

Untersuchungen zur enzymatischen Produktion von Ethylenoxid, Phenol und Naphthol mit der löslichen Methanmonooxygenase

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,

vorgelegt von

Jann Simon Groen

geboren am 22.06.1992 in Gifhorn

Gutachter:

1. Prof. Dr. Markus Pietzsch
2. Prof. Dr. Bruno Bühler
3. Prof. Dr. Thomas Hirth

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.07.2022

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Jann Simon Groen, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht. Die eingereichte schriftliche Fassung der Arbeit entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Weiterhin versichere ich, dass die vorliegende Arbeit noch nicht als Abschlussarbeit an anderer Stelle eingereicht wurde.

Halle (Saale), Datum

Inhaltsverzeichnis und Abkürzungen

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	II
Inhaltsverzeichnis und Abkürzungen	III
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungen	VII
Erläuterungen	VIII
1 Einleitung und Zielsetzung	1
1.1 Einleitung	1
1.1.1 Phenol	1
1.1.2 Naphthol	2
1.1.3 Ethylenoxid	2
1.1.4 Enzymatische Hydroxylierung aromatischer Moleküle	3
1.1.5 Methanotrophe Bakterien.....	5
1.1.6 Methanmonooxygenase.....	6
1.1.7 Multi-Enzym-Kaskaden.....	11
1.1.8 Optimierung von Biotransformationsprozessen.....	14
1.2 Motivation und Zielsetzung	18
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Material	20
2.1.1 Chemikalien.....	20
2.1.2 Puffer und Medien	22
2.1.3 Stammlösungen.....	24
2.1.4 Organismen	24
2.1.5 Vektoren	25
2.1.6 Primer	25
2.1.7 Enzyme, Kits und Reagenzien	25
2.1.8 Geräte	26
2.2 Molekularbiologische Methoden zur Herstellung von MMOB-Varianten.....	28
2.2.1 Amplifikation der MMOB-Gene mittels PCR.....	29
2.2.2 Klonierung der MMOB-Gene in den Vektor pETSUMOadapt.....	29
2.2.3 Transformation von <i>E. coli</i> KRX	30
2.2.4 Kolonie-PCR.....	30
2.3 Mikrobiologische und chromatographische Methoden zur Bereitstellung von sMMO-Komponenten	31
2.3.1 Homologe Produktion der MMOH in <i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b.....	31

2.3.2	Reinigung der MMOH	31
2.3.3	Heterologe Produktion der MMOR in <i>Escherichia coli</i>	31
2.3.4	Reinigung der MMOR	33
2.3.5	Heterologe Produktion von SUMO-MMOB in <i>Escherichia coli</i>	34
2.3.6	Reinigung von wt MMOB	34
2.3.7	Reinigung von MMOB-Varianten	35
2.4	Enzymatische Methoden	35
2.4.1	DCPIP-Assay zur Bestimmung der MMOR-Aktivität	35
2.4.2	Nitrobenzol-Assay zur Bestimmung der sMMO-Aktivität	36
2.4.3	sMMO-katalysierter Umsatz von Nitrobenzol im OxyTherm	36
2.4.4	sMMO-katalysierter Umsatz im diskontinuierlichen HPLC-Assay	37
2.4.5	sMMO-katalysierter Umsatz im Zwei-Phasen-System im Rührkessel-reaktor	38
2.4.6	sMMO-katalysierter Umsatz von Ethylen	39
2.5	Analytische Methoden	43
2.5.1	Proteinkonzentrationsbestimmung	43
2.5.2	Bestimmung des FAD-Gehalts der MMOR	43
2.5.3	SDS-PAGE	43
2.5.4	Agarose-Gelelektrophorese	44
2.5.5	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	44
2.5.6	Gaschromatographie (GC).....	45
2.5.7	Massenspektrometrie	46
3	Ergebnisse	47
3.1	Produktion und Reinigung der sMMO-Komponenten.....	47
3.1.1	Homologe Produktion der Hydroxylase.....	47
3.1.2	Reinigung der Hydroxylase aus <i>M. trichosporium</i> OB3b	47
3.1.3	Rekombinante Produktion der Reduktase.....	48
3.1.4	Rekombinante Produktion der Reduktase im 7,5 L- <i>fed-batch</i> -Prozess	49
3.1.5	Reinigung der Reduktase aus <i>E. coli</i> KRX pET28a_MMOC	50
3.1.6	Rekombinante Produktion von MMOB	56
3.1.7	Reinigung von MMOB.....	57
3.2	Identifizierung umsatzlimitierender Faktoren und Optimierung der Reaktionsbedingungen der sMMO	58
3.2.1	Einsatz von Katalase zur Disproportionierung von Wasserstoffperoxid	59
3.2.2	Einfluss der sMMO-Konzentration	60
3.2.3	Einfluss der Sauerstofflimitierung.....	61
3.2.4	Einfluss der Substratkonzentration	65
3.3	sMMO-katalysierter Umsatz der Zielsubstrate Ethylen, Benzol und Naphthalin	67

3.3.1	Entwicklung des Versuchsaufbaus zum Umsatz von Benzol	67
3.3.2	Entwicklung des Versuchsaufbaus zum Umsatz von Naphthalin	69
3.3.3	Entwicklung des Versuchsaufbaus zum Umsatz von Ethylen.....	71
3.4	Kinetische Untersuchung der sMMO mit Ethylen, Benzol und Naphthalin	73
3.5	Untersuchungen zur Optimierung des enzymatischen Umsatzes von Ethylen, Benzol und Naphthalin	76
3.5.1	Enzymatischer Umsatz von Ethylen.....	76
3.5.2	Enzymatischer Umsatz von Benzol.....	81
3.5.3	Enzymatischer Umsatz von Naphthalin.....	87
3.6	Kombination von Chemo- und Biokatalyse	91
3.6.1	Enzymatischer Umsatz von Produktgemischen aus der Methandehydroaromatisierung im 4-mL-Maßstab.....	91
3.6.2	Enzymatischer Umsatz von Produktgemischen aus der Methandehydroaromatisierung im 350-mL-Maßstab.....	97
3.7	Optimierung des Biokatalysators	100
3.7.1	Rationales Design von Varianten des regulatorischen Protein B.....	100
4	Diskussion	105
4.1	Produktion und Reinigung der sMMO-Komponenten.....	105
4.1.1	Homologe Produktion und Reinigung der MMOH	105
4.1.2	Rekombinante Produktion und Reinigung der MMOR.....	106
4.1.3	Rekombinante Produktion und Reinigung des MMOB	107
4.2	Identifizierung umsatzlimitierender Faktoren und Optimierung der Reaktionsbedingungen der sMMO	108
4.3	Umsatz der Zielsubstrate Ethylen, Benzol und Naphthalin mit der sMMO	111
4.4	Kinetische Untersuchung der sMMO mit Ethylen, Benzol und Naphthalin	113
4.5	Untersuchungen zur Optimierung des enzymatischen Umsatzes von Ethylen, Benzol und Naphthalin	114
4.5.1	Enzymatischer Umsatz von Ethylen im 10-mL- und im 700-mL-Maßstab ...	114
4.5.2	Enzymatischer Umsatz von Benzol im 1- und im 2-Phasen-System	117
4.5.3	Enzymatischer Umsatz von Naphthalin im 1- und 2-Phasen-System.....	120
4.6	Kombination von Chemo- und Biokatalyse	121
4.7	Rationales Design von Varianten des regulatorischen Protein B	124
5	Zusammenfassung	126
6	Ausblick.....	128
7	Literatur	130
8	Anhang	146
8.1	Nukleotidsequenz und Plasmidkarte des Vektors pET28a_mmoc	146

8.2 Nukleotidsequenz und Plasmidkarte des Vektors pETSUMOadapt_mmob.....	148
8.3 Kolonie-PCR von <i>E. coli</i> KRX pETSUMOadapt_mmob-Stämmen	152
8.4 Reinigung von MMOB-Varianten	152
8.5 Präparation der SUMO-Protease scUlp1	153
8.6 Aktivitätsbestimmung gereinigter MMOR-Fractionen	153
8.7 Einfluss organischer Lösungsmittel auf die sMMO-Aktivität	155
8.8 Einfluss von BSA auf die sMMO	155
8.9 HPLC-Kalibrierung.....	156
8.10 GC-Kalibrierung.....	157
8.11 Kalibrierung des Massenspektrometers VarioOne	158
8.12 Untersuchung zum Umsatz der Glucosedehydrogenase	159
8.13 Untersuchung zum Umsatz der Katalase.....	159
Danksagung.....	160
Lebenslauf	161

Abkürzungen

BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
ACN	Acetonitril
AEC	Anionenaustauschchromatographie (<i>anion exchange chromatography</i>)
CA	Cellulose-Acetat
Cat	Katalase
DCPIP	2,6-Dichloroindolphenol
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DHB	Dihydroxybenzol
DHN	Dihydroxynaphthalin
DOPA	Dihydroxyphenylalanin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
GC	Gaschromatographie
GDH	Glucosedehydrogenase
HDH	Hochdruckhomogenisator
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
<i>M. capsulatus</i> Bath	<i>Methylococcus capsulatus</i> Bath
<i>M. trichosporium</i> OB3b	<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b
MBR	Membranreaktor
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MMOB	Protein B der löslichen Methanmonooxygenase
MMOH	Hydroxylase der löslichen Methanmonooxygenase
MMOR	Reduktase der löslichen Methanmonooxygenase
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
SCP	<i>single cell protein</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	Größenausschlusschromatographie (<i>size exclusion chromatography</i>)
sMMO	lösliche Methanmonooxygenase (<i>soluble methane monooxygenase</i>)
SUMO	<i>small ubiquitin-related modifier</i>
TAE-Puffer	Tris-Acetate-EDTA-Puffer
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure (<i>trifluoroacetic acid</i>)
TMA-Puffer	Tris-MES-Acetate-Puffer
tpa	Tris(2-pyridylmethyl)amin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTN	<i>total turnover number</i>

Erläuterungen

In der vorliegenden Arbeit wurde das Fusionsprotein His₆-SUMO-MMOB mit N-terminalem His₆-tag verwendet, welches im weiteren Verlauf als SUMO-MMOB bezeichnet wird.

Die angegebenen Konzentrationen der sMMO beziehen sich auf eine aktive Einheit aus MMOH (αβγ), MMOB und MMOR im molaren Verhältnis von 1:1:1.

In der vorliegenden Arbeit wird die maximale Zykluszahl (*total turnover number*, TTN) des Enzyms folgendermaßen definiert:

$$TTN = \left(\frac{n_{\text{Produkt}}}{n_{\text{Enzym}}} \right) \quad [\text{Chmiel et al., 2018}]$$

Bezogen auf die sMMO ist die TTN definiert als diejenige Anzahl von Hydroxylierungsreaktionen, die von einer katalytisch aktiven Einheit aus MMOH, MMOB und MMOR katalysiert wurden, bis es zur Inaktivierung des Enzyms kam. Die Anzahl der Hydroxylierungsreaktionen wird aus der detektierten Produktmenge und der Anzahl der Hydroxylgruppen des jeweiligen Produktes bestimmt.

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einleitung

1.1.1 Phenol

Phenol ist der einfachste Vertreter der Hydroxy-funktionalisierten Aromaten. Mitte des 19. Jahrhunderts wurde Phenol erstmals nach Extraktion aus Steinkohleteer beschrieben. Die erste Herstellung in Reinform wurde von August Laurent 1851 durchgeführt. [Laurent, 1851]. Aufgrund der bakteriostatischen Wirkung wurde Phenol schon früh zu Desinfektionszwecken genutzt. Im Jahr 1865 setzte Joseph Lister 5 %-ige Phenol-Lösung als eines der ersten Antiseptika in der Chirurgie ein [Römpf-Redaktion und Jahn, 2019]. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde das erste Patent zur Herstellung von Acetylsalicylsäure aus Phenol angemeldet [Hoffmann, 1900]. Wenig später diente Phenol als Ausgangsstoff für die Herstellung des ersten, vollsynthetischen und später industriell produzierten Kunststoffs mit dem Namen „Bakelit“ [Baekeland, 1909]. Seitdem ist der Bedarf an Phenol für die Synthese verschiedener Kunststoffe stetig gestiegen. Mittlerweile wird Phenol als Ausgangsstoff für eine Vielzahl verschiedener Stoffe wie Weichmacher, Detergenzien, Epoxidharze, Kleb- und Farbstoffe verwendet [Römpf-Redaktion und Jahn, 2019]. Im Jahr 2019 betrug der weltweite Phenolbedarf etwa 11 Millionen Tonnen. Der Großteil des produzierten Phenols wird zu Bisphenol A weiterverarbeitet, welches als Grundstoff diverser Kunststoffe, unter anderem zur Herstellung von Plastikflaschen, dient [IHS-Markit, 2020; Weber und Weber, 2010].

1.1.1.1 Herstellung von Phenol

Die selektive Oxidation nicht-funktionalisierter organischer Moleküle stellt unter ambienten Bedingungen einen anspruchsvollen Prozess dar. Die C-H-Bindung von beispielsweise Methan ist mit 105 kcal/mol außerordentlich stabil [Blanksby und Ellison, 2003]. Die Bindungsenergie zwischen Kohlenstoff und Wasserstoff im aromatischen Molekül Benzol ist mit 113 kcal/mol noch höher [Davico *et al.*, 1995]. Die Aktivierung der C-H-Bindung und das Einbringen einer funktionellen Gruppe unter Berücksichtigung der Chemo-, Regio- oder Stereoselektivität stellt hohe Anforderungen an den katalytischen Prozess [Bergman, 2007]. Im Besonderen gilt dies für die direkte und selektive Hydroxylierung von aromatischen Verbindungen wie Benzol oder Naphthalin. Da die Produkte dieser Hydroxylierung elektronenreicher sind und stärkere reduzierende Eigenschaften aufweisen, als die Substrate, kommt es in der Regel zur Weiteroxidation der Produkte [Smith und Norman, 1963]. Die direkte Hydroxylierung von Benzol zu Phenol wurde beispielsweise 2003 als eine der zehn größten Herausforderungen im Bereich der chemischen Katalyse bezeichnet [Cornils und Herrmann, 2003]. Etablierte chemische Prozesse basieren dabei in der Regel auf der Verwendung von Metallkatalysatoren wie Vanadium, Titan oder Palladium [Lücke *et al.*, 2004]. 1987 beschrieben Jintoku *et al.* bereits die direkte Hydroxylierung von Benzol zu Phenol unter der Verwendung von Sauerstoff als Oxidationsmittel und einem $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ -Katalysator. Dabei wurden Drücke von 15 bar Sauerstoff und 15 bar Kohlenstoffmonoxid und Temperaturen bis 180 °C eingesetzt. Hierbei konnte Phenylacetat als Nebenprodukt identifiziert werden. Die maximale Zykluszahl bezogen auf ein Katalysatormolekül (im Folgenden *total turnover number*, TTN) lag nach fünf Stunden zwischen fünf und sechs [Jintoku *et al.*, 1987]. 2015 waren Aratani *et al.* in der Lage, mit H_2O_2 und einem $[(\text{tpa})\text{Mn}^{\text{II}}]^{2+}$ @Al-MCM-41 Katalysator (tpa: Tris(2-pyridylmethyl)amin, Al-MCM-41: mesoporöses Aluminiumsilikat) Phenol mit einer nahezu

100 %-igen Selektivität herzustellen. Die Produktausbeute war hingegen gering ($< 0,1\%$), die TTN des Katalysators betrug etwa 50 und die finale Produktkonzentration nach 25 Stunden 1,3 mM Phenol [Aratani *et al.*, 2015]. Obwohl große Fortschritte bei der chemokatalytischen Hydroxylierung auch unter Verwendung verschiedener Oxidationsmittel wie H_2O_2 , O_2 , oder N_2O erzielt wurden, bleiben geringe Ausbeuten und die Weiteroxidation von Phenolen große Herausforderungen [Fukuzumi und Ohkubo, 2015].

Aufgrund der beschriebenen Schwierigkeiten findet die direkte Hydroxylierung von Benzol zur Herstellung von Phenol bisher keine technische Anwendung.

1.1.1.2 Hock-Prozess

Der größte Anteil ($> 97\%$) des industriell produzierten Phenols wird über den dreistufigen Hock-Prozess hergestellt [Weber und Weber, 2010]. Als Ausgangsstoff dient Benzol, welches größtenteils aus den fossilen Rohstoffen Erdöl und Kohle hergestellt wird [Meng *et al.*, 2021; Mochida *et al.*, 2014; Squires, 1976]. Aus Benzol und Propylen wird zunächst Cumol gebildet. In einer radikalischen Kettenreaktion wird dies zu Cumolhydroperoxid oxidiert und anschließend in saurer Umgebung zu Aceton und Phenol gespalten [Hock und Kropf, 1957]. Bezogen auf die eingesetzte Menge an Benzol werden Phenolausbeuten von ca. 85 % erreicht [University-of-York, 2017]. Die Synthese ist sehr energieintensiv und es kommt neben äquimolaren Mengen Aceton zur Bildung weiterer Nebenprodukte wie Methylstyrol und 2,3-Dimethyl-2,3-diphenylbutan.

Die Synthese von Phenol bietet demnach weiterhin großes Innovationspotenzial. Alternative Katalysemechanismen, wie z. B. die Biokatalyse, rücken hier in den Fokus.

1.1.2 Naphthol

1- und 2-Naphthol sind die beiden einfach-hydroxylierten Derivate des bicyklischen Aromaten Naphthalin. Naphthole spielen eine wichtige Rolle als Zwischenprodukte in verschiedenen organischen Synthesen von Farbstoffen, Pestiziden und Pharmazeutika [Booth, 2000]. Derivate von 2-Naphthol bilden beispielsweise eine wichtige Klasse innerhalb der Azo-Farbstoffe [Mustroph, 2014]. 2-Naphthol dient auch als Ausgangsstoff für die Synthese diverser heterozyklischer Verbindungen, wie beispielsweise Xanthene, Furane und Naphthopyrane, die wichtige Grundbausteine in verschiedenen Medikamenten unter anderem gegen Malaria, Krebs und HIV darstellen [Chaudhary, 2021; Li *et al.*, 2018; Martins *et al.*, 2015]. 1-Naphthol wird ebenfalls zur Herstellung von Farbstoffen und einigen Pharmazeutika verwendet [Bamoniri *et al.*, 2013; Condon *et al.*, 1978]. Auch zur Herstellung des mittlerweile in weiten Teilen der Welt verbotenen Pestizids Carbaryl (Handelsname *Sevin*, Union Carbide) wurde 1-Naphthol verwendet. Traurige Berühmtheit gewann Carbaryl durch die Katastrophe von Bhopal. In einer Fabrik zur Herstellung von Carbaryl in Bhopal (Indien) kam es 1984 zum größten Chemieunglück der Geschichte [Eckerman, 2005].

2-Naphthol wird klassischerweise mittels Sulfonierung aus Naphthalin hergestellt [Bretscher *et al.*, 1978]. 1-Naphthol wird mittels Nitrierung ebenfalls aus Naphthalin hergestellt [Booth, 2000]. Der Großteil des Ausgangsstoffes Naphthalin wird aus fossilen Quellen gewonnen. Naphthalin stellt den Hauptbestandteil von Steinkohleteer dar [Collin und Höke, 2000; Franck und Stadelhofer, 1988].

1.1.3 Ethylenoxid

Anders als die bisher vorgestellten Stoffe Phenol und Naphthol ist Ethylenoxid nicht aromatisch. Ethylenoxid ist ein zyklischer Ether und stellt das einfachste Epoxid dar. Aufgrund der

Ringspannung ist es sehr reaktiv. Das führt zu einer hohen Toxizität, macht Ethylenoxid aber auch äußerst nützlich für organische Synthesen.

Das Gas wird als Gift klassifiziert (UN 1040, [GESTIS-Stoffdatenbank, 2021b]). Das *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH, USA) bestimmte eine Konzentrationsgrenze von 800 ppm Ethylenoxid in der Luft, ab der eine direkte Gefahr für Leben und Gesundheit besteht (*Immediately Dangerous to Life and Health*, IDHL) [The National Institute for Occupational Safety and Health, 2019].

Ethylenoxid wird zur Sterilisation von Lebensmitteln, medizinischen Geräten und Materialien verwendet, für die die Methode der Dampfsterilisation ungeeignet ist. Der Großteil des produzierten Ethylenoxids wird als Zwischenprodukt für die Synthese anderer Chemikalien verwendet. Zu den wichtigsten Produkten, die aus Ethylenoxid hergestellt werden, zählen Ethylenglykol und Polyethylenglykol. Die Glykole werden zur Herstellung von Polyester, Polyethylenterephthalat (PET), Kosmetikprodukten, Pharmazeutika und Weichmachern verwendet [Considine und Considine, 2013; Rebsdats und Mayer, 2001].

Im Jahr 2016 wurden weltweit ca. 34,5 Millionen Tonnen Ethylenoxid produziert [Pinaeva und Noskov, 2020]. Industriell wird Ethylenoxid durch direkte Oxidation von Ethylen mit einem Silber-Katalysator hergestellt. Dabei werden Ausbeuten von bis zu 90 % erreicht [Özbek und Van Santen, 2013]. Der Ausgangsstoff Ethylen wird mittels *steam cracking* unter hohem Energieverbrauch aus fossilen Rohstoffen gewonnen [Amghizar et al., 2017].

Sowohl für die Produktion von Naphtholen als auch für Ethylenoxid ist bisher keine biotechnologische Produktionsstrategie in der Anwendung.

1.1.4 Enzymatische Hydroxylierung aromatischer Moleküle

Für biokatalytische Prozesse werden Enzyme, isoliert oder als Bestandteile von ganzen Zellen oder Organismen, genutzt. Die enzymatische Hydroxylierung von C-H-Bindungen mittels Oxygenasen bietet eine vielversprechende, biobasierte Alternative zur chemischen Katalyse. Die erste enzymatische Hydroxylierung aromatischer Verbindungen wurde 1952 im, zu den Schimmelpilzen zählenden *Rhizopus arrhizus*, nachgewiesen [Peterson et al., 1952]. Die später in allen Domänen der Biosystematik nachgewiesene Enzymklasse wurde 1957 von Hayaishi als „Oxygenasen“ deklariert [Estabrook, 2003]. Oxygenasen nutzen O_2 oder H_2O_2 zur selektiven Hydroxylierung organischer Moleküle und ermöglichen Prozesse unter ambienten Bedingungen [Lock et al., 2017]. Monooxygenasen sind in der Lage, ein Sauerstoffatom aus O_2 in eine organische Verbindung einzubringen. Dioxygenasen übertragen beide Sauerstoffatome auf das Substrat. Die vorrangig in Pflanzen und Pilzen vorkommenden Peroxygenasen nutzen Peroxide als Sauerstoffdonatoren. Basierend auf dem Reaktionsmechanismus und dem Vorhandensein externer Protonendonatoren werden die Mono- und Dioxygenasen nach der *Enzyme Commission* (EC) in die zwei Hauptklassen EC 1.13. und EC 1.14. unterteilt. Die Peroxygenasen nehmen die Klasse EC 1.11. ein. Eine Übersicht verschiedener Oxygenasen, welche aromatische Moleküle hydroxylieren können, ist in Tabelle 1.1 dargestellt. Die meisten Oxygenasen nutzen Metallionen als Cofaktoren im aktiven Zentrum zur Generierung reaktiver Sauerstoffspezies, welche in der Lage sind, die stabilen C-H-Bindungen organischer Moleküle anzugreifen. Die Toluolmonooxygenase besitzt beispielsweise ein Carboxylat-verbrücktes Nicht-Häm-di-Eisen-Zentrum [Lippard, 2005]. Die Fettsäurehydroxylase (Cytochrom P450 BM3, EC 1.14.14.1) und auch verschiedene Peroxygenasen und Peroxidasen besitzen einen über Cysteine oder Histidine gebundenen, Eisenion-haltigen Häm-Cofaktor [Branchaud, 2000; van Rantwijk und Sheldon, 2000; Warman et al., 2005].

Tabelle 1.1: Übersicht verschiedener Oxygenasen zur Hydroxylierung von aromatischen Verbindungen; modifiziert auf Grundlage von [Ullrich und Hofrichter, 2007]

Enzym	Organismus	Substrat	Produkt	Aktives Zentrum	Referenz
Benzol-dioxygenase	<i>Pseudomonas putida</i>	Benzol	Cyclohexa-3,5-dien-1,2-diol	Nicht-Häm-Eisen-Zentrum + Eisen-Schwefel-Cluster	[Bagn��ris <i>et al.</i> , 2005; Mason <i>et al.</i> , 1997]
Naphthalin-dioxygenase	<i>Pseudomonas putida</i>	Naphthalin	1,2-Dihydronaphthalin-1,2-diol	Eisen-Schwefel-Cluster	[Ferraro <i>et al.</i> , 2005; Ferraro <i>et al.</i> , 2017]
Phenylalanin-hydroxylase	<i>Homo sapiens</i>	Phenylalanin	Tyrosin	Eisen + Tetrahydropterin	[Teigen <i>et al.</i> , 2005]
Toluol-monooxygenase	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Toluol	Cresol	Nicht-H��m-Di-Eisen-Zentrum	[Lippard, 2005]
Fetts��ure-hydroxylase (Cytochrom P450 BM3)	<i>Bacillus megaterium</i>	Fetts��uren	ω -Hydroxy-Fetts��uren	H��m-Eisen-zentrum	[Warman <i>et al.</i> , 2005]
Tyrosinase	aerobe Organismen	Tyrosin	Dihydroxyphe-nylalanin (Dopa)	Kupfer-Zentrum	[Halaoui <i>et al.</i> , 2006; Kim und Uyama, 2005]
Unspezifische Peroxygenase	<i>Agrocybe aegerita</i>	Benzol Naphthalin	Phenol, Chinon, Catechol Naphthol	H��m-Eisen-zentrum	[Hofrichter und Ullrich, 2006; Pecyna <i>et al.</i> , 2009]
Hydroxyben-zoathydroxylase	Aerobe Prokaryoten	4-Hydroxy-benzoesäure	3,4-Dihydroxy-benzoesäure	FAD (ohne Metallionen)	[Ballou <i>et al.</i> , 2005]
Lösliche Methan-monooxygenase	<i>Methylosinus trichosporium</i>	Methan	Methanol	Nicht-H��m-Di-Eisen-Zentrum	[Jones <i>et al.</i> , 2020; Tonge <i>et al.</i> , 1977]

Die Hydroxybenzoathydroxylase hingegen ist FAD-abhängig und bildet ein Peroxyflavin-Intermediat als oxygenierende Spezies zur Produktion von 3,4-Dihydroxybenzoesäure [Ballou *et al.*, 2005].

Die Fähigkeit unsubstituierte Aromaten wie Benzol zu hydroxylieren, konnte für verschiedene Oxygenasen gezeigt werden. Die Benzoldioxygenase (EC 1.14.12.3) aus *Pseudomonas putida* dihydroxyliert Benzol zu Cyclohexa-3,5-dien-1,2-diol und löst damit den aromatischen Charakter des Benzolrings auf [Bagn  ris *et al.*, 2005]. Die Peroxygenase aus dem Pilz *Agrocybe aegerita* (EC 1.11.2.1) katalysiert unter Beibehaltung der aromatischen Eigenschaft die Hydroxylierung von Benzol zu Phenol, welches ebenfalls ein Substrat des Enzyms ist und weiter zu Hydrochinon und Brenzkatechin umgesetzt wird [Karich *et al.*, 2013].

Die enzymatische Produktion von Phenol aus Benzol mit dem Fokus auf hoher Produktausbeute ist bisher in der Literatur wenig beschrieben. Mit immobilisierter Meerrettichperoxidase (EC 1.11.1.7) konnten innerhalb von 20 Minuten 91 μ M Phenol gebildet werden [Akasaka *et al.*, 1995]. Karich *et al.* beschrieben die Produktion von 280 μ M eines Gemisches aus *p*-Benzochinon, Hydrochinon, Brenzkatechin und Phenol mit der unspezifischen Peroxygenase aus *A. aegerita* [Karich *et al.*, 2013]. Shoji und Watanabe zeigten den Umsatz von Benzol zu Phenol mit der Fetts  urehydroxylase Cytochrom P450BM3 unter Verwendung von K  dermolek  len [Shoji *et al.*, 2013]. Diese Moleküle sind den nativen Substraten der P450BM3 struk-

turell ähnlich, werden jedoch nicht umgesetzt. Sie binden in der Substratbindetasche des Enzyms und induzieren dadurch die Aktivierung von molekularem Sauerstoff im aktiven Zentrum. Kleinere Moleküle können in das aktive Zentrum diffundieren und werden hydroxyliert [Kawakami et al., 2011]. In einer Reaktion über 12 Stunden konnten mit 25 µM P450BM3 1 mM Phenol hergestellt werden [Shoji et al., 2017].

Ein weiteres Enzym, welches Benzol zu Phenol zu hydroxylieren kann, ist die lösliche Methanmonooxygenase (sMMO, EC 1.14.13.25). Bereits 1977 wurde die Aktivität der sMMO aus *Methylococcus capsulatus* Bath (MCB) gegenüber einer großen Anzahl von Substraten, unter anderem Benzol, nachgewiesen [Colby et al., 1977]. Die Methanmonooxygenase ist ein Enzym, welches in obligat aeroben methanotrophen Bakterien (Kapitel 1.1.5) vorkommt und für die Fixierung von Methan als Kohlenstoff- und Energiequelle zuständig ist.

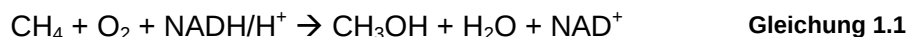
1.1.5 Methanotrophe Bakterien

Methanotrophe sind gramnegative Proteobakterien, die Methan als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen können. Die erste Beschreibung von methanotrophen Organismen erfolgte 1906 durch N. Söhngen [Söhngen, 1906]. Die intensive Charakterisierung methanotropher Bakterien erfolgte 64 Jahre später durch R. Whittenbury und Kollegen [Whittenbury et al., 1970]. Die bis heute gültige Klassifizierung teilt die Methanotrophen in drei Gruppen ein: Typ I, Typ II und Typ X. Diese unterscheiden sich im Stoffwechsel und in der Morphologie der ausgebildeten Membranstrukturen. Generell sind Typ I Methanotrophe γ-Proteobakterien und assimilieren Formaldehyd über den Ribulosemonophosphat-Weg. Typ II Methanotrophe sind α-Proteobakterien und nutzen dazu den Serin-Weg. Da es bei der Einordnung der Methanotrophen viele Ausnahmen gibt, wurde der Typ X als zusätzliche Gruppe etabliert, welche ebenfalls den γ-Proteobakterien zuzuordnen ist und gleichzeitig Proteine des Serin-Stoffwechselweges ausbildet [Hanson und Hanson, 1996; Park und Lee, 2013]. Zu den prominentesten Vertretern der Methanotrophen zählen der Typ II-Stamm *Methylosinus trichosporium* OB3b und der Typ X-Stamm *Methylococcus capsulatus* Bath. Das Genom von *M. capsulatus* Bath wurde 2004 und das von *M. trichosporium* OB3b 2010 vollständig sequenziert [Stein et al., 2010; Ward et al., 2004].

Methanotrophe Bakterien bieten großes Potenzial zur biotechnologischen Anwendung, vor allem unter dem Aspekt der *Green Chemistry*, da mit Methan als Substrate ein klimaschädliches Treibhausgas gebunden werden kann. *M. capsulatus* Bath wird bereits zur Herstellung von single-cell-protein (SCP) als proteinreicher Tierfutterzusatz eingesetzt [Øverland et al., 2010; Petersen et al., 2017]. Seit 2016 betreibt die Firma Calysta (USA) eine Anlage zur SCP-Produktion aus Methan mit Methanotrophen [Calysta-Inc., 2020; Silverman, 2016]. Die Herstellung von biobasierten Polymeren wie Polyhydroxybutyrat (PHB) ist ebenfalls Gegenstand aktueller Forschung. Verschiedene methanotrophe Stämme, unter anderem *M. trichosporium* OB3b, konnten bereits für die Synthese von PHB eingesetzt werden [Wendlandt et al., 2005; Zhang et al., 2008]. Andere biotechnologische Prozesse, in denen methanotrophe Bakterien Anwendungsmöglichkeiten finden, sind die Herstellung von Lipiden als Treibstoff oder als Nahrungsmittelzusatz, sowie die Herstellung von Vitamin B12 oder Ectoin [Strong et al., 2015]. Derzeit werden verschiedene Prozesse erforscht, in denen Methanotrophe eingesetzt werden, um Methan zu fixieren und lösliche, organische Metaboliten, wie Methanol, Formaldehyd und organische Säuren herzustellen [AlSayed et al., 2018; Wang et al., 2021].

1.1.6 Methanmonooxygenase

Das Schlüsselenzym im Methanstoffwechsel der beschriebenen Organismen ist die Methanmonooxygenase (MMO). Die MMO ist für die Fixierung des Methans zuständig und nutzt molekularen Sauerstoff zur Oxidation von Methan zu Methanol.



Die meisten methanotrophen Stämme bilden eine membrangebundene partikuläre Methanmonooxygenase (pMMO, EC 1.14.18.3). Einige Organismen, wie *M. trichosporium* OB3b und *M. capsulatus* Bath, sind außerdem in der Lage eine lösliche Methanmonooxygenase (sMMO, EC 1.14.13.25) zu bilden. Die Expression der beiden Gene für die verschiedenen Formen der MMO wird über den sogenannten *copper-switch* reguliert [Cornish *et al.*, 1984]. Unter Kupfermangel wird die lösliche Form der MMO gebildet. Ab einem Kupfer-zu-Biomasse-Verhältnis von 0,55 – 1,66 µmol/gBTM wird die partikuläre Form gebildet [Jahng und Wood, 1996; Lloyd *et al.*, 1999; Murrell *et al.*, 2000]. Beide MMOs zeichnen sich durch eine komplexe Struktur aus. Die wesentlichen Unterschiede sind zum einen die Lokalisation der MMOs und zum anderen die aktiven Zentren. Die sMMO besitzt ein Nicht-Häm-Di-Eisen-Zentrum während die pMMO Kupferionen im aktiven Zentrum bindet [Chan *et al.*, 2021; Sirajuddin und Rosenzweig, 2015]. Detailliert verglichen werden die verschiedenen Formen der MMO in einem Review von M. Ross und A. Rosenzweig [Ross und Rosenzweig, 2017]. Für die sMMO ist eine Vielzahl an akzeptierten Substraten beschrieben. Neben dem nativen Substrat Methan kann die sMMO verschiedene gesättigte oder ungesättigte, zyklische, aromatische und halogenierte Kohlenwasserstoffe hydroxylieren. Die Anzahl der identifizierten Substrate liegt über 100 [Borodina *et al.*, 2007]. Dieses große Substratspektrum bietet Potenzial zur vielseitigen biotechnologischen Anwendung der sMMO. Bei enzymatischer Synthese bestimmter organischer Verbindungen ist allerdings auch zu beachten, dass es durch die breite Substratspezifität auch zur Bildung von Produktgemischen kommen kann, da auch primäre Hydroxylierungsprodukte als Substrate dienen können.

Die sMMO ist ein Multiproteinkomplex bestehend aus drei Komponenten, der Hydroxylase (MMOH), dem regulatorischen Protein B (MMOB) und der Reduktase (MMOR), welche in den folgenden Kapiteln näher beschrieben werden.

Innerhalb der Methanotrophen sind die Gensequenzen der sMMO zum Teil hoch konserviert. Zwischen den Stämmen *M. trichosporium* OB3b und *M. capsulatus* Bath liegt die Sequenzidentität der Untereinheiten der sMMO zwischen 42 und 82 %. Die sMMO zeigt auch strukturelle Ähnlichkeit zu anderen Monooxygenasen, wie beispielsweise der Toluolmonooxygenase, welche ebenfalls über ein Carboxylat-verbrücktes Nicht-Häm-Di-Eisen-Zentrum verfügt [Coufal *et al.*, 2000].

1.1.6.1 MMOH

Die Hydroxylase (MMOH, 245 kDa) besitzt eine hetero-hexamere Struktur aus zwei α-, zwei β- und zwei γ-Untereinheiten. Das aktive Zentrum ist ein über zwei Histidin und vier Glutaminsäure-Reste koordiniertes Nicht-Häm-Di-Eisen-Cluster in der α-Untereinheit. Als funktionelle Einheit wird ein Trimer aus α, β, γ bezeichnet. Die Kristallstruktur der MMOH und das aktive Zentrum sind in Abbildung 1.1 dargestellt. Anhand der Kristallstruktur und des Vergleiches mit anderen bakteriellen Multiprotein-Monooxygenasen wurde eine 12 Å lange Pore identifiziert, welche einen Elektronen- und Protonentransfer vom umgebenden Lösungsmittel zum aktiven Zentrum erlaubt [Elango *et al.*, 1997; Rosenzweig *et al.*, 1997]. Der genaue

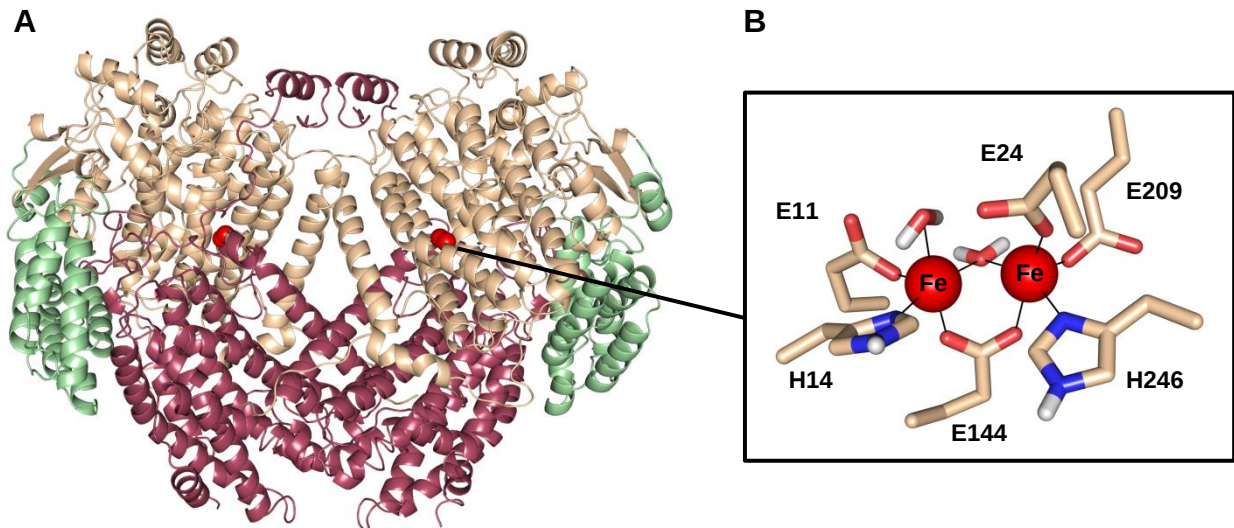


Abbildung 1.1: Röntgenkristallstruktur der Hydroxylase aus *M. trichosporium* OB3b (PDB: 1MTY, 1MHZ); A: Heterohexamer $\alpha_2\beta_2\gamma_2$; beige: α -Untereinheit; violett: β -Untereinheit; grün: γ -Untereinheit; rot: Eisenionen im aktiven Zentrum der α -Untereinheit; B: Carboxylat- und Histidin-verbrücktes Di-Eisen-Zentrum [Elango et al., 1997; Rosenzweig et al., 1997]; Abbildung erstellt mit *pymol*.

Transfer der Substrate Sauerstoff und Methan in das aktive Zentrum ist noch nicht abschließend geklärt. Ein aus drei Kavitäten bestehender Kanal mit einer Länge von 35 – 40 Å bietet eine mögliche Route für den Substrat- und Produkttransfer zwischen aktivem Zentrum und umgebenden Lösungsmittel. Der Übergang zwischen den Kavitäten 1 und 2 ist durch eine Phenylalanin- oder Tryptophan-Seitenkette blockiert [Jones et al., 2020; Lee et al., 2013]. Die Bindung von MMOB im Verlauf des katalytischen Zyklus führt zu einer strukturellen Änderung der MMOH, wodurch der Übergang zwischen den Kavitäten 1 und 2 ermöglicht wird [Banerjee et al., 2019]. Erst 2020 wurde mit Hilfe von Kristallstrukturen ein weiterer Tunnel identifiziert, dessen Zugang durch die Aminosäure W308 kontrolliert wird, und der aufgrund seiner Größe und seiner hydrophoben Umgebung einen möglichen Kanal für einen Transfer von Sauerstoff darstellt [Jones et al., 2020]. Die Bindung von MMOB induziert auch in dem W308-Tunnel strukturelle Änderungen, die einen Sauerstofftransfer unterstützen. Möglicherweise dient der W308-Tunnel auch als Substratkanal für Methan [Jones et al., 2020].

MMOB beeinflusst durch die Bindung nicht nur den Zugang der Substrate. Es konnten Veränderungen in der Koordination des Di-Eisen-Zentrums nachgewiesen werden, welche zu einer Veränderung des Redoxpotenzials und damit zu einer beschleunigten Bildung von reaktiven Übergangszuständen innerhalb des Katalysemechanismus führen [Chang et al., 1999]. Die Region, an die sowohl MMOB als auch MMOR im Reaktionsverlauf binden, nennt sich Canyon-Region. Durch die Bindung von MMOB wird auch der Zugang zur Pore blockiert und damit Elektronentransfer kontrolliert [Wang et al., 2014].

MMOH ist in der Lage, auch ohne Kooperation mit MMOB Methan zu hydroxylieren, jedoch verläuft die Reaktion mit MMOB um den Faktor 150 schneller [Liu et al., 1995b]. Der Katalysemechanismus ist in Kapitel 1.1.6.4 detaillierter beschrieben.

1.1.6.2 MMOB

Das regulatorische Protein B (MMOB, 14,8 kDa) besitzt selbst kein katalytisches Zentrum. Die Struktur von MMOB von *M. trichosporium* OB3b wurde von Chang et al. 1999 veröffentlicht und ist in Abbildung 1.2A dargestellt [Chang et al., 1999]. MMOB besitzt eine hochstrukturierte Kernregion, während sowohl N- (Aminosäuren 1 – 35) als auch C-Terminus (Aminosäuren 127 – 138) keine rigide Struktur aufweisen. Beide Termini scheinen für die sMMO-

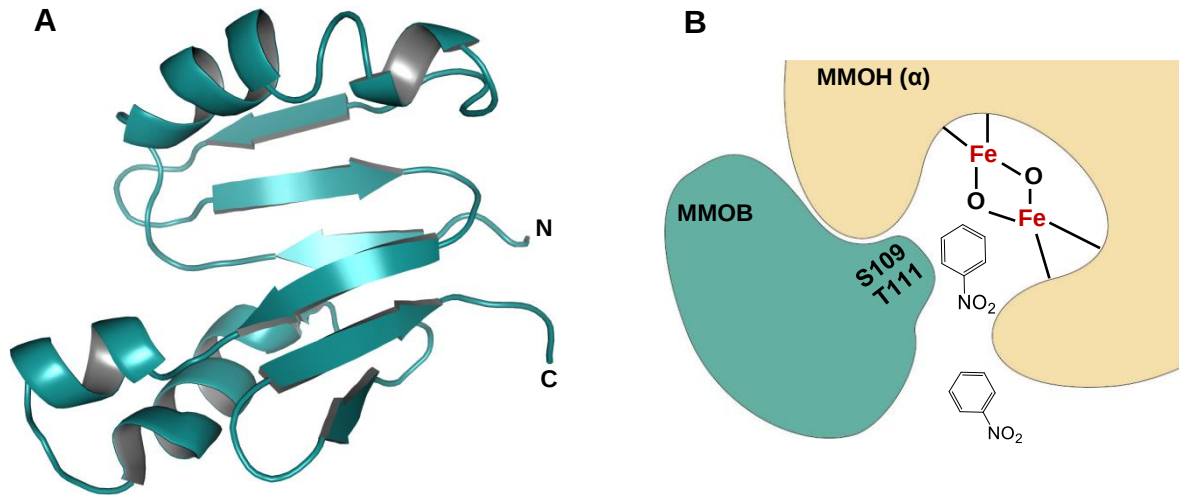


Abbildung 1.2: A: NMR-Struktur des regulatorischen Protein B (MMOB) aus *M. trichosporium* OB3b (PDB 2MOB) [Chang et al., 1999]; Abbildung erstellt mit *pymol*; B: schematische Darstellung der Interaktion von MMOB mit der α -Untereinheit der MMOH; Kontrolle des Substratzugangs zum aktiven Zentrums durch die Aminosäuren S109 und T111 der MMOB; Modells substrat Nitrobenzol dargestellt; Abbildung modifiziert auf Grundlage von [Wallar und Lipscomb, 2001].

Aktivität essenziell zu sein. Eine Deletion der ersten sechs N-terminalen Aminosäuren von MMOB aus *M. capsulatus* Bath führte zum Verlust der sMMO-Aktivität [Callaghan et al., 2002]. C-terminal verkürzte Varianten zeigten ebenfalls deutlich geringere Umsatzraten und eine erhöhte Freisetzung von Peroxiden [Zhang et al., 2006].

Untersuchungen mit anderen Substraten, als dem natürlichen Methan, zeigten, dass die Bindung von MMOB an die Canyon-Region der MMOH einen Einfluss auf die Substrat- und Regiospezifität hat. Schematisch ist dies in Abbildung 1.2B dargestellt.

Mittels Mutagenesestudien wurden verschiedene Aminosäuren identifiziert, die sich innerhalb der strukturierten Kernregion befinden und für die Interaktion mit der MMOH relevant sind [Wallar und Lipscomb, 2001]. Die Position 111 liegt an der Proteinoberfläche und beeinflusst die Affinität von MMOB zur MMOH [Zhang et al., 2006]. Ein Austausch von Threonin 111 zur kürzeren und unpolaren Seitenkette Alanin führte zu einem leichten Anstieg der sMMO-Aktivität gegenüber dem Modells substrat Nitrobenzol. Der Austausch zur voluminöseren Seitenkette Tyrosin führte zu einer Verringerung der Affinität zur MMOH und gleichzeitig zu einer Veränderung der Regiospezifität für das Substrat Nitrobenzol [Brazeau und Lipscomb, 2003]. Als zweite relevante Position wurde Serin 109 identifiziert. Ein Austausch zu Alanin hatte ebenfalls einen positiven Effekt auf die sMMO-Aktivität. In der Variante S109A/T111A konnte eine Synergie der zuvor beschriebenen positiven Effekte beobachtet werden. Die sMMO-Aktivität gegenüber Nitrobenzol konnte um den Faktor 1,2 – 1,7 gesteigert werden [Brazeau und Lipscomb, 2003].

1.1.6.3 MMOR

Die Reduktase (MMOR, 38 kDa) ist der Enzymklasse der Ferredoxin-NAD(P)-Oxidoreduktasen zuzuordnen und transportiert pro Reaktionszyklus zwei Elektronen vom Cofaktor NADH zum aktiven Zentrum der MMOH. Bisher konnten lediglich die NMR-Strukturen der C-terminalen FAD- und der N-terminalen Ferredoxin-Domäne von *M. capsulatus* Bath unabhängig voneinander bestimmt werden [Chatwood et al., 2004; Müller et al., 2002]. Diese sind in Abbildung 1.3 dargestellt. Im Verlauf des Katalysezyklus bindet zunächst NADH an die Bindestelle (Rossmannspalte) der C-terminalen FAD-Domäne. Über zwei *Charge-transfer*-Komplexe (CT1, CT2) werden zwei Elektronen sequenziell von NADH

auf FAD übertragen. Parallel zur Freisetzung des oxidierten NAD⁺ findet die intramolekulare Übertragung der Elektronen vom nun reduzierten FADH⁻ zum (2Fe-2S)-Cluster statt. Dabei wird ein Flavin-Semichinon gebildet. Nach der schrittweisen Reduktion des (2Fe-2S)-Clusters folgt die intermolekulare Elektronenübertragung auf das Nicht-Häm-Di-Eisen-Zentrum der MMOH [Merkx *et al.*, 2001].

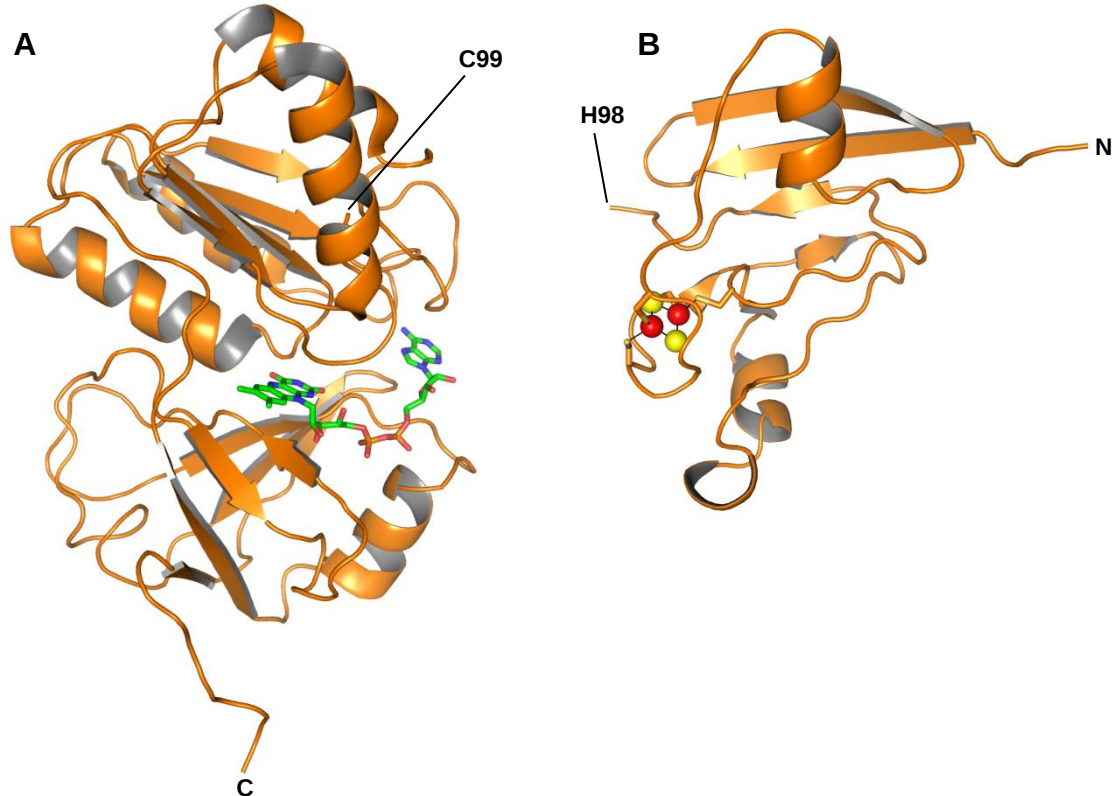


Abbildung 1.3: NMR-Strukturen von Domänen der Reduktase aus *M. capsulatus* Bath; A: C-terminale Domäne (C99 – A348; PDB 1TVK); gebundener Cofaktor FAD in Stabmodell dargestellt [Chatwood *et al.*, 2004]; B: N-terminale Domäne (M1 – H98; PDB 1JQ4); Eisen (rot)-Schwefel (gelb)-Cluster in Kugelmodell dargestellt; Eisen-koordinierende Cystein-Seitenketten in Stabmodell dargestellt [Müller *et al.*, 2002]; Abbildungen erstellt mit *pymol*.

1.1.6.4 Reaktionszyklus

Für den katalytischen Prozess der sMMO zur Hydroxylierung von Methan ist eine komplexe Dynamik der Komponenten MMOH, MMOB und MMOR essenziell. Der Katalysemechanismus ist seit mindestens 40 Jahren Gegenstand intensiver Forschung [Banerjee *et al.*, 2019; Jones *et al.*, 2020]. Aus zahlreichen Untersuchungen wird folgender Katalysemechanismus (Abbildung 1.4) angenommen: Liegt die Hydroxylase im oxidierten Zustand vor (H^{ox}), ist die Affinität der MMOR zur MMOH höher als die von MMOB. Zunächst bindet MMOR an die Canyon-Region und liefert Elektronen von NADH an H^{ox} . Diese werden vom reduzierten (2Fe-2S)-Cluster in MMOR über ein Netzwerk aus Wasserstoffbrücken in der hydrophilen Pore an das Nicht-Häm-Di-Eisen-Zentrum H^{ox} der MMOH gegeben. Die beiden Eisenionen wechseln ihre Oxidationsstufen von +3 zu +2 (H^{red}). Als Aminosäuren, die am Elektronentransport beteiligt sind, wurden T213, N214 und E240 identifiziert [Banerjee *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2013]. Über dieselbe Pore werden die benötigten Protonen in Form von Hydroniumionen geliefert. Im reduzierten Zustand ist die Affinität des MMOB zur MMOH höher, MMOR dissoziiert von der H^{red} . MMOB bindet an die Canyon-Region und induziert strukturelle Änderungen der MMOH, die den Substratkanal für Sauerstoff und Methan öffnen (siehe Kapi-

tel1.1.6.1, Seite 6) und die Reaktivität der Eisenionen erhöhen [Jones et al., 2020]. Außerdem blockiert MMOB den Zugang zur Pore und verhindert damit den Transport überschüssiger Elektronen [Wang et al., 2014; Wang et al., 2015]. Im Folgenden durchläuft das aktive Zentrum der MMOH verschiedene intermediäre Zustände mit unterschiedlichen Oxidationsstufen. Die Aufklärung der einzelnen Stufen erfolgte unter anderem mit Aufnahme optischer und Elektronenspinresonanz-Spektren [Banerjee et al., 2019]. In Abbildung 1.4 ist der Zyklus, der verschiedenen Übergangszustände schematisch dargestellt.

Der Komplex aus H^{red} und MMOB reagiert mit Sauerstoff und bildet das Intermediat **O** [Liu et al., 1995a]. Dabei ist das O_2 -Molekül im aktiven Zentrum lokalisiert aber nicht an das Di-Eisen-Zentrum gebunden. In den Zuständen **P*** und **P** wird das Sauerstoffmolekül gebunden und über einen Metall-zu-Ligand-Elektronentransfer aktiviert. Das ermöglicht die Spaltung der O-O-Bindung, wodurch sich der hochreaktive Übergangszustand **Q** bildet. Aufgrund der geometrischen Koordination der Sauerstoffatome mit Fe^{IV} -Ionen wird dieser Zustand auch als *diamond core* bezeichnet [Banerjee et al., 2013; Lee und Lipscomb, 1999; Tinberg und Lippard, 2009]. Der Zustand **Q** reagiert direkt mit Methan. Vermutlich wird zunächst ein Wasserstoffatom abstrahiert, was zur Ausbildung eines Methylradikals und eines gebundenen Hydroxylradikals führt (**R**). Die beiden Radikale rekombinieren und bilden Methanol (**T**). MMOH befindet sich wieder im oxidierten Zustand H^{ox} und Methanol wird freigesetzt. Aufgrund der veränderten Affinität dissoziiert MMOB von der H^{ox} und MMOR bindet zum Start des neuen Zyklus. Die Methanfreisetzung als letzter Schritt den Reaktionszyklus wurde als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Reaktion identifiziert [Lee et al., 1993]. In Abwesenheit von MMOB ist die Bildung von **O** und **P*** verlangsamt und bestimmt die Reaktionsgeschwindigkeit.

Einige Hypothesen zum Katalysemechanismus werden weiterhin intensiv diskutiert, insbe-

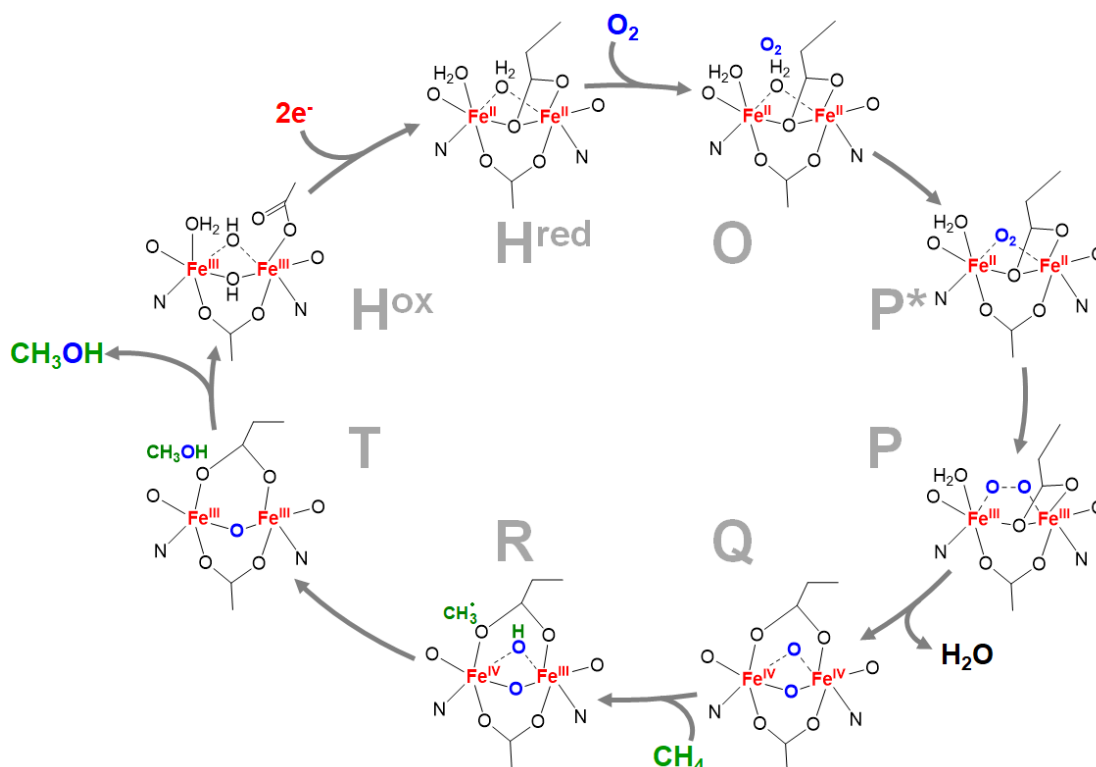


Abbildung 1.4: Reaktionszyklus der sMMO im aktiven Zentrum der MMOH-α-Untereinheit; Darstellung der Intermediären Zustände H^{ox} , H^{red} , **O**, **P***, **P**, **Q**, **R**, **T**. Abbildung modifiziert auf Grundlage von [Banerjee et al., 2019].

sondere die Architektur des Übergangszustandes **Q** und der Substratkanal. Auch die Ergebnisse von Paulsen *et al.* lassen sich nicht in allen Teilen mit dem zuvor beschriebenen Katalysemechanismus in Einklang bringen. Sie untersuchten die Redox-Potenziale und Dissoziationskonstanten einzelner Oxidationsstufen des MMOH-MMOB-Komplexes. Für die Bindung zwischen H^{ox} und MMOB bestimmten sie einen K_d Wert von 8 nM, während für die Bindung zwischen H^{red} und MMOB der K_d -Wert mit 500 μM mehrere Größenordnungen höher war [Paulsen *et al.*, 1994]. Dementsprechend bindet MMOB bevorzugt an H^{ox} und weniger stark an H^{red} . Nach dem beschriebenen Katalysemechanismus bindet jedoch MMOR an den oxidierten Zustand der MMOH (H^{ox}) und der entstehende MMOH-MMOR-Komplex müsste demnach einen noch geringeren K_d -Wert ausweisen. Dies konnte experimentell jedoch bisher nicht bestätigt werden und wird dementsprechend weiter diskutiert [Liu *et al.*, 1997; Paulsen *et al.*, 1994]. Unstrittig ist, dass **Q** den stärksten oxidierenden Zuständen in der Natur zuzuordnen ist [Banerjee *et al.*, 2019].

Sowohl für die sMMO aus *M. trichosporium* OB3b als auch für die sMMO aus *M. capsulatus* Bath wurde eine Entkopplung des Elektronentransfers von der Produktbildung beobachtet. Grund dafür sind verschiedene Nebenreaktionen. MMOR kann in Abwesenheit der Hydroxylase die Elektronen von NADH auf Sauerstoff übertragen, was zur Bildung von H_2O_2 führt [Gassner und Lippard, 1999; Zhang und Lipscomb, 2006]. MMOH ist ebenfalls in der Lage H_2O_2 zu bilden, wenn kein Kohlenwasserstoff als Substrat vorliegt [Valentine *et al.*, 1999]. Aufgrund der Nebenreaktionen verbraucht die sMMO mehr NADH, als Zielprodukt gebildet wird. Das Verhältnis zwischen Elektronenverbrauch und Zielproduktbildung wird als Koppelungseffizienz definiert ist unter anderem abhängig von dem eingesetzten Substrat und dem stöchiometrischen Verhältnis der sMMO-Komponenten. Des Weiteren wurde für die Hydroxylase eine Peroxidase-Aktivität nachgewiesen werden. Der Zustand **P** kann aus H^{ox} auch über den „peroxide shunt“ erreicht werden, bei dem H_2O_2 als Elektronen und Protonendonor dient [Froland *et al.*, 1992]. Vergleichbare Beobachtungen wurden auch für andere Monooxygenasen, wie z. B. der Butanmonooxygenase [Dubbels *et al.*, 2007] und Cytochrom P450 [Loida und Sligar, 1993; Schleizinger *et al.*, 2006] gemacht. In Experimenten mit der sMMO aus *M. trichosporium* OB3b und dem Modells substrat Nitrobenzol konnte A. Griethe die Entkopplung des Elektronentransfers von der Bildung des Zielprodukts p-Nitrophenol zeigen. Die Koppelungseffizienz lag zwischen 3 und 30 %. Außerdem konnte eine Akkumulation von 100 – 300 μM H_2O_2 nachgewiesen werden. Trotz der Peroxidase-Aktivität hat H_2O_2 einen inhibitorischen Effekt auf die sMMO. Konzentrationen zwischen 107 und 145 μM verringern die sMMO-Aktivität um 50 % (IC_{50}) [Griethe, 2018]. Die Entkopplung des Elektronentransfers und die damit zusammenhängende Bildung von inhibitorischem Wasserstoffperoxid werden als maßgebliche Gründe dafür betrachtet, weshalb die beobachtete Zielproduktbildung der sMMO nach wenigen Minuten stagniert und dementsprechend nur geringe Ausbeuten erzielt werden [Griethe, 2018].

1.1.7 Multi-Enzym-Kaskaden

Die Optimierung von chemischen und biotechnologischen Herstellungsverfahren stellt eines der wichtigsten Ziele in der Forschung dar. In den letzten Jahrzehnten hat neben dem ökonomischen Aspekt auch der ökologische Effekt eines Prozesses an Relevanz gewonnen [Noyori, 2009; Woodley, 2008]. Sowohl bei der Auswahl der Ressourcen, als auch bei dem Produktionsprozess selbst müssen Aspekte der *green chemistry*, wie Nachhaltigkeit und Umweltverträglichkeit, beachtet werden [Zimmerman Julie *et al.*, 2020]. Eine Alternative zur chemischen Synthese organischer Moleküle ist die Biokatalyse unter Verwendung von En-

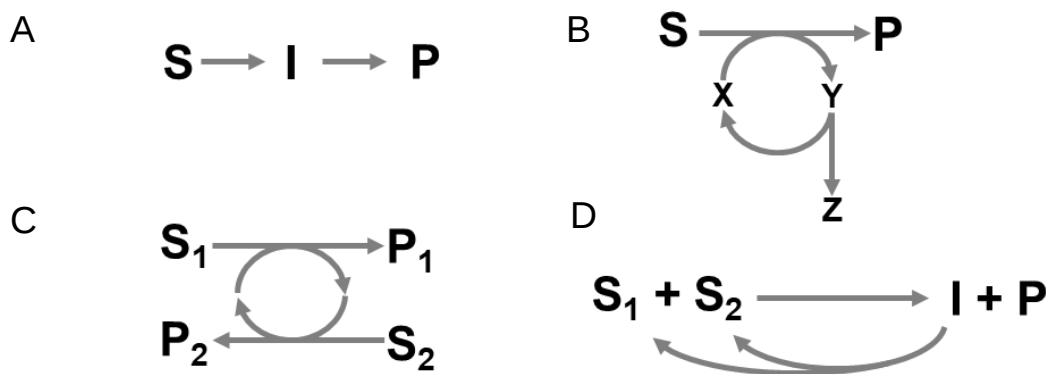


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung von Reaktionskaskaden, Einteilung nach Ricca et al.; S: Substrat; I: Intermediat/Zwischenprodukt; P: Zielprodukt; X, Y, Z: Nebenprodukt; A: lineare Kaskade; B: orthogonale Kaskade; C: parallele Kaskade; D: zyklische Kaskade; Abbildung modifiziert basierend auf [Ricca et al., 2011].

zymen oder Mikroorganismen. Um den energetischen und technischen Aufwand eines Prozesses zu verringern, bietet sich die Kombination mehrerer Reaktionen einer Synthese in einem Schritt an. Da viele Enzyme unter Bedingungen, die dem Cytosol von Zellen gleichen, optimale katalytische Eigenschaften zeigen, können diese häufig in *one-pot*-Reaktionen eingesetzt werden. Dieses Potenzial wurde in den letzten Jahren zunehmend genutzt und es wurden diverse Multi-Enzym-Kaskaden zur Synthese komplexer organischer Produkte entwickelt [Ricca et al., 2011; Sperl und Sieber, 2018]. Ursprünglich wurde der Begriff „Kaskade“ für eine Abfolge von Reaktionsschritten mit instabilen Zwischenprodukten bis zur finalen Bildung eines stabilen Produkts verwendet. Die Kombination mehrerer Reaktionen in einem Ansatz, die prinzipiell auch separat durchgeführt werden könnten, wurde als „Tandem-Reaktion“ definiert. Mittlerweile wird der Begriff der „Kaskade“ weitergefasst und bezeichnet auch Reaktionssysteme, in denen mehrere Schritte spontan oder durch einen oder mehrere biologische oder chemische Katalysatoren in einem Reaktionsgefäß kombiniert werden [Bruggink et al., 2003; Ricca et al., 2011]. Im Bereich der Multi-Enzym-Kaskaden werden je nach Aufbau der Kaskade verschiedene Kategorien definiert, von denen einige im Folgenden näher beschrieben werden.

Die lineare Kaskade (Abbildung 1.5A) bezeichnet die Umwandlung eines Substrates über mindestens ein Intermediat zum Produkt. Primär bietet diese Kaskade einen ökonomischen Vorteil, da der zeitliche Aufwand verringert wird und eine Isolation der Zwischenprodukte umgangen wird. Einen weiteren Vorteil bietet die lineare Kaskade bei Prozessen mit toxischen oder instabilen Zwischenprodukten, da diese im besten Fall nicht akkumulieren. Bei reversiblen Reaktionen führt das Weiterreagieren des Zwischenprodukts dazu, dass die Reaktion in Richtung des Produktes getrieben wird und die Ausbeuten erhöht werden können [Ricca et al., 2011]. Als orthogonale Kaskade (Abbildung 1.5B) wird ein System bezeichnet, in dem die Umwandlung von Substrat zu Produkt an weitere Reaktionen gekoppelt ist. Ein prominentes Beispiel ist die Regeneration von Cofaktoren oder der Abbau von Nebenprodukten. Inhibitorische Nebenprodukte können die katalytische Aktivität von Enzymen und damit die Produktausbeute verringern. Toxische Nebenprodukte stellen unter Umständen hohe Anforderungen an den technischen Prozess. Ein Abbau der Nebenprodukte kann dementsprechend viele Vorteile bieten. Teure Cofaktoren wie NADH oder ATP können durch den Einsatz von Regenerationskaskaden wiederhergestellt werden und müssen nicht in stöchiometrischen Verhältnissen zum Zielsubstrat eingesetzt werden. Die für die Regeneration des Cofaktors implementierten Enzyme nutzen im Idealfall günstige Substrate, wodurch die öko-

logische Bilanz der Kaskade optimiert werden kann. Häufig zur Cofaktorregenerierung eingesetzte Enzyme sind die Glucosedehydrogenase und Formiatdehydrogenase zur Regeneration von NADH und NADPH oder die Acetatkinase zur Regeneration von ATP [Zhao und van der Donk, 2003]. In einer parallelen Kaskade (Abbildung 1.5C) werden zwei Reaktionen über Cofaktoren oder Nebenprodukte miteinander gekoppelt. Im Unterschied zur orthogonalen Kaskade werden dabei beide Produkte der miteinander gekoppelten Reaktionen als Zielprodukte betrachtet [Bisogno *et al.*, 2010; Rioz-Martínez *et al.*, 2010]. Zur Deracemisierung von Aminosäuren wurden zyklische Kaskaden entwickelt (Abbildung 1.5D). Dabei wird beispielsweise ein Enantiomer eines Racemats zum gewünschten Produkt umgesetzt, während das andere Enantiomer zu einem Nebenprodukt umgesetzt wird. Dieses Nebenprodukt kann durch eine zweite Reaktion wieder zu einer Mischung der Ausgangssubstrate umgesetzt werden. Dadurch kommt es zu Akkumulation des enantiomerenreinen Zielprodukts [Ricca *et al.*, 2011; Turner, 2008; Turner, 2010].

Das Design einer Enzymkaskade stellt neue Herausforderungen an die Prozessentwicklung. Damit der vielversprechende ökonomische Vorteil einer Kaskade genutzt werden kann, darf die Herstellung der zusätzlich integrierten Biokatalysatoren nicht kostenintensiver sein, als die Ersparnis durch die Kaskade. Außerdem müssen die Reaktionsbedingungen wie Temperatur, pH-Wert und Ionenstärke angepasst werden, sodass alle beteiligten Enzyme katalytisch effizient arbeiten können. Um eine Akkumulation von unerwünschten Nebenprodukten zu vermeiden, müssen die kinetischen Parameter der ausgewählten Kaskadenenzyme aufeinander abgestimmt sein. Abhängig vom K_M -Wert und den Umsatzraten der einzelnen Enzyme müssen die eingesetzten Enzymaktivitäten angepasst werden. Für einen stabilen Prozess ist ebenso die *total turnover number* (TTN) aller Kaskadenenzyme relevant. Eine geringe TTN eines Enzyms kann die gesamte Kaskade limitieren, da z. B. ein Enzym zur Cofaktorregenerierung frühzeitig an Aktivität verliert.

Eine Enzymkaskade zur Regeneration des Cofaktors NAD(P)H wurde bereits für verschiedene Monooxygenasen beschrieben [Klaus *et al.*, 2019; Torres Pazmiño *et al.*, 2010]. A. Griethe setzte die Glucosedehydrogenase aus *Pseudomonas spec.* zur NADH-Regeneration in Kombination mit der sMMO ein und war damit in der Lage, Umsätze von 175 % bezogen auf die eingesetzte Cofaktormenge zu zeigen [Griethe, 2018].

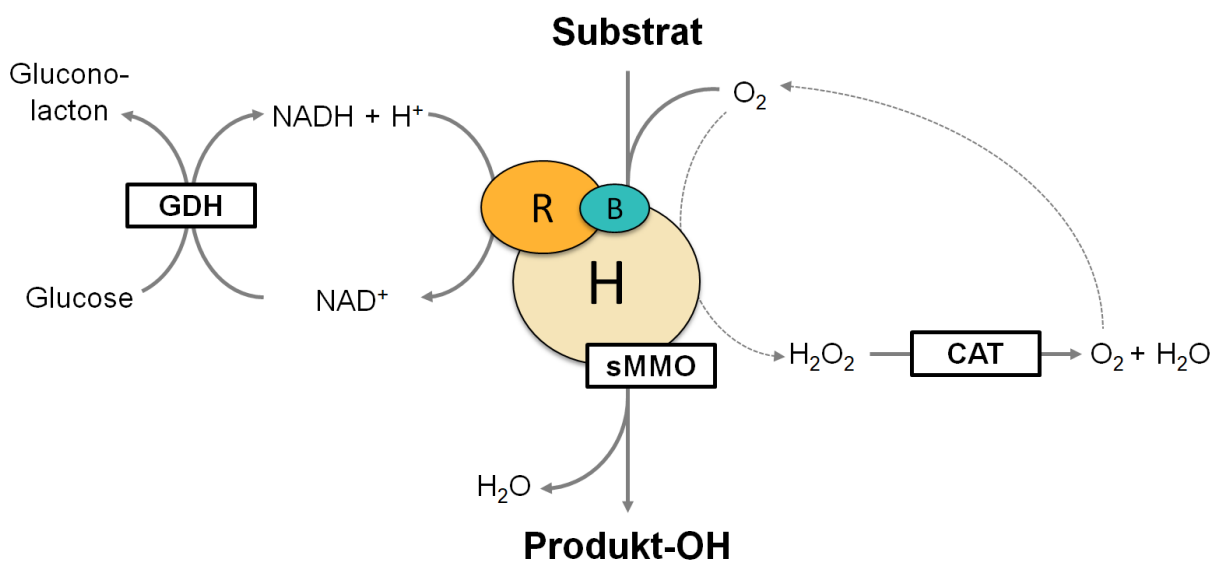


Abbildung 1.6: Enzymkaskade der sMMO-Reaktion mit Cofaktorregenerierung und Disproportionierung von H₂O₂; sMMO: lösliche Methanmonooxygenase; H: Hydroxylase; B: regulatorisches Protein B; R: Reduktase; GDH: Glucosedehydrogenase; CAT: Katalase; Abbildung aus [Griethe, 2018] modifiziert.

Ein zweites Enzym, dessen Einsatz in einer Enzymkaskade mit Monooxygenasen in der Literatur beschrieben wurde, ist die Katalase. Diese disproportioniert H_2O_2 zu H_2O und O_2 . Dadurch wird das sehr reaktive und für die sMMO inhibitorische Nebenprodukt abgebaut und dessen Akkumulation verhindert. Dubbels *et al.* beschrieben den Einsatz von Katalase in einer Kaskade mit der Butanmonooxygenase aus *Pseudomonas butanovora*. Dadurch konnte die Akkumulation von H_2O_2 als Nebenprodukt reduziert werden. Die Reaktionsgeschwindigkeit und die finale Ausbeute konnten dementsprechend gesteigert werden [Dubbels *et al.*, 2007]. A. Griethe nutzte ebenfalls die Katalase und war in der Lage, mit einer Kaskade aus Glucosedehydrogenase (*Pseudomonas spec.*) und Katalase (*Bos taurus*) die Produktausbeute der sMMO beim Umsatz des Modellsubstrats Nitrobenzol von 0,6 % auf 1,2 % zu verdoppeln. Für den Umsatz des physiologischen Substrats Methan konnte die Ausbeute durch den Einsatz der Katalase von 0,5 % auf 3,6 % um den Faktor 7 gesteigert werden [Griethe, 2018]. In Abbildung 1.6 ist eine schematische Abbildung der von A. Griethe entwickelten Kaskade aus sMMO, GDH und Katalase dargestellt. A. Griethe betonte das Potenzial, dass die Leistungsfähigkeit der Kaskade und somit die Produktausbeute durch Anpassung der eingesetzten Enzymaktivitäten noch gesteigert werden könnte.

1.1.8 Optimierung von Biotransformationsprozessen

Mit dem Ziel, Produktionsprozesse nachhaltiger und umweltverträglicher zu gestalten, wird der Einsatz von Enzymen in der organischen Synthese immer populärer [Münch *et al.*, 2021; Strohmeier *et al.*, 2011]. Die Biokompatibilität der Biokatalysatoren bietet einen großen Vorteil und kann den ökologischen „Fußabdruck“ von biotechnologischen Produktionsprozessen verringern. Im Gegensatz zu chemischen Katalysatoren können Enzyme unter Verwendung von Mikroorganismen aus erneuerbaren Rohstoffen hergestellt werden. Die intrinsische Regio- und Stereoselektivität von Enzymen ermöglicht zudem Transformationsprozesse, die rein chemisch nur schwer realisierbar sind und vereinfacht damit die Prozessstrategie [Yi *et al.*, 2021].

1.1.8.1 Proteinstabilität

Ein Nachteil, der bei der Nutzung von Biokatalysatoren auch beachtet werden muss, ist in der Regel eine geringere Prozessstabilität von Enzymen im Vergleich zu chemischen Katalysatoren [Schoemaker *et al.*, 2003]. Dabei wird zwischen thermodynamischer und kinetischer Stabilität unterschieden. Die thermodynamische Stabilität beschreibt die Differenz der freien Energie durch die Entfaltung von Proteinen und spiegelt die Stabilität des Proteins gegenüber Temperaturerhöhungen, pH-Wert-Änderungen oder organischen Lösungsmitteln wider. Irreversible Entfaltungen, die in der Regel einer Kinetik erster Ordnung folgen, werden durch die kinetische Stabilität beschrieben [Sanchez-Ruiz, 2010]. Beispielsweise nimmt die Aktivität von Enzymen im Zeit- oder Reaktionsverlauf aufgrund von Denaturierung des Proteins ab. Diese Deaktivierung im Zeitverlauf kann mittels verschiedener Parameter beschrieben werden. Die *total turnover number* (TTN) bezeichnet die Anzahl der Substratmoleküle, die von einem Enzym-Molekül umgesetzt werden, bevor dieses deaktiviert ist. Um einen stabilen Prozess zu entwickeln, muss nicht nur die thermodynamische Stabilität des Biokatalysators garantiert werden, sondern auch die Deaktivierung im Zeitverlauf, also die kinetische Stabilität, durch geeignete Bedingungen optimiert werden [Feller, 2010; Stepankova *et al.*, 2013].

Monooxygenasen katalysieren für organische Synthesen sehr interessante Reaktionen, die chemisch nur schwer zu kontrollieren sind. Für viele Monooxygenasen sind allerdings niedrige Aktivitäts- und Stabilitätswerte beschrieben und kostenintensive Cofaktoren nötig. Auf-

grund dessen ist die Zahl der industriellen Anwendungen dieser Enzyme bisher gering [Julsing *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2017]. Um biotechnologische Produktionsprozesse in Bezug auf die Stabilität und hoher Produktausbeuten konkurrenzfähiger zu machen, bieten sich verschiedene Ansatzpunkte zur Optimierung an.

Zum einen können Enzyme aus extremophilen Organismen isoliert werden, deren natürliches Habitat den erforderlichen Prozessbedingungen ähnelt. Zum anderen lassen sich Enzyme genetisch oder chemisch modifizieren, sodass auch Eigenschaften von Enzymen aus mesophilen Organismen an extreme Prozessbedingungen angepasst werden. Eine dritte Strategie ist die Stabilisierung des Biokatalysators durch Anpassung der Prozessbedingungen [Luetz *et al.*, 2008].

Additive können zugesetzt werden, um für Enzyme optimale Prozessbedingungen aufrecht zu erhalten und eine Inaktivierung zu vermeiden. Ein Großteil der kommerziell vertriebenen Enzympräparationen enthält stabilisierende Additive. In den meisten Fällen werden Additive zur Erhöhung der Lagerstabilität zugesetzt. Salze sind in der Lage, Proteinstrukturen zu stabilisieren, indem sie mit geladenen Aminosäureseitenketten interagieren, die Hydrathülle verdrängen und damit Proteine komprimieren [Andrés, 1999]. Polyole und Zucker gehen viele Wasserstoffbrückenbindungen an der Proteinoberfläche ein und stärken damit auch hydrophobe Wechselwirkungen im Inneren von Proteinen. Durch den Zusatz von Sorbitol, Trehalose oder Glycerol konnte beispielsweise sowohl die thermische Stabilität als auch die Stabilität gegenüber proteolytischen Verdau von α -Amylase aus *Bacillus amyloliquefaciens* und *Bacillus licheniformis* gesteigert werden [Khajeh *et al.*, 2006]. Hydrophile Polymere wie Polyethylenglykol (PEG) konnten ebenfalls zur Stabilisierung von Enzymen eingesetzt werden. Einer Erklärung von R. Schmid zufolge schützt die Interaktion zwischen Polymer und Protein das Enzym vor destabilisierenden Effekten des Lösungsmittels [Schmid, 1979]. Für verschiedene Proteine wie Laktatdehydrogenase, Trypsin oder Alkoholdehydrogenase konnten stabilisierende Effekte durch Zusatz von Polyethylenimin verschiedener Kettenlängen nachgewiesen werden [Andersson und Hatti-Kaul, 1999].

Eine weitere Möglichkeit, die Umgebung von Proteinen in einem Biotransformationsprozess anzupassen und zu optimieren, ist die Immobilisierung. Durch Immobilisierung von Enzymen an oder in festen Trägermaterialien können diese Schutz bieten vor destabilisierenden Effekten, der Katalysator kann leichter von dem Reaktionsmedium abgetrennt werden und Substrat- und Produktakkumulation können besser kontrolliert werden, um sowohl thermodynamische als auch kinetische Limitationen zu umgehen [Datta *et al.*, 2013]. Immobilisierte Enzyme können leichter wiederverwendet werden und ermöglichen eine kontinuierliche Prozessführung [Mateo *et al.*, 2007]. Viele der industriell eingesetzten Enzyme sind in Immobilisaten stabilisiert. Eine Übersicht über verschiedene Immobilisierungsmethoden und deren Anwendung bietet das Review von R. Sheldon [Sheldon und van Pelt, 2013]. Versuche zur Immobilisierung der sMMO wurden von Dr. A. Griethe beschrieben. Die sMMO-Aktivität konnte nach Immobilisierung von entweder der MMOH oder von MMOB an ein festes Trägermaterial nachgewiesen werden. Die anderen beiden sMMO-Komponenten lagen jeweils in löslicher Form vor. Die resultierende Aktivität war betrug lediglich 10 % im Vergleich zum freien Enzymkomplex [Griethe, 2018]. Dementsprechend ist die Bindung an ein festes Trägermaterial keine geeignete Immobilisierungsmethode für die sMMO. Andere Methoden, wie beispielsweise der Einschluss der Enzymkomponenten in eine Gelmatrix oder in Liposomen oder Polymersomen, könnten Vorteile bieten, da möglicherweise die Interaktion der Proteine untereinander und Beweglichkeit erhalten bleibt.

1.1.8.2 Substratverfügbarkeit

Neben der Stabilität der Biokatalysatoren ist auch die Reaktionsgeschwindigkeit ein relevanter Faktor für biotechnologische Produktionsprozesse. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird von der Enzymaktivität und der eingesetzten Enzymmenge bestimmt. Die Enzymaktivität ist abhängig von der verfügbaren Substratkonzentration. Der mathematische Zusammenhang zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Substratkonzentration wird für einfache enzymatische Reaktionen durch die Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben [Michaelis und Menten, 1913].

