

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fachgebiet für Biotechnologie der Naturstoffe

Selektive biokatalytische Herstellung von Aromastoffen aus Carotinoiden durch
Kombination molekularbiologischer, enzym- und verfahrenstechnischer Methoden

Christoph Nacke

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan
für Ernährung, Landnutzung, Umwelt der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. P. Schieberle
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. W. Schwab
2. Univ.-Prof. Dr. K.-H. Engel

Die Dissertation wurde am 22.07.2010 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung, Umwelt am 24.10.2010 angenommen.

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum März 2007 bis Dezember 2009 in der Arbeitsgruppe Bioverfahrenstechnik des Karl-Winnacker-Instituts der DECHEMA e.V. in Frankfurt angefertigt.

Auszüge aus dieser Dissertation wurden bereits zur Veröffentlichung eingereicht.

Publikationen

Nacke, C., Schilling, M., Schrader, J. (2009) Folding reporter tags can deliver misleading results upon chaperone coexpression. *Journal of Biotechnology* 144, 268-271.

Nacke, C. And Schrader, J. (2011) Liposome based solubilisation of carotenoid substrates for enzymatic conversion in aqueous media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 71, 133-138.

Vorträge

Nacke, C., Schrader, J. (2009) Regiospecific oxidative cleavage of carotenoids. 27. Jahrestagung der Biotechnologen 2009, Mannheim.

Posterpräsentationen

Nacke, C., Schilling, M., Schrader, J. (2009) Carotenoid bioconversion by regiospecific oxidative cleavage. 27. Jahrestagung der Biotechnologen 2009, Mannheim.

Nacke, C., Walisko, R., Schilling, M., Schrader, J. (2009) Oxidative cleavage of carotenoids with the carotenoid cleavage dioxygenase AtCCD1 in a micellar reaction system. *ACHEMA 2009*, Frankfurt a. M.

Nacke, C., Schilling M, Schrader, J. (2009) Carotenoid bioconversion by regiospecific oxidative cleavage. *Biotrans 2009*, Bern, Schweiz

Auszeichnungen

Posterpreis in der Kategorie „Biokatalyse“, *Biotrans 2009*, Bern, Schweiz

Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Wilfried Schwab, für das Übernehmen meiner Betreuung, für die Anregungen und Diskussionen im Verlauf des Projektes und insbesondere für das offene und unterstützende Verhältnis zu mir als externem Doktoranden. Bei Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Engel und bei Herrn Prof. Dr. Peter Schieberle bedanke ich mich für die Mitarbeit in der Prüfungskommission.

PD Dr. Jens Schrader ermöglichte mir die Durchführung der Doktorarbeit am Karl-Winnacker-Institut der DECHEMA e.V. Ihm möchte ich in besonderer Weise dafür danken, dass er uns wissenschaftlich hervorragend und fordernd betreute und ein ausgesprochen loyaler und verlässlicher Gruppenleiter war. Bei M.Sc. Sonja Hüttmann möchte ich mich für ihren großartigen Einsatz während ihrer Masterarbeit bedanken, mit der sie einen wichtigen Beitrag zum Projekterfolg geleistet hat. Den Kollegen von DECHEMA e.V. und Karl-Winnacker-Institut, insbesondere der Arbeitsgruppe Bioverfahrenstechnik, möchte ich für die hervorragende Arbeitsatmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft danken. Besonderer Dank gilt dabei Dr. Martin Schilling, der Freund und wissenschaftlicher Mentor zugleich war, Dr. Marco Mirata, von dem ich analytisch und persönlich viel gelernt habe, sowie Robert Walisko, Sevil Zengin, Fenja Kähne und Isabell Schmidt dafür, dass wir in dieser Zeit so ein eingeschworenes Team waren.

Der Lipoid GmbH möchte ich für die Bereitstellung aufgereinigter Phospholipide danken. Herrn Dr. Christian Christiansen von der Wild Flavours GmbH danke ich für die Bereitstellung von Carotinoiden und für sein Engagement im Rahmen des projektbegleitenden Ausschusses. Herrn Prof. Dr. Gerhard Sandmann danke ich für die Bereitstellung der carotinoidproduzierenden *E.coli*-Stämme, der IGV GmbH für carotinoidproduzierende Algen und daraus hergestellten CO₂-Extrakt. Mein Dank gilt darüber hinaus der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto von Guericke“ e.V. (AiF), die das Projekt finanziell unterstützt hat.

Ganz besonderen Dank möchte ich meinen Eltern aussprechen. Sie haben auf vielfältige Weise diesen Schritt möglich gemacht.

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	SUMMARY	3
3	EINLEITUNG	5
3.1	β-Ionon und natürliche Aromastoffe	5
3.2	Carotinoidbiosynthese und –spaltung	6
3.2.1	Carotinoidbiosynthese	6
3.2.2	Carotinoidspaltung.....	10
3.2.3	Enzym AtCCD1	14
3.3	Vermittlung von Carotinoiden in wässrige Systeme	18
3.3.1	Physikochemische Eigenschaften von Carotinoiden.....	18
3.3.2	Solubilisierung von Carotinoiden in Emulsionen	19
3.3.3	Solubilisierung von Carotinoiden in Mizellen.....	20
3.3.4	Solubilisierung von Carotinoiden in Liposomen	24
3.4	Technische Carotinoidquellen	27
3.4.1	Biomasse als Carotinoidquelle.....	27
3.4.2	Biochemische Verfügbarkeit der Carotinoide	29
3.5	Rekombinante Proteinexpression in <i>E. coli</i>	31
3.6	<i>In-situ</i> Produktabtrennung durch organophile Pervaporation	33
3.6.1	Verfahrensprinzip der organophilen Pervaporation	33
3.6.2	Kennzahlen zur Beurteilung von Pervaporationsprozessen	35
3.6.3	Betriebsparameter und ihr Einfluss auf die Trennleistung	36
4	AUFGABENSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	40
5	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	41
5.1	Charakterisierung von Substratvermittlungssystemen für Carotinoide	41
5.1.1	Mizellen	41
5.1.1.1	Eignung von Tensiden zur Vermittlung von Carotinoiden an Enzyme	41
5.1.1.2	Reaktionsbeschleunigung durch Cosolventien: Einfluss der Tensidstruktur	45
5.1.1.3	Charakterisierung von Verzögerungsphasen bei mizellarer Vermittlung.....	48
5.1.1.4	Kinetische Untersuchung der Umsetzung von β -Carotin aus Mizellen	54
5.1.2	Liposomen.....	56
5.1.2.1	Herstellungsverfahren für transparente Liposomenlösungen	56
5.1.2.2	Einfluss der Phospholipid-Zusammensetzung.....	59
5.1.2.3	Imitation der natürlichen Membranumgebung durch Glycolipide	61
5.1.2.4	Einfluss der Carotinoideinlagerung auf Aggregation und Größenverteilung	64
5.1.2.5	Enzymkinetische Parameter für Carotinoidumsetzungen aus Liposomen	68
5.1.3	Nanoemulsionen.....	69

5.1.3.1	Kompatibilität verschiedener Puffer mit Nanoemulsionen	70
5.1.3.2	Umsetzung von Carotinoiden aus Nanoemulsionen.....	71
5.1.4	Vergleich der erzielten Reaktionsgeschwindigkeiten	72
5.1.5	Zusammenfassung: Wahl des Substratvermittlungssystems	73
5.2	Enzymexpression und Enzymcharakterisierung	75
5.2.1	Stabilität und Aktivität von AtCCD1	75
5.2.1.1	Aktivität in Abhängigkeit vom pH für verschiedene Substrate	76
5.2.1.2	Stabilität unter Reaktionsbedingungen in Abhängigkeit vom pH.....	77
5.2.1.3	Einfluss von Proteinmodifikationen auf die Aktivität	78
5.2.2	Heterologe Expression unter Coexpression molekularer Chaperone.....	80
5.2.2.1	Selektion der optimalen Chaperon-Kombination	81
5.2.2.2	Chaperon-Induktionszeitpunkt und Induktion künstlicher Hitzeschock.....	86
5.2.2.3	Differenzielle Wirkung von Chaperonen auf Fusionsprotein-Untereinheiten.....	88
5.2.3	Untersuchung alternativer Carotinasen	94
5.2.3.1	Enzym RdCCD1	95
5.2.3.2	Enzym Bcmo2.....	96
5.2.3.3	Substratspektrum von Bcmo2.....	98
5.2.3.4	Untersuchung einer zweistufigen Biotransformation mit AtCCD1 und Bcmo2 ..	101
5.2.4	Zusammenfassung: Enzymexpression und -charakterisierung	102
5.3	Biomasse als Substratquelle	103
5.3.1	Rekombinant in <i>E.coli</i> produziertes β -Carotin.....	104
5.3.2	<i>Spirulina platensis</i> Biomasse.....	106
5.3.2.1	Umsetzung von β -Carotin aus <i>Spirulina platensis</i> Biomasse	108
5.3.2.2	Verbesserung der Mizellarisierung durch organische Lösungsmittel	110
5.3.2.3	Mizellarisierung nach saurer Hydrolyse von Carotino-Proteinen.....	112
5.3.3	CO ₂ -Extrakt aus <i>Spirulina</i> -Biomasse	113
5.3.3.1	Umsetzung in Gegenwart von Detergenzien und organischen Cosolventien ...	114
5.3.4	Biomasse als Substratquelle: Zusammenfassung und Ausblick	116
5.4	<i>In situ</i>-Produktabtrennung durch organophile Pervaporation.....	117
5.4.1	Auswahl und Charakterisierung der Pervaporationsmembran	117
5.4.1.1	Aufbau untersuchter Pervaporationsmembranen	117
5.4.1.2	Partialflussdichten und Anreicherungsfaktor mit Modellösungen	120
5.4.2	Verringerung der Produktinhibition durch <i>in situ</i> Produktabtrennung	123
5.4.3	<i>In situ</i> Produktabtrennung: Zusammenfassung	126
5.5	Demonstrationsanlage im Labormaßstab	126
5.5.1	Aufbau der Demonstrationsanlage	127
5.5.2	Eintrag des Cosubstrates Sauerstoff durch Begasung	129
5.5.3	Biokatalytische Herstellung von β -Ionon aus β -Carotin	133
5.5.4	Demonstrationsanlage: Zusammenfassung und Ausblick.....	137

6	MATERIAL UND METHODEN	138
6.1	Material	138
6.1.1	Chemikalien.....	138
6.1.2	Medien, Puffer, Lösungen.....	139
6.1.2.1	Medien	139
6.1.2.2	Puffer.....	140
6.1.3	Mikroorganismen	142
6.1.4	Plasmide	143
6.1.5	Marker	143
6.1.6	Antikörper.....	143
6.1.7	Kommerzielle Kits.....	143
6.2	Geräte	143
6.2.1	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie.....	143
6.2.2	Photometrische Messungen	144
6.2.2.1	Absorptionsmessung	144
6.2.2.2	Fluoreszenzmessung.....	144
6.2.3	Gaschromatographie	144
6.2.4	Kombinierte Gaschromatographie / Massenspektrometrie (GC/MS).....	145
6.2.5	Infrarot-Spektrometer	145
6.2.6	Dynamische Lichtstreuungsmessung (DLS)	145
6.2.7	Enzymreaktor	146
6.2.8	Pervaporationsmodul und Kühlfalle	147
6.2.8.1	Pervaporationsmodul und Kühlfallen	147
6.2.8.2	Pervaporationsmembranen.....	147
6.2.9	Rasterelektronenmikroskopie	147
6.2.10	Sonstige Geräte.....	148
6.3	Methoden	148
6.3.1	Molekularbiologische und proteinbiochemische Methoden	148
6.3.1.1	Transformation kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen.....	148
6.3.1.2	Plasmidpräparation und Sequenzierung.....	149
6.3.1.3	Herstellung von Glycerol-Kulturen	149
6.3.1.4	Proteinexpression	149
6.3.1.5	Herstellung von Zellysaten und Enzym-Rohextrakten.....	150
6.3.1.6	Affinitätschromatographische Proteinaufreinigung	150
6.3.1.7	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Test	151
6.3.1.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und densitometrische Gelanalyse.....	151
6.3.1.9	Western blot.....	153
6.3.1.10	Glutathion-S-Transferase (GST)-Aktivitätstest.....	153
6.3.2	<i>In vitro</i> Vermittlung carotinoider Substrate an Enzyme	154

6.3.2.1	Solubilisierung von Carotinoiden mittels Mizellen.....	154
6.3.2.2	Solubilisierung von Carotinoiden mittels Liposomen	155
6.3.2.3	Solubilisierung von Carotinoiden in Nanoemulsionen	156
6.3.3	Carotinas-Aktivitätstests	156
6.3.3.1	Carotinas-Aktivitätstest in Mikrotiterplatten.....	156
6.3.3.2	Carotinas-Aktivitätstest mit technischen Substraten.....	158
6.3.3.3	Carotinas-Aktivitätstest im Enzymreaktor	158
6.3.4	Produktabtrennung durch organophile Pervaporation.....	161
6.3.5	Analytische Methoden	163
6.3.5.1	Spektrophotometrie	163
6.3.5.2	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie	164
6.3.5.3	Gaschromatographie.....	166
6.3.5.4	Kombinierte Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS)	166
6.3.5.5	FTIR-Messungen	166
6.3.5.6	Rasterelektronenmikroskopie	166
6.3.5.7	Dynamische Lichtstreuungsmessung (DLS).....	167
6.3.6	Auswertung und Datenprozessierung.....	167
6.3.6.1	Auswertung spektrophotometrischer Messungen.....	167
6.3.6.2	Auswertung von Versuchen zur organophilen Pervaporation.....	168
6.4	Software.....	172
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	173
8	ANHANG	188
8.1	Karten und multiple cloning sites eingesetzter Plasmide.....	188
8.1.1	pET-29a	188
8.1.2	pGEX-4T	189
8.1.3	pET-43a	190
8.2	Analysezertifikate Phospholipide	191
8.2.1	Phosphatidylcholin	191
8.2.2	Phosphatidylethanolamin	192

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACO	<i>Apocarotenoid cleavage oxygenase</i>
Apocarotinal	8'-Apo- β -carotin-8'-al
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AtCCD1	<i>Arabidopsis thaliana carotenoid cleavage dioxygenase 1</i>
ATP	Adenosin-Triphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BHT	Butylhydroxytoluol
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CCD	<i>Carotenoid cleavage dioxygenase</i>
CMC	<i>Critical micelle concentration</i> (kritische Mizellkonzentration)
C-Terminus	Carboxyterminales Ende eines Polypeptids
Da	Dalton (Masseneinheit) = $1,660538 \cdot 10^{-27}$ kg
DAD	Diodenarray-Detektor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DHA	Dihydroactinidiolid
EPDM	Ethylen-Propylen-Dien-Monomer
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
FID	Flammenionisationsdetektor
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie
GST	Glutathion-S-Transferase
GVO	Gentechnisch veränderte Mikroorganismen
His ₆	Hexahistidin-Tag
HLB	Hydrophil-lipophil-Balance eines Tensids

HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
ISPR	<i>In-situ product removal, in-situ-Produktabtrennung</i>
KF	Kühlfalle
LB	Luria-Bertani
Log <i>P</i>	Dekadischer Logarithmus des Octanol/Wasser Verteilungskoeffizienten einer Substanz
LOX	Lipoxygenase
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NCED	<i>Nine-cis-epoxycarotenoid cleavage dioxygenase</i>
N-Terminus	Aminoterminal Ende eines Polypeptids
NusA	<i>N-utilizing substance A</i> (Transkriptionsfaktor)
OD _x	Optische Dichte bei X nm
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung)
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDMS	Poly-dimethylsiloxan
PE	Phosphatidylethanolamin
PEI	Polyetherimid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid, Serinprotease-Inhibitor
POMS	Polyoctylmethylsiloxan
ppb	<i>Parts per billion</i>
PV	Pervaporation
REM	Rasterelektronenmikroskopie
R&I-	Rohrleitungs- und Instrumentierungs-
RP-18	Umkehrphase mit C ₁₈ Alkylkette (<i>reversed phase</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SOC	<i>Super optimal broth</i> (SOB) + Glucose
TAE	Tris / Acetat / EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
THF	Tetrahydrofuran

TIC	<i>Total ion current</i> (Totalionenstrom)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	(<i>p-tert-Octylphenoxy</i>)polyethoxyethanol
tRNA	Transfer RNA
Tween 20	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaureat
Tween 40	Polyoxyethylen-sorbitan-monopalmitat
Tween 60	Polyoxyethylen-sorbitan-monostearat
Tween 80	Polyoxyethylen-sorbitan-monooleat
UV	Ultraviolett
VP14	9-cis Epoxycarotinoid-spezifische Dioxygenase aus Mais

Formelzeichen

<u>Zeichen</u>	<u>Bedeutung</u>	<u>Einheit</u>
α	Separations- / Trennfaktor	
A_M	Membranfläche	[m ²]
β	Anreicherungsfaktor	
c	Konzentration	[mol·l ⁻¹]
ρ	Spezifische Dichte	[g·cm ⁻³]
g	Gramm, Erdbeschleunigung (9,81)	[m·s ⁻²]
i	Bevorzugt permeierende Komponente	
j	Weniger bevorzugt permeierende Komponente	
J	Massenstrom	[g·m ⁻² ·h ⁻¹]
k_{cat}	Wechselzahl (Umsatz Substratmoleküle pro Enzymmolekül pro Zeit)	[mol·s ⁻¹]
K_M	Michaelis-Konstante	
λ	Wellenlänge	[nm]
m	Masse	[kg]
p	Druck	[bar]
p_P	Permeatseitiger Druck	[bar]
R	Retentat	
S	Selektivität	

$t_{\max v}$	Zeitraum von Beginn der Reaktion bis zur maximalen Reaktionsgeschwindigkeit bzw. Dauer der Lag-Phase
U	<i>Unit</i> ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$)
V_{\max}	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratsättigung gemäß Michaelis-Menten-Theorem
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Prozent Anteil in Gewicht pro Volumen
% (w/w)	Gewichtsprozent

Anmerkung:

Die Namen von Gensequenzen (z.B. *AtCCD1*) sind in kursiver Schreibweise dargestellt, die Namen der entsprechenden Proteine (z.B. AtCCD1) in normaler Schreibweise.

1 ZUSAMMENFASSUNG

β -Ionon ist ein Aromastoff mit fruchtig-veilchenartigen organoleptischen Eigenschaften. Die natürliche Herkunftsform erzielt circa einen um den Faktor 100 höheren Marktpreis als die synthetische Form und wird insbesondere in der Nahrungsmittel- und Getränkeindustrie eingesetzt. Bisher existierende Verfahren zur Gewinnung des natürlichen Aromastoffes waren die Extraktion aus Veilchenblüten sowie ein biotechnologisches Verfahren zur unspezifischen co-oxidativen Spaltung von Carotinoiden, bei welchem ein hoher Anteil an Nebenprodukten entsteht. Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines biokatalytischen Verfahrenskonzeptes zur Herstellung von als natürlich deklariertem β -Ionon durch regiospezifische oxidative Spaltung von β -Carotin. Als Biokatalysator dienten Enzyme der erst seit wenigen Jahren bekannten Familie der Carotinoid-spaltenden Dioxygenasen (CCDs). In einem Vorgängerprojekt wurde der Biokatalysator mithilfe des Modellsubstrats 8'-Apo- β -carotin-8'-al teilweise charakterisiert und Grundlagen der technischen Carotinoid-Spaltung erarbeitet. Die vorliegende Arbeit behandelt insbesondere den Transfer auf das ökonomisch attraktive, reaktionstechnisch schwer handhabbare Substrat β -Carotin sowie die technische Umsetzung im Labormaßstab. Die Arbeit umfasste fünf Schwerpunkte:

1. Ermittlung und systematische Untersuchung von Vermittlungsformen für das stark hydrophobe Substrat β -Carotin an das Enzym AtCCD1 in dessen wässriger Wirkumgebung
2. Weitere Charakterisierung und verbesserte rekombinante Expression des Enzyms AtCCD1 sowie alternativer Carotinasen für das Verfahren
3. Ermittlung einer selektiven *in-situ*-Produktabtrennungstechnik für β -Ionon aus dem laufenden Bioprozess und Bestimmung relevanter Kenngrößen
4. Zusammenführung der Ergebnisse: „*Proof of concept*“ für den integrierten Bioprozesses anhand einer Demonstrationsanlage im Labormaßstab
5. Untersuchung der Nutzung von carotinoidhaltiger Biomasse anstatt kristallinem β -Carotin als Ausgangsstoff für das Verfahren

Durch angepasste Formulierung konnte mittels liposomaler und mizellarer Substratvermittlung erstmals die regioselektive enzymatische Spaltung von β -

Carotin in technisch relevantem Umfang erreicht werden. Beide Substratvermittlungsformen wurden systematisch in Bezug auf ihre Eigenschaften bei der Vermittlung hydrophober carotinoider Substrate an das Enzym AtCCD1 untersucht. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass sich verschiedene nichtionische Tenside in ihrer Eignung zur Substratvermittlung unterscheiden und zur Umsetzung verschiedener Carotinoide jeweils unterschiedliche Tensidspektren notwendig sind. Der Einfluss der Tensidstruktur auf die Aktivierung der Carotinoidspaltung durch wasserlösliche Cosolventien wurde anhand einer Serie strukturell verwandter Tenside untersucht. Reaktionskinetische Verzögerungsphasen des Enzyms AtCCD1 im mizellaren System wurden charakterisiert und Einflussfaktoren sowie mögliche Ursachen herausgearbeitet. Im liposomalen Substratvermittlungssystem wurde der Einfluss der Phospholipidzusammensetzung auf die erzielte Reaktionsgeschwindigkeit untersucht. Durch den Einsatz von Galaktolipiden in Liposomen wurde die natürliche Reaktionsumgebung des Enzyms AtCCD1, das *in vivo* assoziiert mit der cytoplasmatischen Seite der Thylakoidmembran vorliegt, nachgebildet und ihr kinetischer Einfluss untersucht. Durch Einsatz synergistisch wirkender Chaperon-Kombinationen konnte die volumetrische Aktivität mehr als verdoppelt werden. Die Untersuchung zeigte weiterhin, dass die Coexpression von Chaperonen die Faltungsqualität von Fusionsprotein-Untereinheiten unterschiedlich, in manchen Fällen sogar im gegensätzlichen Sinn beeinflussen kann. Ein *in-situ*-Produktabtrennungsverfahren für β -Ionon mittels organophiler Pervaporation wurde etabliert und mit Modellösungen charakterisiert. Dabei wurde ein Aufreinigungsfaktor von >750 erreicht. Die Umsetzung von β -Carotin aus Biomasse des Cyanobakteriums *Spirulina platensis* sowie aus CO_2 -Extrakt dieser Biomasse zu β -Ionon wurde gezeigt und verbessert. Eine Demonstrationsanlage mit 2,3 Liter Reaktorvolumen wurde aufgebaut und der vollständige Verfahrensablauf ausgehend von kristallinem β -Carotin darin durchgeführt. Das Verfahrensprodukt stellte eine konzentrierte wässrige Lösung des Aromastoffs β -Ionon dar und enthielt als Nebenkomponenten nur Spuren von α -Ionon und einem experimentell vermeidbaren Stabilisator. Mit dieser Arbeit wurde insbesondere in zwei Bereichen ein wissenschaftlicher Beitrag geleistet: Einerseits wurde ein neues Verfahrenskonzept zur biokatalytischen Darstellung eines natürlichen Aromastoffes entwickelt, andererseits wurde die vesikelbasierte Vermittlung hydrophober Substrate an Enzyme in wässriger Wirkumgebung systematisch untersucht.