Um einen enzymatischen Produktionsprozess effizient zu gestalten, sollte eine für das Enzym optimale Substratkonzentration sichergestellt werden. Abhängig von der Art der Substrate sind dabei unterschiedliche Herausforderungen zu beachten. Für die, durch Monooxygenasen katalysierte, Hydroxylierung von Kohlenwasserstoffen wird in der Regel molekularer Sauerstoff als Substrat benötigt. Dieser muss in Lösung vorliegen, um für Enzyme zugänglich zu sein. Die Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser ist allerdings relativ gering. Bei einem Luftdruck von 101,3 kPa und 30 °C beträgt die maximale Konzentration 235 µM [Xing *et al.*, 2014]. In Reaktionssystem aus einer Flüssig- und einer Gasphase findet eine Diffusion von Sauerstoff zwischen den Phasen statt. Es bildet sich ein Gleichgewicht, das unter anderem von der Temperatur und vom Partialdruck von Sauerstoff abhängig ist. Das Henry-Gesetz (Gleichung 1.2) beschreibt den Zusammenhang zwischen gelöster Konzentration und Partialdruck von Gasen.

$$H^{cp} = \frac{c_l}{p_g} \quad \text{Gleichung 1.2}$$

H^{cp} : Henry-Konstante

c_l : Konzentration in Lösung

p_g : Partialdruck in der Gasphase

R. Sander veröffentlichte eine Sammlung verschiedener Parameter, unter anderem der Henry-Konstanten, zur Löslichkeit von Gasen in Wasser [Sander, 2015].

Wird Sauerstoff in der Flüssigphase enzymatisch umgesetzt, sinkt die Konzentration und es findet ein Stofftransport von der Gasphase in die Flüssigphase statt, bis der Gleichgewichtszustand erreicht ist. In vielen biotechnologischen Produktionsprozessen ist die Sauerstoffversorgung ein limitierender Faktor [Lorente-Arevalo *et al.*, 2021]. Der Stofftransport von der Gas- in die Flüssigphase wurde von Whitman 1962 durch eine *2-layer*-Theorie beschrieben: Auf beiden Seiten einer Grenzfläche zwischen Gas- und Flüssigphase bildet sich ein stationärer Film, in dem sich ein Konzentrationsgradient der Gleichgewichtskonzentration annähert [Whitman, 1962]. Die treibende Kraft für den Transfer von der Gas- in die Flüssigphase ist ein Konzentrationsunterschied zwischen den beiden Phasen, welcher demnach an der Grenzfläche am geringsten ist. Aufgrund der geringen Löslichkeit von Sauerstoff in wässrigen Systemen ist die Diffusionsgeschwindigkeit generell langsam [Garcia-Ochoa und Gomez, 2009]. Die meisten Strategien zur Erhöhung der Sauerstofftransferate (*oxygen transfer rate*, OTR) basieren auf einer Vergrößerung der Oberfläche zwischen Gas- und Flüssigphase. Eine große Oberfläche wird zum Beispiel durch aktive Begasung und Bildung von Blasen im Reaktionssystem erreicht. In Bioreaktoren wird beispielsweise durch eine hohe Rührgeschwindigkeit eine möglichst feine Dispersion kleiner Gasbläschen in der Lösung

erreicht. Blasen- und Schaumbildung können jedoch zur Denaturierung von Proteinen und damit zur Inaktivierung von Enzymen führen. Der Kontakt mit der im Vergleich zur wässrigen Lösung hydrophoben Gasphase beeinflusst intramolekulare Wechselwirkungen und führt zu strukturellen Veränderungen [Perriman *et al.*, 2007]. Außerdem werden durch eine aktive Begasung flüchtige, gelöste Stoffe aus der wässrigen Lösung ausgetragen. Bei dem Umsatz organischer Moleküle führt das häufig zum Verlust von Substraten oder Produkten aus der wässrigen Lösung [Pedersen, 2017].

Eine andere Möglichkeit, die Sauerstoffversorgung zu verbessern, ist die Erhöhung des Partialdrucks in der Gasphase. Dadurch wird die Gleichgewichtskonzentration in der Gasphase erhöht. Eine höhere Differenz zwischen apparater Sauerstoffkonzentration und Gleichgewichtskonzentration führt dann zu einer höheren Diffusionsgeschwindigkeit. Ein Nachteil eines höheren Sauerstoffpartialdrucks ist, dass Sauerstoff in höheren Gaskonzentrationen spezielle Sicherheitsanforderungen an den Reaktionsaufbau stellt. Außerdem kann eine Erhöhung der Sauerstoffkonzentration durch oxidative Effekte die Inaktivierung von Enzymen beschleunigen [Saville und Persi, 1992].

Tabelle 1.2: Ausgewählte physikalische Kenndaten von, in der vorliegenden Arbeit untersuchten, Substraten und Produkten; (*) Löslichkeit bei 101,3 kPa Partialdruck des jeweiligen Gases; (**) Löslichkeit bei 21,3 kPa Partialdruck von Sauerstoff (entspricht Luft bei Normaldruck 101,3 kPa).

Substanz	Molekulargewicht	Aggregatzustand bei 30 °C	Löslichkeit in Wasser bei 30 °C	Referenz
Sauerstoff	32 g/mol	Gasförmig	$\frac{235 \mu\text{M}^{**}}{1,12 \text{ mM}^*}$	[Xing <i>et al.</i> , 2014]
Ethylen	28,1 g/mol	Gasförmig	3,9 mM*	[Breitbarth <i>et al.</i> , 2004]
Ethylenoxid	44,1 g/mol	Gasförmig	4,9 M*	[Conway <i>et al.</i> , 1983; Sander, 2015]
Benzol	78,1 g/mol	Flüssig	22,7 mM	[Arnold <i>et al.</i> , 1958]
Phenol	94,1 g/mol	Fest	935 mM	[Seidell, 1941]
Naphthalin	128,2 g/mol	Fest	313 μM	[Bennett und Canady, 1984]
1-Naphthol	144,2 g/mol	Fest	10,6 mM	[Guisseppi-Elie und Maharajh, 1984]
2-Naphthol	144,2 g/mol	Fest	6,1 mM	[Moyle und Tyner, 1953]

Für die enzymatische Hydroxylierung von Kohlenwasserstoffen müssen auch die Zielsubstrate in Lösung vorliegen, um für die Enzyme zugänglich zu sein. Das breite Substratspektrum der sMMO umfasst viele hydrophobe Kohlenwasserstoffe, die nur geringfügig in Wasser löslich sind. Die Löslichkeit der, in der vorliegenden Arbeit untersuchten, Substrate und Produkte ist in Tabelle 1.2 zusammengefasst. Die maximale Konzentration in der wässrigen Lösung kann durch Lösungsmittelzusätze erhöht werden. Die dadurch veränderte Polarität der Lösung kann jedoch auch einen negativen Einfluss auf die Stabilität von Proteinen und damit auf die Enzymaktivität haben (vgl. Kapitel 1.1.8.1). Wird ein Überschuss eines schwer löslichen Substrates eingesetzt, kommt es zur Bildung eines Systems aus mehreren Phasen. Die Nachlösegeschwindigkeit und die Diffusion des Zielsubstrates in die wässrige Lösung sind dann möglicherweise geschwindigkeitsbestimmende Schritte der Reaktion.

Bei der Entwicklung von Reaktionssystemen müssen sowohl die Stabilität und die Eigenschaften des verwendeten Biokatalysators, als auch der Aggregatzustand und die Löslichkeit der Substrate beachtet werden.

1.2 Motivation und Zielsetzung

Die lösliche Methanmonooxygenase (sMMO) bildet mit der spezifischen Oxidation von Methan zu Methanol den ersten Schritt zur Kohlenstoffassimilation methanotropher Bakterien. Ermöglicht wird diese Reaktion durch einen Katalysemechanismus, in dem molekularer Sauerstoff im aktiven Zentrum durch Eisenionen gebunden wird und dessen intermediärer *diamond-core* einen der stärksten, in der Natur vorkommenden, oxidierenden Zustände des Sauerstoffatoms darstellt. Die sMMO zeichnet sich durch ein breites Substratspektrum aus. Sie ist in der Lage, verschiedene lineare, zyklische, aromatische und halogenierte Kohlenwasserstoffe spezifisch zu hydroxylieren. Aufgrund des breiten Substratspektrums und der Fähigkeit spezifische Oxidationsreaktionen zu katalysieren, die chemisch nur schwer zu kontrollieren sind, wird der sMMO schon seit geraumer Zeit großes Potenzial zur biotechnologischen Anwendung zugeschrieben. Allerdings legten bisher nur wenige veröffentlichte Untersuchungen den Fokus auf eine potenzielle Anwendung der sMMO. Von den drei Komponenten der sMMO lassen sich laut aktueller Literatur nur die Reduktase (MMOR) und das regulatorische Protein B (MMOB) rekombinant in *E. coli* produzieren. Die Hydroxylase konnte in aktiver Form bisher nur aus homologer Kultivierung methanotropher Bakterien isoliert werden. Studien zum Umsatz der sMMO zeigten nur geringe Produktausbeuten. Aufgrund dieser Limitierungen in der Verfügbarkeit und der Produktivität der sMMO konzentrierten sich bisherige Untersuchungen hauptsächlich auf die Struktur und den Katalysemechanismus der sMMO. In der vorliegenden Arbeit sollte der Einsatz der sMMO in einem biotechnologischen Prozess untersucht werden.

Die vorliegende Arbeit ist eingebunden in das Projekt „Enzymatische und chemokatalytische Oxidationskaskade in der Gasphase (2) – Phenol aus Biogas“ des Leibniz Instituts für Katalyse (LIKAT) in Rostock, des Fraunhoferinstituts für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik (IGB) in Stuttgart und der Martin-Luther-Universität (MLU) Halle-Wittenberg. Das Ziel des Forschungsverbundes ist es, eine Kopplung zwischen Chemo- und Biokatalyse zur stofflichen Nutzung von Methan aus Biogas zu zeigen. Im Rahmen des Projektes sollte Methan chemokatalytisch mittels Methandehydroaromatisierung zu verschiedenen Produkten, vorrangig Ethylen, Benzol und Naphthalin, gekuppelt werden. Anschließend sollten diese Zwischenprodukte biokatalytisch zu Ethylenoxid, Phenol und Naphthol hydroxyliert werden. Die enzymatische Hydroxylierung von Aromaten und nicht-funktionalisierten Kohlenwasserstoffen bietet eine vielversprechende Alternative zur chemischen Katalyse. Milde Reaktionsbedingungen und hohe Selektivität zeichnen den biobasierten Prozess aus. Da für die direkte chemische Hydroxylierung von Benzol zu Phenol nur geringe Ausbeuten beschrieben sind, könnte der Einsatz von Biokatalysatoren eine alternative biobasierte Strategie zur Phenolproduktion darstellen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war der Einsatz gereinigter sMMO zur selektiven Oxidation von Ethylen zu Ethylenoxid, Benzol zu Phenol und Naphthalin zu Naphthol. Zur Bereitstellung größerer Mengen sMMO waren die Kultivierungs- und Reinigungsstrategien anzupassen. Die Ausbeute des biokatalytischen Prozesses sollte optimiert werden, indem limitierende Faktoren identifiziert und verschiedene Strategien zur Behebung dieser entwickelt werden. Zur Regenerierung des Cofaktors NADH und zur Disproportionierung des inhibitorischen

Nebenprodukts H_2O_2 sollte eine Enzymkaskade eingesetzt und optimiert werden. Ein weiteres Ziel war es, den Biokatalysator an die Prozessziele anzupassen. Dazu wurde das regulatorische Protein B als vielversprechendes Ziel für Protein-*engineering* identifiziert. Mittels rationalen Enzymdesigns auf Basis von Literaturdaten sollten Varianten entwickelt werden, um die Produktivität der sMMO zu erhöhen.

Nachdem Reaktionssysteme für den enzymatischen Umsatz der einzelnen Zielsubstrate Ethylen, Benzol und Naphthalin entwickelt und optimiert wurden, sollten Produktgemische aus der Methandehydroaromatisierung als Realproben enzymatisch umgesetzt werden. Indem die sMMO in einen chemo- und biokatalytischen Produktionsprozess eingebunden wurde, sollte das Potenzial des Enzyms demonstriert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Sämtliche verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 2.1 in alphabetischer Reihenfolge zusammengestellt.

Tabelle 2.1: Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Reinheit	Bestellnummer
1,2-Dihydroxynaphthalin	TCI Europe, Zwijndrecht, Belgien	≥ 95 %	D2299
1,3-Dihydroxynaphthalin	TCI Europe, Zwijndrecht, Belgien	≥ 98 %	D0588
1,4 Dithiothreit (DTT)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	≥ 99 %	6908.1
1,4-Dihydroxynaphthalin	TCI Europe, Zwijndrecht, Belgien	≥ 98 %	D0589
1,5-Dihydroxynaphthalin	TCI Europe, Zwijndrecht, Belgien	≥ 98 %	D0590
1,6-Dihydroxynaphthalin	TCI Europe, Zwijndrecht, Belgien	≥ 99 %	D0591
1,7-Dihydroxynaphthalin	TCI Europe, Zwijndrecht, Belgien	≥ 98 %	D0592
1,8-Dihydroxynaphthalin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	≥ 95 %	740683-1G
1-Decanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	≥ 99 %	150584-500G
1-Naphthol	Merck, Darmstadt, Deutschland	≥ 99 %	1.06223.0050
2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	≥ 99,5 %	6066.4
2,3-Dihydroxynaphthalin	TCI Europe, Zwijndrecht, Belgien	≥ 98 %	D0593
2,6-Dichloroindolphenol	Fluka Analytical	≥ 97 %	36180-56-F
2,6-Dihydroxynaphthalin	TCI Europe, Zwijndrecht, Belgien	≥ 95 %	D0956
2,7-Dihydroxynaphthalin	TCI Europe, Zwijndrecht, Belgien	≥ 99 %	D0594
2-Mercaptoethanol	Serva electrophoresis, Heidelberg, Deutschland	≥ 99 %	28625.02
2-Naphthol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	≥ 99 %	185507-5G
3-(N-Morpholino) pro-pansulfonsäure (MOPS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	≥ 99 %	6979.4
Acetonitril	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	≥ 99,9 %	T907.1
Acrylamid/ Bisacrylamid (30 % Lösung)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland	k. A.	A124.2
Agar-Agar	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	k. A.	5210.2
Agarose	VWR, Radnor, USA	für Elektrophorese	443666A
Ammonium-Eisen(II)-sulfat Hexahydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	≥ 99 %	P728.1
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	≥ 98 %	9592.3
Antischaum Struktol J673	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	k. A.	A8582
Benzol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	≥ 99 %	319953-500ML
Benzonase	Merck, Darmstadt, Deutschland	≥ 90 %	70746-3
Benzylalkohol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	für Analyse	08421-5ML-F
Brenzkatechin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	≥ 99 %	4249.1

Bezeichnung	Hersteller	Reinheit	Bestell- nummer
Coomassie Brilliantblau G 250	Merck, Darmstadt, Deutschland	k. A.	9598.2
D-Glucose Monohydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	≥ 99,5 %,	6887.5
Dichlormethan	Merck, Darmstadt, Deutschland	für Analyse	1.06050.1000
di-Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	≥ 99 %	P7493
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	≥ 99 %	3738.5
Ethylen	Linde, Dublin, Irland	≥ 99,9 %	10102208
Glucose Dehydrogenase (GDH) aus <i>Pseudomonas sp.</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	≥ 200 U*mg ⁻¹	19359
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	≥ 99 %	3783.2
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	k. A.	2363.2
Hydrochinon	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	≥ 99,5 %,	3586.1
Imidazol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	≥ 99 %	X998.4
IPTG	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland	k. A.	206-703-0
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	≥ 99 %	P749.3
Kanamycinsulfat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	k. A.	T832.3
Katalase (Cat) aus Rinderleber	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	10.000 - 40.000 U/mg	C30-1G
Magnesiumchlorid wasserfrei	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	≥ 98,5 %,	KK36.2
m-Kresol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	für Analyse	65996-1ML-F
NAD	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	≥ 98 %	AE11.2
NADH Dinatriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	≥ 98 %	AE12.2
Naphthalin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	≥ 99 %	184500-5G
Natriumacetat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	≥ 99 %	6773.3
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	≥ 99 %	3957.1
Natriumdodecylsulfat (SDS, Rotistock 20%)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	k. A.	1057.1
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	≥ 99 %	6771.1
n-Decan	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	≥ 99 %	3475.2
n-Hexan	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	≥ 95 %	3907.4
Nitrobenzol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	≥ 99 %	252379-25ML
Phenol	Riedel de Haen, Seelze, Deutschland	≥ 99,5 %,	33517
Pierce™ Unstained Protein MW Marker	Thermo Fisher, Waltham, USA		26610
p-Kresol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	≥ 99 %	61030-25G-F
p-Nitrophenol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	k. A.	1048-5G
Protease-Inhibitor-Tabletten cOmplete	Roche, Basel, Schweiz		4693132001
Resorcin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	≥ 99 %	5727.1
Rhamnose Monohydrat	Alfa Aersa, Haverhill, USA	≥ 99 %	A16166
Rinderserumalbumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	≥ 98 %	8076.2
Salzsäure (37 %)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	36,5 - 39,0 %	4625.2
Sauerstoff	Linde, Dublin, Irland	≥ 99,5 %,	2010175
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	k. A.	2367.3

Bezeichnung	Hersteller	Reinheit	Bestellnummer
Toluol	Fluka Analytical	≥ 99,5 %,	89677
Trifluoressigsäure (TFA)	Merck, Darmstadt, Deutschland	≥ 99,8 %,	1.08262.0100
Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin Hydrochlorid (TCEP)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	≥ 98 %	HN95.2
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	≥ 99,9 %	4855.2
Trypton/Pepton aus Casein	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	k. A.	8952.4

2.1.2 Puffer und Medien

Sämtliche verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 2.2 zusammengestellt. Wenn nicht anders angegeben, wurde dH₂O als Lösungsmittel für Puffer und Medien verwendet.

Tabelle 2.2: Verwendete Puffer und Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung	Bemerkung zur Herstellung
Aufschlusspuffer 1	25 mM MOPS 1 mM TCEP 0,2 mM Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ pH 7,0	TCEP und Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ direkt vor der Verwendung zugegeben.
Aufschlusspuffer 2	25 mM MOPS 50 mM NaCl 1 mM TCEP 1 Tab. / 50 mL Protease Inhibitor cOmplete 10 U/mL Benzonase 5 mM MgCl ₂ pH 7,0	TCEP, Proteaseinhibitor und Benzonase direkt vor der Verwendung zugegeben.
Aufschlusspuffer 3	25 mM MOPS 150 mM NaCl pH 7,0	
Puffer A1	entspricht Aufschlusspuffer 1	Vor Verwendung filtriert und entgast
Puffer B1	25 mM MOPS 1 mM TCEP 0,2 mM Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ 0,4 M NaCl pH 7,0	Vor Verwendung filtriert und entgast
Puffer A2	25 mM MOPS 50 mM NaCl 1 mM TCEP pH 7,0	Vor Verwendung filtriert und entgast
Puffer B2	25 mM MOPS 500 mM NaCl 1 mM TCEP pH 7,0	Vor Verwendung filtriert und entgast
Puffer A3	25 mM MOPS 150 mM NaCl 20 mM Imidazol pH 7,0	Vor Verwendung filtriert und entgast

Bezeichnung	Zusammensetzung	Bemerkung zur Herstellung
Puffer B3	25 mM MOPS 150 mM NaCl 750 mM Imidazol pH 7,0	Vor Verwendung filtriert und entgast
TMA-Puffer	50 mM Tris 25 mM MES 25 mM Na-Acetat pH 7,5	
Puffer R	25 mM MOPS 50 mM NaCl pH 7,5	
LB-Medium	10 g/L Trypton 10 g/L NaCl 5 g/L Hefeextrakt pH 7,0	autoklaviert
LB-Agar	LB-Medium mit 2 % (w/v) Agar-Agar	autoklaviert
TB-Medium	Komponente I: 12 g/L Trypton 24 g/L Hefeextrakt 0,5 % (v/v) Glycerin Komponente II: 23,14 g/L KH_2PO_4 125,41 g/L K_2HPO_4	Komponente I und II wurden separat voneinander autoklaviert und vor Gebrauch steril im Verhältnis 10:1 gemischt
Laufmittel A	H_2O mit 0,1 % (v/v) TFA	Vor Verwendung filtriert
Laufmittel B	Acetonitril mit 0,1 % (v/v) TFA	Vor Verwendung filtriert
Bradford-Lösung	100 mg Coomassie-Brillantblau in 50 mL 95 % (v/v) Ethanol gelöst, 100 mL 85 %-ige Phosphorsäure zugegeben und mit dH_2O auf 600 mL aufgefüllt und filtriert, 100 mL Glycerin zugegeben und mit dH_2O auf 1 L aufgefüllt, Verwendung nach 24 h Inkubation bei 20 °C.	
TAE-Puffer	40 mM Tris 1 mM EDTA 18 mM Essigsäure	
Lösungen für SDS-PAGE:		
Entfärbelösung	200 mL Isopropanol 100 mL Essigsäure	mit H_2O auf 1 L aufgefüllt
Färbelösung	1 g Coomassie-Brillant Blau 200 mL Isopropanol 100 mL Essigsäure	mit H_2O auf 1 L aufgefüllt
Kathodenpuffer 10x	30,28 g Tris 144,4 g Glycin 50 mL 20 % (v/v) SDS-Lösung 1 mL 10 % (w/v) NaN_3 -Lösung	mit H_2O auf 1 L aufgefüllt, vor Verwendung 1:10 mit H_2O verdünnt
Probenpuffer (6x, SDS-PA-Gel, reduzierend)	2,27 g Tris 15 mL H_2O 25 mL 20 % (v/v) SDS-Lösung 50 mg Bromphenol 50 g Glycerin pH 6,8	mit H_2O auf 100 mL aufgefüllt, vor Gebrauch 10 $\mu\text{L/mL}$ 2-Mercaptoethanol zugegeben

Bezeichnung	Zusammensetzung	Bemerkung zur Herstellung
Sammelgelpuffer (SDS-PA-Gel)	6,06 g Tris 2 mL 20 % (v/v) SDS-Lösung 100 µL 10 % (w/v) NaN ₃ -Lösung pH 6,8	mit H ₂ O auf 100 mL aufgefüllt
Trenngelpuffer (SDS-PA-Gel)	18,18 g Tris 2 mL 20 % (v/v) SDS-Lösung 100 µL 10 % (w/v) NaN ₃ -Lösung pH 8,8	mit H ₂ O auf 100 mL aufgefüllt

2.1.3 Stammlösungen

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Stammlösungen verwendet (Tabelle 2.3). Wenn nicht anders angegeben, wurde dH₂O als Lösungsmittel verwendet.

Tabelle 2.3: Verwendete Stammlösungen

Substanz	Konzentration	Bemerkung zur Herstellung
Kanamycin	50 mg/mL	sterilfiltriert
(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂	100 mM	sterilfiltriert
L-Rhamnose	2,3 M	sterilfiltriert
IPTG	1 M	sterilfiltriert
Nitrobenzol	10 mM	Vor Verwendung frisch hergestellt
NADH	10 mM	Vor Verwendung frisch hergestellt
2,6-Dichloroindolphenol (DCPIP)	1 mM	Vor Verwendung frisch hergestellt
Trifluoressigsäure (TFA)	50 % (v/v)	Wöchentlich frisch hergestellt
Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin Hydrochlorid (TCEP)	100 mM	Vor Verwendung frisch hergestellt
Rinderserumalbumin (BSA)	40 mg/mL	Vor Verwendung frisch hergestellt und filtriert
Benzol	gesättigt (22 mM bei 20 °C)	
Naphthalin	gesättigt (210 µM bei 20 °C)	

2.1.4 Organismen

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Organismen verwendet

Tabelle 2.4: Verwendete Organismen

Stamm	Genotyp	Verwendung
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) Gold	B F ⁻ ompT hsdS(rB ⁻ mB ⁻) dcm ⁺ Tetr gal λ(DE3) endA Hte	Expressionsstamm, rekombinante Produk- tion von MMOB
<i>Escherichia coli</i> KRX	K [F ⁻ , traD36, ΔompP, proA ⁺ B ⁺ , lacIq, Δ(lacZ)M15] ΔompT, endA1, recA1, gyrA96 (Nal ^r), thi-1, hsdR17 (r _k ⁻ , m _k ⁺), e14 ⁻ (McrA ⁻), relA1, supE44, Δ(lac- proAB), Δ(rhaBAD)::T7 RNA polymer- ase	Expressionsstamm, Rekombinante Produk- tion von MMOR und MMOB-Varianten
<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b (NCIMB 111131)	wt	Homologe Produktion von MMOH

2.1.5 Vektoren

In Tabelle 2.5 sind alle in der vorliegenden Arbeit hergestellten und verwendeten Vektoren aufgelistet.

Tabelle 2.5: Übersicht über die hergestellten und verwendeten Plasmide

Vektor	Resistenz	Quelle
pETSUMOadapt	Kan ^R	Zur Verfügung gestellt von Dr. Eva Bosse-Doenecke [Bosse-Doenecke et al., 2008]
pETSUMOadapt_mmob	Kan ^R	Zur Verfügung gestellt von Dr. A. Dillmann im Rahmen von [Griethe, 2018]
pETSUMOadapt_mmob01	Kan ^R	Vorliegende Arbeit
pETSUMOadapt_mmob02	Kan ^R	Vorliegende Arbeit
pETSUMOadapt_mmob03	Kan ^R	Vorliegende Arbeit
pETSUMOadapt_mmob04	Kan ^R	Vorliegende Arbeit
pETSUMOadapt_mmob05	Kan ^R	Vorliegende Arbeit
pETSUMOadapt_mmob06	Kan ^R	Vorliegende Arbeit
pETSUMOadapt_mmob07	Kan ^R	Vorliegende Arbeit
pETSUMOadapt_mmob08	Kan ^R	Vorliegende Arbeit
pET28a_mmoc	Kan ^R	Vorliegende Arbeit (synthetisiert von ThermoScientific GeneArt®)

2.1.6 Primer

Zur Amplifikation der MMOB-Gene wurden folgende Primer verwendet

Tabelle 2.6: mmob-Primer zur Genamplifikation

Bezeichnung	Sequenz	Restriktions-schnittstelle
mmob-fwd	5'- TCGGTCTCATGGTTCGTCTGCACACAACG -3'	BsaI
mmob-rev	5'- CGTCGGATCCTTAAATGTCCGTCAGTGC -3'	BamHI

Zur Überprüfung, ob die Insertion des mmob-Gens in den pETSUMOadapt-Vektor und die anschließende Transformation erfolgreich waren, wurde eine Kolonie-PCR mit folgenden Primern durchgeführt.

Tabelle 2.7: T7-Primer zur Kolonie-PCR

Bezeichnung	Sequenz
T7-fwd	5'- TAATACGACTCACTATAGGG -3'
T7-rev	5'- CTAGTTATTGCTCAGCGGT -3'

2.1.7 Enzyme, Kits und Reagenzien

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Enzyme, *kits* und molekularbiologische Reagenzien verwendet.

Tabelle 2.8: Verwendete Enzyme, molekularbiologische kits und zugehörige Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer	Bemerkung
DNA loading dye	ThermoScientific	R0611	6-fach
GeneRuler 1kb	ThermoScientific, USA	SM0313	
Massruler loading dye	ThermoScientific, USA	R0611	6-fach
Phusion DNA-Polymerase	ThermoScientific, USA		

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer	Bemerkung
BsaI Restriktionsenzym	ThermoScientific, USA	ER0291	10 U/μL
BamHI Restriktionsenzym	ThermoScientific, USA	ER0051	10 U/μL
Taq-PCR-Mastermix	NewEngland Biolabs	M0270L	2x
HF Puffer	ThermoScientific, USA	F518L	5x
dNTP-mix	ThermoScientific, USA	R0241	2 mM
Green buffer	ThermoScientific, USA	B72	10 x
T4-Ligase	ThermoScientific, USA	EL0011	5 U/μL
T4-Ligase Puffer	ThermoScientific, USA	B69	10x
GeneJet Plasmid Miniprep Kit	ThermoScientific, USA	K0502	
Lösliche Methanmonoxygenase (sMMO):			
Hydroxylase (MMOH)	A. Griethe, J. Groen		Vorliegende Arbeit
Protein B (MMOB)	J. Groen		Vorliegende Arbeit
Reduktase (MMOR)	J. Groen		Vorliegende Arbeit
Katalase (C30)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	C30	10 000 – 40 000 U/mg
Glucosedehydrogenase	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	19359-10MG-F	≥ 200 U/mg
SUMO-Protease scULP1	J. Groen		Auf Grundlage von [Koyuturk, 2015; Thümmeler, 2018]

2.1.8 Geräte

Tabelle 2.9: Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Agarosegelapparatur	HE 33 Mini Horizontal Submarine	GE Healthcare, Chicago, USA
Autoklav	Varioklav Dampfsterilisator	H&P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland
Chromatographieanlage	ÄKTA® pure, Fraction collector F9-C	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Chromatographiesäule	XK 16/20	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Chromatographiesäule	XK 26/20	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Chromatographiesäule	Superdex G-200 pg 26/600 mm	GE Healthcare, Chicago, USA
Chromatographiesäulenmaterial	Nickel Sepharose excel®	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Chromatographiesäulenmaterial	Q-Sepharose FF	GE Healthcare, Chicago, USA
Dialyseschlauch	Spectra/Por Dialysis Membrane 50 kDa, 30 kDa, 10 kDa	Spectrum Labs, Breda, Niederlande
Elektrophoresestromversorgung	EPS 301	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden

Gerät	Typ	Hersteller
Bioreaktor und Zubehör	Biostat C, 38241455	B. Braun Biotech International Satorius group, Melsungen, Deutschland
Filter	Express™ Plus, 0,22 µm	Merck KGaA, Darmstadt, Germany
Flaschenaufsatz Filteranlage		Thermo Scientific, Waltham, USA
Flowbox	Nu-440-400	NuAire Inc., Plymouth, USA
Gaschromatograph	GC Agilent 7890B	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
GC-Säule	HP-5ms, 30 m x 0,25 mm, 0,25 Micron	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Geldokumentation	G:Box	Syngene Europe, Cambridge, UK
Hochdruckhomogenisator	Emulsiflex C5	Avestin Inc., Ottawa, Kanada
Hochleistungsflüssigkeitschromatograph	HPLC Agilent 1290 Infinity II: High speed pump G7120A Multisampler G7167B Column oven G7116B Diode array detector G7115A Fluorescence detector G7121B	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Hochleistungsflüssigkeitschromatographiesäule	InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2,1 x 50 mm, 4 Micron	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Inkubator		Heraeus, Hanau, Deutschland
Magnetrührer	CIMARECi mono	Thermo Scientific, Waltham, USA
Magnetrührer	IKA big squid	IKA® Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland
Massenspektrometer VarioOne-Prototyp		VarioLytics, Stuttgart, Deutschland
Membranfilter	Amicon Ultracentrifugal Filter Units 50 kDa, 20 kDa, 10 kDa	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Membranreaktor		entwickelt von Fraunhofer IGB Stuttgart, Deutschland
Mikrowelle	NN SD452 W	Panasonic, Kadoma, Japan
Peristaltikpumpe		Watson-Marlow, Falmouth, UK
pH-Meter	pH level 2	WTW Inolab, Xylem analytics, Weilheim, Deutschland
Photometer	Ultrospec 2100pro	
Photometer	Nano Drop OneC	Thermo Scientific, Waltham, USA
Pipetten	1 - 10 µL 2 - 20 µL 10 - 100 µL 100 - 1000 µL 500 - 5000 µL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Röhrenzentrifuge	CEPA Z 41 g	Carl Padberg Zentrifugenbau GmbH, Lahr/Schwarzwald, Deutschland
Roller-Mixer	SRT1	Bibby Stuart Scientific
Schüttler	Multitron	Infors HT, Bottmingen, Schweiz
SDS-PAGE Anlage und Zubehör		Bio-Rad, Feldkirchen, Deutschland

Gerät	Typ	Hersteller
Spritzen mit und ohne Luer-Lock	5 - 50 ml	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Spritzenfilter Rotilabo®	0,2 µm, CA, steril	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Thermoblock & -mixer mit Aufsätzen für 1,5 mL, 2 mL & 15 mL Reaktionsgefäße	ThermoStat plus & Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermocycler (PCR)	T advanced	Biometra, Göttingen, Deutschland
Ultra Turrax®	Micra R-T D-1	ART moderne Labortechnik, Mühlheim, Deutschland
Ultraschallbad	Sonorex Super 10 P	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Umlaufkühler	Minichiller	Peter Huber Kältemaschinenbau AG, Offenburg, Deutschland
Umwälzthermostat		Julabo, Seelbach, Deutschland
UV-vis-Einweg-Küvetten	Mikro, Polystyrol	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Germany
Vakuumpumpe		Saskia Hochvakuum GmbH, Dresden, Deutschland
vis-Einweg-Küvetten	Halbmikro, Polystyrol	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Germany
Vortex	Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Waage	EA6DCE-L, BP 221S, BL 310	Satorius AG, Göttingen, Deutschland
Waage	572-371, FKB	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
Wipptisch	Rocky 1000	Fröbel Labortechnik, Lindau, Deutschland
Zentrifuge	5415 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge	Micro Centrifuge SD	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge	Mikro 220R	Hettich Lab, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge	Avanti J30i, Rotor JA-10, Rotor JA 30.50	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Zentrifuge	Sorvall Lynx 6000	Thermo Scientific, Waltham, USA

2.2 Molekularbiologische Methoden zur Herstellung von MMOB-Varianten

Mit der Methode des rationalen Enzymdesigns wurden acht Varianten des regulatorischen Protein B entworfen (Tabelle 3.14, Seite 102). Die Gene wurden von der Firma GeneWiz synthetisiert und im Rahmen der vorliegenden Arbeit in den Vektor pETSUMOadapt kloniert. Die Gensequenzen und die Vektorkarte sind im Anhang 8.2 (Seite 148) dargestellt. In den Folgenden Kapiteln sind die verwendeten molekulargenetischen Methoden inklusive der Transformation des Produktionsorganismus beschrieben.

2.2.1 Amplifikation der MMOB-Gene mittels PCR

Die von GeneWiz hergestellten mmob-Gene wurden mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Dazu wurden die lyophilisierten Gene in dH₂O gelöst und eine Konzentration von 50 µg/mL eingestellt. Die DNA-Konzentration wurde über die Absorption bei 260 nm mit dem NanoDrop OneC gemessen. Ein PCR-Ansatz wurde nach der in Tabelle 2.10 beschriebenen Zusammensetzung pipettiert.

Tabelle 2.10: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes (50 µL) zur Amplifikation eines mmob-Gens

Komponente	c(stock)	c(final)	Volumen
Phusion DNA-Polymerase	2 U/mL	0.02 U/mL	0.5 µL
HF Puffer	5 x	1 x	10 µL
Primer mmob-fwd	10 pmol/µL	0.5 pmol/µL	2.5 µL
Primer mmob-rev	10 pmol/µL	0.5 pmol/µL	2.5 µL
dNTP-mix	2 mM	200 µM	10 µL
Template DNA	50 ng/µL	1 – 5 ng/µL	2 µL
dH ₂ O			22,5 µL

Die PCR wurde mit folgendem Ablauf durchgeführt.

Tabelle 2.11: PRC-Programm zur Amplifikation von mmob-Genen

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
2. Denaturierung	95 °C	1 min
3. Primer-Hybridisierung	66 °C	1 min
4. Elongation	72 °C	1 min
Wiederholung der Schritte 2 – 4 in 25 Zyklen		
5. finale Elongation	72 °C	3 min
7. Ende	4 °C	

2.2.2 Klonierung der MMOB-Gene in den Vektor pETSUMOadapt

Das Plasmid pETSUMOadapt und die PCR-Produkte der Amplifikation der mmob-Gene wurden jeweils mit den Restriktionsenzymen BsaI und BamHI verdaut, um passende 5'- und 3'-Überhänge für die nachfolgende Ligation zu generieren. In den folgenden Tabellen sind die Zusammensetzungen der Restriktionsansätze aufgelistet.

Tabelle 2.12: Zusammensetzung des Restriktionsansatzes (40 µL) zum Verdau der mmob-PCR-Produkte

Komponente	c(stock)	c(final)	Volumen
Green Puffer	10 x	1 x	4 µL
BsaI	10 U/µl	0.5 U/µL	2 µL
BamHI	10 U/µL	0.5 - 1 U/µL	2 - 4 µL
mmob-PCR-Produkt	-	-	28 µL
dH ₂ O			2 µL

Tabelle 2.13: Zusammensetzung des Restriktionsansatzes (40 µL) zum Verdau des Zielvektors

Komponente	c(stock)	c(final)	Volumen
Green Puffer	10 x	1 x	4 µL
BsaI	10 U/µl	1 U/µL	2 µL
BamHI	10 U/µL	1 U/µL	2 µL

Komponente	c(stock)	c(final)	Volumen
pETSUMOadapt	168 ng/μL	50 ng/μL	12 μL
dH ₂ O			20 μL

Nach Zugabe aller Komponenten wurden die Ansätze für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Für die Ligation der mmob-Gene in den pETSUMOadapt-Vektor wurde in den jeweiligen Ansätzen ein stöchiometrisches von mmob-Gen zu Vektor von 5:1 eingestellt. Mit Hilfe der Anzahl an Basenpaaren der jeweiligen DNA-Moleküle, wurde mit folgender Formel die benötigte Masse berechnet.

$$m_{\text{Vektor}} = \frac{m_{\text{Insert}} \cdot bp_{\text{Vektor}}}{5 \cdot bp_{\text{Insert}}} \quad \text{Gleichung 2.1} \quad \begin{array}{l} bp_{\text{Vektor}} = 5642 \\ bp_{\text{Insert}} = 427 \end{array}$$

Die Ligationsansätze wurden nach folgender Zusammensetzung angefertigt. Die Ligationreaktion wurde für eine Stunde bei 23 °C inkubiert und anschließend direkt zur Transformation eingesetzt.

Tabelle 2.14: Zusammensetzung des Ligationsansatzes (40 μL)

Komponente	c(stock)	c(final)	Volumen
T4-Ligase	5 Weiss U/μL	0.1 Weiss U/μL	1 μL
T4-Ligase Puffer	10 x	1 x	5 μL
mmob-Insert	9,9 ng/μL		20 μL
pETSUMOadapt Vektor	50 ng/μL		10 μL
dH ₂ O			4 μL

2.2.3 Transformation von *E. coli* KRX

Zur Expression der Gene der MMOB-Varianten wurden die Ligationsprodukte aus Kapitel 2.2.2 zur Transformation des Stammes *E. coli* KRX eingesetzt. Im Folgenden ist die Transformation für eine MMOB-Variante beschrieben. 100 μL chemokompetente *E. coli* KRX-Zellen wurde auf Eis aufgetaut. 20 μL der Ligationreaktion wurden zugegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 30 Sekunden in einem Wasserbad bei 42 °C. Der Transformationsansatz wurde sofort wieder auf Eis gekühlt. Nach fünf Minuten wurden 800 μL vortemperiertes SOC-Medium zugegeben. Die Zellen wurden für mindestens eine Stunde bei 30 °C und 250 rpm inkubiert. Zur Selektion erfolgreich transformierter Zellen wurden 100 μL der Zellsuspension auf LB-Agarplatten mit 50 μg/mL Kanamycin ausgestrichen. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelne Kolonien wurden ausgewählt und mittels Kolonie-PCR analysiert.

2.2.4 Kolonie-PCR

Zur Untersuchung, ob die Klonierung und die Transformation erfolgreich waren, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dazu wurden Einzelkolonien von der LB-Agarplatte aus Kapitel 2.2.3 in 50 μL dH₂O suspendiert. Die Zellsuspension wurde für zehn Minuten bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurde eine PCR mit dem Taq-Polymerase-MasterMix (NEB) nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei 1 μL der Zellsuspension als DNA-Template diente. Die Analyse der PCR-Ansätze erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

2.3 Mikrobiologische und chromatographische Methoden zur Bereitstellung von sMMO-Komponenten

2.3.1 Homologe Produktion der MMOH in *Methylosinus trichosporium* OB3b

Die Arbeiten zur Kultivierung von *Methylosinus trichosporium* OB3b wurden von Dr. Andreas Griethe durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte auf Basis der in seiner Dissertationsarbeit entwickelten Protokolle [Griethe, 2018]. Das Kulturvolumen betrug 68 L und als Kohlenstoffquelle wurde Methanol eingesetzt. Abweichend zu der beschriebenen Kultivierung wurde Ammonium anstelle von Nitrat als Stickstoffquelle verwendet. Die Zufuhr fand über die pH-Regulierung mittels NH_4OH (15 % (w/v)) statt. Die erhaltene Biomasse wurde freundlicherweise für die Aufarbeitung der MMOH im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Verfügung gestellt.

2.3.2 Reinigung der MMOH

Die Reinigung der MMOH aus *M. trichosporium* OB3b erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Andreas Griethe. Die Reinigungsstrategie basierte ebenfalls auf der Dissertationsarbeit von Dr. Griethe [Griethe, 2018]. Abweichend dazu wurde nur eine Anionenaustauschchromatographie (AEC) bei Raumtemperatur durchgeführt. Die beschriebene Größenausschlusschromatographie wurde umgangen.

133,8 g gefrorene Biomasse aus der in Kapitel 2.3.1 beschriebenen Kultivierung wurden auf Eis aufgetaut und in 350 mL Aufschlusspuffer 1 (Tabelle 2.2, Seite 22) resuspendiert. Zur Homogenisierung der Zellsuspension wurde der Ultra-Turrax® (ART) verwendet. Die Zellen wurden durch 3 Passagen bei 900 bar mit dem Hochdruckhomogenisator (APV 2000) aufgeschlossen und anschließend bei $105000 \times g$ und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde die MMOH mittels Anionenaustauschchromatographie isoliert. Dazu wurde eine ÄKTA Explorer (GE Healthcare) und eine Q-Sepharose FF (XK50/20)-Säule mit einem Säulenvolumen (CV) von 270 mL verwendet. Bei allen Schritten der Chromatographie wurde eine Flussrate von 2 mL/min eingestellt. Die Absorption des Durchflusses wurde bei 280 nm gemessen. Die Säule wurde mit Puffer A1 (Tabelle 2.2, Seite 22) äquilibriert. Mit einer externen Probenpumpe wurde das Rohextrakt (435 mL) aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 2 CV Puffer A1 gewaschen. Zur Elution wurde über 4 CV der Anteil an Puffer B1 (Tabelle 2.2, Seite 22) auf 100 % linear erhöht, was einem NaCl-Gradient von 0 - 400 mM entsprach. Das Eluat wurde in 14 mL-Fractionen gesammelt. Basierend auf dem Chromatogramm wurden Fraktionen ausgewählt und mittels SDS-PAGE analysiert (Kapitel 2.5.3, Seite 43). Die sMMO-Aktivität einzelner Fraktionen wurde mit dem Nitrobenzol-Assay (Kapitel 2.4.2, Seite 36) bestimmt. Fraktionen mit ausreichender Homogenität wurden vereint, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.3 Heterologe Produktion der MMOR in *Escherichia coli*

Eine höhere Ausbeute an aktiver MMOR war für nachfolgende Arbeiten nötig. Deshalb wurde die Produktion rekombinant in *E. coli* KRX durchgeführt. Dazu wurde das Plasmid pET28a_mmoc entworfen und von der Firma ThermoScientific GeneArt® synthetisiert. Die Sequenz wurde von der Firma Eurofins® bestätigt. Die Transformation des Stammes *E. coli* KRX mit dem Plasmid pET28a-mmoc ist in Kapitel 2.2.3 (Seite 30) beschrieben. Zunächst wurde eine Kultivierung im Schüttelkolben-Maßstab durchgeführt. Die Ausbeute an Biomasse wurde anschließend durch eine *Fed-batch* Fermentation erhöht.

2.3.3.1 Kultivierung von *E. coli* KRX pET28a-mmoc im Schüttelkolben

Für die Kultivierung im Schüttelkolben wurden zunächst 2 x 50 mL TB-Medium mit 50 µg/mL Kanamycin von einer Einzelkolonie angeimpft. Die Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C und 180 rpm im Schüttler inkubiert. Die optische Dichte (OD_{600}) der Vorkultur wurde am nächsten Morgen gemessen. Für die Hauptkultur wurden 7 x 500 mL TB-Medium mit 50 µg/mL Kanamycin von der Hauptkultur angeimpft. Das entsprechende Volumen der Vorkultur wurde in die Hauptkultur überführt und OD_{600} der Hauptkultur auf 0,05 eingestellt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 130 rpm. Vor der Induktion wurde aus einer sterilen, frisch angefertigten Stammlösung $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$ zu einer finalen Konzentration von 100 µM zugegeben. Die Induktion erfolgte bei einer OD_{600} von 0,6 durch Zugabe von Rhamnose mit einer finalen Konzentration von 0,1 % (w/v) und IPTG mit einer finalen Konzentration von 0,1 mM. Als Kontrolle wurde ein Kolben (1 x 500 mL) nicht induziert. Zum Zeitpunkt der Induktion und im weiteren Verlauf der Kultivierung wurden Proben zur OD_{600} -Bestimmung genommen und 1/ OD -Proben zur späteren SDS-PAGE-Analyse angelegt (Kapitel 2.5.3, Seite 43). Ab sechs Stunden nach Induktion wurde die Temperatur auf 25 °C reduziert. 22 Stunden nach Induktion wurde das Volumen der induzierten Kulturen für 30 min bei 6 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Biomasse wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C gelagert.

2.3.3.2 Fed-batch-Fermentation von *E. coli* KRX pET28a-mmoc

Die Kultivierung von *E. coli* KRX pET28a-mmoc wurde im Bioreaktor Biostat C (V = 15 L) durchgeführt. Vor der Fermentation wurden die pO_2 - und die pH-Elektrode nach Herstellerangaben kalibriert. Der Fermenter wurde mit 262,5 g Hefeextrakt, 3,75 g Ammoniumchlorid und 1 mL Struktol J673 in einem Gesamtvolumen von 7,5 L dH₂O befüllt und bei 121 °C für 30 Minuten sterilisiert. 44 g D-Glucose-Monohydrat in 250 mL dH₂O und 82,5 g Di-Kaliumhydrogenphosphat in 300 mL dH₂O wurden separat autoklaviert und anschließend steril in den Fermenter gepumpt. Kanamycin wurde steril zu einer finalen Konzentration von 25 µg/mL zugegeben. Zur automatischen pH-Regulierung wurden sterile Lösungen von 20 % (w/v) H₃PO₄ und 10 % (w/v) KOH in dH₂O angeschlossen. Um Schaumbildung zu reduzieren, wurde eine sterile Lösung von 20 % (v/v) Struktol J673 angeschlossen. Bevor die Kultivierung gestartet wurde, sind die aufgeführten Kultivierungsparameter eingestellt worden.

Tabelle 2.15: Kultivierungsparameter für Fermenter Biostat C

Parameter	Wert
pH	7,0
Temperatur	37 °C
pO_2	<i>lower limit 30 % (cascade)</i>
Rührergeschwindigkeit	400 rpm (<i>cascade</i>)
Luftzufuhr	4,5 L/min (<i>cascade</i>)

Zum Animpfen der Hauptkultur wurde eine dreistufige Vorkultur in LB-Medium mit 50 µg/mL Kanamycin vorbereitet. Das Volumen wurde dabei von 2 x 20 mL, auf 2 x 100 mL und weiter auf 3 x 500 mL erhöht. Die Inkubation jeder Stufe der Vorkultur erfolgte geschüttelt bei 37 °C für mindestens 12 Stunden oder über Nacht. 1,5 L der dritten Vorkultur wurden für 20 Minuten bei 6000 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden in 200 mL sterilem LB-Medium resuspendiert und als Inokulum in den Fermenter transferiert. Über den gesamten Fermentationsverlauf wurden steril Proben entnommen und anschließend die OD_{600} und die Glucosekonzentration bestimmt. Für die Messung der Glucosekonzentration wurde zunächst 1 mL der Zellsuspension für drei Minuten bei 16 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen

und mit dem Gerät YSI 2700 Select nach Herstellerangaben analysiert. Zudem wurden 1/OD-Proben zur späteren SDS-PAGE-Analyse (Kapitel 2.5.3, Seite 43) angefertigt und bei -20 °C gelagert. Nachdem die Glucose im Medium vollständig verbraucht war, wurde ein kontinuierlicher *feed* einer Lösung mit 150 g/L Hefeextrakt und 25 % (v/v) Glycerin mit einer Pumpgeschwindigkeit von 70 g/h gestartet. Fünf Stunden nach dem Start der Kultivierung wurden 7,5 mL einer 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ -Lösung steril zugegeben. Sechs Stunden nach dem Start der Kultivierung wurde die Temperatur auf 25 °C gesenkt. Die Induktion der Genexpression erfolgte, nachdem eine OD_{600} von 30 erreicht wurde. Dazu wurden 40 mL einer 2,3 M Rhamnose-Lösung und 7,5 mL einer 0,1 M IPTG-Lösung zugegeben. Die finalen Konzentrationen der Induktoren betrugen 6,1 mM Rhamnose und 0,1 mM IPTG. Nach einer Gesamtzeit von 24 Stunden und einer Induktionszeit von 17 Stunden wurde die Kultivierung beendet. Die Zellsuspension wurde für 30 Minuten bei 6000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Biomasse wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -20 °C gelagert.

2.3.4 Reinigung der MMOR

Für die Isolation der heterolog produzierten MMOR aus *E. coli* KRX wurde eine Strategie aus zwei aufeinanderfolgenden Anionenaustauschchromatographie-Schritten (AEC) verfolgt. Im Anschluss wurde die Reinheit über die Aktivität der MMOR bestimmt. Fraktionen mit verminderter Aktivität wurden bei Bedarf vereint und zusätzlich mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) gereinigt.

106,1 g Biomasse aus der *Fed-batch*-Fermentation (Kapitel 2.3.3.2) wurden mit 300 mL Aufschlusspuffer 2 (Tabelle 2.2, Seite 22) versetzt, auf Eis aufgetaut und mit Hilfe des Ultra-Turrax resuspendiert. Der Zellaufschluss wurde mit dem Hochdruckhomogenisator (APV 2000) bei 900 – 1000 bar in drei Passagen durchgeführt. Die Probe wurde zwischen den Zyklen auf Eis gekühlt. Zelltrümmer und partikuläre Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 50 000 x g für 40 Minuten bei 4 °C abgetrennt. Der Überstand wurde abgenommen und mit Puffer A2 (Tabelle 2.2, Seite 22) auf ein Volumen von 402 mL mit einer Proteinkonzentration von 16 mg/mL verdünnt. Die folgende AEC wurde mit Hilfe einer ÄKTApure (GE Healthcare) durchgeführt. Im ersten AEC-Schritt wurde eine Q-Sepharose FF (XK26/20)-Säule mit einem Säulenvolumen (CV) von 68 mL und einer Flussgeschwindigkeit von 4 mL/min verwendet. Während der gesamten Chromatographie wurde die Absorption des Durchflusses bei 280 nm und bei 465 nm (Absorption des Cofaktors FAD) aufgezeichnet. Nachdem die Säule mit Puffer A2 äquilibriert wurde, wurde das Rohextrakt über die integrierte Probenpumpe aufgetragen. Nicht gebundene Zellbestandteile wurden mit 8 CV Puffer A2 von der Säule gewaschen. Die Elution gebundener Proteine erfolgte durch einen linearen Gradienten von 0 – 100 % Puffer B2 über 10 CV, was einer Änderung der NaCl-Konzentration von 50 auf 500 mM entsprach. Während der Elution wurden Fraktionen mit einem Volumen von 2 – 10 mL gesammelt.

Anhand des Chromatogramms und einer SDS-PAGE-Analyse wurden Fraktionen ausgewählt und vereint. Das Volumen der Probe nach der ersten AEC betrug 83 mL. Um die NaCl-Konzentration zu verringern, wurden die vereinten Fraktionen dialysiert. Die Dialyse erfolgte in Dialyseschläuchen mit einem Größenausschluss von 20 kDa über Nacht bei 4 °C gegen 4 L Puffer A2. Aggregate wurden anschließend durch Zentrifugation bei 50 000 x g und 4 °C für 30 Minuten abgetrennt.

Für die zweite AEC wurde eine Q-Sepharose FF (XK16/20)-Säule mit einem Säulenvolumen (CV) von 10,3 mL und einer Flussgeschwindigkeit von 3 mL/min verwendet. Die Säule wurde mit Puffer A2 äquilibriert und die Probe wurde über die Probenpumpe aufgetragen. Anschlie-

End wurde die Säule mit 5 CV und einem Anteil von 35 % Puffer B2 gewaschen. Die Elution erfolgte durch einen linearen Gradienten von 35 – 100 % B2 über 5 CV. Die Säule wurde für weitere 5 CV mit 100 % Puffer B2 gespült. Das Eluat wurde ebenfalls fraktioniert und anschließend mittels SDS-PAGE analysiert. Die Reinheit der MMOR wurde über den FAD-Gehalt (Kapitel 2.5.2, Seite 43) und einen Aktivitätstest (Kapitel 2.4.1, Seite 35) ermittelt.

Fraktionen mit nicht ausreichender Aktivität wurden vereint, und es wurde eine SEC als weiterer Reinigungsschritt durchgeführt. Für die SEC wurde eine ÄKTAprime mit einer Superdex (G-200 pg 26/600 mm)-Säule verwendet. Die SEC wurde vollständig bei 4 °C durchgeführt. Mittels Ultrafiltration mit Amicon®-Filtereinheiten (20 kDa) wurde die Probe auf ein Volumen von 3,1 mL eingengt. Die Säule wurde mit Puffer A2 und einer Flussrate von 1 mL/min äquilibriert. Die Probe wurde mit einem Spritzenfilter filtriert und mit Hilfe des *capillary loops* aufgetragen. Der SEC-Lauf erfolgte mittels isokratischer Elution über 1,5 CV mit 1 mL/min. Der Durchfluss wurde fraktioniert und mittels SDS-PAGE analysiert. Die Reinheit wurde ebenfalls durch einen Aktivitätstest überprüft. Homogene MMOR-haltige Fraktionen wurden vereint, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.3.5 Heterologe Produktion von SUMO-MMOB in *Escherichia coli*

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Varianten von MMOB produziert und gereinigt. Für alle Varianten wurde dieselbe Produktions- und Reinigungsstrategie verfolgt. Der verwendete Stamm *E. coli* BL21 (DE3) Gold pETSUMOadapt_mmob zur Produktion von His₆-SUMO-MMOB (im Folgenden SUMO-MMOB) wurde von Dr. A. Dillmann im Rahmen der Dissertation von Dr. A. Griethe [Griethe, 2018] erstellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die *E. coli*-Stämme zur Produktion von MMOB-Varianten wurden in der vorliegenden Arbeit erstellt (Kapitel 2.2, Seite 28). Die Arbeiten zur Produktion und zur Reinigung des wt MMOB wurden im Rahmen eines Forschungsgruppenpraktikums in Zusammenarbeit mit Luisa von Wolffersdorff durchgeführt. Abhängig von der benötigten Proteinmenge wurde der Maßstab der Kultivierung und der Aufarbeitung angepasst. Im Folgenden ist der Maßstab einer ausgewählten Kultivierung dargestellt.

3 x 100 mL LB-Medium mit 25 µg/mL Kanamycin wurden als Vorkultur mit einer Einzelkolonie von einer LB-Agarplatte des jeweiligen Stammes angeimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C und 120 rpm. Als Hauptkultur wurden 12 x 500 mL LB-Medium mit 25 µg/mL Kanamycin auf eine Start-OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Dazu wurde das entsprechende Volumen der Vorkultur steril in die Hauptkultur überführt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 90 rpm. Die Induktion erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0,8 durch Zugabe von 0,1 mM IPTG. Während der Kultivierung wurden Proben genommen und zur späteren SDS-PAGE-Analyse (Kapitel 2.5.3, Seite 43) eingefroren. Fünf Stunden nach der Induktion wurde die Kultivierung beendet. Die Zellsuspension wurde für 30 Minuten bei 6000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Biomasse wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C gelagert.

2.3.6 Reinigung von wt MMOB

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Reinigungen des MMOB in unterschiedlichen Maßstäben durchgeführt. In diesem Kapitel ist die Reinigung von Wildtyp MMOB aus der in Kapitel 2.3.5 produzierten Biomasse beschrieben.

34,4 g Biofeuchtmasse wurden in 140 mL Aufschlusspuffer 3 versetzt und auf Eis aufgetaut. Der Zellaufschluss wurde in drei Passagen mit dem Hochdruckhomogenisator (Emulsiflex) bei 900 – 1000 bar durchgeführt. Die Suspension wurde für 40 Minuten bei 50 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde das SUMO-MMOB-Fusionsprotein mittels Me-

tationen-Affinitätschromatographie (IMAC) gereinigt. Dazu wurde eine ÄKTApure mit einer Ni-Sepharose excel® Säule mit einem Säulenvolumen (CV) von 38 mL verwendet. Die Säule wurde mit 4 mL/min Puffer A3 (Tabelle 2.2, Seite 22) äquilibriert. Der Überstand nach Zentrifugation wurde mit der Probenpumpe aufgetragen. Die Säule wurde mit 5 CV Puffer A3 gewaschen. Zur Elution wurde der Anteil an Puffer B3 über 3 CV von 0 % auf 100 % linear erhöht, was einen Imidazol-Gradienten von 20 – 750 mM entsprach. Das Eluat wurde fraktioniert und mittels SDS-PAGE analysiert (Kapitel 2.5.3, Seite 43). SUMO-MMOB-haltige Fraktionen wurden vereint (98 mL) und über Nacht in Dialyseschläuchen mit 10 kDa Porengröße gegen 4 L Aufschlusspuffer 3 (Tabelle 2.2, Seite 22) dialysiert. Mit Hilfe der SUMO-Protease (siehe Anhang 8.5, Seite 153) wurde die SUMO-Domäne proteolytisch abgespalten. Dazu wurde SUMO-Protease in einem stöchiometrischen Verhältnis zum Substrat SUMO-MMOB von 1:200 zugegeben und die Lösung für zwei Stunden bei 30 °C inkubiert. Um das native MMOB aus der Proteinlösung zu isolieren, wurde eine zweite IMAC mit der gleichen Säule durchgeführt. Die Säule wurde mit 4 mL/min Puffer A3 äquilibriert. Die Proteinlösung wurde mit der Probenpumpe aufgetragen. Der MMOB-haltige Durchfluss wurde fraktioniert. Die Säule wurde mit 2 CV Puffer A3 gewaschen. Zur Elution der gebundenen Proteine wurde die Säule mit 3 CV Puffer B3 gespült. Proben der Durchflussfraktionen, der Waschfraktion und der Elutionsfraktion wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Der Reinigungserfolg wurde durch Messung der sMMO-Aktivität (Kapitel 2.4.2, Seite 36) mit den jeweiligen MMOB-Fractionen bestätigt. Homogene MMOB-haltige Fraktionen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei - 80 °C gelagert.

2.3.7 Reinigung von MMOB-Varianten

Zur Reinigung der MMOB-Varianten wurde die gleiche Reinigungsstrategie wie in Kapitel 2.3.6 verwendet. Der Maßstab der Reinigung war jedoch kleiner. Es wurden zwischen 0,3 und 0,5 g Biofeuchtmasse für die Reinigung einer Variante verwendet. Die Reinigung wurde nicht mit der ÄKTApure, sondern mit His-GravyTraps (Tropfsäulen) mit einem Säulenvolumen von 1 mL durchgeführt. Es wurden die gleichen Puffer verwendet. Die Volumina wurden entsprechend der Herstellerempfehlung angepasst. Die Dialyse, der proteolytische Verdau und die Analytik wurden analog zur Reinigung des wt MMOB durchgeführt.

2.4 Enzymatische Methoden

2.4.1 DCPIP-Assay zur Bestimmung der MMOR-Aktivität

Der Umsatz von Dichlorphenol-indophenol (DCPIP) durch die Reduktase (MMOR) wurde photometrisch mit dem Ultrospec 2100pro verfolgt. Für den DCPIP-Assay wurde Puffer R (Tabelle 2.2, Seite 22) in UV-Mikroküvetten vorgelegt und bei 45 °C temperiert. Das Reaktionsvolumen betrug 500 µL. MMOR-haltige Proteinlösung wurde zu einer finalen Proteinkonzentration zwischen 1 und 12 µg/mL zugegeben. Die Absorption bei 600 nm wurde als Referenzwert auf Null gesetzt. Aus einer 1 mM DCPIP-Lösung in Puffer R wurden 50 µL zu einer finalen Konzentration von 100 µM zugegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µL einer 10 mM NADH-Lösung ($c_{\text{final}} = 1 \text{ mM}$) gestartet. Die Abnahme der Absorption bei 600 nm wurde über einen Zeitraum von fünf Minuten verfolgt. Aus der initialen Steigung wurde mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von DCPIP ($\epsilon_{600} = 13\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, [Fox *et al.*, 1990]) die Reaktionsgeschwindigkeit ermittelt. Da DCPIP auch ohne MMOR durch NADH reduziert wird, wurde eine Referenzreaktion ohne Enzym durchgeführt. Aus der Differenz der

Reaktionsgeschwindigkeiten der Reaktionen mit und ohne Enzym wurde die Aktivität der MMOR berechnet.

2.4.2 Nitrobenzol-Assay zur Bestimmung der sMMO-Aktivität

Der Umsatz von Nitrobenzol durch die sMMO wurde photometrisch mit dem Ultrospec 2100pro verfolgt. Für den Nitrobenzol-Assay wurde TMA-Puffer (Tabelle 2.2, Seite 22) in UV-Mikroküvetten vorgelegt und bei 30 °C temperiert. Das Reaktionsvolumen betrug 500 µL. Aus einer 10 mM Nitrobenzol-Lösung in TMA-Puffer wurden 50 µL zu einer finalen Konzentration von 1 mM zugegeben. Die sMMO-Komponenten MMOH, MMOB und MMOR wurden zugegeben, die finalen Konzentrationen betrugen jeweils 1 µM. Dabei bezieht sich die Konzentrationsangabe auf eine katalytisch aktive Einheit aus MMOH ($\alpha\beta\gamma$), MMOB und MMOR. Die Absorption bei 420 nm wurde als Referenzwert auf Null gesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µL einer 10 mM NADH-Lösung ($c_{\text{final}} = 1 \text{ mM}$) gestartet. Die sMMO setzte Nitrobenzol unter anderem zu p-Nitrophenol um, welches unter den verwendeten Bedingungen teilweise zu p-Nitrophenolat dissoziiert. Die Bildung von p-Nitrophenolat wurde durch Messen der Absorption bei 420 nm ($\epsilon_{420} = 8715 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, [Griethe, 2018]) über einen Zeitraum von fünf Minuten verfolgt. Aus der initialen Steigung der ermittelten Produktkonzentration wurde die Reaktionsgeschwindigkeit ermittelt. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde auf die eingesetzte Masse an aktiven MMOH-Einheiten ($\alpha\beta\gamma$, $c = 1 \text{ µM}$, $M = 123,863 \text{ kDa}$) bezogen und daraus die Enzymaktivität berechnet. Da die sMMO Nitrobenzol unter den verwendeten Bedingungen zu einem Gemisch aus 89 % p-Nitrophenol und 11 % m-Nitrophenol umsetzt [Froland *et al.*, 1992; Griethe, 2018], wurde die finale Enzymaktivität um den entsprechenden Faktor korrigiert.

2.4.3 sMMO-katalysierter Umsatz von Nitrobenzol im OxyTherm

Die enzymatische Oxidation von Nitrobenzol wurde auch im OxyTherm (Hansatech) durchgeführt. Das Gerät misst die Sauerstoffkonzentration in Lösung über einer Platin-Elektrode am Boden des Reaktionsraumes. Vor den Versuchen wurde eine Kalibrierung nach Herstellerangaben durchgeführt. Das finale Reaktionsvolumen betrug 1,2 mL und die Temperatur wurde auf 30 °C eingestellt. Reaktionsbedingungen einer Standardreaktion und die dafür benötigten Volumina sind in Tabelle 2.16 gezeigt. Davon abweichende Versuchsbedingungen sind zum jeweiligen Versuch in Kapitel 3.2 (Seite 58) und in der zusammenfassenden Tabelle 3.4 (Seite 67) aufgelistet. Die Stammlösungen wurden, wenn nicht anders angegeben mit TMA-Puffer als Lösungsmittel hergestellt.

Zunächst wurde das benötigte Volumen TMA-Puffer (Tabelle 2.2, Seite 22) im Reaktionsraum vorgelegt. Standardmäßig wurde eine Rührgeschwindigkeit von 15 % (Herstellerangaben) eingestellt. Es folgte die Zugabe der Nitrobenzol- und der D-Glucose-Lösung. Dann wurden die Proteine zugegeben. Die benötigten Volumina der sMMO-Komponenten wurden berechnet, nachdem die Konzentrationen der Proteinlösungen bestimmt wurden (Kapitel 2.5.1). Lyophilisierte Glucosedehydrogenase (GDH, aus *Pseudomonas spec.*, Sigma-Aldrich) wurde zunächst in TMA-Puffer gelöst und es wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 5 mg/mL hergestellt. Die Katalase (Cat, aus Rinderleber, Sigma-Aldrich) wurde als Suspension geliefert. Nach Herstellerangaben wurde die Suspension mit TMA-Puffer auf 5 mg/mL verdünnt, für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und dann für 10 Minuten bei 16 000 x g zentrifugiert. Vom Überstand wurde das entsprechende Volumen zur Reaktion zugegeben.

Parallel zur kontinuierlichen Sauerstoffmessung wurden während der Reaktion Proben genommen ($V = 2,5 \mu\text{L}$) und direkt mittels NanoDrop OneC analysiert. Es wurde jeweils ein UV-Vis-Spektrum aufgenommen. Anhand der Absorption bei 420 nm wurde die Konzentration von p-Nitrophenol ($\epsilon_{420} = 8715 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, [Griethe, 2018]) bestimmt. Die Konzentrationswerte der jeweiligen Reaktion wurden in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Mit Hilfe des Programms *Origin 2019* und der Funktion „Analyse > Mathematik > Mehrere Kurven Mitteln“ wurden mindestens drei Replikate zu einer Progresskurve gemittelt und als Konzentrationsverlauf dargestellt.

Tabelle 2.16: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes zum enzymatischen Umsatz von Nitrobenzol im OxyTherm

Komponente	c(stock)	c(final)	Volumen
MMOH	Zuvor bestimmt (2.5.1)	1 μM	abh. von c(stock)
MMOB	Zuvor bestimmt (2.5.1)	1 μM	abh. von c(stock)
MMOR	Zuvor bestimmt (2.5.1)	1 μM	abh. von c(stock)
Glucosedehydrogenase	5 mg/mL	5 $\mu\text{g/mL}$	1,2 μL
Katalase	5 mg/mL	100 $\mu\text{g/mL}$	24 μL
Nitrobenzol	10 mM	1 mM	120 μL
D-Glucose	500 mM	50 mM	120 μL
NADH	10 mM	1 mM	120 μL
TMA-Puffer			ad. 1,2 mL

2.4.4 sMMO-katalysierter Umsatz im diskontinuierlichen HPLC-Assay

Der sMMO-katalysierte Umsatz von Benzol, Naphthalin und verschiedenen Probengemischen wurde diskontinuierlich mittels HPLC-verfolgt. Der allgemeine Ablauf einer Reaktion ist im Folgenden beschrieben. Abweichende Parameter sind im Ergebnisteil zum entsprechenden Versuch näher erläutert.

Als Reaktionsgefäße wurden 22 mL Bördekappen-Glasgefäße verwendet, die in einem Magnetrührer ausgestattet und in einem Inkubator auf 30 °C temperiert wurden. Das Reaktionsvolumen betrug 4 mL. Demnach betrug der Gasraum über der Probe bei verschlossenem Gefäß 18 mL. Es wurden dieselben Stammlösungen wie in Kapitel 2.4.3 (Tabelle 2.16, Seite 37) verwendet. Die finalen Konzentrationen sind im Ergebnisteil des jeweiligen Versuchs angegeben. TMA-Puffer wurde vorgelegt und es folgte die Zugabe der D-Glucose- und der Enzym-Lösungen. Dann wurden Substratlösungen zugegeben. Für den Umsatz von Benzol wurde eine gesättigte Lösung von Benzol in TMA-Puffer hergestellt ($c = 22 \text{ mM}$, [GESTIS-Stoffdatenbank, 2021a]). Aus dieser gesättigten Lösung wurde das entsprechende Volumen in das Reaktionsgefäß pipettiert. Das Substrat Naphthalin wurde entweder als Feststoff oder ebenfalls aus einer gesättigten Lösung ($c = 0,24 \text{ mM}$, [GESTIS-Stoffdatenbank, 2021c]) in TMA-Puffer zugegeben. Anstatt der wässrigen Substratlösung wurde in einigen Versuchen *n*-Decan als Lösungsmittel für die Substrate verwendet. In diesen Reaktionsansätzen wurden 200 μL der organischen Lösung zugegeben. Direkt nach Zugabe der Substrate wurden die Gefäße mit einem Teflon-Septum und einer Aluminium-Kappe gasdicht verschlossen. Der Ansatz wurde für 10 Minuten bei der Reaktionstemperatur von 30 °C inkubiert, bevor mit Hilfe einer Spritze mit Kanüle 400 μL 10 mM NADH-Lösung ($c_{\text{final}} = 1 \text{ mM}$) zugegeben wurden, um die Reaktion zu starten. Vor Reaktionsstart und während der Reaktion wurden Proben genommen. Dazu wurden mit einer Hamilton-Spritze 90 μL der wässrigen Phase

der Reaktionslösung durch das Septum entnommen und in Reaktionsgefäße gegeben, in denen 10 µL 50 % (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) zum sofortigen Abstoppen der Reaktion vorgelegt wurden. Die Proben wurden sofort gemischt und dann für mindestens zehn Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für zehn Minuten bei 16 000 x g und 4 °C wurden 36 µL des Überstandes in HPLC-Probengefäße überführt und mit 4 µL 100 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) versetzt. Die HPLC-Analyse ist in Kapitel 2.5.5 (Seite 44) beschrieben.

Um die Substratkonzentration zu Beginn der Reaktion bestimmen zu können, wurde das Volumen der gesättigten Substratlösung in das entsprechende Volumen TMA-Puffer ohne Enzyme gegeben. Dadurch konnte derselbe Verdünnungsfaktor erreicht werden. Da keine Proteinpräzipitation nötig war, wurde die Lösung direkt mittels HPLC analysiert. Um den Verlust an Benzol durch Evaporation zu minimieren, wurden die Proben durchgehend auf 4 – 6 °C gekühlt.

Im Fall einer organischen Phase aus *n*-Decan, wurden vor und nach der Reaktion 20 µL der organischen Substratlösung mit 180 µL *n*-Decan verdünnt. Die Analyse erfolgte mittels Gaschromatographie (Kapitel 2.5.6, Seite 45).

In einigen Versuchen wurden kleinere HPLC-Probengefäße ($V = 1,5$ mL) mit den entsprechenden Deckeln als Reaktionsgefäße verwendet. Die benötigten Volumina wurden entsprechend auf ein Gesamtvolumen von 1 mL angepasst.

2.4.5 sMMO-katalysierter Umsatz im Zwei-Phasen-System im Rührkesselreaktor

Die Versuche zum enzymatischen Umsatz im Rührkesselreaktor wurden am Fraunhofer IGB (Stuttgart) durchgeführt. Um den Maßstab der enzymatischen Reaktion zu vergrößern wurde ein Rührkesselreaktor ($V = 1$ L) des DASGIP Parallelfementer-Systems von Eppendorf verwendet. Die Substratversorgung fand über eine organische Phase mit *n*-Decan als Lösungsmittel statt. Das Volumen der organischen Phase in der Reaktion betrug 17,5 mL. Die Zusammensetzung der Substratlösung in *n*-Decan ist im Ergebnisteil zum jeweiligen Versuch angegeben. Das Volumen der wässrigen Phase betrug 350 mL. Die Zusammensetzung und die verwendeten Stammlösungen der wässrigen Phase sind in Tabelle 2.17 dargestellt.

Tabelle 2.17: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes zum enzymatischen Umsatz im DASGIP Rührkesselreaktor

Komponente	c(stock)	c(final)	Volumen
MMOH	Zuvor bestimmt (2.5.1)	2 µM	Anhängig von c(stock)
MMOB	Zuvor bestimmt (2.5.1)	2 µM	Anhängig von c(stock)
MMOR	Zuvor bestimmt (2.5.1)	2 µM	Anhängig von c(stock)
Glucosedehydrogenase	5 mg/mL	5 µg/mL	350 µL
Katalase	5 mg/mL	200 µg/mL	14 mL
BSA	40 mg/mL	10 mg/mL	87,5 mL
D-Glucose	500 mM	50 mM	35 mL
NADH	10 mM	1 mM	35 mL
TMA-Puffer			ad. 350 mL

Zunächst wurde der Kessel mit dem entsprechenden Volumen TMA-Puffer und D-Glucose-Lösung befüllt. Dann folgte die Zugabe der Proteinlösungen, welche zuvor mittels Spritzenfilter filtriert wurden. Der Kessel wurde verschlossen und in die DASGIP-Plattform eingesetzt.

Mit Hilfe der zugehörigen Software wurde die Rührgeschwindigkeit auf 180 rpm und die Temperatur auf 30 °C eingestellt. Ein- und Auslass des Massenspektrometers VarioOne (Variolitics) wurden über ein Septum im Deckel des Kessels angeschlossen, sodass Kontakt zur Lösung bestand und Blasenbildung vermieden wurde. 17,5 mL der Substratlösung in *n*-Decan wurden über einen Einlass im Deckel des Kessels zugegeben. Um zu vermeiden, dass die MS-Analytik durch kleine Tröpfchen des organischen Lösungsmittels gestört wird, wurde der Rührer während der Zugabe der Substratlösung gestoppt und anschließend wieder gestartet. Die Konzentrationen von Benzol, Phenol und Toluol in der wässrigen Phase wurden kontinuierlich mit dem VarioOne verfolgt (Kapitel 2.5.7, Seite 46). Nach etwa 20 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe der NADH-Lösung gestartet. Diese wurde mit Hilfe einer Spritze über ein Tauchrohr direkt in die wässrige Phase des Reaktionsansatzes gepumpt. Während der Reaktion wurden ebenfalls über ein Tauchrohr Proben genommen. 90 µL jeder Probe wurden zum Abstoppen der Reaktion direkt mit 10 µL 50 % (v/v) TFA versetzt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Proben wurden bei 16 000 x g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. 36 µL des Überstandes wurden mit 4 µL 100 mM TCEP versetzt und in HPLC-Probengefäße gegeben. Vor und nach der Reaktion wurden zudem Proben der organischen Phase entnommen und 1:10 mit *n*-Decan verdünnt. Die Proben aus der wässrigen Phase wurden mittels HPLC und die der organischen Phase wurden mittels GC analysiert. Die Analyse wurde von der zentralen Analytik-Abteilung des Fraunhofer IGB nach den Vorschriften in Kapitel 2.5.5 und 2.5.6 durchgeführt.

2.4.6 sMMO-katalysierter Umsatz von Ethylen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden alle Arbeiten zum Umsatz von Ethylen am Fraunhofer IGB (Stuttgart) durchgeführt. Die verwendeten Anlagen und Geräte waren ATEX-zertifiziert.

2.4.6.1 Umsatz von Ethylen im 10-mL-Maßstab

Als Reaktionsgefäße dienten Bördelkappen-Glasgefäße mit einem Gesamtvolumen von 22 mL. Das Reaktionsvolumen betrug 10 mL. Somit betrug das Volumen des Kopfraumes über der Lösung 12 mL. Es wurden dieselben Stammlösungen wie in Kapitel 2.4.3 (Tabelle 2.16, Seite 37) verwendet. Das Reaktionsgefäß wurde mit TMA-Puffer (Tabelle 2.2, Seite 22), 50 mM D-Glucose und 1 mM NADH und Magnetprüher befüllt, gasdicht verschlossen und bei 30 °C unter Rühren inkubiert. Ein- und Auslass des Massenspektrometers VarioOne wurden über das Septum im Deckel angeschlossen (Abbildung 2.1). Die Peristaltikpumpe P1 des VarioOne wurde auf 5,1 mL/min eingestellt. Die Begasung erfolgte ebenfalls über das Septum im Deckel mit Hilfe von Kanülen. Zunächst wurde der Kopfraum mit 100 % Sauerstoff gesättigt. Anschließend wurde mit einer gasdichten Spritze 5 mL Ethylen zusätzlich in den Kopfraum gegeben. Nach Erreichen einer konstanten Substratkonzentration in der wässrigen Phase (stabiles MS-Signal) wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 µg/mL Katalase, 5 µg/mL GDH und 2 µM sMMO-Komponenten gestartet. Diese wurden kurz zuvor vereinigt und mit Hilfe einer Spritze zugegeben. Während der Reaktion wurden Substrat- und Produktkonzentrationen in der Flüssigphase kontinuierlich mittels Massenspektrometrie (Kapitel 2.5.7, Seite 46) verfolgt.

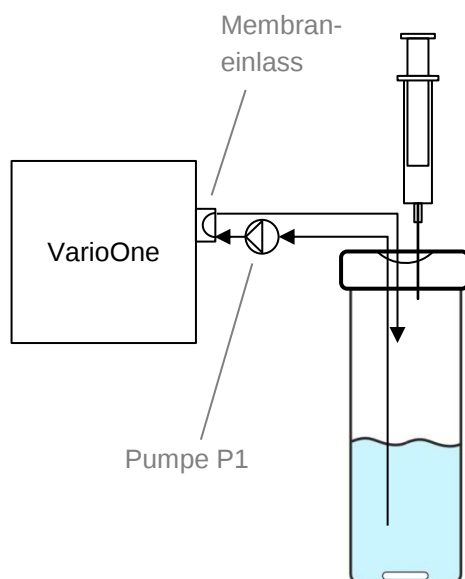


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zum Umsatz von Ethylen im 10-mL-Maßstab; Reaktionsgefäß: $V = 22 \text{ mL}$; Ein- und Auslass des VarioOne-Massenspektrometers über Septum angeschlossen; Zugabe von Ethylen mittels gasdichter Spritze über das Septum in den Kopfraum des Reaktionsgefäßes; Aufbau verwendet für Reaktionen E1 (3.3.3) und E2 (3.5.1.1).

2.4.6.2 Umsatz von Ethylen in Membranreaktor

Der enzymatische Umsatz von Ethylen wurde unter anderem im Membranreaktor (MBR) demonstriert. Ein 3-D-Modell, sowie der schematische Aufbau des Reaktors sind in Abbildung 2.3 und Abbildung 2.2 dargestellt. Die Reaktion im MBR wurde analog zu den Versuchen in 10 mL-Maßstab (Kapitel 2.4.6.1) durchgeführt.

Das Volumen einer Kammer des MBR (Kammer Rxn) beträgt 560 mL. Um eine Umwälzung des Reaktionsvolumens zu ermöglichen und Volumenschwankungen zu kompensieren, wurde eine Schlauchpumpe (P2) inklusive Ausgleichsbehälter integriert. Das Betriebsmindestvolumen für eine Kammer des MBR inklusive Ausgleichsbehälter und Umwälzung wurde auf 700 mL bestimmt. Sowohl der Reaktor als auch der Ausgleichsbehälter wurden auf 30°C temperiert. Zunächst wurde der Reaktor über den Ausgleichsbehälter mit entsprechendem Volumen TMA-Puffer (Tabelle 2.2, Seite 22) mit 50 mM D-Glucose und 1 mM NADH befüllt. Anschließend wurden die beiden anliegenden Kammern (G1, G2) mit Sauerstoff bzw. Ethylen gespült. Durch das Schließen der Ventile V3 und V4 am Gasauslass des MBR wurde Druck in der jeweiligen Kammer aufgebaut, welcher durch die entsprechenden Ventile V1 und V2 reguliert wurde. Anschließend wurde mittels Pumpe P2 die blasenfreie Umwälzung des Reaktorvolumens garantiert.

Ein- und Auslass des Massenspektrometers VarioOne wurden an die Schlauchverbindungen zwischen Reaktionskammer (Rxn) und Ausgleichsbehälter angeschlossen. Vor Reaktionsstart wurden zunächst $200 \mu\text{g/mL}$ Katalase und $5 \mu\text{g/mL}$ GDH über ein Septum direkt in die Kammer Rxn des MBR gegeben. Nach Erreichen einer konstanten Sauerstoff- und Ethylenkonzentration in der Lösung wurde die Reaktion durch Zugabe von $2 \mu\text{M}$ aller sMMO-Komponenten gestartet. Während der Reaktion wurden Substrat- und Produktkonzentrationen kontinuierlich mittels Massenspektrometrie (Kapitel 2.5.7, Seite 46) verfolgt.

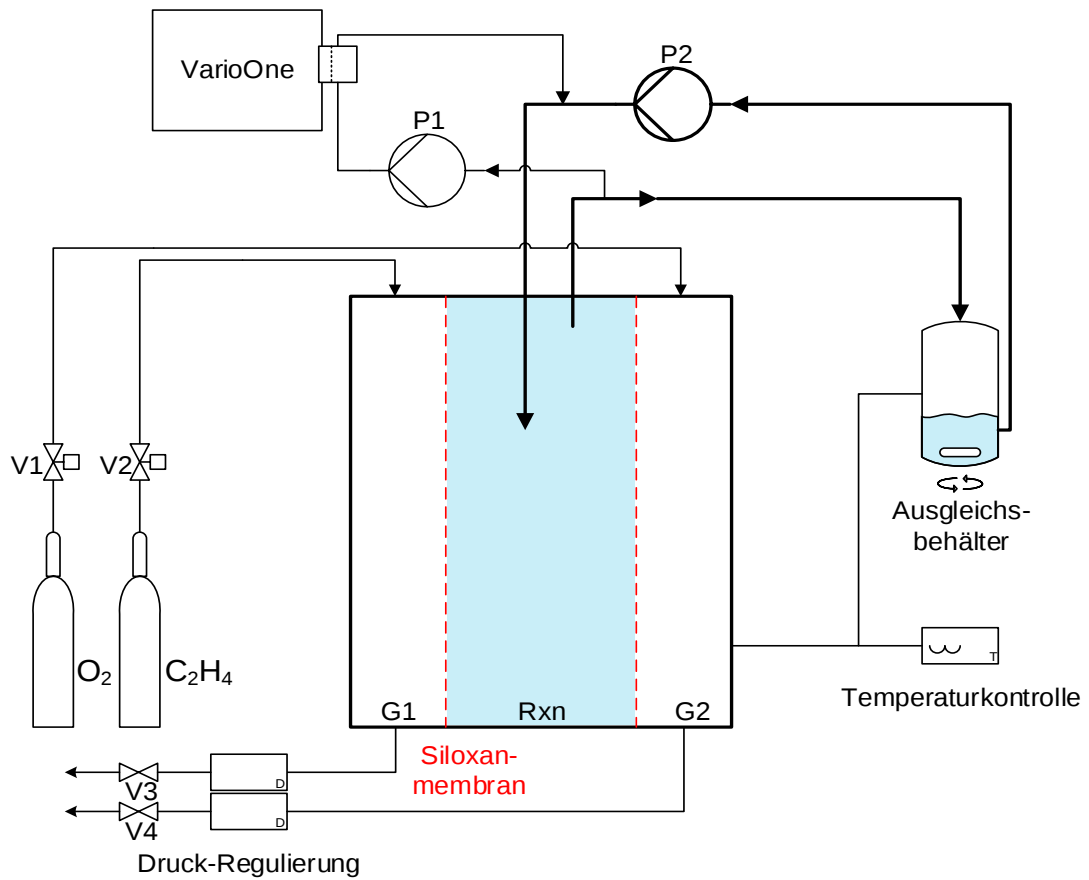


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Reaktionsaufbaus zum Umsatz von Ethylen im Membranreaktor; Reaktionskammer (Rxn): $V = 560 \text{ mL}$; Reaktionsvolumen: $V_{\text{total}} = 700 \text{ mL}$; $T = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$; Pumpe P1: $5,2 \text{ mL/min}$; Pumpe P2: 825 mL/min ; G1: Kammer Ethylen, Druck $p_{G1} = 0,5 - 2 \text{ bar}$; G2: Kammer Sauerstoff, $p_{G2} = 0,5 - 2 \text{ bar}$;

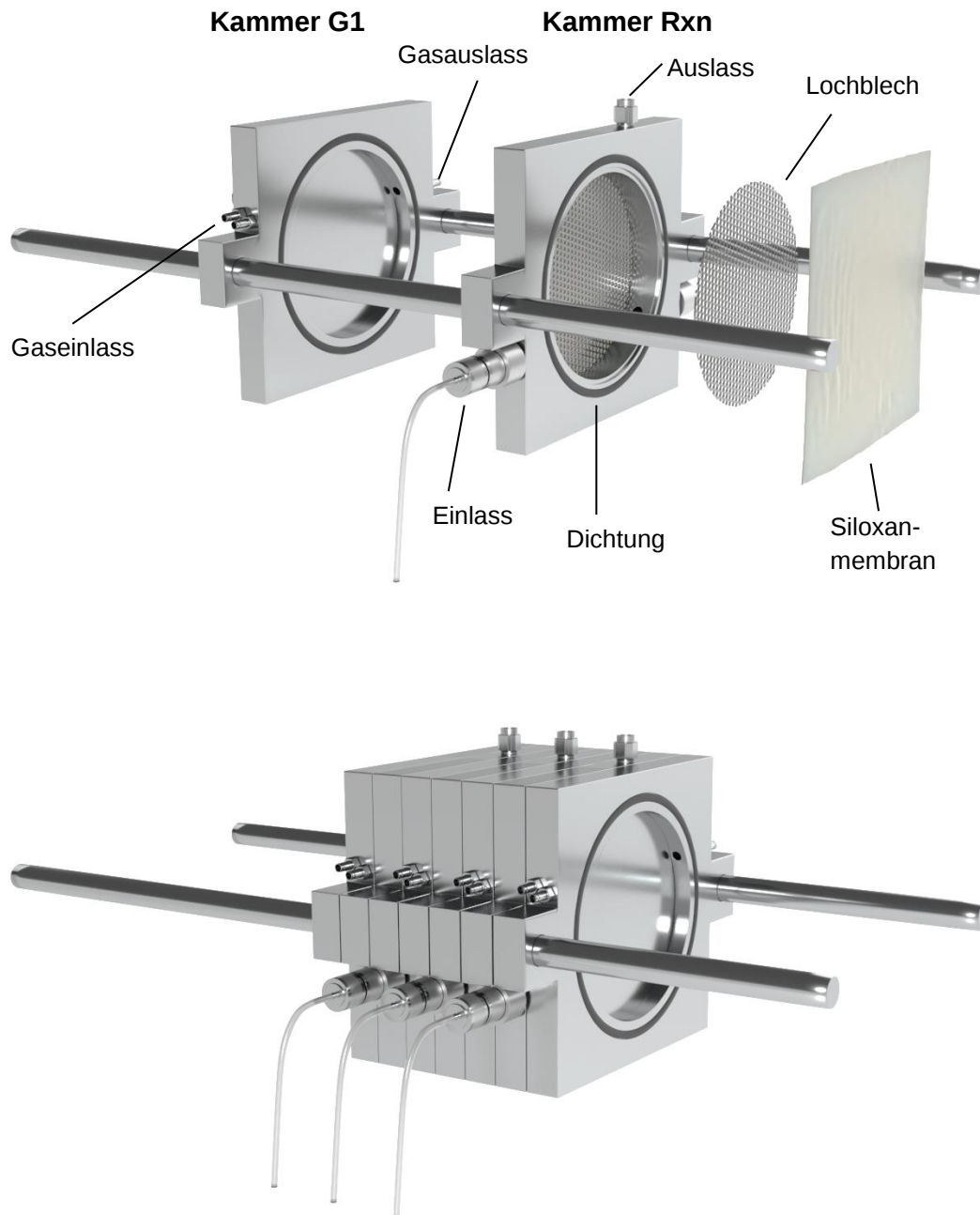


Abbildung 2.3: 3-D-Modell des Membranreaktors, vereinfachte Darstellung entspricht näherungsweise dem Original; oben: Explosionszeichnung / geöffneter Zustand des Reaktors; unten: geschlossener Zustand des Reaktors mit mehreren Kammern; Kammer G1 und Kammer Rxn siehe Abbildung 2.2 (Seite 41), erstellt mit *blender*

2.5 Analytische Methoden

2.5.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Nach der Reinigung der sMMO-komponenten und vor jedem *in vitro* Einsatz der Proteine wurde die Proteinkonzentration gemessen. Zur Bestimmung der Konzentration der Glucosedehydrogenase, der Katalase und der MMOR wurde der Bradford-Assay verwendet. Die Konzentrationen von MMOH und MMOB wurden durch Messung der Absorption bei 280 nm ermittelt.

2.5.1.1 Bradford-Assay

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Test nach Bradford verwendet [Bradford, 1976]. 975 μL Bradford-Lösung (Tabelle 2.2, Seite 22) wurden in einer Halbmikro-Küvette vorgelegt und mit 25 μL Probe versetzt und gemischt. Nach zwei Minuten wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Als *blank* wurden 25 μL des verwendeten Puffers anstelle der Probe eingesetzt. Zur Berechnung der Proteinkonzentration wurde eine Kalibrierung mit Rinderserumalbumin (BSA) im entsprechenden Puffer im Bereich von 0,05 – 0,5 mg/mL erstellt.

2.5.1.2 Absorption bei 280 nm

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Absorption bei 280 nm mit dem NanoDrop OneC gemessen. Mit der vom Hersteller integrierten Methode wurden 2,5 μL Probe unverdünnt gemessen. Auf Basis des Lambert-Beer'schen Gesetzes wurde mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten die Konzentration berechnet [Beer, 1852]. Die verwendeten Extinktionskoeffizienten und Molekulmassen wurden mit der Anwendung ProtParam (expasy.org) ermittelt sind in Tabelle 2.18 aufgelistet.

Tabelle 2.18: Extinktionskoeffizient und Molekulargewicht verschiedener Proteine

Protein	Extinktionskoeffizient 280 nm [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]	Molekulargewicht [kDa]
MMOH ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$)	546000	247,725
MMOH ($\alpha\beta\gamma$)	273000	123,863
MMOB	15470	14,752
SUMO-MMOB	16960	28,15

2.5.2 Bestimmung des FAD-Gehalts der MMOR

Der FAD-Gehalt der MMOR wurde nach dem Protokoll von Kopp *et al.* durchgeführt [Kopp *et al.*, 2001]. Zunächst wurde die Konzentration einer MMOR-Präparation bestimmt (Kapitel 2.5.1.1). 50 μL einer MMOR Präparation mit einer Konzentration von 1 – 5 mg/mL wurden für fünf Minuten bei 99 °C inkubiert. Das denaturierte Protein wurde durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 13 000 x g abgetrennt. Mit dem NanoDrop OneC wurde ein Absorptionsspektrum des Überstandes aufgezeichnet. Über den Extinktionskoeffizient von FAD ($\epsilon_{450} = 11\,300 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) wurde die Konzentration von FAD im Überstand bestimmt und mit der initialen Proteinkonzentration ins Verhältnis gesetzt.

2.5.3 SDS-PAGE

Trenn- und Sammelgele wurden nach folgender Zusammensetzung mit der Gel-Präparationsapparatur (Biorad) hergestellt.

Tabelle 2.19: Pipettierschema zur Herstellung von SDS-PA-Gelen

Komponente	2 Trenngele (12,5 %)	2 Sammelgele (4,5 %)
Trenngelpuffer	2,5 mL	-
Sammelgelpuffer	-	1,25 mL
30 % Acrylamid/Bisacrylamid	4,2 mL	0,75 mL
dH ₂ O	3,3 mL	3,1 mL
TEMED	10 µL	10 µL
gesättigte APS-Lösung	20 µL	8 µL

Der SDS-PAGE-Probenpuffer wurde durch Zugabe von 10 µL/mL 2-Mercaptoethanol oder 10 mM DTT vervollständigt. Die Proben wurden mit 20 – 80 % (v/v) Probenpuffer versetzt und bei 95 °C für fünf Minuten inkubiert. Wenn nicht spezifiziert, wurden 10 µL jeder Probe und 5 µL des Molekulargewichts-Markers aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für die ersten sechs Minuten bei 80 mA und 300 V und für weitere 25 Minuten bei 60 mA und 300 V durchgeführt. Während der Elektrophorese wurde die Laufkammer mit Wasser gekühlt.

Nach der elektrophoretischen Trennung wurde das Gel für mindestens eine Stunde in Färbelösung auf dem Wipptisch inkubiert. Zur Entfärbung wurde das Gel in Entfärbelösung inkubiert. Diese wurde nach ca. 30 Minuten gewechselt, bis das Gel ausreichend entfärbt war.

2.5.3.1 1/OD₆₀₀-Proben

Zur Analyse der Proteine in *E. coli*-Zellen während der Kultivierung, wurden Proben der Zellsuspension mit dem Volumen $V \text{ [mL]} = 1/\text{OD}_{600}$ zentrifugiert (16 000 x g, 10 min). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in 100 µL SDS-PAGE-Probenpuffer mit 2-Mercaptoethanol resuspendiert. Die Proben wurden ebenfalls für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert und anschließend mittels SDS-PAGE analysiert.

2.5.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse von DNA-Molekülen während der Klonierung, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden 0,35 g Agarose in 35 mL TAE-Puffer erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Die Lösung wurde auf ca. 60 °C abgekühlt, 20 µL Ethidiumbromidlösung ($c(\text{stock}) = 1 \text{ g/L}$) wurden zugegeben und die Lösung wurde in die Gelkammer gegossen. Nach dem Aushärten des Gels wurden 5 - 10 µL Probe oder DNA-Referenzmarker in die Geltaschen gegeben. Die Proben wurden zuvor mit 6 x DNA-Probenpuffer im Verhältnis von 5:1 versetzt. Die Elektrophorese wurde für eine Stunde bei 80 V und 400 mA durchgeführt. Zur Analyse der DNA-Banden wurde eine UV-Gel-Dokumentationsanlage verwendet.

2.5.5 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Eine diskontinuierliche Analyse von Substrat- und Produktkonzentrationen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels HPLC und GC durchgeführt. Die Proben wurden entsprechend der Beschreibung in Kapitel 2.4.4 aufgearbeitet und anschließend vermessen. Die HPLC-Analytik erfolgte mit einer Agilent 1290 Infinity II HPLC mit Diodenarraydetektor. Die Parameter sind in der folgenden Tabelle aufgelistet. Die Detektion einzelner Substanzen fand bei unterschiedlichen Wellenlängen statt. Zur Quantifizierung wurde eine Kalibrierung mit den jeweiligen Referenzsubstanzen unter den gleichen Reaktionsbedingungen erstellt. Die Peak-Fläche wurde in Abhängigkeit von der Konzentration aufgetragen. Die Kalibriergeraden sind in Anhang 8.9 (Seite 155) dargestellt.

Tabelle 2.20: Parameter der HPLC-Analyse

Gerät:	AGILENT 1290 Infinity II		
Säule:	InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 2,1 x 50 mm, 4 Micron		
Laufmittel:	A: H ₂ O + 0,1 % (v/v) TFA B: Acetonitril + 0,1 % (v/v) TFA		
Methode:	Injektionsvolumen: 2 µL		
	Flussrate: 0,5 mL/min		
	Gradient:		
	Zeit [min]	Acetonitril [%]	
	0,0	5	
	1,5	10	
	6,5	60	
	6,51	85	
	7,0	85	
post time 0.5 min			
Detektion:	Diodenarraydetektor		
	Komponente	λ [nm]	Retentionszeit [min]
	Benzol	208	4,297
	Phenol	275	2,168
	Hydrochinon	275/289	0,575
	Toluol	208/254	5,41
	Benzylalkohol	208/254	2,03
	p-Kresol	275	3,39
	Naphthalin	275	6,119
	1-Naphthol	275	4,754
	2-Naphthol	275	4,556

2.5.6 Gaschromatographie (GC)

Substrat- und Produktlösung in organischem Lösungsmittel wurden mittels GC analysiert. Dazu wurde eine Agilent 7890A Gaschromatograph mit einer HP-5ms (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm) Säule verwendet. Zum Spülen der Injektionsnadel wurde Dichlormethan verwendet. Vor der Injektion wurden die Proben 1:10 mit dem entsprechenden Lösungsmittel verdünnt. Zur Quantifizierung wurde eine Kalibrierung mit den jeweiligen Referenzsubstanzen unter den gleichen Reaktionsbedingungen erstellt. Die *Peak*-Fläche wurde in Abhängigkeit von der Konzentration aufgetragen. Die Kalibriergeraden sind in Anhang 8.10 (Seite 157) dargestellt.

Tabelle 2.21: Parameter der GC-Analyse

Gerät:	AGILENT 7890B		
Säule:	Agilent HP-5ms 30 m x 0,25 mm, 0,25 Micron		
Carrier-Gas	He 1,5 mL/min <i>constant flow</i>		
Methode:	Injektionsvolumen 1 µL		
	<i>Inlet:</i> T = 250 °C		
	Split ratio 1:100		

Gerät:	AGILENT 7890B	
Detektion:	Ofen:	
	Zeit [min]	T [°C]
	0,0	80
	1,0	80
	4,4	250
	post time 1 min	
	Flammenionisationsdetektor (FID)	
Detektion:	T = 300 °C	
	Air flow 400 mL/min	
	H ₂ -fuel flow 40 mL/min	
	N ₂ markup flow 10 mL/min	
	Komponente	Retentionszeit [min]
	Benzol	1,722
Detektion:	Toluol	1,98
	Naphthalin	3,575
	n-Decan Lösungsmittel-peak	2,8 – 2,85

2.5.7 Massenspektrometrie

Die Analytik der Substrat- und Produktkonzentration erfolgte mittels kontinuierlicher Massenspektrometrie (MS). Dazu wurde der Prototyp VarioOne der Firma VarioLytics (Stuttgart) verwendet. Der Flüssigeinlass ermöglicht eine kontinuierliche Messung verschiedener Substanzen in wässriger Lösung. Der Aufbau und die Funktionsweise des Flüssigeinlasses mit anschließender quantitativer MS-Analyse sind auf der Internetseite des Herstellers veranschaulicht (www.variolitics.de/vario-two-flussig-und-gasanalysator/, Stand 26.10.2021). Ein- und Auslass zur Probenzufuhr wurden über Kapillaren an das Reaktionsgefäß angeschlossen, sodass die Reaktionslösung zur Messung schaumfrei ab- und zugeführt werden konnte. Das Totvolumen der Kapillaren und Schläuche wurde auf 1,9 mL ermittelt. Mit Hilfe der integrierten Schlauchpumpe wurden 5,1 mL Reaktionsvolumen pro Minute am Membraneinlass des VarioOne vorbeigepumpt. Volatile Substanzen gelangten durch die Membran in das Vorvakuum. Von dort wurden die Moleküle in das Hochvakuum zur massenspektrometrischen Analyse geleitet. Die Ionenstärke wurde parallel für mehrere Masse-Ladungsverhältnisse gemessen. Zur Auswertung wurde die Ionenstärke jeweils ins Verhältnis zur gemessenen Ionenstärke von Wasser ($m/z = 18$) gesetzt. Dadurch konnte ausgeglichen werden, dass äußere Einflüsse, wie Temperatur oder Luftdruckschwankungen das Messergebnis beeinflussten. Mit Hilfe einer Kalibrierung wurde aus der Ionenstärke die Konzentration der jeweiligen Substanzen bestimmt. Zur Kalibrierung wurden Lösungen mit bekannter Konzentration des jeweiligen Stoffes mit denselben Messparametern gemessen. Die Ionenstärke wurde nach Erreichen eines Plateaus über mehrere Sekunden gemittelt. In Anhang 8.11 (Seite 158) sind die Rohdaten der Kalibrierung und die daraus gebildeten Kalibriergeraden dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Produktion und Reinigung der sMMO-Komponenten

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war ein Ziel, die enzymatische Umsetzung von Ethylen, Benzol und Naphthalin durch die sMMO aus *M. trichosporium* OB3b *in vitro* zu untersuchen und den Maßstab der Enzymreaktionen zu vergrößern. Dafür war es notwendig, ausreichende Mengen der sMMO-Komponenten im hohen mg-Bereich zur Verfügung zu stellen. Bereits beschriebene Kultivierungs- und Reinigungsstrategien wurden dafür verwendet und teilweise angepasst. Alle Bestandteile der sMMO lassen sich homolog aus methanotrophen Bakterien isolieren. Zur Erhöhung der Ausbeute und der Möglichkeit zur genetischen Modifikation der Zielproteine, war eine rekombinante Produktion erstrebenswert. Rekombinante Produktionsstrategien sind bisher für das regulatorische Protein B (MMOB) und die Reduktase (MMOR) beschrieben. In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse zur Produktion und Aufarbeitung der drei sMMO-Komponenten MMOH, MMOB und MMOR vorgestellt.

3.1.1 Homologe Produktion der Hydroxylase

Da die Hydroxylase (MMOH) aus *Methylosinus trichosporium* OB3b bisher noch nicht in aktiver Form rekombinant produziert und gereinigt werden konnte [Jahng und Wood, 1994] und der Anteil an MMOH in *M. trichosporium* OB3b bis zu 12 % des Gesamtproteins beträgt [Fox et al., 1990], wurde die homologe Produktionsstrategie gewählt. Es wurden die in der Dissertationsschrift von Dr. Andreas Griethe beschriebenen Protokolle verwendet [Griethe, 2018]. Die Kultivierung wurde im *Fed-batch*-Prozess durchgeführt (siehe Kapitel 2.3.1, Seite 31). Aus einem finalen Kulturvolumen von 75 L konnten 4,4 kg Biofeuchtmasse geerntet werden (Daten nicht gezeigt), welche von Dr. A. Griethe zur weiteren Aufarbeitung der MMOH zur Verfügung gestellt wurde.

3.1.2 Reinigung der Hydroxylase aus *M. trichosporium* OB3b

Die Reinigung der Hydroxylase (MMOH) erfolgte aus dem Wildtyp Organismus *Methylosinus trichosporium* OB3b. Die ursprünglich auf der Arbeit von Fox und Kollegen basierende Reinigungsstrategie, bestehend aus einer Anionenaustauschchromatographie (AEC) und einer Größenausschlusschromatographie (SEC), wurde von A. Griethe weiterentwickelt [Fox et al., 1989; Griethe, 2018]. Diese Ergebnisse dienten als Grundlage für die Reinigung der MMOH in der vorliegenden Arbeit. Um größere Mengen gereinigter MMOH zur Verfügung zu stellen, sollte die Reinigungsstrategie vereinfacht werden. Da die SEC aufgrund des geringen Probenvolumens eine Skalierung des Reinigungsprozesses limitiert, sollte dieser Schritt vermieden werden. Ziel war die Vereinfachung des Reinigungsprozesses, um größere Mengen Biomasse in einem Durchgang aufarbeiten zu können. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde die Reinigung der MMOH mehrmals durchgeführt. Abweichend zu dem Protokoll von A. Griethe wurde lediglich die Anionenaustauschchromatographie (AEC) durchgeführt. Außerdem fand die Reinigung bei Raumtemperatur anstelle von 4 °C statt. In Tabelle 3.1 ist das Ergebnis einer Reinigung zusammengefasst. Als Indikator für die Reinheit der MMOH-Präparation diente die spezifische Aktivität. Die spezifische Aktivität wurde mit dem Nitrobenzol-Assay (Kapitel 2.4.2, Seite 36) bestimmt und sollte mindestens 100 mU/mg betragen. Bereits nach einer AEC konnten MMOH-haltige Fraktionen mit ausreichender Reinheit (120 mU/mg) erhalten werden. Aus 133,8 g Biofeuchtmasse wurden 1449 mg aktive MMOH gereinigt. Die auf die Aktivität bezogene Ausbeute betrug 328 %. Dabei ist zu beachten, dass

die Aktivität im Rohextrakt ohne zusätzliche Zugabe der Komponenten MMOB und MMOR erfolgte. Die resultierenden Aktivitätswerte sind demnach nicht unter denselben Bedingungen gemessen worden.

Mit der Reinigung in nur einem AEC-Schritt konnte genügend aktive MMOH für die nachfolgenden Untersuchungen bereitgestellt werden. Der Arbeitsaufwand wurde durch diese Vereinfachung der Aufarbeitungsstrategie deutlich verringert.

Tabelle 3.1: Reinigung der MMOH aus *M. trichosporium* OB3b; Die Messung der sMMO Aktivität erfolgte im Nitrobenzol Assay im Rohextrakt noch ohne Zusatz von MMOB bzw. MMOR danach mit jeweils 1 μ M MMOB bzw. MMOR.

Schritt	Konzentration	Volumen	Proteinmenge	Aktivität	Gesamtaktivität	Ausbeute	Anreicherungs- faktor
	mg/mL	mL	mg	mU/mg	U	%	
RE	20,3	435	8830,5	6,0	53	100	1
1. AEC	11,5	126	1449	120	174	328	20

3.1.3 Rekombinante Produktion der Reduktase

Im Organismus *Methylosinus trichosporium* OB3b liegt die Reduktase nur in geringen Mengen vor und macht nur etwa 0,1 – 0,3 % des löslichen Proteins im Wildtyp aus [Merkx *et al.*, 2001; Pilkington und Dalton, 1990]. Eine homologe Produktion und Reinigung ist deshalb mit hohem chromatographischen Aufwand und niedriger Ausbeute an gereinigter MMOR, in Bezug auf die eingesetzte Biomasse, verbunden [Fox *et al.*, 1989; Griethe, 2018]. Um die sMMO als Biokatalysator in größerem Maßstab nutzbar zu machen, war eine Optimierung der Produktion der MMOR notwendig. Die rekombinante Produktion aktiver MMOR in *Escherichia coli* ist bislang nur für die MMOR aus dem Organismus *Methylococcus capsulatus* Bath beschrieben [Kopp *et al.*, 2001; Lloyd, 1997; West *et al.*, 1992]. Hinweise über die Kreuzreaktivität der sMMO-Komponenten aus verschiedenen Organismen lieferten erstmals Stirling und Dalton 1979 [Stirling *et al.*, 1979].

In der vorliegenden Arbeit sollte die Ausbeute der rekombinanten Produktion der MMOR aus *M. capsulatus* Bath erhöht werden. Dazu wurde ein neues Expressionsplasmid auf Basis des Vektors pET28a für die rekombinante Produktion in *E. coli* entworfen. Die Vektorkarte und Sequenz ist im Anhang 8.1 (Seite 146) dargestellt. Die Gensynthese und Subklonierung in den Expressionsvektor wurden von der Firma GeneArt® (ThermoFisher Scientific) durchgeführt. Zur Expression wurde der Stamm *E. coli* KRX verwendet. Die Transformation des Stammes ist in Kapitel 2.2.3 (Seite 30) beschrieben. Die Kultivierung wurde zunächst im Schüttelkolben durchgeführt. Der Ablauf der Kultivierung ist in Kapitel 2.3.3.1 (Seite 32) beschrieben. In Abbildung 3.1A ist der Verlauf der optischen Dichte (OD_{600}) der *E. coli*-Kultur zur rekombinanten MMOR-Produktion dargestellt. Abbildung 3.1B zeigt die Analyse der intrazellulären Proteine der *E. coli*-Kultur mittels SDS-PAGE.

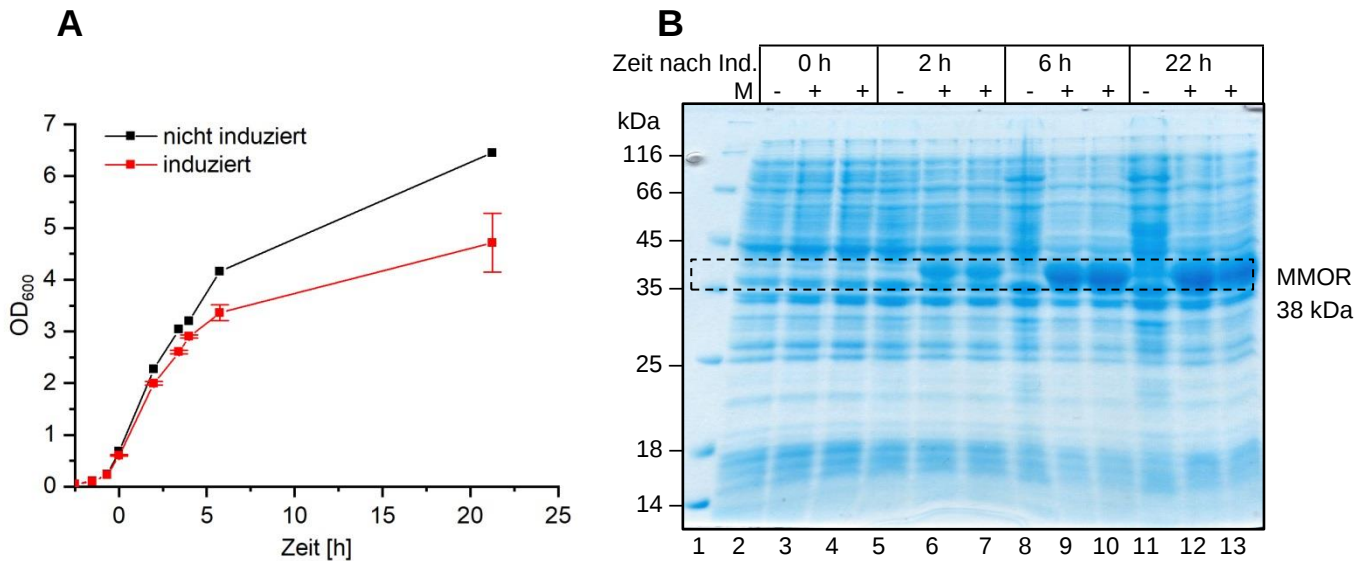


Abbildung 3.1: Kultivierung von *E. coli* KRX pET28a_MMOC im Schüttelkolben ($V = 500$ mL) zur rekombinanten Produktion von MMOR (MCB); Methode beschrieben in Kapitel 2.3.3.1 (Seite 32). A: Wachstumskurve; rot: induzierte Kultur ($n = 3$); schwarz: nicht induzierte Kontrolle ($n = 1$); Gesamtvolumen 3,5 L TB-Medium mit 50 $\mu\text{g/mL}$ Kanamycin, $T = 37$ °C, 130 rpm; Induktion bei $t = 0$ h durch Zugabe von final 0,1 % (w/v) Rhamnose und 0,1 mM IPTG; Zusatz von 0,1 mM $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ zum Zeitpunkt der Induktion. B: SDS-PAGE-Analyse von $1/\text{OD}_{600}$ -Proben (Kapitel 2.5.3.1, Seite 44) von induzierter (+) und nicht induzierter Kultur (-); Probenahme zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion; M: *Unstained Protein Molecular Weight Marker*; $\text{MW}_{\text{MMOR}} = 38$ kDa.

Zu Beginn der Kultivierung steigt die optische Dichte bis zum Induktionszeitpunkt ($t = 0$ h) gleichmäßig für Kontrolle und Expressionskultur an. Die Induktion erfolgte bei einer optischen Dichte von 0,65. Nach dem Zeitpunkt der Induktion zeigte die nicht induzierte Kontrolle ein stärkeres Wachstum als die induzierte Expressionskultur. Zum Ende der Kultivierung nach 22 h lag die OD_{600} der induzierten Kultur bei 4,6 und die der nicht induzierten Kontrolle bei 6,5. Der Wachstumsunterschied ist auf die metabolische Last durch die Expression und Translation der rekombinanten MMOR zurückzuführen. In Abbildung 3.1B wurden Zellkulturproben mittels SDS-PAGE analysiert. Zum Zeitpunkt der Induktion ($t = 0$ h) zeigten die untersuchten Kulturen ein ähnliches Bandenmuster (Spuren 2 – 4). In den Proben, die 2, 6 und 22 Stunden nach der Induktion genommen wurden, unterschieden sich die Bandenmuster. In den Proben der induzierten Kulturen (Spuren 9 – 10, 12 – 13, 15 – 16) nimmt mit zunehmender Inkubationszeit die Intensität einer Bande mit der Größe von etwa 40 kDa zu. Diese ist auf die Synthese von MMOR zurückzuführen. Mit dem neu entworfenen Expressionsplasmid konnte die MMOR aus *M. capsulatus* Bath rekombinant in *E. coli* KRX produziert werden. Die Identität des Enzyms wurde durch einen Aktivitätsnachweis belegt (siehe Anhang 8.5, Seite 153).

3.1.4 Rekombinante Produktion der Reduktase im 7,5 L-fed-batch-Prozess

Basierend auf den Versuchen im Schüttelkolben (Kapitel 3.1.3) wurde der Maßstab zur rekombinanten Produktion der MMOR vergrößert, um die verfügbare Menge an MMOR-haltiger Biomasse zu erhöhen. Dazu wurde die Kultivierung im Bioreaktor mit einer Fed-batch-Strategie durchgeführt. Als Medium wurde TB-Medium mit 25 $\mu\text{g/mL}$ Kanamycin verwendet. Das Anfangsvolumen von 7,5 L wurde aus einer dreistufigen Vorkultur angeimpft. Ein detaillierter Ablauf der Fermentation ist in Kapitel 2.3.3.2 (Seite 32) beschrieben.

Während der Kultivierung wurde das Wachstum anhand der OD_{600} sowie die Glucosekonzentration verfolgt.

Der Verlauf der OD_{600} und der Glucoseverbrauch sind in Abbildung 3.2A dargestellt. Von Beginn an stieg die OD_{600} . Die Glucosekonzentration sank zunächst leicht. Zwei Stunden nach dem Beginn der Kultivierung nahm die Glucosekonzentration deutlich ab. Nach 2,5 Stunden war die Glucose vollständig verbraucht und der Glycerol-Hefeextrakt-*feed* wurde gestartet (Abbildung 3.2(a)). Vor der Induktion der Genexpression wurden 0,1 mM $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$ zugegeben und die Temperatur von 37 °C auf 25 °C gesenkt (b). Die Induktion erfolgte sieben Stunden nach Beginn der Kultivierung bei einer OD_{600} von 33,5 durch Zugabe von 0,1 mM IPTG und 0,1 % (w/v) Rhamnose (c). Die OD_{600} stieg weiter und näherte sich 14 Stunden nach der Induktion einem Wert von $OD_{600} = 56$ an. 17 Stunden nach der Induktion und einer Gesamtprozesszeit von 24 h wurde die Kultivierung beendet. Nach Zentrifugation des finalen Kulturvolumens von 9,5 L wurden 1094 g Biofeuchtmasse (BFM) erhalten.

Abbildung 3.2B zeigt die Analyse von Kulturproben mittels SDS-PAGE. Mit zunehmender Zeit nach Induktion lässt sich auf der Höhe von ca. 40 kDa eine unscharfe Bande erkennen, die dem Zielprotein zuzuordnen ist. Die Zunahme der Bandenintensität deutet darauf hin, dass auch im größeren Maßstab in der *Fed-batch*-Fermentation das Zielprotein MMOR rekombinant produziert wurde. Die Biomasse wurde im weiteren Verlauf zur Reinigung der MMOR eingesetzt.

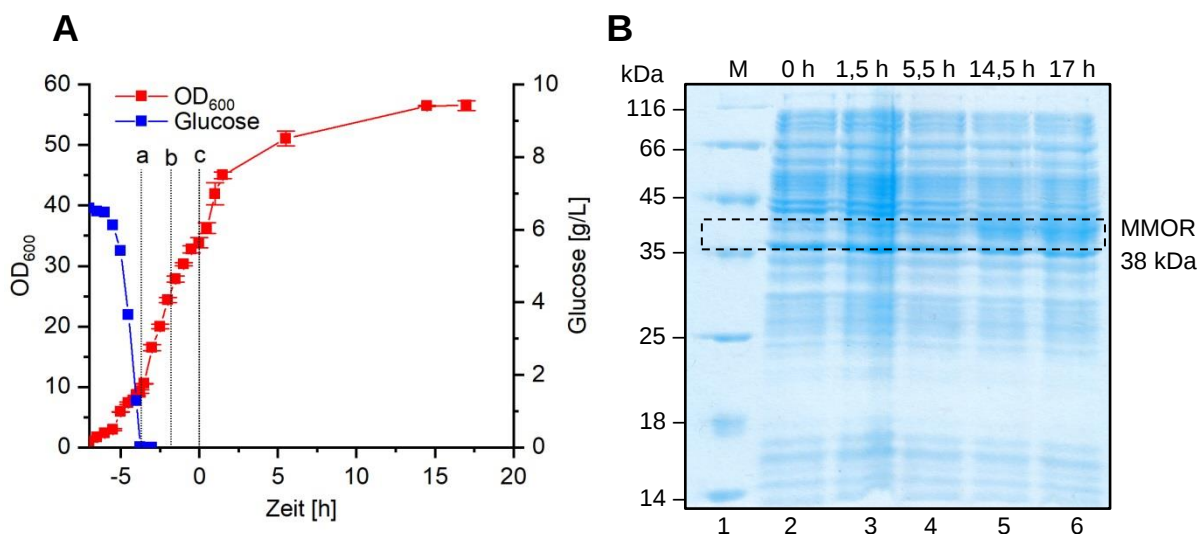


Abbildung 3.2: Kultivierung von *E. coli* KRX pET28a-MMOC im Bioreaktor zur rekombinanten Produktion von MMOR; A: optische Dichte (rot) und Glucosekonzentration (blau) im Zeitverlauf; Startvolumen $V = 7,5$ L TB-Medium; $T = 37$ °C; a: Start des Glycerin-Hefeextrakt-*feed*; b: Zugabe 0,1 mM $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$, $T = 25$ °C; c: Induktion durch Zugabe von 0,1 mM IPTG und 0,1 % (w/v) Rhamnose; Kultivierungsparameter beschrieben in 2.3.3.2 (Seite 32); B: SDS-PAGE-Analyse von $1/OD_{600}$ -Proben (Kapitel 2.5.3.1, Seite 44) der Fermentation von *E. coli* KRX pET28a-MMOC; Probenahme zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion; M: *Unstained Protein Molecular Weight Marker*; $MW_{MMOR} = 38$ kDa.

3.1.5 Reinigung der Reduktase aus *E. coli* KRX pET28a-MMOC

Nach der rekombinanten Produktion der MMOR in *E. coli* KRX wurde das Zielprotein chromatographisch gereinigt. Die in der Literatur beschriebene Strategie zur Reinigung der MMOR beinhaltet als letzten Schritt eine Affinitätschromatographie mittels 5'-AMP-Sepharose [Kopp *et al.*, 2001]. Die Angaben zur Bindung von MMOR an 5'-AMP-Sepharose sind nicht reproduzierbar [Griethe, 2018]. Die in der vorliegenden Arbeit verfolgte Reini-

gungsstrategie bestand aus zwei Anionenaustauschchromatographie-Schritten. Die Parameter der chromatographischen Reinigung sind in Kapitel 2.3.4 (Seite 33) beschrieben. 106,1 g Biomasse wurden mit einem Hochdruckhomogenisator (HDH) in vier Passagen aufgeschlossen. Nach der Zentrifugation betrug das Volumen des Überstandes ca. 300 mL und die Proteinkonzentration 21,5 mg/mL. Die Gesamtproteinmenge betrug 6450 mg. Im ersten Schritt wurde eine Anionenaustauschchromatographie (AEC) durchgeführt (Q-Sepharose FF, CV = 68 mL). Der Überstand wurde dazu auf ein Volumen von 401 mL mit Aufschlusspuffer verdünnt. Abbildung 3.3 zeigt das Chromatogramm des ersten Reinigungsschritts. Da MMOR FAD als Cofaktor besitzt, bietet die Absorption bei 465 nm eine zusätzliche spezifische Detektionsmöglichkeit. Im Durchfluss stieg das Absorptionssignal bei 280 nm auf über 4000 mAU an, das Absorptionssignal bei 465 nm stieg auf ca. 170 mAU an. Wirtszellproteine, die nicht an die Säule gebunden wurden, konnten in diesem Schritt abgetrennt werden. Die Absorption bei 465 nm deutet darauf hin, dass sich auch FAD-bindende Proteine im Durchfluss befanden. Im nachfolgenden Waschschrift sank das Absorptionssignal bei 280 nm auf 170 mAU ab. Eluiert wurde mit einem linearen Anstieg der Salzkonzentration von 50 bis 500 mM NaCl. Während der Elution ließen sich bei 280 nm mehrere große Peaks erkennen. Der Peak zwischen 1300 und 1500 mL zeigte zudem ein Signal bei 465 nm. Vermutlich handelt es sich bei diesem Peak vor allem um die Elution des Zielproteins MMOR. Von einigen Elutionsfraktionen wurden Proben genommen und mittels SDS-PAGE analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.4 dargestellt. In der Rohextrakt-Probe nach Zellaufschluss (RE, Spur 2) sind Wirtszellproteine und das Zielprotein MMOR zu erkennen. In Spur 3 wurde eine Probe des Durchflusses aufgetragen. In dieser lassen sich viele Banden der Wirtszellproteine aus dem Rohextrakt erkennen. Auf der Höhe der MMOR befindet sich keine deutliche Bande. Das Zielprotein hat demnach an die Säule gebunden. In der Waschfraktion (Spur 4) ist die Proteinkonzentration gering. Es lassen sich keine Banden erkennen. In den Elutionsfraktionen 11 bis 28 lassen sich Banden auf der für die MMOR erwarteten

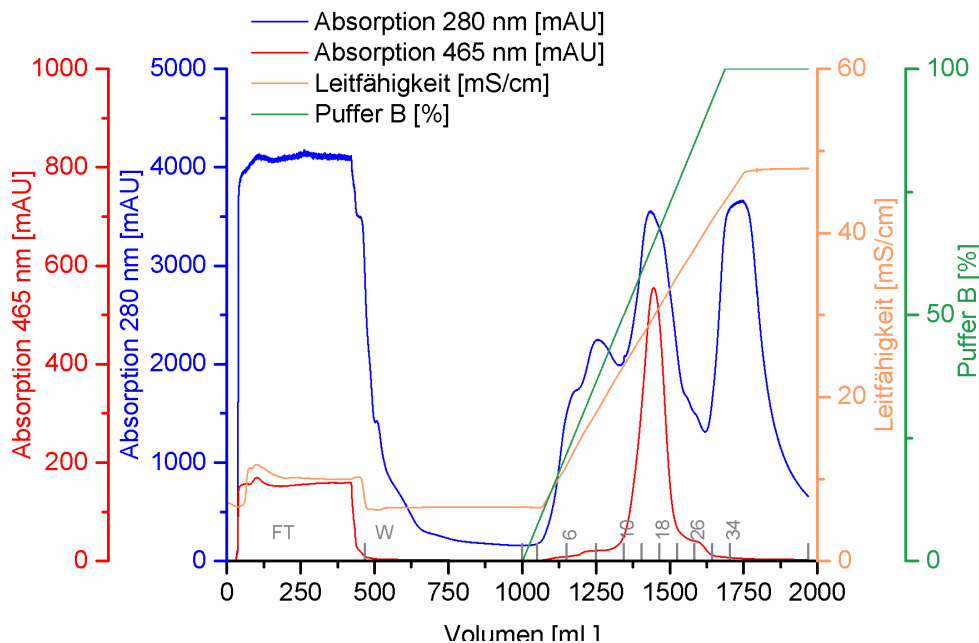


Abbildung 3.3: Chromatogramm der 1. AEC zur Reinigung der MMOR; (Methode beschrieben in 2.3.4 Seite 33); Säule: Q-Sepharose FF, CV = 68 mL, Flussrate 4 mL/min; blau: Absorptionssignal bei 280 nm; rot: Absorptionssignal bei 465 nm; orange: Leitfähigkeit [mS/cm]; grün: prozentualer Anteil an Puffer B; einzelne Reinigungsschritte und Fraktionen sind mit grau markiert; FT: Durchfluss; W: Waschfraktion; Nummerierung ausgewählter Elutionsfraktionen

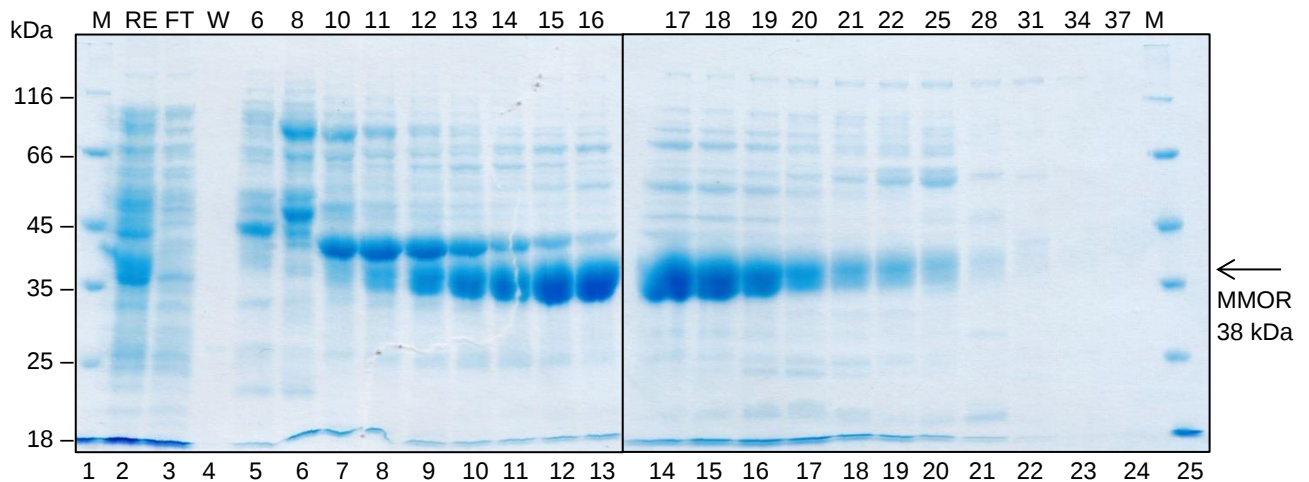


Abbildung 3.4: SDS-PAGE-Analyse von Reinigungsfractionen der 1. AEC; Probenpräparation: 10 μ L Probe mit 40 μ L Probenpuffer mit 10 mM DTT versetzt, Inkubation für 5 min bei 95 °C, Auftragung von 10 μ L; M: *Unstained Protein Molecular Weight Marker*; RE: Rohextrakt nach Zellaufschluss; FT: Durchflussfraktion; W: Waschfraktion; 6 – 37: Elutionsfraktionen (siehe Abbildung 3.3); $MW_{MMOR} = 38$ kDa

Höhe erkennen. In allen Elutionsfraktionen sind neben der MMOR auch verunreinigende Proteine zu erkennen. Die Fraktionen 10 bis 14 (Spuren 7 bis 11) sind vorrangig durch ein Protein mit einer Größe von ca. 42 kDa verunreinigt.

Die Fraktionen 13 – 20 (Spuren 10 bis 17) wurden vereinigt und über Nacht dialysiert. Nach der Dialyse wurde die Probe zentrifugiert, um Aggregate abzutrennen. Es war ein kleines Pellet sichtbar. Anschließend wurde eine Proteinkonzentration von 8,56 mg/mL bestimmt. Das Volumen der Probe für die weitere Reinigung betrug 118 mL. Insgesamt wurden 1010 mg Protein in den folgenden Schritten weiter aufgearbeitet.

Nach einer Dialyse folgte als zweiter Reinigungsschritt eine weitere AEC (Q-Sepharose FF, CV = 10,3 mL). Das Chromatogramm und die SDS-PAGE-Analyse der Fraktionen sind in Abbildung 3.5 und Abbildung 3.6 dargestellt. Bei der zweiten AEC wurden erneut die Absorptionssignale bei 280 nm und bei 465 nm detektiert. Im Durchfluss (FT) stieg das Absorptionssignal bei 280 nm bis auf ca. 500 mAU an. Die Analyse mittels SDS-PAGE (Abbildung 3.6, Spur 3 und 4) zeigt schwache Banden in den beiden analysierten Durchflussfraktionen FT2 und FT3 sowohl auf der Höhe der MMOR als auch von verunreinigenden Proteinen. Nach ca. 150 mL wurde mit 35 % Puffer B gewaschen. Sowohl bei 280 nm als auch bei 465 nm zeigt das Absorptionssignal zu Beginn des Waschschritts einen Peak, danach sinkt das Absorptionssignal wieder. Die Analyse mittels SDS-PAGE zeigt, dass sowohl Zielprotein als auch Verunreinigungen von der Säule gewaschen wurden (Spuren 5 und 6). Nach der Waschphase ab einem Gesamtvolumen von 200 mL wurde der Anteil an Puffer B linear erhöht. Sowohl im Absorptionssignal bei 280 nm als auch im Signal bei 465 nm ließ sich ein großer Elutionspeak zwischen 220 und 250 mL erkennen. Die maximale Absorption bei 465 nm betrug ca. 1000 mAU. Die Analyse der Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE bestätigt, dass es sich bei dem Elutionspeak hauptsächlich um das Zielprotein MMOR handelte. Die Bande der MMOR ist sehr intensiv und zeigt eine leichte Doppelbande, welche möglicherweise auf eine nicht vollständige Reduktion der MMOR zurückzuführen ist. Oberhalb und unterhalb der Bande des Zielproteins lassen sich in den Spuren der Elutionsfraktionen (Spuren 11 – 19) Verunreinigungen erkennen.

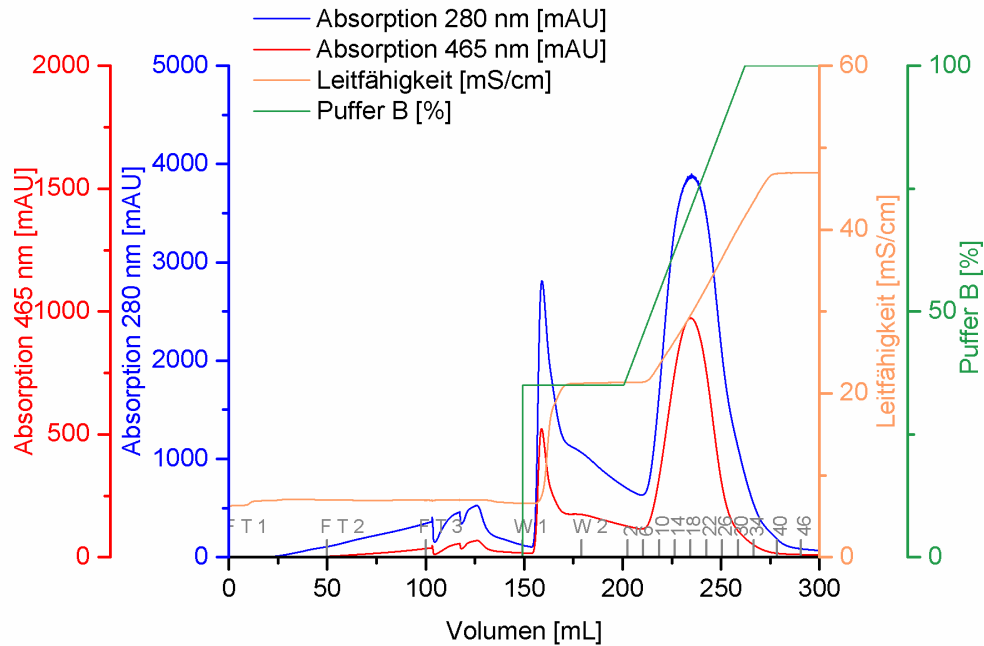


Abbildung 3.5: Chromatogramm der 2. AEC zur Reinigung der MMOR; (Methode beschrieben in 2.3.4 Seite 33); Säule: Q-Sepharose FF, CV = 10,3 mL, Flussrate 3 mL/min; blau: Absorptionssignal bei 280 nm; rot: Absorptionssignal bei 465 nm; orange: Leitfähigkeit [mS/cm]; grün: prozentualer Anteil an Puffer B; einzelne Reinigungsschritte und Fraktionen sind mit grau markiert; FT: Durchfluss; W: Waschfraktion; Nummerierung ausgewählter Elutionsfraktionen

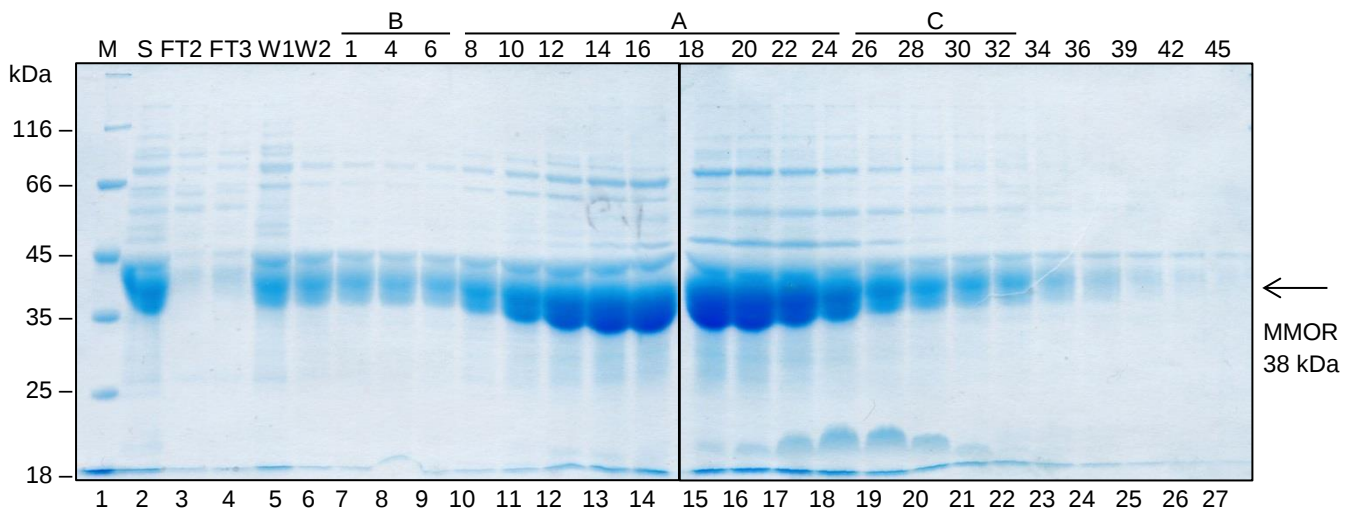


Abbildung 3.6: SDS-PAGE-Analyse von Reinigungsfraktionen der 2. AEC; Probenpräparation: 10 μ L Probe mit 40 μ L Probenpuffer mit 10 mM DTT versetzt, Inkubation für 5 min bei 95 $^{\circ}$ C, Auftragung von 10 μ L; M: *Unstained Protein Molecular Weight Marker*; S: aufgetragene Probe, Überstand nach Dialyse und Zentrifugation, FT2 – FT3: Durchflussfraktionen; W1 – W2: Waschfraktionen; 1 – 45: Elutionsfraktionen (siehe Abbildung 3.5); A: vereinigte Elutionsfraktionen mit höchster Reinheit; B, C: vereinigte Elutionsfraktionen mit geringerer Reinheit; $MW_{MMOR} = 38$ kDa.

Im Anschluss wurden die Fraktionen 8 – 25 zu einer Präparation A mit der höchsten Reinheit vereinigt. Die Elutionsfraktionen 1 – 7 wurden zu einer Präparation B mit einigen Verunreinigungen vereinigt. Und die Elutionsfraktionen 26 – 32 wurden zu der Präparation C, ebenfalls mit Verunreinigungen, vereinigt.

Der Grad der Reinheit wurde über den FAD-Gehalt bestimmt (Kapitel 2.5.2, Seite 43). Um die Aktivität der MMOR unabhängig von den anderen sMMO-Komponenten bestimmen zu können, wurde 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCPIP) als Elektronenakzeptor verwendet. Die

Reduktion führt zu einer Entfärbung des Moleküls, welche photometrisch bei 600 nm verfolgt werden kann (Kapitel 2.4.1, Seite 35).

Nach der zweiten AEC betrug die über den FAD-Gehalt bestimmte Reinheit der Präparation A 89 %, der Präparation B 75 % und der Präparation C 85 %. Die spezifische Aktivität wurde für die Präparationen A und C bestimmt. Die Aktivität der Präparation A war mit 53 U/mg deutlich höher, als die der Präparation C mit 29,8 U/mg, obwohl der Unterschied in der Reinheit nur 4 % betrug. Für Untersuchungen zur enzymatischen *in vitro*-Hydroxylierung wurde lediglich die MMOR-Präparation A mit der höchsten Reinheit verwendet. Die Proteinkonzentrationen, das Volumen, sowie die finalen Proteinmengen sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Aus 106 g Biofeuchtmasse wurden in der verwendeten Präparation A 349 mg MMOR gereinigt. Bezogen auf das Kulturvolumen entsprach dies einer Ausbeute von 36 mg/L. Für nachfolgende Untersuchungen zur *in vitro* Hydroxylierung mit der sMMO-Komponenten stand zunächst genügend aktive MMOR zur Verfügung.

Tabelle 3.2: Ausbeute und Aktivität der gereinigten MMOR aus rekombinanter Produktion; Fraktionen A, B, C: siehe Abbildung 3.6.

Schritt		Konzentration	Volumen	Proteinmenge	Aktivität	Ausbeute bezogen auf die Proteinmenge	Reinheit nach FAD-Gehalt
		mg/mL	mL	mg	U/mg	%	%
RE		21,5	300	6450	n. b.	100	n. b.
1. AEC		8,56	118	1010,1	n. b.	15,7	n. b.
2. AEC	A	9,3	37,5	348,8	53	5,4	89
	B	2,8	14	39,2	n. b.	0,6	75
	C	2,6	14,5	37,2	29,8	0,6	85

Um den Verlust an MMOR zu minimieren, wurden Reinigungsfractionen mit geringerem FAD-Gehalt und geringerer spezifischen Aktivität (z. B. Präparation B und C) aus verschiedenen Reinigungsexperimenten weiter aufgearbeitet. Diese wurden vereint und mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) gereinigt. Der Ablauf ist in Kapitel 2.3.4 (Seite 33) beschrieben. Das Säulenvolumen betrug 320 mL. Beispielhaft ist im Folgenden das Ergebnis eines SEC-Durchlaufs beschrieben.

Vereinigte Fraktionen mit einem Gesamtvolumen von 38 mL wurden mittels Ultrafiltration auf ein Volumen von 3,1 mL eingengt, anschließend filtriert und als Probe für den SEC-Lauf eingesetzt. Die Proteinkonzentration der Probe betrug 21 mg/mL. In Abbildung 3.7 ist das Chromatogramm eines Laufs dargestellt. In dem Retentionsvolumen zwischen 150 und 300 mL sind mehrere Elutionspeaks zu erkennen. Ein dominanter Peak befindet sich zwischen 200 und 230 mL. Die Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.8 dargestellt. Auf Spur 2 wurde die konzentrierte Probe vor der SEC aufgetragen. Die dominante Bande bei 38 kDa ist dem Zielprotein MMOR zuzuordnen. Ober- und unterhalb der Bande sind verunreinigende Proteine zu erkennen. In den Elutionsfraktionen 14 bis 24 (Spur 3 bis Spur 6) sind Banden mit höherem Molekulargewicht und geringe Mengen MMOR zu erkennen. In den Elutionsfraktionen 28 – 36 (Spur 7 bis Spur 12) ist die Bande der MMOR die intensivste. In den Spuren 7 bis 9 ist auf einer Höhe von 45 kDa

noch eine andere Bande zu erkennen. Als reinste MMOR-Probe wurden die Elutionsfraktionen der Spuren 10 bis 12 vereinigt.

Die vereinten Fraktionen wurden erneut mittels Ultrafiltration eingeeengt. Das finale Volumen der MMOR-Präparation nach einem SEC-Durchlauf betrug 7,3 mL mit einer Proteinkonzentration von 4,5 mg/mL. Damit wurden 50 % der eingesetzten Proteinmenge erhalten. Durch die SEC konnte die Reinheit basierend auf dem FAD-Gehalt auf 98 % erhöht werden. Da Fraktionen aus verschiedenen Präparationen für diesen zusätzlichen Reinigungsschritt vereinigt wurden, ist eine Bilanzierung mit dem bisher beschriebenen Reinigungsablauf nicht möglich.

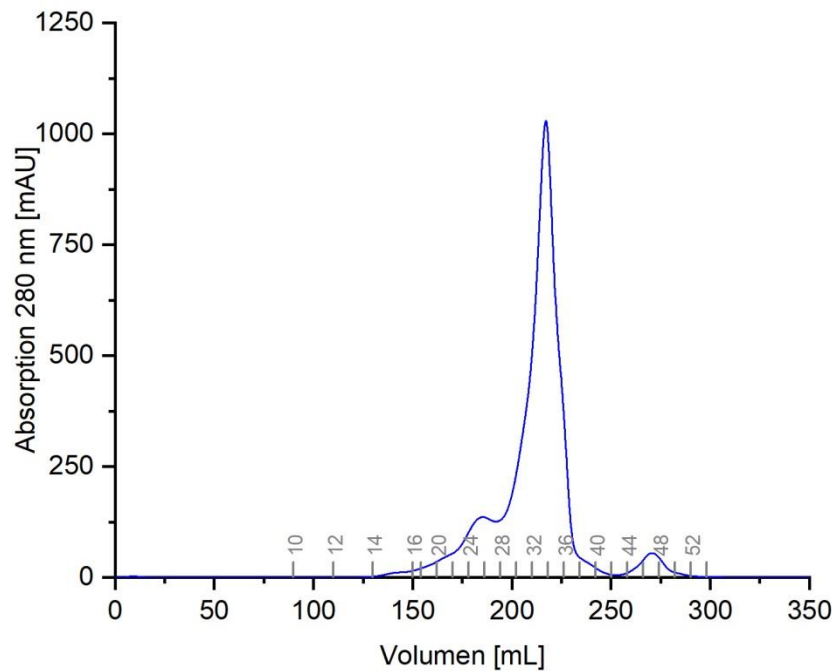


Abbildung 3.7: Chromatogramm der SEC als finaler Schritt zur Reinigung von MMOR; Säule: Superdex G-200 pg 26/600 mm, CV = 320 mL, Flussrate 1 mL/min; blau: Absorptionssignal bei 280 nm; Nummerierung ausgewählter Elutionsfraktionen in grau; Methode beschrieben in Kapitel 2.3.4, Seite 33

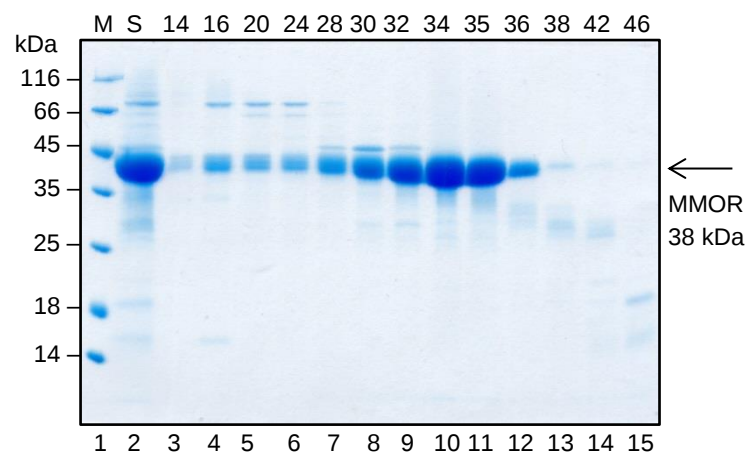


Abbildung 3.8: SDS-PAGE-Analyse von Elutionsfraktionen der SEC zur Reinigung von MMOR; Probenpräparation: 10 μ L Probe mit 10 μ L Probenpuffer mit 10 mM DTT versetzt, Inkubation für 5 min bei 95 °C, Auftragung von 10 μ L; M: *Unstained Protein Molecular Weight Marker*; S: aufgetragene Probe nach Ultrafiltration; 14 - 46: Elutionsfraktionen (siehe Abbildung 3.7); $MW_{MMOR} = 38$ kDa

3.1.6 Rekombinante Produktion von MMOB

Das regulatorische Protein B (MMOB) wurde rekombinant in *E. coli* BL21 (DE3) Gold produziert. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Varianten von MMOB produziert und gereinigt. Für alle Varianten wurde dieselbe Produktions- und Reinigungsstrategie verfolgt. In diesem Kapitel sind beispielhaft die Ergebnisse zur Produktion und Reinigung von Wildtyp MMOB vorgestellt.

Eine Vektorkarte und die entsprechenden Sequenzen sind im Anhang 8.2 (Seite 148) aufgeführt. Das Protein wurde als Fusionskonstrukt mit einem N-terminalen His₆-SUMO-tag produziert. Der experimentelle Ablauf der Kultivierung ist in Kapitel 2.3.5 (Seite 34) beschrieben. Die Expression erfolgte in LB-Medium im Schüttelkolben-Maßstab ($V = 12 \cdot 0,5 \text{ L}$) über einen Zeitraum von fünf Stunden nach Induktion mit IPTG. Die Induktion der Genexpression sollte in früherer Wachstumsphase bei einer OD_{600} von 0,8 erfolgen. Während der Kultivierung wurden Proben genommen und mittels SDS-PAGE analysiert. Der Verlauf der optischen Dichte (OD_{600}) ist in Abbildung 3.9A dargestellt, das Ergebnis der SDS-PAGE-Analyse in Abbildung 3.9B. Nach der Induktion stieg die OD_{600} der nicht induzierten Kontrolle innerhalb von fünf Stunden auf 3,6. Die induzierte Kultur zeigte aufgrund der metabolischen Last durch die Expression und Translation des rekombinanten Proteins ein geringeres Wachstum. Am Ende der Kultivierung betrug die $OD_{600} = 2,8$. Zum Zeitpunkt der Induktion (Spuren 2 und 3) sind nur schwache Banden auf der für das Zielprotein SUMO-MMOB erwarteten Höhe (28,3 kDa) zu erkennen (Abbildung 3.9B). Mit zunehmender Expressionsdauer (Spuren 4 bis 9) nimmt die Intensität der SUMO-MMOB-Banden sowohl in der induzierten Kultur als auch in der nicht induzierten Kontrolle zu. In der induzierten Kultur ist deutlich mehr SUMO-MMOB zu erkennen. Die Zunahme der Bandenintensität in der nicht induzierten Kontrolle ist auf die Basalexpression zurückzuführen, welche bereits für das T7-Expressionssystem beschrieben ist [Mertens et al., 1995]. Aus einem Kulturvolumen von 6 L wurden 34,4 g Biofeuchtmasse geerntet.

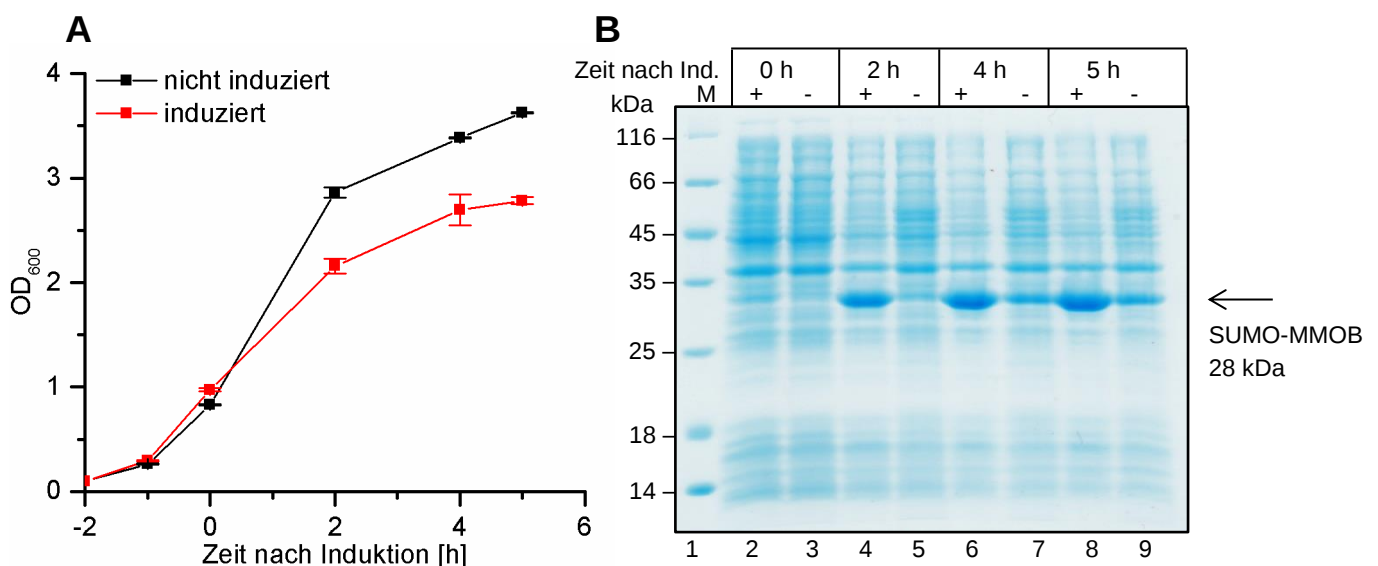


Abbildung 3.9: Kultivierung von *E. coli* BL21 (DE3) Gold pETSUMOadapt_mmob zur rekombinanten Produktion von SUMO-MMOB im Schüttelkolben-Maßstab; $V = 12 \cdot 0,5 \text{ L}$; Methode beschrieben in Kapitel 2.3.5, Seite 34; A: Verlauf der optischen Dichte der Hauptkultur; rot: induzierte Kultur ($n = 3$); schwarz: nicht induzierte Kontrolle ($n = 2$); Gesamtvolumen 6 L LB-Medium mit 25 $\mu\text{g/mL}$ Kanamycin, $T = 37^\circ\text{C}$, 130 rpm; Induktion bei $t = 0 \text{ h}$ durch Zugabe von final 0,1 mM IPTG; B: SDS-PAGE-Analyse von $1/OD_{600}$ -Proben (Kapitel 2.5.3.1, Seite 44) von induzierter (+) und nicht induzierter Kultur (-); Probenahme zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion; M: *Unstained Protein Molecular Weight Marker*; $MW_{\text{SUMO-MMOB}} = 28 \text{ kDa}$.

3.1.7 Reinigung von MMOB

Zur Reinigung von Wildtyp MMOB und verschiedenen Varianten wurde eine Strategie aus zwei Metallionen-Affinitätschromatographie-Schritten (IMAC) verfolgt. Das SUMO-MMOB-Fusionsprotein sollte zunächst mittels IMAC aus dem Rohextrakt der aufgeschlossenen *E. coli*-Zellen gereinigt werden. Anschließend sollte der His-SUMO-tag proteolytisch abgespalten werden. Die dafür verwendete His-getaggte SUMO-Protease wurde ebenfalls rekombinante in *E. coli* produziert und mittels IMAC gereinigt (siehe Anhang 8.5, Seite 153). Im dritten Schritt sollte eine zweite IMAC durchgeführt werden, wobei MMOB nach der Proteolyse keinen N-terminalen His-tag mehr besitzt und demnach nicht an die Säule bindet. Im aufgefingenen Durchfluss des zweiten IMAC-Schrittes sollte sich gereinigtes MMOB befinden. Der detaillierte Ablauf der Reinigung ist in Kapitel 2.3.6 (Seite 34) beschrieben. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Varianten von MMOB in unterschiedlichem Maßstab gereinigt. Im Folgenden sind beispielhaft die Ergebnisse der Reinigung von wt MMOB zusammengefasst.

Für die Reinigung wurden die in Kapitel 3.1.6 produzierten 34,4 g Biofeuchtmasse aufgeschlossen. Das Volumen des Rohextrakts betrug 168 mL mit einer Proteinkonzentration von 14 mg/mL. Nach der ersten IMAC wurden SUMO-MMOB-haltige Elutionsfraktionen ausgewählt und vereint. Das Volumen nach der ersten IMAC betrug 98 mL mit einer Proteinkonzentration von 7,5 mL. Nach Dialyse und proteolytischem Verdau mittels SUMO-Protease folgte die zweite IMAC. Das Ergebnis der SDS-PAGE-Analyse nach dem proteolytischen Verdau und der zweiten IMAC ist in Abbildung 3.10 gezeigt. Weitere Ergebnisse zur Reinigung von MMOB-Varianten sind im Anhang 8.4 (Seite 152) dargestellt.

In Spur 2 ist die Probe nach dem proteolytischen Verdau aufgetragen. Die Bande bei 14 kDa ist MMOB zuzuordnen. Oberhalb dieser ist eine Bande bei 18 kDa zu erkennen. Diese ist die abgespaltene His₆-SUMO-Domäne. Trotz ihres Molekulargewichts von 13,4 kDa zeigt die His₆-SUMO-Domäne ein anderes Laufverhalten und migriert, wie in der Literatur beschrieben, bei höherem Molekulargewicht [Marblestone et al., 2006]. Unverdautes SUMO-MMOB ist auf einer Höhe von 28 kDa zu erkennen. Nur geringe Mengen SUMO-MMOB wurden nicht gespalten. Sowohl die SUMO-Domäne, als auch ungespaltenes SUMO-MMOB und die SUMO-Protease tragen einen His-tag. In der Durchflussfraktion (Spur 3) ist demnach nur gereinigtes MMOB vorhanden. In der Waschfraktion (Spur 4) ist ebenfalls nur eine Bande des MMOB zu erkennen. Die SUMO-Domäne und ungespaltenes SUMO-MMOB konnten in

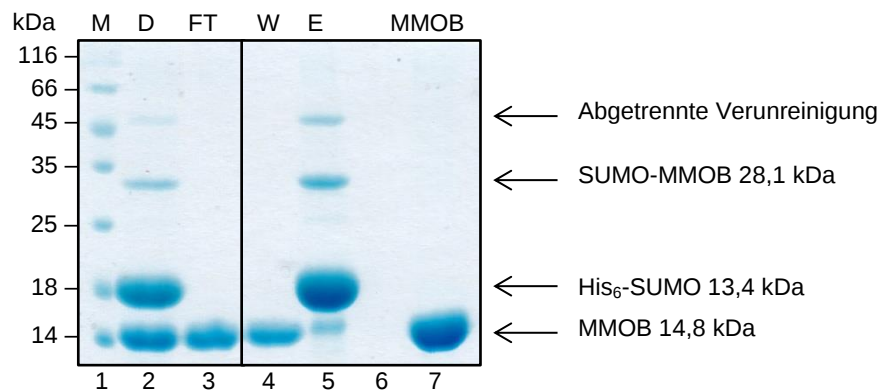


Abbildung 3.10: SDS-PAGE-Analyse von Fraktionen der MMOB-Reinigung; Probenpräparation: 10 µL Probe mit 10 µL Probenpuffer, Inkubation für 5 min bei 95 °C, Auftragung von 10 µL; M: *Unstained Protein Molecular Weight Marker*; D: Probe nach Verdau mit SUMO-Protease; FT: Durchlauf fraktionen, finale MMOB-Präparation; W: Waschfraktion; E1: Elutionsfraktion; MMOB: MMOB-Referenz aus vorheriger Präparation; MW_{SUMO-MMOB} = 28 kDa; MW_{MMOB} = 14,8 kDa

der Elutionsfraktion (Spur 5) nachgewiesen werden. Das Volumen der Durchflussfraktionen (Spur 3) betrug 195 mL und die Proteinkonzentration 1,12 mg/mL. Im Anschluss wurde die MMOB-Lösung mittels Ultrafiltration auf ein Volumen von 70,3 mL mit einer finalen Konzentration von 2,95 mg/mL eingeeengt. Aus 34,4 g Biofeuchtmasse wurden 207 mg MMOB gereinigt. Die Identität des MMOB wurde durch einen Aktivitätstest der sMMO (Kapitel 2.4.2, Seite 36) mit Zugabe der Komponenten MMOH und MMOR bestätigt (Daten nicht gezeigt). Es konnte genügend wt MMOB für die nachfolgenden Untersuchungen bereitgestellt werden.

Tabelle 3.3: Reinigung von MMOB aus rekombinanter Produktion

Schritt	Konzentration	Volumen	Proteinmenge	Ausbeute bezogen auf die Proteinmenge	Protein
	mg/mL	mL	mg	%	
Rohextrakt	14	168	2352	100	
1. IMAC	7,5	98	735	31	SUMO-MMOB
Dialyse	3,15	200	630	27	SUMO-MMOB
SUMO-Verdau					SUMO + MMOB
2. IMAC	1,12	195	218	9,3	MMOB

3.2 Identifizierung umsatzlimitierender Faktoren und Optimierung der Reaktionsbedingungen der sMMO

Ziel der vorliegenden Arbeit war die selektive, enzymatische Oxidation von Ethylen, Benzol und Naphthalin. Der Fokus sollte dabei zunächst auf eine Optimierung der maximalen Zykluszahl (*total turnover number*, TTN) des Enzyms gelegt werden. Aufgrund der Fähigkeit, viele verschiedene Substrate, unter anderem Ethylen, Benzol und Naphthalin, zu hydroxylieren, sollte die sMMO für diese Biotransformationsprozesse eingesetzt werden. In bisherigen Untersuchungen zeigte die sMMO meist nur geringe Umsatzraten und Produktausbeuten (Kapitel 1.1.6.49). Im nachfolgenden Kapitel werden die Experimente und deren Ergebnisse zur Identifizierung von Faktoren beschrieben, die die Enzymreaktion limitieren. Darauf basierend wurden Strategien zur Optimierung der TTN und der Ausbeute entwickelt und angewendet (Kapiteln 3.3.1 - 3.2.4). Zur Untersuchung der sMMO wurde das Modellsupstrat Nitrobenzol verwendet. Das primäre Hydroxylierungsprodukt *p*-Nitrophenol lässt sich durch Messung der Absorption quantifizieren. Unter anderem benutzte A. Griethe das Modellsupstrat Nitrobenzol zur biochemischen Charakterisierung der sMMO. Seine Ergebnisse lieferten die Grundlage für die folgenden Untersuchungen [Griethe, 2018]. Die von A. Griethe genutzte Methode zur Regenerierung des Cofaktors NADH mit Hilfe der Glucosedehydrogenase (Abbildung 1.6, Seite 13) wurde ebenfalls in den folgenden Experimenten eingesetzt. Eine Übersicht der untersuchten Reaktionsbedingungen und der resultierenden Aktivitätswerte, der jeweiligen TTN und der Ausbeuten ist in Tabelle 3.4 (Seite 67) aufgelistet. Die TTN und die Ausbeute beziehen sich dabei auf die zum Ende der Reaktion erhaltenen Produktmengen. In den folgenden Kapiteln werden die einzelnen Parameter detailliert betrachtet.

3.2.1 Einsatz von Katalase zur Disproportionierung von Wasserstoffperoxid

Die sMMO bildet wie viele Oxygenasen das Nebenprodukt Wasserstoffperoxid. Gleichzeitig besitzt das Enzym eine Peroxidase-Aktivität und kann H_2O_2 zur Hydroxylierung von Substraten nutzen und auch direkt zu O_2 und H_2O umsetzen [Gassner und Lippard, 1999; Zhang und Lipscomb, 2006]. Diese Nebenreaktionen verringern die Zielproduktbildung. A. Griethe untersuchte den inhibitorischen Effekt von H_2O_2 auf die sMMO und bestimmte IC_{50} -Werte von 107 – 145 μM H_2O_2 [Griethe, 2018]. Der Inhibierungsmechanismus ist noch nicht abschließend geklärt. Um eine Akkumulation von H_2O_2 zu verhindern, sollte Katalase als weiteres Kaskadenenzym zugesetzt werden. Katalase disproportioniert H_2O_2 zu H_2O und O_2 (Abbildung 1.5, Seite 12). Erste Untersuchungen zum Einsatz von Katalase in einer sMMO-Enzymkaskade wurden bereits von A. Griethe durchgeführt. Vergleichbare Experimente wurden von Dubbels *et al.* mit der Butanmonooxygenase beschrieben [Dubbels *et al.*, 2007]. Sowohl Griethe als auch Dubbels waren in der Lage, durch den Einsatz von Katalase die Produktausbeute der *in vitro* eingesetzten Enzyme zu erhöhen (siehe Kapitel 1.1.7, Seite 11). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte diese Strategie optimiert werden, indem die Aktivität der Katalase in der Enzymkaskade angepasst wird. In dem Experiment wurden verschiedene Katalasekonzentrationen eingesetzt und der Umsatz von Nitrobenzol mit der sMMO untersucht. Die Reaktionen wurden in einem Volumen von 1,2 mL im OxyTherm durchgeführt. Dies ermöglichte die kontinuierliche Messung der Sauerstoffkonzentration in der Reaktionslösung bei konstanter Temperatur und Rührgeschwindigkeit. Parallel dazu wurde diskontinuierlich durch Absorptionsmessung die Produktkonzentration von p-Nitrophenol verfolgt. Der detaillierte Ablauf des Versuchs ist in Kapitel 2.4.3 (Seite 36) beschrieben. In Abbildung 3.11 ist der Verlauf der Produktkonzentration der jeweiligen Reaktion dargestellt.

Ohne Zusatz von Katalase (Reaktion A) nahm die Geschwindigkeit der Produktbildung bereits nach einer Minute ab. Die Produktkonzentration stagnierte bei 30,5 μM , was einer Aus-

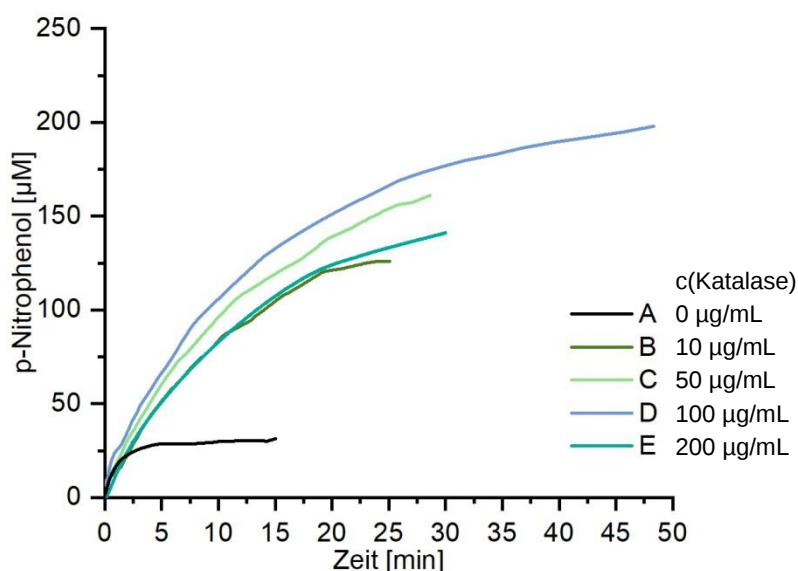


Abbildung 3.11: Umsatz von Nitrobenzol durch die sMMO mit verschiedenen Katalase-Konzentrationen; Versuchsaufbau beschrieben in Kapitel 2.4.3 (Seite 36); p-Nitrophenol detektiert bei $\lambda = 420 \text{ nm}$; die Erstellung der gemittelten Progresskurven ist in Kapitel 2.4.3 beschrieben; $n = 3$; Standardabweichung $\leq 10 \%$; Reaktionsparameter: $V = 1,2 \text{ mL}$ TMA-Puffer pH 7,5 in OxyTherm; $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$; $c(\text{sMMO}) = 1 \text{ } \mu\text{M}$; $c(\text{GDH}) = 5 \text{ } \mu\text{g/mL}$; $c(\text{Glc}) = 50 \text{ mM}$; $c(\text{Nitrobenzol}) = 1 \text{ mM}$; $c(\text{NADH}) = 1 \text{ mM}$; Rührgeschwindigkeit 1 %; A: $c(\text{Cat}) = 0 \text{ } \mu\text{g/mL}$; B: $c(\text{Cat}) = 10 \text{ } \mu\text{g/mL}$; C: $c(\text{Cat}) = 50 \text{ } \mu\text{g/mL}$; D: $c(\text{Cat}) = 100 \text{ } \mu\text{g/mL}$; E: $c(\text{Cat}) = 200 \text{ } \mu\text{g/mL}$; spez. Aktivität der Katalase 13500 U/mg.

beute von 3 % entspricht. Mit dem Zusatz von Katalase in der sMMO Reaktion nahm die Produktausbeute deutlich zu und der Zeitraum der Produktbildung verlängerte sich. Durch Zugabe von 10 µg/mL Katalase (Reaktion B) konnte über einen Zeitraum von 20 Minuten Produktbildung beobachtet werden. Es wurde eine Ausbeute von 12,5 % erreicht. Mit 100 µg/mL Katalase (Reaktion D) konnte zum Ende der Messung nach 50 Minuten immer noch eine Zunahme der Produktkonzentration beobachtet werden. Mit einer Produktkonzentration von 200 µM nach 50 Minuten konnte die Ausbeute auf 20 % der eingesetzten Substratkonzentration erhöht werden. Eine weitere Verdopplung der Katalasemenge auf 200 µg/mL (Reaktion E) hatte keinen weiteren positiven Effekt.