2 SUMMARY

β -ionone is an aroma compound with fruity violet-like organoleptic properties. It is used in particular in the foodstuff and beverage industries. The natural form of β -ionone has a market price approximately one hundred times higher than the synthetic form. Up to now, only two processes for the production of the natural form of this aroma compound were available: On the one hand the extraction from violet florals, on the other hand a biotechnological process for the non-specific enzymatic co-oxidative cleavage of carotenoids which, however, leads to the formation of a high share of side products. The goal of this work was to develop a biocatalytic process concept for the production of natural labeled β -ionone by regiospecific oxidative cleavage of β -carotene. The biocatalyst applied was a member of the relatively new family of carotenoid cleavage dioxygenases (CCDs). In a previous project, the biocatalyst was partially characterised using the model substrate 8'-apo- β -carotene-8'-al and the basis for a potential technical application was established. This work focuses on changing the substrate of the biocatalytic reaction towards β -carotene which is economically highly attractive but particularly challenging with regard to handling and reaction design. The second goal of this work was to provide a proof of concept by setting up a fully functional lab scale model plant. The five core areas of this work were:

1. Determination and systematic investigation of substrate delivery strategies for the highly hydrophobic substrate β -carotene to the enzyme AtCCD1 in an aqueous reaction environment
2. Further characterisation and improved recombinant expression of the enzyme AtCCD1 and of alternative carotenases for the process concept
3. Identification of a suitable *in situ* product separation technique for β -ionone from the ongoing bioprocess and determination of technical parameters
4. Combination of previous results: Proof of concept for integrated bioprocess by lab scale demonstration plant
5. Investigation of carotenoid containing biomass as potential process substrate instead of crystalline β -carotene

By adaptation of the substrate delivery, the first regioselective enzymatic cleavage

of β -carotene at a technically relevant scale could be achieved using micellar and liposomal systems. Both the micellar and the liposomal substrate delivery system were investigated systematically with regard to their ability to deliver hydrophobic carotenoids to the enzyme AtCCD1. Among other things it could be shown that non-ionic surfactants differ significantly in their suitability for the delivery of hydrophobic substrates and that for each individual carotenoid only a distinct set of surfactants permitted successful substrate delivery to the biocatalyst. The influence of surfactant molecular structure on the activation of carotenoid cleavage by water soluble cosolvents was investigated using a series of structurally related surfactants. Kinetic delay phases of the enzyme AtCCD1 in the micellar delivery system were investigated and potential causes for the phenomenon were identified. In the liposomal substrate delivery system, the influence of the phospholipid composition on the reaction velocity was determined. The natural reaction environment of the enzyme AtCCD1 which is associated with the cytoplasmic side of the thylakoid membrane *in vivo* was mimicked by the insertion of galactolipids into liposome membranes and the kinetic effects were determined. By co-expressing synergistically working combinations of molecular chaperones, the volumetric activity could be more than doubled. Additionally, the effect of chaperones on the individual subunits of fusion proteins was investigated. The results showed that coexpression of chaperones can affect the folding quality of fusion protein subunits differently, in some cases even in opposite direction. An *in situ* product separation method for β -ionone by organophilic pervaporation was established and characterised using model solutions. Purification factors for β -ionone of more than 750 were achieved. The conversion of β -carotene from biomass of the cyanobacterium *Spirulina platensis* and from CO₂-extract of this biomass was shown and first improvement steps were conducted. A 2.3 L lab scale demonstration plant was set up and the full process was conducted successfully using crystalline β -carotene as substrate. The process product was a concentrated aqueous solution of β -ionone containing as side components only traces of α -ionone and an experimentally avoidable chemical stabilizer. This work provided a scientific contribution especially in two areas: Firstly, a new process concept for the biocatalytic production of a natural labeled aroma compound was developed. Secondly, the vesicle based delivery of hydrophobic substrates to enzymes in their aqueous reaction environment was systematically investigated.

3 EINLEITUNG

Die vorliegende Arbeit stellt die Weiterführung und technische Umsetzung von Forschungsarbeiten dar, die an der Technischen Universität München (Fachgebiet Biotechnologie der Naturstoffe, Prof. W. Schwab) und dem Karl-Winnacker-Institut der DECHEMA e.V. (Arbeitsgruppe Bioverfahrenstechnik, Dr. J. Schrader) durchgeführt wurden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen stellen eine Grundlage für die Entwicklung eines biokatalytischen Herstellungsverfahrens für den Aromastoff β -Ionon aus β -Carotin dar. Im Folgenden sollen der Stand der Technik zu den zentralen Aspekten des Vorhabens geschildert und die technisch-wissenschaftlichen Herausforderungen umrissen werden.

3.1 β -Ionon und natürliche Aromastoffe

Unter den möglichen Carotinoid-Spaltprodukten sind insbesondere die Ionone sowie die Rosenketone von großem wirtschaftlichem Interesse als Duft- und Aromastoffe (Veddelar, 2004). Bei β -Ionon handelt es sich um eine norisoprenoide C₁₃-Substanz mit fruchtig-veilchenartigen organoleptischen Eigenschaften. β -Ionon besitzt mit 0,007 ppb eine der niedrigsten bekannten Geruchsschwellen (Buttery et al., 1971). Norisoprenoide sind durch Carotinoidspaltung entstandene Verbindungen mit einer Cyclohexen-Gruppe und isoprenoidem Aufbau. Natürliche Quelle von β -Ionon ist Veilchenblütenöl (*Viola odorata*). Aufgrund der geringen Ausbeute beträgt der Preis für natürliches β -Ionon im industriellen Handel zwischen 500 und 1000 US\$/kg. β -Ionon wird auch synthetisch hergestellt (Pommer et al., 1967) und findet in dieser Herkunftsform verbreitet Einsatz als Duftstoff in der Konsumgüterindustrie. Die weltweite Jahresproduktion an synthetischem β -Ionon betrug daher in 2003 zwischen 4000 und 8000 Tonnen (Weltchemieverband ICCA, SIAR-Profil β -Ionon). Der Preis für synthetisches β -Ionon liegt mit rund 10 US\$/kg deutlich unter dem der natürlichen Substanz. Als Aromastoff findet β -Ionon bisher nur selten Einsatz, da als Aromastoffe bevorzugt als natürlich deklarierte Substanzen verwendet werden und es bisher keinen effizienten Zugang zu natürlichem β -Ionon gibt.

Aromastoffe, die aus natürlichen Ausgangsstoffen mit mikrobiellen oder enzymatischen Methoden hergestellt werden, können gemäß der europäischen und

US-amerikanischen Gesetzgebung als „natürlich“ deklariert werden und sind damit in den von Konsumenten stark nachgefragten „Bio-„ oder „Natur-„ Nahrungsmitteln einsetzbar (EC Flavour Directive 88/388/EEC vom 22.6.1988, US Code of Federal Regulations 21 CFR 101.22a.3. von 1985). Die Nutzung chemischer Syntheseschritte führt hingegen zu der weniger nachgefragten Deklaration als „naturidentisch“ (EU) oder „künstlich“ (USA). Der Anteil natürlicher Aromastoffe an der Gesamtmenge der Aromastoffe in Getränken betrug im Jahr 2001 in der Europäischen Union bereits 90% beziehungsweise 80% in den USA. Im Bereich der nicht milchbasierten Nahrungsmittel betrug der Anteil in beiden Regionen 80% (Berger et al., 2001). Der Weltmarktumsatz im Aroma- und Riechstoffsektor betrug 2005 rund 16 Milliarden US\$ (www.leffingwell.com/top_10.htm).

Aufgrund der kommerziellen Attraktivität einer biotechnologischen Herstellung von als natürlich deklariertem β -Ionon wurden verschiedene Ansätze dazu publiziert. Diese verfolgten nahezu alle einen co-oxidativen Carotinoidabbau, bei dem durch Enzyme wie Lipoxygenase, Lactoperoxidase oder Xanthinoxidase radikalische Intermediate gebildet werden. Diese Radikale führen in unspezifischen Nebenreaktionen zur Spaltung der Carotinoide, wobei die Ausbeute des gewünschten Produkts naturgemäß niedrig ist (Winterhalter und Rouseff, 2002). In neueren Arbeiten wird ein Carotinoidabbau zu Aromastoffen durch eine mikrobielle Peroxidase aus *Lepista irina* beschrieben, die eine geringe Spezifität für die 9,10-Doppelbindung in β -Carotin zeigt (Zorn et al., 2003). Aus der Patentliteratur kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die industrielle Herstellung von natürlichem β -Ionon bisher auf einem co-oxidativen Verfahren unter Verwendung von gemahlenem Soja als Enzymquelle durchgeführt wird (Belin et al., 1998).

3.2 Carotinoidbiosynthese und –spaltung

3.2.1 Carotinoidbiosynthese

Carotinoide sind in Mikroorganismen und Pflanzen gebildete terpenoide Substanzen, die vielfältige biologische Funktionen besitzen (Britton, 1995, Meyer, 2002). Die rund 700 aktuell bekannten Carotinoidtypen sind zum überwiegenden Anteil aus einem C₄₀ – Kohlenstoffgerüst aufgebaut und stellen damit Tetraterpene

dar. Viele Carotinoide sind an ihren Enden C1-C6-zyklisiert (Abb. 1). An den zyklischen Endgruppen oxyfunktionalisierte Carotinoide werden als Xanthophylle bezeichnet.

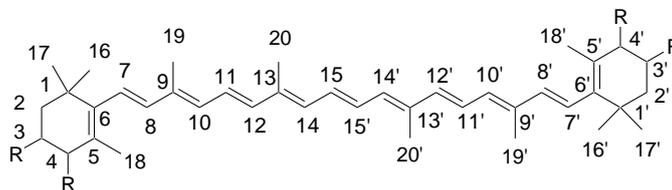


Abb. 1: Struktur eines Carotinoids / Xanthophylls mit einem C₄₀-Grundgerüst und zwei zyklisierten Enden. Nummerierung der Kohlenstoffatome gemäß IUPAC.

In der Natur dienen Carotinoide einerseits als Vorläufermoleküle für Signal- und Lockstoffe, andererseits sind sie zentraler Bestandteil photoprotektiver Systeme: Das Hormon Abszissinsäure reguliert das Pflanzenwachstum und wird aus dem Carotinoid 9-*cis*-Violaxanthin gebildet (Schwartz et al., 2003). Aus β -Carotin entsteht das Hormon Stringolacton, welches die Sprossenbildung und Verästelung in Pflanzen reguliert (Floss und Walter, 2009). Das ausgedehnte konjugierte π -Elektronensystem von Carotinoiden dient in Bakterien und Pflanzen als Radikalfänger bei der Photosynthese. Carotinoide dienen durch ihre Fähigkeit zur Lichtabsorption überdies als Licht-Erntemoleküle und verleihen dem Photosystem einen erhöhten Wirkungsgrad (Merchant und Sawaya, 2005, Bergantino et al., 2003).

Die Biosynthese von Carotinoiden erfolgt durch Kondensation der C₅-Vorläufermoleküle Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) und Isopentenylpyrophosphat (IPP) zu Geranylpyrophosphat (Abb. 2). Die Addition weiterer IPP-Moleküle durch das Enzym GGPP-Synthase (GGPS) führt zunächst zu Farnesylpyrophosphat und anschließend zu dem Diterpen Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP). Das C₄₀-Grundgerüst (Phytoen) von Carotinoiden wird durch Kondensation von zwei Molekülen GGPP durch das Enzym Phytoensynthase aufgebaut. Die Schließung des ausgedehnten konjugierten π -Elektronensystems von Carotinoiden erfolgt durch schrittweise Desaturierung von Phytoen zu ζ -Carotin und von ζ -Carotin zu Lycopin durch die Enzyme Phytoen-Desaturase und ζ -Carotin-Desaturase. In Pflanzen schließt die

Führt die Biosynthese weiter zu den Xanthophyllen, geschieht dies durch Einbringung sauerstoffhaltiger Substituenten an den endständigen Iononringen von β -Carotin durch entsprechende Enzyme (Abb. 3). Hydroxylierung an den 3- und 3'-C-Atomen von β -Carotin durch β -Carotin-Hydroxylase (BHY) führt zur Bildung von Zeaxanthin. Die Einbringung oder Modifikation weiterer Substituenten führt zu einem breiten Spektrum weiterer Xanthophylle. So entsteht das Vorläufermolekül des Pflanzenhormons Abszisinsäure durch zweistufige Epoxidierung von Zeaxanthin durch das Enzym Zeaxanthin-Exoxidase (ZEP) über das Zwischenprodukt Antheraxanthin. Einen interessanten Sonderfall stellt das im Pilz *Xanthophyllomyces dendrorhous* (anamorph *Phaffia rhodozyma*) entdeckte Enzym Astaxanthin-Synthase (ASY) dar, welches an einem der beiden Synthesewege für das kommerziell bedeutsame Xanthophyll Astaxanthin beteiligt ist. Für dieses Enzym ist eine Doppelfunktionalität postuliert: einerseits eine Ketolase-Funktion für die Synthese von Canthaxanthin aus β -Carotin, andererseits eine Hydroxylase-Funktion für die Überführung von Canthaxanthin in Astaxanthin (Ojima et al., 2006, Fraser und Bramley, 2004, Sandmann, 2001).

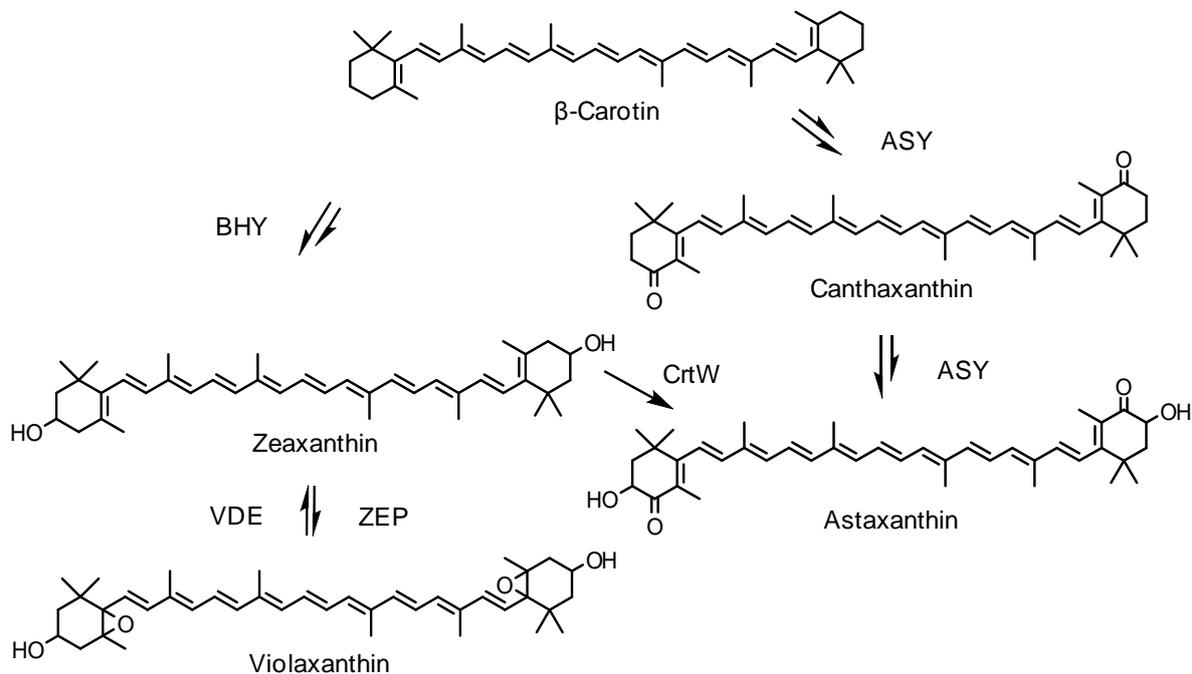


Abb. 3: Synthese von Xanthophyllen aus β -Carotin. Die Biosynthese wurde in unterschiedlichen Organismen aufgeklärt (Fraser et al., 1998, Fraser und Bramley, 2004, Sandmann, 2001, Ojima et al., 2006) und ist in der Gesamtheit bisher nur postuliert. ASY: Astaxanthin-Synthase; BHY: β -Carotin-Hydroxylase; CrtW: β -Carotin-Ketolase; VDE: Violaxanthin-De-Epoxidase; ZEP: Zeaxanthin-Epoxidase. Zweistufige Schritte sind durch gleichsinnigen Doppelpfeil, reversible Schritte durch gegensinnigen Doppelpfeil gekennzeichnet.

3.2.2 Carotinoidspaltung

Die Biosynthese von Carotinoiden und Xanthophyllen ist seit längerer Zeit biochemisch und genetisch nachvollzogen. Die weitere Prozessierung von Carotinoiden durch regiospezifische oxidative Spaltung abseits der 15,15'-Bindung zu Apocarotinoiden wird erst seit wenigen Jahren wieder intensiv untersucht, nachdem grundlegende wissenschaftliche Durchbrüche erzielt wurden (Schwartz et al., 1997).

Im Fokus dieser Arbeit stehen oxidative Spaltprodukte von Carotinoiden (Apocarotinoide) mit attraktiven organoleptischen Eigenschaften. Viele pflanzliche Aromastoffe weisen eine ähnliche C₁₃-norisoprenoide Struktur auf (Bossler und Belin, 1994). Die Ionon-Grundstruktur dieser Aromastoffe deutet auf eine Synthese durch oxidative Spaltung von Carotinoiden hin. Der Mechanismus einer solchen Spaltung war lange Zeit umstritten. Postuliert waren die Spaltung durch Autoxidation, eine unspezifische enzymatische Cooxidation und die spezifische enzymatische Spaltung (Winterhalter und Rouseff, 2002). Die regiospezifische enzymatische Spaltung von β -Carotin zu zwei Molekülen Retinal mithilfe des Verdauungssystems von Ratten konnte zwar gezeigt werden (Olson und Hayaishi, 1965, Goodman und Huang, 1965), die Aufreinigung und umfassende biochemische Charakterisierung des Enzyms gelangen jedoch nicht. Erst dreißig Jahre später konnte mittels Transposon-Tagging das Gen eines verwandten Enzyms in Mais identifiziert werden (Abb. 4) (Schwartz et al., 1997, Tan et al., 1997). Die von diesem *vp14* genannten Gen codierte Dioxygenase spaltet die Substrate 9-*cis*-Neoxanthin und 9-*cis*-Violaxanthin an der 11,12-Doppelbindung zu einem Molekül Xanthoxin und einem Molekül eines C₂₅-Dialdehyds. Anhand der nun bekannten Sequenz eines regiospezifisch oxidativ carotinoidspaltenden Enzyms konnten in den vergangenen Jahren eine große Anzahl homologer Gene aus verschiedenen Organismen kloniert und die entsprechenden eisenhaltigen, Häm-ähnlichen Enzyme charakterisiert werden (Huang et al., 2009a). Homologe Dioxygenasen, die wie VP14 spezifisch neben der 9-*cis*-Doppelbindung von Epoxy-carotinoiden spalten, werden als *nine cis epoxy-carotenoid dioxygenases* (NCEDs) bezeichnet. Eine weitere verwandte Gruppe von Enzymen aus Säugetieren und Insekten spaltet Carotinoide zentral an der 15-15'-Bindung und ist damit an der Vitamin A - Synthese beteiligt (von Lintig und Vogt, 2000, Redmond et

al., 2001). Eine dritte Gruppe von Enzymen wird als *carotenoid cleavage dioxygenases* (CCDs) bezeichnet. Sie unterscheiden sich von den NCEDs durch ein breiteres Spektrum an Substraten (Huang et al., 2009a) bei weiterhin hoher Spezifität für die zu schneidende Doppelbindung und in einigen Fällen durch eine sich von den NCEDs unterscheidende Schnittposition. Der erste bekannte Vertreter dieser Gruppe ist das in dieser Arbeit eingesetzte Enzym AtCCD1. Es wurde mithilfe degenerierter Primer im Genom von *Arabidopsis thaliana* identifiziert (Schwartz et al., 2001) und spaltet Carotinoide, Apocarotinoide und Xanthophylle symmetrisch an den 9,10- und 9',10'-Doppelbindungen. Kürzlich wurde zusätzlich eine schwach ausgeprägte 5,6 / 5',6' - Schnittaktivität von CCD1-Enzymen für Lycopin publiziert (Huang et al., 2009a, Vogel et al., 2008). Die oxidative Spaltung von Carotinoiden durch CCD1-Enzyme führt zur Bildung von Iononen, die wichtige Aromakomponenten von Pflanzen darstellen. Es konnte gezeigt werden, dass das Transkriptionsniveau von CCD1-Genen mit der Emission von β -Ionon in Blüten korreliert (Simkin et al., 2004).

Neben *AtCCD1* wurden im Genom von *Arabidopsis* weitere CCD-Gene gefunden, die wiederum der entsprechenden Gruppe von verwandten Enzymen in anderen Organismen als Namensgeber dienten: *AtCCD4*, *AtCCD7* und *AtCCD8* (Tan et al., 2003, Huang et al., 2009b). *AtCCD7* katalysiert die asymmetrische 9',10'-Spaltung von β -Carotin zu 10'-Apo- β -carotin-10'-al und β -Ionon. *AtCCD8* schneidet das Reaktionsprodukt von *AtCCD7*, 10'-Apo- β -carotin-10'-al an der 13,14-Position zu 13-apo- β -Carotenon und einem C₉-Dialdehyd (Schwartz et al., 2004, Aldridge et al., 2006a). Die Enzyme der CCD7- und CCD8-Familie kooperieren vermutlich bei der Synthese eines Pflanzenhormons, das die Sprossenverzweigung reguliert. Die biochemische Funktion der CCD4-Familie wurde erst im vergangenen Jahr weitestgehend aufgeklärt. Enzyme der CCD4-Familie besitzen wie CCD1-Enzyme eine 9,10/9',10'-Schnittaktivität, weisen jedoch keine Substratpromiskuität auf (Huang et al., 2009b). Es existieren zwei verschiedene Unterklassen der CCD4-Familie, die verschiedene Substrate umsetzen: β -Carotin und 8'-Apo- β -carotin-8'-al.

Neben den CCD- und NCED-Enzymen aus Pflanzen und den zentral und dezentral spaltenden Oxygenasen aus Tieren wurde eine Reihe von VP14-homologen Enzymen publiziert, die noch keiner Kategorie zugeordnet wurden: LCD aus *Bixa*

orellana schneidet symmetrisch die 5,6- und 5',6'-Doppelbindungen in Lycopin, ZCD aus *Crocus sativus* schneidet die 7,8- und 7',8'-Doppelbindungen von Zeaxanthin innerhalb der Safranal-Synthese. Eine Dioxygenase aus dem Pilz *Fusarium fujikuroi* schneidet Carotinoide und Apocarotinoide an der 15,15'-Position (Prado-Cabrero et al., 2007), ein cyanobakterielles Enzym hingegen nur Apocarotinoide an der selben Position (Scherzinger et al., 2006).

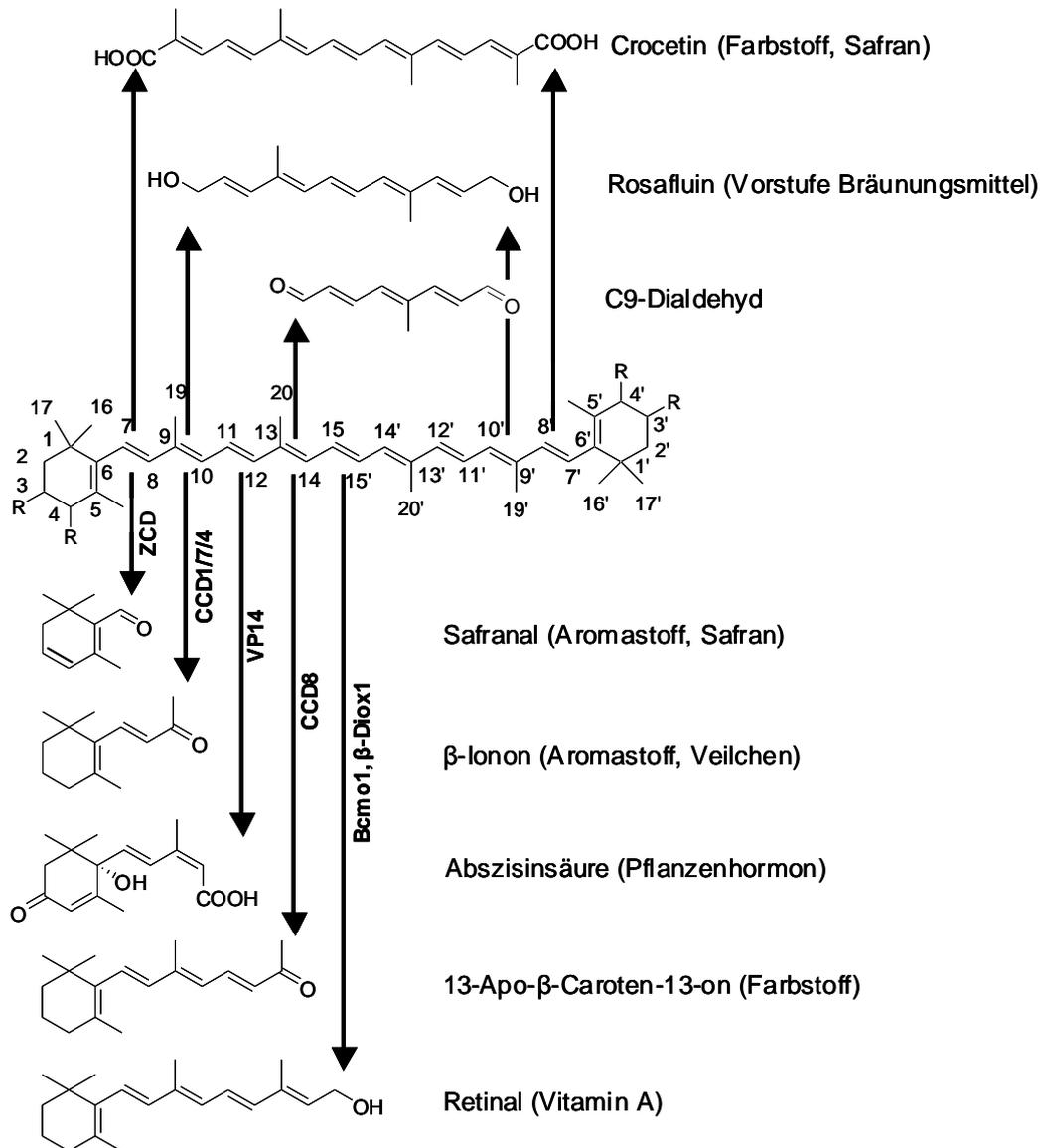


Abb. 4: Spezifische Spaltungsmuster verschiedener Carotinoid-Oxygenasen und Auswahl dabei entstehender, kommerziell attraktiver Produkte. ZCD und VP14 bilden die Vorstufen der dargestellten Produkte.

Obwohl die CCD-Enzymgruppe vorläufig als Dioxygenasen bezeichnet wurde (Chernys und Zeevart, 2000), war der genaue Reaktionsmechanismus trotz zahlreicher Untersuchungen mit isotonenmarkiertem Sauerstoff lange Zeit unklar.