Durch die Anpassung der Katalase-Aktivität in der Enzymkaskade konnte der Zeitraum, in dem sMMO-Aktivität nachgewiesen werden konnte um den Faktor 10 verlängert werden. Da die sMMO länger aktiv war, konnte auch die finale Produktausbeute und die TTN um den Faktor von 6,4 erhöht werden (Tabelle 3.4, Seite 67). Aus dem initialen Anstieg der Produktkonzentration wurde die spezifische Aktivität der sMMO berechnet. Diese variierte zwischen 89 und 140 mU/mg. Ein eindeutiger Trend war nicht zu beobachten. Die Daten zeigen deutlich, dass der Einfluss von H_2O_2 als umsatzlimitierender Faktor durch die Anpassung der Katalaseaktivität in der Enzymkaskade verringert werden konnte. In den folgenden Untersuchungen wurde die Enzymkaskade mit Katalase in einem Verhältnis von 100 µg/mL Katalase zu 1 µM sMMO eingesetzt.

3.2.2 Einfluss der sMMO-Konzentration

Die Erhöhung der Katalysatormenge kann zur Steigerung der Produktmenge im gleichen Reaktionszeitraum führen, sofern die Reaktionsgeschwindigkeit der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des gesamten Prozesses ist. Für Enzyme ist dieser Zusammenhang aufgrund des Mechanismus und kinetischer Aspekte nur in einem bestimmten Bereich linear bzw. zutreffend. Dies gilt für die sMMO insbesondere aufgrund des gasförmigen Substrates O_2 . Aus diesem Grund sollte in den folgenden Experimenten die Enzymkonzentration für die sMMO-Katalyse variiert und optimiert werden.

Der Umsatz von Nitrobenzol wurde bei verschiedenen sMMO-Konzentrationen verfolgt. Dabei wurde das in Kapitel 3.2.1 bestimmte optimale Konzentrationsverhältnis von 1 µM sMMO zu 100 µg/mL (1350 U/mL) Katalase beibehalten. In Abbildung 3.12 ist der Verlauf der Produktkonzentration mit 1, 2, und 5 µM sMMO dargestellt. Die Ausbeuten, die Reaktionsgeschwindigkeiten und die daraus berechneten Werte für die spezifische Aktivität der sMMO sind in Tabelle 3.4 (Seite 67) aufgelistet.

Mit zunehmender sMMO-Konzentration nahm, wie erwartet, auch die initiale Reaktionsgeschwindigkeit zu. Die spezifische Aktivität der sMMO blieb im Bereich zwischen 140 und 118 mU/min relativ konstant. Mit einer Verdopplung der sMMO-Konzentration von 1 µM (Reaktion D) auf 2 µM (Reaktion F) erhöhte sich die Produktausbeute um den Faktor 1,8 auf 36 %. Eine weitere Erhöhung der Enzymkonzentration auf 5 µM sMMO (Reaktion G) führte lediglich zu einer Steigerung der Ausbeute um den Faktor 1,26 im Vergleich zur Reaktion mit 2 µM sMMO auf 45 %. Die TTN sank mit einer Erhöhung der Enzymkonzentration von 199 mit 1 µM sMMO auf 179 mit 2 µM sMMO und weiter auf 90 mit 5 µM sMMO. Die Reaktion mit 5 µM sMMO zeigte einen unerwarteten Kurvenverlauf (Abbildung 3.12). Nach dem steilen Anstieg der Produktkonzentration zu Reaktionsbeginn nahm die Geschwindigkeit der Produktbildung nach 2,5 Minuten ab. Die Produktkonzentration stieg nicht mehr, wie in den vorangegangenen Versuchen zu beobachten war, hyperbol, sondern linear bis zum Zeitpunkt 40 Minuten. Diese Limitierung der Reaktionsgeschwindigkeit ist vermutlich auf den Mangel

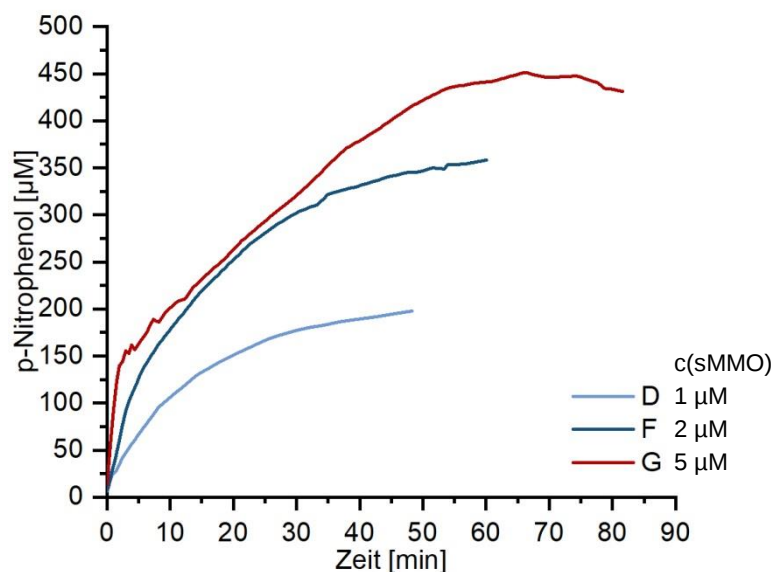


Abbildung 3.12: Umsatz von Nitrobenzol mit verschiedenen sMMO-Konzentrationen; Versuchsaufbau beschrieben in Kapitel 2.4.3 (Seite 36); p-Nitrophenol detektiert bei $\lambda = 420$ nm; die Erstellung der gemittelten Progresskurven ist in Kapitel 2.4.3 beschrieben; $n = 3$; Standardabweichung ≤ 10 %; Reaktionsparameter: $V = 1,2$ mL TMA-Puffer pH 7,5 in OxyTherm; $T = 30$ °C; $c(\text{GDH}) = 5$ µg/mL; $c(\text{Glc}) = 50$ mM; $c(\text{Nitrobenzol}) = 1$ mM; $c(\text{NADH}) = 1$ mM; Rührgeschwindigkeit 1 %; D: $c(\text{sMMO}) = 1$ µM, $c(\text{Cat}) = 100$ µg/mL; F: $c(\text{sMMO}) = 2$ µM*, $c(\text{Cat}) = 200$ µg/mL; G: $c(\text{sMMO}) = 5$ µM*, $c(\text{Cat}) = 500$ µg/mL.

an verfügbarem Sauerstoff zurückzuführen. Weitere Untersuchungen dazu werden im folgenden Abschnitt beschrieben.

3.2.3 Einfluss der Sauerstofflimitierung

Die sMMO nutzt molekularen Sauerstoff, um Nitrobenzol und andere Substrate zu hydroxylieren (Gleichung 1.1, Seite 6). Um die Enzymreaktion zu optimieren, muss die Verfügbarkeit von Sauerstoff in der Lösung sichergestellt werden. Die Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser ist unter anderem von der Temperatur und vom Sauerstoff-Partialdruck in der Gasphase über der Lösung abhängig. Bei 30 °C und 101,3 kPa Luft mit 21 % (v/v) Sauerstoff beträgt die maximale Sauerstoffkonzentration in Wasser 235 µM [Xing et al., 2014]. Das verwendete Reaktionssystem ist offen, der Gasraum wird als unendlich groß betrachtet. Wird Sauerstoff in der Lösung verbraucht, diffundiert Luftsauerstoff von der Gas- in die Flüssigphase nach. Wenn mehr Sauerstoff verbraucht wird, als über die Oberfläche nachdiffundiert, dann sinkt die verfügbare Sauerstoffkonzentration in der Lösung. Davon ausgehend, dass die Kinetik der sMMO bezogen auf das Substrat Sauerstoff einem klassischen Verlauf nach Michaelis-Menten folgt, nimmt auch die Reaktionsgeschwindigkeit mit einer sinkenden Sauerstoffkonzentration ab. Für die sMMO aus *Methylococcus capsulatus* Bath wurde ein K_M -Wert für Sauerstoff von 16,8 µM bestimmt [Pilkington und Dalton, 1990]. Um eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen, sollte die Sauerstoffkonzentration deutlich über dem K_M -Wert liegen.

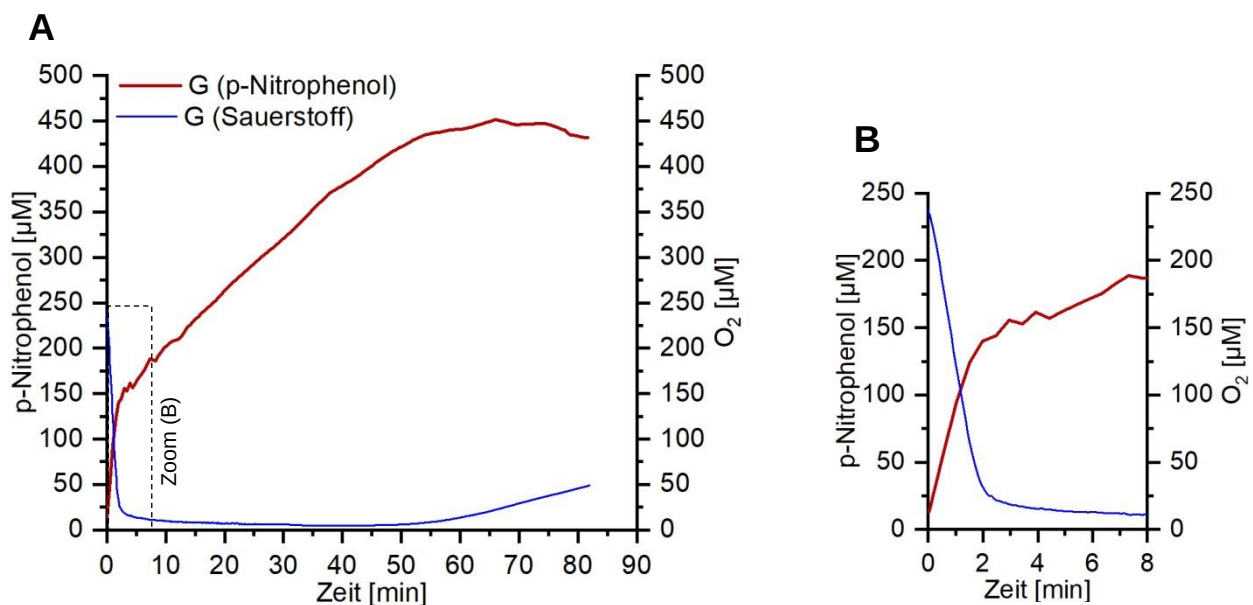
Alle in diesem Kapitel 3.2 beschriebenen Reaktionen wurden im OxyTherm durchgeführt und die Sauerstoffkonzentrationen in der Lösung wurden kontinuierlich gemessen. In Abbildung 3.13 ist neben der Nitrobenzolkonzentration auch die Sauerstoffkonzentration im Zeitverlauf der Reaktion G dargestellt. Die O_2 -Konzentration zu Beginn entsprach mit 235 µM der Sättigungskonzentration. Innerhalb der ersten 2,5 Minuten der Reaktion, in denen die Produktkonzentration stark anstieg, sank die Sauerstoffkonzentration rapide auf etwa 20 µM. In Folge dessen sank auch die Reaktionsgeschwindigkeit. Im Verlauf der Produktkonzentration

war ein Abknicken des Anstieges zu erkennen. In dem Zeitraum, in dem die Produktkonzentration linear stieg, blieb die Sauerstoffkonzentration auf niedrigem Niveau unter 20 μM . Erst nach 50 Minuten, als die Produktkonzentration stagnierte, stieg die Sauerstoffkonzentration in Lösung wieder.

In dem verwendeten Reaktionssystem fand die Versorgung mit Sauerstoff nur durch Diffusion an der Grenzfläche zwischen Reaktionslösung und der Luft statt. Mit der Erhöhung der sMMO-Konzentration auf 5 μM überstieg die Geschwindigkeit des enzymatischen Sauerstoffverbrauchs die Diffusionsrate, sodass die Sauerstoffkonzentration auf unter 20 μM sank. Anhand dieses Kurvenverlaufs lässt sich vermuten, dass zwischen 2,5 und 50 Minuten Reaktionszeit die Diffusionsrate von Sauerstoff der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im Reaktionssystem war. Als nach 50 Minuten die Enzymaktivität abnahm und die Rate des Sauerstoffverbrauchs sank, war die Diffusionsrate höher und die Sauerstoffkonzentration in Lösung stieg wieder.

Auffällig bei diesem Versuch ist, dass in den ersten zwei Minuten ca. 200 μM Sauerstoff verbraucht und nur 130 μM Nitrophenol gebildet wurden. Grund dafür ist die zuvor beschriebene Entkopplung des Elektronentransfers und der Zielproduktbildung (Kapitel 1.1.6.4, Seite 9). Ohne Substrat im aktiven Zentrum kommt es zur Übertragung des aktivierten Sauerstoffs auf H_2O und damit zur Bildung von H_2O_2 . In diesem Versuch lag die aus dem O_2 -Verbrauch und der Produktbildung berechnete Kopplungseffizienz für die Anfangsphase der Reaktion bei 65 %.

In dem Zeitraum zwischen 2,5 und 50 Minuten bleibt die Sauerstoffkonzentration nahezu konstant. Der Sauerstoffverbrauch und die Diffusionsrate sind in diesem Zeitraum gleich groß. Unter der Annahme, dass die Kopplungseffizienz im Reaktionsverlauf gleich bleibt, müsste das Verhältnis zwischen Sauerstoffverbrauch und Produktbildung im Zeitraum zwischen 2,5 und 50 Minuten ebenfalls der Kopplungseffizienz entsprechen. Mit diesem Zusammenhang ließe sich bestätigen, dass die Sauerstoffdiffusion in diesem Zeitraum limitie-



Abbildungung 3.13: Umsatz von Nitrobenzol durch die sMMO; Versuchsaufbau beschrieben in Kapitel 2.4.3 (Seite 36); p-Nitrophenol detektiert bei $\lambda = 420 \text{ nm}$, Sauerstoff gemessen mit OxyTherm (Hansatech); die Erstellung der gemittelten Progresskurven ist in Kapitel 2.4.3 beschrieben; $n = 3$; Standardabweichung $\leq 10 \%$; Reaktionsparameter: $V = 1,2 \text{ mL}$ TMA-Puffer pH 7,5 in OxyTherm; $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$; $c(\text{GDH}) = 5 \text{ } \mu\text{g/mL}$; $c(\text{Glc}) = 50 \text{ mM}$; $c(\text{Nitrobenzol}) = 1 \text{ mM}$; $c(\text{NADH}) = 1 \text{ mM}$; Rührgeschwindigkeit 1 %; $c(\text{sMMO}) = 5 \text{ } \mu\text{M}$, $c(\text{Cat}) = 500 \text{ } \mu\text{g/mL}$.

rend ist. Zur Bestätigung dieser Hypothese wurde in weiteren Untersuchungen für das verwendete Reaktionssystem die Rate der Sauerstoffdiffusion $\frac{dc_{O_2}}{dt}$ in Abhängigkeit von der apparenten Sauerstoffkonzentration c_{O_2} bestimmt. Dabei gilt folgender Zusammenhang:

$$\frac{dc_{O_2}}{dt} = k_L a \cdot (c_{O_2}^0 - c_{O_2}) \quad \text{Gleichung 3.1}$$

$\frac{dc_{O_2}}{dt}$: Sauerstoffdiffusionsrate

$k_L a$: volumenbezogener Stoffübergangskoeffizient

$c_{O_2}^0$: Gleichgewichtskonzentration

c_{O_2} : apparente Sauerstoffkonzentration an der Phasengrenze

Zunächst wurde Reaktionspuffer mit Stickstoff begast, um den gelösten Sauerstoff auszutreiben und die Sauerstoffkonzentration zu minimieren. Anschließend wurde Reaktionspuffer mit verringerter Sauerstoffkonzentration in den Reaktionsraum des OxyTherm gegeben. Der Anstieg der Sauerstoffkonzentration $\frac{dc_{O_2}}{dt}$ in Lösung wurde gegen die Differenz der Sauerstoffkonzentration zur Sättigungskonzentration aufgetragen (Abbildung 3.14A). Der daraus ermittelte volumenbezogene Stoffübergangskoeffizient $k_L a$ beträgt $6,2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Der $k_L a$ -Wert ermöglicht es, die Rate der Sauerstoffdiffusion zu jedem Zeitpunkt der Reaktion G in Abbildung 3.13 (Seite 62) zu berechnen. Im Zeitraum zwischen 2,5 und 50 Minuten, in der die Produktkonzentration linear steigt, wurde eine mittlere Diffusionsrate von $8,6 \text{ } \mu\text{M}/\text{min}$ bestimmt. Der Anstieg der Produktkonzentration wurde in diesem Zeitraum gemittelt und beträgt $5,7 \text{ } \mu\text{M}/\text{min}$. Basierend auf dem Quotient aus Sauerstoffverbrauch und Produktbildung wurde eine Kopplungseffizienz von 66 % ermittelt. Dieser Wert stimmt mit der zuvor aus der Abnahme der Sauerstoffkonzentration und der Zunahme der Produktkonzentration in den ersten 2,5 Minuten der Reaktion ermittelten Kopplungseffizienz nahezu überein. Damit wurde bestätigt, dass bei gleichbleibender Kopplungseffizienz die Rate der Produktbildung durch die Diffusionsrate von Sauerstoff aus der Luft in die Flüssigphase limitiert ist. Eine Erhöhung der Diffusionsrate würde demnach die Limitierung verringern und die Reaktionsgeschwindig-

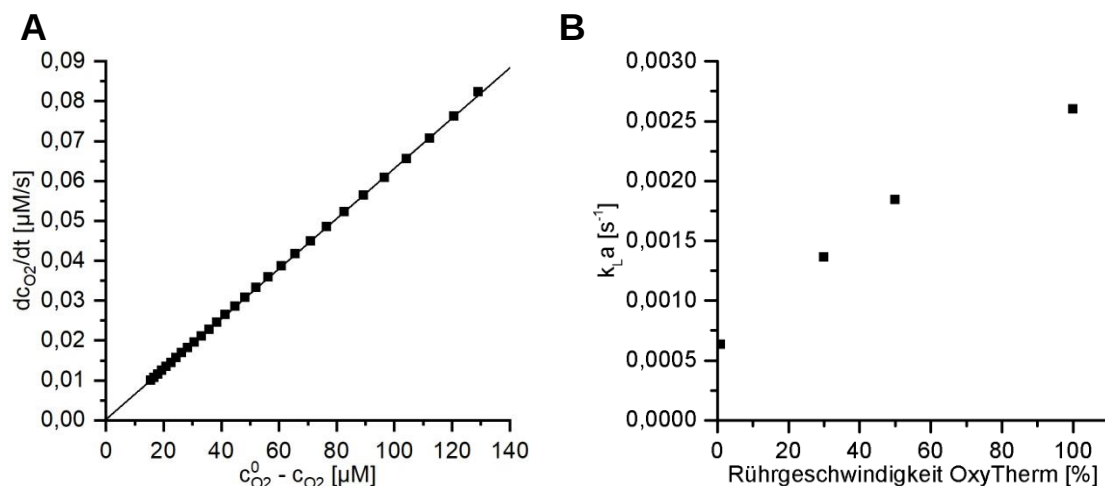


Abbildung 3.14: A: Bestimmung des Stoffübergangskoeffizienten $k_L a$ im OxyTherm; Sauerstofftransportrate in Abhängigkeit von der Differenz der apparenten zur Gleichgewichts-Sauerstoffkonzentration in Lösung; $k_L a = 6,2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ermittelt aus der Steigung der linearen Regression; B: ermittelte $k_L a$ -Werte bei verschiedenen Rührgeschwindigkeiten im OxyTherm (Hansatech), TMA-Puffer, $V = 1,2 \text{ mL}$, $T = 30 \text{ } ^\circ\text{C}$.

keit erhöhen.

Die Diffusionsrate ist unter anderem von der Fläche, über die der Stofftransfer stattfindet, und von der Differenz der apparenten Sauerstoffkonzentration zur Sättigungskonzentration abhängig. Eine Auswahl möglicher Strategien, um die Diffusionsrate von Sauerstoff zu erhöhen, ist in der Einleitung (Kapitel 1.1.8.2, Seite 16) aufgeführt. Da die Reaktionen zur Messung der Sauerstoffkonzentration im OxyTherm durchgeführt werden, ließ sich der Reaktionsraum und damit die Oberfläche in diesem Versuch nicht ändern. Eine aktive Begasung zur Vergrößerung der Oberfläche ist aufgrund der Sensitivität der Enzyme gegenüber Schaumbildung ungeeignet.

Im folgenden Versuch sollte die Rührgeschwindigkeit angepasst werden, um die Diffusionsrate zu erhöhen. Das 2-layer-Modell von Whitman beschreibt die Bildung von zwei stationären Schichten auf jeder Seite der Grenzfläche zwischen Gas- und Flüssigphase. Innerhalb der Lösung entsteht ein Konzentrationsgradient abhängig von der Entfernung zur Oberfläche. An der Grenzfläche ist die Sauerstoffkonzentration am höchsten [Whitman, 1962]. Die Differenz zur Sättigungskonzentration ist demnach dort am geringsten, sodass die Diffusionsgeschwindigkeit verringert wird. Durch eine Umwälzung der Lösung wird der Konzentrationsgradient verändert. Dadurch kann die Differenz der Sauerstoffkonzentration an der Grenzfläche zur Sättigungskonzentration erhöht und die Diffusionsgeschwindigkeit gesteigert werden. Für das verwendete Reaktionssystem im OxyTherm wurde der Stoffübergangskoeffizient $k_L a$ bei verschiedenen Rührgeschwindigkeiten experimentell ermittelt (Abbildung 3.14B, Seite 63). Mit Erhöhung der Rührgeschwindigkeit steigt der $k_L a$ -Wert. Eine schnellere Umwälzung des Reaktionspuffers erhöht die Diffusionsrate und könnte die Sauerstofflimitierung in Reaktion G (Abbildung 3.13, Seite 62) verringern. Deswegen wurde als nächstes der enzymatische Umsatz von Nitrobenzol mit 5 μM sMMO bei verschiedenen Rührgeschwindigkeiten durchgeführt.

In Abbildung 3.15 wurden die gleichen Reaktionsbedingungen wie in den vorangegangenen Versuchen eingesetzt. Die Rührgeschwindigkeit wurde wie folgt verändert: In Reaktion G wurde die in dem Aufbau minimale Rührgeschwindigkeit (1 %) eingesetzt. In Reaktion H betrug die Rührgeschwindigkeit im OxyTherm 30 % und in Reaktion J wurde die maximale Rührgeschwindigkeit 100 % eingesetzt. In allen drei Reaktionen stieg die Produktkonzentration innerhalb der ersten 2,5 Minuten auf etwa 130 μM p-Nitrophenol. Danach stieg die Produktkonzentration in Reaktion G mit einer Geschwindigkeit von 5,7 $\mu\text{M}/\text{min}$, in Reaktion H mit 25,9 $\mu\text{M}/\text{min}$ und in Reaktion J mit 52,4 $\mu\text{M}/\text{min}$. In der Reaktion J mit einer Rührgeschwindigkeit von 100 % ist kein Abknicken der Progresskurve erkennbar. Die Sauerstoffdiffusion scheint nicht mehr limitierend zu sein. Die Ausbeute konnte dadurch von 45 % auf 57 % gesteigert werden. Die Zeit, in der diese Ausbeute erreicht wurde, konnte von 67 Minuten auf 23 Minuten verkürzt werden. Auch die TTN ist durch die Verringerung der Sauerstofflimitierung leicht gestiegen. In Reaktion J konnte mit maximaler Rührgeschwindigkeit eine TTN von 114 erreicht werden. Die höchste TTN (199) wurde jedoch mit geringerer sMMO-Konzentration in Reaktion D erreicht (Tabelle 3.4, Seite 67). Weitere Reaktionsparameter sind zu optimieren, um möglicherweise auch mit 5 μM sMMO eine hohe TTN zu gewährleisten.

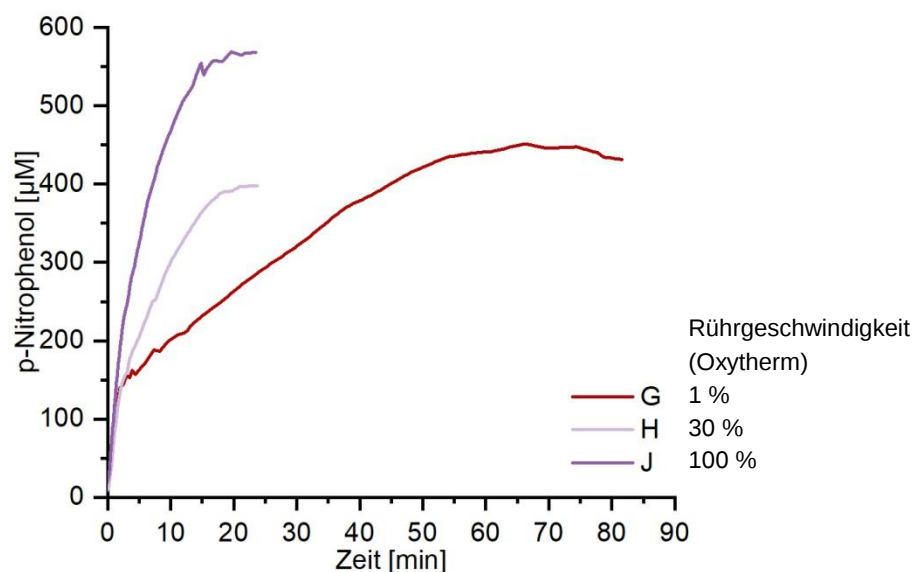


Abbildung 3.15: Umsatz von Nitrobenzol durch die sMMO bei verschiedenen Rührgeschwindigkeiten; Versuchsaufbau beschrieben in Kapitel 2.4.3 (Seite 36); p-Nitrophenol detektiert bei $\lambda = 420$ nm; die Erstellung der gemittelten Progresskurven ist in Kapitel 2.4.3 beschrieben; $n = 3$; Standardabweichung ≤ 15 %; Reaktionsparameter: $V = 1,2$ mL TMA-Puffer pH 7,5 in OxyTherm; $T = 30$ °C; $c(\text{sMMO}) = 5$ μM , $c(\text{Cat}) = 500$ $\mu\text{g/mL}$; $c(\text{GDH}) = 5$ $\mu\text{g/mL}$; $c(\text{Glc}) = 50$ mM; $c(\text{Nitrobenzol}) = 1$ mM; $c(\text{NADH}) = 1$ mM; G: Rührgeschwindigkeit 1 %; H: Rührgeschwindigkeit 30 %; J: Rührgeschwindigkeit 100 %.

3.2.4 Einfluss der Substratkonzentration

Die in den bisherigen Versuchen standardmäßig eingesetzte Substratkonzentration betrug 1 mM Nitrobenzol. In der Literatur wurde ebenfalls Nitrobenzol als Modells substrat für die sMMO verwendet. Die eingesetzten Konzentrationen variierten in der Regel zwischen 0,25 und 5 mM [Brazeau und Lipscomb, 2003; Griethe, 2018; Liu et al., 2005]. Der für Nitrobenzol bestimmte K_M -Wert beträgt 510 μM [Griethe, 2018]. Um eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit aufrecht zu erhalten, sollte die Substratkonzentration deutlich über dem K_M -Wert liegen. dennoch wurden in der Literatur und in der vorliegenden Arbeit zunächst Substratkonzentrationen eingesetzt, die nur geringfügig über dem K_M liegen. Solange nur geringe Mengen der eingesetzten Substratkonzentration umgesetzt werden, ist der Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit durch die Abnahme der Substratkonzentration gering. Mit den bisherigen Optimierungen von Prozessparametern konnte in der vorliegenden Arbeit die finale Produktkonzentration von 30 μM (Reaktion A, Abbildung 3.11, Seite 90) auf 568 μM (Reaktion J, Abbildung 3.15, Seite 65) erhöht werden. Im Reaktionsverlauf sank die Substratkonzentration dementsprechend unter den K_M -Wert, wodurch ein großer Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit zu erwarten ist. Die Reaktion ist kinetisch limitiert. Um zu verhindern, dass die Substratkonzentration unter den K_M -Wert sinkt, sollte diese in den folgenden Reaktionen angepasst werden. Abbildung 3.16 zeigt den Verlauf der Produktkonzentration bei verschiedenen initialen Nitrobenzolkonzentrationen. Die TTN, Produktausbeuten und spezifischen Aktivitäten sind in Tabelle 3.4 (Seite 67) zusammengefasst. Eine Verdopplung der Nitrobenzolkonzentration von 1 mM in Reaktion J auf 2 mM in Reaktion K führte zu einer 1,6-fachen Steigerung der finalen Produktkonzentration und damit auch der TTN. Eine weitere Steigerung der Substratkonzentration auf 5 mM in Reaktion L führte nur zu einer geringen Steigerung der finalen Produktkonzentration und der TTN. Die aus dem initialen Anstieg der Progresskurven ermittelte spezifische Aktivität der sMMO nimmt mit höherer Substratkonzentration ab. Dies widerspricht der Annahme, dass die Kinetik der sMMO sich durch den klassi-

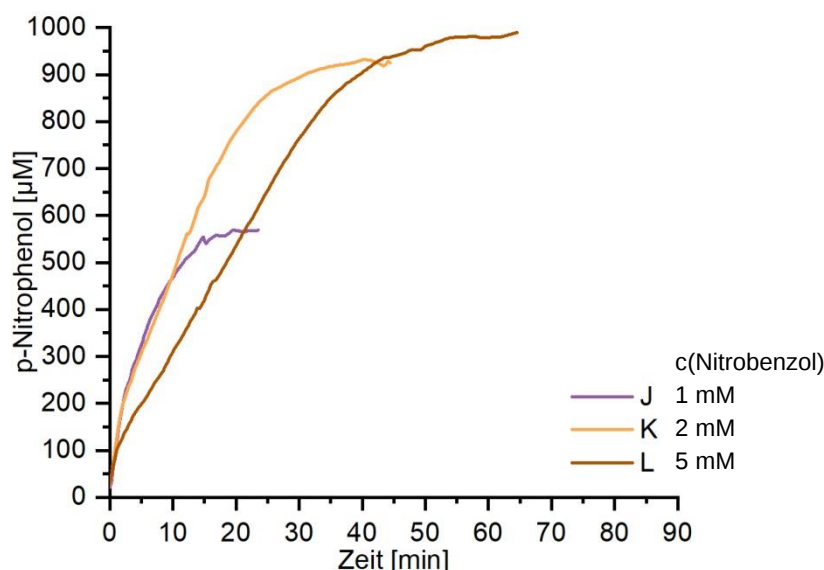


Abbildung 3.16: Umsatz verschiedener Nitrobenzolkonzentrationen durch die sMMO; Versuchsaufbau beschrieben in Kapitel 2.4.3 (Seite 36); p-Nitrophenol detektiert bei $\lambda = 420$ nm; die Erstellung der gemittelten Progresskurven ist in Kapitel 2.4.3 beschrieben; $n = 3$; Standardabweichung ≤ 15 %; Reaktionsparameter: $V = 1,2$ mL TMA-Puffer pH 7,5 in OxyTherm; $T = 30$ °C; $c(\text{sMMO}) = 5$ μM , $c(\text{Cat}) = 500$ $\mu\text{g/mL}$; $c(\text{GDH}) = 5$ $\mu\text{g/mL}$; $c(\text{Glc}) = 50$ mM; $c(\text{NADH}) = 1$ mM; Rührgeschwindigkeit 100 %; J: $c(\text{Nitrobenzol}) = 1$ mM; K: $c(\text{Nitrobenzol}) = 2$ mM; L: $c(\text{Nitrobenzol}) = 5$ mM.

schen Verlauf nach Michaelis-Menten beschreiben lässt [Griethe, 2018]. Eine Substratüberschusshemmung ist für die sMMO nicht beschrieben. Auch A. Griethe setzte bis zu 5 mM Nitrobenzol ein, konnte jedoch keine eindeutige Hemmung der sMMO durch das Substrat feststellen [Griethe, 2018].

Nach dem initialen Anstieg in den ersten 2,5 Minuten ist in den Progresskurven von Reaktion K mit 2 mM Nitrobenzol und von Reaktion L mit 5 mM Nitrobenzol ein Abknicken und ein linearer Anstieg der Produktkonzentration zu erkennen. Der Verlauf ist vergleichbar mit dem Ergebnis in Kapitel 3.2.3 (Abbildung 3.13, Seite 62). Obwohl die Rührgeschwindigkeit auf 100 % gesetzt wurde, führte eine Erhöhung der Substratkonzentration vermutlich zu einer Limitierung durch die Sauerstoffdiffusion. Möglicherweise hat die Menge an gelöstem Nitrobenzol einen Einfluss auf die Löslichkeit von Sauerstoff im Reaktionspuffer. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden dazu keine weiteren Untersuchungen durchgeführt.

Um eine möglichst hohe TTN zu erreichen, sollte die Substratkonzentration so gewählt werden, dass sie im Reaktionsverlauf nicht unter den K_M sinkt. Eine hohe Substratkonzentration kann jedoch einen inhibierenden Effekt auf das Enzym haben. Die höchste Produktkonzentration konnte mit 5 mM Nitrobenzol erreicht werden. Die höchste prozentuale Ausbeute wurde jedoch mit einer geringeren Nitrobenzolkonzentration von 1 mM erreicht.

Die folgende Tabelle fasst die Reaktionsbedingungen und die resultierenden Aktivitätswerte und Ausbeuten der Versuche zur Identifizierung umsatzlimitierender Faktoren zusammen.

Tabelle 3.4: Umsatz von Nitrobenzol (Substrat) durch die sMMO, Übersicht der Reaktionsparameter, Aktivitätswerte und Ausbeuten

Reaktion	c(Substrat)	c(sMMO)	c(Katalase)	Rühr- geschwindigkeit (OxyTherm)	c(Produkt)	Reaktionsdauer	TTN	Produkt- ausbeute	spez. Aktivität der sMMO
	μM	μM	μg/mL	%	μM	min		%	mU/mg
A	1000	1	0	1	30,5	5	31	3,1	136
B	1000	1	10	1	125	25	125	12,5	89
C	1000	1	50	1	161	29	161	16,1	100
D	1000	1	100	1	199	49	199	19,9	140
E	1000	1	200	1	141	29	141	14,1	121
F	1000	2	200	1	358	60	179	35,8	118
G	1000	5	500	1	451	67	90	45,1	123
H	1000	5	500	30	477	23	95	47,7	122
J	1000	5	500	100	568	23	114	56,8	162
K	2000	5	500	100	932	40	186	46,6	150
L	5000	5	500	100	982	57	196	19,6	97

In den Kapiteln 3.2.1 bis 3.2.4 konnten verschiedene Faktoren identifiziert werden, die die TTN der sMMO und die Ausbeute in einem klassischen Reaktionsansatz limitieren. Durch Anpassung der Katalase-Konzentration, Erhöhung der sMMO-Konzentration und Anpassung der Substratversorgung konnte die TTN um den Faktor 6 auf 199 und die Produktausbeute um den Faktor 18 auf 57 % erhöht werden (Tabelle 3.4, Seite 67). Diese Erkenntnisse wurden in den folgenden Kapiteln verwendet, um die enzymatische Hydroxylierung von Benzol, Naphthalin und Ethylen zu optimieren.

3.3 sMMO-katalysierter Umsatz der Zielsubstrate Ethylen, Benzol und Naphthalin

Nachdem zur Identifizierung umsatzlimitierender Faktoren das Modellsubstrat Nitrobenzol verwendet worden war, sollte nun der Fokus auf die Zielsubstrate Ethylen, Benzol und Naphthalin gelegt werden. In der Literatur wurde der Umsatz dieser drei Substrate bereits gezeigt, jedoch war nicht viel über die Kinetik der Hydroxylierung mit gereinigten sMMO-Komponenten bekannt. Detaillierte Untersuchungen zum Verlauf der Reaktionen sind nicht veröffentlicht. Diese können jedoch als Grundlage für eine Optimierung der Biotransformationsprozesse dienen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten zunächst Methoden etabliert werden, mit Hilfe derer der Reaktionsverlauf anhand der jeweiligen Produktkonzentration verfolgt werden konnte.

3.3.1 Entwicklung des Versuchsaufbaus zum Umsatz von Benzol

Das Zielprodukt der enzymatischen Hydroxylierung von Benzol im Rahmen der vorliegenden Arbeit war Phenol. Bereits aus der Literatur ist bekannt, dass es häufig zur weiteren Oxidation kommt (siehe Kapitel 1.1.4, Tabelle 1.1, Seite 4). In Abbildung 3.17 sind theoretisch mög-

liche Hydroxylierungsreaktionen mit Benzol als Substrat dargestellt. Die Verteilung ist jedoch vom jeweiligen Enzym anhängig. Als Produkte der enzymatischen Hydroxylierung von Benzol durch die sMMO wurden in der Literatur Phenol und Hydrochinon beschrieben [Pilkington und Dalton, 1990]. Die Bildung weiterer dihydroxylierter Isomere ist bisher nicht nachgewiesen. Für die Anwendung ist jedoch eine genaue Kenntnis aller Produkte notwendig. Im Folgenden sind die Ergebnisse zur Entwicklung eines geeigneten Versuchsaufbaus aufgeführt. Für den Umsatz von Benzol zu Phenol wurde eine diskontinuierliche Bestimmung der Produktkonzentrationen mittels HPLC etabliert (Kapitel 2.4.4, Seite 37). Der verwendete Diodearraydetektor ermöglichte die Detektion von Substraten und Produkten bei verschiedenen Wellenlängen, sodass diese exakt quantifiziert werden konnten. Der Einsatz des hydrophoben Substrates Benzol in wässriger Lösung erforderte Anpassungen des Reaktionssystems. Die Adsorption von Substraten oder Produkten an die hydrophoben Oberflächen der Reaktionsgefäße wurde verhindert, indem Glasgefäße verwendet wurden. Unter Standardbedingungen lassen sich 23 mM Benzol in Wasser lösen. Benzol ist leicht flüchtig und besitzt im Vergleich zu Wasser einen hohen Dampfdruck (Dampfdruck bei 30 °C: $p_{\text{Benzol}} = 15,5 \text{ kPa}$, $p_{\text{Wasser}} = 4,2 \text{ kPa}$ [GESTIS-Stoffdatenbank, 2021a]). Aufgrund dessen verdampft Benzol leicht aus wässriger Lösung. Um den Verlust von Benzol während des enzymatischen Umsatzes zu minimieren, wurden die Reaktionsgefäße gasdicht verschlossen. Die Benzolkonzentration wurde durch Zugabe aus einer gesättigten wässrigen Lösung eingestellt. Die Probenahme erfolgte über ein Septum im Deckel der Reaktionsgefäße. Die Reaktionsproben wurden mit 5 % TFA (v/v) abgestoppt, das präzipitierte Protein mittels Zentrifugation abgetrennt und der Überstand chromatographisch analysiert (Kapitel 2.5.5, Seite 44). Während der Aufarbeitung der Proben, die im Reaktionsverlauf genommen wurden, ließ sich der Benzolverlust durch Evaporation nicht vermeiden. Deswegen wurde auf eine Analyse des Substratverbrauchs verzichtet. Lediglich die Benzolkonzentration zu Reaktionsbeginn wurde bestimmt, indem eine vergleichbare Verdünnung aus der gesättigten Benzollösung in Reaktionspuffer ohne Proteine angefertigt wurde, welche anschließend direkt verlustfrei mittels HPLC analysiert wurde. Die Produkte der Hydroxylierung von Benzol verdampften während der Probenaufarbeitung nicht und konnten daher genau quantifiziert werden.

Zunächst wurde der durch gereinigte sMMO katalysierte Umsatz von Benzol gemessen. In Abbildung 3.18 ist der Verlauf der Produktkonzentration dargestellt. In diesem Versuch wurde Phenol als einziges Produkt detektiert. Die Progresskurve zeigt einen hyperbolen Verlauf. Sie nähert sich nach 20 Minuten einem Maximum von 50 μM an. Dieser Verlauf ist mit den Ergebnissen des Nitrobenzol-Umsatzes in Kapitel 3.2 (Seite 58) vergleichbar. Aus der Pro-

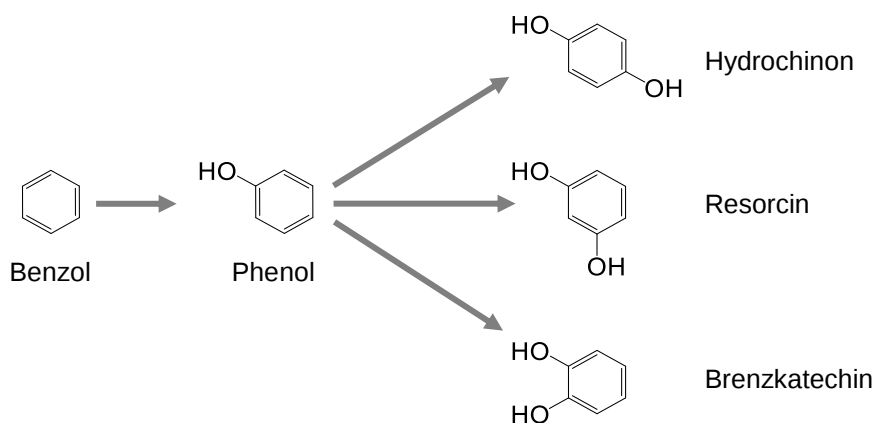


Abbildung 3.17: Schematische Darstellung möglicher Hydroxylierungsprodukte von Benzol

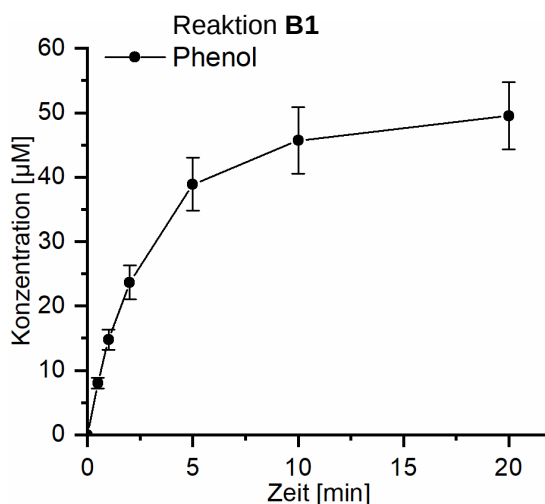


Abbildung 3.18 (Reaktion B1): Umsatz von Benzol mit der sMMO; Versuchsaufbau beschrieben in Kapitel 2.4.4 (Seite 37); $V = 2,5 \text{ mL}$ TMA-Puffer pH 7,5; $T = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $c(\text{sMMO}) = 1 \text{ } \mu\text{M}$; $c(\text{NADH}) = 1 \text{ mM}$; $c(\text{Benzol}) = 1 \text{ mM}$; Analyse mittels HPLC (Kapitel 2.5.5, Seite 44); Mittelwert aus $n = 3$ unabhängigen Reaktionen.

gresskurve lässt sich der Anfangsanstieg und somit eine spezifische Aktivität der sMMO von $110,6 \text{ mU/mg}$ bestimmen. Dieser Wert ist etwas niedriger, als die spezifische Aktivität für den Umsatz von Nitrobenzol. Für die beiden strukturell ähnlichen Substrate Nitrobenzol und Benzol zeigt die sMMO eine ähnliche spezifische Aktivität.

Trotz geringer Produktausbeute konnte die enzymatische Bildung von Phenol mit gereinigter sMMO hier erstmals zeitaufgelöst dargestellt werden.

3.3.2 Entwicklung des Versuchsaufbaus zum Umsatz von Naphthalin

In der Literatur ist der Umsatz von Naphthalin zu 1- und 2-Naphthol durch die sMMO beschrieben. Weitere Hydroxylierungsprodukte wurden bisher nicht identifiziert, sind aufgrund des breiten Substratspektrums der sMMO jedoch nicht auszuschließen. In Abbildung 3.19 sind die möglichen Produkte der ein- oder zweifachen Hydroxylierung von Naphthalin und Naphthol dargestellt.

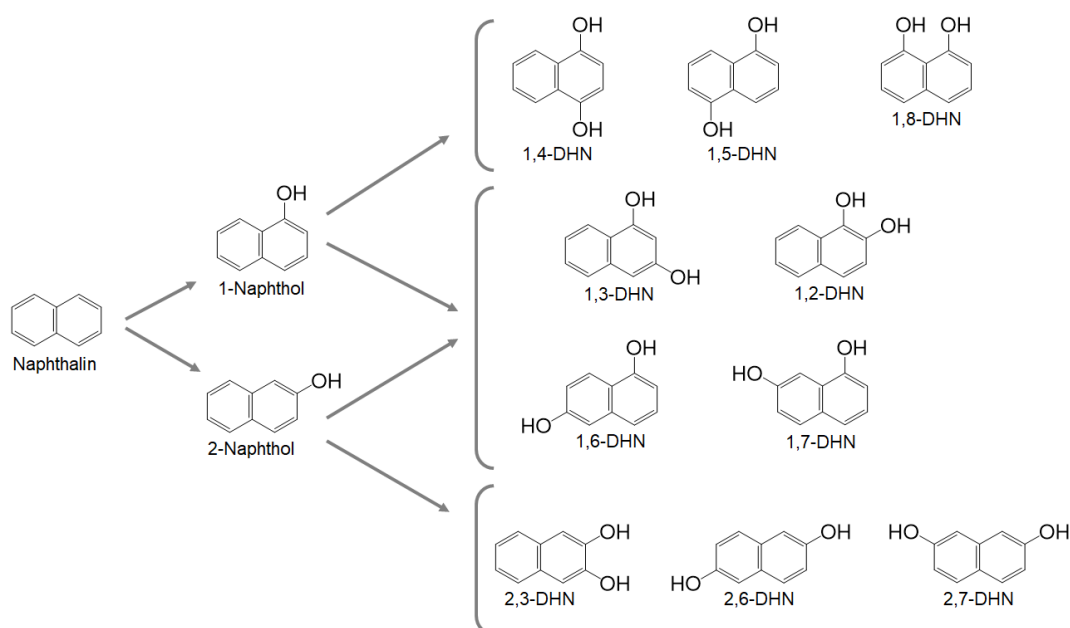


Abbildung 3.19: Schematische Darstellung möglicher Hydroxylierungsprodukte von Naphthalin

Naphthalin ist in Wasser nahezu unlöslich. Unter Standardbedingungen lassen sich nur 242 μM Naphthalin in Wasser lösen [GESTIS-Stoffdatenbank, 2021c]. Unter Reaktionsbedingungen bei 30 °C konnte eine maximale Konzentration von 340 μM nachgewiesen werden. Aufgrund der Hydrophobizität adsorbiert Naphthalin an Kunststoffoberflächen von Reaktionsgefäßen. Deshalb wurde der enzymatische Umsatz von Naphthalin ebenfalls in Glasgefäßen durchgeführt. Reaktionsproben wurden analog zum Umsatz von Benzol (Kapitel 3.3.1) durch Zugabe von TFA abgestoppt und präzipitierte Proteine wurden mittels Zentrifugation abgetrennt. Die Analyse erfolgte ebenfalls mittels HPLC (Kapitel 2.5.5, Seite 44). Während der Probenaufarbeitung konnte ein Verlust von Naphthalin festgestellt werden. Vermutlich kommt es durch die Zugabe von TFA zur Co-Präzipitation von Naphthalin und denaturierten Proteinkomponenten. Zur exakten Bestimmung der Naphthalinkonzentration zum Reaktionsstart wurde vor der Enzymzugabe eine Probe abgenommen und ohne TFA-Zugabe direkt mittels HPLC analysiert. Im weiteren Reaktionsverlauf wurde auf die Analyse des Substratverbrauchs verzichtet. Die Hydroxylierungsprodukte konnten in allen Reaktionsproben verlustfrei quantifiziert werden, da diese nicht während der Probenaufarbeitung präzipitierten.

Der detaillierte Ablauf der Reaktion **N1** ist in Kapitel 2.4.4 (Seite 37) beschrieben. Abbildung 3.20 zeigt den Verlauf der Produktkonzentrationen von 1- und 2-Naphthol. Dihydroxylierte Naphthalinisomere wurden unter diesen Bedingungen nicht detektiert. Mit dem Reaktionsstart stiegen die Konzentrationen von 1- und 2-Naphthol. Im Verlauf der Reaktion sank die Reaktionsgeschwindigkeit, sodass nach 20 Minuten ein Maximum von 32 μM 1-Naphthol und 22 μM 2-Naphthol erreicht wird. In der Summe wurden 54 μM Naphthol gebildet. Im gesamten Reaktionsverlauf konnte ein Verhältnis von 60 % 1-Naphthol und 40 % 2-Naphthol nachgewiesen werden.

Das Ergebnis des enzymatischen Umsatzes von Naphthalin ist vergleichbar mit dem Umsatz von Benzol (Reaktion **B1**, Kapitel 3.3.1, Abbildung 3.18, Seite 69) und Nitrobenzol (Reaktion **A**, Kapitel 3.2, Abbildung 3.11, Seite 59). Die aus dem initialen Anstieg der Produktkonzentration ermittelte spezifische Aktivität der sMMO betrug 128,4 mU/mg. Die spezifische Aktivität für den Umsatz von Naphthalin liegt unter den verwendeten Reaktionsbedingungen damit in der gleichen Größenordnung, wie die der anderen aromatischen Substrate Benzol und Nitrobenzol. Die Bildung von 1- und 2-Naphthol mit gereinigter sMMO konnte erstmals zeit-aufgelöst gezeigt werden.

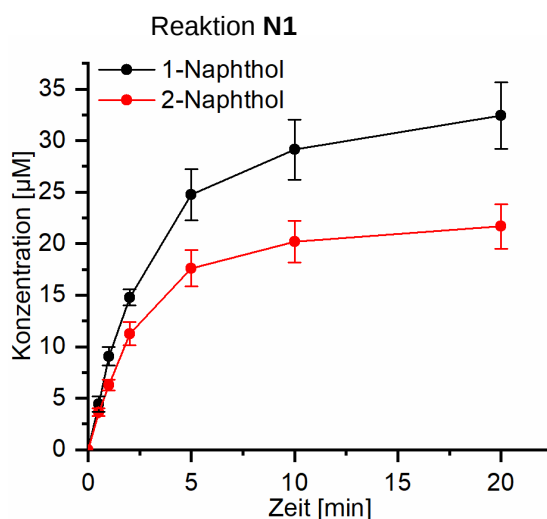


Abbildung 3.20 (**Reaktion N1**): Umsatz von Naphthalin mit der sMMO; Versuchsaufbau beschrieben in Kapitel 2.4.4 (Seite 37); $V = 2,5 \text{ mL}$ TMA-Puffer pH 7,5; $T = 30 \text{ °C}$; $c(\text{sMMO}) = 1 \text{ }\mu\text{M}$; $c(\text{NADH}) = 1 \text{ mM}$; $c(\text{Naphthalin}) = 0,3 \text{ mM}$; Analyse mittels HPLC (Kapitel 2.5.5, Seite 44); Mittelwert aus $n = 3$ unabhängigen Reaktionen.

3.3.3 Entwicklung des Versuchsaufbaus zum Umsatz von Ethylen

Analog zu den Experimenten für die Substrate Benzol und Naphthalin sollte für den enzymatischen Umsatz von Ethylen durch die sMMO zunächst ein Reaktionssystem entwickelt werden, welches es ermöglichte, den Umsatz zeitaufgelöst zu verfolgen. Für diese Reaktion werden mit Sauerstoff und Ethylen zwei gasförmige Substrate benötigt, die im Reaktionspuffer gelöst vorliegen müssen, um für die sMMO zugänglich zu sein. Zwischen der Gasphase und der Flüssigphase findet Diffusion der Substrate statt. Ein Netto-Stofftransport ist zu beobachten, bis der Gleichgewichtszustand erreicht ist. Die Lage des Gleichgewichts ist unter anderem von der Temperatur und vom Partialdruck des Stoffes in der Gasphase über der Lösung abhängig. Bei einem Partialdruck von 101,3 kPa Ethylen und 30 °C beträgt die maximale Konzentration in Lösung 3,90 mM. Die Löslichkeit von Sauerstoff bei 101,3 kPa Partialdruck und 30 °C beträgt 1,12 mM [Breitbarth *et al.*, 2004; Miyamoto *et al.*, 2014; Xing *et al.*, 2014]. Die verfügbare Substratmenge in der Lösung kann demnach über die Zusammensetzung der Gasphase und den Druck kontrolliert werden. Wie in Kapitel 3.2.3 (Seite 61) gezeigt, kann der Stofftransport der gasförmigen Substrate in die flüssige Phase die Reaktionsgeschwindigkeit limitieren. Zudem ist zu beachten, dass Ethylen und Sauerstoff als Gasgemisch eine explosive Atmosphäre bilden können. Deswegen war es notwendig, die Reaktionen unter speziellen Sicherheitsanforderungen (ATEX) zu planen und durchzuführen. Die Experimente erfolgten aus diesem Grund in Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer Institut IGB in Stuttgart, wo entsprechende geschützte Bedingungen eingehalten wurden.

Die Reaktion wurde in einem gasdicht verschlossenen Glasgefäß mit einem Gesamtvolumen von 22 mL durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 10 mL. Das Massenspektrometer wurde entsprechend des Aufbaus in Abbildung 2.1 (Seite 40) angeschlossen. Durch die angeschlossenen Kapillaren des Massenspektrometers erhöhte sich das verfügbare Gasvolumen in dem Reaktionssystem auf 13,9 mL. Die Substrate Sauerstoff und Ethylen wurden über Kanülen und das im Deckel befindliche Septum in den Kopfraum des Gefäßes gegeben. Der detaillierte Reaktionsablauf ist in Kapitel 2.4.6 (Seite 39) beschrieben. Die Analytik erfolgte kontinuierlich mittels Massenspektrometrie (MS). Dazu wurde der Prototyp VarioOne von Variolytics (Stuttgart) verwendet (Kapitel 2.5.7, Seite 46). Dieser ermöglichte die Detektion des Ionenstroms mehrerer Masse-Ladungs-Verhältnisse gleichzeitig, sodass sowohl die Substrat- als auch die Produktkonzentrationen in Lösung online verfolgt werden konnten. In dem verwendeten Reaktionssystem wurde der Kopfraum zunächst mit 100 % Sauerstoff gespült, bis die Sauerstoffkonzentration in der Flüssigphase ein konstantes Niveau erreichte. Anschließend wurde in das gasdicht verschlossene Gefäß eine definierte Menge Ethylen gegeben. Bis zum Erreichen des Gleichgewichtszustandes diffundierte Ethylen aus der Gasphase in die Lösung. Nach Zugabe des Substrates Ethylen wurde der Reaktionsansatz inkubiert, bis die Ethylenkonzentration in der Lösung ein konstantes Niveau erreichte. Dann wurde die Reaktion **E1** durch Zugabe der Enzyme gestartet.

In Abbildung 3.21 ist der enzymatische Umsatz von Ethylen mit gereinigter sMMO als zeitlicher Verlauf der Produktkonzentration dargestellt. Nach dem Reaktionsstart stieg die Konzentration von Ethylenoxid in der Lösung. Die spezifische Aktivität zu Beginn der Reaktion betrug 54,1 mU/mg. Danach nahm, wie auch für die Substrate Naphthalin, Benzol und Nitrobenzol, die Reaktionsgeschwindigkeit ab. Die Produktkonzentration näherte sich nach wenigen Minuten einem Maximum von 40 µM an. Das Produkt Ethylenoxid ist ebenfalls bei Raumtemperatur gasförmig. Es findet ein Stofftransport aus der Flüssigphase in die Gasphase statt. Die angegebenen Konzentrationen wurden in der flüssigen Phase gemessen.

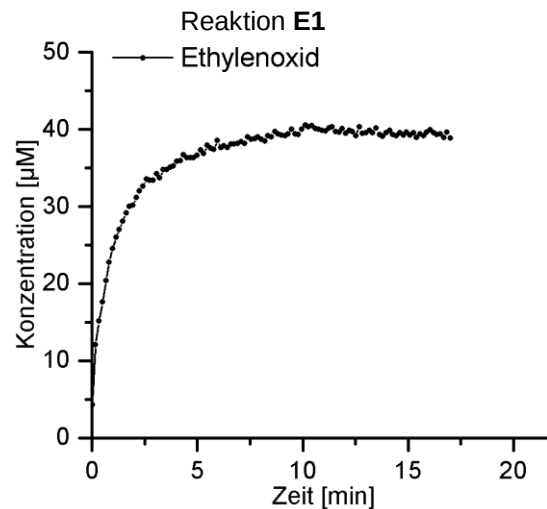


Abbildung 3.21 (Reaktion E1): Umsatz von Ethylen mit der sMMO; Versuchsaufbau beschrieben in Kapitel 2.4.6.1 (Seite 39); $V = 10$ mL TMA-Puffer pH 7,5; $T = 30$ °C; $c(\text{sMMO}) = 5$ µM; $c(\text{NADH}) = 1$ mM; $c(\text{Ethylen})$ in Lösung = 1 mM; Analyse mittels MS (VarioOne, Kapitel 2.5.7, Seite 46); $n = 1$.

Das Henry-Gesetz (Kapitel 1.1.8.2, Gleichung 1.2, Seite 16) beschreibt den Zusammenhang zwischen gelöster Konzentration und Partialdruck von Gasen und ermöglicht die Berechnung der Ethylenoxidgehalt, die sich nach dem Erreichen des Gleichgewichtszustandes in der Gasphase befindet. Die Henry-Konstante ist temperaturabhängig. Mit Hilfe der van't-Hoff-Gleichung kann die Henry-Konstante bei abweichenden Temperaturen berechnet werden (Gleichung 3.2, [Atkins *et al.*, 2018]). Basierend auf den Daten von Conway *et al.* und der Sammlung von R. Sander wurde eine Henry-Konstante für Ethylenoxid bei der Reaktionstemperatur 30 °C von $H^{\text{cp}} = 4,859 \cdot 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{Pa}^{-1}$ berechnet [Conway *et al.*, 1983; Sander, 2015].

$$H^{\text{cp}}(T) = H_0^{\text{cp}} \cdot e^{\left(\frac{-\Delta_{\text{sol}}H}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)\right)} \quad \text{Gleichung 3.2}$$

$H^{\text{cp}}(T)$: Henry-Konstante als Funktion der Temperatur

H_0^{cp} : Henry-Konstante bei T_0

$\Delta_{\text{sol}}H$: Lösungsenthalpie

R : allgemeine Gaskonstante $8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$

T_0 : Standardtemperatur 298,15 K der in [Sander, 2015] angegebenen Werte

$$H_0^{\text{cp}} = 5,8 \cdot 10^{-2} \frac{\text{mol}}{\text{m}^3 \cdot \text{Pa}} \quad [\text{Sander, 2015}]$$

$$\frac{-\Delta_{\text{sol}}H}{R} = \frac{d \ln H^{\text{cp}}}{d\left(\frac{1}{T}\right)} = 3200 \text{ K} \quad [\text{Conway et al., 1983; Sander, 2015}]$$

Die Henry-Konstante und die Ethylenoxid-Konzentration in der Lösung am Ende der Reaktion wurden in Gleichung 1.2 (Seite 16) eingesetzt, um den Partialdruck und dadurch die Stoffmenge von Ethylenoxid in der Gasphase zu berechnen. Der Anteil an Ethylenoxid, welcher in dem verwendeten Reaktionssystem in der Gasphase zu erwarten ist, beträgt demnach lediglich 1,1 % der Stoffmenge in der flüssigen Phase. Im weiteren Verlauf der vorlie-

genden Arbeit wird deshalb der Anteil an Ethylenoxid in der Gasphase nicht weiter berücksichtigt.

Der Vergleich des Ethylenumsatzes (Reaktion **E1**) mit den vorherigen Ergebnissen zum Umsatz von Benzol (Reaktion **B1**, Abbildung 3.18) und Naphthalin (Reaktion **N1**, Abbildung 3.20) zeigt einen ähnlichen Verlauf der Produktkonzentration. Da für den Umsatz von Ethylen eine höhere Enzymkonzentration eingesetzt wurde, ist die Reaktionsgeschwindigkeit zu Beginn der Reaktion höher. Die Inaktivierung der sMMO ist bereits nach etwa 2,5 Minuten zu beobachten. Die finale Produktkonzentration ist vergleichbar.

Der enzymatische Umsatz aller drei Zielsubstrate konnte zeitaufgelöst mit gereinigter sMMO aus *M. trichosporium* OB3b gezeigt werden. Unabhängig vom Substrat werden etwa 40 – 50 μM Produkt gebildet, bevor die Reaktion zum Erliegen kommt. Die Ergebnisse der Untersuchungen, welche in Kapitel 3.2.1 beschrieben sind, lassen die Schlussfolgerung zu, dass diese Limitierung auf eine Akkumulation von inhibitorischem Wasserstoffperoxid zurückzuführen ist.

3.4 Kinetische Untersuchung der sMMO mit Ethylen, Benzol und Naphthalin

Die in Kapitel 3.3 entwickelten Versuchsdurchführungen erlauben, die Produktkonzentrationen während der Enzymkatalyse zeitaufgelöst zu verfolgen. Basierend darauf wurden in diesem Kapitel die kinetischen Parameter des Enzyms in Bezug auf die Substrate Ethylen, Benzol und Naphthalin bestimmt. Das detaillierte Verständnis der kinetischen Eigenschaften des Enzyms ermöglicht in der späteren Anwendung fundierte Maßnahmen zur Optimierung der Reaktionsbedingungen und liefert zudem einen wissenschaftlichen Neuwert, da es zu den untersuchten Substraten bisher keine spezifischen Literaturangaben gibt. Die kinetischen Parameter K_M und $V_{\max}$ wurden aus der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration ermittelt.

Mit Benzol, Naphthalin und Ethylen wurden jeweils Reaktionen mit steigenden Substratkonzentrationen durchgeführt. Aus dem initialen Anstieg der Produktkonzentration wurde die Reaktionsgeschwindigkeit ermittelt. In Abbildung 3.22 sind die Reaktionsgeschwindigkeiten des Umsatzes in Abhängigkeit von der jeweiligen Substratkonzentration als V-S-Diagramme dargestellt. Für die Substrate Naphthalin und Ethylen scheint die Kinetik dem klassischen Verlauf nach Michaelis-Menten zu folgen. Die Kinetiken für Ethylen und Naphthalin wurden mit der Gleichung 3.4 angepasst. Für Benzol zeigt sich ein inhibitorischer Effekt bei steigender Substratkonzentration. Die Anpassung der Kinetik von Benzol erfolgte daher mit der Gleichung 3.3 unter Berücksichtigung der Substratüberschusshemmung. Die nach Regression bestimmten kinetischen Parameter sind in Tabelle 3.5 aufgelistet.

Die K_M -Werte für Ethylen und Naphthalin liegen bei 305 und 380 μM , der K_M -Wert für Benzol liegt bei 74,7 μM . Alle ermittelten K_M -Werte liegen im Bereich zwischen dem für das natürliche Substrat Methan beschriebenen Wert (25 μM [Fox *et al.*, 1990], 66 μM [Tonge *et al.*, 1977]) und dem für das häufig genutzte Modells substrat Nitrobenzol ermittelten K_M -Wert (510 μM [Griethe, 2018], 460 μM [Liu *et al.*, 2005]). Das dem nativen Substrat strukturell am meisten ähnelnde Substrat Ethylen zeigt einen höheren K_M -Wert als Benzol. Bei der Bewertung ist zu beachten, dass für das Substrat Benzol eine Überschusshemmung detektiert wurde. Der ermittelte K_i -Wert beträgt 1645 μM . Auch die maximale Reaktionsgeschwindigkeit

$V_{\max}$ ist für Benzol am geringsten, für Ethylen und Naphthalin ergeben sich vergleichbare $V_{\max}$ -Werte. Trotz struktureller Ähnlichkeit wurde kein inhibierender Effekt für das Substrat Naphthalin beobachtet, ist jedoch nicht auszuschließen. Da aufgrund der geringen Löslichkeit von Naphthalin in Wasser keine höheren Substratkonzentrationen möglich sind, ist der Nachweis einer potenziellen Substratüberschusshemmung bei höheren Substratkonzentrationen unter den angewendeten Messbedingungen nicht möglich. Die Experimente zum Umsatz von Nitrobenzol in Kapitel 3.2 (Tabelle 3.4, Seite 67) zeigten ebenfalls eine Abnahme der spezifischen Aktivität bei einer Erhöhung der Substratkonzentration von 1 mM auf 2 und 5 mM. Möglicherweise liegt dieser Beobachtung ebenfalls eine Substratüberschusshemmung zugrunde.

Der Mechanismus der Enzymhemmung durch Benzol wurde nicht näher untersucht. Ob es sich um einen reversiblen oder irreversiblen Effekt, um eine Destabilisierung des Enzyms oder einen Einfluss auf die Wechselwirkung der sMMO-Komponenten handelt, konnte nicht geklärt werden.

Die Ergebnisse der kinetischen Charakterisierung der sMMO sollten in den folgenden Untersuchungen als Grundlage für eine geeignete Auswahl von Reaktionsbedingungen zur Optimierung der Produktausbeute dienen.

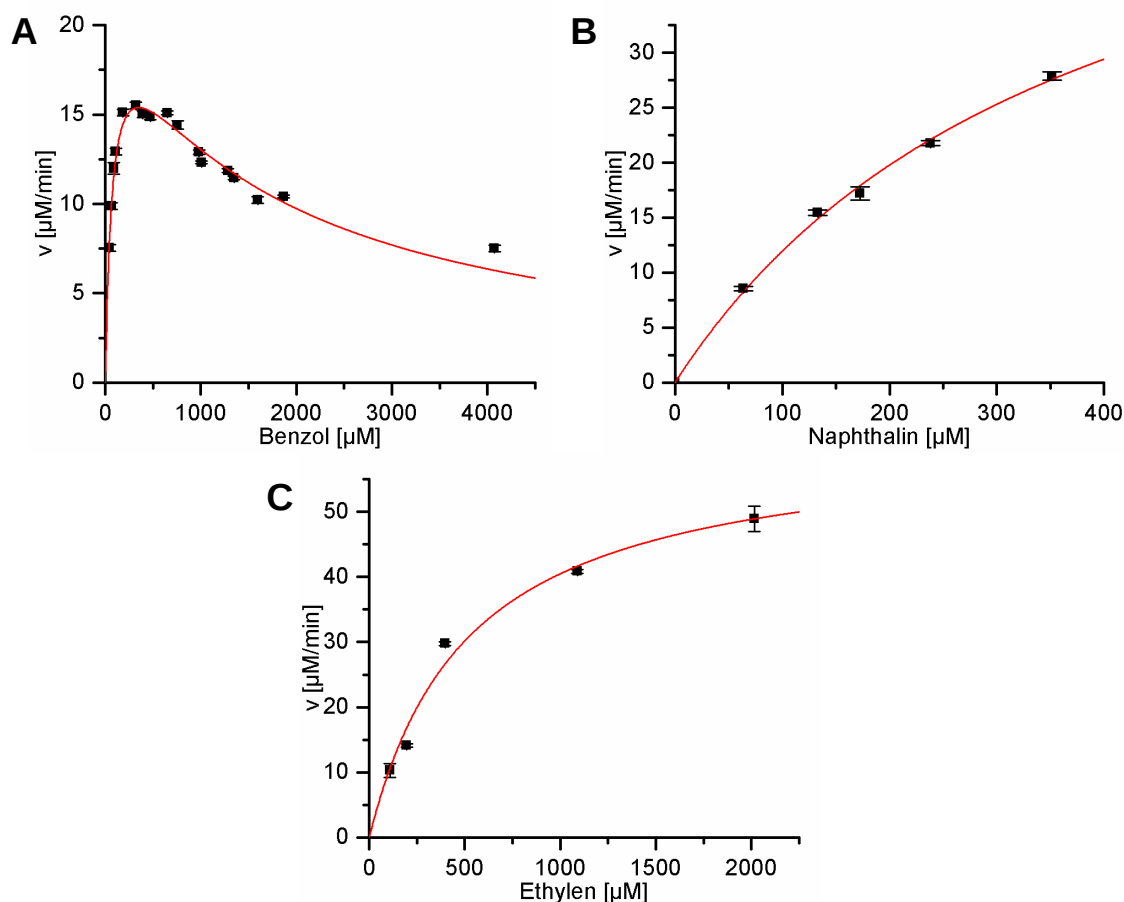


Abbildung 3.22: V-S-Diagramme zur Bestimmung enzymkinetischer Parameter der sMMO, Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Konzentration verschiedener Substrate; A: Umsatz von Benzol mit der sMMO; V = 2,5 mL TMA-Puffer pH 7,5; T = 30 °C; c(sMMO) = 1 µM; c(NADH) = 1 mM; c(Benzol) = 0,05 – 4 mM; Analyse mittels HPLC (Kapitel 2.5.5, Seite 44); n = 2; Regression nach Gleichung 3.3 dargestellt in rot; B: Umsatz von Naphthalin mit der sMMO; V = 2,5 mL TMA-Puffer pH 7,5; T = 30 °C; c(sMMO) = 1 µM; c(NADH) = 1 mM; c(Naphthalin) = 0,05 – 0,34 mM; Analyse mittels HPLC; n = 3; Regression nach Gleichung 3.4 dargestellt in rot; C: Umsatz von Ethylen mit der sMMO; V = 10 mL TMA-Puffer pH 7,5; T = 30 °C; c(sMMO) = 5 µM; c(NADH) = 1 mM; c(Ethylen) = 0,1 – 2 mM; Analyse mittels MS (VarioOne, Kapitel 2.5.7, Seite 46); n = 1; Regression nach Gleichung 3.4 dargestellt in rot.

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad \text{Gleichung 3.4}$$

$$v = \frac{v_{\max}}{1 + \frac{K_M}{[S]} + \frac{[S]}{K_i}} \quad \text{Gleichung 3.3}$$

Tabelle 3.5: Kinetische Parameter der sMMO, Versuchsbedingungen siehe Abbildung 3.22

	Benzol	Naphthalin	Ethylen
K_M [µM]	$74,7 \pm 9,4$	$380 \pm 58,4$	$305 \pm 85,4$
$V_{\max}$ [µM/min]	$21,9 \pm 1,1$	$57,3 \pm 6,5$	$58,7 \pm 5,3$
k_{cat} [s ⁻¹]	$0,365 \pm 0,018$	$0,955 \pm 0,108$	$0,196 \pm 0,018$
K_i [µM]	1645 ± 201	-	-

3.5 Untersuchungen zur Optimierung des enzymatischen Umsatzes von Ethylen, Benzol und Naphthalin

Für biotechnologische Anwendungen sind hohe Zykluszahlen (*total-turnover-number*, TTN) des Katalysators und hohe Produktausbeuten essenziell. Basierend auf den Ergebnissen der kinetischen Charakterisierung (Kapitel 3.4, Seite 73) und der Untersuchung umsatzlimitierender Faktoren (Kapitel 3.2, Seite 58) sollten Reaktionssysteme entwickelt werden, mit denen für das jeweilige Substrat Ethylen, Benzol oder Naphthalin hohe TTN und Produktausbeuten der Enzymkatalyse erreicht werden. Da die Substrate verschiedene physikalische Eigenschaften aufweisen, wurden die Reaktionssysteme zunächst für jedes Zielsubstrat einzeln betrachtet.

3.5.1 Enzymatischer Umsatz von Ethylen

Eine Herausforderung bei der Optimierung des enzymatischen Umsatzes von Ethylen besteht in der Bereitstellung der gasförmigen Substrate Sauerstoff und Ethylen. Wie in Kapitel 3.3.3 (Seite 71) beschrieben, wird die Substratkonzentration in Lösung von der Zusammensetzung der Gasphase über der Lösung bestimmt.

Eine Übersicht der verschiedenen Reaktionen zum Umsatz von Ethylen, deren Reaktionsbedingungen und resultierende Aktivitätswerte und Ausbeuten, ist in Tabelle 3.6 (Seite 81) dargestellt.

3.5.1.1 Umsatz von Ethylen im 10-mL-Maßstab

Zunächst sollte in dem bereits beschriebenen Reaktionssystem von Reaktion **E1** (Kapitel 3.3.3, Seite 71) die Enzymkaskade aus Katalase und Glucosedehydrogenase (siehe Kapitel 3.2, Seite 58) integriert werden. Der detaillierte Versuchsaufbau ist in Kapitel 2.4.6.1 (Seite 39) beschrieben und schematisch in Abbildung 2.1 (Seite 40) dargestellt. Der Gasraum des Reaktionsgefäßes wurde vor dem Start mit 100 % Sauerstoff gespült, bis die Konzentration in Lösung konstant war. Anschließend wurden 5 mL Ethylen zusätzlich durch ein Septum in das geschlossene Reaktionsgefäß gegeben. Die Zusammensetzung der Gasphase wurde nicht analysiert. Die verfügbaren Substratmengen wurden anhand der Gasvolumina berechnet. Unter Berücksichtigung der Henry-Konstanten von Ethylen ($5,223 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{Pa}^{-1}$, [Sander, 2015; Sander, 2011]) und Sauerstoff ($1,092 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{Pa}^{-1}$ [Miyamoto *et al.*, 2014; Peter Warneck, 2012]) lassen sich die Gleichgewichtskonzentrationen der gasförmigen Substrate in der Reaktionslösung berechnen. Mögliche Effekte anderer gelöster Komponenten auf die Löslichkeit der Gase werden in diesem Fall nicht betrachtet. Der Partialdruck von Sauerstoff im Reaktionsgefäß betrug theoretisch 101,3 kPa. Nach der idealen Gasgleichung betrug die verfügbare Menge von Sauerstoff in der Gasphase 559 μmol . Die zu erwartende Sauerstoffkonzentration in wässriger Lösung war 1,12 mM. Die zugegebene Menge an Ethylen betrug 208 μmol . Nach Einstellung des Gleichgewichts sollte der Partialdruck theoretisch 34,5 kPa und die Konzentration in der Lösung 1,8 mM betragen. Um die Diffusion zwischen Gas- und Flüssigphase zu beschleunigen, wurde der Ansatz kontinuierlich gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe der Enzyme gestartet. Es wurden 2 μM sMMO, 5 $\mu\text{g/mL}$ GDH zur Cofaktorregenerierung, sowie 200 $\mu\text{g/mL}$ Katalase zu Disproportionierung von Wasserstoffperoxid eingesetzt. In Abbildung 3.23 ist der Verlauf der Substrat- und Produktkonzentrationen in der Flüssigkeit von Reaktion **E2** dargestellt.

Verglichen mit den zuvor berechneten Konzentrationen von Sauerstoff und Ethylen in Lösung unter Idealbedingungen waren die gemessenen Konzentrationen geringer. Der Einfluss

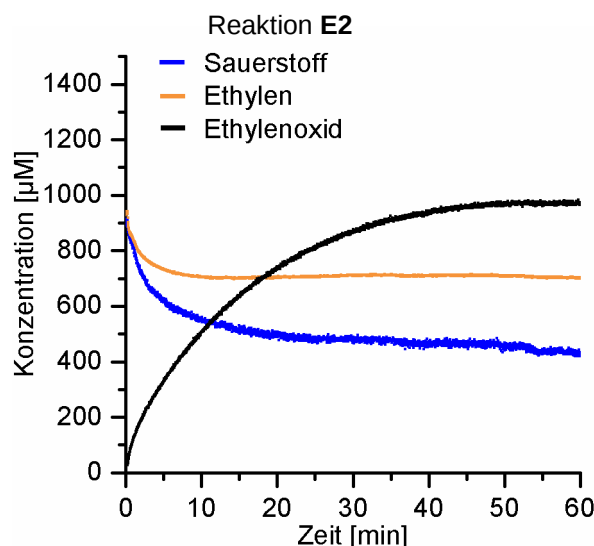


Abbildung 3.23 (Reaktion E2): Umsatz von Ethylen mit der sMMO im 10 mL-Maßstab; Verlauf der Substratkonzentrationen von Ethylen (orange) und Sauerstoff (blau) und der Produktkonzentration Ethylenoxid (schwarz); Versuchsaufbau beschrieben in Kapitel 2.4.6.1 (Seite 39); $V(\text{Flüssigphase}) = 10 \text{ mL}$, $V(\text{Gasphase}) = 13,9 \text{ mL}$, Sättigung der Gasphase mit O_2 , Zugabe von 5 mL Ethylen bei Normaldruck in die Gasphase. TMA-Puffer pH 7,5; $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$; $c(\text{sMMO}) = 2 \text{ } \mu\text{M}$; $c(\text{Cat}) = 200 \text{ } \mu\text{g/mL}$; $c(\text{GDH}) = 5 \text{ } \mu\text{g/mL}$; $c(\text{Glc}) = 50 \text{ mM}$; $c(\text{NADH}) = 1 \text{ mM}$; Analyse mittels MS (VarioOne, Kapitel 2.5.7, Seite 46); $n = 1$.

anderer Substanzen die in dem Reaktionspuffer gelöst waren, wurde bei der theoretischen Berechnung im Vorfeld nicht beachtet. Die Auswertung erfolgte mit den gemessenen Konzentrationswerten. Die Substratkonzentrationen von Sauerstoff und Ethylen nahmen nach dem Reaktionsstart ab. Die Ethylen-Konzentration fiel innerhalb der ersten acht Minuten von 934 μM auf 710 μM und stagnierte im weiteren Reaktionsverlauf. Die Konzentration von Sauerstoff sank innerhalb der ersten fünf Minuten von 910 μM auf 600 μM . Im weiteren Reaktionsverlauf sank die Konzentration leicht bis auf 450 μM nach 60 Minuten.

Die Produktkonzentration von Ethylenoxid stieg nach dem Reaktionsstart an. Aus dem initialen Anstieg wurde eine spezifische Aktivität von 680 mU/mg bestimmt. Im Verlauf der Reaktion nahm die Geschwindigkeit der Produktbildung ab. Nach 55 Minuten war eine maximale Ethylenoxid-Konzentration von 970 μM erreicht. Zu beachten ist, dass die gemessenen Substratkonzentrationen von Ethylen und Sauerstoff nur um 200 μM bzw. 460 μM abnahmen, während deutlich mehr Produkt gebildet wurde. Grund dafür ist, dass die angegebenen Messwerte nur die Konzentrationen in der Reaktionslösung sind und die gasförmigen Substrate aus dem geschlossenen Kopfraum nachdiffundieren. Für das Substrat Ethylen ist gut zu erkennen, dass sich nach zehn Minuten ein Gleichgewicht zwischen Substratverbrauch durch das Enzym und Substratnachschieb durch Diffusion eingestellt hat. Das Ergebnis zeigt, dass durch die Implementierung der Cofaktorregenerierung und der enzymatischen Eliminierung des inhibitorischen Wasserstoffperoxids bis zu 1 mM Ethylenoxid enzymatisch hergestellt werden konnten. Die Produktausbeute an Ethylenoxid bezogen auf die eingesetzte Substratmenge konnte von 0,2 % auf 4,7 % gesteigert werden. Es konnte eine TTN von 485 erreicht werden, was eine deutliche Steigerung im Vergleich zu den Versuchen mit Nitrobenzol ist (Kapitel 3.2, Seite 58). Weitere Parameter sind in Tabelle 3.6 (Seite 81) vergleichend aufgelistet.

3.5.1.2 Umsatz von Ethylen im 700-mL-Membranreaktor

In dem bisher verwendeten Reaktionsaufbau (Reaktion E1 und E2) fand die Substratversorgung über die Grenzfläche zwischen Gas- und Flüssigphase statt. Dabei wurde ein Gemisch

aus Ethylen und Sauerstoff als Gasphase eingesetzt. Die Bildung solcher explosiven Gasgemische ist ein sicherheitstechnisches Risiko und erfordert spezielle Maßnahmen, die bei der Entwicklung von Produktionsprozessen berücksichtigt werden müssen. Das vorrangige Ziel ist daher immer die Vermeidung von explosionsfähigen Gasgemischen. Im Hinblick auf eine mögliche technologische Anwendung sollte ein System untersucht werden, welches eine Maßstabsvergrößerung des enzymatischen Ethylen-Umsatzes ermöglicht und in dem die Bildung explosionsfähiger Gasgemische vermieden werden kann.

Dazu sollte der enzymatische Umsatz in einem speziellen Membranreaktor (MBR) durchgeführt werden. Der Aufbau des MBR ist in Abbildung 2.2 und Abbildung 2.3 (Seite 41 - 42) schematisch dargestellt. Ein Modul des MBR besteht aus drei Kammern. Die mittlere Kammer ($V = 560$ mL) wurde mit Reaktionspuffer gefüllt, in dieser fand der enzymatische Umsatz statt. Auf beiden Seiten der Kammer befand sich eine Siloxanmembran, die die mittlere Reaktionskammer von den außenliegenden Kammern trennte. Über die außenliegenden Kammern wurde die Versorgung mit den gasförmigen Substraten sichergestellt. Jeweils eine Kammer wurde mit Ethylen und eine mit Sauerstoff gefüllt. Die gasförmigen Substrate diffundierten durch die Siloxanmembran in den Reaktionsraum. Dabei konnte der Druck in der jeweiligen Kammer variiert werden, um die Gleichgewichtskonzentration im Reaktionspuffer anzupassen. Der modulare Aufbau ermöglichte die Zugabe von Ethylen und Sauerstoff über zwei voneinander getrennte Membranen, sodass die Bildung explosiver Gasgemische vermieden wurde. Außerdem könnten mehreren Module kombiniert und so das Reaktionsvolumen bei konstantem Oberfläche-Volumen-Verhältnis vergrößert werden. Bei der Verwendung eines Moduls des MBR betrug das Betriebsvolumen 700 mL.

Zunächst sollte der enzymatische Umsatz von Ethylen im MBR in diesem Volumen unter denselben Bedingungen, wie in Kapitel 3.5.1.1 (Seite 76), untersucht werden. Der Ablauf des Versuchs ist in Kapitel 2.4.6.2 (Seite 40) beschrieben. Zur Analytik der Substrat- und Produktkonzentrationen wurde das Massenspektrometer VarioOne an den MBR angeschlossen. In Abbildung 3.24 sind die Substrat- und Produktkonzentrationen im Reaktionsverlauf dargestellt.

Es ist nur eine geringfügige Zunahme der Konzentration an Ethylenoxid zu erkennen. Nach

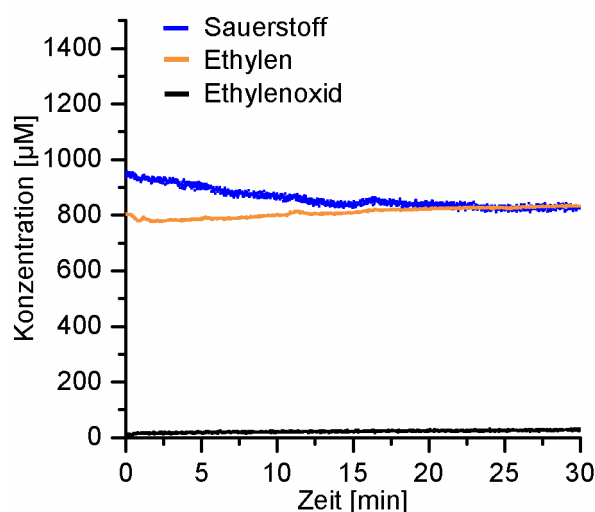


Abbildung 3.24: Umsatz von Ethylen mit der sMMO im Membranreaktor; Verlauf der Substratkonzentrationen von Ethylen (orange) und Sauerstoff (blau) und der Produktkonzentration Ethylenoxid (schwarz); Versuchsaufbau beschrieben in Kapitel 2.4.6.2 (Seite 40); $V = 700$ mL TMA-Puffer pH 7,5; $T = 30$ °C; $c(\text{sMMO}) = 2$ µM*; $c(\text{Cat}) = 200$ µg/mL; $c(\text{GDH}) = 5$ µg/mL; $c(\text{Glc}) = 50$ mM; $c(\text{NADH}) = 1$ mM; $p_{\text{O}_2} = 1$ bar, $p_{\text{C}_2\text{H}_4} = 1$ bar; Analyse mittels MS (VarioOne, Kapitel 2.5.7, Seite 46); $n = 1$.

30 Minuten lag die Konzentration bei 24 μM . Die Sauerstoffkonzentration sank innerhalb von 20 Minuten von 940 μM auf 830 μM und blieb dann nahezu konstant. Die Ethylenkonzentration stieg im Reaktionsverlauf von 800 auf etwa 830 μM . Die geringen Schwankungen der gemessenen Konzentrationen sind auf den Einfluss der Fragmentierung bei der MS-Analyse und die Sensibilität der MS-Analyse gegenüber Druck- und Temperaturschwankungen der Umgebung zurückzuführen. Trotz vergleichbarer Zusammensetzung der Reaktionskomponenten, konnte im MBR zunächst keine enzymatische Produktion von Ethylenoxid nachgewiesen werden.

Die Ursache für dieses Ergebnis ließe sich wie folgt erklären: Im Gegensatz zum Batch-Reaktor aus Glas verfügt der MBR aufgrund seiner Bauweise über große Oberflächen von Membranen und Schläuchen. An diese können die eingesetzten Proteine potenziell adsorbieren. Dadurch könnte die enzymatische Reaktionskaskade inhibiert werden.

Um diese These zu bestätigen, wurde im folgenden Versuch die Adsorption von Proteinen an die exponierten Oberflächen des MBR quantitativ gemessen. Dazu wurde das Reaktionssystem analog zum zuvor beschriebenen enzymatischen Umsatz mit einer Lösung von 1 mg/mL Rinderserumalbumin (BSA) in Reaktionspuffer gefüllt. Nach fünf und 20 Minuten wurden Proben genommen und anschließend mittels Bradford-Assay (Kapitel 2.5.1.1, Seite 43) die Proteinkonzentration in Lösung bestimmt.

Mit zunehmender Inkubationszeit war eine leichte Abnahme der BSA-Konzentration in Lösung im MBR erkennbar. Nach 20 Minuten konnten noch 94 % der Ausgangskonzentration nachgewiesen werden. 0,06 mg/mL des eingesetzten Proteins befanden sich nicht mehr in Lösung sondern wurden vermutlich an adsorptive Membranoberflächen des Reaktionssystems gebunden.

Die Adsorptionseigenschaften verschiedener Proteine können sehr unterschiedlich sein. Eine Korrelation zwischen der Abnahme der BSA-Konzentration und einer möglichen Adsorption der sMMO ist anhand dieser Daten nicht möglich. Das Ergebnis der BSA-Adsorption lässt die qualitative Aussage zu, dass Proteinbestandteile im Reaktionssystem der Lösung entzogen werden können. Möglicherweise adsorbierten einzelne sMMO-Komponenten (MMOH, MMOB oder MMOR) an Membranoberflächen, sodass die sMMO-Aktivität verringert wurde und infolgedessen nicht mehr detektiert werden konnte.

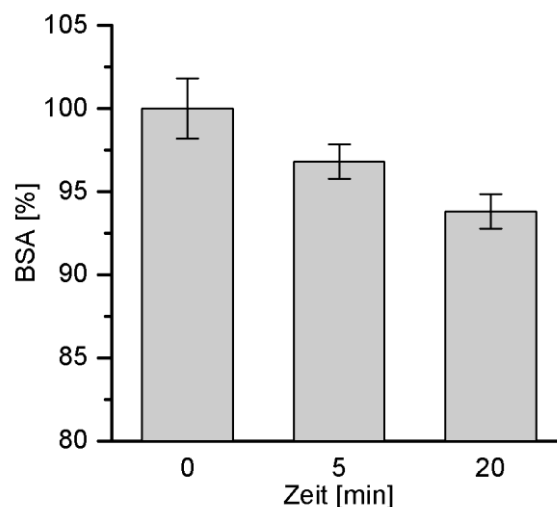


Abbildung 3.25: Adsorption von BSA im Membranreaktor; Inkubation von 1 mg/mL BSA in 700 mL TMA-Puffer pH 7,5 im MBR (Aufbau siehe Abbildung 2.2, Seite 41); Probenahme nach 5 und nach 20 Minuten; Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay (Kapitel 2.5.1.1, Seite 43) mit $n = 3$;

In dem folgenden Experiment wurde ein Überschuss von BSA im Reaktionsansatz verwendet, um vor Enzymzugabe die Protein-adsorbierenden Oberflächen abzusättigen. Der Reaktionsraum des MBR wurde mit Reaktionspuffer gefüllt und eine finale Konzentration von 10 mg/mL BSA zugesetzt. Die Ethylen- und Sauerstoffversorgung erfolgte wieder über die angrenzenden Kammern. Nach einer Inkubationszeit von etwa 20 Minuten wurde die Reaktion (**E3**) durch Zugabe der Enzyme gestartet. In Abbildung 3.26 sind die Substrat- und Produktkonzentrationen des enzymatischen Umsatzes von Ethylen in Gegenwart von BSA dargestellt.

Mit dem Reaktionsbeginn stieg die Ethylenoxidkonzentration deutlich an und eine Abnahme der Substratkonzentrationen von Sauerstoff und Ethylen war zu erkennen. Aus dem initialen Anstieg der Produktkonzentration wurde eine spezifische Aktivität von 488 mU/mg bestimmt. Im Vergleich zum Ethylenumsatz in 10 mL-Maßstab (Reaktion **E2**, Abbildung 3.23, Seite 77) ist die spezifische Aktivität etwas geringer (siehe Tabelle 3.6, Seite 81). Die Geschwindigkeit der Produktbildung nahm im Reaktionsverlauf ab. Die Produktkonzentration näherte sich nach etwa 50 Minuten einem Maximum von 1080 μM an.

Die Substratkonzentrationen erreichten nach zehn Minuten ein Minimum von 800 μM Sauerstoff und 310 μM Ethylen. Danach stiegen die Substratkonzentrationen wieder. Der Verlauf der Substratkonzentrationen lässt sich wie folgt erklären: Zu Beginn der Reaktion wurden Sauerstoff und Ethylen verbraucht. Je größer die Differenz der jeweiligen Konzentration in Lösung zur Gleichgewichtskonzentration war, desto höher war die Diffusionsrate des Gases durch die Siloxanmembran in die Reaktionslösung. Im Reaktionsverlauf nahm die Reaktionsgeschwindigkeit ab. Nach etwa 15 Minuten überstieg die Diffusionsgeschwindigkeit die Geschwindigkeit des Substratverbrauchs. Dadurch stiegen die Konzentrationen von Ethylen und Sauerstoff wieder. Obwohl Sauerstoff und Ethylen vorhanden waren, sank die Reaktionsgeschwindigkeit und die Produktkonzentration näherte sich einem Maximum an.

Durch den Einsatz im MBR konnte die Substratversorgung der sMMO sichergestellt werden, ohne dass ein explosionsfähiges Gemisch aus Sauerstoff und Ethylen gebildet wurde. Das

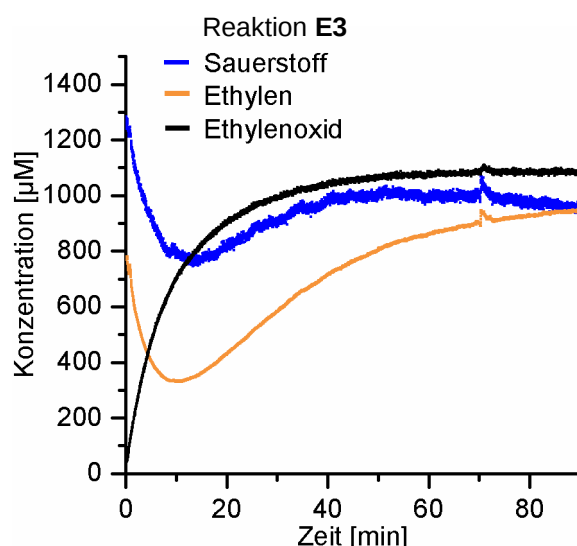


Abbildung 3.26 (Reaktion **E3**): Umsatz von Ethylen mit der sMMO im Membranreaktor nach Zusatz von BSA; Verlauf der Substratkonzentrationen von Ethylen (orange) und Sauerstoff (blau) und der Produktkonzentration Ethylenoxid (schwarz); Versuchsaufbau beschrieben in Kapitel 2.4.6.2 (Seite 40); $V = 700$ mL TMA-Puffer pH 7,5; $T = 30$ °C; $c(\text{sMMO}) = 5$ μM ; $c(\text{Cat}) = 500$ $\mu\text{g/mL}$; $c(\text{GDH}) = 5$ $\mu\text{g/mL}$; $c(\text{Glc}) = 50$ mM; $c(\text{NADH}) = 1$ mM; $c(\text{BSA}) = 10$ mg/mL; $p_{\text{O}_2} = 1,5$ bar, $p_{\text{C}_2\text{H}_4} = 1$ bar; Analyse mittels MS (VarioOne, Kapitel 2.5.7, Seite 46); Darstellung der Progresskurven einer Reaktion. Die Reaktion wurde 2x mit vergleichbarem Verlauf durchgeführt.

Reaktionsvolumen wurde von 10 mL (Reaktion **E1** und **E2**) auf 700 mL (Reaktion **E3**) erhöht und es konnten nach Zusatz von 10 mg/mL BSA vergleichbare Produktkonzentrationen von 1 mM Ethylenoxid erreicht werden (Tabelle 3.6, Seite 81). In weiterführenden Experimenten konnte bestätigt werden, dass 10 mg/mL BSA keinen negativen Einfluss auf die sMMO-Aktivität hat (Anhang 8.8, Seite 155). Da es nicht möglich war, die im MBR eingesetzte Stoffmenge an Ethylen zu ermitteln, wurde für Reaktion **E3** keine Ausbeute berechnet. Im Vergleich zum 10-mL-Batch-Ansatz ermöglicht der MBR eine semi-kontinuierliche Reaktionsführung, indem eine kontinuierliche Substratversorgung über die Membranoberflächen erfolgt. Eine Abtrennung des Produktes wurde in diesem Fall nicht untersucht.

Der MBR stellt ein geeignetes Reaktionssystem zur Selektivoxidation des gasförmigen Substrats Ethylen mit der sMMO dar. Innerhalb von 50 Minuten konnten 33,3 mg Ethylenoxid enzymatisch produziert werden.

Tabelle 3.6: Zusammenfassung der Ergebnisse zum enzymatischen Umsatz von Ethylen, (*) bezogen auf die zu Reaktionsbeginn gelöste Substratmenge

Reaktion	c(sMMO)	n(Ethylen)	c(Ethylen) in Lösung	n(Ethylenoxid)	c(Ethylenoxid) in Lösung	m(Ethylenoxid)	Reaktionsdauer	TTN	Produktausbeute	spez. Aktivität der sMMO
Einheit	μM	μmol	μM	μmol	μM	mg	min		%	mU/mg
E1 (Abbildung 3.21)	5	208	1043	0,38	38	0,02	10	7,6	0,2	54,1
E2 (Abbildung 3.23)	2	208	934	9,7	970	0,43	50	485	4,7	680
E3 (Abbildung 3.26)	2	n.b.	771	756	1080	33,3	60	540	n.b.	488

3.5.2 Enzymatischer Umsatz von Benzol

Das flüssige Substrat Benzol stellt andere Herausforderungen an das Reaktionssystem als das gasförmige Ethylen. Benzol ist nur begrenzt in Wasser löslich ($c = 22,7 \text{ mM}$ bei $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$) und evaporiert aufgrund des hohen Dampfdrucks ($15,5 \text{ kPa}$ bei $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ [Arnold et al., 1958; GESTIS-Stoffdatenbank, 2021a]) leicht aus wässrigen Lösungen. Die kinetischen Untersuchungen zum sMMO-katalysierten Umsatz von Benzol (Kapitel 3.4, Abbildung 3.22A, Seite 75) zeigen eine Substratüberschusshemmung. Der ermittelte K_i -Wert beträgt $1,6 \text{ mM}$. Ziel der folgenden Versuche war die Entwicklung eines Reaktionssystems, welches die limitierenden Faktoren, die sich aus den Eigenschaften des Substrates Benzol ergeben, berücksichtigt und eine Steigerung der Produktausbeute und der TTN ermöglicht. In Tabelle 3.8 (Seite 87) sind die Reaktionsbedingungen und Ergebnisse verschiedener Reaktionen zum enzymatischen Benzolumsatz zusammengefasst.

3.5.2.1 Benzolumsatz im 1-Phasen-System

Ausgehend von den Ergebnissen von Reaktion **B1** (Abbildung 3.18, Seite 69) wurden die in Kapitel 3.2 identifizierten Maßnahmen zur Eliminierung umsatzlimitierender Faktoren angewendet. In einem Volumen von 4 mL wurde der Umsatz von 3 mM Benzol ($12 \text{ } \mu\text{mol}$) mit $5 \text{ } \mu\text{M}$ sMMO in Anwesenheit der Kaskadenenzyme Katalase und GDH untersucht (Reaktion **B2**). Die Konzentrationen der möglichen Hydroxylierungsprodukte (Abbildung 3.17) sollten zeitaufgelöst, diskontinuierlich verfolgt werden. Der Versuchsablauf ist in Kapitel 2.4.4 (Seite 37) beschrieben.

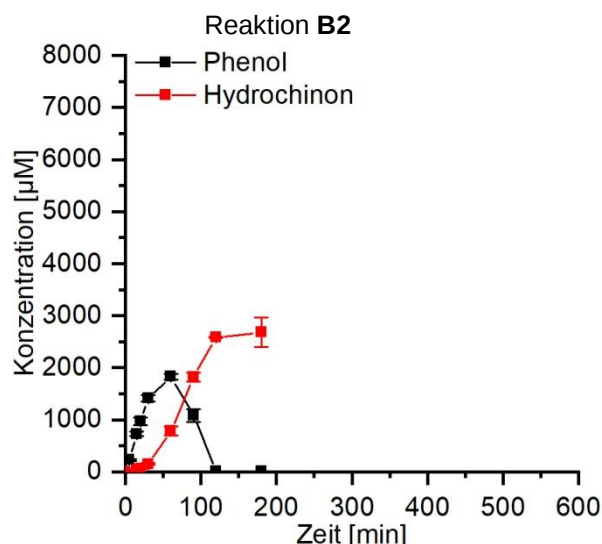


Abbildung 3.27 (**Reaktion B2**): Umsatz von Benzol mit der sMMO; Versuchsaufbau beschrieben in Kapitel 2.4.4 (Seite 37); $V = 4 \text{ mL}$ TMA-Puffer pH 7,5; $T = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $c(\text{sMMO}) = 5 \text{ }\mu\text{M}$; $c(\text{Benzol}) = 3 \text{ mM}$; $c(\text{Cat}) = 500 \text{ }\mu\text{g/mL}$; $c(\text{GDH}) = 5 \text{ }\mu\text{g/mL}$; $c(\text{Glc}) = 50 \text{ mM}$; $c(\text{NADH}) = 1 \text{ mM}$; Analyse mittels HPLC (Kapitel 2.5.5, Seite 44); Mittelwert aus $n = 2$ Reaktionen.

In Abbildung 3.27 ist der Verlauf der Produktkonzentrationen der Reaktion **B2** dargestellt. Aus dem Anfangsanstieg ließ sich eine spezifische Aktivität von 78,6 mU/mg bestimmen. Neben Phenol als primärem Hydroxylierungsprodukt wurde auch Hydrochinon als dihydroxyliertes Produkt nachgewiesen. Hydrochinon ist in diesen Versuchen als einziges sekundäres Oxidationsprodukt dargestellt. Die Isomere Resorcin und Brenzcatechin (Abbildung 3.17, Seite 68) waren lediglich in Spuren nachweisbar. Dreifach-hydroxylierte Produkte konnten nicht nachgewiesen werden.

Zu Beginn der Reaktion **B2** wurde zunächst Phenol (schwarz) gebildet. Die Konzentration stieg innerhalb von 60 Minuten auf 1,8 mM an. Im weiteren Verlauf nahm die Phenolkonzentration ab und Hydrochinon (rot) wurde gebildet. Nach 120 Minuten ist das zuvor gebildete Phenol zu Hydrochinon weiteroxidiert worden. Nur noch geringe Mengen Phenol waren nachweisbar. Die finale Hydrochinon-Konzentration lag bei 2,7 mM (10,8 μmol). Dies entspricht einer Ausbeute von 90 % bezogen auf die eingesetzte Substratmenge an Benzol.

Im Vergleich zum enzymatischen Benzolumsatz ohne Kaskadenenzyme in Reaktion **B1** (Abbildung 3.18, Seite 69) konnte durch den Einsatz der Katalase, die Regeneration von NADH und die Verbesserung der Sauerstoffversorgung die finale Produktkonzentration von 55 μM auf 2,7 mM und die TTN von 55 auf 536 erhöht werden (siehe Tabelle 3.8, Seite 87). Neben Benzol wurde auch Phenol von der sMMO als Substrat genutzt. In weiterführenden Experimenten wurde ein K_M -Wert für Phenol von 1,4 mM bestimmt (Daten nicht gezeigt). In Reaktion **B2** stieg die Phenolkonzentration in den ersten 40 Minuten über den K_M . Dementsprechend sank die Benzolkonzentration, weshalb die Hydroxylierung von Phenol nach etwa 60 Minuten kinetisch bevorzugt wurde. Am Ende der Reaktion lag ausschließlich Hydrochinon als Produkt vor.

Der Fokus des Projektes sollte auf der enzymatischen Produktion von Phenol liegen. Deswegen wurde in einem folgenden Versuch ein anderer Ansatz der Substratversorgung verfolgt. Zu dem Reaktionsvolumen von 4 mL wurden 200 μL Benzol (2240 μmol) gegeben, sodass sich ein zweiphasiges System aus einer organischen Benzol-Phase und dem wässrigen Reaktionspuffer bildete. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass der Reaktionspuffer

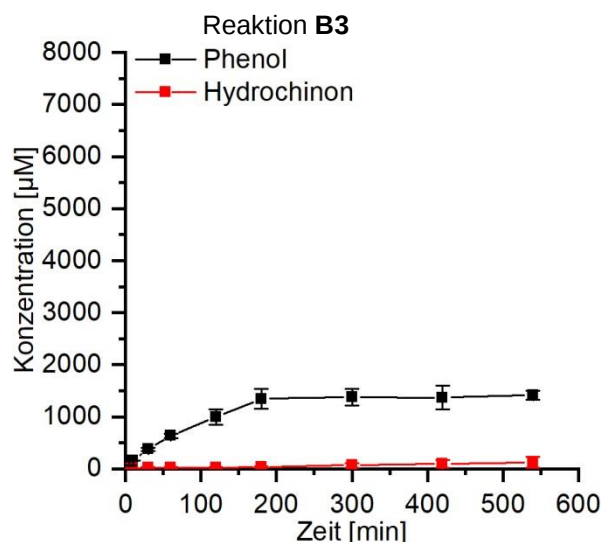


Abbildung 3.28 (Reaktion B3): Umsatz von gesättigter Benzol-Lösung mit der sMMO; Versuchsaufbau beschrieben in Kapitel 2.4.4 (Seite 37); $V = 4$ mL TMA-Puffer pH 7,5; $T = 30$ °C; $c(\text{sMMO}) = 5$ μM ; $c(\text{Cat}) = 500$ $\mu\text{g/mL}$; $c(\text{GDH}) = 5$ $\mu\text{g/mL}$; $c(\text{Glc}) = 50$ mM; $c(\text{NADH}) = 1$ mM; Zugabe von 200 μL Benzol; $c(\text{Benzol}) = 23$ mM (gesättigt); Analyse mittels HPLC (Kapitel 2.5.5, Seite 44); Mittelwert aus $n = 2$ Reaktionen.

mit Benzol gesättigt war. Die Benzol-Konzentration betrug somit 23 mM. Das Ergebnis der Reaktion **B3** mit gesättigter Benzolkonzentration ist in Abbildung 3.28 dargestellt.

Die spezifische Aktivität zu Reaktionsbeginn betrug 19,9 mU/mg und war damit geringer als in Reaktion **B2** (Benzol-Startkonzentration 3 mM, Abbildung 3.27, Seite 82). Dieses Ergebnis korreliert gut mit der Substratüberschusshemmung, die für den Umsatz von Benzol durch die sMMO beobachtet wurde (Kapitel 3.4, Seite 73).

Die Phenolkonzentration stieg innerhalb von 180 Minuten auf 1,5 mM an und stagnierte anschließend. Im gesamten beobachteten Zeitraum stieg die Hydrochinonkonzentration nur auf 200 μM an. Phenol war das Hauptprodukt der Reaktion. Im Gegensatz zu Reaktion **B2** (Abbildung 3.27) stand über den gesamten Reaktionszeitraum des Enzyms Benzol als Substrat zur Verfügung und wurde gegenüber Phenol als Substrat präferiert. Die beschriebenen Reaktionsbedingungen haben demnach einen selektiven Einfluss auf das Produktspektrum.

Für das Ziel einer selektiven Oxidation von Benzol zu Phenol scheint eine geringe Substratmenge aufgrund der Weiteroxidation von Phenol ungeeignet. Eine Erhöhung der Substratkonzentration führt jedoch zu einem inhibierenden Effekt des Benzols und verringert damit die Reaktionsgeschwindigkeit. Eine kontinuierliche Zugabe von Benzol könnte sicherstellen, dass über den gesamten Reaktionszeitraum Benzol als Substrat für die sMMO zur Verfügung steht, und die Inhibition durch hohe Benzolkonzentrationen verringert wird. Eine manuelle Zugabe in regelmäßigen Intervallen erwies sich in dem verwendeten Reaktionssystem als ungeeignet, da sich durch die Evaporation von Benzol und die diskontinuierliche Analytik die Benzolkonzentration nur schwer kontrollieren ließ (Daten nicht gezeigt).

3.5.2.2 Benzolumsatz im 2-Phasen-System

Im Folgenden wurde das in Kapitel 3.5.2.1 beschriebene 2-Phasen-Reaktionssystem zur enzymatischen Phenolproduktion, bestehend aus einer organischen und einer wässrigen Phase, genauer auf seine Anwendbarkeit untersucht. Die organische Phase (P1) sollte als Substratreservoir dienen, und eine konstante Versorgung von Benzol durch Diffusion von der organischen in die wässrige Phase (P2) ermöglichen. In dieser sollte der enzymatische Um-

satz stattfinden. Nach dem *Nernstschen Verteilungsgesetz* ist das Verhältnis der Konzentrationen eines Stoffes (K, Gleichung 3.5) in zwei nicht miteinander mischbaren Phasen konstant.

$$K = \frac{c_{\text{Benzol in P1}}}{c_{\text{Benzol in P2}}} \quad \text{Gleichung 3.5}$$

Die durch das Konzentrationsverhältnis festgelegte Konstante kann experimentell bestimmt werden. Über das Verteilungsgleichgewicht kann anschließend der Benzolanteil in der wässrigen Phase während der enzymatischen Reaktion kontrolliert werden, sodass Benzol immer als präferiertes Substrat zur Verfügung steht und gleichzeitig der inhibierende Effekt eines Substratüberschusses minimiert wird. Die Auswahl der organischen Phase ist dabei essenziell. Obwohl die Lösungsmittel nicht mit Wasser mischbar sind, können sich geringe Mengen in der wässrigen Phase lösen und dadurch die Aktivität der sMMO beeinflussen. Außerdem könnte der Kontakt der Enzyme zum organischen Lösungsmittel an der Grenzfläche der beiden Phasen die Proteine destabilisieren. Basierend auf einer Literaturrecherche wurden zunächst *n*-Hexan, 1-Decanol und *n*-Decan als organische Lösungsmittel ausgewählt und deren Einfluss auf die Aktivität der sMMO untersucht [Antonini *et al.*, 1981; Fernandes und Cabral, 2008; Liu *et al.*, 2021]. In Tabelle 3.7 sind die Werte für die Löslichkeit des jeweiligen organischen Lösungsmittels in Wasser aufgelistet. Sowohl *n*-Hexan als auch 1-Decanol sind in Wasser geringfügig löslich, die Löslichkeit von *n*-Decan ist deutlich geringer. *n*-Hexan ist bereits als Substrat für die sMMO beschrieben, 1-Decanol und *n*-Decan bisher nicht [Green und Dalton, 1989]. Ein K_M -Wert für *n*-Hexan ist nicht bekannt.

Der Einfluss der Lösungsmittel auf die sMMO wurde durch Messung der sMMO-Aktivität in lösungsmittelgesättigtem Puffer überprüft. Dabei wurde der Umsatz des Modells substrats Nitrobenzol photometrisch verfolgt. Aus dem initialen Anstieg der Produktkonzentration wurde die Aktivität der sMMO bestimmt. Der Ablauf des Nitrobenzol-Assays ist in Kapitel 2.4.2 (Seite 36) beschrieben. Die ermittelten Aktivitätswerte sind in Abbildung 3.29 aufgetragen.

In *n*-Hexan- und 1-Decanol-gesättigtem Reaktionspuffer konnten nur geringe Aktivitätswerte für den Nitrobenzolumsatz durch die sMMO detektiert werden. Dies könnte auf einen destabilisierenden Einfluss des Lösungsmittels auf das Enzym zurückzuführen sein. Zudem könnte die sMMO auch *n*-Hexan bzw. 1-Decanol als Substrate akzeptieren und zu Hexanol oder Decandiol umsetzen. Diese möglichen Ursachen wurden nicht weiter untersucht, da die Lösungsmittel *n*-Hexan und 1-Decanol nicht für weitere Versuche eingesetzt wurden. Die sMMO-Aktivität in *n*-Decan-gesättigtem Puffer entspricht etwa der Aktivität ohne organisches Lösungsmittel. Die sehr geringe Löslichkeit von *n*-Decan (0,35 μM , Tabelle 3.7) ist demnach von Vorteil. Das Enzym wird in Anwesenheit von *n*-Decan nicht destabilisiert. Zudem konnten keine Produkte, die auf eine Hydroxylierung von *n*-Decan hinweisen, detektiert werden. Da kein Einfluss von *n*-Decan auf die Aktivität der sMMO zu erkennen war, wurde *n*-Decan im weiteren Verlauf der Experimente als organisches Lösungsmittel für den enzymatischen Umsatz im 2-Phasen-System verwendet.

Das Verteilungsgleichgewicht für Benzol im TMA-Puffer/*n*-Decan-System wurde experimentell bestimmt. Die Konzentration in der organischen Phase wurde mittels GC und die in der wässrigen Phase mittels HPLC gemessen (Kapitel 2.5.5, Seite 44 und Kapitel 2.5.6, Seite 45).

Tabelle 3.7: Löslichkeit verschiedener organischer Lösungsmittel in Wasser

Lösungsmittel	Löslichkeit in Wasser bei 20 °C	Referenz
n-Hexan	151 µM	[PubChem, 2021a]
1-Decanol	253 µM	[PubChem, 2021b]
n-Decan	0,35 µM	[PubChem, 2021c]

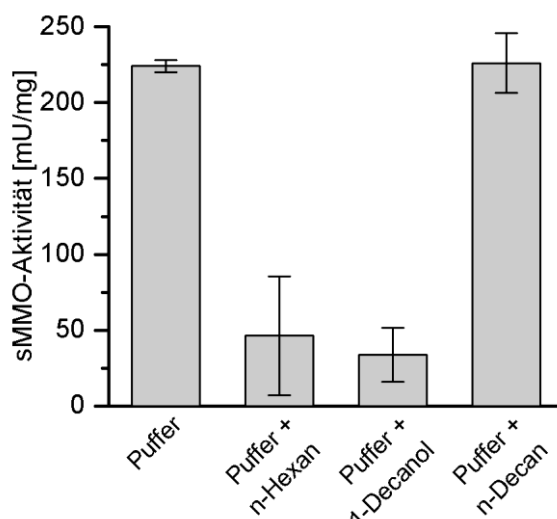


Abbildung 3.29: Spezifische Aktivität der sMMO in Lösungsmittel-gesättigtem Puffer; Nitrobenzol-Assay beschrieben in Kapitel 2.4.2 (Seite 36); $V = 0,5$ mL (mit Lösungsmittel gesättigter) TMA-Puffer pH 7,5; $T = 30$ °C; $c(\text{sMMO}) = 1$ µM; $c(\text{Nitrobenzol}) = 1$ mM; $c(\text{NADH}) = 1$ mM; p-Nitrophenol detektiert bei $\lambda = 420$ nm; spez. Aktivität berechnet aus dem initialen Anstieg der Produktkonzentration, $n = 3$; Herstellung Lösungsmittel gesättigter Puffer: TMA-Puffer wurden mit 1 mL des jeweiligen Lösungsmittels gemischt und bei 30 °C für 15 min bei 600 rpm inkubiert, das benötigte Volumen wurde aus der unteren wässrigen Phase entnommen.

$$K = \frac{c_{\text{Benzol in n-Decan}}}{c_{\text{Benzol in TMA-Puffer}}} = 177$$

Anschließend wurde der enzymatische Umsatz von Benzol in dem 2-Phasen-System aus *n*-Decan und Reaktionspuffer untersucht. Dazu wurden in den Reaktionen **B4** und **B5** verschiedene Anfangskonzentrationen von Benzol in *n*-Decan eingesetzt. 200 µL *n*-Decan mit Benzol (78,8 mM bzw. 362 mM) wurden zu 4 mL des Reaktionsansatzes gegeben. Es wurde ein Volumen von 200 µL organischer Phase ausgewählt, um einen ausreichenden Sauerstofftransfer in die wässrige Phase zu gewährleisten. Ein größeres Volumen *n*-Decan würde die wässrige Phase in diesem Reaktionsaufbau so überschichten, dass der Sauerstofftransfer eingeschränkt ist. Nach Zugabe der organischen Phase zum Reaktionsansatz erfolgte eine 15-minütige Inkubation, damit sich das Konzentrationsgleichgewicht zwischen *n*-Decan und dem Reaktionspuffer einstellt. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe von NADH in die wässrige Phase gestartet.

In Abbildung 3.30 sind die Progresskurven des Benzolumsatzes im 2-Phasen-System mit 78,8 mM (15,8 µmol) in Reaktion **B4** und 362 mM (79 µmol) Benzol in Reaktion **B5** als Startkonzentration in der organischen Phase dargestellt. Die Benzolkonzentration von 78,8 mM als Anfangskonzentration in der organischen Phase wurde ausgewählt, da nach Einstellung des Verteilungsgleichgewichts eine theoretische Konzentration in wässriger Phase von ca. 400 µM vorliegt, bei welcher die Reaktionsgeschwindigkeit der sMMO basierend auf der ki-

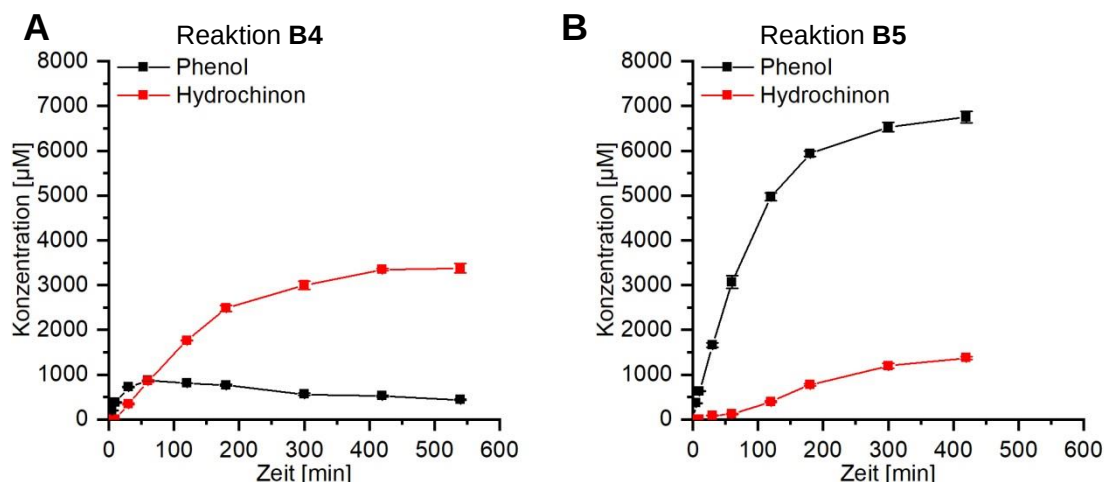


Abbildung 3.30: Umsatz von Benzol mit der sMMO im 2-Phasen-System; Versuchsaufbau beschrieben in Kapitel 2.4.4 (Seite 37); $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$; $V_{\text{aq}} = 4\text{ mL}$ TMA-Puffer pH 7,5; $c(\text{sMMO}) = 5\text{ }\mu\text{M}$; $c(\text{Cat}) = 500\text{ }\mu\text{g/mL}$; $c(\text{GDH}) = 5\text{ }\mu\text{g/mL}$; $c(\text{Glc}) = 50\text{ mM}$; $c(\text{NADH}) = 1\text{ mM}$; Analyse mittels HPLC (Kapitel 2.5.5, Seite 44); $V_{\text{org}} = 0,2\text{ mL}$ n-Decan; **A (Reaktion B4):** $c(\text{Benzol in n-Decan}) = 78,8\text{ mM}$; $n(\text{Benzol}) = 15,8\text{ }\mu\text{mol}$; **B (Reaktion B5):** $c(\text{Benzol in n-Decan}) = 362\text{ mM}$; $n(\text{Benzol}) = 79\text{ }\mu\text{mol}$; Analytik mittels GC (Kapitel 2.5.6, Seite 45); dargestellte Produktkonzentrationen in der wässrigen Phase gemittelt aus $n = 2$ Reaktionen;

netischen Charakterisierung (Kapitel 3.4, Seite 73) maximal ist. Die angegebenen Produktkonzentrationen wurden in der wässrigen Phase gemessen. Die Analyse der organischen Phase am Ende der Reaktion zeigte lediglich Spuren von Phenol. Hydrochinon ließ sich nicht in der organischen Phase nachweisen.

Aus dem initialen Anstieg wurde in Reaktion **B4** eine spezifische Aktivität von $63,8\text{ mU/mg}$ bestimmt. Der Verlauf der Produktkonzentrationen in Reaktion **B4** (Abbildung 3.30A) zeigt, dass zunächst Phenol gebildet wurde. Nach einer Stunde stagnierte die Phenolkonzentration und sank dann im weiteren Reaktionsverlauf auf $440\text{ }\mu\text{M}$ ($1,76\text{ }\mu\text{mol}$) ab. Die Hydrochinonkonzentration begann nach zehn Minuten zu steigen und erreichte am Ende der Reaktion ein Maximum von $3400\text{ }\mu\text{M}$ ($13,6\text{ }\mu\text{mol}$).

In der wässrigen Phase wurde Benzol zu Phenol umgesetzt. Dadurch sank die Benzolkonzentration in der wässrigen Phase und es fand ein Nachschub von Benzol durch Diffusion aus der organischen in die wässrige Phase statt. Die Rate der Diffusion ist abhängig von der Differenz der Benzolkonzentration zur Gleichgewichtskonzentration. In Reaktion **B4** scheint der Verbrauch von Benzol höher gewesen zu sein als die Diffusionsrate, sodass der Benzolnachschub limitierend war und die sMMO auch Phenol zu Hydrochinon umsetzt. Nach neun Stunden betrug die Produktausbeute bezogen auf die eingesetzte Menge an Benzol 98 %. Die Produktverteilung lag bei 89 % Hydrochinon und 11 % Phenol. Die TTN konnte durch den kontinuierlichen Nachschub von Benzol aus der organischen Phase auf 1438 erhöht werden (Tabelle 3.8, Seite 87).

In Reaktion **B5** (Abbildung 3.30B) wurde die eingesetzte Menge an Benzol in der organischen Phase auf 360 mM ($79\text{ }\mu\text{mol}$) erhöht, um auch in der wässrigen Phase einen Überschuss an Benzol zu generieren und damit Phenol als präferiertes Produkt zu erhalten.

Die spezifische Aktivität zu Reaktionsbeginn betrug $101,9\text{ mU/mg}$. Über den gesamten Reaktionsverlauf nahm die Phenolkonzentration zu und erreichte am Ende der Messung $6750\text{ }\mu\text{M}$ ($27\text{ }\mu\text{mol}$). Die Hydrochinonkonzentration begann nach etwa einer Stunde zu steigen und erreichte am Ende der Reaktion $1370\text{ }\mu\text{M}$ ($5,5\text{ }\mu\text{mol}$).

Da deutlich mehr Substrat eingesetzt wurde, ist die prozentuale Produktausbeute mit 45 % im Vergleich zu Reaktion **B4** (Abbildung 3.30A) geringer. Das Produktverhältnis wurde zu

83 % Phenol und 17 % Hydrochinon verschoben und die TTN konnte auf 1899 gesteigert werden. In Reaktion **B5** konnte ein kontinuierlicher Substratnachschieb garantiert werden, sodass über einen Zeitraum von sieben Stunden bevorzugt Benzol zu Phenol umgesetzt wurde.

Durch die in Kapitel 3.2 entwickelten und auf den Umsatz von Benzol angewendeten Reaktionsstrategien konnte der Zeitraum der sMMO-Aktivität von 20 Minuten (Reaktion **B1**, Abbildung 3.20A) auf 180 Minuten (Reaktion **B2**, Abbildung 3.27) erhöht werden. Durch eine Anpassung der Substratzugabe mit Hilfe eines 2-Phasen-Systems konnte die Reaktionszeit auf 420 Minuten erhöht werden (Reaktion **B4** und **B5**, Abbildung 3.30). Die finale Produktkonzentration des Umsatzes von Benzol mit gereinigter sMMO konnte von 55 μM auf 8 mM und die TTN von 55 auf 1899 erhöht werden (Tabelle 3.8.).

Tabelle 3.8: Zusammenfassung der Ergebnisse zum enzymatischen Umsatz von Benzol mit der sMMO; (*) Summe aus n(Hydrochinon) und n(Phenol)

Reaktion	c(sMMO)	n(Benzol)	n(Produkt)*	Reaktionsdauer	TTN	Produkt- ausbeute*	spez. Aktivität der sMMO
Einheit	μM	μmol	μmol	min		%	mU/mg
B1 (Abbildung 3.18)	1	2,5	0,14	20	55	5,5	110,6
B2 (Abbildung 3.27)	5	12,0	10,8	120	536	90	78,6
B3 (Abbildung 3.28)	5	2240	6,12	180	306	0,3	19,9
B4 (Abbildung 3.30A)	5	15,8	15,5	420	1438	98	63,8
B5 (Abbildung 3.30B)	5	79,0	32,5	420	1899	45	101,9

3.5.3 Enzymatischer Umsatz von Naphthalin

Naphthalin ist bei Raumtemperatur fest. Der bityklische, aromatische Kohlenwasserstoff weist mit 242 μM bei 20 °C eine relativ geringe Löslichkeit in Wasser auf ([GESTIS-Stoffdatenbank, 2021c]). Für das Ziel, die enzymatische Produktion von 1- und 2-Naphthol zu optimieren, stellt die Substratversorgung des Enzyms eine große Herausforderung dar. Um eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen, sollte die Substratkonzentration deutlich über dem K_M -Wert liegen. In Kapitel 3.4 (Abbildung 3.22B, Seite 73) wurde ein K_M -Wert für Naphthalin von 380 μM bestimmt. Unter Reaktionsbedingungen ließen sich maximal 340 μM Naphthalin lösen. In Vorversuchen wurde der Einfluss von organischen Lösungsmitteln wie Acetonitril oder DMSO auf die Aktivität der sMMO untersucht, um die Löslichkeit von Naphthalin zu erhöhen (siehe Anhang 8.7, Seite 155). Bereits bei einem Volumenanteil von 0,5 % Acetonitril oder DMSO war die sMMO-Aktivität um etwa 80 % verringert. Der Einsatz dieser Cosolventien war demnach ausgeschlossen. In diesem Kapitel werden verschiedene Strategien der Substratzugabe vorgestellt, um den enzymatischen Umsatz von Naphthalin zu optimieren. Tabelle 3.9 (Seite 90) fasst die Ergebnisse der Reaktionen mit Naphthalin als Substrat der sMMO vergleichend zusammen.

Da sich die Löslichkeit von Naphthalin ohne Zusatz eines Lösungsvermittlers nicht erhöhen ließ, sollte untersucht werden, ob ein Überschuss an Naphthalin als Feststoff eingesetzt werden konnte. Die Konzentration in Lösung ließe sich dadurch nicht erhöhen, jedoch könnte ein konstanter Substratnachschieb durch das Nachlösen gewährleistet werden. Ausgehend

von dem Versuchsaufbau der Reaktion **N1** (Abbildung 3.20, Seite 70) wurde zunächst die Enzymkaskade aus Katalase und GDH zur Eliminierung von H_2O_2 und zur Regeneration von NADH implementiert. In den Reaktionen **N2** und **N3** (Abbildung 3.31) wurden jeweils 5 mg ($39\ \mu\text{mol}$) festes Naphthalin als Substrat in der Reaktion eingesetzt. In Reaktion **N2** (Abbildung 3.31A) wurde Naphthalin direkt als Granulat zugegeben. In Reaktion **N3** (Abbildung 3.31B) wurde das Naphthalin zuvor gemörsert um kleinere Partikel und somit eine größere Oberfläche zu erreichen.

Die Produkte der Reaktion **N2** (Abbildung 3.31A) waren zunächst 1- und 2-Naphthol. Die spezifische Aktivität der sMMO betrug $49,1\ \text{mU/mg}$. Das Produktverhältnis betrug in den ersten 20 Minuten der Reaktionen 60 % 1-Naphthol und 40 % 2-Naphthol. Nach 30 Minuten war die Bildung von dihydroxylierten Naphthalin-Isomeren (DHN) erkennbar. Die Konzentration von 1-Naphthol sank nach 40 Minuten und die von 2-Naphthol blieb im weiteren Reaktionszeitraum konstant. Eine Mischung aus hauptsächlich 1,4- und 2,6-Dihydroxy-naphthalin bildeten nach 240 Minuten die Hauptprodukte der Reaktion.

1-Naphthol und 2-Naphthol wurden von der sMMO als Substrat akzeptiert und weiter hydroxyliert. Am Ende der Reaktion waren noch ungelöste Naphthalin-Partikel in der Reaktion zu erkennen. Insgesamt wurden 12,5 % des eingesetzten Naphthalins umgesetzt. Die Geschwindigkeit, mit der sich das feste Naphthalin nachlöste, war möglicherweise limitierend, sodass 1- und 2-Naphthol als Substrat präferiert wurde.

In Reaktion **N3** (Abbildung 3.31B) wurden ebenfalls zunächst 1- und 2-Naphthol im Verhältnis von 60:40 gebildet. Die spezifische Aktivität betrug $84,8\ \text{mU/mg}$. Bis zum Ende der Reaktion stiegen die Konzentrationen von 1- und 2-Naphthol auf 1570 bzw. $920\ \mu\text{M}$ an. Nach 60 Minuten war die Bildung von Dihydroxynaphthalin zu erkennen. Die finale Konzentration der dihydroxylierten Produkte lag mit $380\ \mu\text{M}$ deutlich niedriger, als in Reaktion **N2** (Abbildung 3.31A).

Da in dieser Reaktion Naphthalin gemörsert eingesetzt wurde, war die Geschwindigkeit des Nachlösens höher und es lag immer Naphthalin als präferiertes Substrat in Lösung vor. Auch bei dieser Reaktion befanden sich am Ende der Messung noch feste Naphthalin-Partikel im Reaktionsansatz. 29,5 % des eingesetzten Naphthalins wurden umgesetzt.

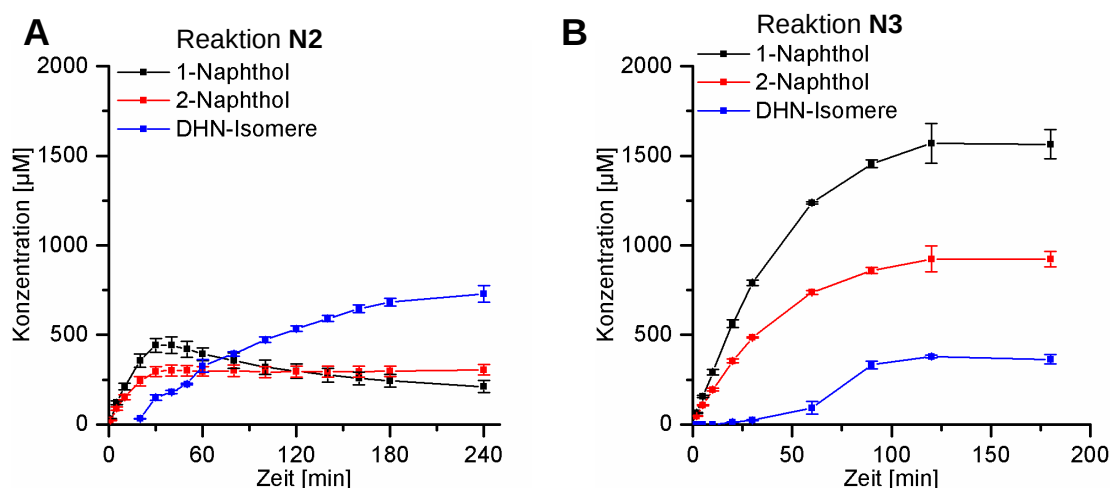


Abbildung 3.31: Umsatz von Naphthalin mit der sMMO; Versuchsaufbau beschrieben in Kapitel 2.4.4 (Seite 37); $T = 30\ ^\circ\text{C}$; $V = 4\ \text{mL}$ TMA-Puffer pH 7,5; $c(\text{sMMO}) = 5\ \mu\text{M}$; $c(\text{Cat}) = 500\ \mu\text{g/mL}$; $c(\text{GDH}) = 5\ \mu\text{g/mL}$; $c(\text{Glc}) = 50\ \text{mM}$; $c(\text{NADH}) = 1\ \text{mM}$; Zugabe von 5 mg ($39\ \mu\text{mol}$) festem Naphthalin als Granulat (A, Reaktion N2) oder gemörsert (B, Reaktion N3); Analyse mittels HPLC (Kapitel 2.5.5, Seite 44); Produktkonzentrationen gemittelt aus $n = 2$ Reaktionen.

Durch die Implementierung der Enzymkaskade aus GDH und Katalase und die Anpassung des Reaktionsaufbaus konnte die finale Produktkonzentration des enzymatischen Umsatzes von Naphthalin von 54 μM auf 2880 μM erhöht werden. Die TTN konnte von 54 auf 575 gesteigert werden. Vergleichbar mit den Ergebnissen des Umsatzes von Benzol (Kapitel 3.5.2, Seite 81) bestimmt auch in diesem Fall die Substratverfügbarkeit das Produktspektrum. Sowohl 1- als auch 2-Naphthol wurden von der sMMO hydroxyliert. Neben 1,4- und 2,6-Dihydroxynaphthalin wurden in den Reaktionen **N2** und **N3** geringe Mengen von 1,5-, 1,6- und 1,7-Dihydroxynaphthalin nachgewiesen (vgl. Abbildung 3.19, Seite 69).

3.5.3.1 Umsatz von Naphthalin in 2-Phasen-System

Das zuvor für den Umsatz von Benzol eingesetzte 2-Phasen-System aus *n*-Decan und Reaktionspuffer (Kapitel 3.5.2.2, Seite 83) könnte auch für den Umsatz von Naphthalin Vorteile bieten. In den Reaktionen **N2** und **N3** (Abbildung 3.31, Seite 88) wurde Naphthalin als Feststoff eingesetzt. Die Geschwindigkeit, mit der sich das Naphthalin nachlöst, stellte vermutlich einen limitierenden Faktor der Reaktion dar. Durch die Vergrößerung der zum Lösungsmittel exponierten Partikeloberfläche konnte die Geschwindigkeit erhöht werden. Hydrophobe Partikel in Proteinlösungen können jedoch auch die Stabilität der Enzyme beeinflussen und die Aggregation von Proteinen begünstigen [Amin et al., 2014; Philo und Arakawa, 2009].

Mit einer organischen Phase als Substratreservoir konnte beim Umsatz von Benzol in den Reaktionen **B4** und **B5** (Abbildung 3.30, Seite 86) eine Reaktionsdauer von bis zu 420 Minuten erreicht werden. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob das 2-Phasen-System auch für das Substrat Naphthalin Vorteile bietet und mit einer längeren Reaktionsdauer auch die Produktausbeute steigert. Zunächst wurden das Verteilungsgleichgewicht von Naphthalin in dem System aus 0,2 mL *n*-Decan und 4 mL Reaktionspuffer bestimmt.

$$K = \frac{c(\text{Naphthalin in } n\text{-Decan})}{c(\text{Naphthalin in TMA-Puffer})} = 2860 \quad \text{Gleichung 3.7}$$

Um die maximale Konzentration von Naphthalin in der wässrigen Phase des 2-Phasen-Systems zu erreichen, wurden 923 mM (185 μmol) in der organischen Phase eingesetzt. Der allgemeine Ablauf der Reaktion ist in Kapitel 2.4.4 (Seite 37) beschrieben. In Abbildung 3.32 ist der Verlauf der Produktkonzentrationen in der wässrigen Phase der Reaktion **N4** dargestellt. Die Konzentrationen in der wässrigen Phase wurden mittels HPLC bestimmt. Am Ende der Reaktion wurden Proben der organischen Phase gaschromatographisch analysiert. Ausgewählte Reaktionsparameter, sowie die Ausbeute und die TTN sind in der Übersichtstabelle (Tabelle 3.9, Seite 90) aufgeführt.

Die spezifische Aktivität zu Beginn der Reaktion **N4** betrug 28,4 mU/mg. Über einen Zeitraum von 120 Minuten stiegen die Konzentrationen von 1- und 2-Naphthol in der wässrigen Phase. Nach 60 Minuten Reaktionszeit stiegen auch die Konzentrationen an Dihydroxynaphthalin-Isomeren. Vorrangig wurden 1,4- und 2,6-Dihydroxynaphthalin gebildet. Nach 120 Minuten stagnierten die Produktkonzentrationen. Am Ende der Reaktion wurden in der wässrigen Phase 1051 μM 1-Naphthol und 620 μM 2-Naphthol und in der organischen Phase 622 μM 1-Naphthol und 178 μM 2-Naphthol nachgewiesen. Aus der summierten Stoffmenge ergab sich ein Verhältnis von 63 % 1-Naphthol zu 37 % 2-Naphthol. Dihydroxynaphthalin-Isomere konnten nur in der wässrigen Phase nachgewiesen werden, die Konzentration betrug 473 μM . Insgesamt konnten 8,18 μmol Produkt nachgewiesen werden, was einer Ausbeute von 4,5 % bezogen auf die eingesetzte Naphthalinmenge entsprach. Die TTN betrug

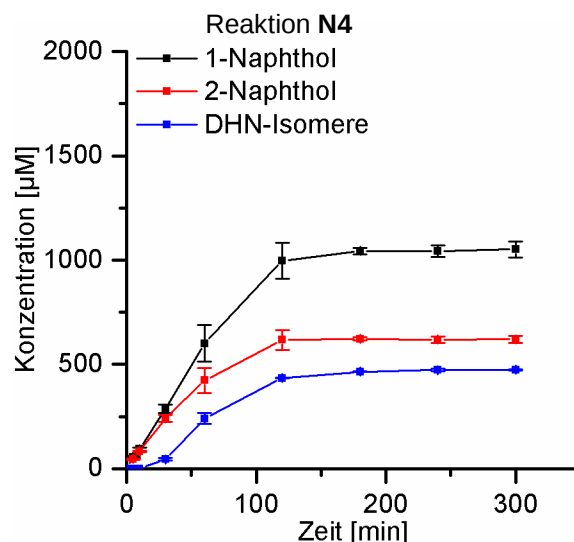


Abbildung 3.32 (Reaktion N4): Umsatz von Naphthalin mit der sMMO im 2-Phasen-System; Versuchsaufbau beschrieben in Kapitel 2.4.4 (Seite 37); $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$; $V_{\text{aq}} = 4\text{ mL}$ TMA-Puffer pH 7,5; $c(\text{sMMO}) = 5\text{ }\mu\text{M}$; $c(\text{Cat}) = 500\text{ }\mu\text{g/mL}$; $c(\text{GDH}) = 5\text{ }\mu\text{g/mL}$; $c(\text{Glc}) = 50\text{ mM}$; $c(\text{NADH}) = 1\text{ mM}$; Analyse mittels HPLC (Kapitel 2.5.5, Seite 44); $V_{\text{org}} = 0,2\text{ mL}$ n-Decan; $c(\text{Naphthalin in n-Decan}) = 923\text{ mM}$; $n(\text{Naphthalin}) = 185\text{ }\mu\text{mol}$; Analytik mittels GC (Kapitel 2.5.6, Seite 45); dargestellte Produktkonzentrationen in der wässrigen Phase gemittelt aus $n = 2$ Reaktionen.

420. Im Vergleich dazu wurden in der Reaktion N3 mit 5 mg festem Naphthalin (Abbildung 3.31B, Seite 88) eine TTN von 575 erreicht und 11,5 μmol Produkt gebildet, was einer Ausbeute von 29,5 % entsprach.

Weder die Reaktionszeit, noch die Ausbeute oder die TTN konnten durch die Substratversorgung aus der organischen Phase und damit einer Vermeidung fester Naphthalin-Partikel in der Reaktionslösung verbessert werden. Für den Umsatz des Zielsubstrats Naphthalin ist der Reaktionsaufbau, in dem ein Überschuss an gemörserterem Naphthalin zugegeben wurde, am besten geeignet. Dennoch konnte gezeigt werden, dass auch Naphthalin als Substrat über eine organische Phase dem Reaktionssystem zugeführt werden kann und ein kontinuierlicher Nachschub des Substrates in die wässrige Phase ermöglicht wird. Dieses Ergebnis bietet eine Grundlage für die nachfolgenden Untersuchungen zum Umsatz von Substratgemischen durch die sMMO.

Tabelle 3.9: Zusammenfassung der Ergebnisse zum enzymatischen Umsatz von Naphthalin; (*) Summe aus $n(1\text{-Naphthol})$, $n(2\text{-Naphthol})$ und $n(\text{DHN})$

Reaktion	$c(\text{sMMO})$	$n(\text{Naphthalin})$	$n(\text{Produkt})^*$	Reaktionsdauer	TTN	Produkt- ausbeute*	spez. Aktivität der sMMO
Einheit	μM	μmol	μmol	min		%	mU/mg
N1 (Abbildung 3.20)	1	0,75	0,14	20	54	18,0	128,4
N2 (Abbildung 3.31A)	5	39,0	4,9	120	245	12,5	49,1
N3 (Abbildung 3.31B)	5	39,0	11,5	120	575	29,5	84,8
N4 (Abbildung 3.32)	5	185	8,4	120	420	4,5	28,4

3.6 Kombination von Chemo- und Biokatalyse

Das Projekt, in welches die vorliegende Arbeit eingebettet war, basierte auf einem kombinatorischen Ansatz aus Chemo- und Biokatalyse. Mittels chemischer Dehydroaromatisierung sollte Methan als Ausgangsstoff bevorzugt zu den drei intermediären Produkten Ethylen, Benzol und Naphthalin umgesetzt werden. Diese sollten in einem zweiten Schritt biokatalytisch hydroxyliert und damit aufgewertet werden. Der Fokus wurde dabei auf die Produktion von Phenol gelegt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese Biokatalyse-Reaktionen enzymatisch mit gereinigten Enzymkomponenten durchzuführen (siehe Kapitel 1.2, Seite 18). Die Untersuchungen der Chemokatalyse wurden vom Projektpartner Leibniz Institut für Katalyse in Rostock (LIKAT) durchgeführt. Einen Überblick über die aktuelle Forschung zur Methandehydroaromatisierung bieten K. Sun und Kollegen [Sun et al., 2018]. Neben Ethylen, Benzol und Naphthalin wurden in den Untersuchungen zur Methandehydroaromatisierung auch andere aromatische Verbindungen wie Toluol und Pyren in geringen Mengen synthetisiert. Die Zusammensetzung eines Produktgemisches der Methankupplung, welches vom LIKAT bereitgestellt wurde und im Rahmen der vorliegenden Arbeit enzymatisch umgesetzt werden sollte, ist in Tabelle 3.10 dargestellt.

Tabelle 3.10: Zusammensetzung des Gemisches kondensierter Produkte der chemischen Methandehydroaromatisierung (Daten von Stefan Peters, Leibniz Institut für Katalyse, Rostock).

Substanz	Masse
Benzol	111.7 mg
Naphthalin	16.9 mg
Toluol	7.7 mg
Anthracen	0.1 mg
Pyren	2.8 mg

Nach der chemischen Reaktion wurden die Produkte bei $< -70\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einer Kühlfalle kondensiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, um einen Verlust von Benzol durch Evaporation zu verhindern. Ethylen wurde bei den Untersuchungen zum Umsatz von Substratgemischen nicht berücksichtigt, da es als gasförmiges Produkt sofort abgetrennt wurde, und nicht im Anschluss an die Methandehydroaromatisierung kondensiert wurde.

3.6.1 Enzymatischer Umsatz von Produktgemischen aus der Methandehydroaromatisierung im 4-mL-Maßstab

Ziel des folgenden Versuches war die enzymatische Hydroxylierung von Substratgemischen. Dabei sollten zunächst artifizielle Gemische der Substanzen mit der entsprechenden stöchiometrischen Zusammensetzung eingesetzt werden. Anschließend sollten Proben aus der Methandehydroaromatisierung als Substrat verwendet werden. Die Resultate der in Kapitel 3.5.2.2 (Seite 83) beschriebenen Ergebnisse zeigten, dass durch die Substratzugabe über eine organische Phase die Reaktionszeit und die finale Produktausbeute der enzymatischen Benzol-Hydroxylierung erhöht werden konnten. Da Benzol mit 80 % (w/w) der Hauptbestandteil in den Substratgemischen aus der Methandehydroaromatisierung ist (Tabelle 3.10), wurde auch in diesem Versuch das in Kapitel 3.5.2.2 vorgestellte 2-Phasen-System zur kontrollierten Substratzugabe verwendet. *n*-Decan als Lösungsmittel ermöglichte außerdem einen verlustfreien Transfer der Substanzgemische aus der Methandehydroaromatisierung in den enzymatischen Reaktionsansatz. Alle kondensierten Zwischenprodukte konnten mit *n*-Decan aus der Kühlfalle der Chemokatalyse gelöst werden. Die Konzentrationen der in *n*-Decan gelösten Stoffe wurden mittels GC (Kapitel 2.5.6, Seite 45) bestimmt. Die Proben wurden auf

die benötigten Konzentrationen verdünnt. Dabei wurden Konzentrationen und Volumina entsprechend der Versuche zum Benzolumsatz (Kapitel 3.5.2) gewählt.

200 μL *n*-Decan mit dem jeweiligen Substratgemisch wurden zu 4 mL wässriger Reaktionslösung gegeben. In dieser wurden 5 μM sMMO inklusive Katalase und GDH eingesetzt. In den Reaktionen **M1** und **M2** wurden zunächst artifizielle Substratgemische eingesetzt. In **M1** bestand das Substratgemisch aus Benzol und Naphthalin, in **M2** aus Benzol, Naphthalin und Toluol. Das Stoffmengenverhältnis der Substrate entsprach jeweils dem der Realproben aus der Methandehydroaromatisierung. In den Reaktionen **M3**, **M4**, **M5** und **M6** wurden dann in *n*-Decan gelöste Produktgemische aus der Methandehydroaromatisierung als Realproben für die enzymatische Hydroxylierung im 2-Phasen-System eingesetzt. Dabei wurden sowohl die Substratmenge, als auch die Enzymmenge variiert. In Tabelle 3.11 sind die Stoffmengen der einzelnen Substrate, die in der jeweiligen Reaktion eingesetzt wurden, aufgelistet. Die Produktkonzentrationen in der wässrigen Phase wurden über den gesamten Reaktionszeitraum diskontinuierlich mittels HPLC gemessen. Nach der Reaktion wurde die Zusammensetzung der organischen Phase mittels GC analysiert. Die Progresskurven der einzelnen Reaktionen sind in Abbildung 3.33 dargestellt. Eine Zusammenfassung der Reaktionsbedingungen und der entsprechenden Ergebnisse ist in Tabelle 3.12 (Seite 96) dargestellt.

Tabelle 3.11: Zusammensetzung der eingesetzten Substratgemische; sMMO in $V_{\text{aq}} = 4 \text{ mL}$ TMA-Puffer pH 7,5; $c(\text{GDH}) = 5 \mu\text{g/mL}$; $c(\text{Glc}) = 50 \text{ mM}$; $c(\text{NADH}) = 1 \text{ mM}$; $V_{\text{org}} = 0,2 \text{ mL}$ *n*-Decan mit der jeweiligen Substratmenge; (**) Realprobengemisch aus der Methandehydroaromatisierung als Substrat eingesetzt

Reaktion	c(sMMO)	n(Benzol)	n(Naphthalin)	n(Toluol)
Einheit	μM	μmol	μmol	μmol
M1 (Abbildung 3.33A)	5	72,4	6,7	0
M2 (Abbildung 3.33B)	5	72,4	6,7	4,2
M3 (Abbildung 3.33C)**	5	72,4	7,4	4,8
M4 (Abbildung 3.33D)**	5	14,5	1,5	1,0
M5 (Abbildung 3.33E)**	2	72,4	7,4	4,8
M6 (Abbildung 3.33F)**	2	14,5	1,5	1,0

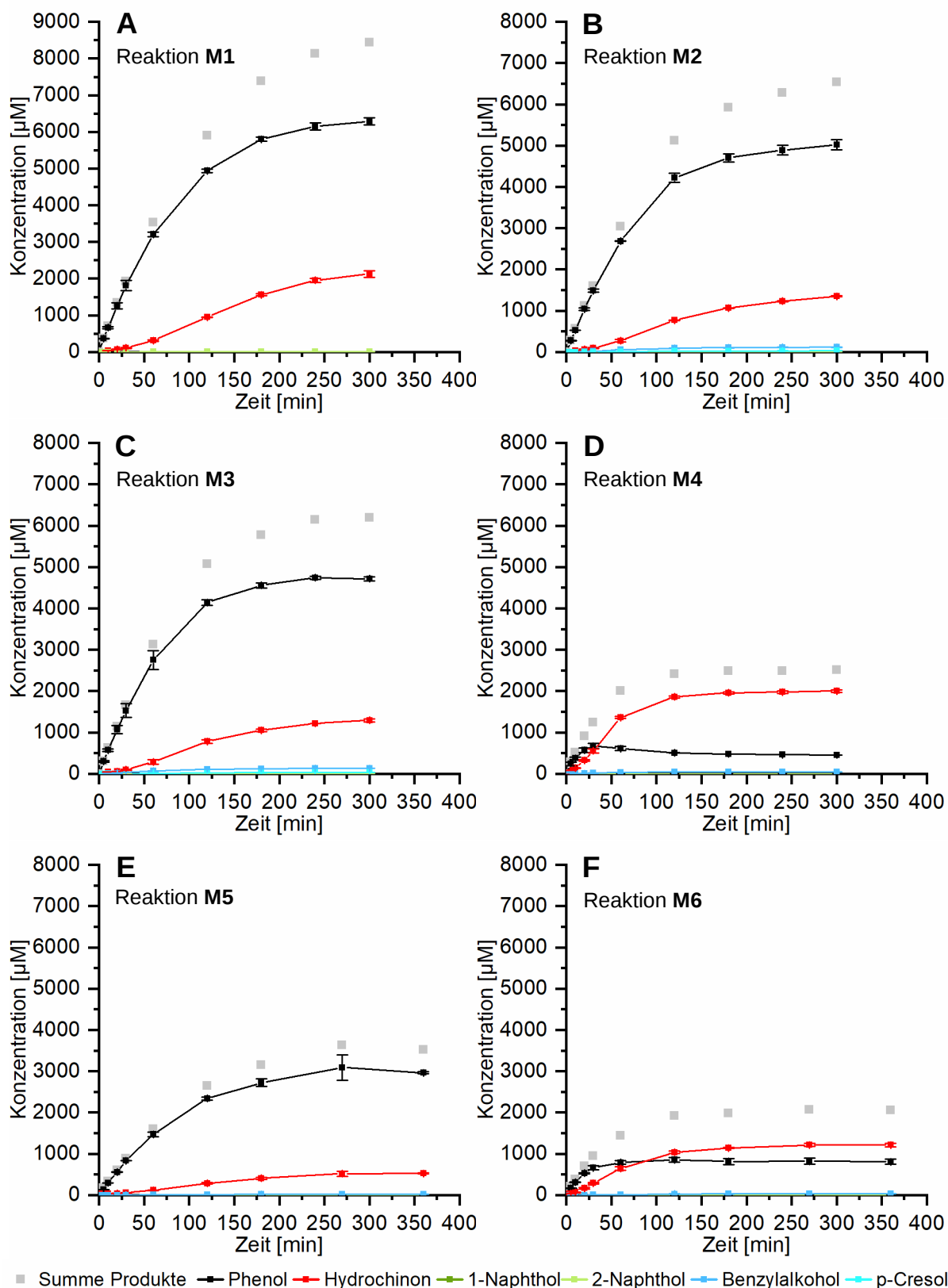


Abbildung 3.33: Umsatz verschiedener Substratgemische mit der sMMO im 2-Phasen-System; allgemeiner Versuchsaufbau beschrieben in Kapitel 2.4.4 (Seite 37); $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$; $V_{\text{aq}} = 4\text{ mL}$ TMA-Puffer pH 7,5; $c(\text{GDH}) = 5\text{ }\mu\text{g/mL}$; $c(\text{Glc}) = 50\text{ mM}$; $c(\text{NADH}) = 1\text{ mM}$; Reaktionen A bis D: $c(\text{sMMO}) = 5\text{ }\mu\text{M}$; $c(\text{Cat}) = 500\text{ }\mu\text{g/mL}$; Reaktionen E und F: $c(\text{sMMO}) = 2\text{ }\mu\text{M}$; $c(\text{Cat}) = 200\text{ }\mu\text{g/mL}$; Analyse mittels HPLC (Kapitel 2.5.5, Seite 44); $V_{\text{org}} = 0,2\text{ mL}$ n-Decan; eingesetzte Substratmengen in n-Decan siehe Tabelle 3.11 (Seite 92); Analytik mittels GC (Kapitel 2.5.6, Seite 45); Produktkonzentrationen in der wässrigen Phase gemittelt aus $n = 2$ Reaktionen.

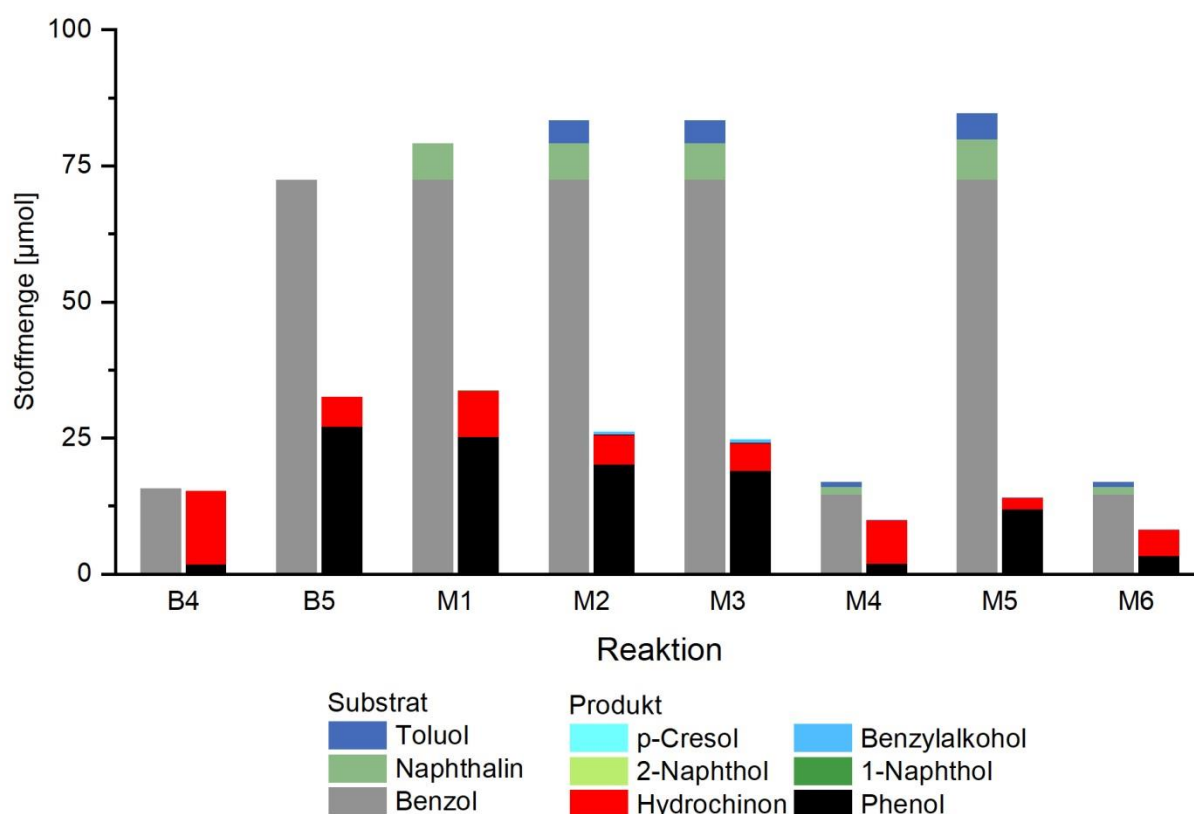


Abbildung 3.34: Umsatz von Substratgemischen in 2-Phasen-System, Summe der eingesetzten Stoffmengen der Substrate und Summe der Stoffmengen der Produkte nach Abbruch der Reaktion; Reaktionsbedingungen siehe jeweilige Abbildung (3.32, 3.35)

Abbildung 3.34 (Seite 94) fasst die Ergebnisse der einzelnen Reaktionen zusammen. Zu jedem Ansatz sind die eingesetzten Stoffmengen der einzelnen Substrate und die finalen Stoffmengen der detektierten Produkte dargestellt. Die Stoffmenge der Substrate wurde aus der GC-Analyse der eingesetzten organischen Phase kalkuliert. Die Stoffmengen der Produkte ergeben sich aus der Summe der am Reaktionsende in der wässrigen und in der organischen Phase detektierten Konzentrationen. Die Reaktionen werden im Folgenden einzeln betrachtet.

In Reaktion **M1** (Abbildung 3.33A) wurde ein artifizielles Gemisch aus 72 μmol Benzol und 6,7 μmol Naphthalin in 200 μL *n*-Decan eingesetzt. Zur Berechnung der spezifischen Aktivität wurde der initiale Anstieg der Summe aller detektierten Produkte ermittelt. Die daraus berechnete spezifische Aktivität betrug 113,4 mU/mg. Der Verlauf der Produktkonzentrationen ist vergleichbar mit dem Umsatz von Benzol im 2-Phasen-System in Reaktion **B5** (Abbildung 3.30, Seite 86). Nach 300 Minuten wurden 46 % des Benzols zu 25 μmol Phenol und 8,5 μmol Hydrochinon umgesetzt. Mit 68 nmol 1-Naphthol und 44 nmol 2-Naphthol wurden lediglich 1,7 % des eingesetzten Naphthalins umgesetzt.

In Reaktion **M2** (Abbildung 3.33B) wurde ein Gemisch aus 72 μmol Benzol, 6,7 μmol Naphthalin und 4,2 μmol Toluol als Substrat zugegeben. Nach 300 Minuten wurden 20 μmol Phenol, 5,4 μmol Hydrochinon, 51 nmol 1-Naphthol, 33 nmol 2-Naphthol, 465 nmol Benzylalkohol und 114 nmol p-Kresol als Produkte nachgewiesen. Demzufolge wurden 35 % des eingesetzten Benzols, 1,3 % des eingesetzten Naphthalins und 14 % des eingesetzten Toluols

umgesetzt. Benzol bleibt auch beim Zusatz mehrerer Substrate das bevorzugte Substrat. Mit Hilfe des Verteilungsgleichgewichts aus Gleichung 3.7 (Seite 89) lässt sich die theoretisch in der wässrigen Phase zu Reaktionsbeginn vorliegende Naphthalinkonzentration berechnen. Die für die sMMO verfügbaren Konzentrationen von Naphthalin in der wässrigen Phase der Reaktionen **M1** und **M2** beträgt lediglich 11,7 μM , sodass die resultierende Reaktionsgeschwindigkeit für den Umsatz von Naphthalin sehr gering ist (siehe Kapitel 3.4, Seite 73). Die eingesetzte Konzentration von Toluol war noch geringer, sodass eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit für den Umsatz von Toluol nicht zu erwarten war. Kinetische Untersuchungen mit Toluol als Substrat wurden nicht durchgeführt. Dennoch kann anhand der eingesetzten Konzentrationen begründet werden, dass der Umsatz von Benzol kinetisch bevorzugt wird und die Hydroxylierungsprodukte Phenol und Hydrochinon die Hauptprodukte der Reaktionen **M1** und **M2** darstellen.

Die Produktausbeute in den Reaktion **M1** und Reaktion **M2** nimmt im Vergleich zur Reaktion **B5** mit Benzol im 2-Phasen-System (Abbildung 3.30, Seite 86) ab, obwohl eine vergleichbare Menge an Benzol eingesetzt wurde. Vermutlich sind die geringen Konzentrationen von Naphthalin und Toluol in der wässrigen Phase ausreichend, um von einem Teil der sMMO-Fraktion mit geringer Geschwindigkeit umgesetzt zu werden. Dieser Teil der sMMO-Fraktion steht dann vorübergehend für den Umsatz von Benzol nicht zur Verfügung, sodass in dem Zeitraum, in dem die sMMO aktiv ist, insgesamt weniger Benzol umgesetzt wird.

Basierend auf diesen Ergebnissen ist für den Umsatz der Realproben zu erwarten, dass auch Phenol und Hydrochinon die Hauptprodukte sind, und dass aufgrund geringer Mengen weiterer Substrate (Anthracen und Pyren) die Ausbeute etwas geringer sein könnte.

In Reaktion **M3** (Abbildung 3.33C, Seite 93) wurde das reale Produktgemisch aus der Methanakupplung (Tabelle 3.10, Seite 91) als Substrat eingesetzt. Zusätzlich zu 72 μmol Benzol, 7,4 μmol Naphthalin und 4,8 μmol Toluol enthielt die Probe geringe Mengen polyzyklischer Aromaten wie Pyren und Anthracen. Diese sind in Wasser nahezu unlöslich (Pyren 0,66 μM bei 20 °C [GESTIS-Stoffdatenbank, 2021d]; Anthracen 0,25 μM bei 25 °C [Haynes, 2014]). Die Konzentration in der organischen Phase war jedoch so gering, dass keine tri- oder tetrazyklischen Aromaten in der wässrigen Phase nachgewiesen werden konnten. In der Auswertung wurden die geringen Mengen polyzyklischer Aromaten deswegen nicht berücksichtigt.

Sowohl die spezifische Aktivität mit 99,9 mU/mg, als auch der Verlauf der Progresskurven ist vergleichbar mit den Ergebnissen der Reaktion **M2** mit artifiziellem Substratgemisch. Nach 300 Minuten Reaktionszeit wurden 19 μmol Phenol, 5,1 μmol Hydrochinon, 48 nmol 1-Naphthol, 32 nmol 2-Naphthol, 528 nmol Benzylalkohol und 129 nmol p-Kresol gebildet. Es wurde keine Produkte der Hydroxylierung von Anthracen oder Pyren detektiert. Wie erwartet, stellen Phenol und Hydrochinon die Hauptprodukte der Reaktion dar. 29,5 % der eingesetzten Substratmenge wurden umgesetzt. Die Ausbeute und damit auch die TTN ist etwas geringer als in Reaktion **M2** (siehe Tabelle 3.11, Seite 92). Das Ergebnis bestätigt die Erwartungen. Zwischen artifiziellem Substratgemisch und Realprobe aus der Methandehydroaromatisierung sind nur geringe Unterschiede zu erkennen.

Um die prozentuale Produktausbeute zu erhöhen, wurde als nächstes die Substratkonzentration in der organischen Phase verringert. In Kapitel 3.5.2.2 (Seite 83) konnte die Produktausbeute des Benzolumsatzes durch eine geringere Substratkonzentration in der organischen Phase auf 98 % gesteigert werden. Dabei wurde die Produktverteilung in Richtung von Hydrochinon verschoben (Reaktion **B4**, Abbildung 3.30A, Seite 86). In Reaktion **M4** in diesem Experiment (Abbildung 3.33D, Seite 93) wurde das Substratgemisch aus der Methandehydroaromatisierung im Vergleich zur Reaktion **M3** um den Faktor 5 auf eine Benzol-

konzentration von 72,4 mM in der organischen Phase verdünnt. Die eingesetzte Benzolkonzentration war damit vergleichbar mit der Reaktion **B4**. Insgesamt wurden 14,5 μmol Benzol, 1,48 μmol Naphthalin und 0,96 μmol Toluol in 200 μL *n*-Decan eingesetzt.

Die spezifische Aktivität zu Reaktionsbeginn betrug 84 mU/mg und war damit etwas geringer, als in Reaktion **M3**, in welcher mehr Benzol eingesetzt wurde. Der Verlauf der Progresskurven ist vergleichbar mit den Ergebnissen von Reaktion **B4** (Abbildung 3.33D, Seite 93). Zunächst wurde hauptsächlich Phenol gebildet. Bereits nach 30 Minuten stieg die Hydrochinonkonzentration und nach ca. 180 Minuten war keine Konzentrationsänderung mehr zu beobachten. Am Ende der Reaktion konnten 1,82 μmol Phenol, 8 μmol Hydrochinon und 191 nmol Benzylalkohol als Produkte nachgewiesen werden, was einer Produktausbeute von 59 % entspricht. Die eingesetzten Konzentrationen von Naphthalin und Toluol waren so gering, dass die möglichen Produkte Naphthol und Kresol nicht quantifiziert werden konnten. Das Ergebnis spiegelt zum Teil die Erwartungen aus den Versuchen zum Benzolumsatz im 2-Phasen-System wieder (Reaktion **B4** und **B5**, Abbildung 3.30, Seite 86). Die prozentuale Ausbeute konnte durch eine Verringerung der Substratkonzentration gesteigert werden während die TTN verringert wurde. Die erhaltene Produktverteilung wurde in Richtung von Hydrochinon verschoben. Im Vergleich zur Reaktion **B4** wurde jedoch kein nahezu vollständiger Umsatz erreicht.

In den Reaktionen **M5** und **M6** (Abbildung 3.33E und F, Seite 93) wurden die Bedingungen aus den Reaktionen **M3** und **M4** übernommen und mit geringerer sMMO Konzentration getestet. Um die Ergebnisse mit den nachfolgenden Versuchen in Kapitel 3.6.2 (Seite 97) vergleichbar zu machen, wurde die sMMO-Konzentration von 5 μM auf 2 μM gesenkt.

In Reaktion **M5** betrug die spezifische Aktivität 119 mU/mg und in Reaktion **M6** 140 mg/mL. Im Vergleich zu den Reaktionen mit 5 μM sMMO war die spezifische Aktivität höher (siehe Tabelle 3.11, Seite 92). Die Progresskurven der Reaktionen mit 2 μM sind vergleichbar mit denen der Reaktionen mit 5 μM sMMO. Die finalen Produktausbeuten sind mit 17 % in Reaktion **M5** und 49 % in Reaktion **M6** etwas geringer.

In allen Reaktionen ist Benzol das präferierte Substrat des eingesetzten Gemisches, da die Verfügbarkeit in der wässrigen Phase am höchsten ist und das Enzym dieses Substrat kinetisch bevorzugt.

Tabelle 3.12: Zusammensetzung und Ergebnisse des enzymatischen Umsatzes von Substratgemischen in $V = 4 \text{ mL}$; (*) Summe aus $n(\text{Phenol})$, $n(\text{Hydrochinon})$, $n(1\text{-Naphthol})$, $n(2\text{-Naphthol})$, $n(\text{Benzylalkohol})$ und $n(p\text{-Cresol})$; (**) Realprobenmisch aus der Methandehydroaromatisierung als Substrat eingesetzt

Reaktion	c(sMMO)	n(Benzol)	n(Naphthalin)	n(Toluol)	n(Produkt)*	Reaktionsdauer	TTN	Produktausbeute*	spez. Aktivität der sMMO
Einheit	μM	μmol	μmol	μmol	μmol	min		%	mU/mg
M1 (Abbildung 3.33A)	5	72,4	6,7	0	33,8	300	2113	42,7	113,4
M2 (Abbildung 3.33B)	5	72,4	6,7	4,2	26,2	300	1578	31,4	90,7
M3 (Abbildung 3.33C)**	5	72,4	7,4	4,8	24,8	300	1497	29,7	99,9
M4 (Abbildung 3.33D)**	5	14,5	1,5	1,0	10,0	180	901	59,2	84,0
M5 (Abbildung 3.33E)**	2	72,4	7,4	4,8	14,1	270	1757	16,6	118,7
M6 (Abbildung 3.33F)**	2	14,5	1,5	1,0	8,2	180	1026	48,5	140,1

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass der Reaktionsaufbau die Kontrolle über die Produktverteilung ermöglicht. Analog zu den artifiziellen Substratgemischen konnten Realproben aus der Methandehydroaromatisierung mit vergleichbaren Ausbeuten enzymatisch umgesetzt werden. *n*-Decan diente dabei als organisches Lösungsmittel in der Reaktion und kontrollierte über das Verteilungsgleichgewicht die Konzentration der verschiedenen Substanzen in der wässrigen Phase. Außerdem ermöglichte *n*-Decan den verlustfreien Transfer der kondensierten Zwischenprodukte aus der chemischen Methandehydroaromatisierung in den enzymatischen Reaktionsansatz.