Einige Untersuchungen legten einen Monooxygenase-Mechanismus nahe (Leuenberger et al., 2001), andere deuteten auf einen Dioxygenase-Mechanismus hin (Jüttner und Höflacher, 1985, Li und Walton, 1990, Creelman und Zeevaart, 1984). Die Zuordnung als Dioxygenase wurde trotz deutlicher Hinweise in den Ergebnissen angezweifelt, da der entstandene Dialdehyd nicht vollständig isotopenmarkiert war. Der Grund für die unvollständige Markierung des Produkts ist ein Austausch von ^{18}O -Sauerstoffatomen des Dialdehyds mit Wasser. Die kinetische Analyse dieses Sauerstoffaustausches führte zu der verbreiteten Akzeptanz des Dioxygenase-Mechanismus (Schmidt et al., 2006).

Strukturelle Informationen zu dieser Enzymfamilie waren erstmals zugänglich, nachdem die Kristallstruktur des apocarotinoidspaltenden Enzyms ACO aus dem Cyanobakterium *Synechocystis sp.* PCC6803 aufgeklärt wurde (Kloer et al., 2005). Die Strukturdaten bestätigten die bis dahin postulierte Komplexierung von Fe^{2+} durch vier Histidin-Reste im aktiven Zentrum. ACO weist einen durch hydrophobe Aminosäuren geformten Kanal von der Enzymoberfläche zum aktiven Zentrum auf. Es wurde postuliert, dass die Öffnung des Substratkanals die Orientierung und Positionierung der apocarotinoiden Substrate steuert.

Viele der beschriebenen Enzyme wurden *in vivo* untersucht. Zumeist wurde dabei ein Komplementierungstest durchgeführt, bei dem die Entfärbung von carotinoidproduzierenden Zellen unter Expression der entsprechenden Oxygenase beobachtet wurde (von Lintig und Vogt, 2000). Für den technischen Einsatz dieser neuen Enzymklasse sind jedoch auch eingehende Untersuchungen der Aktivität *in vitro* notwendig. Eine photometrische Methode zur Aktivitätsbestimmung von carotinoidspaltenden Dioxygenasen stellte für technisch orientierte Untersuchungen eine wesentliche Erleichterung dar (Schilling et al., 2007). Mithilfe von Mikrotiterplattenlesern konnten quantitative und kinetische Untersuchungen nun parallelisiert und zeitnah durchgeführt werden.

Die biotechnologische Herstellung von Carotinoid-Spaltprodukten war lange Zeit nur durch cooxidative Spaltung mit Lipoxygenasen (Ben Aziz et al., 1971, Waché et al., 2002) oder durch direkte Spaltung mit einer Peroxidase aus *Lepista irina* (Zorn et al., 2003) möglich. Diese Verfahren führen jedoch aufgrund fehlender oder

geringer Regiospezifität nur zu sehr geringen Ausbeuten. Mit AtCCD1 konnten Xanthophylle und Apocarotinoide bereits mit einer Ausbeute von >95 % umgesetzt werden (Schilling, 2008). Für β -Carotin, den Ausgangsstoff einer möglichen β -Ionon-Produktion, war mit CCD-Enzymen *in vitro* bisher kein technisch relevanter Umsatz möglich.

3.2.3 Enzym AtCCD1

AtCCD1 ist eine eisenhaltige, Häm-ähnliche Dioxygenase, die Carotinoide, Apocarotinoide und Xanthophylle symmetrisch an den 9,10- und 9',10'-Doppelbindungen spaltet (Abb. 5). Die dabei entstehenden norisoprenoiden C₁₃-Verbindungen besitzen in vielen Fällen attraktive organoleptische Eigenschaften (Winterhalter und Rouseff, 2002).

AtCCD1 ist *in vivo* auf der zytoplasmatischen Seite der Chloroplastenmembran lokalisiert (Auldrige et al., 2006a), in welcher sich die umzusetzenden Substrate befinden. AtCCD1 ist in den vergangenen Jahren intensiv untersucht und charakterisiert worden. Wichtige Meilensteine in der Charakterisierung waren die Aufklärung des Reaktionsmechanismus (Schmidt et al., 2006), der Substrat- und Regiospezifität (Schwartz et al., 2001) sowie die Analyse von Inhibitoren und essentiellen Aminosäuren des aktiven Zentrums (Sergeant et al., 2009, Guo et al., 2008). Erste Arbeiten beschäftigten sich mit Fragen der technischen Einsetzbarkeit von AtCCD1 und beschrieben die Auswirkungen von Proteinmodifikationen auf die kinetischen Eigenschaften des Enzyms, seine Expression (Schilling et al., 2007) sowie Eigenschaften möglicher Substrat-Vermittlungssysteme für Carotinoide an AtCCD1 (Schilling et al., 2008).

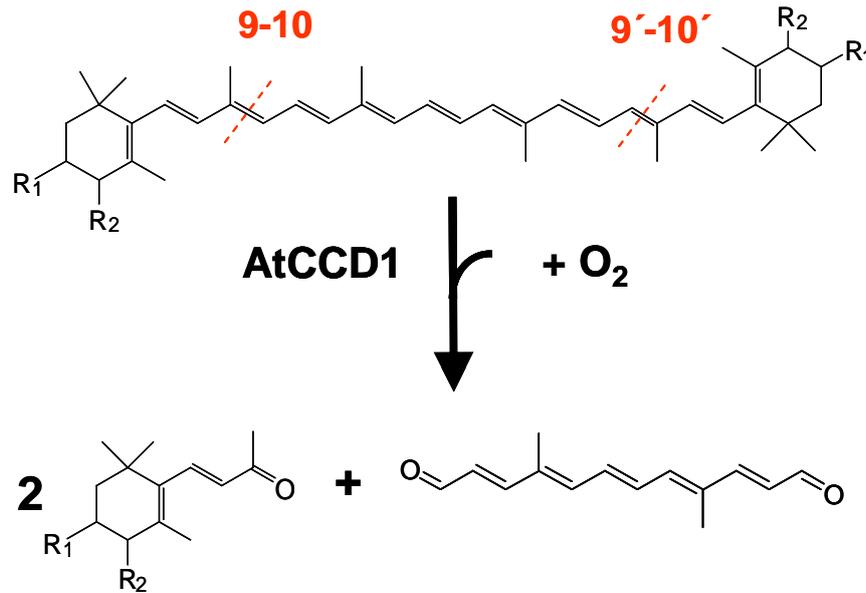


Abb. 5: Schema der symmetrischen oxidativen Spaltung von Carotinoiden durch AtCCD1. Produkte der Reaktion sind zwei Moleküle β -Ionon ($R_1=H$, $R_2=H$) oder eines entsprechenden Derivates und ein Molekül eines C14-Dialdehyds.

Die Kristallstruktur von AtCCD1 ist bisher nicht aufgeklärt. Sie kann zur Zeit nur *in silico* durch homologiebasierte Modellierung mit der Apocarotinoid-Oxygenase ACO als Vorlage angenähert werden (Kloer et al., 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine solche Modellierung und erste Bewertung der strukturellen Eigenschaften durchgeführt. Zum besseren Verständnis sind die Ergebnisse in der Einleitung dargestellt. Abbildung 6 zeigt das Molekülmodell von AtCCD1 nach Modellierung durch SWISS PROT (Kiefer et al., 2009) mit ACO Chain C als Modellierungsvorlage. Die Oberfläche des Proteins ist nach Polarität eingefärbt, wobei blau polare, weiß neutrale und rot apolare Regionen kennzeichnen. Die Struktur der *Synechocystis* Apocarotinoid-Oxygenase ACO weist eine Region mit hoher Dichte hydrophober Aminosäurereste auf, die für die Bindung an Substrat enthaltende Membranen verantwortlich ist. Für VP14 wurde mittels Sekundärstrukturanalyse und ortsgerechter Mutagenese eine amphipatische Helix auf der Proteinoberfläche identifiziert, die eine notwendige, jedoch nicht hinreichende Voraussetzung für die Anlagerung an Membranen darstellt (Tan et al., 2001). Die Enzymoberfläche von AtCCD1 weist ebenfalls eine deutlich abgegrenzte apolare Region auf, die zur Membranassoziation dienen könnte (Abb. 6). In ACO befindet sich in der Nähe dieses hydrophoben Bereiches die Öffnung eines mit hydrophoben Resten ausgekleideten Substratkanals (Kloer et al., 2005).

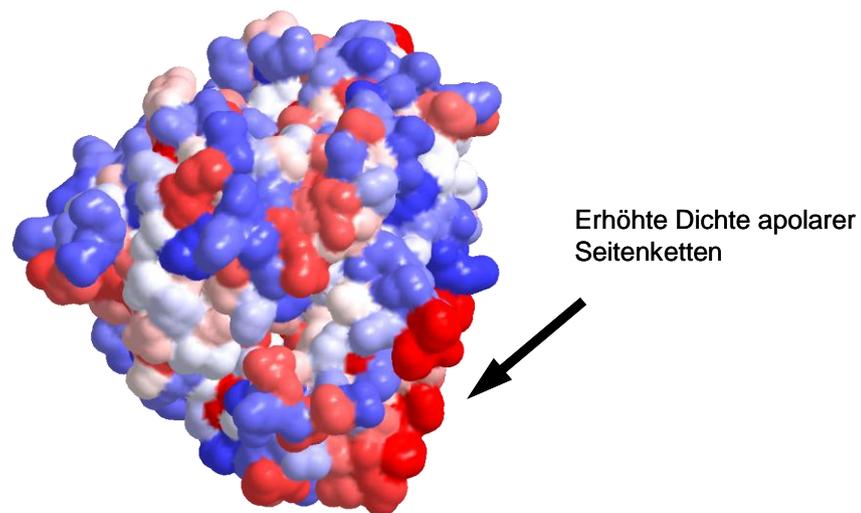


Abb. 6: Strukturmodell von AtCCD1 nach Einfärbung der Oberfläche nach Polarität. Blau: polar, weiß: neutral, rot: apolar. Modell erstellt durch Homologie-Modellierung mittels SWISS PROT (Kiefer et al., 2009) mit der Kristallstruktur von ACO chain C aus *Synechocystis* als Vorlage.

Auch im Modell von AtCCD1 kann nahe der apolaren Region die Öffnung eines Kanals gefunden werden, der nahe an das Proteinzentrum führt, knapp hinter dem Proteinzentrum einen Knick aufweist und zu einer zweiten Öffnung abseits der hydrophoben Oberflächenregion führt. Die Innenseiten des Kanals weisen eine erhöhte Dichte apolarer Aminosäure-Seitenketten auf. In Lokalisierung und Struktur ähnelt der in AtCCD1 vorgefundene Kanal dem in ACO durch Röntgenstrukturanalyse ermittelten. Im Modell von AtCCD1 ist der Kanal tiefer und weniger gekrümmt, was in den unterschiedlichen Substraten der Enzyme begründet sein kann. Abbildung 7 zeigt eine Bildfolge bei Annäherung an das Proteinzentrum durch die Öffnung des möglichen Substratkanals nahe der hydrophoben Oberflächenregion. Abbildungen 7 A bis 7 C sind Teil einer geradlinigen Annäherung ohne weitere Perspektivänderung. Abbildung 7 D ist gegenüber Abbildung 7 C zum Ausgang des Kanals hin gedreht.

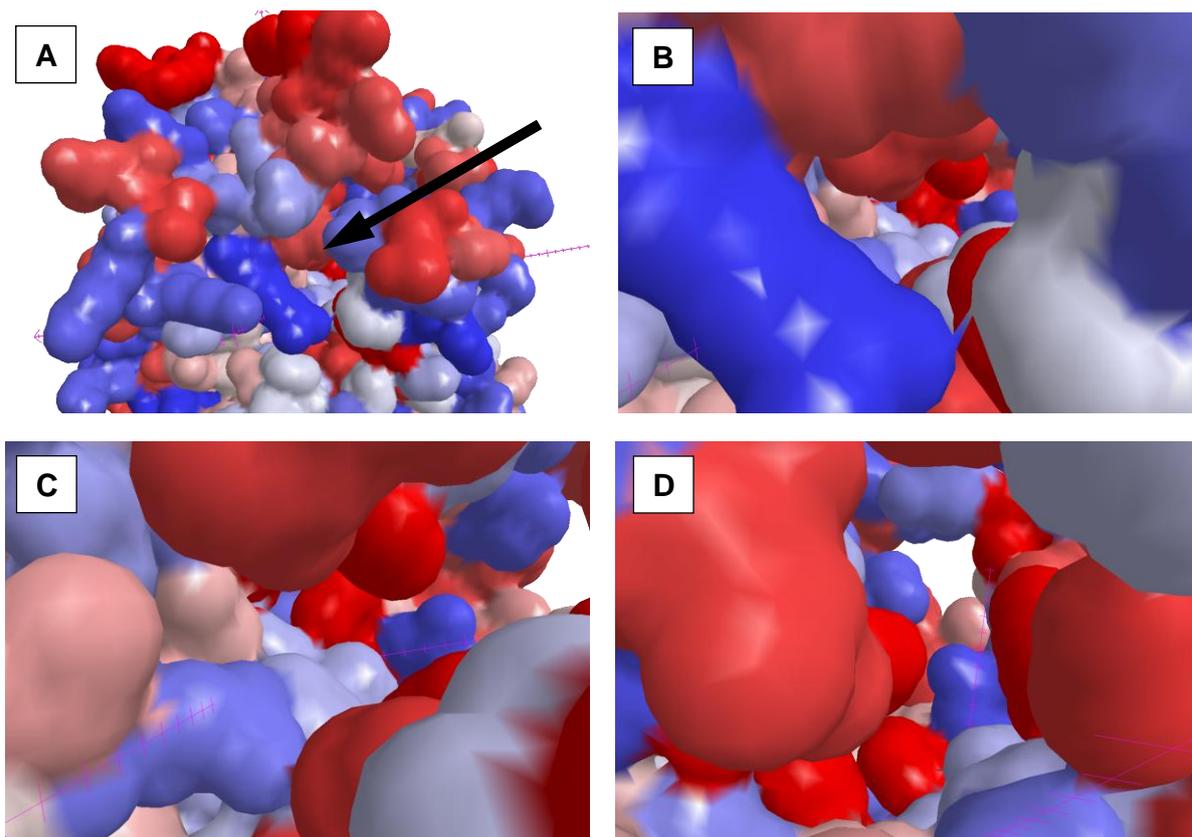


Abb. 7: Kanal im Molekülmodell von AtCCD1. Strukturmodell nach Einfärbung der Oberfläche gemäß Polarität. Blau: polar, weiß: neutral, rot: apolar. Modelliert mittels SWISS PROT (Kiefer et al., 2009) mit der Kristallstruktur von ACO aus *Synechocystis* als Vorlage. A bis C: Geradlinige Annäherung an die Kanalöffnung ohne weitere Perspektivänderung. D: Drehung nach rechts auf den Ausgang des Kanals zu.

Sowohl die Erforschung der Biosyntheseenzyme als auch die Charakterisierung der Carotinoidspaltungsenzyme erfolgte zumeist mittels *in vivo* - Untersuchungen. Nur in einigen Fällen wurden qualitative *in vitro* - Untersuchungen in mizellaren Systemen durchgeführt. Quantitative Studien zum *in vitro* - Einsatz von carotinoidspaltenden Oxygenasen wurden nur vor der Identifizierung des *VP14*-Gens durchgeführt (Goodman et al., 1967). Erst in der jüngeren Vergangenheit sind Untersuchungen zum Einsatz dieser Enzymfamilie *in vitro* sowie zu geeigneten Reaktionssystemen erschienen und bildeten eine Grundlage für den technischen Einsatz dieser Enzyme (Marasco et al., 2006, Mathieu et al., 2007, Schilling et al., 2008, Schilling et al., 2007).

Unter anderem aufgrund seiner Unabhängigkeit von teuren Cofaktoren ist die CCD-Enzymfamilie als technischer Biokatalysator für die Herstellung als natürlich deklarierbarer Carotinoid-Spaltungsprodukte wie den Ionon-basierten Aromastoffen

attraktiv (Aguedo et al., 2004, Winterhalter und Rouseff, 2002). Natürliche Aromen werden vornehmlich in der Lebensmittelindustrie eingesetzt und erzielen die für einen wirtschaftlichen biokatalytischen Prozess notwendigen Marktpreise. Die Biokatalyse muss dabei *in vitro* erfolgen, da die Akzeptanz für Herstellungsverfahren mit gentechnisch veränderten Mikroorganismen (GVO) in der Lebensmittelindustrie derzeit zu gering ist. Für das in dieser Arbeit angestrebte Verfahren sind weitere Untersuchungen notwendig, die die technische Einsetzbarkeit von AtCCD1 betreffen. Die zu untersuchenden Aspekte lassen sich in drei Themengebiete einteilen: Reaktionsparameter des Enzyms für die Umsetzung von β -Carotin, enzymkompatible Systeme zur Vermittlung der hydrophoben Substrate, effektive Enzymexpression.

3.3 Vermittlung von Carotinoiden in wässrige Systeme

3.3.1 Physikochemische Eigenschaften von Carotinoiden

Die carotinoiden Substrate von AtCCD1 sind mit Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten $\log P$ (o/w) von 17,5 (β -Carotin) bis 8,9 (8'-Apo- β -carotin-8'-al) stark hydrophob und in Wasser quasi unlöslich (Cooper et al., 1997). Selbst in Tetrahydrofuran, dem besten Lösungsmittel für Carotinoide, beträgt die Löslichkeitsgrenze für β -Carotin nur 10 g l^{-1} (Craft und Soares, 1992). Darüber hinaus neigen Carotinoide, insbesondere β -Carotin, in Gegenwart von Wasser zur Bildung von Mikroaggregaten (Köhn et al., 2008). Die verschiedenen Aggregatstrukturen sind weiterhin farbig und weisen batho- oder hypsochrome Verschiebungen des Absorptionsspektrums auf (Auweter et al., 1999). Kontrolliert nanoskalig aggregierte Carotinoide können durch einen Überzug aus modifizierter Stärke oder Gelatine hydrokolloidstabilisiert und in wässrigen Medien eingesetzt werden. Während in der Getränkeindustrie diese Aggregationsneigung von Carotinoiden zur Beeinflussung und Stabilisierung des Färbefeffektes genutzt wird, stellt sie für die biotechnologische Umsetzung eine Herausforderung dar, da Carotinoide nur in monomolekular solubilisierter Form durch AtCCD1 umgesetzt werden können.

Enzymatische Umsetzungen von Carotinoiden können daher in zwei Formen stattfinden: in organischen Lösungsmitteln, in welchen das Substrat gelöst ist, oder in wässrigen Medien unter Einsatz von Methoden zur Solubilisierung von Carotinoiden in dieser Umgebung. Für CCDs ist bisher keine stabile Aktivität in einem organischen Lösungsmittel beschrieben worden. Aus diesem Grund war ein zentraler Bestandteil dieser Arbeit die Untersuchung von verschiedenen Verfahren zur Solubilisierung und Vermittlung carotinoider Substrate an Enzyme in wässriger Wirkumgebung. Es wurden drei Verfahren untersucht: Die Substratvermittlung mithilfe von Mizellen, mithilfe von unilamellaren Liposomen und mithilfe von Nanoemulsionen. Ziel aller Untersuchungen war neben einem besseren Verständnis der Vermittlungsformen für hydrophobe Substrate die Ermittlung der kinetisch optimalen Verfahrensform.

Carotinoide unterliegen in Gegenwart von Sauerstoff einem autoxidativen Abbau. Dieser findet auch in organischen Lösungsmitteln statt (Mordi et al., 1991, Mordi et al., 1993) und muss in Untersuchungen zur enzymatischen Carotinoidspaltung durch entsprechende Kontrollen berücksichtigt werden.

3.3.2 Solubilisierung von Carotinoiden in Emulsionen

Emulsionen sind makroskopisch homogene Gemische von nicht mischbaren Flüssigkeiten. Sie bestehen aus einer kontinuierlichen Phase, welche Tröpfchen der zweiten, dispers genannten, Phase umgibt. Klassische Emulsionen werden in der Regel unter Einsatz von 0,5-10 %(w/v) Emulgatoren hergestellt, die die Grenzflächenspannung an der Oberfläche der emulgierten Tröpfchen herabsetzen und die Emulsion thermodynamisch stabilisieren. Die Teilchengröße in einer klassischen Emulsion ist von vielen Faktoren abhängig und liegt normalerweise im Bereich von 100 bis 1000 nm. Wird eine Öl-in-Wasser (o/w)-Emulsion hergestellt, lassen sich in der Ölphase Carotinoide ohne oder unter geringer Aggregation in wässrige Reaktionssysteme einbringen. Die effiziente Charakterisierung und kinetische Verbesserung einer enzymatischen Reaktion zur Carotinoidspaltung setzt die Möglichkeit zur kontinuierlichen und parallelen Verfolgung mehrerer Reaktionen voraus. Bisher können Carotinoid-Spaltungsreaktionen nur auf photometrischem Weg kontinuierlich und parallel verfolgt werden. Aufgrund

mangelnder Transparenz sind klassische Emulsionen zur Substratsolubilisierung bei photometrischer Vermessung nicht einsetzbar. Für diese spezielle Anwendung werden transparente Emulsionen mit Tröpfchendurchmessern kleiner als 300 nm benötigt, die aus reaktionskinetischen Gründen eine hohe Carotinoidkonzentration enthalten und thermodynamisch stabil sein sollten.

Bei Mikroemulsionen handelt es sich um Wasser-Öl-Tensid-Gemische, die optisch transparent und thermodynamisch weitgehend stabil sind. Sie bilden sich in der Regel ohne Energiezufuhr und können nur in bestimmten Bereichen des Dreikomponenten-Phasendiagramms entstehen. Nano-Solve-Präparate stellen eine kommerzielle Sonderform von Mikroemulsionen dar, die einen besonders kleinen Tröpfchendurchmesser von 30-60 nm aufweist und mit selbstemulgierenden Phospholipiden anstatt Tensiden sowie ohne Cosolventien hergestellt wird (Wadja, 2003). Aufgrund ihrer Stabilität und Transparenz sowie der Formulierung ohne denaturierende Inhaltsstoffe sind Nano-Solve-Präparate aus biochemischer Sicht für den Einsatz in enzymkatalytischen Anwendungen besonders geeignet.

Emulsionen wurden in der Biokatalyse schon früh eingesetzt, fanden jedoch bisher vor allem Einsatz bei der Reaktion von Lipasen, da diese eine besonders hohe Stabilität in nicht-wässrigen Reaktionsmedien aufweisen (Orlich, 2000). Der Einsatz von Emulsionen, insbesondere Mikro-/Nanoemulsionen, zur Vermittlung hydrophober Substrate ist bisher nur wenig beschrieben worden (Blaser und Schmidt, 2004, Groger et al., 2006). Über die Vermittlung carotinoider Substrate mittels Mikro- / Nanoemulsionen ist bisher nichts bekannt.

3.3.3 Solubilisierung von Carotinoiden in Mizellen

Neben (Mikro-) Emulsionen gibt es noch eine Reihe weiterer möglicher Strategien zur Vermittlung von hydrophoben Substraten an Enzyme *in vitro*. Im Rahmen dieser Arbeit sollen zwei Systeme untersucht werden, die aufgrund ihrer Eigenschaften besonders geeignet als biomimetische Substratvermittlungssysteme erscheinen: Liposomen und Mizellen. Obwohl es sich bei beiden um vesikuläre Systeme handelt, unterscheiden sie sich grundsätzlich in ihrem Aufbau und

physikochemischen Verhalten. Abbildung 8 zeigt maßstabsgerecht den schematischen Aufbau einer Tensidmizelle und eines unilamellaren Liposoms sowie ein Molekülmodell des eingesetzten Enzyms AtCCD1. Das Substrat β -Carotin und die Orientierung seiner Einlagerung sind ebenfalls dargestellt. Der Durchmesser einer Polysorbat-Mizelle knapp oberhalb der kritischen Mizellkonzentration (CMC) beträgt rund 9 nm, der Durchmesser ihres hydrophoben Kerns etwa 2,1 nm (Bester-Rogac, 2007). Die Länge eines β -Carotin-Moleküls beträgt 2,5 nm (Lazrak et al., 1987). Der Liposomendurchmesser von 100 bis 300 nm konnte als einziges Element nicht maßstabsgerecht dargestellt werden. Der Durchmesser der Phospholipid-Doppelschicht ist dagegen maßstabsgerecht und beträgt für Phosphatidylcholin circa 4 nm.