3.6.2 Enzymatischer Umsatz von Produktgemischen aus der Methandehydroaromatisierung im 350-mL-Maßstab

Im Rahmen des Projektes, in welches die vorliegende Arbeit eingebunden war, wurde der Maßstab der chemischen Methandehydroaromatisierung um den Faktor 10 vergrößert, indem die eingesetzte Katalysatormenge von 0,3 auf 3 g erhöht wurde (Daten von Stefan Peters, Leibniz Institut für Katalyse, Rostock). Für den Umsatz größerer Mengen der Zwischenprodukte aus der chemischen Katalyse sollte auch die enzymatische Folgereaktion auf ein größeres Volumen skaliert werden. Dazu wurden die zuvor verwendeten Reaktionsbedingungen (Kapitel 3.6.1) angepasst und auf ein Volumen von 17,5 mL organischer Phase und 350 mL wässriger Phase übertragen. Das Reaktionsvolumen und somit auch die eingesetzte Stoffmenge wurden um den Faktor 87,5 vergrößert. Die Enzymkonzentration wurde von 5 μ M auf 2 μ M verringert. Außerdem wurde dem Reaktionsansatz 10 mg/mL BSA zugesetzt. Dadurch wurden inaktivierende Adsorptionsprozesse der an der Katalyse beteiligten Enzyme minimiert (siehe Kapitel 8.8, Seite 155). Detaillierte Informationen zum Reaktionsaufbau sind in Kapitel 2.4.5 (Seite 38) beschrieben. Die Substrat- und Produktkonzentrationen in der organischen Phase wurden zu Beginn und am Ende der Reaktion mittels GC analysiert. Die Analyse der wässrigen Phase erfolgte über den gesamten Reaktionsverlauf diskontinuierlich mittels HPLC. Außerdem wurde das Massenspektrometer VarioOne (Variolytics, Stuttgart) verwendet, um kontinuierlich die Konzentrationen von Benzol, Toluol und Phenol in der wässrigen Phase zu verfolgen.

Als Substrate wurden Substanzgemische aus der Methandehydroaromatisierung eingesetzt. Es wurden zwei Reaktionen (**R1** und **R2**, Abbildung 3.35) mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen durchgeführt. Die Konzentrationen sind vergleichbar mit denen in Reaktionen **M5** und **M6** (Abbildung 3.33F und G, Seite 93). Die zusammenfassende Bilanz der Stoffmengen von Substraten und Produkten ist in Abbildung 3.35 (Seite 98) dargestellt. In Tabelle 3.13 (Seite 99) sind die finalen Produktausbeuten, spezifischen Aktivitäten und TTN miteinander verglichen.

In Reaktion **R1** (Abbildung 3.35A, Seite 98) wurde das Produktgemisch aus der Methandehydroaromatisierung mit 362 mM (6335 μ mol) Benzol, 37 mM (645 μ mol) Naphthalin und 24 mM (420 μ mol) Toluol in 17,5 mL *n*-Decan als organische Phase eingesetzt.

Die aus dem initialen Anstieg ermittelte spezifische Aktivität betrug 81 mU/mg. Zu Beginn der Reaktion stieg sowohl die Benzol-, als auch die Phenolkonzentration in der wässrigen Phase an. Anscheinend wurde das Verteilungsgleichgewicht von Benzol zwischen der organischen und der wässrigen Phase noch nicht vollständig erreicht. Die Benzolkonzentration in der wässrigen Phase stieg von 3 mM zu Reaktionsbeginn auf etwa 5 mM nach 110 Minuten an. Danach sank die Benzolkonzentration in der wässrigen Phase kontinuierlich bis auf 2,8 mM nach 360 Minuten. Die Phenolkonzentration stieg im gesamten Reaktionsverlauf nahezu linear an. Der lineare Anstieg der Produktkonzentration lässt eine Limitierung durch die Ver-

fügbarekeit von Sauerstoff in der wässrigen Phase vermuten (Vergleich Kapitel 3.2.3, Seite 61). Nach 300 Minuten war ein leichtes Abflachen der Progresskurve erkennbar. Nach 360 Minuten wurde die Reaktion aus technischen Gründen abgebrochen, obwohl das Ende der enzymatischen Reaktion noch nicht erreicht war. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden 2676 μM (937 μmol) Phenol, 360 μM (126 μmol) Hydrochinon und 50,5 μM (17,7 μmol) Benzylalkohol gebildet. Die Bilanz bezogen auf die eingesetzten Stoffmengen ist in Abbildung 3.36 (Seite 99) dargestellt. Die Produktausbeute nach 360 Minuten betrug 15 % und ist vergleichbar mit dem Ergebnis von Reaktion **M5** im 4-mL-Maßstab (Abbildung 3.33E, Seite 93).

In Reaktion **R2** (Abbildung 3.35B, Seite 98) wurde die Substratlösung um den Faktor 5 auf 72,4 mM Benzol, 7,4 mM Naphthalin und 4,8 mM Toluol verdünnt und als organische Phase eingesetzt. Zu Beginn der Reaktion lag die Benzolkonzentration in der wässrigen Phase bei 600 μM und sank im Reaktionsverlauf auf 190 μM . Die Reaktion wurde nach 240 Minuten aus technischen Gründen abgebrochen, obwohl das Ende der enzymatischen Reaktion noch nicht erreicht war. Die Phenolkonzentration stieg innerhalb der ersten 130 Minuten auf 600 μM an und sank im weiteren Verlauf leicht auf 570 μM (200 μmol) nach 240 Minuten. Die Produktkonzentration von Hydrochinon begann nach 30 Minuten stärker zu steigen und erreichte nach 240 Minuten 940 μM (329 μmol). Die Produktausbeute nach 240 Minuten betrug 37 % und ist damit geringer als in Reaktion **M6** (Abbildung 3.33F, Seite 93). Allerdings wurde die Reaktion abgebrochen, bevor ein Plateau der Produktkonzentrationen erreicht war.

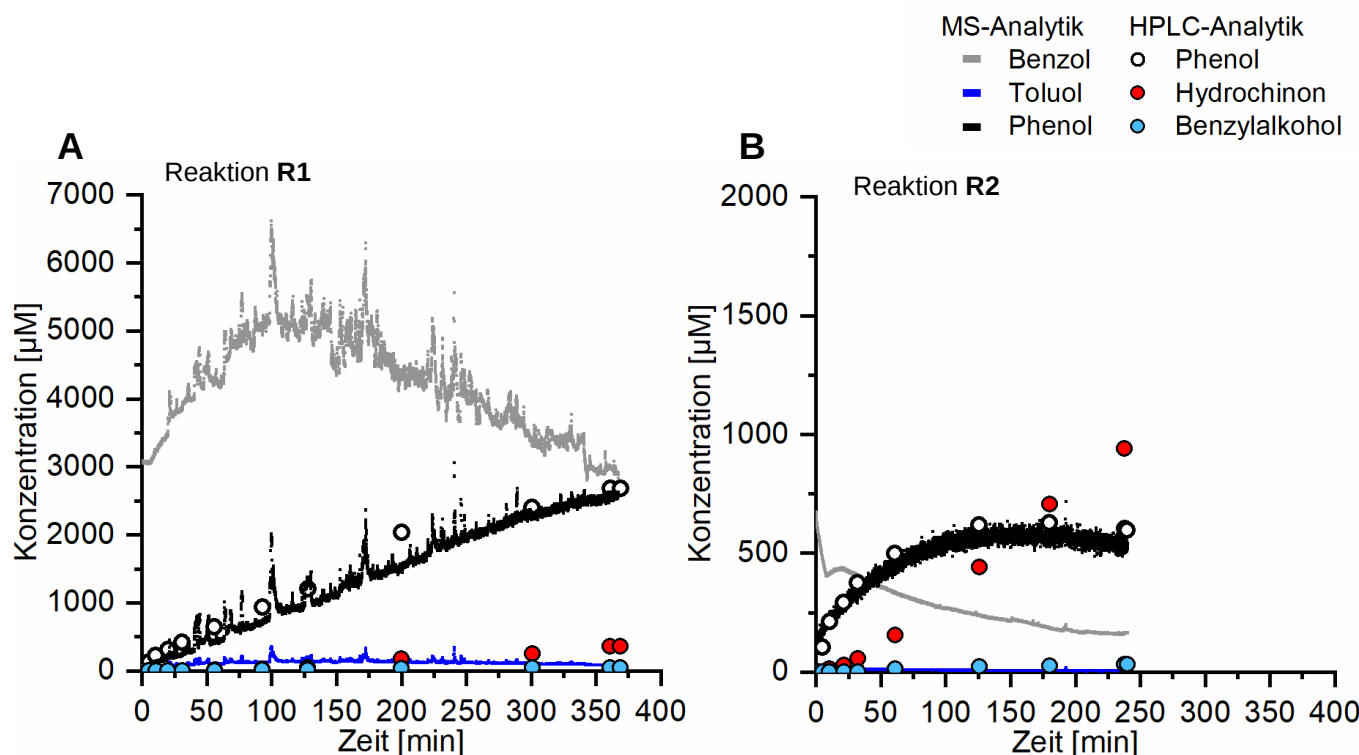


Abbildung 3.35: Umsatz von Realprobengemischen mit der sMMO im 2-Phasen-System im Rührkesselreaktor; Versuchsaufbau beschrieben in 2.4.5 (Seite 38); $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$; $V_{\text{aq}} = 350\text{ mL}$ TMA-Puffer pH 7,5; $c(\text{GDH}) = 5\text{ }\mu\text{g/mL}$; $c(\text{Glc}) = 50\text{ mM}$; $c(\text{NADH}) = 1\text{ mM}$; $c(\text{sMMO}) = 2\text{ }\mu\text{M}$; $c(\text{Cat}) = 200\text{ }\mu\text{g/mL}$; $c(\text{sMMO}) = 2\text{ }\mu\text{M}$; $c(\text{Cat}) = 200\text{ }\mu\text{g/mL}$; kontinuierliche Analyse mittels MS (Kapitel 2.5.7, Seite 46); diskontinuierliche Analyse mittels HPLC durch die zentrale Analytikabteilung des Fraunhofer IGB nach Vorschrift in Kapitel 2.5.5, Seite 44; $V_{\text{org}} = 17,5\text{ mL}$ n-Decan; mit Realprobengemisch aus Methandehydroaromatisierung: **Reaktion R1** (A): 6335 μmol Benzol, 645 μmol Naphthalin, 420 μmol Toluol; **Reaktion R2** (B): 1267 μmol Benzol, 130 μmol Naphthalin, 84 μmol Toluol; Analytik mittels GC durch die zentrale Analytikabteilung des Fraunhofer IGB nach Vorschrift in Kapitel 2.5.6, Seite 45.

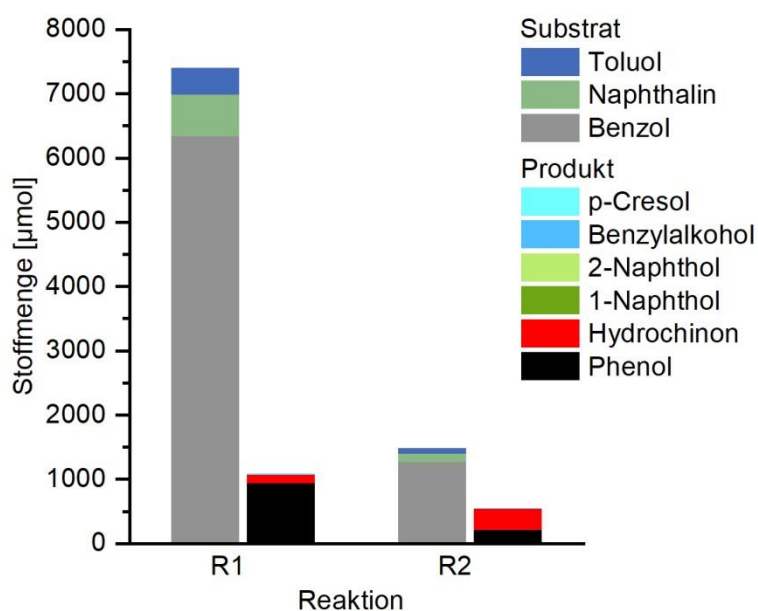


Abbildung 3.36: Umsatz von Substratgemischen in 2-Phasen-System im Rührkesselreaktor; Summe der eingesetzten Stoffmengen der Substrate und Summe der Stoffmengen der Produkte nach Abbruch der Reaktion; Reaktionsbedingungen siehe Tabelle 3.13 und Abbildung 3.36.

Tabelle 3.13: Zusammensetzung und Ergebnisse des enzymatischen Umsatzes von Substratgemischen im Rührkesselreaktor; (*) Summe aus n(Phenol), n(Hydrochinon), n(1-Naphthol), n(2-Naphthol), n(Benzylalkohol) und n(p-Cresol); (**) Realprobengemisch aus der Methandehydroaromatisierung als Substrat eingesetzt

Reaktion	c(sMMO)	n(Benzol)	n(Naphthalin)	n(Toluol)	n(Produkt)*	Reaktionsdauer	TTN	Produkt- ausbeute*	spez. Aktivität der sMMO
Einheit	μM	μmol	μmol	μmol	μmol	min		%	mU/mg
R1 (Abbildung 3.35A)**	2	6335	645	420	1083	360	1728	14,6	81,1
R2 (Abbildung 3.35B)**	2	1267	130	84	549	240	1253	37,1	80,3

Insgesamt entsprechen die Ergebnisse teilweise den Erwartungen aus den Versuchen im 4-mL-Maßstab (Reaktionen **M5** und **M6**, Abbildung 3.33, Seite 93). Benzol ist das präferierte Substrat und mit der Anpassung der eingesetzten Substratmenge ließ sich das Produktverhältnis zwischen Phenol und Hydrochinon ändern. Im Vergleich zu den Reaktionen im 4-mL-Maßstab war das Enzym im DASGIP-Reaktor im 350-mL-Maßstab länger aktiv. Zu den Zeitpunkten, als die Reaktionen **R1** und **R2** abgebrochen wurden, war immer noch eine Änderung der Produktkonzentrationen erkennbar. Dementsprechend war die sMMO noch nicht inaktiviert. Möglicherweise zeigt die sMMO unter sauerstofflimitierenden Bedingungen über einen längeren Zeitraum Aktivität, da weniger toxische Sauerstoffspezies gebildet werden. Diese Vermutung wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht.

Der Maßstab des enzymatischen Umsatzes von Produktgemischen aus der Methandehydroaromatisierung konnte erfolgreich von 4 mL auf 350 mL vergrößert werden. Der Rührkesselreaktor des DASGIP-Systems bietet einen geeigneten Reaktionsraum, wenngleich die Ergebnisse auch Potenzial zur Optimierung darlegen. Möglicherweise lassen sich Prozessparameter wie Rührgeschwindigkeit, Sauerstoffversorgung und Analytik optimieren, um einen

längeren enzymkatalytischen Prozess zu ermöglichen und das Signalrauschen zu vermeiden.

3.7 Optimierung des Biokatalysators

In der Einleitung in Kapitel 1.1.8 wurden verschiedene Strategien vorgestellt, mit denen Bio-transformationsprozesse optimiert werden können. In den vorherigen Kapiteln lag der Fokus auf der Optimierung der Reaktionsparameter und des Reaktionssystems im Hinblick auf eine hohe Produktausbeute und einen hohen maximale Zykluszahl des Enzyms (*total turnover number*, TTN). Neben der Anpassung des Reaktionssystems an die Bedürfnisse des Biokatalysators können auch die Eigenschaften von Biokatalysatoren verändert werden, um die Ziele von Transformationsprozessen zu verfolgen. Mittels unterschiedlicher Mutagenese-Strategien können Enzyme unter anderem bezüglich der Stabilität, verschiedener Aktivitätsparameter oder der Substratspezifität angepasst werden [Bornscheuer *et al.*, 2012]. Auf Basis von Literaturdaten bietet das rationale Design von Enzymen die Möglichkeit, gezielte Veränderungen bestimmter Positionen im Enzym vorzunehmen. In der vorliegenden Arbeit wurde das regulatorische Protein B (MMOB) mittels ortsgerichteter Mutagenese modifiziert. Im Gegensatz zur Hydroxylase (MMOH) lässt sich MMOB rekombinant in *E. coli* produzieren, was die genetische Manipulation der proteincodierenden Sequenzen vereinfacht. Außerdem sind bereits Strukturdaten von MMOB, sowie des MMOB-MMOH-Komplexes bekannt und es wurden erste Mutagenese-Studien mit MMOB durchgeführt, die als Grundlage für ein rationales Design weiterer Varianten dienen (siehe Kapitel 1.1.6.2, Seite 7).

3.7.1 Rationales Design von Varianten des regulatorischen Protein B

Das regulatorische Protein B (MMOB) hat einen entscheidenden Einfluss auf die katalytische Aktivität der sMMO. In Abwesenheit von Protein B sinkt die sMMO-Aktivität auf 10 %. Die Bindung des Protein B an die Hydroxylase erfolgt bevorzugt im reduzierten Zustand (H^{red} , Abbildung 1.4, Seite 10). Dadurch kommt es zu einer strukturellen Änderung, die zum einen den Substratkanal für Elektronen und Protonen schließt, und zum anderen den W308-Tunnel für Sauerstoff das zu hydroxylierende Substrat öffnet [Jones *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2015; Wang und Lippard, 2014]. In vorherigen Studien wurden verschiedene Aminosäuren von MMOB identifiziert, welche an der Bindung zur Hydroxylase und an der Substratorientierung von nicht-natürlichen Substraten beteiligt sind [Brazeau und Lipscomb, 2003; Wallar und Lipscomb, 2001]. Auf Basis bisheriger Literaturerkenntnisse sollten Varianten von MMOB hergestellt werden. Ziel war eine mögliche Steigerung der sMMO-Aktivität und eine Änderung der Substrat- und Produktspezifität der sMMO. In Tabelle 3.14 sind die erstellten Varianten dargestellt. Die Aminosäuren S109 und T111 wurden als relevante Positionen identifiziert. Aus der Literatur ist bekannt, dass größere Seitenketten an diesen Positionen die Affinität der MMOB zur MMOH negativ beeinflussen können [Brazeau und Lipscomb, 2003]. Für einen Austausch wurden demnach kleine polare und unpolare Aminosäuren gewählt. Die Varianten MMOB01 und MMOB05 sind bereits in der Literatur beschrieben und sollten als Vergleich dienen. Die Gene der Varianten wurden von der Firma GeneWiz (Leipzig) synthetisiert und anschließend in den Expressionsvektor pETSUMOadapt kloniert. Dadurch konnten die MMOB-Varianten analog zum bereits beschriebenen Wildtyp-Protein produziert und gereinigt werden (Kapitel 2.3.5, Seite 34 und 2.3.7, Seite 35). Um den Einfluss der Mutationen zu untersuchen, sollte zunächst die sMMO-Aktivität im Vergleich zu Wildtyp-MMOB bestimmt werden. Anschließend sollte die Variante mit der höchsten sMMO-Aktivität genauer

untersucht werden und der Umsatz der Zielsubstrate Benzol und Naphthalin betrachtet werden. Für die Bestimmung der sMMO-Aktivität mit verschiedenen MMOB-Varianten wurde Nitrobenzol als Modellsubstrat verwendet (Kapitel 2.4.2, Seite 36). Aus dem initialen Anstieg der Produktkonzentration wurde die spezifische Aktivität des Enzyms ermittelt. Um zu untersuchen, ob die Affinität von MMOB zur MMOH durch die Mutation beeinflusst wurde, wurden auch Reaktionen durchgeführt in denen das stöchiometrische Verhältnis der sMMO-Komponenten (MMOH:MMOB:MMOR) von 1:1:1 auf 1:2:1 angepasst wurde. Die ermittelten Aktivitätswerte sind in Abbildung 3.37 dargestellt.

In der Reaktion mit Wildtyp-MMOB wurde bei einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1:1 eine spezifische sMMO-Aktivität von 217 mU/mg gemessen. Bei der doppelten Menge an MMOB im Reaktionsansatz stieg die spezifische Aktivität auf 251 mU/mg. Diese Beobachtung konnte die bisherigen Ergebnisse aus der Literatur nicht bestätigen. Sowohl A. Griethe als auch Zhang et al. ermittelten die höchste spezifische Aktivität bei einem stöchiometrischen Verhältnis der sMMO-Komponenten MMOH, MMOB und MMOR von 1:1:1 [Griethe, 2018; Zhang et al., 2006]. Möglicherweise war die eingesetzte MMOB-Konzentration aufgrund von Verunreinigungen geringer, als erwartet, sodass durch eine Erhöhung des MMOB-Anteils erst das optimale Verhältnis erreicht wurde.

Die Varianten MMOB05 bis MMOB08 haben einen Aminosäureaustausch an der Position T111. Die Varianten MMOB05 und MMOB06 zeigten bei einem Verhältnis von MMOH:MMOB:MMOR von 1:1:1 nur noch 30 – 40 % der Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Durch eine Verdopplung der Stoffmenge an MMOB in der Reaktion konnte die Aktivität der Variante MMOB05 auf 84 % im Vergleich zum Wildtyp gesteigert werden. Vermutlich führte der Austausch T111A zu einer Verringerung der Affinität zwischen MMOB und MMOH. Die Variante MMOB06 zeigte auch bei einem stöchiometrischen Verhältnis der Enzymkomponenten von 1:2:1 nur 40 % der Aktivität des Wildtyps. Demnach ist die verringerte Aktivität nicht auf eine gesunkene, Affinität zwischen MMOB und MMOH zurückzuführen, die sich durch eine Konzentrationserhöhung kompensieren ließ.

Die Verkleinerung der Aminosäureseitenkette T111 zu Serin (MMOB07) unter Erhalt der polaren Eigenschaften hat einen geringen positiven Effekt auf die sMMO-Aktivität. Der Austausch von Threonin zu Valin (MMOB08) zeigt keinen eindeutigen Effekt.

In den Varianten MMOB01-MMOB04 wurde basierend auf Erkenntnissen aus der Literatur zusätzlich der Austausch S109A vorgenommen. Die Variante MMOB02 (S109A/T111G) zeigte ähnlich wie die Variante MMOB06 (T111G) eine deutlich geringere Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Ohne Seitenkette an Position 111 scheint die aktivierende Wirkung der MMOB eingeschränkt zu sein. Da sich durch eine Verdopplung der MMOB-Konzentration auch der aktivierende Effekt nicht wieder rekonstruieren lässt, ist eine Verringerung der Affinität der MMOB zur MMOH nicht der ausschlaggebende Grund. Durch einen Austausch des T111 durch eine kleine polare oder unpolare Seitenkette, konnte in Kombination mit dem Austausch S109A die sMMO-Aktivität der Varianten MMOB01, MMOB03 und MMOB04 im Vergleich zum Wildtyp um 10 – 20 % erhöht werden. Mit Serin an der Position 109 zeigte die

Tabelle 3.14: MMOB-Varianten

Variante	Mutation
MMOB01	S109A/T111A
MMOB02	S109A/T111G
MMOB03	S109A/T111S
MMOB04	S109A/T111V
MMOB05	T111A
MMOB06	T111G
MMOB07	T111S
MMOB08	T111V

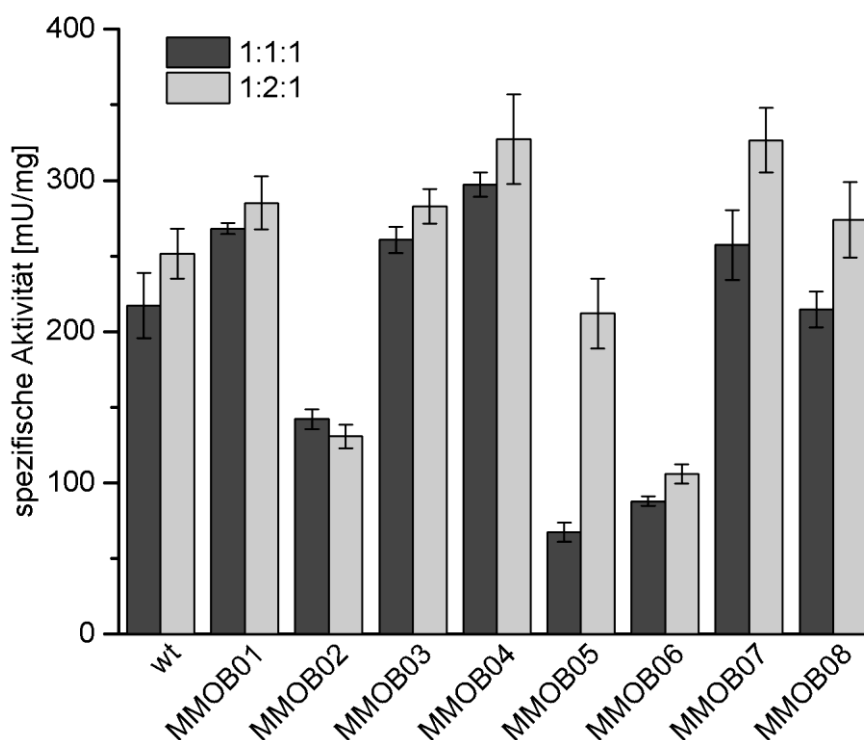


Abbildung 3.37: Spezifische Aktivität der sMMO mit verschiedenen MMOB-Varianten; Nitrobenzol-Assay beschrieben in Kapitel 2.4.2 (Seite 36); $V = 0,5 \text{ mL}$ TMA-Puffer pH 7,5; $T = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$; $c(\text{sMMO}) = 1 \text{ } \mu\text{M}^*$; $c(\text{Nitrobenzol}) = 1 \text{ mM}$; $c(\text{NADH}) = 1 \text{ mM}$; p-Nitrophenol detektiert bei $\lambda = 420 \text{ nm}$; spez. Aktivität berechnet aus dem initialen Anstieg der Produktkonzentration von $n \geq 3$ Reaktionen; (*) bezogen auf eine aktive Einheit;

schwarz: MMOH:MMOB:MMOR = $1 \text{ } \mu\text{M} : 1 \text{ } \mu\text{M} : 1 \text{ } \mu\text{M}$;

grau: MMOH:MMOB:MMOR = $1 \text{ } \mu\text{M} : 2 \text{ } \mu\text{M} : 1 \text{ } \mu\text{M}$

Variante MMOB07 (T111S) die höchste Aktivität. Nach dem Austausch S109A führte die Aminosäure Valin an Position 111 zur höchsten Steigerung der sMMO-Aktivität um 30 %. Die Variante MMOB04 (S109A/T111S) zeigte die höchste Aktivität und wurde anschließend weiter untersucht.

Nachdem die Aktivitätstests mit dem Modellsubstrat Nitrobenzol durchgeführt wurden, sollten die Zielsubstrate Benzol und Naphthalin getestet werden. Der Umsatz wurde über einen Zeitraum von 180 Minuten diskontinuierlich verfolgt. In beiden Reaktionen wurden 1 μM sMMO und die Kaskadenenzyme GDH und Katalase eingesetzt. In der Reaktion **V1** (Abbildung 3.38) betrug die Substratkonzentration 3 mM Benzol. In der Reaktion **V2** (Abbildung 3.39) wurden 5 mg festes Naphthalin als Substrat eingesetzt. Die angegebenen Produktkonzentrationen ergeben sich aus der Summe der detektierten Produkte. Beim Umsatz von Benzol wurden Phenol und Hydrochinon als Produkte identifiziert. Naphthalin wurde zu 1- und 2-Naphthol, 1,4- und 2,6-Dihydroxynaphthalin umgesetzt. Die Produktverteilungen am Ende der jeweiligen Reaktion sind in Abbildung 3.38B und Abbildung 3.39B dargestellt. Aus dem initialen Anstieg der Produktkonzentrationen wurden die in Abbildung 3.38C und Abbildung 3.39C dargestellten Aktivitätswerte der sMMO bestimmt.

Sowohl beim Umsatz von Benzol, als auch von Naphthalin waren die initialen Reaktionsgeschwindigkeiten mit der Variante MMOB04 um 25 – 26 % höher als mit wtMMOB. Die Mutationen S109A/T111V scheinen unabhängig vom Substrat die sMMO-Aktivität zu Beginn der Reaktion zu erhöhen. Damit konnte die Beobachtung aus den Experimenten mit Nitrobenzol als Substrat (Abbildung 3.37) bestätigt werden. Im Verlauf der Reaktion sank jedoch die Enzymaktivität der MMOB04-Variante früher, sodass die Produktkonzentration nach 180 Minuten sowohl beim Benzolumsatz, als auch beim Naphthalinumsatz in der Reaktion mit wtMMOB höher war. Dass die sMMO im Reaktionsverlauf inaktiviert wird, ist bekannt (siehe Kapitel 1.1.6.4, Seite 9) und konnte in den bisherigen Untersuchungen gezeigt werden. Möglicherweise wurden mit der Variante MMOB04 Nebenreaktionen begünstigt, die zu einer Inaktivierung der sMMO beitrugen, sodass die Aktivität im Vergleich zur Reaktion mit wtMMOB

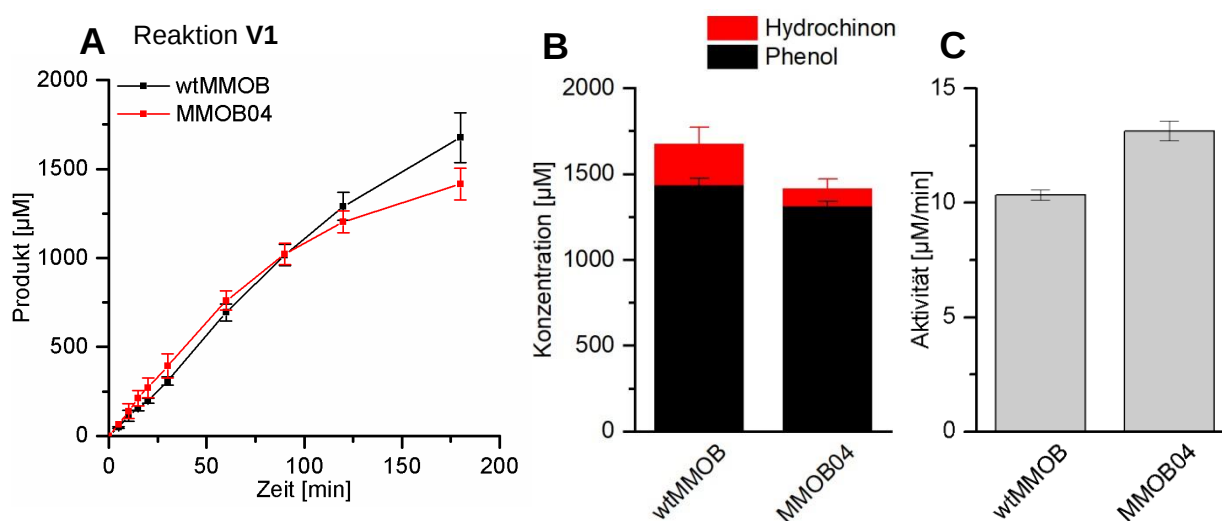


Abbildung 3.38: Umsatz von Benzol mit der sMMO mit Wildtyp MMOB und MMOB04; Versuchsaufbau beschrieben in Kapitel 2.4.4 (Seite 37); $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$; $V = 4\text{ mL}$ TMA-Puffer pH 7,5; $c(\text{sMMO}) = 1\text{ }\mu\text{M}$; $c(\text{Cat}) = 100\text{ }\mu\text{g/mL}$; $c(\text{GDH}) = 5\text{ }\mu\text{g/mL}$; $c(\text{Glc}) = 50\text{ mM}$; $c(\text{NADH}) = 1\text{ mM}$; $c(\text{Benzol}) = 3\text{ mM}$; A: Summe der Produktkonzentrationen im Zeitverlauf gemittelt von $n = 2$ Reaktionen; B: Produktverteilung nach 180 min in Reaktion A; C: sMMO-Aktivität zu Beginn von Reaktion A ermittelt aus linearem Anstieg der Produktkonzentration.

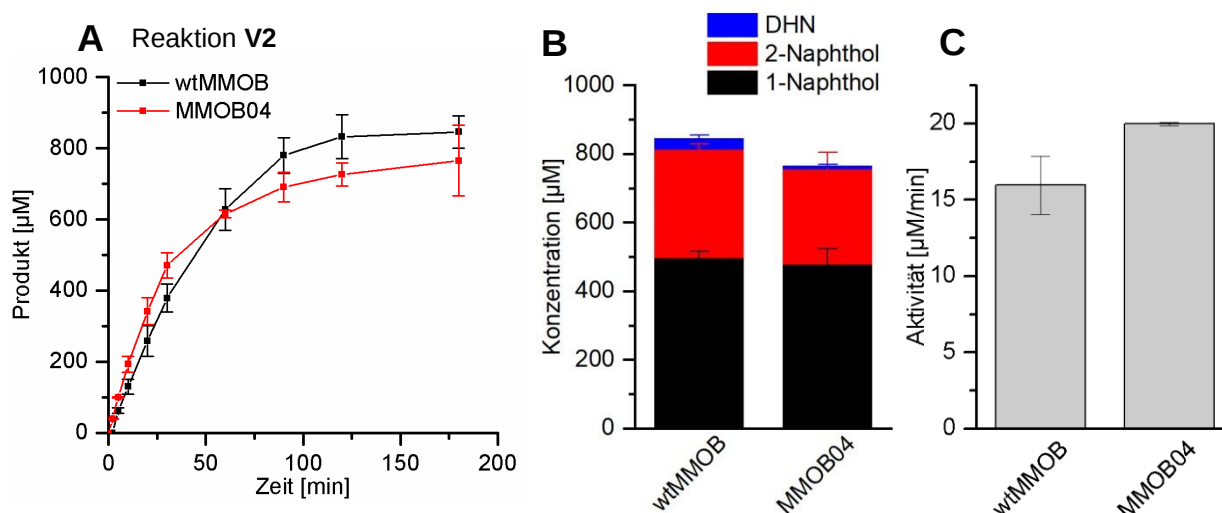


Abbildung 3.39: Umsatz von Naphthalin mit der sMMO mit Wildtyp MMOB und MMOB04; Versuchsaufbau beschrieben in Kapitel 2.4.4 (Seite 37); $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$; $V = 4\text{ mL}$ TMA-Puffer pH 7,5; $c(\text{sMMO}) = 1\text{ }\mu\text{M}$; $c(\text{Cat}) = 100\text{ }\mu\text{g/mL}$; $c(\text{GDH}) = 5\text{ }\mu\text{g/mL}$; $c(\text{Glc}) = 50\text{ mM}$; $c(\text{NADH}) = 1\text{ mM}$; Zugabe von 5 mg festem Naphthalin, $c = 340\text{ }\mu\text{M}$ (gesättigt); **A:** Summe der Produktkonzentrationen im Zeitverlauf gemittelt von $n = 2$ Reaktionen; **B:** Produktverteilung nach 180 min in Reaktion A; **C:** sMMO-Aktivität zu Beginn von Reaktion A ermittelt aus linearem Anstieg der Produktkonzentration.

bereits eher verringert wurde.

In der Produktverteilung konnten Unterschiede zwischen der Reaktion mit MMOB04 und der mit wtMMOB festgestellt werden. Der Anteil an dihydroxylierten Produkten ist in den Reaktionen mit MMOB04 geringer im Vergleich zur Reaktion mit wtMMOB. Beim Benzolumsatz konnte der Hydrochinon-Anteil nach 180 Minuten durch die MMOB04-Variante von 16,7 % auf 7,2 % gesenkt werden. Beim Umsatz von Naphthalin betrug der Anteil an Dihydroxynaphthalin-Isomeren nach 180 Minuten mit wtMMOB 3,9 % und mit MMOB04 1,3 %. Auch der Anteil von 2-Naphthol wurde leicht von 40 % mit wtMMOB auf 37 % mit MMOB04 verringert.

Mit Hilfe von rationalem Enzymdesign wurden relevante Aminosäuren der MMOB identifiziert. Im regulatorischen Protein B wurden die Aminosäuren S109 und T111 zu den kleineren und unpolaren Aminosäuren Alanin und Valin ausgetauscht. Dadurch wurde eine Variante (MMOB04) entwickelt, die eine 25 % höhere sMMO-Aktivität ermöglichte. Beim Umsatz von Benzol und Naphthalin zeigte die Variante außerdem einen um 60 % geringeren Anteil an dihydroxylierten Produkten. Die Produktivität der sMMO mit der Variante MMOB04 war über einen Zeitraum von 180 Minuten jedoch geringer verglichen mit der wtMMOB. Da insbesondere eine langlebige Katalysatorwirkung für die Anwendung wichtig ist, wurde die Variante nicht im größeren Maßstab eingesetzt.

4 Diskussion

4.1 Produktion und Reinigung der sMMO-Komponenten

In der vorliegenden Arbeit wurde die lösliche Methanmonooxygenase (sMMO) als Biokatalysator zur Aufwertung von Produkten aus der Methandehydroaromatisierung eingesetzt. Damit konnte ein kombinatorischer Prozess aus Chemo- und Biokatalyse unter Nutzung von Biogas als Ausgangsstoff demonstriert werden. Erste Versuche zur Skalierung der enzymatischen Reaktion wurden durchgeführt. Für den *in-vitro*-Einsatz der sMMO waren größere Mengen der gereinigten Enzymkomponenten nötig. Deswegen wurden zunächst vorhandene Produktions- und Reinigungsstrategien zur Bereitstellung der Hydroxylase (MMOH), der Reduktase (MMOR) und des Protein B (MMOB) verfolgt und optimiert.

4.1.1 Homologe Produktion und Reinigung der MMOH

Die Hydroxylase (MMOH) trägt das aktive Nicht-Häm-Di-Eisen-Zentrum der sMMO. Bislang wurde in der Literatur noch kein Verfahren zur rekombinanten Gewinnung dieser Enzymkomponente in aktiver Form beschrieben. Aus diesem Grund ist eine homologe Gewinnung aus dem jeweiligen Ursprungstamm notwendig. Zur Kultivierung des Stammes *Methylosinus trichosporium* OB3b kann sowohl Methan, als auch Methanol als Kohlenstoff- und Energiequelle eingesetzt werden [Adegbola, 2008; Fox et al., 1989; Griethe, 2018].

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete MMOH wurde homolog in dem Organismus *M. trichosporium* OB3b produziert und daraus isoliert. Als Kohlenstoff- und Energiequelle wurde Methanol verwendet. Für die Reinigung wurde das von A. Griethe beschriebene Protokoll vereinfacht [Griethe, 2018]. Aus 133,8 g Biomasse konnten 1449 g MMOH gereinigt werden. Da keine Größenausschlusschromatographie durchgeführt wurde, konnten Verluste verringert werden und die Ausbeute im Vergleich zu den Ergebnissen von A. Griethe verdreifacht werden.

Tabelle 4.1: Homologe Produktion der MMOH aus *M. trichosporium* OB3b; Vergleich der Ausbeute an gereinigtem Zielprotein mit Literaturdaten; AEC: Anionenaustauschchromatographie; SEC: Größenausschlusschromatographie

Produktionsstamm	C-Quelle	Ausbeute mg gereinigte MMOH pro g Biofeuchtmasse	Ausbeute mg gereinigte MMOH pro g Gesamtprotein	Reinigungsstrategie	Referenz
<i>M. trichosporium</i> OB3b	Methanol	10,8	164	1. AEC	Vorliegende Arbeit
<i>M. trichosporium</i> OB3b	Methanol	2,73	58,6	1. AEC 2. SEC	[Griethe, 2018]
<i>M. trichosporium</i> OB3b	Methan	4,18	74,9	1. AEC 2. SEC	[Fox et al., 1989]
<i>M. capsulatus</i> Bath	Methan	keine Angabe	163,5	1. AEC 2. AEC 3. SEC	[Pilkington und Dalton, 1990]

Auch die bisher höchsten publizierten Ausbeuten der Reinigung aus *M. trichosporium* OB3b und *M. capsulatus* Bath, welche mit Methan als C-Quelle kultiviert wurden, konnten erreicht bzw. übertroffen werden (Tabelle 4.1).

Mit der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Reinigungsstrategie konnte in mehreren Durchläufen genügend MMOH mit ausreichender Aktivität bereitgestellt werden, um den Maßstab der enzymatischen Reaktion auf bis zu 700 mL zu erhöhen.

4.1.2 Rekombinante Produktion und Reinigung der MMOR

Im Organismus *Methylosinus trichosporium* OB3b liegt die Reduktase nur in geringen Mengen vor und macht etwa 0,1 – 0,3 % des löslichen Proteins im Wildtyp aus [Merkx *et al.*, 2001; Pilkington und Dalton, 1990]. Eine homologe Produktion und Reinigung ist deshalb mit hohem Aufwand und niedriger Ausbeute verbunden. Aus homologer Produktion konnten zwischen 0,05 und 0,1 mg MMOR pro Gramm *M. trichosporium* OB3b Biofeuchtmasse mit einer Aktivität von 127 – 173 U/mg (DCPIP-Assay) gereinigt werden [Fox *et al.*, 1989; Griethe, 2018]. Die Verfügbarkeit der MMOR stellte bisher einen limitierenden Faktor für die Anwendung der sMMO dar. Um die sMMO als Biokatalysator in größerem Maßstab einsetzen zu können, war eine Optimierung der Produktion der MMOR notwendig. Die rekombinante Produktion von MMOR aus *M. trichosporium* OB3b in *E. coli* führte bislang zur Bildung von *inclusions bodies* [Lloyd *et al.*, 1999]. Die MMOR aus *Methylococcus capsulatus* Bath wurde bereits rekombinant in aktiver Form in *E. coli* produziert [Kopp *et al.*, 2001; Lloyd, 1997; West *et al.*, 1992]. Hinweise, dass die MMOR aus *M. capsulatus* Bath auch mit der MMOH und MMOB aus *M. trichosporium* OB3b einen aktiven sMMO-Komplex bildet, lieferten Stirling und Dalton 1979 [Stirling *et al.*, 1979]. In Versuchen, die der vorliegenden Arbeit vorangingen, konnte bestätigt werden, dass die Reduktase aus *M. capsulatus* Bath jene aus *M. trichosporium* OB3b ersetzen und die *in-vitro*-Aktivität der sMMO mit Hydroxylase und MMOB aus *M. trichosporium* OB3b rekonstruieren kann (Daten nicht gezeigt). In der vorliegenden Arbeit wurde die MMOR aus *Methylococcus capsulatus* Bath rekombinant in dem Stamm *Escherichia coli* KRX produziert. Der KRX-Stamm wurde ausgewählt, da er sich im

Tabelle 4.2: Produktion der MMOR aus *M. capsulatus* Bath; Vergleich der Ausbeute an gereinigtem Zielprotein mit Literaturdaten

Produktionsstamm	Kultivierungsstrategie	Ausbeute mg gereinigte MMOR pro L Kulturvolumen	Ausbeute mg gereinigte MMOR pro g Biofeuchtmasse	Referenz
<i>E. coli</i> KRX	Schüttelkolben	40	4,6	Vorliegende Arbeit
<i>E. coli</i> KRX	Fed-batch-Fermentation	360	3,3	Vorliegende Arbeit
<i>E. coli</i> JM105	Schüttelkolben	15	keine Angabe	[Kopp <i>et al.</i> , 2001]
<i>M. trichosporium</i> OB3b	Fed-batch-Fermentation	2,7	0,05	[Griethe, 2018]

Vergleich zum häufig verwendeten *E. coli* BL21(DE3) Expressionsstamm durch eine sichere Unterdrückung der Basaltranskription auszeichnet. Die Expression der chromosomal integrierten T7-RNA-Polymerase ist durch den Rhamnose-induzierbaren rhaBAD-Promotor kontrolliert. Als Expressionsvektor wurde ein pET28-Vektor mit IPTG-induzierbarem T7/lac-Operon verwendet. In Tabelle 4.2 sind die erhaltenen Ausbeuten der MMOR-Präparation im Vergleich zu Literaturwerten zusammengefasst. Durch die Anpassungen in der Produktionsstrategie konnte die Ausbeute an gereinigter MMOR deutlich gesteigert werden. Bezogen auf das Kulturvolumen konnte dadurch die Ausbeute im Vergleich zu Literatur um den Faktor 24 gesteigert werden.

4.1.3 Rekombinante Produktion und Reinigung des MMOB

In den Kapiteln 3.1.6 (Seite 56) und 3.1.7 (Seite 57) wurden die Ergebnisse zur rekombinanten Produktion und zur Reinigung des regulatorischen Protein B (MMOB) vorgestellt. Die rekombinante Produktion des MMOB aus *M. trichosporium* OB3b in *E. coli* wurde erstmals J. Lloyd 1997 beschrieben, welcher ein GST-MMOB-Fusionskonstrukt zur Produktion und anschließenden Reinigung mittels Affinitätschromatographie nutzte [Lloyd, 1997]. In der vorliegenden Arbeit wurde MMOB rekombinant als SUMO-MMOB-Fusionsprotein produziert. Der Induktionszeitpunkt als ein Parameter der Expression kann einen großen Einfluss auf die gebildete Menge an Zielprotein haben [Collins et al., 2013]. Abweichend von dem, im Kontext der Dissertation von A. Griethe entwickelten Protokoll [Griethe, 2018], wurde in der vorliegenden Arbeit die Induktion der Expression des Zielproteins bei einer optischen Dichte von 0,8 anstatt 1 durchgeführt. Die Reinigung des MMOB erfolgte mittels Metallionen-Affinitätschromatographie. Um größere Mengen gereinigtes MMOB bereitzustellen, wurde der Maßstab der Aufarbeitung um den Faktor 3 vergrößert. Chang und Kollegen beschrieben ein Aggregationsverhalten des Zielproteins während der Reinigung bei Konzentrationen von MMOB über 3 mg/mL [Chang et al., 1999]. In der vorliegenden Arbeit wurden deswegen Konzentrationen von über 3 mg/mL vermieden und Proteinlösungen gegebenenfalls mit dem entsprechenden Puffer verdünnt. In Tabelle 4.3 ist die erhaltene Ausbeute im Vergleich zur Literatur dargestellt. Verluste während der Aufarbeitung des Zielproteins konnten dank der detaillierten Beschreibung in der Literatur minimiert werden. Durch die Anpassungen der Produktions- und Reinigungsstrategie konnte die Ausbeute an rekombinantem MMOB in der vorliegenden Arbeit um einen Faktor von 5 – 8 gesteigert.

Tabelle 4.3: Rekombinante Produktion der MMOB aus *M. trichosporium* OB3b in *E. coli* BL21 (DE3); Vergleich der Ausbeute an gereinigtem Zielprotein mit Literaturdaten

Produktionsstamm	Kultivierungsstrategie	Ausbeute mg gereinigte MMOB pro L Kulturvolumen	Ausbeute mg gereinigte MMOB pro g Biofeuchtmasse	Referenz
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Schüttelkolben	34,5	6,0	Vorliegende Arbeit
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Batch-Fermentation	keine Angabe	keine Angabe	[Chang et al., 1999]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Schüttelkolben	4 - 6	keine Angabe	[Lloyd, 1997]
<i>M. trichosporium</i> OB3b	Fed-batch-Fermentation	5,1	0,04	[Griethe, 2018]

4.2 Identifizierung umsatzlimitierender Faktoren und Optimierung der Reaktionsbedingungen der sMMO

Das zentrale Ziel der vorliegenden Arbeit war der biotechnologische Einsatz der sMMO. Für katalytische Produktionsprozesse sind hohe Ausbeuten und Gesamtumsätze (*total turnover number*, TTN) wichtig. Die sMMO zeigt eine rasche Inaktivierung durch Nebenreaktionen und die Akkumulation von H_2O_2 , was zu einer geringeren Produktausbeute führt [Griethe, 2018]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden umsatzlimitierende Faktoren untersucht und Strategien entwickelt, die zu einer Steigerung der Produktausbeute führten. Die Ergebnisse sind in Kapitel 3.2 (Seite 58) dargestellt und ausgewertet.

Zunächst wurde die Integration von Katalase in die Enzymkaskade zur Disproportionierung von Wasserstoffperoxid untersucht. Wie in der Einleitung in Kapitel 1.1.6.4 erläutert, war bekannt, dass H_2O_2 von der sMMO als Nebenprodukt gebildet [Zhang et al., 2006]. Der inhibitorische Effekt von H_2O_2 wurde in vorangegangenen Arbeiten mit der sMMO quantitativ untersucht. Bereits in dieser Studie wurde Einsatz von Katalase in einer Enzymkaskade mit der sMMO gezeigt. Durch den Zusatz von 160 U/mL Katalase konnte die Ausbeute bezogen auf die eingesetzte Substratmenge von 0,62 % auf 1,24 % verdoppelt werden [Griethe, 2018]. Die vorliegende Arbeit fügt dem aktuellen Wissensstand Erkenntnisse über die optimale Katalase-Aktivität in der Enzymkaskade hinzu. 100 $\mu\text{g/mL}$ (1350 U/mL) Katalase wurden als optimale Konzentration identifiziert und führten in einer Reaktion mit 1 μM sMMO zum höchsten Produktausbeute. Diese konnte dadurch unter vergleichbaren Bedingungen von 3,1 % auf 19,9 % um den Faktor 6,4 gesteigert werden.

Katalase wurde auch in anderen Enzymkaskaden zur Disproportionierung von H_2O_2 eingesetzt. In der Regel wird damit ein inaktivierender Effekt des Peroxids auf die umsatzrelevanten Enzyme minimiert. Ein Vergleich verschiedener Enzymkaskaden, in denen durch Zusatz von Katalase eine Steigerung der Produktausbeute erreicht wurde, ist in Tabelle 4.4 zu finden. Dubbels *et al.* untersuchten den enzymatischen Umsatz von Ethylen zu Ethylenoxid mit gereinigter Buthanmonooxygenase. Durch den Einsatz von 4000 U/mL Katalase konnte die Ausbeute um den Faktor 2,6 gesteigert und die Inaktivierung der Buthanmonooxygenase

Tabelle 4.4: Einfluss von Katalase auf die Produktausbeute von Enzymkaskaden; Vergleich verschiedener Enzymkaskaden aus Literaturdaten; Umsatzsteigerung nach Zusatz von Katalase im Vergleich zu Reaktionen ohne Katalase.

Enzym	Substrat	Katalase-Aktivität [U/mL]	Faktor der Umsatzsteigerung	Referenz
sMMO	Nitrobenzol	135	4,1	Vorliegende Arbeit
sMMO	Nitrobenzol	1350	6,5	Vorliegende Arbeit
sMMO	Nitrobenzol	160	2	[Griethe, 2018]
Buthanmonooxygenase	Ethylen	4000	2,6	[Dubbels et al., 2007]
Cytochrom P450 BM3 (immobilisiert)	Anisol	1000	2	[Valikhani et al., 2018]

durch H_2O_2 minimiert werden [Dubbels *et al.*, 2007]. Auch bei der präparativen, enzymatischen Synthese von Dihydroxyacetonphosphat und verschiedenen Ketose-1-Phosphaten wurde Katalase in einer Enzymkaskade mit der Glycerinphosphatoxidase und unterschiedlichen Aldolasen eingesetzt. Durch den Zusatz von 100 U/mL Katalase ein stabiler Produktionsprozess mit Umsätzen von 70 – 96 % entwickelt werden [Fessner und Sinerius, 1994]. Alternativ zur Disproportionierung von H_2O_2 mittels Katalase könnten auch andere Enzyme eingesetzt werden, die Peroxid als Substrat für Oxidationsreaktionen nutzen und damit eine Akkumulation im Reaktionsansatz verhindern. Peroxygenasen und Peroxidasen sind in den letzten Jahren in den Fokus der bioorganischen Chemie gerückt. Sie nutzen H_2O_2 , um C-H-Bindungen zu oxidieren, und sind damit unabhängig von zusätzlichen Elektronenquellen, wie NADH oder NADPH. Das Review von Burek *et al.* bietet einen Überblick über die verschiedenen Peroxid-nutzenden Enzyme und deren Anwendungspotenzial [Burek *et al.*, 2019]. Bezogen auf das Ziel der vorliegenden Arbeit bietet die unspezifische Peroxygenase (UPO) aus *Agrocybe aegerita* eine vielversprechende Alternative und könnte anstelle der Katalase in der Enzymkaskade eingesetzt werden. Die UPO ist in der Lage, sowohl Benzol, als auch Naphthalin zu hydroxylieren [Karich *et al.*, 2013; Kluge *et al.*, 2009]. Damit könnte H_2O_2 als Nebenprodukt der sMMO ebenfalls zur Hydroxylierung der Aromaten genutzt werden. Außerdem besitzt die UPO einen deutlich geringeren K_M -Wert gegenüber H_2O_2 (1,37 mM, $k_{\text{cat}}/K_M = 2,11 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [Molina-Espeja *et al.*, 2014]) als die verwendete Katalase aus Rinderleber ($K_M = 93 \text{ mM}$, $k_{\text{cat}}/K_M = 2,28 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [Switala und Loewen, 2002]) und ist bei geringeren Peroxidkonzentrationen effektiver. Für die UPO wurde jedoch bereits eine zwei- und dreifach-Hydroxylierung von Benzol nachgewiesen [Karich *et al.*, 2013]. Möglicherweise wird das Produktspektrum dadurch in Richtung von Brenzkatechin, Hydrochinon oder Trihydroxybenzol verschoben. Der Einsatz wäre demnach von der Produktauswahl abhängig.

In den zuvor diskutierten Untersuchungen wurde eine sMMO-Konzentration von 1 μM eingesetzt, um einen bestmöglichen Vergleich mit den Literaturdaten zu ermöglichen. Zur Steigerung der Produktausbeute wurde als nächstes die Enzymkonzentration um den Faktor 5 von 1 μM auf 5 μM erhöht. Die in Kapitel 3.2.2 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Ausbeute nur um den Faktor 2,3, von 19,9 % auf 45 %, erhöht werden konnte. Durch die erhöhte Reaktionsgeschwindigkeit stellte sich die Verfügbarkeit von gelöstem Sauerstoff als Substrat der sMMO als ein limitierender Faktor heraus. Bei der darauffolgenden Untersuchung des Verlaufs der Sauerstoffkonzentration zeigte sich, dass die Diffusionsgeschwindigkeit von Sauerstoff aus der Gasphase in die Flüssigphase in dem verwendeten Reaktionssystem die Reaktionsgeschwindigkeit limitierte. Die Limitierung äußerte sich durch einen charakteristischen, linearen Anstieg der Produktkonzentration.

Es ist bekannt, dass die Verfügbarkeit von Sauerstoff eine große Herausforderung bei der Entwicklung von biokatalytischen Reaktionssystemen darstellen kann [Çalik *et al.*, 2004; Garcia-Ochoa und Gomez, 2009]. Die meisten Strategien zur Erhöhung der Sauerstofftransferate (OTR) basieren auf einer Vergrößerung der Oberfläche zwischen Gas- und Flüssigphase. Eine große Oberfläche wird durch aktive Begasung und Energieeintrag zur Dispersion der Blasen erreicht. Blasen- und Schaumbildung können jedoch zur Denaturierung von Proteinen und damit zur Inaktivierung von Enzymen führen [Perriman *et al.*, 2007]. Um eine Denaturierung des Biokatalysators zu verhindern, wurde in der vorliegenden Arbeit keine aktive Begasung des Reaktionsvolumens durchgeführt, sondern lediglich die Rührgeschwindigkeit auf das verfügbare Maximum erhöht. Der volumetrische Stoffübergangskoeffizient k_{La}

konnte für das verwendete System bestimmt werden. Wie erwartet, erhöhte sich der k_La -Wert mit steigender Rührgeschwindigkeit von $6,2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ auf $2,6 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (Abbildung 3.14, Seite 63). Eine wichtige Rolle spielt der k_La typischerweise bei der Kultivierung von Zellen und Mikroorganismen. Die Zusammenfassung, welche k_La -Werte zur Kultivierung von verschiedenen Organismen unter Standardbedingungen erreicht werden sollten, um eine Sauerstoffsättigung von 30 % zu garantieren, ist von Seidel *et al.* veröffentlicht. Abhängig von der Sauerstoffaufnahme der Zellen variieren die Werte zwischen $2,4 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ für CHO-Zellen und $2,9 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ für *E. coli*-Zellen [Seidel *et al.*, 2021]. Ein Direkter Vergleich der Literaturdaten mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist nicht möglich, da der k_La -Wert von vielen Prozessparametern abhängig ist. Dennoch können die Literaturwerte zur Einordnung der eigenen Werte dienen.

Durch die erhöhte OTR konnte die Sauerstofflimitierung minimiert werden. Bei maximaler Rührgeschwindigkeit war keine Limitierung anhand eines linearen Bereichs der Progresskurve zu erkennen. Die Ausbeute konnte von 45 % auf 56,8 % um den Faktor 1,26 erhöht werden. Für den biotechnischen Einsatz der sMMO ist die Verfügbarkeit von Sauerstoff in der Lösung sicherzustellen. Dabei sollten Methoden genutzt werden, die die Proteinstabilität nicht gefährden.

Mit den bisherigen Anpassungen konnte die Produktausbeute von 3,1 auf 56,8 % gesteigert werden. Bei der standardmäßig eingesetzten Substratkonzentration von 1 mM Nitrobenzol waren am Ende der Reaktion noch 432 μM vorhanden. Die Umsatzsteigerung führte dazu, dass die Substratkonzentration unter den K_M -Wert von 510 μM [Griethe, 2018] sank.

Zur Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit und um zu verhindern, dass die Substratkonzentration im Reaktionsverlauf unter den K_M sinkt, wurde in den folgenden Reaktionen die Konzentration von Nitrobenzol auf 2 mM und 5 mM erhöht (Abbildung 3.16, Seite 66). In der Reaktion mit 5 mM Nitrobenzol konnte die höchste Produktkonzentration von 0,98 mM erreicht werden. Im Vergleich zur Startbedingung entsprach dies einer Steigerung um den Faktor 32. Die prozentuale Ausbeute ist durch die höhere Substratkonzentration verringert (46,6 % bei 2 mM Nitrobenzol und 19,6 % bei 5 mM Nitrobenzol). Der Verlauf der Produktkonzentrationen in den Reaktionen mit 2 und 5 mM Nitrobenzol zeigte unter den gewählten Bedingungen einen linear verlaufenden Bereich, welcher auf eine Sauerstofflimitierung hindeutet. Die Steigung ist bei höheren Substratkonzentrationen geringer. Die Korrelation der Steigung im linearen Bereich der Progresskurve zu der Diffusionsrate von Sauerstoff konnte bereits gezeigt werden (Kapitel 3.2.3, Seite 61). Die Diffusionsrate ist unter anderem abhängig von der Differenz der apparenten Sauerstoffkonzentration zur Gleichgewichtskonzentration. Möglicherweise hat die hohe Konzentration von Nitrobenzol einen Einfluss auf die Löslichkeit von Sauerstoff und damit auf die Gleichgewichtskonzentration. Die Rührgeschwindigkeit konnte zur Steigerung der Diffusionsrate in dem verwendeten System nicht weiter erhöht werden. Deshalb wurden keine weiteren Untersuchungen diesbezüglich durchgeführt.

Mit Hilfe des Modells substrats Nitrobenzol wurden verschiedene Faktoren, die die Enzymreaktion der sMMO limitieren, identifiziert. Es wurden Strategien entwickelt, mit denen diese Limitationen umgangen und die Ausbeute der Enzymreaktion gesteigert werden kann. Für einen biotechnologischen Einsatz der sMMO sollte Katalase mit einer Aktivität von 1350 U/mg zu jeweils 1 μM sMMO zugesetzt werden. Außerdem sollte die Verfügbarkeit der benötigten Substrate sichergestellt werden. Für das schlecht lösliche Substrat Sauerstoff kann ein gerührtes Reaktionssystem den kontinuierlichen Nachschub durch Diffusion ver-

bessern. Abhängig von den kinetischen Parametern der sMMO und der Löslichkeit der Substrate sind alternative Strategien zu untersuchen.

4.3 Umsatz der Zielsubstrate Ethylen, Benzol und Naphthalin mit der sMMO

Für die Zielsubstrate Ethylen, Benzol und Naphthalin, welche Zwischenprodukte der chemischen Methandehydroaromatisierung sind, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst Reaktionsverfahren methodisch entwickelt. Diese erlaubten das zeitaufgelöste Verfolgen des Umsatzes mit gereinigter sMMO (Kapitel 3.3, Seite 67). Die Wahl fiel auf die sMMO als Biokatalysator, weil diese in der Lage ist, alle drei Zielsubstrate umzusetzen. In der Literatur wird das breite Substratspektrum der sMMO als großes Potenzial zur biotechnischen Anwendung hervorgehoben. Detaillierte Untersuchungen zu einzelnen Substraten fehlen jedoch.

Der Umsatz von Benzol durch die sMMO wurde erstmals von Colby *et al.* 1977 beschrieben. Die Bildung von Phenol konnte unter Verwendung eines Rohextraktes von *Methylococcus capsulatus* Bath nachgewiesen und auf die sMMO Aktivität zurückgeführt werden [Colby *et al.*, 1977]. In nachfolgenden Arbeiten wurden Phenol und Hydrochinon als Produkte der enzymatischen Hydroxylierung von Benzol identifiziert [Pilkington und Dalton, 1990]. Den ersten Umsatz von Benzol zu Phenol mit gereinigten sMMO-Komponenten aus *Methylosinus trichosporium* OB3b zeigten M. Rataj und Kollegen 1991 [Rataj *et al.*, 1991]. Bisher wurde in keiner Veröffentlichung die Phenolbildung zeitaufgelöst gezeigt. Aktivitätswerte basierten lediglich auf dem O₂- oder NADH-Verbrauch oder auf einer Endpunktbestimmung der Phenolkonzentration. In der vorliegenden Arbeit konnte der zeitliche Verlauf der Phenolbildung durch die sMMO gezeigt werden. Dabei wurde das Substrat Benzol aus einer gesättigten Lösung im verwendeten Puffer zugegeben. Ein vergleichbarer Reaktionsaufbau wurde von Hyman *et al.* beschrieben [Hyman *et al.*, 1985]. Wie bereits im Ergebnisteil in Kapitel 3.3.1 (Seite 67) beschrieben, stellt die Flüchtigkeit von Benzol ein Problem dar. Die Konzentration zu Versuchsbeginn kann anhand der Verdünnung aus der gesättigten Lösung berechnet werden. Durch die Aufarbeitung der Proben im Reaktionsverlauf ist jedoch ein Verlust von Benzol vor der Analyse der Proben nicht zu vermeiden. Wie auch von Rataj *et al.* beschrieben [Rataj *et al.*, 1991], konnte in diesem Versuch der vorliegenden Arbeit ausschließlich Phenol als Hydroxylierungsprodukt nachgewiesen werden. Die Progresskurve der Produktkonzentration zeigt einen hyperbolen Verlauf, der vergleichbar ist mit dem Umsatz von Nitrobenzol (Reaktion A, Abbildung 3.11, Seite 59). Durch die Entkopplung der Reaktion und die Akkumulation von H₂O₂ wird die sMMO nach einigen Minuten inhibiert. Der Mechanismus der Entkopplung und der Bildung von H₂O₂ sind in der Einleitung in Kapitel 1.1.6 (Seite 9) beschrieben. Diese Beobachtung wurde in der Literatur beim Umsatz von Benzol bisher nicht beschrieben. Der zeitliche Verlauf der Phenolbildung durch die sMMO ist in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt, wobei Proben nach definierten Zeitpunkten entnommen und mittels HPLC quantitativ analysiert wurden.

Das bizyklische Naphthalin stellt das zweite aromatische Zwischenprodukt aus der Methandehydroaromatisierung dar. In Kapitel 3.3.2 (Seite 69) wurde der sMMO-katalysierte Umsatz von Naphthalin zu 1- und 2-Naphthol untersucht. Naphthalin wurde 1981 erstmals als Substrat der sMMO beschrieben. Dabei wurde Rohextrakt von *M. capsulatus* Bath verwendet und ein Produktverhältnis von 60 % 1-Naphthol zu 40 % 2-Naphthol nachgewiesen

[Dalton *et al.*, 1981]. Den ersten Umsatz von Naphthalin mit gereinigten sMMO-Komponenten zeigten Brusseau *et al.* nach Zuarbeit von J. Lipscomb und B. Fox [Brusseau *et al.*, 1990; Fox *et al.*, 1989]. Außerdem nutzten Brusseau *et al.* den von Wackett und Gibson entwickelten Assay zur Quantifizierung der Hydroxylierung von Aromaten mit Hilfe eines Diazo-Farbkomplexes [Wackett und Gibson, 1983]. Seitdem wird Naphthalin als Substrat für den sMMO-Aktivitätsnachweis in ganzen Zellen methanotropher Organismen verwendet [Zhang *et al.*, 2009]. Die Produktspezifität bezüglich der Naphthol-Isomere wurde seither nicht weiter untersucht. Auch eine zeitaufgelöste Darstellung der Produktbildung ist bislang nicht veröffentlicht. In der vorliegenden Arbeit konnte das Verhältnis von 60 % 1-Naphthol zu 40 % 2-Naphthol bestätigt werden. Auch der Umsatz von Naphthalin mit gereinigten sMMO-Komponenten zeigt eine Stagnation der Produktbildung nach einigen Minuten, die auf die Entkopplung des Elektronentransfers und die Akkumulation von H_2O_2 zurückzuführen ist. Das Ergebnis stimmt mit den Erwartungen aus den vorherigen Versuchen mit den Substraten Nitrobenzol (Reaktion A, Abbildung 3.11, Seite 59) und Benzol (Abbildung 3.18, Seite 69) überein.

Das dritte Zwischenprodukt aus der Methandehydroaromatisierung, welches in der vorliegenden Arbeit enzymatisch oxidiert wurde, ist das gasförmige Ethylen. Ethylen wurde als Substrat der sMMO eingesetzt und die enzymatische Bildung von Ethylenoxid wurde zeitaufgelöst verfolgt. Die Ergebnisse sind in Kapitel 3.3.3 (Seite 71) dargestellt.

Der Umsatz von Ethylen mit der sMMO wurde ebenfalls von Colby *et al.* 1977 erstmals gezeigt [Colby *et al.*, 1977]. Die Arbeitsgruppe war in der Lage die Bildung von 3,54 mM Ethylenoxid auf die Aktivität der sMMO im Rohextrakt des Organismus *Methylococcus capsulatus* Bath zurückzuführen. In weiterführenden Untersuchungen wurde Ethylen als Substrat für die Aktivitätsbestimmung von sMMO-Fractionen aus *M. capsulatus* Bath verwendet [Colby und Dalton, 1978; Colby und Dalton, 1979] und später aufgrund der einfacheren Handhabung durch Propylen ersetzt [Pilkington und Dalton, 1990]. *M. capsulatus* Bath und *Methylocystis* sp. stellen bislang die einzigen methanotrophen Organismen dar, in denen eine Aktivität der sMMO gegenüber Ethylen nachgewiesen wurde [Grosse *et al.*, 1999]. Mit der sMMO aus *M. trichosporium* OB3b wurde bisher kein Ethylen-Umsatz beschrieben. In Abbildung 3.21 (Seite 72) konnte erstmals die Produktion von 40 μM Ethylenoxid mit gereinigten sMMO-Komponenten mit der MMOH aus *M. trichosporium* OB3b gezeigt werden. Die kontinuierliche Quantifizierung der Substrate und Produkte mittels Massenspektrometrie ermöglichte eine präzise Analyse des Reaktionsverlaufs. Für das gasförmige Substrat Ethylen und das ebenfalls gasförmige Produkt Ethylenoxid stellt das verwendete Massenspektrometer eine geeignete Methode zur Prozessüberwachung dar. Der Verlauf der Produktkonzentration ist mit denen der vorangegangenen Experimente zum Umsatz von Benzol und Naphthalin vergleichbar. Unabhängig vom Substrat nähert sich die Produktkonzentration nach 10 bis 15 Minuten einem Maximum zwischen 35 und 50 μM an. Wie die Ergebnisse in Kapitel 3.2.1 (Seite 59) zeigen, ist diese Limitierung auf die Entkopplung des Elektronentransfers und die Bildung des inhibitorischen Nebenprodukts H_2O_2 zurückzuführen. Die bereits vorgestellten Strategien, um die Limitierungen des Umsatzes zu umgehen, wurden in den Kapitel 3.5 (Seite 76 - 91) in Experimenten für den technischen Umsatz der Zielsubstrate Benzol, Naphthalin und Ethylen angewendet.

Für alle drei Zielsubstrate konnten Reaktionssysteme entwickelt werden, mit denen der Reaktionsverlauf zeitaufgelöst verfolgt werden kann. Dadurch konnten Reaktionsgeschwindigkeiten ermittelt und kinetische Parameter der sMMO für die jeweiligen Substrate bestimmt werden.

4.4 Kinetische Untersuchung der sMMO mit Ethylen, Benzol und Naphthalin

Für den biotechnologischen Einsatz der sMMO sind Kenntnisse über enzymkinetische Parameter für die Zielsubstrate essenziell. Sie ermöglichen die Einstellung von Reaktionsbedingungen, unter denen die sMMO bestmögliche Umsatzraten zeigt und geben Aufschluss über mögliche Inhibierungen. Bisher konzentrierten sich die meisten Untersuchungen der sMMO auf den Katalysemechanismus und die Identifizierung einzelner Übergangszustände im katalytischen Zentrum. Makroskopische Untersuchungen zur Enzymkinetik sind bisher nur wenig beschrieben. In Tabelle 4.5 sind bereits bekannte Literaturwerte zu enzymkinetischen Parametern der sMMO für verschiedene Substrate zusammengefasst und mit den Werten aus der vorliegenden Arbeit verglichen.

Tabelle 4.5: Zusammenfassung der kinetischen Parameter der sMMO

Substrat	Stamm	K_M [μM]	k_{cat} [s^{-1}]	K_i [μM]	Referenz
Methan	<i>M. trichosporium</i> OB3b	25	3,7	-	[Fox et al., 1990]
	<i>M. trichosporium</i> OB3b	66	k. A.	-	[Tonge et al., 1977]
	<i>M. capsulatus</i> Bath	3	k. A.	-	[Pilkington und Dalton, 1990]
Furan	<i>M. trichosporium</i> OB3b	35	7,6	-	[Fox et al., 1990]
Propylen	<i>M. trichosporium</i> OB3b	k. A.	4,4	-	[Fox et al., 1990]
Sauerstoff	<i>M. capsulatus</i> Bath	16,8	k. A.	-	[Pilkington und Dalton, 1990]
Nitrobenzol	<i>M. trichosporium</i> OB3b	460	k. A.	-	[Liu et al., 2005]
Nitrobenzol	<i>M. trichosporium</i> OB3b	510	0,62	-	[Griethe, 2018]
Benzol	<i>M. trichosporium</i> OB3b	75	0,37	1645	Vorliegende Arbeit
Naphthalin	<i>M. trichosporium</i> OB3b	380	0,96	-	Vorliegende Arbeit
Ethylen	<i>M. trichosporium</i> OB3b	305	0,2	-	Vorliegende Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde für alle drei Zielsubstrate Benzol, Naphthalin und Ethylen jeweils die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration bestimmt und daraus die enzymkinetischen Parameter K_M , V_{max} und k_{cat} ermittelt. Die Ergebnisse sind in Kapitel 3.4 (Seite 73) beschrieben.

Für das Substrat Benzol wurde eine Substratüberschusshemmung detektiert ($K_i = 1645 \mu\text{M}$, Tabelle 3.5, Seite 75). Dass die sMMO durch Substratüberschuss inhibiert wird, ist bisher nicht in der Literatur beschrieben. Sowohl Liu *et al.* als auch A. Griethe untersuchten die Kinetik der sMMO für das strukturell ähnliche Substrat Nitrobenzol, identifizierten jedoch keinen inhibierenden Effekt. Allerdings lagen die höchsten eingesetzten Substratkonzentrationen lediglich um einen Faktor von 3 bis 10 über dem ermittelten, apparenten K_M . Ein möglicher Einfluss höherer Substratkonzentrationen wurde nicht in Betracht gezogen [Griethe, 2018; Liu *et al.*, 2005]. Aufgrund der wenigen vorhandenen kinetischen Daten zur sMMO ist eine Substratüberschusshemmung auch für andere Substrate nicht auszuschließen. Untersuchungen anderer Enzyme der Monooxygenase-Familie zeigten bereits inhibierende Effekte von Substraten [Ferroni *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2001]. Lin und Kollegen untersuchten beispielsweise zehn verschiedene Cytochrom P450-Enzyme und identifizierten Substratinhibierungen bei sechs davon. Die ermittelten K_i -Werte lagen um Faktoren zwischen 1,2 und 10 über dem K_M -Wert [Lin *et al.*, 2001].

Für das Ziel der vorliegenden Arbeit, unter anderem Benzol zu Phenol zu hydroxylieren und diese Reaktion mit einem Fokus auf die Produktausbeute und die TTN des Biokatalysators zu optimieren, ist die beobachtete Substratüberschusshemmung ein essenzieller Faktor und muss bei der Planung des technischen Umsatzes berücksichtigt werden. Um eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen sollte die lokale Benzolkonzentration in einem Bereich liegen, in dem der inhibierende Effekt minimal ist.

Die kinetische Untersuchung mit dem Substrat Naphthalin ergab einen K_M -Wert von 380 μM , welcher in der gleichen Größenordnung liegt, wie die Literaturwerte für das ebenfalls aromatische Substrat Nitrobenzol. Aufgrund der geringen Löslichkeit lag die höchste eingesetzte Substratkonzentration bei 360 μM und damit unterhalb des ermittelten apparenten K_M . Die Reaktion konnte nicht in Substratsättigung durchgeführt werden. Deswegen war keine Substratüberschusshemmung nachweisbar und die Regression der kinetischen Parameter wurde nach der klassischen Michaelis-Menten-Kinetik durchgeführt.

Für das Substrat Ethylen wurde ein K_M -Wert von 305 μM bestimmt. Auch in diesem Fall ist zu beachten, dass keine komplette Substratsättigung erreicht wurde. Die höchste eingesetzte Substratkonzentration liegt nur um den Faktor 6,5 über dem ermittelten, apparenten K_M . Ein inhibierender Effekt wurde nicht beobachtet. Der ermittelte K_M -Wert für Ethylen liegt mit 305 μM deutlich über den publizierten K_M -Werten der sMMO für das natürliche Substrat Methan (25 μM [Fox *et al.*, 1990], 66 μM [Tonge *et al.*, 1977]).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur kinetischen Charakterisierung der sMMO fügen dem Wissensstand Informationen über drei weitere nicht-natürliche Substrate hinzu. Für das Ziel der vorliegenden Arbeit, den sMMO-katalysierten Umsatz von Benzol, Naphthalin und Ethylen zu optimieren, sind die Kenntnisse über die enzymkinetischen Parameter essenziell. Dadurch können Reaktionsbedingungen gezielt angepasst und optimiert werden und Ergebnisse im Hinblick auf die kinetischen Eigenschaften des Enzyms interpretiert werden.

4.5 Untersuchungen zur Optimierung des enzymatischen Umsatzes von Ethylen, Benzol und Naphthalin

Nachdem umsatzlimitierende Faktoren der sMMO-Reaktion untersucht und die Zielsubstrate kinetisch charakterisiert worden waren, wurden in Kapitel 3.5 (Seite 76) diese Erkenntnisse genutzt und Reaktionssysteme zur Erhöhung der Produktausbeute und der maximalen Zykluszahl des Enzyms (*total turnover number*, TTN) für die jeweiligen Substrate Ethylen, Benzol und Naphthalin entwickelt.

4.5.1 Enzymatischer Umsatz von Ethylen im 10-mL- und im 700-mL-Maßstab

Das zunächst für den Umsatz von Ethylen entwickelte Reaktionssystem (3.3.3, Seite 71) wurde anschließend weiter optimiert (Kapitel 3.5.1.1, Seite 76). Die Enzymkaskade aus Glucosedehydrogenase (GDH) zur Cofaktorregenerierung und Katalase (Cat) zur Disproportionierung von H_2O_2 wurde implementiert. Dadurch konnten die finale Produktkonzentration und die prozentuale Ausbeute um den Faktor 24 auf 970 μM bzw. 4,7 % und die TTN um den Faktor 64 auf 485 gesteigert werden (Tabelle 3.6, Seite 81). Wie bereits in Kapitel 4.3 (Seite 111) genannt, sind bisher keine vergleichbaren Untersuchungen zum Umsatz von Ethylen mit gereinigter sMMO veröffentlicht. Um das Ergebnis der vorliegenden Arbeit dennoch einordnen zu können, bietet sich ein Vergleich mit den Ergebnissen von Colby *et al.* 1977 an. In Rohextrakt von *M. capsulatus* Bath wurde der Umsatz von Ethylen und die Produktion von 3,54 mM Ethylenoxid innerhalb von 12 Minuten nachgewiesen. Bezogen auf die eingesetzte

Proteinmenge wurde eine spezifische Aktivität von 148 mU/mg bestimmt [Colby *et al.*, 1977]. Zu beachten ist, dass die Reaktion mit einer Proteinkonzentration von 2 mg/mL Rohextrakt und bei der für *M. capsulatus* Bath optimalen Temperatur von 45 °C durchgeführt wurde. Die Versuchsbedingungen wichen deutlich von denen in der vorliegenden Arbeit ab. Die MMOH macht in *M. capsulatus* Bath einen Anteil von ca. 16 % der löslichen Proteinfraction aus [Pilkington und Dalton, 1990]. Demnach ließe sich die von Colby *et al.* bestimmte spezifische Aktivität auf die eingesetzte Menge an MMOH umrechnen und läge bei ca. 925 mU/mg [Colby *et al.*, 1977]. Verglichen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte mit dem Rohextrakt eine höhere Produktkonzentration erreicht werden. Die berechnete spezifische Aktivität der MMOH war ebenfalls höher, als die der gereinigten sMMO in der vorliegenden Arbeit (Tabelle 3.6, Seite 81). Ebenfalls mit Rohextrakt eines Methanotrophen konnten Grosse *et al.* auch den Umsatz von Ethylen zu Ethylenoxid zeigen. Die Arbeitsgruppe nutzte den Stamm *Methylocystis* sp. WI 14. Der Anteil der MMOH am Gesamtprotein des Stammes wurde auf 10 % geschätzt. Die auf die eingesetzte Proteinmenge bezogene spezifische Aktivität betrug 33,6 mU/mg [Grosse *et al.*, 1999]. Bezogen auf den Anteil der MMOH kann eine spezifische Aktivität von 336 mU/mg berechnet werden.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte spezifische Aktivität (488 - 680 mU/mg) liegt in der gleichen Größenordnung, wie die der Untersuchungen mit Rohextrakt methanotropher Bakterien. Diese quantitativen Vergleiche sind jedoch nur bedingt aussagekräftig, da unterschiedliche Ursprungsorganismen der sMMO verwendet wurden und Reaktionsbedingungen und Analysemethoden unterschiedlich sind.

Bisher wurden nur wenige andere Enzyme beschrieben, die in der Lage sind, Ethylen als Substrat zu nutzen. Eine Übersicht über Untersuchungen zur biokatalytischen Produktion von Ethylenoxid ist in Tabelle 4.6 dargestellt. Mit Rohextrakt pMMO-bildender *M. trichosporium* OB3b-Zellen konnte ein Umsatz von Ethylen zu Ethylenoxid gezeigt werden [Miyaji, 2011]. Der Stamm *M. trichosporium* IMV 3011 wurde ebenfalls als Ganzzellkatalysator zur Ethylenoxidproduktion eingesetzt. Es konnten Produktkonzentrationen von 40 – 240 nM erreicht werden [Xin *et al.*, 2017]. Weitere Ethylen-umsetzende Enzyme sind die Alkenmonooxygenase aus dem gram-positiven Bakterium *Nocardioide* sp. und die Ammoniummonooxygenase aus dem gram-negativen Bakterium *Nitrosomonas europaea* [Bennett *et al.*, 2016; Mattes *et al.*, 2006]. Für Untersuchungen zur biokatalytischen Produktion von Ethylenoxid, wurden Mutanten der Toluolmonooxygenase entwickelt, die in der Lage sind, Ethylen umzusetzen. Mit ganzen *E. coli*-Zellen, die diese Varianten produzierten, konnten innerhalb von 200 Minuten bis zu 0,7 mM Ethylenoxid produziert werden. Aktivitätswerte bezogen auf die eingesetzte Enzymmenge sind dazu nicht veröffentlicht [Carlin *et al.*, 2015].

Tabelle 4.6: Biokatalytische Produktion von Ethylenoxid aus Ethylen

Biokatalysator	Ethylenoxid produziert	Referenz
<i>M. capsulatus</i> Bath Rohextrakt	3,54 mM	[Colby <i>et al.</i> , 1977]
<i>Methylocystis</i> sp. WI 14 Rohextrakt	k. A.	[Grosse <i>et al.</i> , 1999]
<i>M. trichosporium</i> OB3b (ganze Zellen)	k. A.	[Miyaji, 2011]
<i>M. trichosporium</i> OB3b (ganze Zellen)	40 – 240 nM	[Xin <i>et al.</i> , 2017]
Rekombinante Toluolmonooxygenase-Varianten in <i>E. coli</i> -Zellen	0,7 mM	[Carlin <i>et al.</i> , 2015]
Gereinigte sMMO	1,08 mM	Vorliegende Arbeit

Nachdem die Enzymkaskade eingebunden und der Ethylenumsatz im 10-mL-Maßstab optimiert worden war, konnte in Kapitel 3.5.1.2 (Seite 77) der Reaktionsmaßstab auf 700 mL vergrößert und der enzymatische Umsatz in einem Membranreaktor gezeigt werden. Enzymreaktoren sind für die biotechnologische Anwendung von Enzymen essenziell. Die Art und der Aufbau des Reaktors müssen dabei an die benötigten Bedingungen der Biokatalyse angepasst werden. Der Membranreaktor bietet ein geeignetes Reaktionssystem für den Umsatz des gasförmigen Substrats Ethylen. Während sich im 10-mL-Maßstab in Kapitel 3.5.1.1 (Seite 76) potenziell ein explosionsfähiges Gemisch der gasförmigen Substrate Ethylen und Sauerstoff im Kopfraum des Reaktionsgefäßes bilden kann, wurde dies durch die Verwendung des Membranreaktors verhindert. Ethylen und Sauerstoff wurden über zwei voneinander getrennte Membranen dem Reaktionssystem zugeführt wurden (Abbildung 2.2, Seite 41). Für eine technische Anwendung und die Planung eines enzymatischen Produktionsprozesses ist die Vermeidung solcher Sicherheitsrisiken ein großer Vorteil.

Über den Partialdruck von Sauerstoff bzw. Ethylen an der jeweiligen Membran konnte die jeweilige Substratkonzentration in der Lösung kontrolliert werden. Unklar war zunächst, ob die ausgewählten Silikonmembranen einen möglichen Einfluss auf die Enzymreaktion haben und ob die Permeabilität der Membranen eine ausreichende Substratversorgung ermöglicht. Basierend auf den Ergebnissen in Kapitel 3.5.1.2 (Abbildung 3.24, Seite 78 und Abbildung 3.26, Seite 80) wurde gezeigt, dass der Zusatz von Rinderserumalbumin (BSA) als Membran-blockierendes Agens notwendig ist, um die Adsorption für die Reaktion essenzieller Proteinbestandteile an Membranoberflächen zu verhindern. Dass BSA einen positiven Einfluss auf die Stabilität von Enzymreaktionen haben kann, ist bekannt: H. Bisswanger beschrieb einen generellen stabilisierenden Effekt von hohen Konzentrationen eines inerten Proteins wie BSA auf Enzyme [Bisswanger, 2014]. Mehrere Publikationen zeigten den positiven Einfluss von BSA-Zusätzen auf die Produktausbeute in Polymerasekettenreaktionen (PCR) mit der Schlussfolgerung, dass BSA die Adsorption von Enzymen an den hydrophoben Oberflächen der Kunststoffgefäße verhindert [Farell und Alexandre, 2012; Nagai *et al.*, 1998]. Durch den Zusatz von BSA konnte in der vorliegenden Arbeit über 1 mM Ethylenoxid in dem Membranreaktor enzymatisch produziert werden. Vergleichbar mit dem Ergebnis im 10-mL-Maßstab stagnierte die Produktkonzentration nach 60 Minuten Reaktionszeit, vermutlich aufgrund der Inaktivierung der MMOH.

Enzym-Membran-Reaktoren werden in der Regel für Prozesse eingesetzt, in denen eine kontinuierliche Zuführung von Substrat und eine kontinuierliche Abtrennung von Produkt erreicht werden soll, während der Biokatalysator in einem eingeschlossenen Reaktionsraum verbleibt. Eine Zusammenfassung der gängigen Enzym-Membran-Reaktor-Prozesse bietet das Review von Rios und Kollegen [Rios *et al.*, 2004]. Der Verlauf der Konzentrationen von Sauerstoff und Ethylen in der Lösung zeigt, dass die Permeabilität der Membran ausreicht, und ein Substratnachschieb gewährleistet ist (Abbildung 3.26, Seite 80). Eine Abführung des gebildeten Produkts wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht. Ethylenoxid ließe sich möglicherweise ebenfalls über die Membranen austragen und könnte aus dem gasförmigen Substrat-Produkt-Gemisch isoliert werden.

Die Abtrennung von Produkten nach der Synthese ist häufig zeit- und energieaufwändiger, als der Produktionsprozess selbst. Deswegen bieten Membranreaktorsysteme Vorteile in der Implementierung von ökonomischen Produktionsprozessen. Ein Prozess zur enzymatischen Produktion von Ethylenoxid in einem Membranreaktor ist bisher in der Literatur nicht beschrieben und konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals demonstriert werden.

4.5.2 Enzymatischer Umsatz von Benzol im 1- und im 2-Phasen-System

In Kapitel 3.5.2 (Seite 81) wurde der Umsatz von Benzol untersucht und das Reaktionssystem optimiert, um eine hohe Produktausbeute und eine hohe TTN des Katalysators zu erreichen. Da das flüssige Substrat Benzol andere Ansprüche an das Reaktionssystem stellt, als das gasförmige Ethylen, wurde der Membranreaktor nicht in Betracht gezogen. Die Reaktion wurde in einem geschlossenen und gerührten Gefäß durchgeführt. Durch Zusatz der Enzymkaskade aus GDH und Katalase und Optimierung der Reaktionsparameter konnte die prozentuale Ausbeute von 5,5 auf 90 % um den Faktor 16 und die TTN von 55 auf 536 um den Faktor 9,7 gesteigert werden (Tabelle 3.8, Seite 87). Neben Phenol konnte Hydrochinon als sekundäres Hydroxylierungsprodukt nachgewiesen werden. Damit konnten die Ergebnisse von Pilkington *et al.* bestätigt werden [Pilkington und Dalton, 1990], nachdem Colby *et al.* und Stirling *et al.* lediglich Phenol als Hydroxylierungsprodukt von Benzol identifizierten [Colby *et al.*, 1977; Stirling *et al.*, 1979]. Vergleichbare Beobachtungen wurden auch für die ebenfalls über ein Nicht-Häm-Di-Eisen-Zentrum verfügende Ammoniakmonooxygenase gemacht. Hyman *et al.* untersuchten die Hydroxylierung von Benzol durch Ganzzellkatalyse des Organismus *Nitrosomonas europaea*. Sie konnten nachweisen, dass zunächst Phenol gebildet wird, welches dann zu Hydrochinon hydroxyliert wird [Hyman *et al.*, 1985]. Auch Peroxygenasen, die über einen anderen Reaktionsmechanismus unter Verwendung von H_2O_2 verfügen, können Benzol zu Phenol und weiter zu Hydrochinon hydroxylieren [Hofrichter und Ullrich, 2014]. In den genannten Fällen ist die *para*-Position präferiert. Für die unspezifische Peroxygenase aus *Agrocybe aegerita* wurde auch das *meta*-Isomer Brenzcatechin als Produkt detektiert [Karich *et al.*, 2013]. In der vorliegenden Arbeit konnten sowohl Brenzcatechin, als auch Resorcin lediglich in Spuren detektiert werden. Die Konzentrationen lagen jedoch immer unterhalb der Bestimmungsgrenze von 10 μM .

Da bereits in den kinetischen Untersuchungen gezeigt wurde, dass die Benzolkonzentration einen erheblichen Einfluss auf die sMMO hat, wurden Experimente zur Umsatzsteigerung mit verschiedenen Benzolkonzentrationen durchgeführt. In der Reaktion B2 mit 3 mM Benzol (Abbildung 3.27, Seite 82) betrug die initiale Reaktionsgeschwindigkeit 49 $\mu M/min$. Unter Berücksichtigung der eingesetzten sMMO-Konzentration stimmt die Reaktionsgeschwindigkeit mit den zuvor ermittelten kinetischen Daten überein (Kapitel 3.5, Abbildung 3.22A, Seite 75). In Reaktion B3 (Abbildung 3.28, Seite 83) war die Reaktionslösung mit Benzol gesättigt, die Konzentration betrug 23 mM. Durch die hohe Benzolkonzentration wurde die sMMO wie erwartet stärker inhibiert und die Reaktionsgeschwindigkeit verringerte sich auf 9,8 $\mu M/min$. Der Vergleich von Reaktion B2 und Reaktion B3 zeigt, dass sich die Produktverteilung über die eingesetzte Substratkonzentration beeinflussen ließ. Durch den Einsatz eines Überschusses von Benzol (Reaktion B3), war Phenol das präferierte Produkt der Reaktion. Die geringere Benzolkonzentration (Reaktion B2) führte zu einem höheren Anteil von Hydrochinon am Ende der Reaktion. Der Grund für den Wechsel in der Substratpräferenz liegt in den kinetischen Eigenschaften der sMMO in Bezug auf Benzol und Phenol. Sinkt die Benzolkonzentration im Reaktionsverlauf unter den K_M -Wert (75 μM , Abbildung 3.22, Seite 75), während die Phenolkonzentration über den K_M -Wert (1,4 mM, Daten nicht gezeigt) steigt, verläuft der Phenolumsatz schneller, als die Bildung von Phenol. Dadurch sinkt die Phenolkonzentration und Hydrochinon akkumuliert.

Dem Fokus des Projektes, in welches die vorliegende Arbeit eingebettet war, entsprechend, sollte Phenol das Hauptprodukt der Reaktion sein. Um die enzymatische Produktion von Phenol möglichst effizient zu gestalten, wurde in Kapitel 3.5.2.2 (Seite 83) ein 2-Phasen-

System als Reaktionsaufbau entwickelt, der eine permanente Verfügbarkeit von Benzol sicherstellt, ohne dass die Reaktionsgeschwindigkeit durch hohe Substratkonzentrationen zu sehr verringert wird. Eine organische Phase diene als Substratreservoir. In der wässrigen Phase fand die Enzymreaktion statt. Durch Diffusion des Substrates von der organischen in die wässrige Phase wurde der Nachschub von Benzol sichergestellt. Zunächst wurde der Einfluss verschiedener organischer Lösungsmittel auf die sMMO-Aktivität untersucht. Es musste sichergestellt werden, dass das verwendete Lösungsmittel keinen negativen Einfluss auf die Aktivität oder Stabilität der sMMO hat. Aus Vorversuchen war bekannt, dass die sMMO schon bei geringen Konzentrationen von organischen Lösungsmitteln (Acetonitril, DMSO), die in wässriger Lösung vorlagen, einen Großteil ihrer Aktivität verliert (Anhang 8.7, Seite 155). Außerdem beinhaltet das bekannte Substratspektrum der sMMO viele längerketige Alkane und Alkohole, die als Lösungsmittel für eine organische Phase in Frage kämen, unter anderem *n*-Hexan und *n*-Octan [Colby *et al.*, 1977]. Es konnte gezeigt werden, dass die geringen Löslichkeitswerte von *n*-Hexan und 1-Decanol in wässriger Lösung ausreichen, um die sMMO-Aktivität gegenüber dem Modells substrat Nitrobenzol deutlich zu verringern (Abbildung 3.29, Seite 85). Ob es durch hydrophobe Wechselwirkungen zur Destabilisierung der sMMO kam, oder ob *n*-Hexan oder 1-Decanol konkurrierende Substrate darstellen, wurde nicht untersucht. *n*-Decan weist eine um mehrere Größenordnungen geringere Löslichkeit in Wasser auf, als *n*-Hexan und 1-Decanol (Tabelle 3.7, Seite 85) und scheint dadurch keinen negativen Einfluss auf die Aktivität der sMMO zu haben. Deswegen wurde *n*-Decan als organische Phase für die Enzymreaktion im 2-Phase-System verwendet. Das Verteilungsgleichgewicht von Benzol in dem 2-Phasen-System wurde empirisch bestimmt ($K = 177$, Gleichung 3.6, Seite 85), sodass die Substratkonzentration in der wässrigen Phase zu Reaktionsbeginn über die Konzentration in der organischen Phase kontrolliert werden konnte. In der Literatur ist der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient (K_{ow}) als Maß für die Lipophilie bzw. Hydrophilie eines Stoffes angegeben. Für Benzol beträgt dieser $K_{ow} = 134$ und liegt damit in der gleichen Größenordnung, wie der Koeffizient für das System aus *n*-Decan und Reaktionspuffer [GESTIS-Stoffdatenbank, 2021a].

Für die Enzymreaktion in diesem 2-Phasen-System waren noch weitere Faktoren zu beachten. *n*-Decan bildete in dem verwendeten System die obere Phase und beeinflusste dadurch die Diffusion des ebenfalls benötigten Substrates Sauerstoff in die wässrige Phase. Außerdem war auch die Diffusionsgeschwindigkeit von Benzol von der organischen in die wässrige Phase ein möglicher geschwindigkeitsbestimmender Faktor. Um eine Substratlimitierung zu vermeiden und sowohl eine Diffusion von Sauerstoff, als auch von Benzol zu unterstützen, wurde das Volumen der organischen Phase angepasst und das Reaktionssystem mit geringer Geschwindigkeit gerührt.

Enzyme können bei Kontakt mit der Grenzfläche zwischen organischer und wässriger Phase destabilisiert werden und denaturieren. Wird die Grenzfläche zwischen den Phasen durch starkes Rühren und Bildung einer Emulsion vergrößert, steigt das Risiko, dass Enzyme denaturiert werden [Berg und Tymoczko, 2018]. Die Rührgeschwindigkeit wurde so angepasst, dass keine vollständige Emulsion gebildet wurde, sondern dass sich Tropfen der organischen Phase in der wässrigen Phase bildeten.

Der enzymatische Umsatz von Benzol wurde in dem 2-Phasen-System mit zwei verschiedenen Benzolkonzentrationen untersucht (Abbildung 3.30, Seite 86). Die Benzolkonzentration von 78,8 mM (Reaktion B4, Abbildung 3.30A) wurde ausgewählt, da nach der Einstellung des Verteilungsgleichgewichts die resultierende Konzentration in der wässrigen Phase ca. 400 μ M betrug, bei welcher die Reaktionsgeschwindigkeit der sMMO basierend auf den Er-

gebnissen kinetischen Charakterisierung (Kapitel 3.4, Abbildung 3.22, Seite 75) maximal ist. In Reaktion B5 (Abbildung 3.30, Seite 86) wurde zum Vergleich die fünffache Substratkonzentration (362 mM) in der organischen Phase eingesetzt. Die verfügbare Benzolkonzentration beeinflusste auch in dem 2-Phasen-System die Produktverteilung. Bei geringerer Benzolkonzentration in der organischen Phase (Reaktion B4) war die Diffusionsgeschwindigkeit langsamer, sodass die Verfügbarkeit von Benzol für die sMMO limitierend war. Die Benzolkonzentration in der wässrigen Phase sank, während die Phenolkonzentration zu Beginn der Reaktion stieg. Dadurch wurde der Umsatz von Phenol kinetisch begünstigt und Hydrochinon akkumulierte als Hauptprodukt der Reaktion. Bei höherer Benzolkonzentration in der organischen Phase (Reaktion B5) war auch die Diffusionsgeschwindigkeit in die wässrige Phase höher und Benzol war im gesamten Reaktionszeitraum das präferierte Substrat. Abhängig von der eingesetzten Substratkonzentration konnte durch das 2-Phasen-System ein nahezu vollständiger Umsatz erreicht werden. Die TTN und die finale Produktkonzentration konnten im Vergleich zur 1-Phasen-Reaktion um den Faktor 3 gesteigert werden (Tabelle 3.8, Seite 87). Das Ergebnis bestätigt, dass die Substratverfügbarkeit ein essenzieller, limitierender Faktor der sMMO-Katalyse ist.

Konzepte zur technischen Nutzung der sMMO in gereinigter Form sind bisher noch nicht veröffentlicht. Dementsprechend ist auch der Einsatz dieser Enzymkaskade in einem 2-Phasen-System in der vorliegenden Arbeit erstmals beschrieben.

Der Einsatz von organischen Lösungsmitteln in der Biokatalyse wird seit den 80er Jahren intensiv untersucht und erweitert das Anwendungsspektrum von Biokatalysatoren [Antonini *et al.*, 1981]. Ein Anwendungsbereich, in dem biphasische Reaktionssysteme erfolgreich eingesetzt werden, ist die enzymatische Produktion optisch aktiver Substanzen [Willeman *et al.*, 2002]. Selektive, biokatalytische Prozesse, die vorher aufgrund geringer Substratlöslichkeit nicht rentabel waren, können durch den Einsatz eines 2-Phasen-Systems eine Alternative zu chemischen Prozessen bieten. Beispielsweise konnte durch den Einsatz eines 2-Phasen-Systems aus wässriger Phase und Heptan die Amindehydrogenase zur Produktion von p-Fluorphenylisopropylamin und Methylbenzylamin genutzt werden. Aufgrund der geringen Löslichkeit der jeweiligen Substrate war der Umsatz in einem ausschließlich wässrigen Reaktionssystem zuvor nur in sehr geringen Mengen bzw. gar nicht detektierbar [Au *et al.*, 2014].

Biphasische Systeme werden außerdem für Reaktionen eingesetzt, in denen, wie auch in der vorliegenden Arbeit, Substrate oder Produkte inhibierende Effekte auf den Biokatalysator haben und demnach eine Akkumulation verhindert werden sollte [Fernandes und Cabral, 2008]. Ein Beispiel beschrieben Rosche und Kollegen. Durch den Einsatz einer organischen Phase aus längerkettigen Alkoholen konnte die enzymatische Produktion von *R*-Phenylacetylcarbiol mit der Pyruvatdecarboxylase aus *Zymomonas mobilis* um den Faktor 10 gesteigert werden. Ausschlaggebend war der verringerte toxische Effekt des Substrates Acetaldehyd. Die organische Phase diente als Substratreservoir und garantierte die Verfügbarkeit von Acetaldehyd in der wässrigen Phase bei niedrigen Konzentrationen [Rosche *et al.*, 2004]. Dieser wesentliche Vorteil des 2-Phasen-System konnte auch in der vorliegenden Arbeit demonstriert werden. Die eingesetzte Menge an Benzol konnte erhöht werden, ohne dass der Substratüberschuss die sMMO inhibiert. Die Ergebnisse bieten großes Potenzial, die sMMO für organische Synthesen über einen langen Zeitraum zu nutzen.

4.5.3 Enzymatischer Umsatz von Naphthalin im 1- und 2-Phasen-System

Da auch Naphthalin eines der intermediären Produkte der chemischen Methandehydroaromatisierung war, wurden Untersuchungen zur Optimierung der enzymatischen Hydroxylierung von Naphthalin mit der sMMO durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Kapitel 3.5.3 (Seite 87) dargestellt. Der enzymatische Umsatz von Naphthalin wurde optimiert, indem die Enzymkaskade aus GDH und Katalase implementiert und die Substratversorgung angepasst wurde. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse zum enzymatischen Umsatz von Naphthalin ist in Tabelle 3.9 auf Seite 90 dargestellt. Aufgrund der geringen Löslichkeit von Naphthalin (unter Reaktionsbedingungen 340 μM) stellte die verfügbare Substratkonzentration den limitierenden Faktor dar. Der in der kinetischen Charakterisierung (Kapitel 3.4, Seite 73) bestimmte K_M -Wert liegt mit 380 μM über der Löslichkeitsgrenze von Naphthalin in dem verwendeten Reaktionssystem. Der Einsatz der Lösungsmittelzusätze Acetonitril bzw. DMSO zur Steigerung der Löslichkeit wurde nicht weiterführend untersucht, da die sMMO-Aktivität bereits bei geringen Mengen drastisch beeinträchtigt wurde (Anhang 8.7, Seite 155). Alternativ wurde Naphthalin als Feststoff zugegeben, sodass eine gesättigte Lösung entstand und durch Nachlösen ein Substratnachschieb gewährleistet war. Die Geschwindigkeit des Nachlösens hängt unter anderem von der Oberfläche zwischen Feststoff und wässriger Umgebung ab. Um den Einfluss dieses Effektes auf den enzymatischen Umsatz zu untersuchen wurde in Reaktion N2 (Abbildung 3.31A, Seite 88) Naphthalin-Granulat und in Reaktion N3 (Abbildung 3.31B, Seite 88) gemörsertes, pulverförmiges Naphthalin eingesetzt. Mit Naphthalin-Granulat als Feststoff wurde das gebildete Naphthol als Substrat umgesetzt und Dihydroxynaphthalin (DHN)-Isomere bildeten das Hauptprodukt der Reaktion. In der Reaktion mit gemörsertem Naphthalin als Feststoff sind 1- und 2-Naphthol die Hauptprodukte. Der Anteil an DHN-Isomeren ist geringer. Die größere Oberfläche des gemörserten Naphthalins sorgt dafür, dass die Nachlösegeschwindigkeit erhöht wird. Die Art und Beschaffenheit des Feststoffs hatten einen deutlichen Einfluss auf das Produktspektrum. Im Fall des Granulats (Reaktion N2) zeigte sich, dass 1- und 2-Naphthol zunächst akkumulierten und dann ebenfalls von der sMMO umgesetzt wurden, sodass ein Gemisch aus Dihydroxynaphthalin-Isomeren als Hauptprodukt am Ende der Reaktion vorlag. Die Nachlösegeschwindigkeit des Naphthalin-Granulats war langsamer als der Umsatz, sodass die Konzentration in der Lösung gering war und die Hydroxylierung der Naphthole kinetisch bevorzugt wurde. Durch das Mörsern des Naphthalins wurde die Oberfläche und damit auch die Nachlösegeschwindigkeit erhöht. In Reaktion N3 war die Naphthalinkonzentration in der Lösung im Reaktionsverlauf ausreichen, sodass die Hydroxylierung von Naphthalin kinetisch präferiert wurde. 1- und 2-Naphthol bildeten die Hauptprodukte der Reaktion.

Insgesamt konnte durch den Einsatz der Enzymkaskade und die Anpassung der Reaktionsparameter die Produktausbeute von 18 auf 30 % erhöht und die TTN von 54 auf 575 um den Faktor 10 gesteigert werden (Tabelle 3.9, Seite 90). Vergleichbar mit den Ergebnissen in Kapitel 3.3.2 (Seite 69) konnte in den ersten 20 Minuten Reaktionszeit das Produktverhältnis von 60 % 1-Naphthol zu 40 % 2-Naphthol bestätigt werden. Durch die Hydroxylierung der Naphthole veränderte sich das Verhältnis im weiteren Reaktionsverlauf. In Reaktion N2 (Abbildung 3.31A, Seite 88) lagen am Ende der Reaktion 17 % 1-Naphthol, 24 % 2-Naphthol und 59 % DHN vor. In der Reaktion N3 (Abbildung 3.31B, Seite 88) betrug die Produktverteilung am Ende der Reaktion 55 % 1-Naphthol, 32 % 2-Naphthol und 13 % DHN.

Die enzymatische Bildung von DHN aus 1- oder 2-Naphthol ist in der Literatur hauptsächlich im Rahmen des Naphthalin-Metabolismus von Pseudomonaden beschrieben. Das die Reak-

tion katalysierende Enzym nennt sich 1-Naphthol-2-Hydroxylase [Davies und Evans, 1964; Swetha Vandana und Phale Prashant, 2005]. Dass 1- und 2-Naphthol als Substrate von der sMMO akzeptiert werden, ist bisher in der Literatur nicht beschrieben. Auch bei der Verwendung von Naphthalin als Substrat zur Messung der sMMO-Aktivität in ganzen Zellen methanotropher Organismen wurde die Weiterhydroxylierung nicht beschrieben [Brusseau *et al.*, 1990]. Ob dihydroxylierte Produkte in den Fällen untersucht wurden oder einen Einfluss auf den verwendeten kolorimetrischen Assay haben, ist nicht bekannt. Bei zukünftigen Untersuchungen zur sMMO-Aktivität mit Naphthalin als Substrat sollte eine zusätzliche HPLC-Analyse wie in Kapitel 2.5.5 (Seite 44) in Betracht gezogen werden, um die Bildung von DHN zu analysieren, wodurch der kolorimetrische Assay verfälscht werden könnte.

Da sich die Verfügbarkeit von Naphthalin als Substrat in der wässrigen Lösung als ein limitierender Faktor herausstellte, wurde eine alternative Strategie der Substratzugabe untersucht. Das für den Umsatz von Benzol erfolgreich demonstrierte 2-Phasen-System wurde auch für das Substrat Naphthalin verwendet. Naphthalin wurde in dem organischen Lösungsmittel *n*-Decan gelöst und über die organische Phase dem Reaktionssystem zugeführt. Dadurch sollte vermieden werden, dass der Übergang von der festen in die flüssige Phase den Geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt. Die Ergebnisse der Reaktion N4 sind in Kapitel 3.5.3.1 (Seite 89) beschrieben.

Es konnten lediglich 73 % der TTN (420) und der finale Produktmenge (8,4 μmol) im Vergleich zum Einsatz des festen Naphthalins in Reaktion N3 (Abbildung 3.31, Seite 88) erreicht werden. Aufgrund des Verteilungsgleichgewichtes wurde eine hohe Konzentration von 923 mM Naphthalin in der organischen Phase eingesetzt, sodass die prozentuale Ausbeute lediglich 4,5 % betrug. Durch den Einsatz des 2-Phasen-Systems konnte der Substratnachschieb nicht verbessert werden. Die Diffusionsgeschwindigkeit von Naphthalin von der organischen in die wässrige Phase scheint nicht ausreichend schnell zu sein, um einen positiven Effekt auf das Reaktionssystem zu haben. Auch die Reaktionsdauer konnte nicht verlängert werden. Unabhängig vom verwendeten Reaktionssystem war eine Stagnation der Produktkonzentrationen nach 120 bis 180 Minuten zu erkennen.

Für den enzymatischen Umsatz von Naphthalin bietet das 2-Phasen-System unter den getesteten Bedingungen keinen Vorteil.

4.6 Kombination von Chemo- und Biokatalyse

Ein weiteres Ziel des Projektes, in welches die vorliegende Arbeit eingebettet ist, war die Demonstration der Kombination aus Chemokatalyse zum Umsatz von Methan zu Ethylen, Benzol und Naphthalin mit der Biokatalyse zur anschließenden selektiven Hydroxylierung dieser Zwischenprodukte. Der Fokus wurde auf den Umsatz von Benzol gelegt, sodass der kombinatorische Ansatz eine Produktion von Phenol aus dem Biogas Methan ermöglichen sollte. Die sMMO ist aufgrund ihres breiten Substratspektrums ein geeignetes Enzym für den biokatalytischen Schritt, da es neben Benzol auch die anderen Zwischenprodukte umsetzt. Mit den Ergebnissen, die in der vorliegenden Arbeit in Kapitel 3.6 (Seite 91) beschrieben wurden, konnte diese kombinatorische Strategie erstmals gezeigt werden. Dazu wurden sowohl artifizielle Substratgemische, als auch Realproben aus der Methandehydroaromatisierung eingesetzt. Die Zusammensetzung der Substratgemische des Projektpartners Leibniz Institut für Katalyse in Rostock (LIKAT) ist in Tabelle 3.10 (Seite 91) aufgeführt.

Die Untersuchungen zum enzymatischen Umsatz von Substratgemischen beschränkten sich auf die im Anschluss an die Methandehydroaromatisierung kondensierten Zwischenproduk-

te. Das gasförmige Ethylen wurde dabei nicht berücksichtigt. Da Benzol den Hauptbestandteil der Substratgemische ausmachte, wurde das in Kapitel 3.5.2.2 (Seite 83) entwickelte 2-Phasen-System verwendet. Die Substratgemische wurden in *n*-Decan gelöst und als organische Phase in der Enzymreaktion eingesetzt. Das Lösungsmittel *n*-Decan ermöglichte den verlustfreien Transfer der Zwischenprodukte aus der Chemokatalyse in die enzymatische Reaktion. Alle Zwischenprodukte waren in *n*-Decan löslich und konnten direkt aus der Kühlfalle gelöst werden. Dadurch konnte der Einsatz weiterer Lösungsmittel, die für die nachfolgende Enzymreaktion hinderlich sein könnten, vermieden werden.

Die Ergebnisse der verschiedenen Reaktionen zum Umsatz von Substratgemischen sind in Tabelle 3.11 (Seite 92) und Abbildung 3.34 (Seite 94) zusammengefasst. Benzol ist in allen untersuchten Reaktionen das präferierte Substrat. Dadurch, dass die Anteile von Naphthalin und Toluol in der organischen Phase deutlich geringer sind, ist die resultierende Konzentration in der wässrigen Phase so niedrig, dass nur geringe Mengen umgesetzt werden. Im Speziellen gilt dies für das Substrat Naphthalin. Es lassen sich jeweils nur Spuren von Naphthol als Produkt nachweisen. Als Produkte der Hydroxylierung von Toluol konnten *p*-Kresol und Benzylalkohol nachgewiesen werden. Damit konnten die Ergebnisse von Borodina *et al.* und die Simulation von Sigdel *et al.* bestätigt werden, die ebenfalls ein Gemisch aus Benzylalkohol und *p*-Cresol als Produkt der Hydroxylierung von Toluol durch die sMMO identifizierten [Borodina *et al.*, 2007; Sigdel *et al.*, 2015]. Durch den Zusatz von Benzol, Naphthalin und Toluol als Substrate verringerte sich die Produktausbeute in den Reaktionen M1 – M3 (Abbildung 3.33, Seite 93) von 43 % auf 30 %. Die geringen Mengen von Naphthalin und Toluol in der wässrigen Phase belegen einen Teil der sMMO-Proteine, da sie auch als Substrate im aktiven Zentrum binden. Dieser Teil der sMMO-Fraktion steht dann vorübergehend für den Umsatz von Benzol nicht zur Verfügung, sodass in dem Zeitraum, in dem die sMMO aktiv ist, insgesamt weniger Benzol umgesetzt wird.

Während in den Reaktionen M1 – M3 artifizielle Substratgemische getestet wurden, sind in den folgenden Reaktionen Realprobengemische aus der Methandehydroaromatisierung unter vergleichbaren Bedingungen eingesetzt worden. Zusätzlich zu Benzol, Naphthalin und Toluol enthielten die Realproben Spuren von polyzyklischen Aromaten wie Anthracen und Pyren. Die Mengen waren jedoch so gering, dass sie in der wässrigen Phase nicht nachgewiesen werden konnten. Die Produktausbeute wurde dadurch nicht beeinflusst. In Reaktion M4 konnte eine Ausbeute von 30 % bezogen auf die eingesetzte Stoffmenge des Realprobengemisches erreicht werden. Die Hauptprodukte waren 76 % Phenol und 21 % Hydrochinon. Eine Verringerung der Substratkonzentration in Reaktion M5 führte zu einer höheren Ausbeute von 59 %. Das Produktspektrum wurde zu 80 % Hydrochinon und 18 % Phenol verschoben (Abbildung 3.34, Seite 94). Damit bestätigt das Ergebnis die Beobachtungen aus den Experimenten zum Umsatz von Benzol im 2-Phasen-System (Kapitel 3.5.2.2, Seite 83).

In Kapitel 3.6.2 (Seite 97) wurde abschließend eine Strategie vorgestellt, um größere Mengen der Realproben aus der Methandehydroaromatisierung umzusetzen. Der enzymatische Umsatz der Substratgemische wurde in einem Volumen von 350 mL in einem Rührkesselreaktor durchgeführt, was einer Vergrößerung des Maßstabs um den Faktor 87,5 entspricht. Die Konzentrationen von Benzol, Phenol und Toluol in der wässrigen Phase wurden kontinuierlich mittels Massenspektrometrie verfolgt. Zusätzlich konnten die Daten durch eine parallele, diskontinuierliche Analyse mittels GC und HPLC bestätigt und erweitert werden. In Reaktion R1 (Abbildung 3.35A, Seite 98) wurden im 350-mL-Maßstab die gleichen Substrat- und Enzymkonzentrationen eingesetzt, wie in Reaktion M5 (Abbildung 3.33E, Seite 93) im 4-mL-

Maßstab. Analog dazu entsprachen die Konzentrationen in Reaktion R2 (Abbildung 3.35B, Seite 98) denen aus Reaktion M6 (Abbildung 3.33F, Seite 93). Der Einsatz von 362 mM Benzol in der organischen Phase führte auch im 350 mL-Rührkesselreaktor in Reaktion R1 zur Bildung von Phenol als Hauptprodukt, während bei einer geringeren Substratkonzentration von 78,8 mM Benzol in Reaktion R2 das zunächst gebildete Phenol größtenteils weiterhydroxyliert wurde und Hydrochinon das Hauptprodukt der Reaktion darstellt. Im Vergleich zum hyperbolen Verlauf der Produktkonzentration im kleinen Maßstab in Reaktion M5, konnte im Rührkesselreaktor in Reaktion R1 ein linearer Anstieg der Produktkonzentration beobachtet werden. Der Vergleich mit den Beobachtungen in Kapitel 3.2.3 (Seite 61) ermöglicht die Vermutung, dass die Reaktion durch die Sauerstoffdiffusion limitiert ist. Aus technischen Gründen konnten die Reaktionen im Rührkesselreaktor nicht über einen längeren Zeitraum beobachtet werden, sodass die Berechnung der Ausbeute und der TTN lediglich auf den Zeitraum bezogen werden kann, an dem die Reaktionen abgebrochen wurden. Zu dem Zeitpunkt, an dem die Reaktion abgebrochen wurde, war noch keine Inaktivierung der sMMO erkennbar. Die Werte für die Ausbeute und die TTN waren im Rührkesselreaktor aufgrund des frühzeitigen Abbruchs etwas geringer als im 4-mL-Maßstab.

Im Rührkesselreaktor konnte der Umsatz über einen Zeitraum von sechs Stunden gezeigt werden (Reaktion R1), während im 4-mL-Maßstab die Produktkonzentration bereits nach 4,5 Stunden ein Maximum erreichte und stagnierte (Reaktion M5). Möglicherweise stellt der Sauerstoffmangel im Hinblick auf die Enzymstabilität einen Vorteil dar, indem inaktivierende Nebenreaktionen, wie die Bildung von H_2O_2 verringert werden.

Die höchste Produktausbeute im Rührkesselreaktor konnte in Reaktion R2 erreicht werden. 36 % des eingesetzten Realprobengemisches wurden enzymatisch umgesetzt. Die höchste Phenolkonzentration konnte mit 2,7 mM in Reaktion R2 erreicht werden. 89 mg Phenol wurden in einem kombinatorischen Ansatz aus Chemo- und Biokatalyse mit Methan als Ausgangsstoff produziert. Der Einsatz der sMMO als Biokatalysator zur Aufwertung der Produkte aus der Methankupplung konnte demonstriert werden.

Die industrielle Herstellung von Phenol findet über den mehrstufigen Hock-Prozess statt (siehe Kapitel 1.1.1.2, Seite 2). Dieser erreicht eine Phenolausbeute von 85 % bezogen auf die eingesetzte Benzolmenge [University-of-York, 2017]. Die direkte chemische Hydroxylierung von Benzol zu Phenol, wie in der Einleitung (Kapitel 1.1.1.1, Seite 1) beschrieben, ist hingegen schwer kontrollierbar und liefert geringe Ausbeuten. Für die direkte Hydroxylierung bietet die Selektivität enzymatisch katalysierter Reaktionen eine vielversprechende Alternative. Konzepte für biotechnische Prozesse zur Benzolhydroxylierung sind bisher nur wenig beschrieben. In Kapitel 1.1.4 (Seite 3) sind verschiedene Enzyme vorgestellt, die in der Lage sind, aromatische Moleküle selektiv zu hydroxylieren. Für die Hydroxylierung von Benzol zu Phenol bietet sich ein Vergleich mit der Toluol-4-Monooxygenase (T4MO) an. Tao *et al.* nutzen T4MO exprimierende *E. coli*-Zellen und entwickelten ein Reaktionssystem zur selektiven Hydroxylierung von Benzol zu Phenol und von Naphthalin zu 2-Naphthol. Um die Toxizität der Substrate zu verringern wurde Dioctylphthalat als organische Phase eingesetzt und diente als Substrat- und Produktreservoir. Mit diesem System konnten jeweils 12 % des eingesetzten Naphthalins und 51 % des eingesetzten Benzols umgesetzt werden. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurde mit Dioctylphthalat ein organisches Lösungsmittel gewählt, welches auch als Produktreservoir dient. Das gebildete Phenol geht von der wässrigen Phase in die organische Phase über. Dadurch konnte in der Arbeit von Tao *et al.* eine Hydroxylierung des Phenols verhindert und eine Produktspezifität von 97 % erreicht werden. Als sekundäres Hydroxylierungsprodukt wurden geringe Mengen Brenzkatechin detektiert [Tao *et*

al., 2005]. In der vorliegenden Arbeit konnte in Kapitel 3.5.2.2 (Seite 83) beim Umsatz von Benzol in dem 2-Phasen-System eine deutlich höhere Ausbeute (98 %) erreicht werden. Auch beim Umsatz von Naphthalin in Kapitel 3.5.3 (Seite 87) konnte mit 30 % eine höhere Ausbeute erreicht werden. Da Tao *et al.* jedoch höhere Substratmengen einsetzten, waren auch die erreichten Produktmengen der Ganzzell-Katalyse höher. In einem Volumen von 40 mL konnten aus 122 mg Benzol 52,5 mg Phenol gebildet werden [Tao *et al.*, 2005]. Die T4MO wurde bezüglich der Oxidation von Ethylen zu Ethylenoxid bisher nicht untersucht. Aufgrund dessen und der Tatsache, dass die T4MO über eine im Vergleich zur sMMO noch komplexere Struktur verfügt [Pikus *et al.*, 1996], wurde sie in der vorliegenden Arbeit für die *in-vitro*-Katalyse mit isolierten Enzymen nicht in Betracht gezogen.

Den Einsatz von gereinigten Enzymen zur selektiven Hydroxylierung von Aromaten beschrieben auch Schmid und Kollegen 2001 [Schmid *et al.*, 2001]. Sie entwickelten eine Enzymkaskade aus rekombinant produzierter 2-Hydroxybiphenyl-3-Monooxygenase (HbpMO) aus *Pseudomonas azelaica* und einer Formiatdehydrogenase zur Cofaktorregenerierung. Diese wurde in einem 200 mL Rührkesselreaktor zur Hydroxylierung von 2-Hydroxybiphenyl zu 2,3-Dihydroxybiphenyl eingesetzt. Als Substrat- und Produktreservoir diente eine organische Phase aus 1-Decanol. Indem das gebildete Produkt aus der wässrigen in die organische Phase extrahiert wurde, konnte über einen Zeitraum von sieben Stunden eine Produktivität von $0,45 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ aufrecht gehalten werden [Schmid *et al.*, 2001]. Umgerechnet entspricht dies einer Raum-Zeit-Ausbeute von $40 \text{ } \mu\text{M}/\text{min}$. Um diese Daten mit den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit zu vergleichen, wurde für die Reaktion R1 (Abbildung 3.35A, Seite 98) mit nahezu linearem Anstieg der Produktkonzentration eine Raum-Zeit-Ausbeute bestimmt. Diese ist mit $10 \text{ } \mu\text{M}/\text{min}$ geringer als die der HbpMO.

Die vorliegende Arbeit fügt dem Wissensstand ein weiteres Konzept zur biokatalytischen Produktion hydroxylierter Aromaten hinzu. Das breite Substratspektrum der sMMO wurde genutzt und das häufig beschriebene Anwendungspotenzial der sMMO wurde mit belastbaren Ergebnissen belegt. Basierend auf bestehenden Konzepten wurden Reaktionssysteme an die benötigten Bedingungen der sMMO angepasst und es wurde der Einsatz gereinigter sMMO als Biokatalysator zur Herstellung von verschiedenen Produkten gezeigt. Das eingesetzte Reaktionssystem ermöglicht die Kombination von Chemo- und Biokatalyse, wobei die Zwischenprodukte aus der chemischen Methankupplung verlustfrei in die Reaktion zur biokatalytischen Hydroxylierung transferiert werden können.

4.7 Rationales Design von Varianten des regulatorischen Protein B

In der vorliegenden Arbeit wurden unter anderem Reaktionssysteme zum biotechnologischen Einsatz der sMMO optimiert. Eine Alternative stellt die Anpassung der sMMO als Biokatalysator an dem Transformationsprozess dar. Mittels *Proteinengineering* wurden Untersuchungen zur Verbesserung der Enzymaktivität der sMMO und zur Erhöhung des Umsatzes durchgeführt.

Die Interaktion des regulatorischen Protein B (MMOB) mit der Hydroxylase (MMOH) spielt eine wichtige Rolle im Katalysemechanismus und führt zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung (Kapitel 1.1.6.2, Seite 7). Aminosäuren des MMOB, die an der Interaktion mit der MMOH beteiligt sind und den Zugang von Substraten kontrollieren, wurden identifiziert (Abbildung 1.2B, Seite 8). Mittels rationalen Enzymdesigns wurden Varianten des regulatori-

schen Protein B entwickelt, die zur Steigerung der sMMO-Aktivität führen sollten (Kapitel 3.7.1, Seite 100). Auf Basis von Literaturdaten wurden die Aminosäuren S109 und T111 ausgewählt und durch Austausch insgesamt acht Varianten generiert (Tabelle 3.14, Seite 102). Die spezifische Aktivität der Varianten wurde mit dem Modellsubstrat Nitrobenzol bestimmt (Abbildung 3.37, Seite 102). Für die Varianten MMOB01 (S109A/T111A) und MMOB05 (T111A) wurde bereits von Brazeau *et al.* ein positiver Effekt auf die Reaktionsgeschwindigkeit des Nitrobenzolumsatzes beschrieben [Brazeau und Lipscomb, 2003]. In der vorliegenden Arbeit konnte der positive Effekt des Austausches S109A/T111A in Variante MMOB01 bestätigt werden. Die resultierende sMMO-Aktivität ist um 20 % höher. Entgegen den Erwartungen führte der Austausch T111A in Variante MMOB05 in der vorliegenden Arbeit zu einer um 70 % geringeren sMMO-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp unter den gleichen Reaktionsbedingungen. MMOB05 war die einzige Variante, bei der eine deutliche Aktivitätssteigerung beobachtet werden konnte, nachdem das stöchiometrische Verhältnis der sMMO-Komponenten von MMOH:MMOB:MMOR = 1:1:1 auf 1:2:1 erhöht wurde. Vermutlich wurde die Affinität von MMOB zu MMOH durch den Austausch T111A verringert. Nach Verdopplung der MMOB-Konzentration im Reaktionsansatz war die sMMO-Aktivität vergleichbar mit dem Wildtyp.

Eine verringerte Aktivität zeigen auch die Varianten MMOB02 (S109A/T111G) und MMOB06 (T111G). Beide Varianten besitzen Glycin an Position 111. Brazeau und Lipscomb zeigten, dass die große aromatisch Aminosäure wie Tyrosin an Position 111 einen negativen Einfluss auf die sMMO-Aktivität hat [Brazeau und Lipscomb, 2003]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass auch der Austausch zu Glycin ohne Seitenkette einen negativen Einfluss hat. In diesem Fall ist nicht die Affinität, sondern die Wechselzahl k_{cat} verringert. Die Aktivität ließ sich nicht durch eine Erhöhung der MMOB-Konzentration steigern.

Eine kurze Aminosäureseitenkette, wie Threonin selbst, scheint an der Position 111 essenziell zu sein. Sowohl polare (Serin) als auch unpolare Seitenketten (Alanin/Valin) haben einen positiven Effekt. Die höchste sMMO-Aktivität für das Modellsubstrat Nitrobenzol wurde mit der Variante MMOB04 (S109A/T111V) gemessen. Deswegen wurde diese Variante ausgewählt und der Umsatz der Substrate Benzol und Naphthalin im Vergleich zum Wildtyp-MMOB betrachtet.

Es konnte gezeigt werden, dass die Variante MMOB04 trotz erhöhter initialer Aktivität über einen längeren Zeitraum nicht zu höheren Umsätzen von Benzol bzw. Naphthalin führte (Abbildung 3.38 und Abbildung 3.39, Seite 103). Unabhängig vom Substrat scheint die Variante MMOB04 (S109A/T111V) in größerem Maße Aktivität zu verlieren, sodass mit dem Wildtyp in dem untersuchten Reaktionszeitraum mehr Produkt gebildet werden konnte. Auffällig ist jedoch, dass der Anteil an dihydroxylierten Produkten mit der MMOB04-Variante geringer ist. Möglicherweise führt die hydrophobe Seitenkette Valin im Vergleich zur polaren Seitenkette Threonin an Position 111 dazu, dass der Zugang einfach hydroxylierter Substrate wie Phenol und Naphthol zum aktiven Zentrum der MMOH eingeschränkt wird. Die Vermutung wird durch Ergebnisse von Zhang und Kollegen gestützt, nach denen das MMOB den Zugang zum Substratkanal der MMOH reguliert [Zhang *et al.*, 2006].

Die mittels rationalen Enzymdesigns entworfenen Varianten von MMOB führten nicht zu einer höheren Produktausbeute. Deshalb wurden die MMOB-Varianten nicht in weiteren Experimenten für die enzymatische Produktion von Phenol, Naphthol und Ethylenoxid eingesetzt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vertiefen das Verständnis über die Interaktion des MMOB und der MMOH und den regulierenden Einfluss auf den Substratzugang.

5 Zusammenfassung

Ziel des Projekts, in welches die vorliegende Arbeit eingebunden ist, war die Kombination aus Chemo- und Biokatalyse zur Aufwertung von Methan zu den Produkten Phenol, Naphthol und Ethylenoxid. Beteiligt waren an dem Projekt das Leibniz Institut für Katalyse (LIKAT) in Rostock, das Fraunhoferinstitut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik in Stuttgart und die Arbeitsgruppe „Aufarbeitung biotechnischer Produkte“ der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Mittels chemischer Methandehydroaromatisierung sollte aus Methan zunächst ein intermediäres Produktgemisch aus Benzol, Naphthalin und Ethylen gebildet werden. Im Anschluss sollten diese Zwischenprodukte biokatalytisch, selektiv oxidiert werden. Als ein Enzym, welches in der Lage ist, das flüssige Benzol, das feste Naphthalin und das gasförmige Ethylen zu hydroxylieren, wurde die lösliche Methanmonooxygenase (sMMO) aus *Methylosinus trichosporium* OB3b (NCIMB 11131) identifiziert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte das große Potenzial der sMMO genutzt und Reaktionssysteme zur biokatalytischen Produktion von Phenol, Naphthol und Ethylenoxid entwickelt werden.

Dazu wurden gereinigte sMMO-Komponenten jeweils im Gramm-Maßstab bereitgestellt. Basierend auf etablierten Protokollen wurden die Produktions- und Reinigungsstrategien der sMMO-Komponenten angepasst und verbessert. Die Hydroxylase (MMOH) wurde homolog aus *Methylosinus trichosporium* OB3b isoliert. Die Produktion der Reduktase (MMOR) und des regulatorischen Protein B (MMOB) erfolgte jeweils rekombinant in *Escherichia coli*. Im Vergleich zur Literatur konnte die Ausbeute an gereinigtem Protein, bezogen auf die eingesetzte Biomasse, für MMOH um den Faktor 2,6, für MMOR um den Faktor 24, und die Ausbeute für MMOB um den Faktor 3,2 erhöht werden.

Mit Hilfe des Modellsubstrats Nitrobenzol wurde der enzymatische Umsatz der sMMO untersucht. Umsatzlimitierende Faktoren wurden identifiziert und Strategien zur Steigerung der maximalen Zykluszahl des Enzyms (*total turnover number*, TTN) und der Produktausbeute entwickelt. Die bereits beschriebene Enzymkaskade aus Glucosedehydrogenase zur Regenerierung des Cofaktors NADH und Katalase zur Disproportionierung des inhibitorischen Nebenprodukts H_2O_2 wurde integriert und optimiert. Die Verfügbarkeit des gasförmigen Substrats Sauerstoff stellte sich ebenfalls als limitierender Faktor heraus. Nach Anpassung der Enzym- und Substratkonzentrationen konnte die TTN um den Faktor 6 und die maximal erreichte Produktkonzentration um den Faktor 32 gesteigert werden.

Nach der Optimierung der Prozessbedingungen sollte auch der Biokatalysator angepasst werden, um höhere Aktivitäten und Ausbeuten zu erreichen. Mittels rationalen Enzymdesigns wurden Varianten von MMOB generiert. Der Austausch der Aminosäuren S109A und T111V führte zu einer höheren initialen sMMO-Aktivität und einer leicht veränderten Produktspezifität. Die finalen Produktausbeuten konnten dadurch jedoch nicht erhöht werden.

Für den Umsatz der Zielsubstrate Benzol, Naphthalin und Ethylen wurden zunächst die makroskopischen enzymkinetischen Parameter $V_{\max}$, K_M und k_{cat} der sMMO ermittelt. Für das Substrat Benzol konnte zudem eine Substratüberschusshemmung festgestellt werden. Basierend auf den bisherigen Ergebnissen wurden die Reaktionssysteme für das jeweilige Zielsubstrat optimiert.

Der enzymatische Umsatz von Ethylen wurde zunächst in einem 10 mL-Ansatz gezeigt. Anschließend konnten in einem 700 mL-Membranreaktor (MBR) 1 mM bzw. 33,3 mg Ethylenoxid biokatalytisch produziert werden. Der MBR stellt ein geeignetes System zum Umsatz des gasförmigen Substrats Ethylen dar und verhindert die Bildung explosiver Gasgemische. Die Adsorption essenzieller Proteinkomponenten an Membran- und Kunststoffoberflächen

und die damit einhergehende Inaktivierung der sMMO konnte durch Zusatz von Rinderserumalbumin verhindert werden.

Der sMMO-katalysierte Umsatz von Benzol wurde zunächst in einem gerührten 4 mL-*batch*-Ansatz durchgeführt. Wie erwartet wurde Benzol zu Phenol und teilweise weiter zu Hydrochinon hydroxyliert. Die Produktverteilung konnte zugunsten des gewünschten Produkts Phenol verändert werden, wenn die ausreichende Verfügbarkeit von Benzol im Reaktionsverlauf garantiert war. Zur Vermeidung hoher Benzolkonzentration, die zu einer Substratüberschusshemmung führen, bei gleichzeitig konstantem Benzol-Nachschub, wurde ein 2-Phasen-System aus einer organischen und einer wässrigen Phase entwickelt. *n*-Decan als organische Phase diente als Substratreservoir und ermöglichte die notwendige Diffusion von Benzol in die wässrige Phase, in der der enzymatische Umsatz stattfand. In diesem System konnten maximale Konzentrationen von 6,8 mM Phenol und 3,4 mM Hydrochinon und eine Produktausbeute von 98 % erreicht werden.

Der Umsatz von Naphthalin wurde ebenfalls im 4 mL-*batch*-Ansatz gezeigt. Naphthalin wurde durch die sMMO zu 1- und 2-Naphthol in einem Verhältnis von 3:2, sowie zu weiteren dihydroxylierten Naphthalinisomeren umgesetzt. Die höchsten Naphtholkonzentrationen konnten in einer gesättigten Substratlösung erreicht werden. Es konnten 1,6 mM 1-Naphthol und 0,9 mM 2-Naphthol mit einer Produktausbeute von 30 % enzymatisch synthetisiert werden.

Basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen und mit dem Fokus auf Phenol als Zielprodukt, konnte schließlich die enzymatische Hydroxylierung mit der chemokatalytischen Methanakupplung verknüpft werden. Vom Projektpartner LIKAT wurde nach der Methandehydroaromatisierung ein Produktgemisch aus Benzol, Naphthalin, Toluol und Spuren weiterer polyzyklischer Aromaten kondensiert und in dem ausgewählten organischen Lösungsmittel *n*-Decan für die biokatalytische Hydroxylierung bereitgestellt. Der enzymatische Umsatz dieses Gemisches konnte in dem 2-Phasen-System gezeigt werden. Anschließend wurde der Maßstab von 4 mL auf 350 mL vergrößert und es konnten in einem Rührkesselreaktor 15 - 37 % des chemokatalytisch gewonnenen Substratgemisches umgesetzt werden. In einer Reaktion wurden dabei 89 mg Phenol, 13,9 mg Hydrochinon und 1,9 mg Benzylalkohol enzymatisch hergestellt. In Zusammenarbeit mit den Projektpartnern konnte somit die Kombination aus Chemo- und Biokatalyse gezeigt werden und Methan zu Phenol und anderen hydroxylierten Aromaten umgesetzt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Potenzial der sMMO für biotechnische Anwendungen demonstriert. Ansatzpunkte und Strategien für eine zukünftige technische Nutzung der sMMO konnten weiterentwickelt werden. Die sMMO wurde erstmals als Biokatalysator in Prozessen zur Produktion von Phenol, Naphthol und Ethylenoxid eingesetzt.

6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte das Potenzial der sMMO für biotechnologische Anwendungen demonstriert werden. Es wurden jedoch auch Limitierungen deutlich, die Ansatzpunkte für eine Optimierung des Biotransformationsprozesses darstellen.

Produktions- und Reinigungsstrategien zur Bereitstellung der sMMO-Komponenten wurden in der vorliegenden Arbeit verbessert. Eine rekombinante Produktion aktiver MMOH konnte bisher jedoch nicht mit ausreichender Aktivität gezeigt werden. Eine heterologe Produktion in einem Organismus, für den diverse Methoden zur genetischen Modifikation bereits etabliert sind, würde Möglichkeiten zur zielgerichteten oder *random*-Mutagenese vereinfachen.

Die Akkumulation des inhibitorischen Nebenprodukts H_2O_2 ist ein wesentlicher limitierender Faktor des enzymatischen Umsatzes der sMMO. Ein rekombinanter Zugang zur MMOH würde die Modifikation des aktiven Zentrums vereinfachen. Möglicherweise ließe sich dadurch die H_2O_2 -Bildung verringern oder vermeiden. Außerdem könnten kinetische Eigenschaften optimiert und die Stabilität der MMOH erhöht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde Katalase eingesetzt, um das gebildete H_2O_2 zu H_2O und O_2 zu spalten. Alternativ könnten Peroxygenasen eingesetzt werden, die H_2O_2 nutzen und in der Lage sind, ebenfalls Kohlenwasserstoffe zu hydroxylieren. Auf diese Weise könnte das Nebenprodukt der sMMO ebenfalls zur Bildung der Zielprodukte genutzt werden.

Ein weiterer reaktionsrelevanter Faktor ist die Verfügbarkeit von Sauerstoff in der Reaktionslösung. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rührgeschwindigkeit erhöht, um den Sauerstoffeintrag zu verbessern. In den Versuchen zum Umsatz von Ethylen, wurde mit höheren Partialdrücken von Sauerstoff gearbeitet. Es wurde jedoch nicht untersucht, welchen Einfluss eine höhere Sauerstoffkonzentration in der Lösung auf die sMMO hat. Auch in der Literatur ist darüber bisher wenig beschrieben. Die Sauerstoffkonzentration in der Lösung könnte über den Partialdruck in der Gasphase angepasst werden und das Reaktionssystem dahingehend optimiert werden, dass die Sauerstofftransfertrate verbessert wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte die sMMO-Aktivität über einen Zeitraum von bis zu sechs Stunden gezeigt werden. Die Entkopplung des Elektronentransfers von der Zielproduktbildung ist ein wesentlicher Grund für die Inaktivierung der sMMO. Möglicherweise ließe sich die Kopplungseffizienz durch bestimmte Prozessparameter oder Reaktionszusätze weiter verbessern. Andere inhibierende oder destabilisierende Faktoren könnten identifiziert werden, um gezielte Maßnahmen zur Steigerung der Reaktionszeit und Prozessstabilität zu entwickeln.

In der vorliegenden Arbeit wurde *n*-Decan als organische Phase eingesetzt, die als Substratreservoir dient. Die Produkte der Reaktion waren nur geringfügig löslich in *n*-Decan und wurden dem Reaktionssystem dadurch nicht entzogen. Die Zusammensetzung der organischen Phase sollte in künftigen Experimenten optimiert werden, um sowohl einen Nachschub der Substrate als auch eine kontinuierliche Abtrennung der Produkte zu ermöglichen. Dadurch könnte eine potenzielle Inhibierung durch die Akkumulation von Produkten vermieden werden. Eine kontinuierliche Abtrennung der Reaktionsprodukte könnte auch eine Weiterhydroxylierung der Produkte verhindern.

Als Alternative zum 2-Phasen-System wäre eine kontinuierliche Reaktionsführung durch die Immobilisierung der Enzyme denkbar. Da die Enzymkaskade aus mehreren Enzymen besteht und eine Interaktion der einzelnen sMMO-Proteine nötig ist, bietet sich der Einschluss der gesamten Kaskade in Gelstrukturen oder Mikrokapseln an. Im Gegensatz zu kovalenten

Bildung an ein festes Trägermaterial, könnte durch den Einschluss die benötigte Mobilität der einzelnen Proteine garantiert werden (siehe Einleitung 1.1.8.1, Seite 14).

Konzepte zur biotechnologischen Anwendung werden auch mit sMMO-bildenden Methanotrophen als Ganzzell-Katalysator intensiv erforscht. Die in der vorliegenden Arbeit entwickelten Reaktionssysteme könnten auch für die Optimierung solcher Ganzzell-basierten Bio-transformationsprozesse interessante Ansatzpunkte liefern, um beispielsweise die Substratverfügbarkeit zu garantieren.

Die Kombination von Chemo- und Biokatalyse ist ein vielversprechender Ansatz, um die Vorteile beider Gebiete für Produktionsprozesse zu nutzen. Die Chemokatalyse zeichnet sich häufig durch hohe Umsatzraten aus, während die Biokatalyse sehr spezifisch und ressourcenarm erfolgen kann. In dem Projekt, in welches die vorliegende Arbeit eingebunden ist, wurde durch diesen kombinatorischen Ansatz Phenol aus Biogas hergestellt. Phenol ist eine *bulk*-Chemikalie und wird zur Herstellung hochwertiger Produkte eingesetzt. Die Spezifität der enzymatisch katalysierten Reaktionen könnte auch genutzt werden, um Feinchemikalien herzustellen, die rein chemisch nur schwer in Reinform produziert werden können. Diese sind deutlich teurer, wodurch eine höhere Wertschöpfung erreicht werden kann.

7 Literatur

- Adegbola, O. (2008). "High cell density methanol cultivation of *Methalosinus trichosporium* OB3b," Department of Chemical Engineering, Queen's University Kingston, Ontario.
- Akasaka, R., Mashino, T. und Hirobe, M. (1995). "Hydroxylation of benzene by horseradish peroxidase and immobilized horseradish peroxidase in an organic solvent." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **5**, 1861-1864.
- AlSayed, A., Fergala, A., Khattab, S., ElSharkawy, A. und Eldyasti, A. (2018). "Optimization of methane bio-hydroxylation using waste activated sludge mixed culture of type I methanotrophs as biocatalyst." *Applied Energy*, **211**, 755-763.
- Amghizar, I., Vandewalle, L. A., Van Geem, K. M. und Marin, G. B. (2017). "New trends in olefin production." *Engineering*, **3**, 171-178.
- Amin, S., Barnett, G. V., Pathak, J. A., Roberts, C. J. und Sarangapani, P. S. (2014). "Protein aggregation, particle formation, characterization & rheology." *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **19**, 438-449.
- Andersson, M. M. und Hatti-Kaul, R. (1999). "Protein stabilising effect of polyethyleneimine." *J Biotechnol*, **72**, 21-31.
- Andrés, I. (1999). "Stability of biocatalysts." *Electronic Journal of Biotechnology*; Vol 2, No 1 (1999).
- Antonini, E., Carrea, G. und Cremonesi, P. (1981). "Enzyme catalysed reactions in water - Organic solvent two-phase systems." *Enzyme and Microbial Technology*, **3**, 291-296.
- Aratani, Y., Yamada, Y. und Fukuzumi, S. (2015). "Selective hydroxylation of benzene derivatives and alkanes with hydrogen peroxide catalysed by a manganese complex incorporated into mesoporous silica-alumina." *Chemical Communications*, **51**, 4662-4665.
- Arnold, D., Plank, C., Erickson, E. und Pike, F. (1958). "Solubility of Benzene in Water." *Industrial & Engineering Chemistry Chemical and Engineering Data Series*, **3**, 253-256.
- Atkins, P. W., Paula, J. und Keeler, J. (2018). "Atkins' physical chemistry." Eleventh edition ed., Oxford University Press, Oxford; New York, 908.
- Au, S. K., Bommarius, B. R. und Bommarius, A. S. (2014). "Biphasic Reaction System Allows for Conversion of Hydrophobic Substrates by Amine Dehydrogenases." *ACS Catalysis*, **4**, 4021-4026.
- Baekeland, L. H. (1909). *Chemiker-Zeitung*, **33**.
- Bagnéris, C., Cammack, R. und Mason, J. R. (2005). "Subtle Difference between Benzene and Toluene Dioxygenases of *Pseudomonas putida*." *Appl Environ Microbiol*, **71**, 1570.
- Ballou, D. P., Entsch, B. und Cole, L. J. (2005). "Dynamics involved in catalysis by single-component and two-component flavin-dependent aromatic hydroxylases." *Biochem Biophys Res Commun*, **338**, 590-598.

- Bamoniri, A., Pourali, A. R. und Nazifi, S. M. R. (2013). "Facile synthesis of 1-naphthol azo dyes with nano SiO₂/HIO₄ under solvent-free conditions." *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, **27**, 439-445.
- Banerjee, R., Jones, J. C. und Lipscomb, J. D. (2019). "Soluble Methane Monooxygenase." *Annual review of biochemistry*.
- Banerjee, R., Meier, K. K., Münck, E. und Lipscomb, J. D. (2013). "Intermediate P* from soluble methane monooxygenase contains a diferrous cluster." *Biochemistry*, **52**, 4331-4342.
- Beer. (1852). "Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten." *Annalen der Physik*, **162**, 78-88.
- Bennett, D. und Canady, W. J. (1984). "Thermodynamics of solution of naphthalene in various water-ethanol mixtures." *Journal of the American Chemical Society*, **106**, 910-915.
- Bennett, K., Sadler, N. C., Wright, A. T., Yeager, C. und Hyman, M. R. (2016). "Activity-based protein profiling of ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*." *Applied and environmental microbiology*, **82**, 2270-2279.
- Berg, J. M. und Tymoczko, J. L. (2018). "Stryer biochemie." Springer, 8.
- Bergman, R. G. (2007). "C–H activation." *Nature*, **446**, 391.
- Bisogno, F. R., Rioz-Martínez, A., Rodríguez, C., Lavandera, I., de Gonzalo, G., Torres Pazmiño, D. E., et al. (2010). "Oxidoreductases Working Together: Concurrent Obtaining of Valuable Derivatives by Employing the PIKAT Method." *ChemCatChem*, **2**, 946-949.
- Bisswanger, H. (2014). "Enzyme assays." *Perspectives in Science*, **1**, 41-55.
- Blanksby, S. J. und Ellison, G. B. (2003). "Bond Dissociation Energies of Organic Molecules." *Acc Chem Res*, **36**, 255-263.
- Booth, G. (2000). "Naphthalene Derivatives." *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*.
- Bornscheuer, U. T., Huisman, G. W., Kazlauskas, R. J., Lutz, S., Moore, J. C. und Robins, K. (2012). "Engineering the third wave of biocatalysis." *Nature*, **485**, 185-194.
- Borodina, E., Nichol, T., Dumont, M. G., Smith, T. J. und Murrell, J. C. (2007). "Mutagenesis of the "leucine gate" to explore the basis of catalytic versatility in soluble methane monooxygenase." *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 6460-6467.
- Bosse-Doenecke, E., Weininger, U., Gopalswamy, M., Balbach, J., Knudsen, S. M. und Rudolph, R. (2008). "High yield production of recombinant native and modified peptides exemplified by ligands for G-protein coupled receptors." *Protein Expression and Purification*, **58**, 114-121.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem*, **72**, 248-54.
- Branchaud, B. P. (2000). "Heme Peroxidases By H. Brian Dunford (University of Alberta)." *J Am Chem Soc*, **122**, 7434-7434.

- Brazeau, B. J. und Lipscomb, J. D. (2003). "Key Amino Acid Residues in the Regulation of Soluble Methane Monooxygenase Catalysis by Component B." *Biochemistry*, **42**, 5618-5631.
- Breitbarth, E., Mills, M. M., Friedrichs, G. und LaRoche, J. (2004). "The Bunsen gas solubility coefficient of ethylene as a function of temperature and salinity and its importance for nitrogen fixation assays." *Limnology and Oceanography: Methods*, **2**, 282-288.
- Bretscher, H., Eigenmann, G. und Plattner, E. (1978). "Integrierte Verfahrensentwicklung am Beispiel der Naphthalinsulfonsäurederivate." *Chimia*, **32**, 180.
- Bruggink, A., Schoevaart, R. und Kieboom, T. (2003). "Concepts of Nature in Organic Synthesis: Cascade Catalysis and Multistep Conversions in Concert." *Organic Process Research & Development*, **7**, 622-640.
- Brusseau, G. A., Tsien, H.-C., Hanson, R. S. und Wackett, L. P. (1990). "Optimization of trichloroethylene oxidation by methanotrophs and the use of a colorimetric assay to detect soluble methane monooxygenase activity." *Biodegradation*, **1**, 19-29.
- Burek, B. O., Bormann, S., Hollmann, F., Bloh, J. Z. und Holtmann, D. (2019). "Hydrogen peroxide driven biocatalysis." *Green Chemistry*, **21**, 3232-3249.
- Çalik, P., Yilgör, P., Ayhan, P. und Demir, A. S. (2004). "Oxygen transfer effects on recombinant benzaldehyde lyase production." *Chemical engineering science*, **59**, 5075-5083.
- Callaghan, A. J., Smith, T. J., Slade, S. E. und Dalton, H. (2002). "Residues near the N-terminus of protein B control autocatalytic proteolysis and the activity of soluble methane monooxygenase." *European journal of biochemistry*, **269**, 1835-1843.
- Calysta-Inc. (2020). www.calysta.com. (Zugriff: 20.10.2021)
- Carlin, D., Bertolani, S. und Siegel, J. (2015). "Biocatalytic conversion of ethylene to ethylene oxide using an engineered toluene monooxygenase." *Chemical Communications*, **51**, 2283-2285.
- Chan, S. I., Chang, W.-H., Huang, S.-H., Lin, H.-H. und Yu, S. S. F. (2021). "Catalytic machinery of methane oxidation in particulate methane monooxygenase (pMMO)." *Journal of Inorganic Biochemistry*, **225**, 111602.
- Chang, S.-L., Wallar, B. J., Lipscomb, J. D. und Mayo, K. H. (1999). "Solution Structure of Component B from Methane Monooxygenase Derived through Heteronuclear NMR and Molecular Modeling." *Biochemistry*, **38**, 5799-5812.
- Chatwood, L. L., Mueller, J., Gross, J. D., Wagner, G. und Lippard, S. J. (2004). "NMR Structure of the Flavin Domain from Soluble Methane Monooxygenase Reductase from *Methylococcus capsulatus* (Bath)." *Biochemistry*, **43**, 11983-11991.
- Chaudhary, A. (2021). "Recent development in the synthesis of heterocycles by 2-naphthol-based multicomponent reactions." *Molecular Diversity*, **25**, 1211-1245.
- Chmiel, H., Takors, R. und Weuster-Botz, D. (2018). "Bioprozesstechnik." Springer.
- Colby, J. und Dalton, H. (1978). "Resolution of the methane mono-oxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath) into three components. Purification and properties of component C, a flavoprotein." *Biochemical Journal*, **171**, 461.

- Colby, J. und Dalton, H. (1979). "Characterization of the second prosthetic group of the flavoenzyme NADH-acceptor reductase (component C) of the methane mono-oxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath)." *The Biochemical journal*, **177**, 903-908.
- Colby, J., Stirling, D. I. und Dalton, H. (1977). "The soluble methane mono-oxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath). Its ability to oxygenate *n*-alkanes, *n*-alkenes, ethers, and alicyclic, aromatic and heterocyclic compounds." *The Biochemical journal*, **165**, 395-402.
- Collin, G. und Höke, H. (2000). "Naphthalene and hydronaphthalenes." *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*.
- Collins, T., Azevedo-Silva, J., da Costa, A., Branca, F., Machado, R. und Casal, M. (2013). "Batch production of a silk-elastin-like protein in *E. coli* BL21(DE3): key parameters for optimisation." *Microbial Cell Factories*, **12**, 21.
- Condon, M. E., Cimarusti, C. M., Fox, R., Narayanan, V. L., Reid, J., Sundeen, J. E., et al. (1978). "Nondepressant .beta.-adrenergic blocking agents. 1. Substituted 3-amino-1-(5,6,7,8-tetrahydro-1-naphthoxy)-2-propanols." *Journal of Medicinal Chemistry*, **21**, 913-922.
- Considine, D. M. und Considine, G. D. (2013). "Van Nostrand's scientific encyclopedia." Springer Science & Business Media.
- Conway, R. A., Waggy, G. T., Spiegel, M. H. und Berglund, R. L. (1983). "Environmental fate and effects of ethylene oxide." *Environ Sci Technol*, **17**, 107-112.
- Cornils, B. und Herrmann, W. A. (2003). "Concepts in homogeneous catalysis: the industrial view." *Journal of Catalysis*, **216**, 23-31.
- Cornish, A., Nicholls, K. M., Scott, D., Hunter, B. K., Aston, W. J., Higgins, I. J., et al. (1984). "In vivo ¹³C NMR Investigations of Methanol Oxidation by the Obligate Methanotroph *Methylosinus trichosporium* OB3b." *Microbiology*, **130**, 2565-2575.
- Coufal, D. E., Blazyk, J. L., Whittington, D. A., Wu, W. W., Rosenzweig, A. C. und Lippard, S. J. (2000). "Sequencing and analysis of the *Methylococcus capsulatus* (bath) soluble methane monooxygenase genes." *Eur. J. Biochem.*, **267**, 2174-2185.
- Dalton, H., Golding, B. T., Waters, B. W., Higgins, R. und Taylor, J. A. (1981). "Oxidations of cyclopropane, methylcyclopropane, and arenes with the mono-oxygenase system from *Methylococcus capsulatus*." *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 482-483.
- Datta, S., Christena, L. R. und Rajaram, Y. R. S. (2013). "Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials." *3 Biotech*, **3**, 1-9.
- Davico, G. E., Bierbaum, V. M., DePuy, C. H., Ellison, G. B. und Squires, R. R. (1995). "The C-H Bond Energy of Benzene." *J Am Chem Soc*, **117**, 2590-2599.
- Davies, J. I. und Evans, W. C. (1964). "Oxidative metabolism of naphthalene by soil pseudomonads. The ring-fission mechanism." *The Biochemical journal*, **91**, 251-261.
- Dubbels, B. L., Sayavedra-Soto, L. A. und Arp, D. J. (2007). "Butane monooxygenase of *Pseudomonas butanovora*: purification and biochemical characterization of a terminal-alkane hydroxylating diiron monooxygenase." *Microbiology*, **153**, 1808-1816.

- Eckerman, I. (2005). "THE BHOPAL SAGA Causes and Consequences of the World's Largest Industrial Disaster."
- Elango, N. A., Radhakrishnan, R., Froland, W. A., Wallar, B. J., Earhart, C. A., Lipscomb, J. D., *et al.* (1997). "Crystal structure of the hydroxylase component of methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b." *Protein Science*, **6**, 556-568.
- Estabrook, R. W. (2003). "A Passion For P450s (Remembrances of the Early History of Research on Cytochrome P450)." *Drug Metabolism and Disposition*, **31**, 1461.
- Farell, E. M. und Alexandre, G. (2012). "Bovine serum albumin further enhances the effects of organic solvents on increased yield of polymerase chain reaction of GC-rich templates." *BMC research notes*, **5**, 257-257.
- Feller, G. (2010). "Protein stability and enzyme activity at extreme biological temperatures." *Journal of Physics: Condensed Matter*, **22**, 323101.
- Fernandes, P. und Cabral, J. M. S. (2008). "Biocatalysis in Biphasic Systems: General." *Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Media*, 189-210.
- Ferraro, D. J., Gakhar, L. und Ramaswamy, S. (2005). "Rieske business: Structure–function of Rieske non-heme oxygenases." *Biochem Biophys Res Commun*, **338**, 175-190.
- Ferraro, D. J., Okerlund, A., Brown, E. und Ramaswamy, S. (2017). "One enzyme, many reactions: structural basis for the various reactions catalyzed by naphthalene 1,2-dioxygenase." *IUCrJ*, **4**, 648-656.
- Ferroni, F. M., Tolmie, C., Smit, M. S. und Opperman, D. J. (2016). "Structural and Catalytic Characterization of a Fungal Baeyer-Villiger Monooxygenase." *PLOS ONE*, **11**, e0160186.
- Fessner, W.-D. und Sinerius, G. (1994). "Synthesis of Dihydroxyacetone Phosphate (and Isosteric Analogues) by Enzymatic Oxidation; Sugars from Glycerol." *Angewandte Chemie International Edition in English*, **33**, 209-212.
- Fox, B. G., Afroland, W., Jollie, D. R. und Lipscomb, J. D. (1990). "Methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b." In: *Methods in Enzymology*, Academic Press, 191-202, 188.
- Fox, B. G., Froland, W. A., Dege, J. E. und Lipscomb, J. D. (1989). "Methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b. Purification and properties of a three-component system with high specific activity from a type II methanotroph." *Journal of Biological Chemistry*, **264**, 10023-10033.
- Franck, H.-G. und Stadelhofer, J. W. (1988). "Naphthalene—production and uses." In: *Industrial Aromatic Chemistry*, Springer, 298-333.
- Froland, W. A., Andersson, K. K., Lee, S. K., Liu, Y. und Lipscomb, J. D. (1992). "Methane monooxygenase component B and reductase alter the regioselectivity of the hydroxylase component-catalyzed reactions. A novel role for protein-protein interactions in an oxygenase mechanism." *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 17588-17597.
- Fukuzumi, S. und Ohkubo, K. (2015). "One-Step Selective Hydroxylation of Benzene to Phenol." *Asian Journal of Organic Chemistry*, **4**, 836-845.

- Garcia-Ochoa, F. und Gomez, E. (2009). "Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview." *Biotechnology Advances*, **27**, 153-176.
- Gassner, G. T. und Lippard, S. J. (1999). "Component Interactions in the Soluble Methane Monooxygenase System from *Methylococcus capsulatus* (Bath)." *Biochemistry*, **38**, 12768-12785.
- GESTIS-Stoffdatenbank. (2021a). "Benzol." Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung <https://gestis.dguv.de/data?name=010060>. (Zugriff: 01.03.2021)
- GESTIS-Stoffdatenbank. (2021b). "Ethylenoxid." Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung www.gestis.dguv.de/data?name=012000. (Zugriff: 10.11.2021)
- GESTIS-Stoffdatenbank. (2021c). "Naphthalin." Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung <https://gestis.dguv.de/data?name=015510>. (Zugriff: 01.03.2021)
- GESTIS-Stoffdatenbank. (2021d). "Pyren." Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung <https://gestis.dguv.de/data?name=022830>. (Zugriff: 02.03.2021)
- Green, J. und Dalton, H. (1989). "Substrate specificity of soluble methane monooxygenase. Mechanistic implications." *Journal of Biological Chemistry*, **264**, 17698-17703.
- Griethe, A. (2018). "Untersuchungen zur biotechnischen Nutzung der löslichen Methan-Monooxygenase aus *Methylosinus trichosporium* OB3b," Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Grosse, S., Laramée, L., Wendlandt, K.-D., McDonald, I. R., Miguez, C. B. und Kleber, H.-P. (1999). "Purification and Characterization of the Soluble Methane Monooxygenase of the Type II Methanotrophic Bacterium *Methylocystis* sp. Strain WI 14." *Appl Environ Microbiol*, **65**, 3929-3935.
- Guisseppi-Elie, A. und Maharajh, D. (1984). "The solubility of 1-naphthol in water at different temperatures." *Thermochimica acta*, **73**, 187-191.
- Halaoui, S., Asther, M., Sigoillot, J. C., Hamdi, M. und Lomascolo, A. (2006). "Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications." *Journal of Applied Microbiology*, **100**, 219-232.
- Hanson, R. S. und Hanson, T. E. (1996). "Methanotrophic bacteria." *Microbiol Rev*, **60**, 439-471.
- Haynes, W. M. (2014). "CRC handbook of chemistry and physics." CRC press.
- Hock, H. und Kropf, H. (1957). "Autoxydation von Kohlenwasserstoffen und die Cumol-Phenol-Synthese." *Angewandte Chemie*, **69**, 313-321.
- Hoffmann, F. "Acetyl Salicylic Acid." US 644077 A (1898/08/01), FARBENFABRIKEN OF ELBERFELD COMPANY, US.
- Hofrichter, M. und Ullrich, R. (2006). "Heme-thiolate haloperoxidases: versatile biocatalysts with biotechnological and environmental significance." *Appl Microbiol Biotechnol*, **71**, 276-88.
- Hofrichter, M. und Ullrich, R. (2014). "Oxidations catalyzed by fungal peroxygenases." *Curr Opin Chem Biol*, **19**, 116-25.

- Hyman, M. R., Sansome-Smith, A. W., Shears, J. H. und Wood, P. M. (1985). "A kinetic study of benzene oxidation to phenol by whole cells of *Nitrosomonas europaea* and evidence for the further oxidation of phenol to hydroquinone." *Archives of Microbiology*, **143**, 302-306.
- IHS-Markit. (2020). "Phenol." <https://ihsmarkit.com/products/phenol-chemical-economics-handbook.html>. (Zugriff: 11.01.2022)
- Jahng, D. und Wood, T. K. (1994). "Trichloroethylene and chloroform degradation by a recombinant pseudomonad expressing soluble methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b." *Applied and Environmental Microbiology*, **60**, 2473-2482.
- Jahng, D. und Wood, T. K. (1996). "Metal ions and chloramphenicol inhibition of soluble methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b." *Appl Microbiol Biotechnol*, **45**, 744-749.
- Jintoku, T., Taniguchi, H. und Fujiwara, Y. (1987). "Palladium Catalyzed Hydroxylation of Benzene with O₂ or H₂O via the C-H Aromatic Bond Activation. Preparation of Phenol." *Chemistry Letters*, **16**, 1865-1868.
- Jones, J. C., Banerjee, R., Shi, K., Aihara, H. und Lipscomb, J. D. (2020). "Structural Studies of the *Methylosinus trichosporium* OB3b Soluble Methane Monooxygenase Hydroxylase and Regulatory Component Complex Reveal a Transient Substrate Tunnel." *Biochemistry*, **59**, 2946-2961.
- Julsing, M. K., Cornelissen, S., Bühler, B. und Schmid, A. (2008). "Heme-iron oxygenases: powerful industrial biocatalysts?" *Curr Opin Chem Biol*, **12**, 177-186.
- Karich, A., Kluge, M., Ullrich, R. und Hofrichter, M. (2013). "Benzene oxygenation and oxidation by the peroxxygenase of *Agrocyste aegerita*." *AMB Express*, **3**, 5.
- Kawakami, N., Shoji, O. und Watanabe, Y. (2011). "Use of perfluorocarboxylic acids to trick cytochrome P450BM3 into initiating the hydroxylation of gaseous alkanes." *Angew Chem Int Ed Engl*, **50**, 5315-8.
- Khajeh, K., Shokri, M. M., Asghari, S. M., Moradian, F., Ghasemi, A., Sadeghi, M., et al. (2006). "Acidic and proteolytic digestion of α -amylases from *Bacillus licheniformis* and *Bacillus amyloliquefaciens*: Stability and flexibility analysis." *Enzyme and Microbial Technology*, **38**, 422-428.
- Kim, Y. J. und Uyama, H. (2005). "Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future." *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, **62**, 1707-1723.
- Klaus, T., Seifert, A., Häbe, T., Nestl, B. M. und Hauer, B. (2019). "An Enzyme Cascade Synthesis of Vanillin." *Catalysts*, **9**.
- Kluge, M., Ullrich, R., Dolge, C., Scheibner, K. und Hofrichter, M. (2009). "Hydroxylation of naphthalene by aromatic peroxxygenase from *Agrocyste aegerita* proceeds via oxygen transfer from H₂O₂ and intermediary epoxidation." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **81**, 1071-1076.
- Kopp, D. A., Gassner, G. T., Blazyk, J. L. und Lippard, S. J. (2001). "Electron-transfer reactions of the reductase component of soluble methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath)." *Biochemistry*, **40**, 14932-41.

- Koyuturk, O. (2015). "Project study: Production of recombinant SUMO protease with *E. coli* Rosetta (DE3) pET28a-scUlp1 and scale-up of the production process," Aufarbeitung biotechnischer Produkte, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg.
- Laurent, A. (1851). "Ueber das Phenol (Phenyl oxydhydrat, phenylige Säure)." *Journal für Praktische Chemie*, **52**, 279-282.
- Lee, S.-K. und Lipscomb, J. D. (1999). "Oxygen Activation Catalyzed by Methane Monooxygenase Hydroxylase Component: Proton Delivery during the O–O Bond Cleavage Steps." *Biochemistry*, **38**, 4423-4432.
- Lee, S. J., McCormick, M. S., Lippard, S. J. und Cho, U.-S. (2013). "Control of substrate access to the active site in methane monooxygenase." *Nature*, **494**, 380.
- Lee, S. K., Nesheim, J. C. und Lipscomb, J. D. (1993). "Transient intermediates of the methane monooxygenase catalytic cycle." *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 21569-21577.
- Li, W., Zhao, S. J., Gao, F., Lv, Z. S., Tu, J. Y. und Xu, Z. (2018). "Synthesis and In Vitro Anti-Tumor, Anti-Mycobacterial and Anti-HIV Activities of Diethylene-Glycol-Tethered Bis-Isatin Derivatives." *ChemistrySelect*, **3**, 10250-10254.
- Lin, Y., Lu, P., Tang, C., Mei, Q., Sandig, G., Rodrigues, A. D., et al. (2001). "Substrate Inhibition Kinetics for Cytochrome P450-Catalyzed Reactions." *Drug Metabolism and Disposition*, **29**, 368.
- Lippard, S. J. (2005). "Hydroxylation of C–H bonds at carboxylate-bridged diiron centres." *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, **363**, 861-877.
- Liu, A., Jin, Y., Zhang, J., Brazeau, B. J. und Lipscomb, J. D. (2005). "Substrate radical intermediates in soluble methane monooxygenase." *Biochem Biophys Res Commun*, **338**, 254-261.
- Liu, K. E., Valentine, A. M., Wang, D., Huynh, B. H., Edmondson, D. E., Salifoglou, A., et al. (1995a). "Kinetic and spectroscopic characterization of intermediates and component interactions in reactions of methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath)." *J Am Chem Soc*, **117**, 10174-10185.
- Liu, Y., Liu, P., Gao, S., Wang, Z., Luan, P., González-Sabín, J., et al. (2021). "Construction of chemoenzymatic cascade reactions for bridging chemocatalysis and Biocatalysis: Principles, strategies and prospective." *Chemical Engineering Journal*, **420**, 127659.
- Liu, Y., Nesheim, J. C., Lee, S.-K. und Lipscomb, J. D. (1995b). "Gating Effects of Component B on Oxygen Activation by the Methane Monooxygenase Hydroxylase Component." *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 24662-24665.
- Liu, Y., Nesheim, J. C., Paulsen, K. E., Stankovich, M. T. und Lipscomb, J. D. (1997). "Roles of the methane monooxygenase reductase component in the regulation of catalysis." *Biochemistry*, **36**, 5223-5233.
- Lloyd, J. S. (1997). "Heterologous expression and site-directed mutagenesis of soluble methane monooxygenase," University of Warwick.