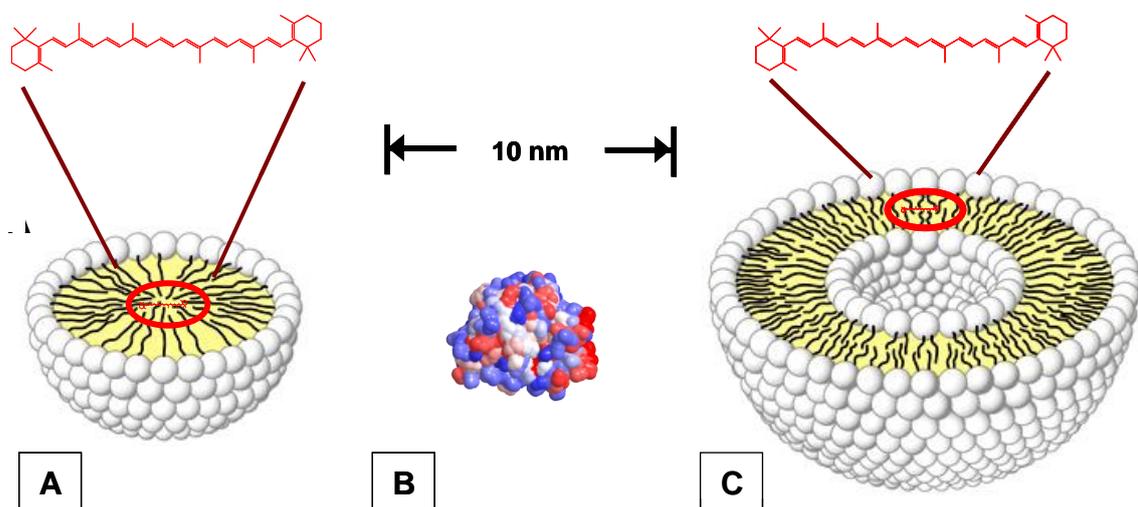


Abb. 8: Maßstabsgerechte schematische Darstellung des Enzyms AtCCD1 (B), einer carotinoidbeladenen Mizelle (A) und eines carotinoidbeladenen Liposoms (C). Hydrophobe Bereiche, die die Einlagerung von Carotinoiden erlauben, sind gelb gefärbt. Der Durchmesser von Liposomen beträgt bei den hier gewählten Bedingungen 100 bis 300 nm und ist als einziges Element nicht maßstabsgerecht dargestellt. Der Membrandurchmesser von Liposomen beträgt für Phosphatidylcholin ca. 4 nm und ist maßstabsgerecht. Quelle Abbildungen Mizelle und Liposom: Wikimedia Commons.

Als Tensid wird eine Klasse von Molekülen bezeichnet, die einen hydrophilen und einen hydrophoben Teil besitzen. Aufgrund ihres amphiphilen Charakters lagern sich Tenside an die Grenzflächen nicht mischbarer Phasen an und reduzieren auf diese Weise die Grenzflächenspannung. Tenside werden nach ihrem Ladungszustand in wässriger Lösung kategorisiert. Es gibt anionische, kationische, zwitterionische und nichtionische Tenside (Fabry, 1991). Tenside werden in einer

Vielzahl von technischen Anwendungen eingesetzt, insbesondere als Emulgatoren und zur Verbesserung der Benetzbarkeit hydrophober Substanzen (Tadros, 2005).

Oberhalb der kritischen Mizellkonzentration (CMC) lagern sich die zuvor molekular gelösten Tensidmoleküle zu sphärischen Aggregaten zusammen, die Mizellen genannt werden. In wässrigen Lösungen sind die hydrophoben Abschnitte der Tenside zum Mizellkern hin orientiert, während die hydrophilen Abschnitte die Grenzfläche zum Umgebungsmedium bilden. Der hydrophobe Kern von Mizellen wird als Pseudophase bezeichnet. In der Pseudophase können hydrophobe Substanzen molekular gelöst werden (Dwars et al., 2005). Die Aggregationszahl ist eine tensidspezifische Größe und gibt die Anzahl von Tensidmonomeren pro Mizelle unter Standardbedingungen an. Theoretisch müsste eine Erhöhung der Tensidkonzentration oberhalb der CMC zur Ausbildung weiterer, gleich dimensionierter Mizellen führen, während die durch die CMC bestimmte Konzentration an Monomeren konstant bleibt. Untersuchungen ergaben jedoch, dass die CMC und die Aggregationszahl von Tensiden von der Gesamttensidkonzentration (Bhattacharya und Palepu, 2004), der Ionenstärke der Lösung (Tadros, 2005), der Temperatur sowie der Konzentration von Cosolventien (Aramaki et al., 1999, Carnero Ruiz et al., 2003) abhängig sind.

Mizellen sind keine statischen Strukturen, sondern existieren in einem Gleichgewichtszustand von Mizellzerfall und Mizellaufbau. Das dynamische Gleichgewicht zwischen den beiden Zuständen wird durch die Relaxationszeit τ_2 beschrieben, die bei den meisten Tensiden im Millisekundenbereich, bei einigen Sonderfällen jedoch auch im Minutenbereich liegt (Patist et al., 2002, Rharbi et al., 1999). Zusätzlich findet ein Austausch von Tensidmonomeren zwischen der Mizelle und dem Umgebungsmedium statt, der durch die im Mikrosekundenbereich liegende Relaxationszeit τ_1 beschrieben wird. Beide Gleichgewichtsprozesse beeinflussen die Kinetik des Austausches von mizellar solubilisierten Substanzen zwischen Mizellen (Rharbi und Winnik, 2001).

Die Molekülstruktur von Tensiden ähnelt der von Phospholipiden, und Mizellen werden aus diesem Grund als vereinfachte biomimetische Systeme für natürliche Membranen beschrieben (Rehage, 2005, Viparelli et al., 1999). Insbesondere

nichtionische Tenside eignen sich für den Einsatz von Mizellen als Membranmimetika, da sie üblicherweise nicht denaturierend wirken und enzymkompatibel sind (Bhairi, 2001).

Mizellen sind zur Solubilisierung von Carotinoiden in wässrigen Lösungen geeignet und können für die Vermittlung hydrophober Moleküle an Enzyme in wässriger Wirkumgebung eingesetzt werden. Mizellare Substratvermittlung wurde bereits in frühen Untersuchungen zur Funktion carotinoidspaltender Enzyme angewendet (Olson und Hayaishi, 1965). Die photometrische Messung einer unspezifischen co-oxidativen Spaltung von mizellar vermittelten Carotinoiden mithilfe einer Lipoxygenase wurde kurze Zeit später beschrieben (Ben Aziz et al., 1971) und das photometrische Messverfahren in der Folgezeit vielfach eingesetzt (Zorn et al., 2003). Auch bei der Charakterisierung der regiospezifisch spaltenden CCD-Enzyme erfolgte die Substratvermittlung mittels Mizellen aus nichtionischen Tensiden. Im überwiegenden Teil dieser Untersuchungen wurden jedoch qualitative Fragestellungen untersucht und keine kinetischen oder quantitativen. Die ersten systematischen Studien zur Rolle des mizellaren Substratvermittlungssystems bei der enzymatischen Umsetzung von Carotinoiden erfolgten 2007 und 2008 (Schilling, 2008, Schilling et al., 2008, Schilling et al., 2007). Sie gaben Aufschluss über den kinetischen Einfluss des mizellaren Systems auf die Gesamtreaktionsgeschwindigkeit und zeigten Wege der Mizell-Umstrukturierung, die zu erhöhten Reaktionsgeschwindigkeiten führten. Die Untersuchungen wurden jedoch mit dem Modellsubstrat 8'-Apo- β -carotin-8'-al anstatt dem kommerziell attraktiven β -Carotin durchgeführt und behandelten in vielen Punkten nur Mizellen aus einem Tensid, dem nichtionischen Triton X-100.

Über die individuelle Eignung von Tensiden zur Vermittlung hydrophober Substrate an Enzyme ist in der Literatur bisher wenig bekannt. Insbesondere die Auswahl des zur Substratvermittlung eingesetzten Vertreters innerhalb einer Tensidklasse erfolgte in der Literatur häufig ohne Begründung. Es wurde davon ausgegangen, dass innerhalb einer Tensidklasse keine wesentlichen Unterschiede in der Eignung zur Vermittlung hydrophober Substrate bestehen. Zwei aktuelle Arbeiten (Kim et al., 2008, Wache et al., 2006) deuten jedoch an, dass nichtionische Tenside sich in ihrer Eignung zum Vermitteln carotinoider Substrate an Enzyme unterscheiden. Zur

Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Struktur von Tensiden und ihrer Eignung zur Substratvermittlung bieten sich Detergenzien-Familien wie die Tween-Serie an. Die Vertreter der Tensid-Serie unterscheiden sich durch die Länge der hydrophoben Seitenkette (Tween 20 bis Tween 60), beziehungsweise durch eine Doppelbindung in der hydrophoben Seitenkette (Tween 80) (Abb. 9). Der hydrophile Kopf der Tenside besteht aus einem zufällig polymerisierten Polyoxyäthylen(20)-Sorbitan und ist in allen Fällen gleich.

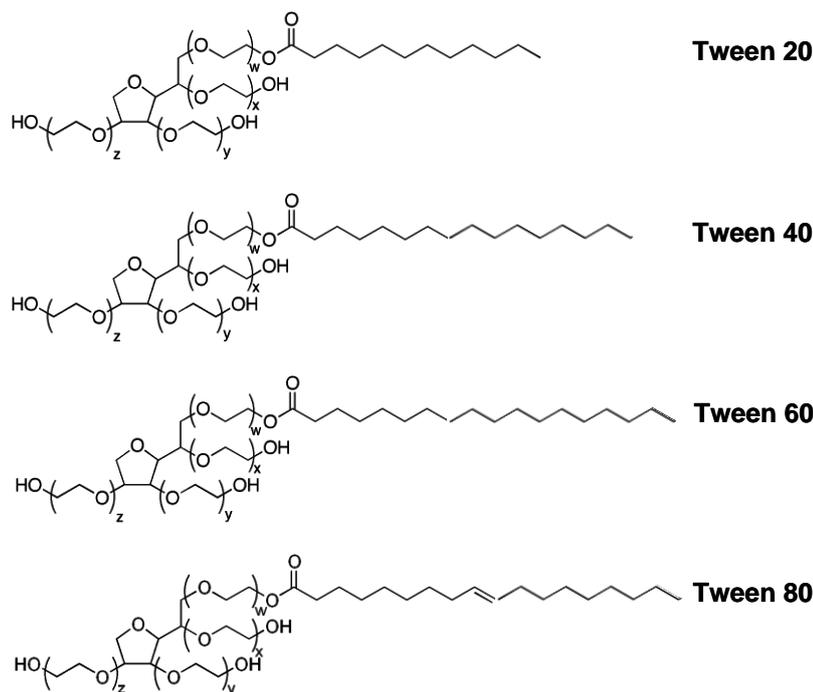


Abb. 9: Struktur der Tenside der Tween-Serie. Die Tenside der Serie unterscheiden sich in der Länge beziehungsweise der Sättigung der hydrophoben Seitenkette. Der hydrophile Kopf besteht in allen Fällen aus einem Polyoxyäthylen-Sorbitan mit $x+y+z = 20$.

Die Eignung von Tween-Tensiden zur Vermittlung carotinoider Substrate an AtCCD1 wurde bereits gezeigt (Schilling, 2008), und das physikochemische Verhalten dieser Tenside ist umfangreich beschrieben (Bester-Rogac, 2007, Bhattacharya und Palepu, 2004, Donbrow et al., 1978).

3.3.4 Solubilisierung von Carotinoiden in Liposomen

Liposomen stellen die dritte Klasse von Substratvermittlungsformen dar, die im Rahmen der Arbeit untersucht wurden. Liposomen sind sphärische Vesikel, die aus

einer oder mehreren Phospholipid-Doppelschichten aufgebaut sind und in der Untersuchung von membranassoziierten oder membrangebundenen Proteinen (Bonk et al., 1997) sowie in der pharmazeutischen Formulierungstechnik (Torchilin, 2005) verbreitet Anwendung finden. Werden Liposomen als Vermittlungsvesikel für hydrophobe Substanzen eingesetzt, so befinden sich diese im Gegensatz zu Mizellen nicht im Kern des Vesikels, sondern im hydrophoben Zentrum der Lipiddoppelschichten. Der schematische Aufbau eines unilamellaren Liposoms ist in Abbildung 8 C und die Struktur von Phospholipiden ist beispielhaft anhand eines L- α -Phosphatidylcholins aus Ei dargestellt (Abb. 10).

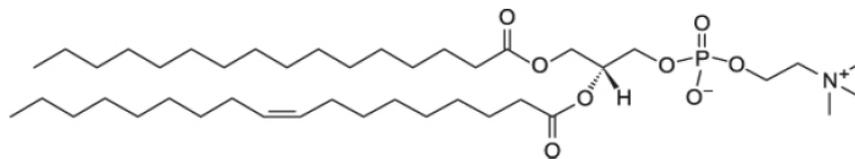


Abb. 10: L- α -Phosphatidylcholin, beispielhafte Struktur mit Oleyl- und Stearyl-Seitenketten. Die Fettsäurereste stellen den hydrophoben Teil des Moleküls dar, der Cholsäure-Phosphoester den hydrophilen Teil.

Liposomen stellen eine realistische Nachbildung natürlicher Membranumgebungen dar, da sie wie diese aus Phospholipid-Doppelschichten aufgebaut sind. Die in der Natur am häufigsten auftretenden Phosphoglyceride sind Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylserin (PS). Darüber hinaus treten in der Natur noch häufig Glycolipide auf, bei denen am zentralen Glycerin über Esterbindungen zwei aliphatische Ketten sowie ein Zuckermolekül glykosidisch gebunden sind. Die Zusammensetzung von Phospholipidvesikeln kann der Membranzusammensetzung eines nachzuahmenden Zellkompartiments nachempfunden werden (Latowski et al., 2004, Latowski et al., 2002). Phospholipid-Doppelschichten können in Abhängigkeit von der Temperatur verschiedene Aggregatzustände einnehmen. Unterhalb der Phasenübergangstemperatur T_m befinden sich die Phospholipide in der Membran in einem geordneten, gelartigen Zustand. Oberhalb von T_m geht die Doppelschicht in einen ungeordneten, flüssigkristallinen Zustand über und wird dabei mechanisch deutlich flexibler. Die Phasenübergangstemperatur hängt von der Länge und dem Sättigungsgrad der veresterten Fettsäuren ab und liegt für hochreines PC bei -18°C (Chen et al., 1980).

Verschiedene Methoden können eingesetzt werden, um beladene Liposomen herzustellen. Die am weitesten verbreitete Methode ist die Filmmethode (Yamamoto und Bangham, 1978). Dabei werden Phospholipide und die zu solubilisierende Substanz in einem organischen Lösungsmittel gelöst und vermischt. Durch anschließende Entfernung des Lösungsmittels wird ein homogener Lipidfilm gebildet, in dem die zu solubilisierende Substanz gelöst ist. Die Resuspension solcher Filme in wässriger Lösung führt zur Ausbildung von großen, multilamellaren Vesikeln (MLV) mit üblicherweise 5 bis 20 konzentrischen Lipiddoppelschichten und Durchmessern bis zu 1 μm (Philippot und Schuber, 1995). Phospholipidvesikel mit einem Durchmesser von mehr als 300 nm führen aufgrund von Lichtstreuung zu trüben Suspensionen (Taylor et al., 2005). Diese wären in einem photometrischen Meßsystem zur kinetischen Verfolgung von Carotinoid-Spaltungsreaktionen nicht einsetzbar. Die MLV können durch Leistungseintrag in metastabile, unilamellare Vesikel (ULV) mit einer definierten engen Größenverteilung überführt werden. Übliche Verfahren für diesen Schritt sind die Extrusion der MLV-Suspension durch Membranen mit definierter Porengröße, Hochdruckhomogenisierung oder Beschallung mit einer Ultraschall-Sonotrode (Hope et al., 1986). Die Extrusion birgt den Nachteil, dass Phospholipide und solubilisierte Substanz die Membran im Verlauf der Extrusion zusetzen und die entstandene ULV-Suspension keine definierte Konzentration dieser Komponenten mehr aufweist.

In Abhängigkeit von ihrer Molekülstruktur orientieren sich Carotinoide in den Phospholipid-Doppelschichten von Liposomen unterschiedlich: β -Carotin wird parallel zur Membranoberfläche in deren hydrophoben Kern eingelagert (Milon et al., 1986). Mit der β -Carotin-Einlagerung geht eine Absenkung der Phasenübergangstemperatur T_m einher. Dieser Effekt wird von Pflanzen zur Regulation der Membranfluidität bei Kältestress eingesetzt (Gruszecki, 2004a). An den endständigen Iononringen oxyfunktionalisierte Xanthophylle durchspannen die Lipiddoppelschicht nahezu orthogonal zur Membranoberfläche und führen als „molekulare Niete“ zu einer deutlichen Versteifung der Membran (Milon et al., 1986, Strzalka und Gruszecki, 1994).

Die enzymatische Carotinoidspaltung durch AtCCD1 bei Substratvermittlung mittels unilamellarer Liposomen konnte mit dem Modells substrat 8'-Apo- β -carotin-8'-al gezeigt werden (Schilling, 2008). Bei Verwendung des kommerziell attraktiven Substrates β -Carotin konnten nur Spuren des Produktes β -Ionon nachgewiesen werden. Das Ergebnis stellte dennoch den ersten bekannten *in vitro* Umsatz von β -Carotin mittels AtCCD1 dar. Das in den genannten Versuchen eingesetzte Phospholipidgemisch bestand zu etwa 45 % (w/w) aus Phosphatidylcholin und war darüber hinaus undefiniert. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen hatten zum Ziel, mit definierten Phospholipidpräparationen die Einflussfaktoren für eine verbesserte Umsetzung von β -Carotin aus Liposomen zu ermitteln.

3.4 Technische Carotinoidquellen

Werden bei der Herstellung von Aromastoffen Substrate natürlicher Herkunft und als Katalysator natives Enzym oder ganze mikrobielle Zellen eingesetzt, gelten die Produkte gemäß der europäischen Aromenverordnung als natürlich und können entsprechende Marktpreise erzielen. Der Marktpreis von kristallinem β -Carotin aus natürlichen Quellen liegt mit rund 200 €/kg bei Abnahme großindustrieller Mengen um etwa den Faktor zehn über dem für synthetisches β -Carotin. Für die ökonomische Bewertung eines biokatalytischen Herstellungsprozesses für β -Ionon sind die Kosten des eingesetzten natürlichen Substrats von entscheidender Bedeutung. Als „technisches Substrat“ wird in diesem Zusammenhang gezielt gezüchtete oder als Abfallstrom verfügbare Biomasse bezeichnet, die einen hohen Gehalt des gewünschten Substrats aufweist.

3.4.1 Biomasse als Carotinoidquelle

Zur biokatalytischen Umsetzung von Carotinoiden kommen verschiedene Typen von carotinoidhaltiger Biomasse als technische Substratquellen in Frage: carotinoidhaltige Trester aus der Saffherstellung sowie carotinoidhaltige Pilz-, Pflanzen-, Algen- oder cyanobakterielle Biomasse. In zwei Punkten unterscheiden sich die genannten technischen Substratquellen deutlich: der Gesamtkonzentration an Carotinoiden und dem Carotinoidspektrum. Insbesondere das Carotinoidspektrum ist für den technischen Einsatz von Relevanz, da das eingesetzte Enzym AtCCD1 eine große Bandbreite verschiedener Carotinoide und

Apocarotinoide spaltet. Hochwertige Aromastoffe entstehen dabei vor allem bei der symmetrischen 9,10/9',10'-Spaltung von β -Carotin und Zeaxanthin. Bei Spaltung von β -Carotin entsteht β -Ionon und bei Spaltung von Zeaxanthin 3-Hydroxy- β -Ionon, das holzig-tabakartige organoleptische Eigenschaften aufweist.

Eine *de novo* Synthese von β -Carotin in rekombinanten Mikroorganismen als Ausgangsstoff für die biokatalytische Herstellung von β -Ionon stellt für die Aromastoffindustrie aufgrund der fehlenden öffentlichen Akzeptanz von GVO in lebensmittelnahen Produktionsprozessen keine gangbare Option dar. Ein als natürlich deklarierbarer Aromastoff muss aus natürlichen Ausgangssubstanzen unter Einsatz eines in der Natur auftretenden Enzyms oder Mikroorganismus hergestellt sein. Langfristig könnte die bereits beschriebene *de novo* Synthese von β -Ionon in *E. coli* (Schilling, 2008) oder anderen Organismen jedoch auch für den Markt natürlicher Aromen einsetzbar werden. Bis dahin kann die marktgerechte Herstellung nur durch Umsetzung von natürlichem β -Carotin in aufgereinigter Form oder in Form von Biomasse durch isoliertes, rekombinant hergestelltes Enzym erfolgen.

Pflanzenbiomasse ist als technisches Substrat für die Biokonversion von β -Carotin nur eingeschränkt geeignet. Pflanzen beinhalten ein sehr heterogenes Spektrum an Geweben, von denen in vielen keine Carotinoide akkumuliert werden. Die carotinoidhaltigen Teile der Pflanze müssten von den übrigen getrennt werden. Die Verwendung dieses Biomassetyps ist nur dann sinnvoll, wenn eine bereits zu einem anderen Zweck abgetrennte Biomasse als Abfallstrom zu einem geringen Preis erworben werden kann, wie es bei Karottentrestern aus der Saftproduktion der Fall wäre. Die Carotinoidkonzentration in Pflanzenbiomasse ist überdies gering (Jaramillo-Flores et al., 2005) und die Lagerbarkeit dieses technischen Substrattyps begrenzt. Das Carotinoidspektrum von *Daucus carota* beschränkt sich auf Lycopin sowie α - und β -Carotin, wobei β -Carotin etwa 65 mol% der enthaltenen Carotinoide ausmacht (Granado et al., 1992).

Mikroorganismen werden seit der Mitte des 20. Jahrhunderts zur extraktiven Herstellung von natürlichem β -Carotin eingesetzt (Bhosale, 2004). Die Kultivierungs- und Zellerntetechniken sind entsprechend intensiv untersucht und

optimiert worden. Viele mikrobielle β -Carotin-Produzenten können leicht sprühgetrocknet und damit in eine transportier- und lagerbare Form gebracht werden (Molina Grima et al., 2003). Insbesondere carotinoidhaltige Cyanobakterien wie *Spirulina platensis* und Algen wie *Dunaliella salina* werden getrocknet weltweit im dreistelligen Tonnenmaßstab pro Jahr als Nahrungsergänzungsmittel gehandelt. Die Kultivierung β -Carotin-produzierender Biomasse kann in klimatisch begünstigten Regionen im Außenbereich und kontinuierlich erfolgen, was niedrige Produktionskosten erlaubt (Olaizola, 2003). Carotinoidproduzierende Hefen werden hingegen üblicherweise in Bioreaktoren kultiviert (Dufosse, 2006). In Tabelle 1 sind mögliche β -Carotin-Quellen aufgeführt, deren Verfügbarkeit einen technischen Einsatz zur biokatalytischen β -Ionon-Herstellung erlauben würde. Hierbei wurden nur Organismen ausgewählt, deren carotinoide Hauptprodukt β -Carotin ist.

Tab. 1: Mögliche technische β -Carotin-Quellen und aktuell erreichte Substratkonzentration (Bhosale und Gadre, 2002, Orset und Young, 2000, Kim et al., 1997). Wo entsprechende Daten verfügbar waren, ist anstatt volumetrischer Konzentration der Biotrockenmasseanteil angegeben.

Organismus	Typ	Carotinoidgehalt	Referenz
<i>Blakeslea trispora</i>	Pilz	2,16 g ^{*l} ⁻¹	Kim, 1997
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Pilz	250 mg ^{*l} ⁻¹	Bhosale, 2002
<i>Dunaliella salina</i>	Alge	10,35 mg ^{*l} ⁻¹	Orset, 2000
<i>Spirulina platensis</i>	Cyanobakt.	962 μ g ^{*g} ⁻¹ (BTM)	IGV GmbH, pers. Komm.
<i>Daucus carota</i>	Pflanze	73,9 μ g ^{*g} ⁻¹ (BTM)	Jaramillo-Flores, 2005

3.4.2 Biochemische Verfügbarkeit der Carotinoide

Die Verfügbarkeit von Carotinoiden aus Biomasse für eine enzymatische Biokatalyse ist bisher kaum untersucht worden. Veröffentlichte Informationen bestehen im Wesentlichen aus ernährungswissenschaftlichen Studien zur Bioverfügbarkeit von Carotinoiden aus Biomasse im Verdauungssystem. Dabei steht zumeist die Absorption der Carotinoide im Verdauungstrakt im Vordergrund und nicht ihre enzymatische Zugänglichkeit. Anhand der verwertbaren Literatur lassen sich zwei zentrale Herausforderungen für die biokatalytische Umsetzung von

Carotinoiden aus Biomasse identifizieren: Einerseits muss die häufige Komplexierung mit Proteinen aufgehoben werden, andererseits muss eine Mobilisierung der Carotinoide aus den Speicherorten *in vivo* in Vesikel erfolgen, in welchen die Carotinoide in enzymatisch zugänglicher Form vorliegen.

Verschiedene Arbeiten beschreiben, dass β -Carotin aus pflanzlichen Quellen üblicherweise als Komplex mit carotinoidbindenden Proteinen vorkommt (Milicua et al., 1991, Borowska et al., 2003). Auch für Cyanobakterien existieren entsprechende Untersuchungen (Kirilovsky, 2007). Die Zugänglichkeit für das Verdauungssystem ist bei komplexierten Carotinoiden sehr schlecht. Eine Behandlung von pflanzlicher Biomasse für 30 Minuten mit 4 % Essigsäure führte zu einer Hydrolyse der Carotinoid-Protein-Komplexe und verbesserte die Extrahierbarkeit von β -Carotin stark (Jaramillo-Flores et al., 2005).

Beim Zellaufschluss von Biomasse können sich Lipid-in-Wasser-Emulsionen bilden. Die in den Zellen enthaltenen Carotinoide sind in der hydrophoben Phase des Zweiphasensystems zu erwarten. Da AtCCD1 in Emulsionen nur geringe Aktivität zeigte (Schilling, 2008), ist für die biokatalytische Umsetzung die Überführung der Emulsion in ein System aus gemischten Mizellen sinnvoll, in dem die AtCCD1-Aktivität bereits teilweise optimiert wurde. Der Übergang der Carotinoide aus Emulsionstropfen in gemischte Mizellen ist im Rahmen von Untersuchungen zur intestinalen Carotinoidabsorption untersucht worden. Dabei wurde gezeigt, dass insbesondere stark hydrophobe Carotinoide wie β -Carotin schlecht aus den Lipid-Vesikeln in gemischte Mizellen mobilisiert werden können (Tyssandier et al., 2001, Milicua et al., 1991). Es ist anzunehmen, dass der Transfer der Carotinoide durch eine erhöhte Hydrophobizität des Soluten verbessert wird (Milicua et al., 1991). Der hydrophile Charakter von wässrigen Lösungen kann unter anderem durch die Mischung mit Cosolventien beeinflusst werden. Einige organische Lösungsmittel wie Oleylalkohol oder Butylstearat sind biokompatibel und bieten zusätzlich die Möglichkeit, Carotinoide aus lebender Biomasse zu mobilisieren. Die biokompatible Extraktion von β -Carotin aus wachsenden Algenkulturen mit solchen Solventien ist bereits beschrieben (Mojaat et al., 2008) und könnte in Zukunft genutzt werden, um das Substrat während einer Biokonversion mit immobilisierten Enzymen kontinuierlich nachzuproduzieren.

Die Extraktion von hydrophoben Substanzen mittels überkritischem CO₂ stellt einen einfachen und im Großmaßstab günstigen ersten Verarbeitungsschritt für Biomasse dar. Zwar sind die Investitionen in CO₂-Extraktionsanlagen höher als für konventionelle Lösungsmittelextraktion, doch unter Berücksichtigung der Energiekosten und der Kosten für die Lösungsmittelbeschaffung und -abtrennung ergibt sich in vielen Fällen ein Kostenvorteil für die Extraktion mit superkritischem CO₂ (Reverchon und De Marco, 2006). Im Vergleich mit unbehandelter Biomasse bietet die Verwendung eines CO₂-Extraktes einen Vorteil: Durch die Wahl der Extraktionsbedingungen kann das Spektrum an extrahierten Carotinoiden gesteuert und auf das Zielsubstrat eingeeengt werden (Gamlieli-Bonshtein et al., 2002). Die CO₂ - Extraktion von Carotinoiden aus Biomasse führt immer zu einer Mitextraktion anderer hydrophober Substanzen wie Fettsäuren (Wang et al., 2007). Diese können selbst stabile Vesikel bilden (Apel et al., 2002) und erlauben möglicherweise, dass β -Carotin aus CO₂-Extrakt auch ohne oder unter geringem Einsatz von Tensiden oder Phospholipiden umgesetzt wird.

3.5 Rekombinante Proteinexpression in *E. coli*

Die Überexpression von Proteinen in *E.coli* führt häufig zu einer anteiligen Bildung von teilweise oder ganz fehlgefaltetem Enzym, welches in aggregierter Form in Einschlusskörpern (*inclusion bodies*) vorliegt. Dieses Phänomen tritt besonders dann auf, wenn es sich um heterologe Expressionen handelt, wie in diesem Fall mit der pflanzlichen AtCCD1 im bakteriellen Expressionsorganismus *E.coli* (Hoffmann et al., 2004). Ursachen für das Auftreten von *inclusion bodies* können eine Überlastung des zellulären Translations- und Faltungsapparates, ein ungeeignetes Faltungsmilieu oder nicht durchgeführte posttranslationale Modifikationen sein. Das zu Einschlusskörpern aggregierte Protein kann zwar noch eingeschränkte Aktivität besitzen (Doglia et al., 2008), ist aber häufig nur nach einer Proteinerückfaltung nutzbar (Lilie et al., 1998). Aufgrund der zur Verfügung stehenden genetischen Werkzeuge und der umfassenden Charakterisierung wird ein Wechsel des Expressionssystems fort von *E.coli* häufig nicht angestrebt. Aus diesem Grund existieren inzwischen zahlreiche Methoden, um den Anteil an fehlgefaltetem Protein bei der Expression in *E.coli* zu verringern: Anpassung der Induktions- und Expressionsbedingungen (Sorensen und Mortensen, 2005), Codonoptimierung

durch Gensynthese, die Bereitstellung unzureichend vorhandener tRNAs in *E.coli* oder die genetische Fusion mit Löslichkeitsverbessernden Proteinen (Esposito und Chatterjee, 2006). Zwei der genannten Methoden zur Reduzierung fehlgefalteten Proteins sind für das Enzym AtCCD1 bereits beschrieben: Expressionsbedingungen und Induktion (Schilling, 2008) sowie die Fusion mit verschiedenen Polypeptiden (Schilling et al., 2007).

Eine weitere Möglichkeit, um bei Überexpressionen den Anteil korrekt gefalteter Proteine zu erhöhen, stellt die Coexpression molekularer Chaperone dar (Lee et al., 2004). Molekulare Chaperone sind Proteine, die die nicht-kovalente Faltung von anderen Proteinen beziehungsweise den Aufbau makromolekularer Strukturen unterstützen. Sie sind dabei nicht Teil der beeinflussten Proteine oder Proteinkomplexe und wirken häufig synergistisch mit anderen Chaperonen (Nishihara et al., 1998). Chaperone wirken durch sehr verschiedene Mechanismen und an unterschiedlichen Punkten der Proteinbiosynthese. Unter anderem wirken sie als Isomerasen, schützen exponierte hydrophobe Regionen der naszierenden Polypeptidkette bei der Translation oder bieten ein definiertes und geschütztes Milieu für die Selbstfaltung neu synthetisierter Polypeptide (Wall und Pluckthun, 1995). Bei zahlreichen Chaperonen ist bekannt, dass sie erst gemeinsam mit weiteren Chaperonen ihre Wirkung entfalten oder ihre Effizienz dadurch steigt (Nishihara et al., 1998, Nishihara et al., 2000). Es ist daher sinnvoll, Chaperone zur Verbesserung der Proteinüberexpression nicht nur einzeln, sondern in bewusst gewählten Kombinationen einzusetzen.

Sind *E.coli*-Zellen Stress-Einflüssen wie Temperaturerhöhung, organischen Lösungsmitteln oder Akkumulation von aggregierten Proteinen ausgesetzt, wird vorübergehend die Synthese von 20-30 sogenannten Hitzeschock-Proteinen (*heat shock proteins*, *hsps*) hochreguliert (Neidhardt und VanBogelen, 1987). Die Hitzeschockreaktion kann auch chemisch ausgelöst werden. Ethanol stellt einen der effizientesten Auslöser der hsp-Reaktion dar. Die Hochregulation der Hitzeschock-Antwort wurde bereits bei mehreren Proteinüberexpressionen eingesetzt, um die Effizienz bereits coexprimierter Chaperone weiter zu verbessern (Thomas und Baneyx, 1997).

3.6 *In-situ* Produktabtrennung durch organophile Pervaporation

3.6.1 Verfahrensprinzip der organophilen Pervaporation

Der Begriff Pervaporation beschreibt einen Prozess zur selektiven Abtrennung von flüchtigen Substanzen aus Gemischen mithilfe nichtporöser Membranen und wurde bereits 1917 geprägt (Karlsson und Trägårdh, 1997). In Abhängigkeit von der Natur der zu pervaporierenden Komponente wird das Verfahren als hydrophile oder organophile Pervaporation bezeichnet. Im technischen Einsatz eignet sich das Verfahren besonders für die Abtrennung gering konzentrierter Substanzen mit einem Molekulgewicht < 200 Da (Willemsen et al., 2004). Die organophile Pervaporation wird in der industriellen Praxis noch sehr selten angewendet, während die hydrophile Pervaporation bereits Einsatz in so zentralen Prozessschritten wie der Entwässerung oder Trennung von Lösungsmitteln findet (Bowen et al., 2004).

Integrierte Bioprozesse, bei denen ganze Zellen oder isolierte Enzyme als Biokatalysatoren eingesetzt werden, sind häufig durch eine niedrige Produktivität gekennzeichnet. Diese kann durch inhibierende oder toxische Wirkung der Produkte hervorgerufen werden, die insbesondere bei hydrophoben Molekülen auftritt. Die organophile Pervaporation ist für den Einsatz zur *in situ* -Produktabtrennung in Bioprocessen besonders geeignet: Die Abtrennung ist auch bei sehr geringen Konzentrationen der zu trennenden Substanz effektiv. Das Verfahren bedient sich porenfreier Membranen, die nahezu keinem *fouling* unterliegen und keine vorgeschaltete Enzym- oder Zellabtrennung benötigen. Überdies stellt die Membran eine Sterilbarriere zwischen Reaktionsmedium und Produkt dar (Bengtson und Bøddeker, 1995).

Andere *in situ* - Produktabtrennungsverfahren, die keine Zellabtrennung voraussetzen, wären der Einsatz von Adsorberharzen oder eine flüssig-flüssig-Extraktion mit enzymkompatiblen Lösungsmitteln. Der Einsatz von Adsorberharzen ist neben der Verblockungsgefahr durch ihre begrenzte Selektivität und Kapazität eingeschränkt (Berger, 1995, Klingenberg und Hanssen, 1988). Enzymkompatible organische Lösungsmittel sind für AtCCD1 bisher nicht bekannt und bergen im technischen Einsatz die Gefahr stabiler Emulsionsbildung und den Nachteil der

Entsorgung nach Erreichen der maximalen Anzahl Einsatzzyklen. Gegenüber anderen Abtrennungstechniken weist die Pervaporation den Nachteil geringer Stoffflüsse auf. Dieser Nachteil wird durch eine hohe Selektivität, geringe Neigung zum *fouling* und eine leichte Reinigung/Sterilisierung aufgewogen. Die Einsetzbarkeit von organophiler Pervaporation zur Abtrennung von Aromastoffen aus Bioprozessen wurde bereits demonstriert, beispielsweise für die Abtrennung von Essigsäureestern, Citronellol und Geraniol aus *Ceratocystis moniliformis* - Kulturen (Bluemke und Schrader, 2001) oder die Abtrennung von 2-Phenylethanol aus *Kluyveromyces marxianus* - Kulturen (Etschmann et al., 2005).

In einem Pervaporationsprozess trennt eine Membran den Feed-Flüssigkeitsstrom, der die abzutrennende Komponente enthält, von einem Gasraum unter starkem Unterdruck (Abb. 11).

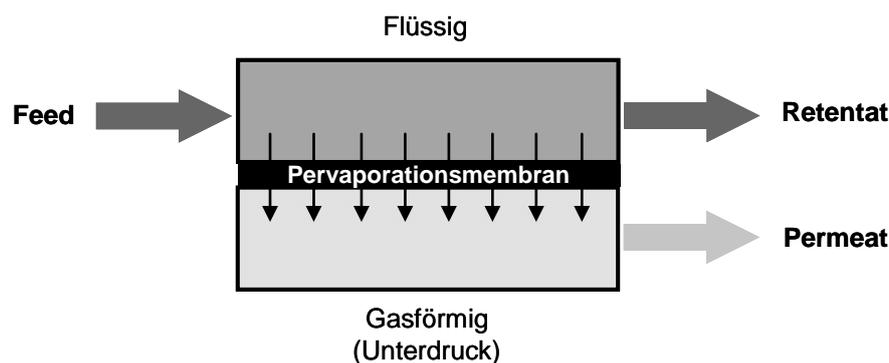


Abb. 11: Verfahrensprinzip der Pervaporation

Die treibende Kraft des Prozesses ist die Differenz der Partialdrücke der abzutrennenden Komponente zwischen den beiden Seiten der Membran (Rautenbach, 1996, Hausmanns, 1999). Die Partialdruckdifferenz entsteht durch die kontinuierliche Abführung der abzutrennenden Komponente auf der Permeatseite. Die Selektivität des Verfahrens beruht auf einer bevorzugten Absorption der abzutrennenden Komponente durch die hydrophobe Pervaporationsmembran. Die abzutrennende Komponente durchquert diffusiv die Membran und durchläuft auf der Permeatseite aufgrund des herrschenden Unterdrucks einen Phasenwechsel in den gasförmigen Zustand. Der Permeat-Gasstrom wird durch Kühlfallen auskondensiert und stellt eine konzentrierte Lösung der abzutrennenden Komponente dar, die nicht mehr von ökologisch kritischen

organischen Lösungsmitteln getrennt werden muss. Der Transport der abzutrennenden Komponente an die Grenzschicht zur Membran erfolgt diffusiv. Die Geschwindigkeit der Absorption der abzutrennenden Komponente durch die Membran ist abhängig von der Grenzflächenkonzentration dieser Komponente. Um eine geringe Grenzschichtdicke und Konzentrationspolarisation zu erreichen, wird eine Pervaporationsmembran bei möglichst hohen Reynoldszahlen überströmt.

3.6.2 Kennzahlen zur Beurteilung von Pervaporationsprozessen

Die Bewertung eines Pervaporationsprozesses erfolgt grundlegend nach zwei Kriterien: Trenngüte und Stofffluss. Die Trenngüte beschreibt die Selektivität des Trennprozesses für die Zielkomponente im Vergleich zu den anderen in der Feedlösung enthaltenen Komponenten. Der Stofffluss stellt die flächenbezogene Flussdichte der abzutrennenden Komponente dar (Rautenbach, 1996).

Die Flussdichte J_{ges} beschreibt die Masse an Permeat, die pro Zeiteinheit durch eine definierte Fläche der Pervaporationsmembran dringt. Sie ist abhängig von der Permeatmasse m_p , der Membranfläche A_M und der Pervaporationsdauer t_{PV} .

$$J_{\text{ges}} = m_p \cdot A_M^{-1} \cdot t_{PV}^{-1} \quad [\text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}] \quad (1)$$

Der zur Bewertung des Stoffflusses benötigte Partialfluss der Zielkomponente lässt sich anhand ihres Konzentrationsanteils w_i am Gesamtfluss J_{ges} berechnen. Der Gesamtfluss stellt die Summe der Partialflüsse aller Einzelkomponenten dar.

$$J_i = J_{\text{ges}} \cdot w_i \quad [\text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}] \quad (2)$$

Der Anreicherungsfaktor β_i der Komponente i ist dimensionslos und beschreibt das Verhältnis der Konzentration $c_{i,P}$ des Stoffes i im Permeat zur Konzentration $c_{i,F}$ des Stoffes i in der Feedlösung. Er ist ein Maß für die neben der reinen Abtrennung erzielte Anreicherung der Zielkomponente im Permeat. Die Angabe der verwendeten Konzentrationseinheiten ist notwendig, da mit Massenanteilen gebildete Anreicherungs-faktoren einen anderen Wert als mit Stoffmengenanteilen gebildete haben können.

$$\beta_i = c_{i,P} \cdot c_{i,F}^{-1} \quad (3)$$

Die Selektivität $S_{i,j}$ ist ebenfalls dimensionslos und repräsentiert das Verhältnis der Partialflussdichten J_i und J_j eines Stoffpaares. Sie ist ein Maß dafür, wie bevorzugt eine der Komponenten durch die Membran permeiert.

$$S_{i,j} = J_i \cdot J_j \quad (4)$$

Die Angabe der verwendeten Konzentrationseinheiten ist für $S_{i,j}$ ebenfalls notwendig, da auch hier mit Massenanteilen gebildete Selektivitäten einen anderen Wert als mit Stoffmengenanteilen gebildete annehmen können.

3.6.3 Betriebsparameter und ihr Einfluss auf die Trennleistung

Vier Parameter haben einen wesentlichen Einfluss auf die Trennleistung eines Pervaporationsprozesses: Temperatur, permeatseitiger Druck, Feedkonzentration und die Membranbeschaffenheit.

Temperatur:

Der Stofftransport durch die feedseitige Grenzschicht über der Membran ist abhängig von der Viskosität der Lösung und dem Diffusionskoeffizienten der Einzelkomponente. Beide Größen sind temperaturabhängig (Maltzahn, 2005). Aufgrund eines erhöhten freien Volumens im Membranmaterial steigt mit der Temperatur auch die Löslichkeit der abzutrennenden Komponente in der Pervaporationsmembran (Baudot und Marin, 1997). Die Gesamtflussdichte und die Partialflussdichten steigen mit zunehmender Temperatur an. Der Zusammenhang wird als diffusionskontrollierter Vorgang durch eine abgewandelte Arrheniusgleichung beschrieben.

$$J_i = J_{i,0} \cdot e^A \quad \text{mit} \quad A = -E_A \cdot R^{-1} \cdot (T^{-1} - T_0^{-1}) \quad (5)$$

E_A : Aktivierungsenergie der Pervaporation [$\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$]

R : Allgemeine Gaskonstante [$\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$]

Die Selektivität eines Pervaporationsvorgangs wird durch die Temperatur nicht beeinflusst. In einem nicht temperaturempfindlichen Reaktionssystem kann bei Bedarf die Gesamtflussdichte durch eine Erhöhung der Temperatur gesteigert werden. Kopplungseffekte zwischen Partialflüssen von Einzelkomponenten werden durch erhöhte Temperatur allerdings verstärkt.

Permeatseitiger Druck:

Der Druck auf der Feedseite einer Pervaporationsmembran hat nur einen sehr geringen Einfluss auf die Pervaporationsleistung, da die Löslichkeit von Flüssigkeiten in Polymeren nur minimal vom Druck abhängt (Böddeker, 1986). Der permeatseitige Druck ist jedoch für die Partialdruckdifferenz, die den Prozess treibt, von wesentlicher Bedeutung. Auf der Permeatseite einer Pervaporationsmembran wird üblicherweise ein möglichst starker Unterdruck aufgebaut. Eine Erhöhung des permeatseitigen Drucks führt zu einer Abnahme der Partialflussdichte der abzutrennenden Komponente. Die Abhängigkeit der Partialflussdichte vom permeatseitigen Druck ist nicht linear, sondern verstärkt sich mit abnehmendem Druck (Alexandre et al., 2000).

Feedkonzentration:

Die Partialflussdichte der abzutrennenden Komponente ist bei Pervaporation verdünnter Lösungen linear von ihrer Konzentration im Feedstrom abhängig. Der Partialfluss des Solvens ist hingegen unabhängig von der Feedkonzentration der abzutrennenden Komponente. Die Konzentration der abzutrennenden Komponente im Permeat nimmt daher linear mit steigender Feedkonzentration zu (Hausmanns, 1999). Bei Pervaporation hoch konzentrierter Lösungen der abzutrennenden Komponente kommt es zu einer starken Sorption dieser Substanz in der Membran, was zu einer Membranquellung führt. Diese resultiert in einer verringerten Hydrophobizität des Polymers und einem erhöhten Wasserfluss (Tian et al., 2005).

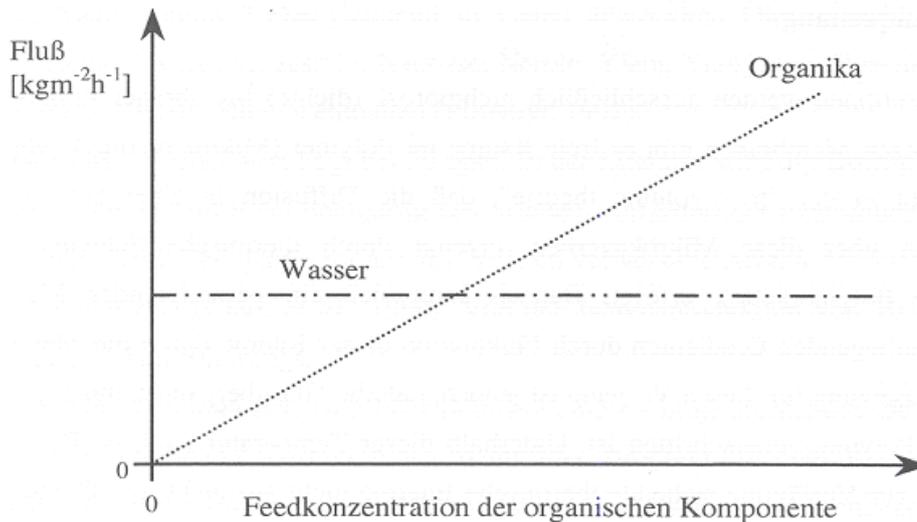


Abb. 12: Idealisierter Zusammenhang zwischen dem Partialfluss von Wasser und organischer Substanz und ihrer Konzentration in der Feedlösung bei organophiler Pervaporation (Hausmanns, 1999).

Bei der Pervaporation von Gemischen mehrerer permeierender Komponenten wirken sich die Feedkonzentrationen dieser Komponenten jeweils auf das Diffusionsverhalten der anderen Komponenten aus. Die Gesamtsorption in der Membran beeinflusst das Diffusionsverhalten der Einzelkomponenten. Aufgrund spezifischer Wechselwirkungen zwischen den Gemischkomponenten und dem Membranmaterial sowie zwischen einzelnen Gemischkomponenten kommt es zu Flusskopplungseffekten (Böddeker, 1986).

Membranbeschaffenheit:

Zwei Eigenschaften der Membran beeinflussen das Pervaporationsverhalten in besonderem Maß: die Dicke der Membran und der Aggregatzustand des Membranpolymers. Die Membrandicke beeinflusst die Gesamtflussdichte und die Selektivität in entgegengesetzter Richtung. Je dicker die Membran, desto geringer die Gesamtflussdichte und desto höher die Selektivität. Die Membrandicke muss in Bioprozessen also der geforderten Permeatreinheit und der Produktionsgeschwindigkeit der abzutrennenden Substanz angepasst werden. Die Polymere von Pervaporationsmembranen weisen in der Regel mindestens zwei Aggregatzustände auf: gummiartig-elastisch und gasartig-kristallin. Im gummiartig-elastischen Zustand sind die Polymersegmente beweglich. Dies erleichtert die Sorption von zu trennenden Komponenten, führt aber zum Quellen der Membran

bei Kontakt mit der Feedlösung. Die Quellung führt zu einer verringerten Hydrophobizität des Polymers und erhöhten Flussdichten (Tian et al., 2005). Im glasartig-kristallinen Zustand tritt dieser Effekt nicht auf, die Membran ist jedoch spröder und mechanisch weniger belastbar.

4 AUFGABENSTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Gegenstand der hier vorgestellten Arbeit war die Entwicklung eines integrierten Verfahrenskonzeptes zur biokatalytischen Herstellung von als natürlich deklariertem β -Ionon durch regioselektive oxidative Spaltung von β -Carotin. Ziel der Arbeit war ein *proof of concept* in Form einer lauffähigen Demonstrationsanlage im Labormaßstab. Die Bearbeitung der Aufgabe umfasste die notwendigen Untersuchungen auf molekularbiologischer, enzymtechnologischer und verfahrenstechnischer Ebene. Diese Arbeit ist die Fortführung der in einem Vorläuferprojekt geleisteten Arbeiten über die Eignung des regioselektiv carotinoidspaltenden Enzyms AtCCD1 zur Herstellung des Aromastoffes β -Ionon aus dem Modellsubstrat 8'-Apo- β -carotin-8'-al (Schmidt et al., 2006, Schilling, 2008). Die Aufgabe umfasste neben der Demonstrationsanlage vier Schwerpunkte:

- Ermittlung eines Reaktions- und Substratvermittlungssystems, das erstmalig die regiospezifische oxidative Spaltung von β -Carotin zu β -Ionon durch AtCCD1 im quantitativen Maßstab erlaubt.
- Weitere Charakterisierung und verbesserte rekombinante Expression des Enzyms AtCCD1 sowie möglicher alternativer Carotinasen
- Charakterisierung der organophilen Pervaporation als Verfahren zur selektiven *in situ* Produktabtrennung von β -Ionon aus dem laufenden Bioprozess unter Berücksichtigung der biologischen Produktsicherheit.
- Untersuchung der Nutzung von regenerativen, preisgünstigen („technischen“) Substratquellen wie β -carotinreicher Biomasse oder daraus hervorgehenden Primärprodukten.

Alle Aufgaben sollten unter Berücksichtigung der Prozesskosten bearbeitet werden, um den Anforderungen an einen möglichen industriellen Verfahrenseinsatz Rechnung zu tragen. Zusätzlich zur Entwicklung eines Verfahrenskonzeptes und dem Aufbau einer Demonstrationsanlage sollten im Rahmen dieser Arbeit Grundlagenfragen bearbeitet werden, die die weitergehende Charakterisierung der Enzymfamilie der *carotenoid cleavage dioxygenases* (CCDs) als technische Biokatalysatoren betreffen. Dabei sollte insbesondere die Wechselwirkung dieser Enzymfamilie mit verschiedenen Vermittlungssystemen für die stark hydrophoben Substrate untersucht werden.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

5.1 Charakterisierung von Substratvermittlungssystemen für Carotinoide

Mit den carotinoidschneidenden Dioxygenasen (*carotenoid cleavage dioxygenases*, CCDs) steht seit wenigen Jahren erstmals eine Gruppe von Enzymen zur Verfügung, die Carotinoide regiospezifisch oxidativ spalten (Huang et al., 2009a). Die carotinoiden Substrate von CCDs weisen hohe Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten $\log P$ (o/w) von 17,5 (β -Carotin) bis 8,9 (8'-Apo- β -carotin-8'-al) auf. Sie sind damit stark hydrophob und in Wasser quasi unlöslich (Cooper et al., 1997). Für die biokatalytische Umsetzung von Carotinoiden stellt ihre Hydrophobizität eine Herausforderung dar, da Carotinoide nur in monomolekular solubilisierter Form durch CCDs umgesetzt werden können. Enzymatische Umsetzungen von Carotinoiden müssen aus diesem Grund entweder in organischem Lösungsmittel stattfinden oder es müssen Methoden zur Solubilisierung von Carotinoiden in wässriger Umgebung eingesetzt werden. Für CCDs ist bisher keine stabile Aktivität in organischem Lösungsmittel beschrieben worden. Zentraler Bestandteil dieser Arbeit war daher die Untersuchung von drei Verfahren zur Solubilisierung und Vermittlung carotinoider Substrate an Enzyme in wässriger Wirkumgebung. Die untersuchten Verfahren basierten auf Mizellen, unilamellaren Liposomen und Nanoemulsionen.