- Lloyd, J. S., Finch, R., Dalton, H. und Murrell, J. C. (1999). "Homologous expression of soluble methane monooxygenase genes in *Methylosinus trichosporium* OB3b." *Microbiology*, **145**, 461-470.
- Lock, M., Nichol, T., Murrell, J. C. und Smith, T. J. (2017). "Mutagenesis and expression of methane monooxygenase to alter regioselectivity with aromatic substrates." *FEMS Microbiol Lett*, **364**.
- Loida, P. J. und Sligar, S. G. (1993). "Molecular recognition in cytochrome P-450: Mechanism for the control of uncoupling reactions." *Biochemistry*, **32**, 11530-11538.
- Lorente-Arevalo, A., Ladero, M. und Bolivar, J. M. (2021). "Intensification of oxygen-dependent biotransformations catalyzed by immobilized enzymes." *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 100544.
- Lücke, B., Narayana, K. V., Martin, A. und Jähnisch, K. (2004). "Oxidation and Ammoxidation of Aromatics." *Advanced Synthesis & Catalysis*, **346**, 1407-1424.
- Luetz, S., Giver, L. und Lalonde, J. (2008). "Engineered enzymes for chemical production." *Biotechnology and Bioengineering*, **101**, 647-653.
- Marblestone, J. G., Edavettal, S. C., Lim, Y., Lim, P., Zuo, X. und Butt, T. R. (2006). "Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO." *Protein Sci*, **15**, 182-9.
- Martínez, A. T., Ruiz-Dueñas, F. J., Camarero, S., Serrano, A., Linde, D., Lund, H., *et al.* (2017). "Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations." *Biotechnol Adv*, **35**, 815-831.
- Martins, P., Jesus, J., Santos, S., Raposo, L. R., Roma-Rodrigues, C., Baptista, P. V., *et al.* (2015). "Heterocyclic anticancer compounds: recent advances and the paradigm shift towards the use of nanomedicine's tool box." *Molecules*, **20**, 16852-16891.
- Mason, J. R., Butler, C. S., Cammack, R. und Shergill, J. K. (1997). "Structural studies on the catalytic component of benzene dioxygenase from *Pseudomonas putida*." *Biochemical Society Transactions*, **25**, 90-95.
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M. und Fernandez-Lafuente, R. (2007). "Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques." *Enzyme and Microbial Technology*, **40**, 1451-1463.
- Mattes, T. E., Coleman, N. V., Chuang, A. S., Rogers, A. J., Spain, J. C. und Gossett, J. M. (2006). "Mechanism controlling the extended lag period associated with vinyl chloride starvation in *Nocardioides* sp. strain JS614." *Archives of Microbiology*, **187**, 217.
- Meng, Q., Yan, J., Wu, R., Liu, H., Sun, Y., Wu, N., *et al.* (2021). "Sustainable production of benzene from lignin." *Nature Communications*, **12**, 4534.
- Merkx, M., Kopp, D. A., Sazinsky, M. H., Blazyk, J. L., Muller, J. und Lippard, S. J. (2001). "Dioxygen activation and methane hydroxylation by soluble methane monooxygenase: a tale of two irons and three proteins." *Angew. Chem., Int. Ed.*, **40**, 2782-2807.
- Mertens, N., Remaut, E. und Fiers, W. (1995). "Tight Transcriptional Control Mechanism Ensures Stable High-Level Expression from T7 Promoter-Based Expression Plasmids." *Bio/Technology*, **13**, 175-179.

- Michaelis, L. und Menten, M. L. (1913). "Die Kinetik der Invertinwirkung." *Biochem. z.*, **49**, 352.
- Miyaji, A. (2011). "Particulate Methane Monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b." In: *Methods in Enzymology* (Rosenzweig, A. C. und Ragsdale, S. W., eds.), Academic Press, 211-225, 495.
- Miyamoto, H., Yampolski, Y. und Young, C. L. (2014). "IUPAC-NIST Solubility Data Series. 103. Oxygen and Ozone in Water, Aqueous Solutions, and Organic Liquids (Supplement to Solubility Data Series Volume 7)." *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, **43**, 033102.
- Mochida, I., Okuma, O. und Yoon, S.-H. (2014). "Chemicals from Direct Coal Liquefaction." *Chemical Reviews*, **114**, 1637-1672.
- Molina-Espeja, P., Garcia-Ruiz, E., Gonzalez-Perez, D., Ullrich, R., Hofrichter, M. und Alcalde, M. (2014). "Directed Evolution of Unspecific Peroxygenase from *Agrocybe aegerita*." *Appl Environ Microbiol*, **80**, 3496-3507.
- Moyle, M. P. und Tyner, M. (1953). "Solubility and diffusivity of 2-naphthol in water." *Industrial & Engineering Chemistry*, **45**, 1794-1797.
- Müller, J., Lugovskoy, A. A., Wagner, G. und Lippard, S. J. (2002). "NMR Structure of the [2Fe-2S] Ferredoxin Domain from Soluble Methane Monooxygenase Reductase and Interaction with Its Hydroxylase." *Biochemistry*, **41**, 42-51.
- Münch, J., Püllmann, P., Zhang, W. und Weissenborn, M. J. (2021). "Enzymatic Hydroxylations of sp³-Carbons." *ACS Catalysis*, 9168-9203.
- Murrell, J. C., McDonald, I. R. und Gilbert, B. (2000). "Regulation of expression of methane monooxygenases by copper ions." *Trends in Microbiology*, **8**, 221-225.
- Mustroph, H. (2014). "Dyes, General Survey." *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 1-38.
- Nagai, M., Yoshida, A. und Sato, N. (1998). "Additive effects of bovine serum albumin, dithiothreitol and glycerol on PCR." *IUBMB Life*, **44**, 157-163.
- Noyori, R. (2009). "Synthesizing our future." *Nature Chemistry*, **1**, 5-6.
- Øverland, M., Tauson, A.-H., Shearer, K. und Skrede, A. (2010). "Evaluation of methane-utilising bacteria products as feed ingredients for monogastric animals." *Archives of Animal Nutrition*, **64**, 171-189.
- Özbek, M. und Van Santen, R. (2013). "The mechanism of ethylene epoxidation catalysis." *Catalysis letters*, **143**, 131-141.
- Park, D. und Lee, J. (2013). "Biological conversion of methane to methanol." *Korean Journal of Chemical Engineering*, **30**, 977-987.
- Paulsen, K. E., Liu, Y., Fox, B. G., Lipscomb, J. D., Munck, E. und Stankovich, M. T. (1994). "Oxidation-reduction potentials of the methane monooxygenase hydroxylase component from *Methylosinus trichosporium* OB3b." *Biochemistry*, **33**, 713-722.

- Pecyna, M. J., Ullrich, R., Bittner, B., Clemens, A., Scheibner, K., Schubert, R., et al. (2009). "Molecular characterization of aromatic peroxygenase from *Agroclybe aegerita*." *Appl Microbiol Biotechnol*, **84**, 885-897.
- Pedersen, A. T. (2017). "Oxygen Dependent Biocatalytic Processes.," Department of Chemical and Biochemical Engineering, Technical University of Denmark, Lyngby.
- Perriman, A. W., Henderson, M. J., Holt, S. A. und White, J. W. (2007). "Effect of the Air–Water Interface on the Stability of β -Lactoglobulin." *The Journal of Physical Chemistry B*, **111**, 13527-13537.
- Peter Warneck, J. W. (2012). "The Atmospheric Chemist's Companion." 1 ed., Springer Netherlands, X, 438.
- Petersen, L. A. H., Villadsen, J., Jørgensen, S. B. und Gernaey, K. V. (2017). "Mixing and mass transfer in a pilot scale U-loop bioreactor." *Biotechnology and Bioengineering*, **114**, 344-354.
- Peterson, D. H., Murray, H. C., Eppstein, S. H., Reineke, L. M., Weintraub, A., Meister, P. D., et al. (1952). "Microbiological Transformations of Steroids.1 I. Introduction of Oxygen at Carbon-11 of Progesterone." *J Am Chem Soc*, **74**, 5933-5936.
- Philo, J. S. und Arakawa, T. (2009). "Mechanisms of protein aggregation." *Current pharmaceutical biotechnology*, **10**, 348-351.
- Pikus, J. D., Studts, J. M., Achim, C., Kauffmann, K. E., Münck, E., Steffan, R. J., et al. (1996). "Recombinant toluene-4-monooxygenase: catalytic and Mössbauer studies of the purified diiron and Rieske components of a four-protein complex." *Biochemistry*, **35**, 9106-9119.
- Pilkington, S. J. und Dalton, H. (1990). "Soluble methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* Bath." In: *Methods in Enzymology*, Academic Press, 181-190, 188.
- Pinaeva, L. und Noskov, A. (2020). "Prospects for the Development of Ethylene Oxide Production Catalysts and Processes." *Petroleum Chemistry*, **60**, 1191-1206.
- PubChem. (2021a). "PubChem Compound Summary for CID 8058, Hexane." National Center for Biotechnology Information <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hexane>. (Zugriff: 24.03.2021)
- PubChem. (2021b). "PubChem Compound Summary for CID 8174, 1-Decanol." National Center for Biotechnology Information <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1-Decanol>. (Zugriff: 24.03.2021)
- PubChem. (2021c). "PubChem Compound Summary for CID 15600, Decane." National Center for Biotechnology Information <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Decane>. (Zugriff: 24.03.2021)
- Rataj, M. J., Kauth, J. E. und Donnelly, M. I. (1991). "Oxidation of deuterated compounds by high specific activity methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium*. Mechanistic implications." *J Biol Chem*, **266**, 18684-90.
- Rebsdats, S. und Mayer, D. (2001). "Ethylene Oxide." *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*.

- Ricca, E., Brucher, B. und Schrittwieser, J. H. (2011). "Multi-Enzymatic Cascade Reactions: Overview and Perspectives." *Advanced Synthesis & Catalysis*, **353**, 2239-2262.
- Rios, G. M., Belleville, M. P., Paolucci, D. und Sanchez, J. (2004). "Progress in enzymatic membrane reactors – a review." *Journal of Membrane Science*, **242**, 189-196.
- Rioz-Martínez, A., Bisogno, F. R., Rodríguez, C., de Gonzalo, G., Lavandera, I., Torres Pazmiño, D. E., et al. (2010). "Biocatalysed concurrent production of enantioenriched compounds through parallel interconnected kinetic asymmetric transformations." *Organic & Biomolecular Chemistry*, **8**, 1431-1437.
- Römpf-Redaktion und Jahn, U. (2019). "Phenol." Thieme Gruppe.
- Rosche, B., Breuer, M., Hauer, B. und Rogers, P. L. (2004). "Biphasic aqueous/organic biotransformation of acetaldehyde and benzaldehyde by *Zymomonas mobilis* pyruvate decarboxylase." *Biotechnology and Bioengineering*, **86**, 788-794.
- Rosenzweig, A. C., Brandstetter, H., Whittington, D. A., Nordlund, P., Lippard, S. J. und Frederick, C. A. (1997). "Crystal structures of the methane monooxygenase hydroxylase from *Methylococcus capsulatus* (Bath): Implications for substrate gating and component interactions." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **29**, 141-152.
- Ross, M. O. und Rosenzweig, A. C. (2017). "A tale of two methane monooxygenases." *J Biol Inorg Chem*, **22**, 307-319.
- Sanchez-Ruiz, J. M. (2010). "Protein kinetic stability." *Biophysical chemistry*, **148**, 1-15.
- Sander, R. (2015). "Compilation of Henry's law constants (version 4.0) for water as solvent." *Atmos. Chem. Phys.*, **15**, 4399-4981.
- Sander, S. P., Abbatt, J., Barker, J. R., Burkholder, J. B., Friedl, R. R., Golden, D. M., Huie, R. E., Kolb, C. E., Kurylo, M. J., Moortgat, G. K., Orkin, V. L., and Wine, P. H. (2011). "Chemical Kinetics and Photochemical Data for Use in Atmospheric Studies, Evaluation No. 17." *JPL Publication*, **10**.
- Saville, B. A. und Persi, S. (1992). "The effect of oxygen upon the kinetics of enzyme inactivation: In vitro investigations using glutamine synthetase." *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, **70**, 1143-1148.
- Schleizinger, J. J., Struntz, W. D. J., Goldstone, J. V. und Stegeman, J. J. (2006). "Uncoupling of cytochrome P450 1A and stimulation of reactive oxygen species production by co-planar polychlorinated biphenyl congeners." *Aquatic Toxicology*, **77**, 422-432.
- Schmid, A., Vereyken, I., Held, M. und Witholt, B. (2001). "Preparative regio- and chemoselective functionalization of hydrocarbons catalyzed by cell free preparations of 2-hydroxybiphenyl 3-monooxygenase." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **11**, 455-462.
- Schmid, R. D. "Stabilized soluble enzymes." *Advances in Biomedical Engineering*, 1979//, Berlin, Heidelberg, 41-118.
- Schoemaker, H. E., Mink, D. und Wubbolts, M. G. (2003). "Dispelling the myths--biocatalysis in industrial synthesis." *Science*, **299**, 1694-1697.

- Seidel, S., Maschke, R. W., Werner, S., Jossen, V. und Eibl, D. (2021). "Oxygen Mass Transfer in Biopharmaceutical Processes: Numerical and Experimental Approaches" *Chemie Ingenieur Technik*, **93**, 42-61.
- Seidell, A. (1941). "Solubilities of organic compounds: a compilation of quantitative solubility data from the periodical literature." D. van Nostrand.
- Sheldon, R. A. und van Pelt, S. (2013). "Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how." *Chemical Society Reviews*, **42**, 6223-6235.
- Shoji, O., Kunitatsu, T., Kawakami, N. und Watanabe, Y. (2013). "Highly selective hydroxylation of benzene to phenol by wild-type cytochrome P450BM3 assisted by decoy molecules." *Angew Chem Int Ed Engl*, **52**, 6606-10.
- Shoji, O., Yanagisawa, S., Stanfield, J. K., Suzuki, K., Cong, Z., Sugimoto, H., *et al.* (2017). "Direct Hydroxylation of Benzene to Phenol by Cytochrome P450BM3 Triggered by Amino Acid Derivatives." *Angewandte Chemie International Edition*, **56**, 10324-10329.
- Sigdel, S., Hui, G., Smith, T. J., Murrell, J. C. und Lee, J.-K. (2015). "Molecular dynamics simulation to rationalize regioselective hydroxylation of aromatic substrates by soluble methane monooxygenase." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **25**, 1611-1615.
- Silverman, J. (2016). "BioGTL platform for the conversion of natural gas to fuels and chemicals." *Calysta Energy, Inc.*
- Sirajuddin, S. und Rosenzweig, A. C. (2015). "Enzymatic oxidation of methane." *Biochemistry*, **54**, 2283-94.
- Smith, J. R. L. und Norman, R. O. C. (1963). "539. Hydroxylation. Part I. The oxidation of benzene and toluene by Fenton's reagent." *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 2897-2905.
- Söhngen, N. L. (1906). "Ueber Bakterien, welche Methan als Kohlenstoffnahrung und Energiequelle gebrauchen." In: *Parasitenkunde und Infektionskrankheiten*, 513-517, 2.
- Sperl, J. M. und Sieber, V. (2018). "Multienzyme Cascade Reactions—Status and Recent Advances." *ACS Catalysis*, **8**, 2385-2396.
- Squires, A. M. (1976). "Chemicals from coal." *Science*, **191**, 689-700.
- Stein, L. Y., Yoon, S., Semrau, J. D., DiSpirito, A. A., Crombie, A., Murrell, J. C., *et al.* (2010). "Genome Sequence of the Obligate Methanotroph *Methylosinus trichosporium* Strain OB3b." *Journal of Bacteriology*, **192**, 6497.
- Stepankova, V., Bidmanova, S., Koudelakova, T., Prokop, Z., Chaloupkova, R. und Damborsky, J. (2013). "Strategies for Stabilization of Enzymes in Organic Solvents." *ACS Catalysis*, **3**, 2823-2836.
- Stirling, D. I., Colby, J. und Dalton, H. (1979). "A comparison of the substrate and electron-donor specificities of the methane mono-oxygenases from three strains of methane-oxidizing bacteria." *The Biochemical journal*, **177**, 361-364.
- Strohmeier, G. A., Pichler, H., May, O. und Gruber-Khadjawi, M. (2011). "Application of Designed Enzymes in Organic Synthesis." *Chemical Reviews*, **111**, 4141-4164.

- Strong, P. J., Xie, S. und Clarke, W. P. (2015). "Methane as a resource: can the methanotrophs add value?" *Environ Sci Technol*, **49**, 4001-18.
- Sun, K., Ginosar, D. M., He, T., Zhang, Y., Fan, M. und Chen, R. (2018). "Progress in nonoxidative dehydroaromatization of methane in the last 6 years." *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **57**, 1768-1789.
- Swetha Vandana, P. und Phale Prashant, S. (2005). "Metabolism of Carbaryl via 1,2-Dihydroxynaphthalene by Soil Isolates *Pseudomonas* sp. Strains C4, C5, and C6." *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 5951-5956.
- Switala, J. und Loewen, P. C. (2002). "Diversity of properties among catalases." *Archives of biochemistry and biophysics*, **401**, 145-154.
- Tao, Y., Bentley, W. E. und Wood, T. K. (2005). "Phenol and 2-naphthol production by toluene 4-monooxygenases using an aqueous/dioctyl phthalate system." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **68**, 614-621.
- Teigen, K., Jensen, V. R. und Martinez, A. (2005). "The Reaction Mechanism of Phenylalanine Hydroxylase. – A Question of Coordination." *Pteridines*, **16**, 27-34.
- The National Institute for Occupational Safety and Health, N. (2019). "Ethylene Oxide." NIOSH www.cdc.gov/niosh/npg/npgd0275.html. (Zugriff: 10.11.2021)
- Thümmeler, A. (2018). "Expression und Charakterisierung von A β -Peptiden und deren Spaltung durch die Acylpeptidhydrolase," Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Tinberg, C. E. und Lippard, S. J. (2009). "Revisiting the mechanism of dioxygen activation in soluble methane monooxygenase from *M. capsulatus* (Bath): evidence for a multi-step, proton-dependent reaction pathway." *Biochemistry*, **48**, 12145-12158.
- Tonge, G. M., Harrison, D. E. und Higgins, I. J. (1977). "Purification and properties of the methane mono-oxygenase enzyme system from *Methylosinus trichosporium* OB3b." *The Biochemical journal*, **161**, 333-344.
- Torres Pazmiño, D. E., Winkler, M., Glieder, A. und Fraaije, M. W. (2010). "Monooxygenases as biocatalysts: Classification, mechanistic aspects and biotechnological applications." *Journal of Biotechnology*, **146**, 9-24.
- Turner, N. J. (2008). "Chemoenzymatic Routes to Enantiomerically Pure Amino Acids and Amines." *Multi-Step Enzyme Catalysis*, 21-39.
- Turner, N. J. (2010). "Deracemisation methods." *Curr Opin Chem Biol*, **14**, 115-121.
- Ullrich, R. und Hofrichter, M. (2007). "Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds." *Cellular and Molecular Life Sciences*, **64**, 271-293.
- University-of-York. (2017). "The Essential Chemical Industry - online." Department of Chemistry, University of York <https://www.essentialchemicalindustry.org/chemicals/phenol.html>. (Zugriff: 20.01.2022)

- Valentine, A. M., Stahl, S. S. und Lippard, S. J. (1999). "Mechanistic Studies of the Reaction of Reduced Methane Monooxygenase Hydroxylase with Dioxygen and Substrates." *J Am Chem Soc*, **121**, 3876-3887.
- Valikhani, D., Bolivar, J. M., Dennig, A. und Nidetzky, B. (2018). "A tailor-made, self-sufficient and recyclable monooxygenase catalyst based on coimmobilized cytochrome P450 BM3 and glucose dehydrogenase." *Biotechnology and Bioengineering*, **115**, 2416-2425.
- van Rantwijk, F. und Sheldon, R. A. (2000). "Selective oxygen transfer catalysed by heme peroxidases: synthetic and mechanistic aspects." *Curr Opin Biotechnol*, **11**, 554-564.
- Wackett, L. P. und Gibson, D. T. (1983). "Rapid method for detection and quantitation of hydroxylated aromatic intermediates produced by microorganisms." *Applied and environmental microbiology*, **45**, 1144-1147.
- Wallar, B. J. und Lipscomb, J. D. (2001). "Methane Monooxygenase Component B Mutants Alter the Kinetics of Steps Throughout the Catalytic Cycle." *Biochemistry*, **40**, 2220-2233.
- Wang, S., Liu, Q., Li, J. und Wang, Z. (2021). "Methane in wastewater treatment plants: status, characteristics, and bioconversion feasibility by methane oxidizing bacteria for high value-added chemicals production and wastewater treatment." *Water Research*, **198**, 117122.
- Wang, W., Jacob, R. E., Luoh, R. P., Engen, J. R. und Lippard, S. J. (2014). "Electron transfer control in soluble methane monooxygenase." *J Am Chem Soc*, **136**, 9754-62.
- Wang, W., Liang, A. D. und Lippard, S. J. (2015). "Coupling Oxygen Consumption with Hydrocarbon Oxidation in Bacterial Multicomponent Monooxygenases." *Acc Chem Res*, **48**, 2632-9.
- Wang, W. und Lippard, S. J. (2014). "Diiron oxidation state control of substrate access to the active site of soluble methane monooxygenase mediated by the regulatory component." *J Am Chem Soc*, **136**, 2244-7.
- Ward, N., Larsen, Ø., Sakwa, J., Bruseth, L., Khouri, H., Durkin, A. S., *et al.* (2004). "Genomic Insights into Methanotrophy: The Complete Genome Sequence of *Methylococcus capsulatus* (Bath)." *PLOS Biology*, **2**, e303.
- Warman, A. J., Roitel, O., Neeli, R., Girvan, H. M., Seward, H. E., Murray, S. A., *et al.* (2005). "Flavocytochrome P450 BM3: an update on structure and mechanism of a biotechnologically important enzyme." *Biochemical Society Transactions*, **33**, 747-753.
- Weber, M. und Weber, M. (2010). "Phenols." In: *Phenolic Resins: A Century of Progress* (Pilato, L., ed.), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 9-23.
- Wendlandt, K. D., Geyer, W., Mirschel, G. und Hemidi, F. A.-H. (2005). "Possibilities for controlling a PHB accumulation process using various analytical methods." *J Biotechnol*, **117**, 119-129.
- West, C. A., Salmond, G. P. C., Dalton, H. und Murrell, J. C. (1992). "Functional expression in *Escherichia coli* of proteins B and C from soluble methane monooxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath)." *Microbiology*, **138**, 1301-1307.
- Whitman, W. G. (1962). "The two film theory of gas absorption." *International Journal of Heat and Mass Transfer*, **5**, 429-433.

- Whittenbury, R., Phillips, K. C. und Wilkinson, J. F. (1970). "Enrichment, Isolation and Some Properties of Methane-utilizing Bacteria." *Microbiology*, **61**, 205-218.
- Willeman, W. F., Gerrits, P. J., Hanefeld, U., Brussee, J., Straathof, A. J., Van Der Gen, A., *et al.* (2002). "Development of a process model to describe the synthesis of (R)-mandelonitrile by *Prunus amygdalus* hydroxynitrile lyase in an aqueous–organic biphasic reactor." *Biotechnology and bioengineering*, **77**, 239-247.
- Woodley, J. M. (2008). "New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener." *Trends in Biotechnology*, **26**, 321-327.
- Xin, J.-Y., Xu, N., Ji, S.-F., Wang, Y. und Xia, C.-G. (2017). "Epoxidation of Ethylene by Whole Cell Suspension of *Methylosinus trichosporium* IMV 3011." *Journal of Chemistry*, **2017**, 9191382.
- Xing, W., Yin, M., Lv, Q., Hu, Y., Liu, C. und Zhang, J. (2014). "1 - Oxygen Solubility, Diffusion Coefficient, and Solution Viscosity." In: *Rotating Electrode Methods and Oxygen Reduction Electrocatalysts* (Xing, W., Yin, G. und Zhang, J., eds.), Elsevier, Amsterdam, 1-31.
- Yi, D., Bayer, T., Badenhurst, C. P., Wu, S., Doerr, M., Höhne, M., *et al.* (2021). "Recent trends in biocatalysis." *Chemical Society Reviews*.
- Zhang, J. und Lipscomb, J. D. (2006). "Role of the C-Terminal Region of the B Component of *Methylosinus trichosporium* OB3b Methane Monooxygenase in the Regulation of Oxygen Activation." *Biochemistry*, **45**, 1459-1469.
- Zhang, J., Wallar, B. J., Popescu, C. V., Renner, D. B., Thomas, D. D. und Lipscomb, J. D. (2006). "Methane Monooxygenase Hydroxylase and B Component Interactions." *Biochemistry*, **45**, 2913-2926.
- Zhang, Y., Xin, J., Chen, L., Song, H. und Xia, C. (2008). "Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular weight by methanotroph from methane and methanol." *Journal of Natural Gas Chemistry*, **17**, 103-109.
- Zhang, Y., Xin, J., Chen, L. und Xia, C. (2009). "The methane monooxygenase intrinsic activity of kinds of methanotrophs." *Appl Biochem Biotechnol*, **157**, 431-441.
- Zhao, H. und van der Donk, W. A. (2003). "Regeneration of cofactors for use in biocatalysis." *Curr Opin Biotechnol*, **14**, 583-589.
- Zimmerman Julie, B., Anastas Paul, T., Erythropel Hanno, C. und Leitner, W. (2020). "Designing for a green chemistry future." *Science*, **367**, 397-400.

8 Anhang

8.1 Nukleotidsequenz und Plasmidkarte des Vektors pET28a_mmoc



Abbildung 8.1: Plasmidkarte des Vektors pET28a-mmoc; synthetisiert durch ThermoFischer GeneArt®;

Legende:

T7-Promoter

T7-Terminator

NcoI-Restriktionsschnittstelle

NdeI-Restriktionsschnittstelle

Nukleotidsequenz mmoc (*M. capsulatus* Bath)

Startcodon

Stoppcodon

Zusätzlich eingefügte Nukleotide

ORF unterstrichen

Nukleotidsequenz pET28a_mmoc (rev. 5' – 3'):

TGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCA
GCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCGGTCAAGCTCTAAATCGG
GGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTTCACGTAGTGG
GCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGAAGTCTTGTTCCAAACCTGGAA

CAACACTCAACCCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTG
ATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAAACAAAATATTAACGTTTACAATTTTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGG
AACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGTCATGAATTAATTCCTTAGAAAACTCATCGAGCATC
AAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTGAAGGAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTC
ACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCAACATCAATACAACCTATTAATT
TCCCCTCGTCAAAAAAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGTTTATGC
ATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCG
TGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGA
ACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCA
GTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTGGGAAGAGGCATAAATCCGTCAGCCAGTTTAG
TCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGGGCTTCCCAT
ACAATCGATAGATTGTGCGACCTGATTGCCCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAA
TTTAATCGCGGCCCTAGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGATTACTGTTTATGTAAGCAGACAG
TTTTATTGTTTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCT
TCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGA
TCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGT
AGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGCGTGTGCCAGT
GGCGATAAGTCGTGCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGTGAACGGGGGGTTC
GTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTC
CCGAAGGGAGAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAAC
GCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAG
CCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTTACGGTTTCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGT
TATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCAACGACCGAGCGCAGC
GAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATATA
TGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTCATG
GCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGT
GACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGGTTTTACCGTCATACCGAAACGCGCGAGGCAGCTGCGGTAAAGCTCATCAG
CGTGGTCTGAAGCGATTACAGATGTCTGCCTGTTTCATCCGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAAGCGTTAATGTCTGG
CTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTCTGTTTGGTCACTGATGCCCTCCGTGTAAGGGGGATTTCTGTTTCAT
GGGGTAATGATACCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGTTACTGATGATGAACATGCCCGGTTACTGGAACGTT
GTGAGGGTAAACAACCTGGCGGTATGGATGCGGCGGACAGAGAAAAATCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCGTTAATACA
GATGTAGGTGTTCCACAGGGTAGCCAGCAGCATCTGCGATGCAGATCCGGAACATAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCGCGT
TTCCAGACTTTACGAAACACGGAACCGAAGACCATTATGTTGTTGCTCAGGTCGCAGACGTTTTTGACGAGCAGTCGCTTC
ACGTTGCTCGCTATCGGTGATTCTGCTAACCAGTAAGGCAACCCCGCCAGCCTAGCCGGGTCTCAACGACAGGAGC
ACGATCATGCGCACCCGTGGGGCCGCCATGCCGGCGATAATGGCTGCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGACCACTGAC
GAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCCGAATACCGCAAGCGACAGGCCGATCATCGTCCGCTCCAGCGAAAGCGGTCTCT
CGCCGAAAATGACCAGAGCGCTGCCGGCACCTGTCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCGACGATA
GTCATGCCCCGCGCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTTGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTGAGATCCCGGTGCCTAATGAGT
GAGCTAACTTACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCG
GCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGCTATTGGGCGCCAGGGTGGTTTTTCTTTTACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATT
GCCCTTACCGCCTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTGCCCCAGCAGGCGAAAATCCTGTTTGATGG
TGGTTAACGGCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGGTATCGTCGTATCCCACTACCGAGATATCCGCACCAACGCGCAGCCCG
GACTCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTACG
CATTTGCATGGTTTGTGAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCGCCTTCCCGTTCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGA
GATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGCGCGCGAGACAGAACTTAATGGGCCCCGTAACAGCGCGATTGTGCTGGTGACCC
AATGCGACCATGCTCCACGCCAGTCGCGTACCGTCTTCATGGGAGAAAAATAATACTGTTGATGGGTGTCTGGTCAGAGAC
ATCAAGAAATAACGCCGGAACATTAGTGACGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCA
GCCCACTGACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCGCTTTACAGGCTTCGACGCGCGCTTCGTTCTACCATCGACACCACC
ACGCTGGCACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCCGCGACAATTTGCGACGGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGC
AACGCCAATCAGCAACGACTGTTTGCCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGCTT
CCACTTTTTCCCGCGTTTTTCGAGAAAACGTGGCTGGCTGGTTACACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCGGCATAC
TCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTACATTCACCACCCTGAATTGACTCTCTTCCGGGCGCTATCATGCCATACCGCG
AAAGGTTTTGCGCCATTTCGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCAGTAGT
AGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCGCAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCCGGCCACGGGGCC
TGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTCCCCATCGGTGATGTGCGCGATAT
AGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGTGCGGCCACGATCGCTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGA
AATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTTGTGAGCGGATAACAATTCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAG
ATATACCGGTATGCGAGGATTCACACTATCACGGCGGTGACGGAGGATGGCGAATCGCTCCGCTTCGAATGCCGTTCCGG

```

ACGAGGACGTCATCACCGCCGCCCTGCGCCAGAACATCTTTCTGATGTCGTCCTGCCGGGAGGGCGGCTGTGCGACCTGCAAG
GCCTTGTGTCAGCGAAGGGGACTACGACCTCAAGGGCTGCAGCGTTCAGGCGCTGCCGCCGAAGAGGAGGAGGAAGGGTTGGT
GTTGTTGTGCCGGACCTACCCGAAGACCGACCTGGAAATCGAAGTGCCTTATACCCATTGCCGCATCAGTTTTTGGTGAGGTGCG
GCAGTTTCGAGGCGGAGGTGCTCGGCCTCAACTGGGTTTCGAGCAACACCGTCCAGTTCTTTTGCAGAAGCGGCCCGACGAG
TGCGGCAACCGTGGCGTGAAATTGCAACCCGGTCAGTTCATGGACCTGACCATCCCCGGCACCAGATGTCTCCGCTCCTACTC
GCCGGCGAACCTTCTTAATCCCGAAGCCGCGCTGGAGTTCCTGATCCGCGTGTTACCGGAGGGACGGTTTTTCGGACTACCTGC
GCAATGACGCGCGTGTCCGACAGGTCTCTCGGTCAAAGGGCCACTGGGCGTGTTTCGGTCTCAAGGAGCGGGGCATGGCGCCG
CGCTATTTTCGTGGCCGGCGGCACCGGGTTGGCGCCGGTGGTCTCGATGGTGCGGCAGATGCAGGAGTGGACCGCGCCGAACGA
GACCCGCATCTATTTCCGTGTGAACACCGAGCCGGAATTGTTCTACATCGACGAGCTCAAATCCCTGGAACGATCGATGCGCA
ATCTCACCGTGAAGGCCTGTGTCTGGCACCCGAGCGGGGACTGGGAAGGCGAGCAGGGCTCGCCCATCGATGCGTTGCGGGAA
GACCTGGAGTCTCTCCGACGCCAACCCGGACATTTATTGTGCGGTCCGCCGGGCATGATCGATGCCGCTGCGAGCTGGTACG
CAGCCGCGGTATCCCCGGCGAACAGGTCTTCTTCGAAAAATTCCTGCCGTCCGGGGCGGCCTGATACATATGCTAGCATGA
CTGGTGGACAGCAAATGGGTGCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCA
CCACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCCTGAGCAATAACTAGCATAACCCC
TTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAACATATCCGGAT

```

8.2 Nukleotidsequenz und Plasmidkarte des Vektors pETSUMOadapt_mmob

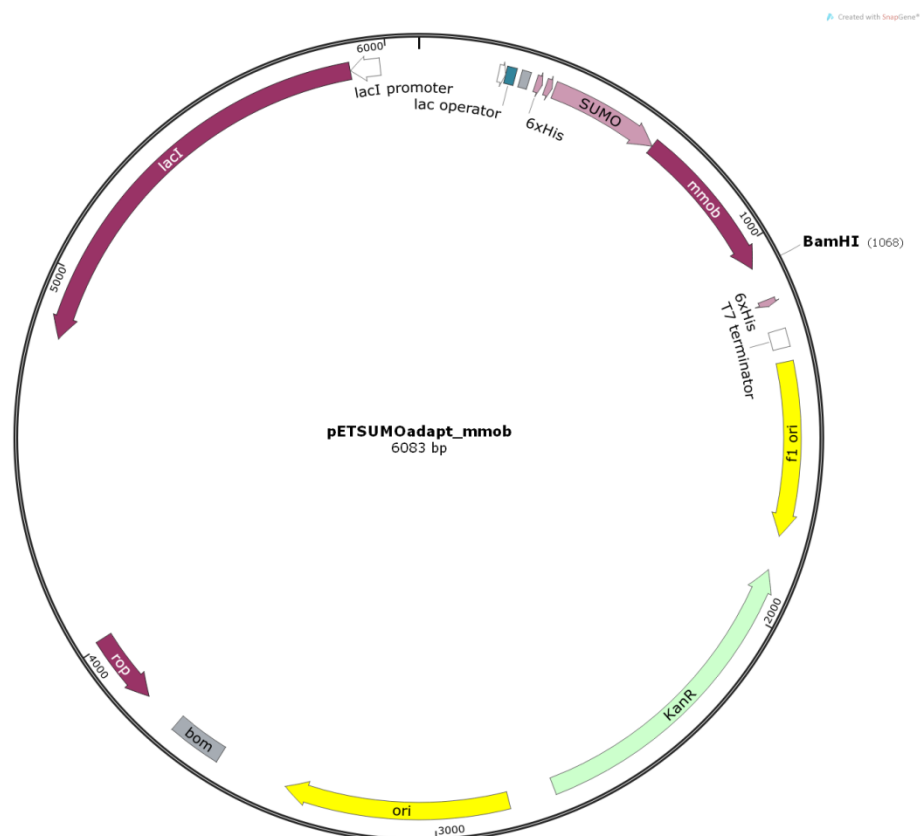


Abbildung 8.2: Plasmidkarte des Vektors pETSUMOadapt_mmob; zur Verfügung gestellt von A. Dillmann

[illegible]

AGCGAGGGCGTGCAGATTCCGAATACCGCAAGCGACAGGCCGATCATCGTCGCGCTCCAGCGAAAGCGGTCTCGCCGAAAA
 TGACCCAGAGCGCTGCCGGCACCTGTCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCGACGATAGTCATGCCC
 CGCGCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTGAGATCCCGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACT
 TACATTAATTGCGTTGCGCTCAGTCGCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCG
 CGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCCAGGGTGGTTTTTCTTTTACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTCAC
 CGCCTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTGGCCAGCAGGCGAAAATCTGTGTTGATGGTGGTTAACG
 GCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGTATCGTCGTATCCCACTACCGAGATATCCGCACCAACGCGCAGCCCGACTCGGTA
 ATGGCGCGCATTGCCCGCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTCAGCATTTCAT
 GGTGTTGTGAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCGCCCTCCCGTTCGGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTAT
 GCCAGCCAGCCAGACGACGCGCCGAGACAGAACTTAATGGGCCCCGCTAACAGCGCGATTGCTGGTGACCCAATGCGACC
 AGATGCTCCACGCCAGTCGCGTACCGTCTTCATGGGAGAAAAATAACTGTTGATGGGTGTCTGGTCAGAGACATCAAGAAA
 TAACGCCGAACATTAGTGCAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCCACTGA
 CGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCCGCTTTACAGGCTTCGACGCCGCTTCGTTCTACCATCGACACCACCGCTGGCA
 CCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCCGCGACAATTTGCGACGGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAAT
 CAGCAACGACTGTTTGCCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTTT
 CCCGCGTTTTTCGAGAAACGTGGCTGGCTGGTTTACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCGGCATACTCTGCGACA
 TCGTATAACGTTACTGGTTTACATTACCAACCCGTAATTGACTCTCTCCGGGCGCTATCATGCCATACCGCGAAAGGTTTT
 GCGCCATTGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCTAGGAAGCAGCCAGTAGTAGGTTGAGG
 CCGTTGAGCACCGCCGCCGAAGGAATGGTGCATG

Multiple cloning site in pETSUMOadapt

5' - GGTGGTAGAGACCTCAGGATCC AAGCTT GCGGCCGCTCGAGAGACAAGCTT - 3'
 3' - CCACCATCTCTGGAGTCTTAGGTTTCGAACGCCGGCGGAGCTCTCTGTTTCGAA - 5'

Schnitt durch BsaI und BamHI:

5' - GG TGGTAGAGACCTCAG GATCC AAGCTT GCGGCCGCTCGAGAGACAAGCTT - 3'
 3' - CCACCA TCTCTGGAGTCTTAGGTTTCGAACGCCGGCGGAGCTCTCTGTTTCGAA - 5'

Nukleotidsequenz wt-mmob

ATAGGTCTCA TGGTTCGTCTGCACACAACGCCTACAACGCGGGTATTATGCAAAAACTGGTAAGGCTTTTGCGGACGAATT
 CTTTCGCTGAAGAAAATCAAGTGGTGCACGAAAGCAATGCAGTTGTTCTGGTTCTGATGAAATCTGACGAGATTGACGCGATTA
 TTGAGGACATCGTCTTGAAGGGTGGCAAGGCGAAGAATCCGAGCATCGTGGTGGAGGACAAAGCTGGCTTTTGGTGGATTAAG
 GCTGACGGTGCGATCGAGATTGATGCGGCCGAGGCGAGCGAACTGTTGGGTAAGCCGTTTAGCGTTTACGACTTACTGATCAA
 TGTTAGCAGCACCCTTGGTCTGCTTATACCCTGGGTACGAAGTTTACCATCACGTCTGAGCTGATGGGTCTGGACCGCGCAC
 TGACGGACATTTAAG GATCC GACG

Nukleotidsequenz mmob01 (S109A/T111A) synthetisiert von GeneWiz

ATAGGTCTCA TGGTTCGTCTGCACACAACGCCTACAACGCGGGTATTATGCAAAAACTGGTAAGGCTTTTGCGGACGAATT
 CTTTCGCTGAAGAAAATCAAGTGGTGCACGAAAGCAATGCAGTTGTTCTGGTTCTGATGAAATCTGACGAGATTGACGCGATTA
 TTGAGGACATCGTCTTGAAGGGTGGCAAGGCGAAGAATCCGAGCATCGTGGTGGAGGACAAAGCTGGCTTTTGGTGGATTAAG
 GCTGACGGTGCGATCGAGATTGATGCGGCCGAGGCGAGCGAACTGTTGGGTAAGCCGTTTAGCGTTTACGACTTACTGATCAA
 TGTTCCAGCCTGTTGGTCTGCTTATACCCTGGGTACGAAGTTTACCATCACGTCTGAGCTGATGGGTCTGGACCGCGCAC
 TGACGGACATTTAAG GATCC GACG

Nukleotidsequenz mmob02 (S109A/T111G) synthetisiert von GeneWiz

ATAGGTCTCA TGGTTCGTCTGCACACAACGCCTACAACGCGGGTATTATGCAAAAACTGGTAAGGCTTTTGCGGACGAATT
 CTTTCGCTGAAGAAAATCAAGTGGTGCACGAAAGCAATGCAGTTGTTCTGGTTCTGATGAAATCTGACGAGATTGACGCGATTA
 TTGAGGACATCGTCTTGAAGGGTGGCAAGGCGAAGAATCCGAGCATCGTGGTGGAGGACAAAGCTGGCTTTTGGTGGATTAAG
 GCTGACGGTGCGATCGAGATTGATGCGGCCGAGGCGAGCGAACTGTTGGGTAAGCCGTTTAGCGTTTACGACTTACTGATCAA
 TGTTCCAGCCTGTTGGTCTGCTTATACCCTGGGTACGAAGTTTACCATCACGTCTGAGCTGATGGGTCTGGACCGCGCAC
 TGACGGACATTTAAG GATCC GACG

Nukleotidsequenz mmob03 (S109A/T111S) synthetisiert von GeneWiz

ATAGGTCTCA TGGTTCGTCTGCACACAACGCCTACAACGCGGGTATTATGCAAAAACTGGTAAGGCTTTTGCGGACGAATT
 CTTTCGCTGAAGAAAATCAAGTGGTGCACGAAAGCAATGCAGTTGTTCTGGTTCTGATGAAATCTGACGAGATTGACGCGATTA
 TTGAGGACATCGTCTTGAAGGGTGGCAAGGCGAAGAATCCGAGCATCGTGGTGGAGGACAAAGCTGGCTTTTGGTGGATTAAG
 GCTGACGGTGCGATCGAGATTGATGCGGCCGAGGCGAGCGAACTGTTGGGTAAGCCGTTTAGCGTTTACGACTTACTGATCAA

TGTT**CC**AGC**CTC**GTTGGTCGTGCTTATACCCTGGGTACGAAGTTTACCATCACGTCTGAGCTGATGGGTCTGGACCGCGCAC
TGACGGACATT**TAA**G **GATCC**GACG

Nukleotidsequenz mmob04 (S109A/T111V) synthetisiert von GeneWiz

ATAGGTCTCA **TGGT**TCGTCTGCACACAACGCCTACAACGCGGGTATTATGCAAAAACTGGTAAGGCTTTTGCGGACGAATT
CTTCGCTGAAGAAAATCAAGTGGTGCACGAAAGCAATGCAGTTGTTCTGGTTCTGATGAAATCTGACGAGATTGACGCGATTA
TTGAGGACATCGTCTGAAGGGTGGCAAGGCGAAGAATCCGAGCATCGTGGTGGAGGACAAAGCTGGCTTTTGGTGGATTAAG
GCTGACGGTGCGATCGAGATTGATGCGGCCGAGGCAGGCGAACTGTTGGGTAAGCCGTTTAGCGTTTACGACTTACTGATCAA
TGTT**CC**AGC**CTC**GTTGGTCGTGCTTATACCCTGGGTACGAAGTTTACCATCACGTCTGAGCTGATGGGTCTGGACCGCGCAC
TGACGGACATT**TAA**G **GATCC**GACG

Nukleotidsequenz mmob05 (T111A) synthetisiert von GeneWiz

ATAGGTCTCA **TGGT**TCGTCTGCACACAACGCCTACAACGCGGGTATTATGCAAAAACTGGTAAGGCTTTTGCGGACGAATT
CTTCGCTGAAGAAAATCAAGTGGTGCACGAAAGCAATGCAGTTGTTCTGGTTCTGATGAAATCTGACGAGATTGACGCGATTA
TTGAGGACATCGTCTGAAGGGTGGCAAGGCGAAGAATCCGAGCATCGTGGTGGAGGACAAAGCTGGCTTTTGGTGGATTAAG
GCTGACGGTGCGATCGAGATTGATGCGGCCGAGGCAGGCGAACTGTTGGGTAAGCCGTTTAGCGTTTACGACTTACTGATCAA
TGTTAGCAGC**CTC**GTTGGTCGTGCTTATACCCTGGGTACGAAGTTTACCATCACGTCTGAGCTGATGGGTCTGGACCGCGCAC
TGACGGACATT**TAA**G **GATCC**GACG

Nukleotidsequenz mmob06 (T111G) synthetisiert von GeneWiz

ATAGGTCTCA **TGGT**TCGTCTGCACACAACGCCTACAACGCGGGTATTATGCAAAAACTGGTAAGGCTTTTGCGGACGAATT
CTTCGCTGAAGAAAATCAAGTGGTGCACGAAAGCAATGCAGTTGTTCTGGTTCTGATGAAATCTGACGAGATTGACGCGATTA
TTGAGGACATCGTCTGAAGGGTGGCAAGGCGAAGAATCCGAGCATCGTGGTGGAGGACAAAGCTGGCTTTTGGTGGATTAAG
GCTGACGGTGCGATCGAGATTGATGCGGCCGAGGCAGGCGAACTGTTGGGTAAGCCGTTTAGCGTTTACGACTTACTGATCAA
TGTTAGCAGC**CTC**GTTGGTCGTGCTTATACCCTGGGTACGAAGTTTACCATCACGTCTGAGCTGATGGGTCTGGACCGCGCAC
TGACGGACATT**TAA**G **GATCC**GACG

Nukleotidsequenz mmob07 (T111S) synthetisiert von GeneWiz

ATAGGTCTCA **TGGT**TCGTCTGCACACAACGCCTACAACGCGGGTATTATGCAAAAACTGGTAAGGCTTTTGCGGACGAATT
CTTCGCTGAAGAAAATCAAGTGGTGCACGAAAGCAATGCAGTTGTTCTGGTTCTGATGAAATCTGACGAGATTGACGCGATTA
TTGAGGACATCGTCTGAAGGGTGGCAAGGCGAAGAATCCGAGCATCGTGGTGGAGGACAAAGCTGGCTTTTGGTGGATTAAG
GCTGACGGTGCGATCGAGATTGATGCGGCCGAGGCAGGCGAACTGTTGGGTAAGCCGTTTAGCGTTTACGACTTACTGATCAA
TGTTAGCAGC**CTC**GTTGGTCGTGCTTATACCCTGGGTACGAAGTTTACCATCACGTCTGAGCTGATGGGTCTGGACCGCGCAC
TGACGGACATT**TAA**G **GATCC**GACG

Nukleotidsequenz mmob08 (T111V) synthetisiert von GeneWiz

ATAGGTCTCA **TGGT**TCGTCTGCACACAACGCCTACAACGCGGGTATTATGCAAAAACTGGTAAGGCTTTTGCGGACGAATT
CTTCGCTGAAGAAAATCAAGTGGTGCACGAAAGCAATGCAGTTGTTCTGGTTCTGATGAAATCTGACGAGATTGACGCGATTA
TTGAGGACATCGTCTGAAGGGTGGCAAGGCGAAGAATCCGAGCATCGTGGTGGAGGACAAAGCTGGCTTTTGGTGGATTAAG
GCTGACGGTGCGATCGAGATTGATGCGGCCGAGGCAGGCGAACTGTTGGGTAAGCCGTTTAGCGTTTACGACTTACTGATCAA
TGTTAGCAGC**CTC**GTTGGTCGTGCTTATACCCTGGGTACGAAGTTTACCATCACGTCTGAGCTGATGGGTCTGGACCGCGCAC
TGACGGACATT**TAA**G **GATCC**GACG

8.3 Kolonie-PCR von *E. coli* KRX pETSUMOadapt_mmob-Stämmen

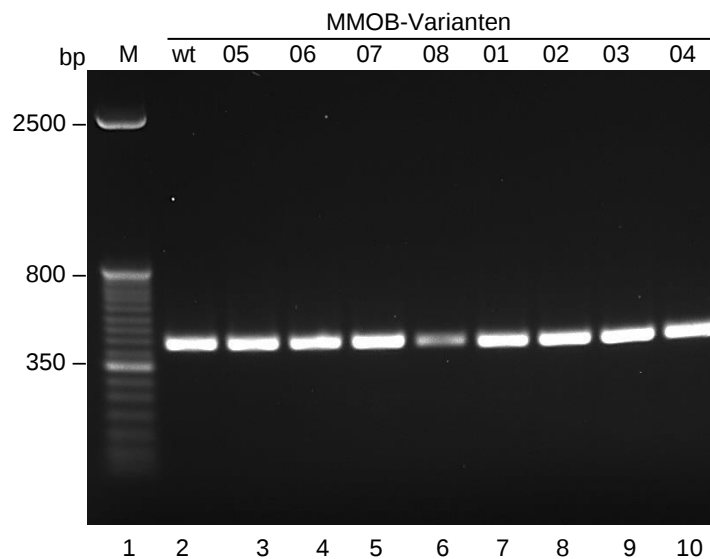


Abbildung 8.3: Agarose-Gelelektrophorese nach Kolonie-PCR von *E. coli* KRX pETSUMOadapt_mmob-Stämmen; Kolonie-PCR beschrieben in Kapitel 2.2.4 (Seite 30), verwendete Primer: T7_fwd, T7_rev (Tabelle 2.7, Seite 25); Agarose-Gelelektrophorese beschrieben in Kapitel 2.5.4, Seite 44

8.4 Reinigung von MMOb-Varianten

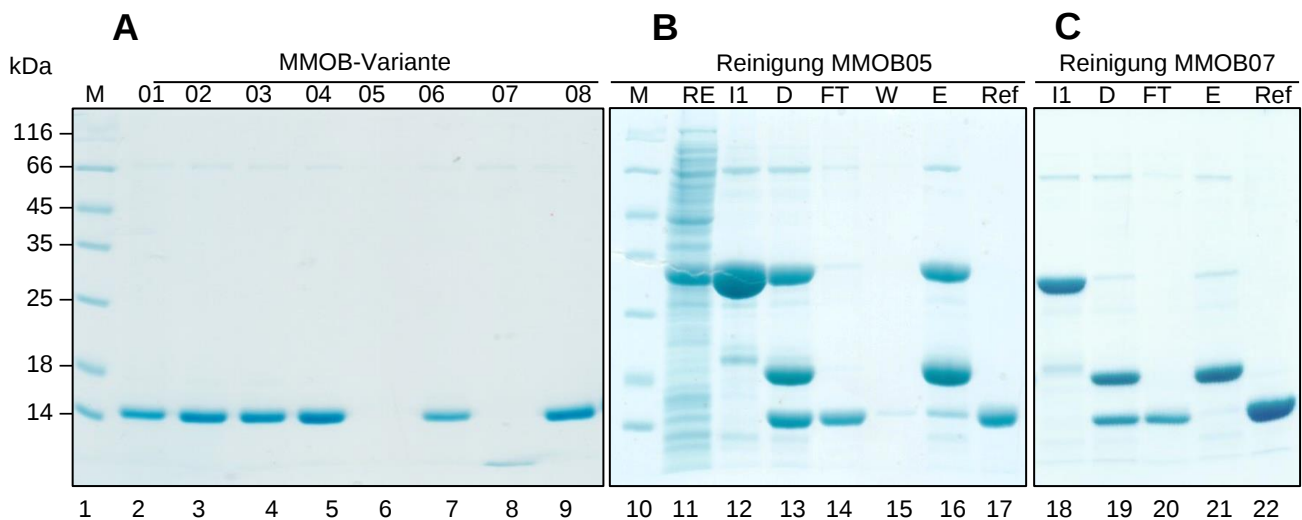


Abbildung 8.4: SDS-PAGE-Analyse von Fraktionen der Reinigung von MMOb-Varianten; Reinigungsmethode beschrieben in Kapitel 2.3.7 (Seite 35); **Gel A:** Gereinigte Varianten MMOb01 – 04, 06, 08 nach der 2. IMAC, Reinigung der Varianten MMOb05 und 07 zunächst nicht erfolgreich; **Gel B:** Reinigung der Variante MMOb05, M: Molekulargewichtsmarker, RE: Rohextrakt, I1: Elutionsfraktion IMAC 1, D: Nach Verdau mit SUMO-Protease, FT: Durchfluss IMAC2, W: Waschfraktion IMAC2, E: Elutionsfraktion IMAC2, Ref: gereinigtes wtMMOb; **Gel C:** Reinigung der Variante MMOb07, I1: Elutionsfraktion IMAC1, D: nach Verdau mit SUMO-Protease, FT: Durchfluss IMAC2, E: Elutionsfraktion IMAC2, Ref: gereinigtes wtMMOb. Die SDS-PAGE-Analyse wurde analog zu der Analyse der Reinigung des Wildtyp MMOb in Abbildung 3.10 (Seite 57) durchgeführt.

8.5 Präparation der SUMO-Protease scUlp1

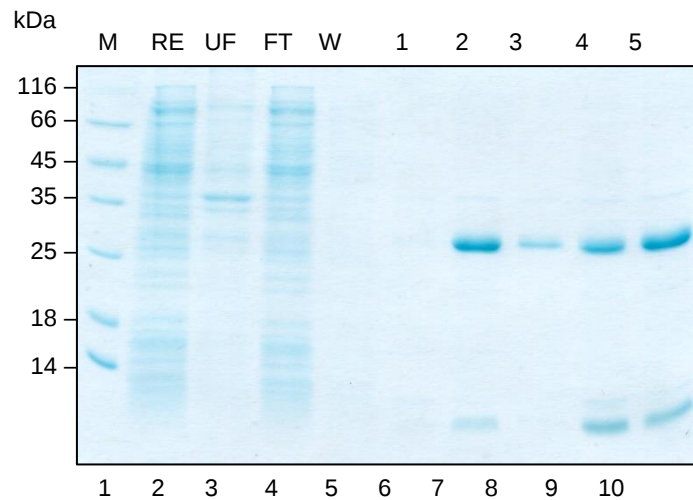


Abbildung 8.5: SDS-PAGE-Analyse von Reinigungsfraktionen zur Aufarbeitung der SUMO-Protease scUlp1; Biomasse (30,2 g BWM *E. coli* Rosetta (DE3) pET28a-scUlp1) zur Aufarbeitung wurde zur Verfügung gestellt von O. Koyuturk, M. Wolfram. Die Reinigung wurde nach dem Protokoll von O. Koyuturk durchgeführt [Koyuturk, 2015]. Reinigung mittels IMAC. M: *Unstained Protein Molecular Weight Marker*; RE: Rohextrakt nach Zellaufschluss (lösliche Fraktion); UF: unlösliche Fraktion nach Zentrifugation; FT: Durchflussfraktion; W: Waschfraktion; 1-5: Elutionsfraktionen. Finale Proteinkonzentration nach Vereinigung der Elutionsfraktionen und Dialyse $c = 0,46 \text{ mg/mL}$, $V = 48 \text{ mL}$, $m = 22,1 \text{ mg}$.

8.6 Aktivitätsbestimmung gereinigter MMOR-Fraktionen

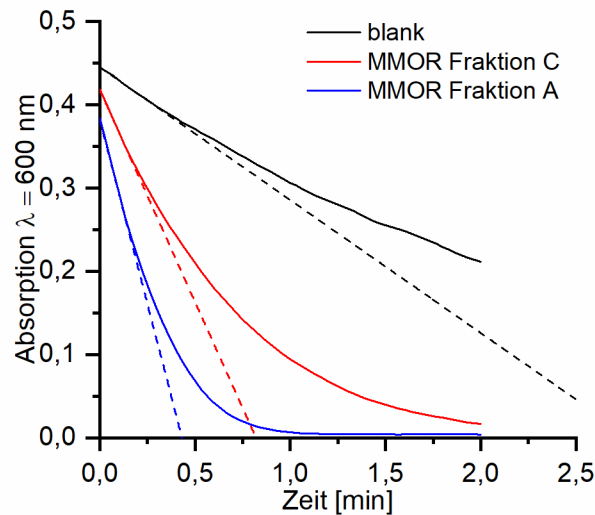


Abbildung 8.6: Progresskurven der MMOR-Aktivität im DCPIP-Assay; Methode beschrieben in Kapitel 2.4.1, Seite 35; Absorption von DCPIP bei 600 nm gemittelt von $n = 3$ Reaktionen; $V = 500 \text{ }\mu\text{L}$, $T = 45 \text{ }^\circ\text{C}$, $c(\text{DCPIP}) = 100 \text{ }\mu\text{M}$, $c(\text{NADH}) = 1 \text{ mM}$; $c(\text{MMOR})$ siehe Tabelle 8.1

Tabelle 8.1: Parameter und Reaktionsgeschwindigkeiten der MMOR im DCPIP-Assay

Probe	Protein- konzentration	Anstieg	Anstieg nach <i>blank</i> Abzug	Reaktionsge- schwindigkeit	Spezifische Aktivität
	µg/mL	min ⁻¹	min ⁻¹	µM/min	U/mg
<i>blank</i>	0	-0,1597	-	-	-
MMOR Fraktion A	1,1	-0,8873	-0,7276	55,97	53
MMOR Fraktion C	0,9	-0,5098	-0,3501	26,93	29,8

8.7 Einfluss organischer Lösungsmittel auf die sMMO-Aktivität

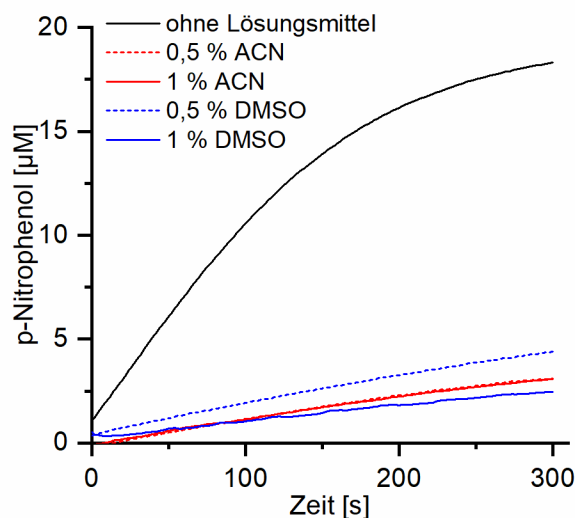


Abbildung 8.7: Umsatz von Nitrobenzol mit der sMMO mit und ohne Lösungsmittelzusatz; Nitrobenzol-Assay beschrieben in Kapitel 2.4.2 (Seite 36); p-Nitrophenol detektiert bei $\lambda = 420$ nm; Progresskurven gemittelt aus $n = 3$; Standardabweichung ≤ 10 %; Reaktionsparameter: $V = 0,5$ mL TMA-Puffer pH 7,5 mit angegebenem Volumen-Prozentanteil Acetonitril (ACN) oder Dimethylsulfoxid (DMSO); $T = 30$ °C; $c(\text{sMMO}) = 1$ μM^* , $c(\text{Nitrobenzol}) = 1$ mM; $c(\text{NADH}) = 1$ mM; (*) bezogen auf eine aktive Einheit (MMOH:MMOB:MMOR = 1:1:1);

8.8 Einfluss von BSA auf die sMMO

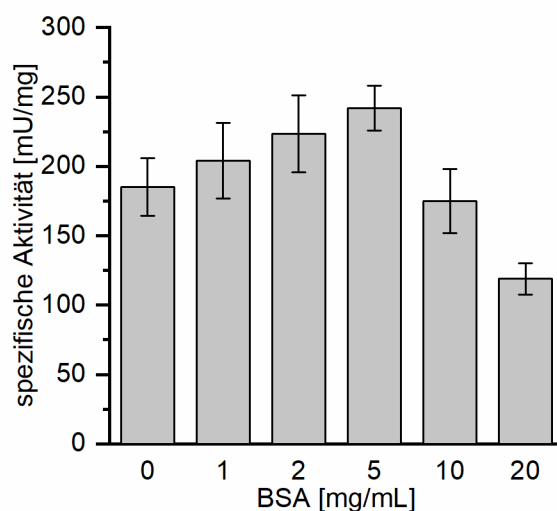


Abbildung 8.8: Spezifische Aktivität der sMMO im Nitrobenzol-Assay mit verschiedenen BSA-Konzentrationen; Nitrobenzol-Assay beschrieben in Kapitel 2.4.2 (Seite 36); $V = 0,5$ mL TMA-Puffer pH 7,5; $T = 30$ °C; $c(\text{sMMO}) = 1$ μM ; $c(\text{Nitrobenzol}) = 1$ mM; $c(\text{NADH}) = 1$ mM; $c(\text{BSA}) = 0 - 20$ mg/mL; p-Nitrophenol detektiert bei $\lambda = 420$ nm; spez. Aktivität berechnet aus dem initialen Anstieg der Produktkonzentration aus $n \geq 3$ Reaktionen.

8.9 HPLC-Kalibrierung

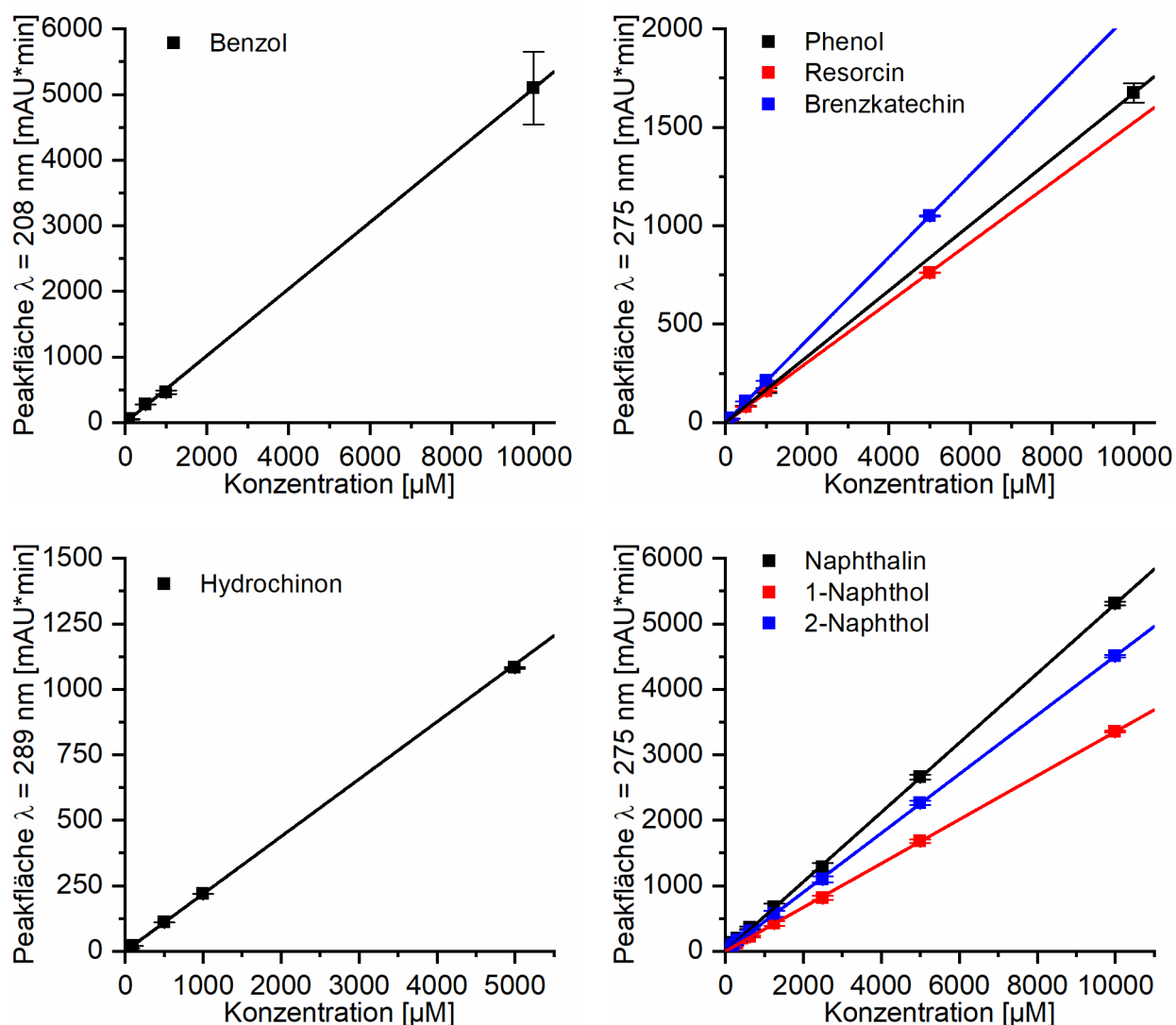


Abbildung 8.9: Kalibriergeraden der HPLC-Analyse; die entsprechenden Substanzen wurden in 10 – 50 % ACN gelöst und mit der Methode in Kapitel 2.5.5 (Seite 44) analysiert; Injektionsvolumen 1 μL; n = 2

Tabelle 8.2: Kalibrierung der HPLC-Analyse; ermittelte Korrelationskoeffizienten aus Abbildung 8.9

Substanz	Wellenlänge nm	Korrelationsfaktor	Korrelationskoeffizient
		Peakfläche/Konzentration $\text{mAU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$	R^2
Benzol	208	0,5093	0,99985
Phenol	275	0,1674	0,99999
Resorcin	275	0,1524	0,99987
Brenzkatechin	275	0,2099	0,99999
Hydrochinon	289	0,2190	0,99995
Naphthalin	275	0,5305	0,99989
1-Naphthol	275	0,3352	0,99989
2-Naphthol	275	0,4509	0,99991

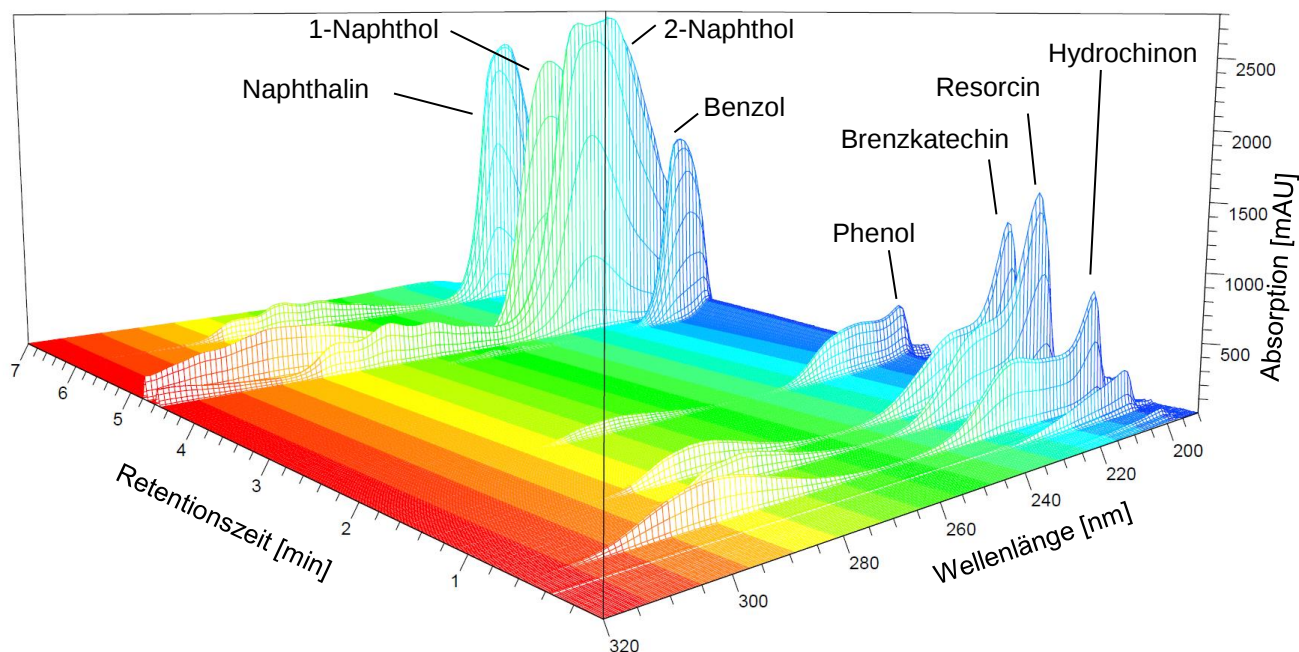


Abbildung 8.10: Beispiel-Chromatogramm der HPLC-Analyse, Methode beschrieben in Kapitel 2.5.5 (Seite 44)

8.10 GC-Kalibrierung

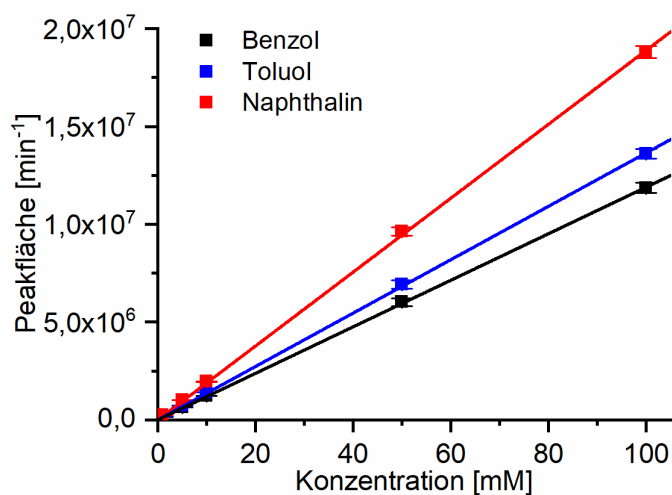


Abbildung 8.11; Kalibriergeraden der GC-Analyse; die entsprechenden Substanzen wurden in n-Decan gelöst und mit der Methode in Kapitel 2.5.6 (Seite 45) analysiert; Injektionsvolumen 1 μL ; $n = 2$

Tabelle 8.3: Kalibrierung der HPLC-Analyse; ermittelte Korrelationskoeffizienten aus Abbildung 8.11

Substanz	Korrelationsfaktor Peakfläche/Konzentration $\text{min}^{-1} \text{mM}^{-1}$	Korrelationskoeffizient R^2
Benzol	119007	0,99994
Toluol	136545	0,99991
Naphthalin	188999	0,99987

8.11 Kalibrierung des Massenspektrometers VarioOne

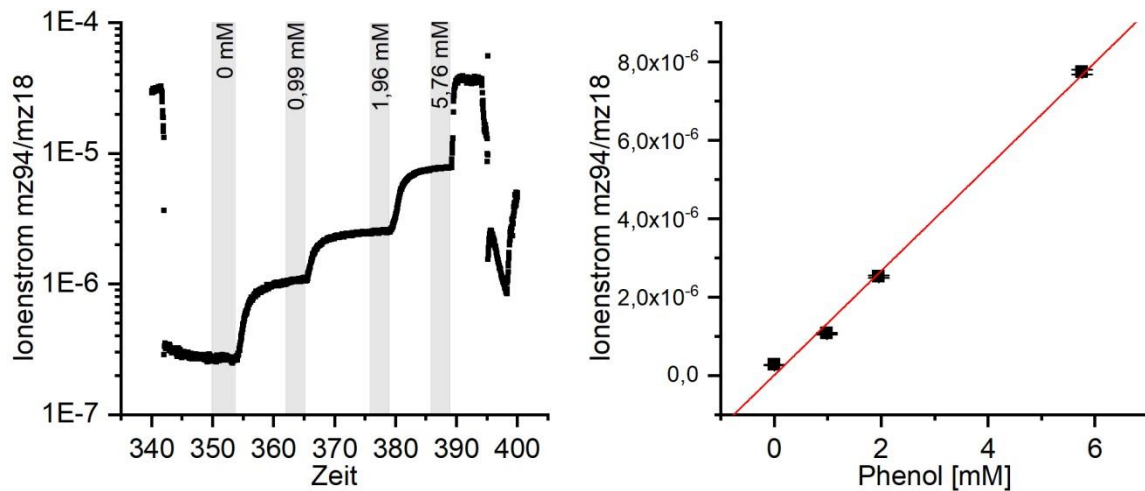


Abbildung 8.12; Kalibrierung der MS-Analyse (VarioOne, Variolytics, Stuttgart) mit bekannten Phenol-Konzentrationen; Messprinzip und Methode sind in Kapitel 2.5.7 (Seite 46) beschrieben. Definierte Mengen an Phenol wurden in eine wässrige Lösung gegeben. Der Ionenstrom bei $m/z = 94$ wurde kontinuierlich gemessen und im Anschluss an den Ionenstrom von Wasser ($m/z = 18$) als Referenz normiert. Nach Erreichen eines konstanten Ionenstroms wurde der Mittelwert gebildet (Bereiche in grau markiert) und gegen die Konzentration aufgetragen.

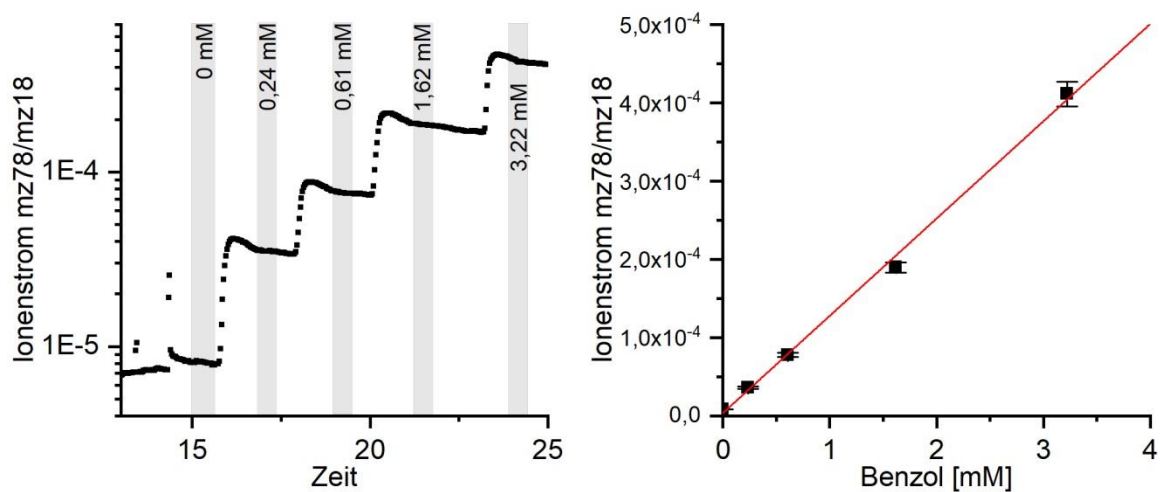


Abbildung 8.13; Kalibrierung der MS-Analyse (VarioOne, Variolytics, Stuttgart) mit bekannten Benzol-Konzentrationen; Messprinzip und Methode sind in Kapitel 2.5.7 (Seite 46) beschrieben. Definierte Mengen an Benzol wurden in eine wässrige Lösung gegeben. Der Ionenstrom bei $m/z = 78$ wurde kontinuierlich gemessen und im Anschluss an den Ionenstrom von Wasser ($m/z = 18$) als Referenz normiert. Nach Erreichen eines konstanten Ionenstroms wurde der Mittelwert gebildet (Bereiche in grau markiert) und gegen die Konzentration aufgetragen.

8.12 Untersuchung zum Umsatz der Glucosedehydrogenase

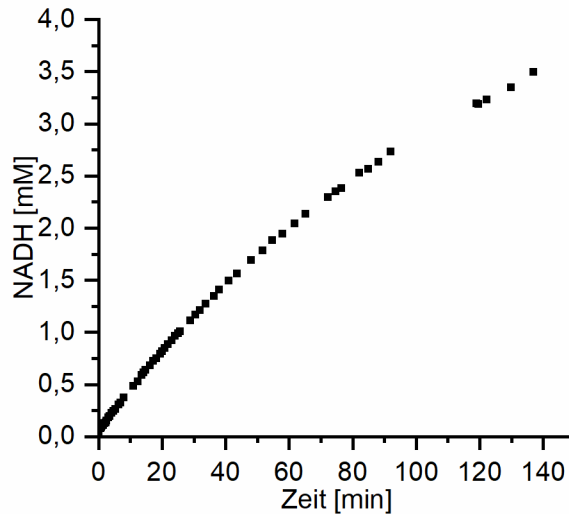


Abbildung 8.14; Umsatz von Glucose mit der Glucosedehydrogenase (GDH, *Pseudomonas sp.*, Sigma-Aldrich), Bildung von NADH; Reaktion: $V = 1 \text{ mL}$ TMA-Puffer pH 7,5, $c(\text{GDH}) = 1 \mu\text{g/mL}$, $c(\text{D-Glucose}) = 50 \text{ mM}$, $c(\text{NAD}) = 10 \text{ mM}$; Bildung von NADH spektrophotometrisch verfolgt mit NanoDrop, Berechnung der Konzentration über Extinktionskoeffizient $\epsilon_{340} = 6200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; Daten aus $n = 2$ Reaktionen dargestellt. Im beobachteten Zeitraum wurden mit $1 \mu\text{g/mL}$ GDH $3,5 \text{ mM}$ NADH gebildet. Durch Einsatz von $5 \mu\text{g/mL}$ GDH im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten mindestens $17,5 \text{ mM}$ NADH produziert werden können.

8.13 Untersuchung zum Umsatz der Katalase

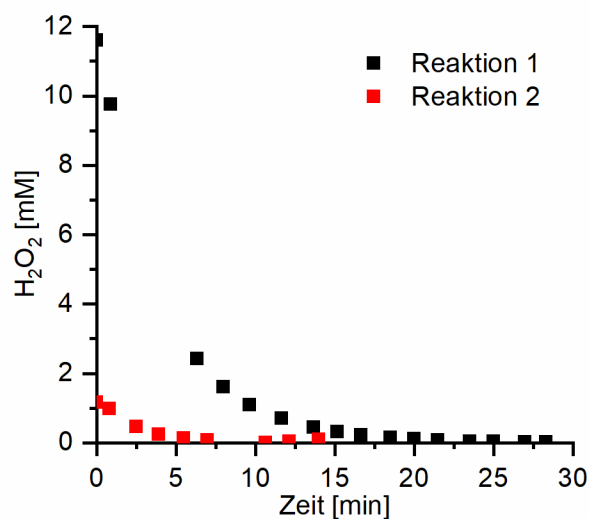


Abbildung 8.15; Umsatz von H_2O_2 mit der Katalase (Cat, Rinderleber, Sigma-Aldrich); Reaktion: $V = 1 \text{ mL}$ TMA-Puffer pH 7,5, $c(\text{Cat}) = 0,1 \mu\text{g/mL}$, Reaktion 1: $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 11,6 \text{ mM}$, Reaktion 2: $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 1,16 \text{ mM}$, Konzentration von H_2O_2 bestimmt mit YSI-Analysator (nach Herstellerangaben). In Reaktion 1 wurden mit $0,1 \mu\text{g/mL}$ Cat $11,6 \text{ mM}$ H_2O_2 umgesetzt. Durch Einsatz von $100 - 500 \mu\text{g/mL}$ im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte mindestens $11,6 - 58 \text{ M}$ H_2O_2 umgesetzt werden können.

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand während meiner Arbeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der AG Aufarbeitung biotechnischer Produkte des Instituts für Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Im Folgenden möchte ich mich bei allen Menschen (und Mieps) bedanken, die mich während dieser Zeit unterstützt haben. Dank euch kann ich auf dieses interessante, anspruchsvolle und lehrreiche, teilweise langwierige und dennoch abwechslungsreiche Abenteuer mit einem Lächeln zurückblicken.

Als aller erstes ist da Prof. Dr. Markus Pietzsch zu nennen, der mir die Möglichkeit zur Anfertigung der Promotion in seiner Arbeitsgruppe mit diesem interessanten Thema gab. Danke für das investierte Vertrauen, die hilfreichen Diskussionen und die Denkanstöße bezüglich wissenschaftlicher und auch gesellschaftlicher und sozialer Prioritäten.

Eine der wichtigsten Stützen während der gesamten Zeit war Dr. Franziska Seifert. Ich habe sehr gerne mit dir zusammen gearbeitet und mich von deiner fachlichen Kompetenz und deiner unerschöpflichen Begeisterungsfähigkeit inspirieren lassen. Danke!

Als weitere Mitstreiter im Projekt geht mein Dank an Dr. Zeljko Simic, Dr. Andreas Griethe und an die Projektpartner des IGB in Stuttgart und des LIKAT in Rostock. Im speziellen möchte ich Ilka Derwenskus danken, welche mir bei den teilweise sehr langen Tagen im Technikum am IGB zur Seite stand. Außerdem danke ich Dr. Matthias Stier und dem Team von VarioLytics, die unter Anderem die MS-Analytik möglich gemacht haben.

Tatkräftige Unterstützung bekam ich auch von Luisa von Wolffersdorff und von Mohammed Al Bader. Das gemeinsame Arbeiten im Labor war stets von konstruktivem Austausch und einer lustigen Atmosphäre geprägt. Dadurch sind unweigerlich wichtige Freundschaften entstanden, die auch außerhalb des S1-Bereichs ihren Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Neben der wissenschaftlichen Herausforderung war vor allem das Miteinander in der Arbeitsgruppe ein wichtiger Faktor, der mir Tag für Tag die nötige Motivation verlieh. Als ein Team Probleme bewältigen und gemeinsam Ziele erreichen – das macht die AG zu etwas Besonderem. Ich danke euch allen!

Danke auch an alle, die meine Arbeit gelesen haben und mich auf kleine oder große Fehler und Ungereimtheiten hingewiesen haben.

Und Schlussendlich: Danke an die besten Menschen der Welt, an meine Freunde und meine Familie, die mir geholfen haben, mich ausgehalten haben und mich zurück in die Spur geschubst haben, wenn ich mal die Orientierung verloren habe.

In der Hauptrolle natürlich Frau Gerd, Prost!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Jann Simon Groen
Geburtsdatum und -ort:	22.06.1992 in Gifhorn
Nationalität:	Deutsch
Akademischer Grad	Master of Science

Schulischer und Beruflicher Werdegang

11.2017 – jetzt	Promotion am Institut für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
10.2017 – 11.2017	Wissenschaftliche Hilfskraft, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie
08.2015 – 03.2016	Auslandspraktikum bei BioBase Europe Pilot Plant, Gent (Belgien), gefördert durch IAESTE Thema „Carbon capture through microbial fermentation“
10.2014 – 11.2017	Studium im Fach Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abschluss Master of Science, Thema der Abschlussarbeit: „Untersuchungen zur <i>in-vitro</i> -Synthese von Dolichylphosphat-Mannose mit Dpm1“ (Arbeitsgruppe Aufarbeitung biotechnischer Produkte, Institut für Pharmazie)
10.2011 – 09.2014	Studium im Fach Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abschluss Bachelor of Science, Thema der Abschlussarbeit: „Etablierung von optimierten Strategien zur Expression und Reinigung von Trypsinvarianten“ (Abteilung Naturstoffbiochemie, Institut für Biochemie und Biotechnologie)
09.2004 – 06.2011	Schule Mariengymnasium Jever, Abschluss Abitur