Ziel aller Untersuchungen war neben einem besseren Verständnis der Vermittlungsformen für hydrophobe Substrate die Identifikation der am besten geeigneten Vermittlungsform und die Ermittlung von kinetisch optimalen Bedingungen für die Reaktionsführung mit AtCCD1.

5.1.1 Mizellen

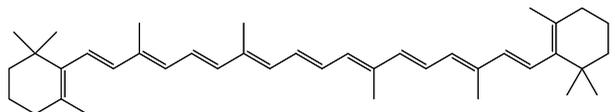
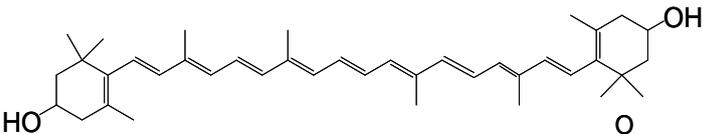
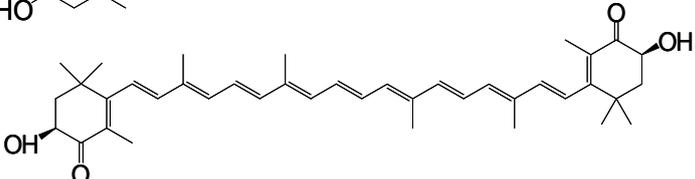
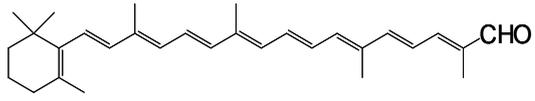
5.1.1.1 Eignung von Tensiden zur Vermittlung von Carotinoiden an Enzyme

Zur mizellaren Solubilisierung von hydrophoben Substanzen stehen grundsätzlich vier Klassen von Tensiden zur Verfügung: Nichtionische, kationische, anionische und zwitterionische. Nichtionische Tenside scheinen für die Substratvermittlung in

einer enzymatischen Reaktion besonders geeignet, da sie in der Regel nicht denaturierend wirken (Bhairi, 2001).

Aus diesem Grund wurde die Eignung strukturell nahe verwandter nichtionischer Tenside (Tween 20 bis 80, Triton X-100) zur Substratvermittlung an native AtCCD1 untersucht. Zusätzlich zu den nichtionischen wurden ein häufig verwendetes anionisches Tensid (Natrium-Cholat) und ein zwitterionisches Tensid (CHAPS) untersucht. Die enzymatische Umsetzung aus den beschriebenen Tensidmizellen erfolgte mit vier verschiedenen Carotinoiden. Neben β -Carotin wurden die Xanthophylle Zeaxanthin und Astaxanthin sowie das Apocarotinoid 8'-Apo- β -carotin-8'-al umgesetzt. Wie in Tabelle 2 dargestellt unterschieden sich die Substrate in ihrer Hydrophobizität, dargestellt durch den log P (o/w) - Wert und bilden das gesamte Hydrophobizitätsspektrum innerhalb der Substrate von AtCCD1 ab.

Tab. 2: Strukturen und Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten log P (o/w) der untersuchten Carotinoide.

Name	Struktur	log P (o/w)
β -Carotin		17,5
Zeaxanthin		14,8
Astaxanthin		13,3
β -Apo-8'-Carotinal		8,9

Alle Reaktionen zu einem Substrat wurden zeitgleich und mit der selben Enzymlösung durchgeführt. Der Vergleich von Absolutwerten zwischen Proben mit

verschiedenen Substraten ist nicht möglich, da die eingesetzten Zellen getrennt aufgeschlossen und unterschiedlich lange gelagert wurden.

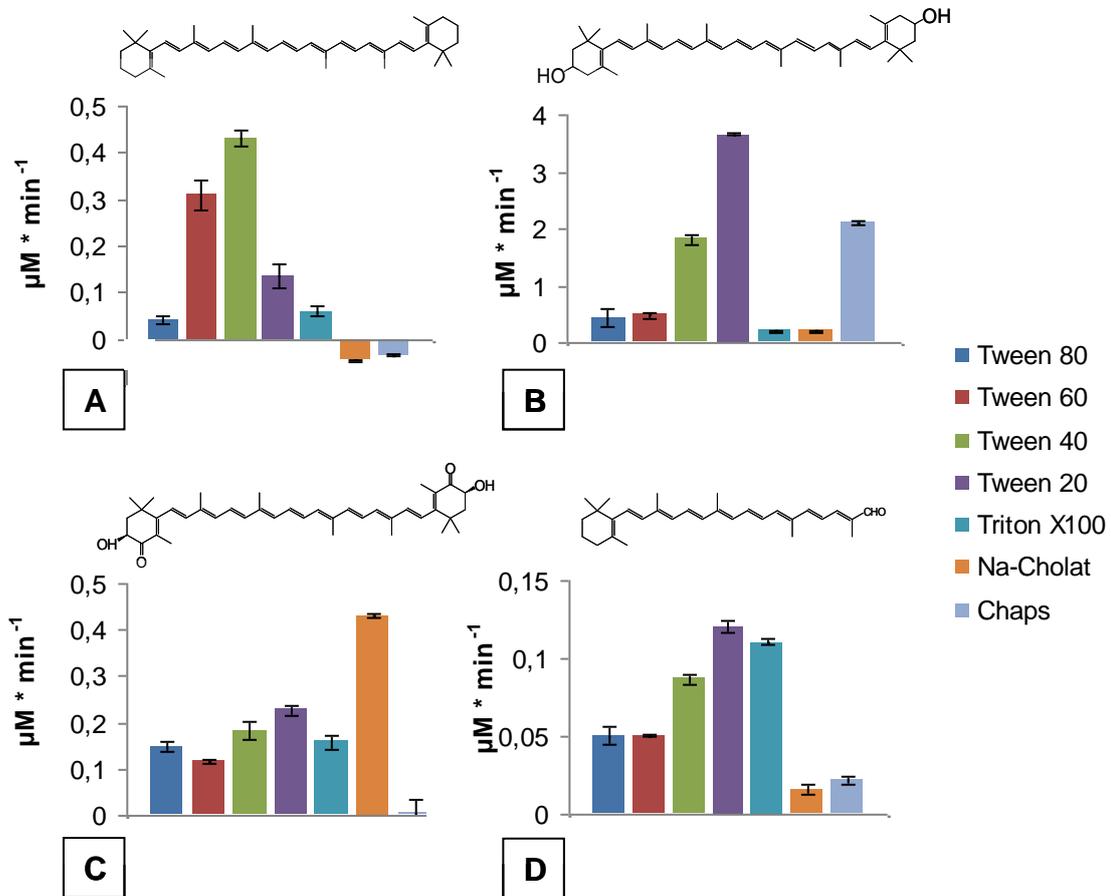


Abb. 13: Relativer Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten bei der Umsetzung von β -Carotin (A), Zeaxanthin (B), Astaxanthin (C) und 8'-Apo- β -carotin-8'-al (D) mit nativer AtCCD1. Eingesetzte Substratkonzentration: 4,8 μM . Tensidkonzentration: 80 mM (in allen Fällen oberhalb der CMC). Alle Proben eines Substrats wurden mit der selben Enzymlösung vermessen. Vergleich zwischen Werten, die mit verschiedenen Substraten gewonnen wurden, sind nicht möglich, da die eingesetzten Zellen aus der selben Charge stammten, jedoch getrennt aufgeschlossen und unterschiedlich lange gelagert wurden.

Die Ergebnisse in Abbildung 13 zeigen für jedes der getesteten Substrate ein unterschiedliches Spektrum von Tensiden, welche zur enzymatischen Umsetzung geeignet ist. Auch innerhalb der strukturell sehr ähnlichen Gruppe der Tween-Tenside bestehen für ein einzelnes Substrat mitunter sehr deutliche Unterschiede in der Eignung zur Vermittlung an AtCCD1 (Abb. 13 A,B).

Innerhalb der nichtionischen Tenside ist insbesondere das Ergebnis für Triton X-100 interessant. Während die Vermittlung von 8'-Apo- β -carotin-8'-al an AtCCD1 mit diesem Tensid sehr gut gelingt, werden β -Carotin und die Xanthophylle Zeaxanthin und Astaxanthin nicht beziehungsweise nur schlecht umgesetzt.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der HLB-Wert des Tensids für die Vermittlung der besonders hydrophoben bizyklischen Carotinoide entscheidend ist. Der HLB-Wert beschreibt das Verhältnis der Molmassen des hydrophilen und des lipophilen Anteils eines Moleküls. Die in Tabelle 3 dargestellten HLB-Werte von Tensiden der Tween-Serie sind mit 15 bis 16,7 höher als der von Triton X-100 mit 13,5. Der HLB-Wert ist unter anderem ein Indikator für die Hydrophobizitätsdifferenz zwischen dem hydrophoben Kern einer Mizelle und dem umgebenden Medium (Tadros, 2005). Die Daten zeigen, dass im untersuchten System ein HLB-Wert >15 notwendig ist, um besonders hydrophobe Substanzen wie bizyklische Carotinoide monomolekular zu solubilisieren. Mit einem $\log P$ (o/w) von 8,9 und 13,3 sind 8'-Apo- β -carotin-8'-al und Astaxanthin deutlich hydrophiler als die übrigen getesteten Substrate ($\log P$ (o/w) 14,8 bis 17,5) und können mit allen nichtionischen Tensiden monomolekular an AtCCD1 vermittelt werden.

Tab. 3: Physikalische Daten der auf Eignung zur Substratvermittlung untersuchten Tenside (Sigma Detergent Guide, Editon 2008).

Tensid	CMC [mM]	M_w	HLB	Typ
Tween 20	0,060	1228	16,7	nichtionisch
Tween 40	0,027	1277	15,6	nichtionisch
Tween 60	0,021	1309	14,9	nichtionisch
Tween 80	0,012	1310	15	nichtionisch
Triton X-100	0,55	625	13,5	nichtionisch
Na-Cholat	12	431	18	kationisch
CHAPS	6	615	10	zwitterionisch

In Fällen, in denen der HLB-Wert des eingesetzten Tensids nicht hoch genug war, um das carotinoide Substrat erfolgreich zu vermitteln, fand mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Ausbildung kristalliner Carotinoid-Nanopartikel statt. Tensidhaltige Dispersionen solcher Partikel können über lange Zeit stabil sein und zeichnen sich gegenüber einer monomolekularen Lösung durch eine charakteristische Veränderung im Absorptionsspektrum aus (Auweter et al., 1999). Die spektrale Veränderung äußert sich bei Carotinoiden durch einen Farbwechsel von gelb (monomolekular) zu rot (nanokristallin) und war in nicht umsetzbaren Tensid-Carotinoid-Kombinationen durchweg zu beobachten. In Abbildung 14 ist

beispielhaft ein mizellares Solubilisat von Astaxanthin in CHAPS (A) und Natrium-Cholat (B) abgebildet. Während Astaxanthin bei Vermittlung mit Natrium-Cholat - Mizellen zügig umgesetzt wurde (Abb. 13 C), fand bei Vermittlung mit CHAPS-Mizellen keine Reaktion statt. Die Ausbildung von Astaxanthin-Aggregaten ist übrigens auch für die charakteristische Farbänderung von Hummer während des Kochens verantwortlich (Buchwald und Jencks, 1968).



Abb. 14: Mizellare Solubilisate von 0,24 mM Astaxanthin in (A) CHAPS und (B) Natrium-Cholat. Tensidkonzentration 98 mM.

Während die Nanokristallisation von Carotinoiden in der Getränkeindustrie von hohem Nutzen zur Einstellung von Farbeffekten ist, muss sie für die biokatalytische Umsetzung von Carotinoiden vermieden werden, da die Carotinoide in nanokristalliner Form nicht mehr für eine enzymatische Umsetzung durch AtCCD1 zur Verfügung stehen.

5.1.1.2 Reaktionsbeschleunigung durch Cosolventien: Einfluss der Tensidstruktur

Bei mizellarer Substratvermittlung an AtCCD1 kann die Reaktionsgeschwindigkeit gesteigert werden, indem wasserlösliche organische Cosolventien wie aliphatische Alkohole zum Reaktionsmedium gegeben werden. Die für die maximale Aktivierung notwendige Cosolvenskonzentration ist umgekehrt proportional zum $\log P$ (o/w) - Wert des eingesetzten Cosolvens (Schilling et al., 2007). Für ein detaillierteres Verständnis dieses Effektes ist es von Interesse, ob die Aktivierung durch Beeinflussung des Enzyms oder der mizellaren Substratvermittlungsvesikel geschieht. Führen graduelle Veränderungen auf Tensidseite zu einer Veränderung des Aktivierungseffektes, so muss dieser mizellseitig begründet sein. Um den Einfluss der Tensidstruktur auf die Aktivierung durch organische Cosolventien zu

untersuchen, wurde die nichtionische Tween-Tensidgruppe gewählt, deren Vertreter sich durch die Länge der hydrophoben Seitenkette (Tween 20 bis Tween 60) beziehungsweise durch eine Doppelbindung in der hydrophoben Seitenkette (Tween 80) unterscheiden (Abb. 15). Der hydrophile Kopf der Tenside besteht aus einem zufällig polymerisierten Polyoxyäthylen(20)-Sorbitan und ist in allen Fällen gleich. Um Vergleichbarkeit der Daten mit den publizierten Ergebnissen zu gewährleisten, wurde das Modellsubstrat 8'-Apo- β -carotin-8'-al eingesetzt. Die Substratkonzentration betrug 48 μM bei einem konstanten molaren Substrat/Tensid-Verhältnis von 1:338. Es wurde nicht modifizierte AtCCD1 eingesetzt und während des Zellaufschlusses kein Tensid zur Enzymsolubilisierung zugegeben. Abbildung 15 zeigt, dass die zur maximalen Aktivierung notwendige Cosolvenskonzentration mit der Länge der hydrophoben Seitenkette des Tensids ansteigt.

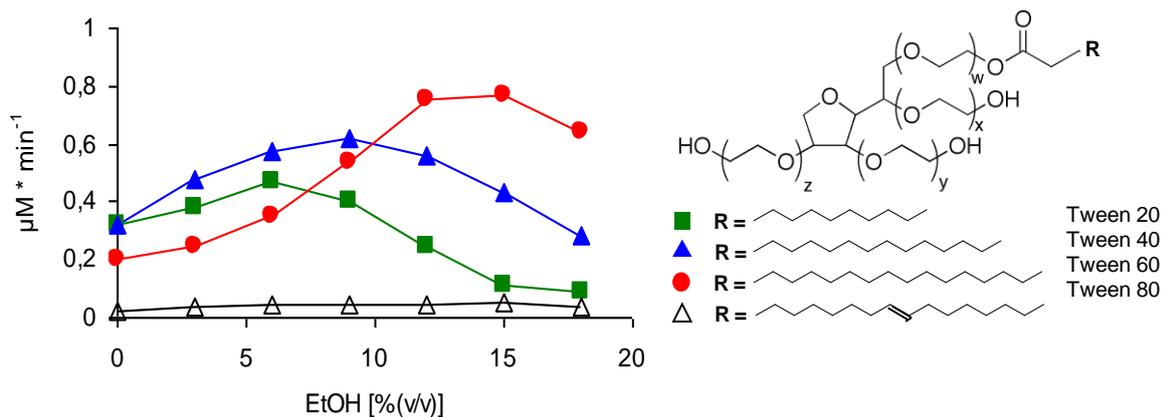


Abb. 15: Einfluss der Tensidstruktur auf die Beschleunigung der Carotinoidspaltung durch wasserlösliche organische Cosolventien. Substrat: 8'-Apo- β -carotin-8'-al. Enzym: AtCCD1 (nativ). Die Länge der hydrophoben Seitenkette von Tween-Tensiden bestimmt die Cosolvenskonzentration, bei der eine maximale Aktivierung stattfindet. Das Vorhandensein einer ungesättigten C-C-Bindung in der aliphatischen Seitenkette von Tween verhindert die Vermittlung des Substrates an das Enzym.

Das Vorhandensein einer Doppelbindung in der hydrophoben Seitenkette im Fall von Tween 80 verursacht, dass das Substrat kaum noch in umsetzbarer Form an AtCCD1 vermittelt werden kann. Der gegenüber Abbildung 13 D deutlichere Unterschied rührt aus einer zehnfach höheren Substratkonzentration in Abbildung 15 her. Für die Umsetzung von Zeaxanthin wurde der gleiche Effekt sowohl in Bezug auf den Einfluss der Länge als auch in Bezug auf den Einfluss der Sättigung

der hydrophoben Tensid-Seitenkette gemessen. Allerdings stieg die maximal erreichbare Aktivierung nicht linear mit der Länge der hydrophoben Seitenkette.

Die Daten untermauern die publizierte Hypothese (Schilling et al., 2007), dass die Aktivierung der Carotinoidumsetzung mit AtCCD1 aus nichtionischen Tensiden auf einer Umstrukturierung der Mizellen durch Zugabe des organischen Cosolvens beruht. Die Anwesenheit wasserlöslicher organischer Cosolventien erniedrigt die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Tensidmolekülen und erhöht die CMC (Carnero Ruiz et al., 2003). Infolge der erhöhten CMC sinkt die Aggregationszahl N_{agg} von Mizellen nichtionischer Tenside, und der Abstand des Substrates im hydrophoben Mizellkern von der Mizelloberfläche verringert sich (Bhattacharya und Palepu, 2004). Möglicherweise existiert ein für AtCCD1 optimaler Abstand des Substrates von der Vesikeloberfläche. Da Mizellen aus Tensiden mit längerer hydrophober Seitenkette einen größeren Durchmesser haben, müssen sie durch entsprechend höhere Konzentrationen organischer Cosolventien künstlich verkleinert werden, um den möglichen optimalen Abstand zwischen Substrat und Vesikeloberfläche zu erreichen. Eine Veränderung der Vesikeloberfläche selbst und eine dadurch veränderte Enzym-Mizell-Interaktion können nicht die Ursache für das Phänomen darstellen, da der hydrophile Tensidteil in allen Fällen gleich ist.

Die kommerziell vertriebene Form von Tween 80 stellt ein racemisches Gemisch der *cis*- und *trans*- Isomere dar. Der hydrophobe Kern einer aus ihnen gebildeten Mizelle ist offenbar anders beschaffen, so dass die Umsetzung von 8'-Apo- β -carotin-8'-al und Zeaxanthin aus diesen Mizellen nicht in signifikantem Maß möglich ist. Aus den veröffentlichten Daten zu CMC, Aggregationszahl, Mizelldurchmesser und Gibbs-Enthalpie der Mizellbildung (Glenn et al., 2005) lässt sich der zugrundeliegende Unterschied zu Tween 20, 40 und 60 nicht ablesen. Messungen zu Durchmesser und Abgrenzung des hydrophoben Kerns von Tween 80-Mizellen im Unterschied zu anderen Vertretern der Tween-Familie liegen bisher nicht vor.

5.1.1.3 Charakterisierung von Verzögerungsphasen bei mizellarer Vermittlung

Die Spaltung von Carotinoiden aus Mizellen nichtionischer Tenside durch AtCCD1 folgt nicht immer der Michaelis-Menten-Kinetik. Stattdessen tritt in manchen Fällen eine Verzögerung der Reaktion auf. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wird nicht bei der maximalen Substratkonzentration zu Anfang der Reaktion erreicht, sondern zu einem späteren Zeitpunkt (Schilling et al., 2008). Als Verzögerungsphase wird im Folgenden die Zeit $t_{\max v}$ bis zum Erreichen der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max} definiert. Bisher konnte nicht geklärt werden, ob das Auftreten solcher Verzögerungsphasen enzym- oder mizellseitig begründet ist, also auf einer Produktaktivierung von AtCCD1 durch den gebildeten C₁₇-Dialdehyd oder auf einer Umstrukturierung und verzögerten Penetration der Mizellen durch AtCCD1 beruht. Es existieren bisher kaum detaillierte Analysen solcher Effekte für andere Enzyme. Nur für den Einsatz von Phospholipasen mit reversen Mizellen wurden Verzögerungsphasen von bis zu 86 Minuten beschrieben und auf den Einfluss von Grenzflächenstruktur und -hydrophobizität hin untersucht (Yamazaki et al., 2004).

Die Hypothese einer Produktaktivierung durch den C₁₇-Dialdehyd konnte nicht direkt überprüft werden. Die Substanz ist in Reinform nicht zu beziehen und eine präparative Aufreinigung war aufgrund der Instabilität der Substanz nicht erfolgreich. Aus diesem Grund wurden Untersuchungen durchgeführt, um das Phänomen der Verzögerungsphasen zu charakterisieren und Hinweise zu erhalten, ob das Phänomen enzymseitig oder mizellseitig verursacht wird. Untersucht wurde der Einfluss von pH und organischen Cosolventien sowie das Auftreten von Verzögerungsphasen bei der Umsetzung von Xanthophyllen, deren Spaltung zur Bildung eines kürzeren C₁₄-Dialdehyds führt. Außerdem wurde untersucht, ob eine Carotinoid-Oxygenase aus *Mus musculus* (Bcmo2), die die gleiche Regiospezifität wie AtCCD1 aufweist, unter identischen Bedingungen ebenfalls Verzögerungsphasen zeigt.

Verzögerungsphasen sind bei enzymatischen Reaktionen sehr selten. Es musste deshalb sichergestellt werden, dass die Verzögerung nicht die Folge einer langsamen physikochemischen Gleichgewichtseinstellung bei der Mischung der Reaktionskomponenten ist. Bei Tween-Mizellen ändern sich durch Verdünnung und

Anwesenheit von Cosolventien zum Beispiel die CMC und die Aggregationszahl (Bhattacharya und Palepu, 2004). Die Dauer solcher Relaxationseffekte liegt üblicherweise unterhalb einer Minute, und sie sind als Ursache für die beobachteten Verzögerungsphasen sehr unwahrscheinlich (Patist et al., 2002). Um den Einfluss physikochemischer Prozesse auszuschließen, wurden alle Reaktionskomponenten außer der Enzymlösung vorab gemischt und temperiert. Bei sofortigem Start der enzymatischen Reaktion und nach dreißigminütiger Inkubation vor der Enzymzugabe traten keine Veränderungen des beschriebenen Verzögerungseffektes auf.

Auftreten von Verzögerungsphasen bei Umsetzung von Xanthophyllen mit AtCCD1 und der murinen Carotinoid-Oxygenase Bcmo2

Astaxanthin (36 μM) wurde bei 37°C aus Tween 40 - Mizellen (12 mM) in Mikrotiterplatten umgesetzt und der Reaktionsverlauf über die Abnahme der Substratabsorption wie in Abschnitt 6.3.3.1 beschrieben verfolgt. Alle Komponenten wurden vor der Messung auf 37°C temperiert. Die Pipettierung und Vermengung der Reaktionskomponenten erfolgte automatisch, um Mischeffekte zu vermeiden. AtCCD1 und Bcmo2 waren nicht modifiziert und wurden in Form von Zellextrakten eingesetzt. Als Negativkontrollen wurden Extrakte der entsprechenden Leervektor-transformierten Zellen eingesetzt. AtCCD1 zeigte bei Verwendung des Xanthophylls Astaxanthin als Substrat weiterhin die von Schilling beschriebene Verzögerungsphase, während Bcmo2 die höchste Reaktionsgeschwindigkeit zu Anfang der Reaktion erreicht (Abb. 16).

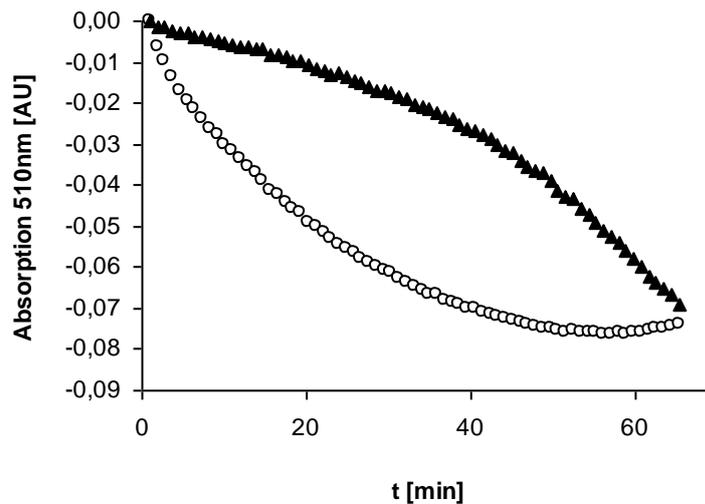


Abb. 16: Spaltung von Astaxanthin aus Tween 40 - Mizellen mit nicht modifizierter AtCCD1 (▲) und nicht modifizierter Bcmo2 (○). Carotinoidkonzentration: 38 μM . Tween 40 - Konzentration: 12 mM. Die Reaktion erfolgte bei 37°C nach automatischer Pipettierung und Vermengung, um Mischeffekte zu vermeiden. Alle Komponenten wurden vor der Reaktion auf 37°C temperiert.

Das Ergebnis zeigt, dass das Auftreten von Verzögerungsphasen bei der Umsetzung von mizellar vermittelten Carotinoiden spezifisch für das Enzym AtCCD1 ist. Der Effekt muss in einer direkten Veränderung des Enzyms oder in der AtCCD1-Mizell-Interaktion begründet sein. Eine direkte Wirkung auf AtCCD1 in Form einer Produktaktivierung durch gebildeten Dialdehyd ist unwahrscheinlich, da bei der Umsetzung von 8'-Apo- β -carotin-8'-al (Schilling et al., 2008) und dem hier eingesetzten Astaxanthin (Tab. 2) verschiedene Dialdehyde gebildet werden.

Einfluss von Cosolventien auf Verzögerungsphasen

Zu Verzögerungsphasen bei der Umsetzung von Carotinoiden aus nichtionischen Tensiden sind bisher nur wenige Einflussfaktoren bekannt: Das eingesetzte Tensid ist entscheidend für das Auftreten von Verzögerungsphasen und sowohl die Enzymkonzentration als auch die Substratkonzentration beeinflussen die Dauer der Verzögerungsphase (Schilling et al., 2008). In den publizierten Untersuchungen wurde die maximale Reaktionsgeschwindigkeit zwar zu unterschiedlichen Zeitpunkten, jedoch immer bei einem konstanten Anteil an umgesetztem Substrat von $17 \pm 2\%$ vorgefunden (Schilling, 2008). Die Messungen waren alle bei einer Cosolvenskonzentration von 10% (w/v) Ethanol durchgeführt worden. In der vorliegenden Arbeit wurden Messungen mit variabler Cosolvenskonzentration durchgeführt, um festzustellen, ob die eingesetzte Cosolvenskonzentration die

Dauer der Verzögerungsphase beeinflusst. Zeaxanthin ($48 \mu\text{M}$) in Tween 40-Mizellen (16 mM) wurde bei 37°C in 20 mM Tris pH 9,0 mit nativer AtCCD1 gespalten. Beim Zellaufschluss wurde kein Tensid zur Enzymsolubilisierung eingesetzt. Alle Komponenten wurden vor der Reaktion temperiert und die Messung bei 490 nm photometrisch in Mikrotiterplatten verfolgt. Um Mischeffekte zu vermeiden, erfolgten Pipettierung und Vermengung automatisch. Als Negativkontrollen wurden Extrakte von mit Leervektor transformierten und identisch kultivierten *E.coli*-Zellen eingesetzt. Die Bestimmung von $t_{\text{max } v}$ erfolgte durch Ermittlung der maximalen Steigung über 10 Datenpunkte (Zeitabstand 55 s) bei linearer Interpolation und nach Subtraktion des Reaktionsverlaufs der entsprechenden Kontrolle. Der Substratumsatz bei zum Erreichen v_{max} wurde bezogen auf die Anfangsabsorption der Probe bei 490 nm errechnet.

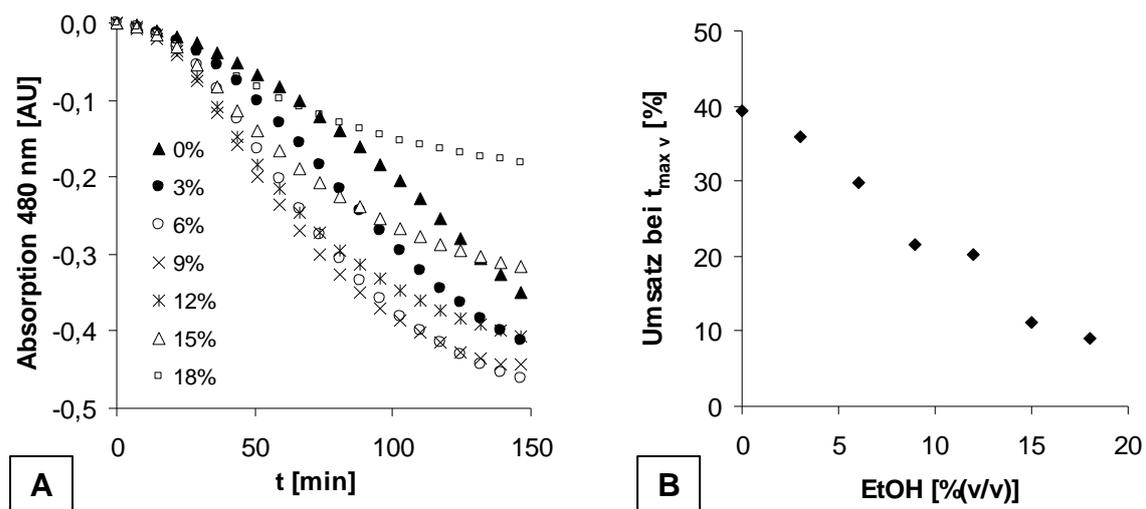


Abb. 17: A: Reaktionsverläufe für verschiedene Konzentrationen des organischen Cosolvens Ethanol. Umsetzung von Zeaxanthin ($48 \mu\text{M}$) in Tween 40-Mizellen (16 mM) durch nicht modifizierte AtCCD1 in 20 mM Tris pH 9,0 bei 37°C . Die Messung der Substratkonzentration erfolgte photometrisch bei 490 nm . B: Einfluss der Cosolvenskonzentration auf die Länge der Verzögerungsphasen bis zum Erreichen von $t_{\text{max } v}$ bei der Umsetzung von Zeaxanthin aus Tween 40 - Mizellen.

Die Dauer der Verzögerungsphase ist linear mit der eingesetzten Cosolvenskonzentration korreliert. Der Anteil an umgesetztem Substrat beim Erreichen der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit beträgt im Ethanol-freien Reaktionssystem ca. 39% und sinkt durch Zugabe von 18% (w/v) Ethanol nahezu linear auf 9% (Abb. 17). Die Gegenwart von organischen Cosolventien verursacht bei mizellaren Lösungen eine Reihe von Veränderungen, die als solvophobische

Effekte bezeichnet werden und offensichtlich das Phänomen der Verzögerungsphasen beeinflussen. Die zentrale Veränderung von Mizellen in Gegenwart von organischen Cosolventien ist die Erhöhung des Reichardt-Parameters E_T , der ein Maß für die Polarität der Mizell-Grenzfläche darstellt (Moya et al., 2007). Die erhöhte Polarität verursacht im untersuchten System eine Verkürzung der Verzögerungsphase. Die Ursache für die Verkürzung könnte eine erleichterte Enzym-Mizell-Anlagerung sein. Bei einer statistischen Anzahl von 0,7 Substratmolekülen pro Mizelle stellen die initiale Anlagerung von AtCCD1 an eine Mizelle und der Wechsel zwischen Mizellen wichtige Einflussfaktoren für die Reaktionsgeschwindigkeit dar.

Einfluss des pH auf Verzögerungsphasen

Der pH-Wert einer Lösung beeinflusst Struktur und Größe von darin enthaltenen Mizellen. Sowohl die Aggregationszahl als auch die Hydratation pro Masseneinheit Tensid verringern sich mit ansteigendem pH (Bloor et al., 1970). Um einen möglichen Zusammenhang zwischen pH und Verzögerungsphasen bei der Umsetzung von Carotinoiden aus Mizellen zu identifizieren, wurden Umsätze bei verschiedenen pH durchgeführt und $t_{\max v}$ sowie der Anteil umgesetzten Substrats bei v_{\max} ermittelt. Astaxanthin (36 μM) wurde bei 37°C aus Tween 40 - Mizellen (12 mM) mit nativer AtCCD1 in Mikrotiterplatten umgesetzt und der Reaktionsverlauf über die Abnahme der Substratabsorption wie in Abschnitt 6.3.3.1 beschrieben verfolgt. Alle Komponenten wurden vor der Messung auf 37°C temperiert. Pipettierung und Vermengung der Reaktionskomponenten erfolgten automatisch. Es wurden Puffer gewählt, deren pKa-Werte maximal ± 1 vom zu puffernden pH-Wert abwichen. Die eingesetzten Puffer waren: Ethanolamin (pH 10,5 / 9,5), Tris (pH 9 / 8,5 / 8 / 7,5), BisTris (pH 6,5) und Acetat (pH 5,5 / 4,5). Die Pufferkonzentration betrug in allen Fällen 75 mM. Die durch Titration auf den Ziel-pH verschiedenen Gesamtionenstärken wurden durch Zugabe von Natriumchlorid auf den minimal möglichen Einheitswert von 150 mM angeglichen. Die Bestimmung von $t_{\max v}$ erfolgte durch Ermittlung der maximalen Steigung über 10 Datenpunkte (Zeitabstand 59 s) bei linearer Interpolation und nach Subtraktion des Reaktionsverlaufs der entsprechenden Kontrolle. Der Substratumsatz bis zum Erreichen von v_{\max} wurde bezogen auf die Anfangsabsorption der Probe bei 510 nm errechnet.

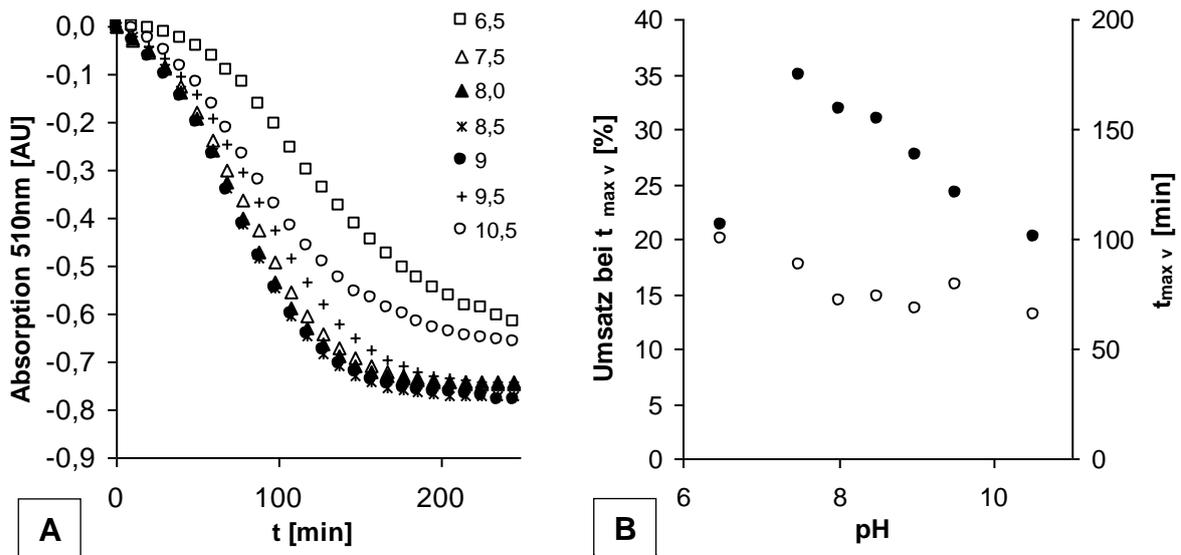


Abb. 18: A: Reaktionsverläufe für verschiedene pH bei der Umsetzung von 38 μM Astaxanthin aus Tween 40 - Mizellen (12 mM) mit AtCCD1 (nativ) bei 37°C. Pufferkonzentration: 75 μM , Gesamtionenstärke mit Natriumchlorid auf 150 mM eingestellt. Pipettierung und Vermengung automatisch, um Mischeffekte zu vermeiden.

B: Einfluss des pH-Wertes auf die kinetischen Verzögerungsphasen. Darstellung für zwei Bezugssysteme: Zeit bis zum Erreichen der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (○) und Substratumsatz (●) bei Erreichen der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit.

Die Reaktionsverläufe zeigen, dass bei den untersuchten pH innerhalb des Messzeitraums keine wesentliche Denaturierung des Enzyms statt fand (Abb. 18 A). Stabilitätsuntersuchungen unterstützen die Beobachtung (Abschnitt 5.2.1.2). Mit Ausnahme der Kurve für pH 10,5 näherten sich alle Absorptionskurven asymptotisch dem Wert -0,8 an (volle Messdauer nicht dargestellt). Die Kurve für pH 6,5 näherte sich asymptotisch dem Wert -0,72. Alle Kurven weisen den sigmoidalen Verlauf einer Reaktion mit Verzögerungsphase auf. Mit zunehmend alkalischem pH verkürzt sich die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit leicht (Abb. 18 B). Der Anteil an umgesetztem Substrat bei Erreichen der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit verändert sich hingegen aufgrund unterschiedlicher Reaktionsgeschwindigkeiten deutlich und besitzt ein Maximum von 35% bei pH 7,5 (Abb. 18 B). Zu alkalischen pH hin verringerte sich der Anteil an umgesetztem Substrat bei Erreichen von v_{max} , während $t_{\text{max v}}$ nahezu konstant blieb. Da der pH-Wert die Aggregationszahl und damit den mittleren Mizelldurchmesser wie anfangs beschrieben beeinflusst, ist das beobachtete Optimum der Reaktionsgeschwindigkeit möglicherweise in einem optimalen Mizelldurchmesser begründet. Der Abstand des carotinoiden Substrats von der

Mizelloberfläche wird durch den Mizelldurchmesser bestimmt. Möglicherweise besteht in Analogie zum Einfluss der Tensidstruktur (Abschnitt 5.1.1.2) ein für AtCCD1 optimaler Abstand des Substrates von der Vesikeloberfläche. Die von Schilling (2008) publizierte Konstanz des Anteils an umgesetztem Substrat bei Erreichen von v_{\max} gilt nur bei konstantem pH. Aus kinetischer Sicht ist die Reaktionsführung bei pH-Werten zwischen 7,5 und 8,5 sinnvoll, da hier eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit bis in Bereiche >30% Substratumsatz erzielt wird.

5.1.1.4 Kinetische Untersuchung der Umsetzung von β -Carotin aus Mizellen

Maximale Solubilisierungskapazität von Tween 40 - Mizellen für β -Carotin

Die enzymatische Carotinoidspaltung ist im technischen Einsatz in aller Regel substratlimitiert, weil eine Reaktionsführung in organischem Lösungsmittel mit Carotinasen bisher nicht möglich ist und Substratvermittlungsvesikel nur begrenzte Konzentrationen von Carotinoiden monomolekular solubilisieren können. Für eine effiziente Biokatalyse ist es deshalb wichtig, die maximale Kapazität des eingesetzten Substrat-Vermittlungssystems zu kennen. Für die biokatalytische Herstellung von β -Ionon aus β -Carotin mittels AtCCD1 wurden Tween 40 - Mizellen als am besten geeignete Substratvermittlungsvesikel ermittelt. Die Bestimmung des maximalen molaren Verhältnisses von β -Carotin zu Tensid, bei welchem noch stabile Mizellen gebildet werden, erfolgte bei Bedingungen der enzymatischen Reaktion. Bei konstanter Tensidkonzentration von 16 mM in 50 mM Tris pH 8,5 (Gesamtionenstärke 146 mM) wurde die solubilierte Konzentration von β -Carotin variiert und nach 24 Stunden Lagerung bei 25°C das Auftreten von Präzipitation optisch und durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm bestimmt. Unter den beschriebenen Bedingungen können stabile Mizellen bis zu einem molaren Verhältnis von β -Carotin zu Tween 40 von 1 : 11,8 gebildet werden.

Bestimmung der kinetischen Parameter K_M und v_{MAX}

Die Bestimmung der kinetischen Parameter erfolgte durch Messung der erzielten Reaktionsgeschwindigkeit bei verschiedenen Substratkonzentrationen bei einem Substrat/Tensid-Verhältnis kleiner 1:11,8. Die Messungen erfolgten mit GST-fusionierter AtCCD1, da diese Modifikation für den Einsatz in einer Demonstrationsanlage am besten geeignet ist (Abschnitt 5.2.1.3). Die Messungen

wurden bei 37°C und konstanter Tensidkonzentration von 16 mM in 50 mM Tris pH 8,5 (Gesamtionenstärke 146 mM) durchgeführt. Die Veränderung der Reaktionsgeschwindigkeit mit der Substratkonzentration zeigt den erwarteten Verlauf (Abb. 19 A). Zur Bestimmung der kinetischen Parameter wurden die Datenpunkte nach der Methode von Hanes aufgetragen und eine lineare Interpolation durchgeführt (Abb. 19 B).

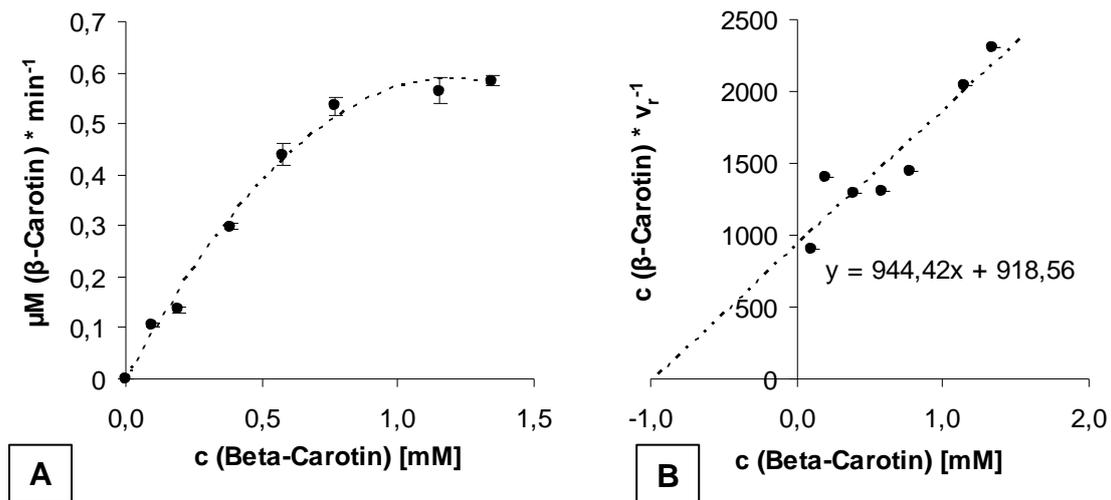


Abb. 19: Bestimmung der enzymkinetischen Parameter K_M , k_{CAT} und v_{MAX} für die Umsetzung von β -Carotin aus Tween 40 - Mizellen durch GST-AtCCD1 in 50 mM Tris pH 8,5 bei 37°C. Die Verfolgung der Reaktion erfolgte photometrisch bei 490 nm in Mikrotiterplatten. Alle Reaktionsansätze wurden gleichzeitig und mit der selben Enzymcharge vermessen. Alle Messungen wurden dreifach durchgeführt. A: Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit über der Substratkonzentration. B: Hanes-Plot ($c_s \cdot v_r^{-1}$ über c_s) der Daten in A und linearer Fit durch die Datenpunkte. Der Korrelationskoeffizient R^2 betrug 0,87.

Anhand der Geradengleichung konnten erstmals die kinetischen Parameter für die Umsetzung von mizellar dargereichtem β -Carotin durch AtCCD1 bestimmt werden: $K_M = 0,97 \text{ mM}$, $k_{CAT} = 0,62 \text{ min}^{-1}$ und $v_{MAX} = 1,06 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$. Der Vergleich der kinetischen Parameter des eingesetzten Reaktionssystems mit anderen industriell eingesetzten Enzymprozessen zeigt, dass die Spaltung von β -Carotin in β -Ionon durch AtCCD1 trotz aller erzielten Verbesserungen langsam abläuft.

5.1.2 Liposomen

Liposomen können in Bezug auf den Durchmesser und die Anzahl übereinander liegender Lipiddoppelschichten sehr verschieden sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein definierter Typ von Liposomen untersucht: Unilamellare Liposomen mit einem maximalen Durchmesser von 300 nm. Die Beschränkung auf unilamellare Liposomen erfolgte aufgrund des Einsatzes als Substratvermittlungsvesikel. Bei multilamellaren Liposomen (*multilamellar vesicles*, MLV) steht nur das in der äußersten Lipiddoppelschicht solubilisierte Substrat für eine enzymatische Umsetzung durch AtCCD1 zur Verfügung, bei unilamellaren Liposomen hingegen das gesamte Substrat. Die Beschränkung auf Liposomen mit niedrigem Durchmesser ist bedingt durch die eingesetzte Analysetechnik. Um eine hohe Anzahl von Zeitreihen-Untersuchungen mit entsprechenden Kontrollen in Drei- oder Vierfachbestimmung durchführen zu können, mussten die Liposomenlösungen transparent und in 96-Well-Mikrotiterplatten photometrisch vermessbar sein. Nur Liposomen mit einem Durchmesser < 300 nm bilden transparente Lösungen und erlauben eine photometrische Verfolgung der Carotinoid-Spaltungsreaktion (Taylor et al., 2005).

5.1.2.1 Herstellungsverfahren für transparente Liposomenlösungen

Im Vergleich zu Tensidmizellen sind das physikochemische Verhalten und die Handhabung von Liposomen deutlich komplizierter, da sie sehr unterschiedliche Strukturen ausbilden können und thermodynamisch nicht stabil sind (Deems, 2000, Sackmann und Feder, 1995). Um die Eignung von Liposomen zur Substratvermittlung an AtCCD1 zu untersuchen, musste ein Verfahren zur reproduzierbaren Herstellung transparenter unilamellarer Liposomen mit definiertem Carotinidgehalt gefunden werden. Die einzelnen Schritte des Herstellungsverfahrens sind in Abschnitt 6.3.2.2 beschrieben. In diesem Kapitel sollen Eigenschaften des Herstellungsverfahrens beschrieben und einige praktische Hinweise zur erfolgreichen Herstellung carotinoidbeladener Liposomen gegeben werden.

Die Herstellung von Liposomen mit der Filmmethode nach (Bangham, 1963) führt zu multilamellaren Vesikeln mit einer breiten Größenverteilung. Jedoch lassen sich die multilamellaren Vesikel durch Energieeintrag in unilamellare Vesikel umwandeln

(*large unilamellar vesicles*, LUV) und zu SUV (*small unilamellar vesicles*) verkleinern (Abb. 20). Gleichzeitig nimmt die Breite der Größenverteilung ab und mit ihr der Polydispersitätsindex der Suspension (Huang, 1969). Die Energiezufuhr kann mit verschiedenen Methoden erfolgen: Ultraschallbehandlung mit einer Sonotrode, Extrusion durch eine Membran oder Hochdruckhomogenisierung sind die häufigsten. Die Homogenisierung ist reproduzierbarer, erfordert aber deutlich größere Probenvolumina. Zudem ist die Variation des Leistungseintrags beim Einsatz von Homogenisatoren im kleinen Maßstab schwieriger. Die Extrusion führt zu einem Verlust von Phospholipid und Carotinoid in der Extrusionsmembran. Aus diesem Grund erfolgte die Umwandlung von MLV in ULV in den dargestellten Untersuchungen mittels Ultraschall.

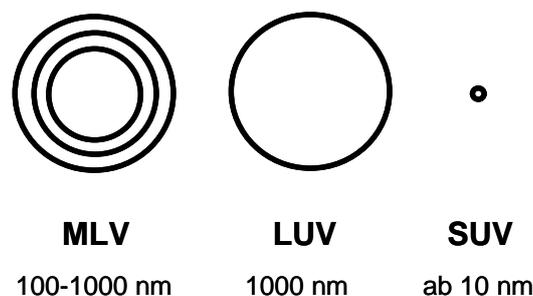


Abb. 20: Schematische Darstellung von Struktur und Größenordnung multi- und unilamellarer Vesikel.

Der minimal notwendige Leistungseintrag zur Herstellung monolamellarer Liposomen wurde untersucht. Dazu wurden Proben einer nicht carotinoidhaltigen Liposomenlösung nach unterschiedlichen Beschallungszeiten entnommen und ihre Partikelgrößenverteilung mittels dynamischer Lichtstreuungsmessung (*dynamic light scattering*, DLS) untersucht. Die Sonifizierung erfolgte bei einer Schalleistung von 50 W und Pulsen von 0,5 s mit Pausen von 1,5 s in einem auf 20°C temperierten Wasserbad. Die sonifizierten MLV bestanden aus 40 mol% Phosphatidylcholin und 60 mol% Phosphatidylethanolamin bei einer Gesamt-Lipidkonzentration von 150 µM. Der durchschnittliche Liposomendurchmesser verringerte sich durch den Eintrag der ersten 1,5 kJ * ml⁻¹ von 7380 auf 170 nm und nahm durch den Eintrag weiterer 10,5 kJ * ml⁻¹ weiter auf 96 nm ab (Abb. 21). Der Polydispersitätsindex p ist ein Maß für die Breite der Molmassenverteilung einer Partikelmenge. Er nahm nicht wie für die Sonifizierung von MLV erwartet ab, sondern blieb konstant um 0,5.

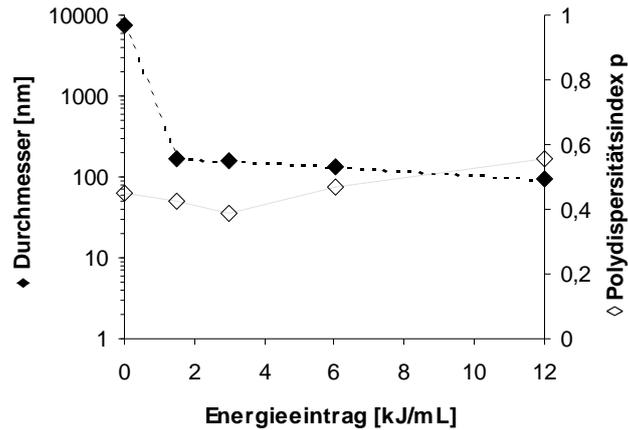


Abb. 21: Veränderung des durchschnittlichen Liposomendurchmessers (♦) und des Polydispersitätsindex (◇) mit der durch eine Ultraschall-Sonotrode eingetragenen Energie. Schalleistung: 50 W mit Pulsen von 0,5 s und Pausen von 1,5 s. Die Beschallung erfolgte in einem auf 20°C temperierten Wasserbad mit einer 150 µM Phospholipidlösung in 20 mM Tris pH 8,5 und einer Zusammensetzung von 40 mol% Phosphatidylcholin und 60 mol% Phosphatidylethanolamin.

Phospholipidmembranen können in zwei Aggregatzuständen vorliegen, in denen Carotinoide unterschiedlich gut lösbar sind: Geordnet und gelartig oder chaotisch und flüssigkristallin (Korger, 2005). Die Phasenübergangstemperatur T_m hängt vom Phospholipidtyp ab und steigt mit der Länge und dem Sättigungsgrad der Fettsäure (Szoka und Papahadjopoulos, 1980).

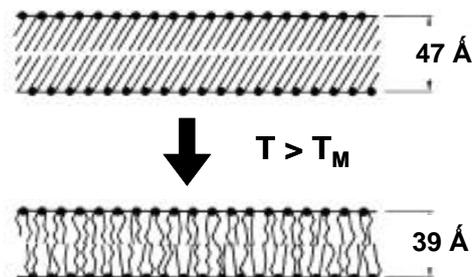


Abb. 22: Schematische Darstellung der Struktur einer Phospholipidmembran in den zwei Phasenzuständen gelartig und flüssigkristallin. Angegebene Schichtdicken gelten für reine Phosphatidylcholin-Membranen in Wasser (Korger, 2005).

Um Kristallisation der Carotinoide innerhalb der Lipidphase zu vermeiden, muss bei der Herstellung carotinoidhaltiger Liposomen darauf geachtet werden, dass die Temperatur stets deutlich oberhalb der Phasenübergangstemperatur des Phospholipidgemisches liegt (Korger, 2005). Dies gilt insbesondere während des Abdampfens des organischen Lösungsmittels bei der Filmbildung, wo die

Verdampfungsenthalpie den entstehenden Lipidfilm abkühlt. Darüber hinaus ist gegebenenfalls temperierte Pufferlösung bei der Lösung des Lipidfilms zu verwenden.

5.1.2.2 Einfluss der Phospholipid-Zusammensetzung

Um Carotinoide aus Liposomen umzusetzen, muss AtCCD1 diese aus der Membran der Vermittlungsvesikel beziehen. Dies geschieht vermutlich durch Anlagerung von AtCCD1 an die Liposomenoberfläche mittels einer hydrophoben Region auf der Enzymoberfläche (Abschnitt 3.2.3). Die in natürlichen Lipidmembranen am häufigsten auftretenden Phospholipide sind Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin. Der Einfluss der Lipidzusammensetzung von ULV auf die Eignung zur Vermittlung carotinoider Substrate an AtCCD1 wurde untersucht. Dazu wurden mit 0,5 mM β -Carotin oder 0,5 mM Zeaxanthin beladene ULV (Gesamtlipidkonzentration 2 mM) mit variabler Zusammensetzung aus Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin erzeugt. Als Ausgangsmaterial dienten hochaufgereinigte Phospholipide, die von der Firma Lipoid GmbH zur Verfügung gestellt wurden. Die erzielte Reaktionsgeschwindigkeit bei Umsetzung mit GST-fusionierter AtCCD1 wurde in Dreifachbestimmung photometrisch bei 490 nm gemessen. Die Reaktion fand bei 37°C in 50 mM Tris pH 8,5 statt. Für beide untersuchte Substrattypen existiert jeweils eine optimale Zusammensetzung von Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin. Für die Vermittlung von β -Carotin lag das Optimum bei 40 mol%, für die Vermittlung von Zeaxanthin bei 50 mol% Phosphatidylcholin (Abb. 23). Die verbleibenden Anteile bestanden jeweils nur aus Phosphatidylethanolamin. Mit steigendem Anteil an Phosphatidylcholin waren unterschiedliche Verläufe zu beobachten: Die Vermittlung des Xanthophylls Zeaxanthin gelang mit steigendem Phosphatidylcholin-Anteil unverändert gut, während die Vermittlung des hydrophoberen β -Carotin quasi-linear schlechter wurde und mit ULV aus reinem Phosphatidylcholin nicht mehr möglich war (Abb. 23).

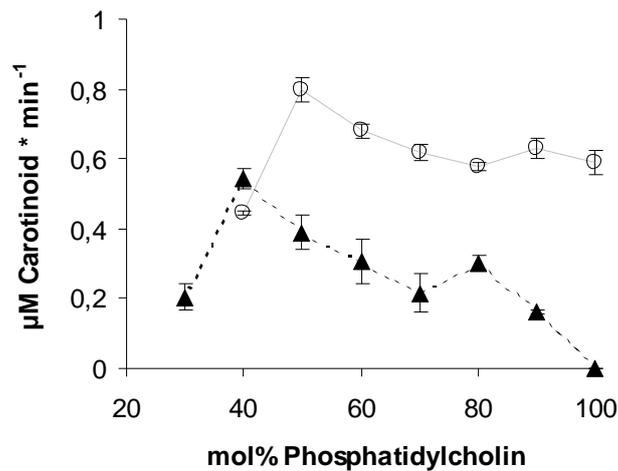


Abb. 23: Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Lipidzusammensetzung für die Spaltung von 0,5 mM β -Carotin (▲) und 0,5 mM Zeaxanthin (○) durch GST-AtCCD1. Die unilamellaren Liposomen bestanden aus Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin bei einer Gesamt-Lipidkonzentration von 2 mM in 50 mM Tris pH 8,5. Die Messung erfolgte bei 37°C und wurde in Mikrotiterplatten photometrisch bei 490 nm verfolgt. Kontrollen mit nicht carotinoidbeladenen Liposomen wurden mitgeführt und sind von den dargestellten Datenreihen abgezogen.

Die Verläufe der Reaktionsgeschwindigkeiten zeigen, dass eine geeignete Lipidzusammensetzung gewählt werden muss, um stark hydrophobe Substrate wie β -Carotin an Enzyme wie AtCCD1 zu vermitteln. Die Verwendung kommerziell erhältlicher, undefinierter Lipidgemische kann zu einem deutlich schlechteren Ergebnis führen, wie der Vergleich mit Literaturdaten zeigt (Schilling, 2008). Dort konnten bei der Umsetzung von liposomal vermitteltem β -Carotin mit AtCCD1 nur Spuren von β -Ionon per GC-MS nachgewiesen werden.

Das unterschiedliche Verhalten des Systems für β -Carotin und das polar substituierte Zeaxanthin beruht möglicherweise auf der unterschiedlichen Einlagerung dieser Moleküle in Lipiddoppelschichten. Xanthophylle lagern sich orthogonal zur Membran ein, durchspannen sie und wirken mit ihren polaren Kopfgruppen als „molekulare Niete“ (Strzalka und Gruszecki, 1994). Die Lipidmembran wird dadurch steifer (Gruszecki, 2004b). Das vollkommen unpolare β -Carotin wird dagegen oberflächenparallel in die hydrophobe Mitte der Lipiddoppelschicht eingelagert und verändert die Steifigkeit kaum (Socaciu et al., 2000). Für eine Umsetzung von β -Carotin muss AtCCD1 deshalb die Oberfläche der Lipiddoppelschicht penetrieren, was das unterschiedliche Verhalten bei Liposomen mit hohem Phosphatidylcholin-Anteil erklären könnte.

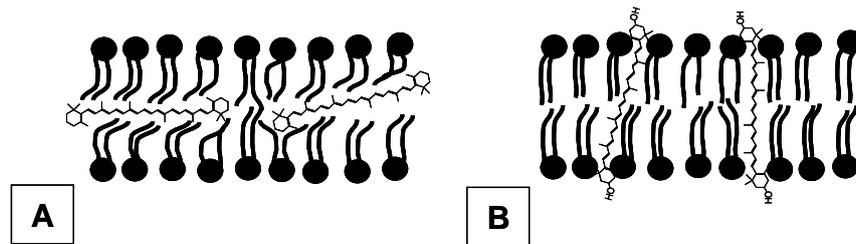


Abb. 24: Schematische Darstellung der Orientierung von β -Carotin (A) und Zeaxanthin (B) in Lipidmembranen.

Nicht mit allen Lipidzusammensetzungen war die Herstellung carotinoïd-beladener Liposomen möglich: Die Einlagerung stark hydrophober Substanzen in Liposomen destabilisiert diese und führt dazu, dass bei Einlagerung von β -Carotin unterhalb von 30 mol% Phosphatidylcholin und bei Zeaxanthin unterhalb von 40 mol% Phosphatidylcholin keine stabilen ULV mehr herstellbar sind.

5.1.2.3 Imitation der natürlichen Membrenumgebung durch Glycolipide

Anhand der Phospholipidzusammensetzung von Liposomen können die Membranen bestimmter Zellkompartimente nachempfunden werden. Dies erlaubt eine weitgehende Imitation der *in vivo*-Wirkumgebung von Proteinen. AtCCD1 befindet sich *in vivo* auf der cytoplasmatischen Seite der Chloroplastenmembran (Auldridge et al., 2006a). Charakteristisch für die Chloroplastenmembran in *Arabidopsis thaliana* ist ein hoher Gehalt an Glycolipiden, insbesondere dem in Abbildung 26 B dargestellten Monogalactosyldiacylglycerol (Dormann et al., 1999). Die Membranen der Chloroplastenfraktion von *Arabidopsis thaliana* enthalten rund 75 mol% Galaktolipide, wobei 21 mol% auf Digalactosyl- (DGDG) und 54 mol% auf Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) entfallen (Bonaventure et al., 2003). Im Gegensatz zu DGDG bildet MGDG in Lipiddoppelschichten invers hexagonale Strukturen aus (Latowski et al., 2002) (Abb. 25).

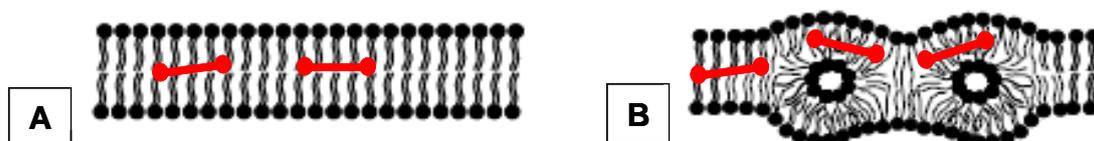


Abb. 25: Schematische Darstellung einer Phospholipid-Doppelschicht ohne (A) und mit (B) durch Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) gebildete invers hexagonale Strukturen (Latowski et al., 2002). Mögliche Einlagerungsorte von β -Carotin in den zwei Typen von Lipidmembranen sind schematisch dargestellt (rote Symbole).

Es wurden Untersuchungen mit dem Ziel durchgeführt, die natürliche Membranumgebung von AtCCD1 *in vitro* durch MGDG enthaltende Liposomen zu imitieren. Ziel war, eine erhöhte spezifische Aktivität von AtCCD1 zu erreichen. Hierzu wurden Liposomenlösungen mit einer Gesamt-Lipidkonzentration von 5 mM hergestellt, die verschiedene Anteile MGDG enthielten. Der verbleibende Anteil bestand gemäß den Ergebnissen aus Abschnitt 5.1.2.2 aus Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin im optimalen Verhältnis von 50:50 mol%. Die Liposomen enthielten 0,2 mM β -Carotin beziehungsweise Zeaxanthin und waren in 50 mM Tris pH 8,5 gelöst. Die Reaktion erfolgte mit GST-fusionierter AtCCD1, wurde bei 37°C durchgeführt und bei 490 nm photometrisch verfolgt. Entsprechende Negativkontrollen mit nicht carotinoidbeladenen Mizellen gleicher Zusammensetzung wurden mitgeführt und die Absorptionsverläufe von denen der Umsätze subtrahiert. MGDG-Anteile von mehr als 30 mol% wurden nicht getestet, da die Stabilität daraus gebildeter unilamellarer Vesikel zu gering war, um Verfälschungen sicher auszuschließen. Das liposomale Substratvermittlungssystem zeigte für das vollkommen unpolare Substrat β -Carotin erneut ein anderes Verhalten als für das Xanthophyll Zeaxanthin, welches an den endständigen Iononringen polare Substituenten trägt. Die volumetrische Aktivität von AtCCD1 bei der Spaltung von liposomal vermitteltem β -Carotin wurde durch MGDG-Anteile zwischen 10 und 20 mol% um etwa 70% erhöht (Abb. 26 A). Bei der Spaltung von Zeaxanthin verringerte sich die volumetrische Aktivität von AtCCD1 mit zunehmendem MGDG-Anteil konstant. Da in allen Reaktionsansätzen dieselbe Enzymlösung mit unbekannter Konzentration eingesetzt wurde, repräsentieren die Daten gleichzeitig auch die Veränderung der spezifischen Aktivität von AtCCD1 im jeweiligen System.

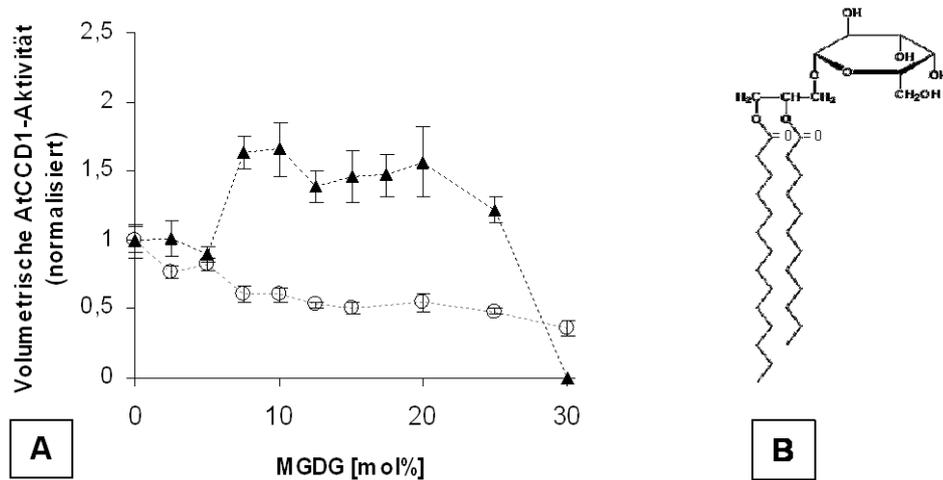


Abb. 26: A: Einfluss des Anteils von Monogalactosyl-Diacylglycerol (MGDG) auf die Eignung von unilamellaren Liposomen für die Substratvermittlung von β -Carotin (▲) und Zeaxanthin (o) an AtCCD1. Der Lipidanteil neben MGDG war zusammengesetzt aus 50 mol% Phosphatidylcholin und 50 mol% Phosphatidylethanolamin. Gesamt-Lipidkonzentration: 5 mM. Carotinoidkonzentration: 0,2 mM. B: Struktur des Glycolipids Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG)

Ein ähnlicher Effekt von MGDG wurde für das Enzym Violaxanthin-Deepoxidase beschrieben (Latowski et al., 2004), welches ebenfalls ein carotinoides Substrat besitzt, das mittels Liposomen an das Enzym vermittelt werden kann.

Die getesteten Substrate werden an verschiedenen Orten in die Lipiddoppelschicht eingelagert. Es wurde daher die Hypothese formuliert, dass der positive Effekt von MGDG auf die Vermittlung von β -Carotin an AtCCD1 auf einer Veränderung der räumlichen Lage des Substrates in Bezug auf das Enzym beruht. In den Regionen revers hexagonaler Struktur, die durch MGDG hervorgerufen werden, ist die Schichtdicke der Membran (Latowski et al., 2002) und damit auch der Abstand des in der Membranmitte eingelagerten β -Carotins zur Oberfläche verringert. Möglicherweise ist die Entfernung des Substrates zur Vesikeloberfläche für die Effizienz der Carotinoidspaltung durch AtCCD1 ausschlaggebend. Der fehlende Effekt auf die Umsetzung von Zeaxanthin kann mit dessen membrandurchspannender Orientierung begründet werden, die unabhängig vom Membranaufbau einen guten Zugang von AtCCD1 zum Substrat gewährleistet. Die Hypothese wäre in Übereinstimmung mit der Beschleunigung der Reaktion aus Mizellen durch organische Cosolventien, welche neben einer verringerten Grenzflächenpolarität eine Verringerung des Mizelldurchmessers hervorruft.

5.1.2.4 Einfluss der Carotinoideinlagerung auf Aggregation und Größenverteilung

Die Auswirkung von Carotinoideinlagerung in Phospholipidmembranen ist auf molekularer Ebene bereits beschrieben. Carotinoideinlagerung führt zu signifikanten Veränderungen der molekularen Ordnung, der Permeabilität und der molekularen Symmetrie der Lipidmembran (Socaciu et al., 2000, Socaciu et al., 2002). Um die Eignung von Liposomen als Substratvermittlungsvesikel für stark hydrophobe Carotinoide bewerten zu können, wurde der Einfluss der Carotinoideinlagerung auf makroskopischer Ebene untersucht. Dabei wurde wieder zwischen den Effekten durch Einlagerung von mäßig hydrophoben Xanthophyllen und Effekten durch Einlagerung von stark hydrophobem β -Carotin unterschieden.

Für beide Carotinoidtypen sowie für nicht beladene Liposomen wurde mittels dynamischer Lichtstreuungsmessung (DLS) der erreichte Durchmesser der ULV sowie die Aggregationsneigung gemessen. Die erhaltenen Daten wurden durch rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen abgesichert. Die untersuchten ULV bestanden aus 90 mol% Phosphatidylcholin und 10 mol% Phosphatidylethanolamin bei einer Gesamt-Lipidkonzentration von 5 mM und einer Carotinoidkonzentration von 0,2 mM in 50 mM Tris pH 8,5 I = 146 mM. Die eingetragene Energiemenge bei der Sonifizierung betrug $12 \text{ kJ} \cdot \text{ml}^{-1}$ mit einer Zeitdifferenz bis zur DLS-Messung von 15 min. Um Störungen durch Schwebstoffe zu vermeiden, wurden die ULV-Lösungen vor der DLS-Messung 3 min bei 16 000 g zentrifugiert.

Die Einlagerung von β -Carotin veränderte den durchschnittlichen ULV-Durchmesser wie erwartet kaum: Liposomen ohne Carotinoid besaßen einen durchschnittlichen Durchmesser von 18 nm, Liposomen mit eingelagertem β -Carotin 19 nm (Abb. 27). Die Versteifung von Lipidmembranen durch Xanthophylle aufgrund ihrer Orientierung orthogonal zur Membranfläche („molekulare Niete“) wirkt sich hingegen deutlich auf den erhaltenen Liposomendurchmesser aus: Er war bei gleichem Energieeintrag um den Faktor 2,3 erhöht und betrug durchschnittlich 44 nm.

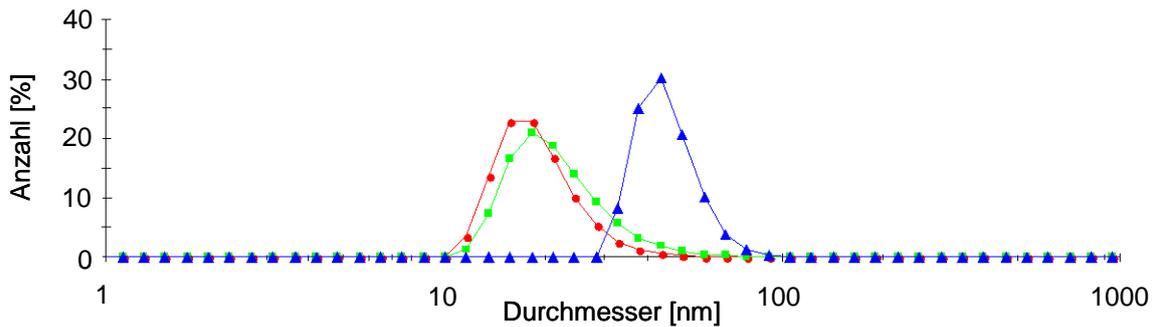


Abb. 27: Größenverteilung der unilamellaren Liposomen in Abhängigkeit von der Carotinoideinlagerung. Ohne Carotinoid: rot (●). 0,2 mM Zeaxanthin: blau (▲). 0,2 mM β -Carotin: grün (■). Gesamt-Lipidkonzentration 5 mM (90 mol% Phosphatidylcholin, 10 mol% Phosphatidylethanolamin). Größenverteilung berechnet nach Signalanzahl.

Nicht nur in Bezug auf die erhaltene Größe sondern auch in Bezug auf die Stabilität der Liposomen rufen β -Carotin und das Xanthophyll Zeaxanthin unterschiedliche Effekte hervor. Die Einlagerung von β -Carotin in die Phospholipid-Doppelschicht reduzierte die Stabilität der hergestellten SUV deutlich. Wenige Minuten nach der Sonifizierung setzte eine Aggregation zu größeren Vesikeln ein, während die Anzahl von SUV abnahm. Fünfzehn Minuten nach Sonifizierung waren zwei Peaks bei 45 nm und bei 350 nm in der Größenverteilung zu erkennen (Abb. 28). Dreiunddreißig Minuten nach Sonifizierung waren nahezu keine Liposomen mit Durchmessern um 45 nm mehr vorhanden. Es existierte eine sehr breite Verteilung von großen Vesikeln mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 800 nm. Mit Zeaxanthin beladene und nicht carotinoidbeladene Liposomen zeigten über den Messzeitraum keine Veränderung der Größenverteilung.

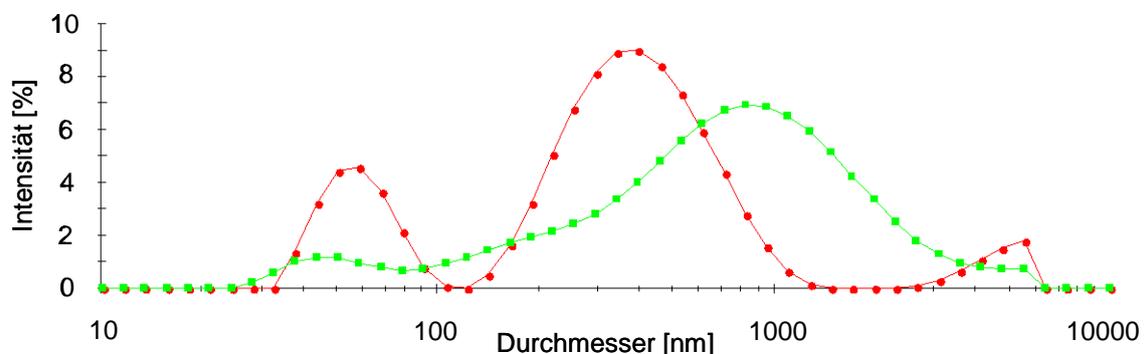


Abb. 28: Größenverteilung mit β -Carotin (0,2 mM) beladener unilamellarer Liposomen in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer. 15 min nach Sonifizierung: rot (●). 33 min nach Sonifizierung: grün (■). Gesamt-Lipidkonzentration 5 mM (90 mol% Phosphatidylcholin, 10 mol% Phosphatidylethanolamin). Größenverteilung berechnet nach Signalintensität.

Die mittels DLS gemessene Aggregation β -Carotin-haltiger Liposomen wurde durch zusätzliche elektronenmikroskopische Aufnahmen abgesichert. Stark verdünnte Liposomenlösungen wurden auf Aluminium-Probenträger getropft, bei 10°C vakuumgetrocknet und anschließend unter Vakuum lichtbogenkohlebedampft. Die Temperatur des Probenhalters blieb dabei unterhalb von 20°C. REM-Aufnahmen wurden sofort nach Herstellung der Proben durchgeführt. Für charakteristische Regionen der Probe wurde mittels energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) die Elementzusammensetzung bestimmt.

Sechzehn Minuten nach Sonifizierung β -Carotin enthaltender Liposomen waren sowohl einzelne SUV, als auch größere Vesikel zu erkennen (Abb. 28). Die mittels DLS gemessenen SUV mit 19 nm mittlerem Durchmesser würden bei der gewählten Vergrößerung etwa 0,5 mm groß abgebildet und sind als kleine helle Punkte auf der Trägeroberfläche zu erkennen. Die durch Aggregation entstandenen größeren Vesikel besaßen im REM-Bild einen Durchmesser von 300 bis 400 nm und entsprachen damit den DLS-Daten. Eine Stunde nach Sonifizierung waren bei gleicher Auflösung wesentlich mehr und größere aggregierte Vesikel zu erkennen (Abb. 28). In Übereinstimmung mit den DLS-Daten war die Größenverteilung breiter und besaß ein Maximum um 700 - 900 nm. Es waren wenige SUV als kleine helle Punkte zu erkennen.

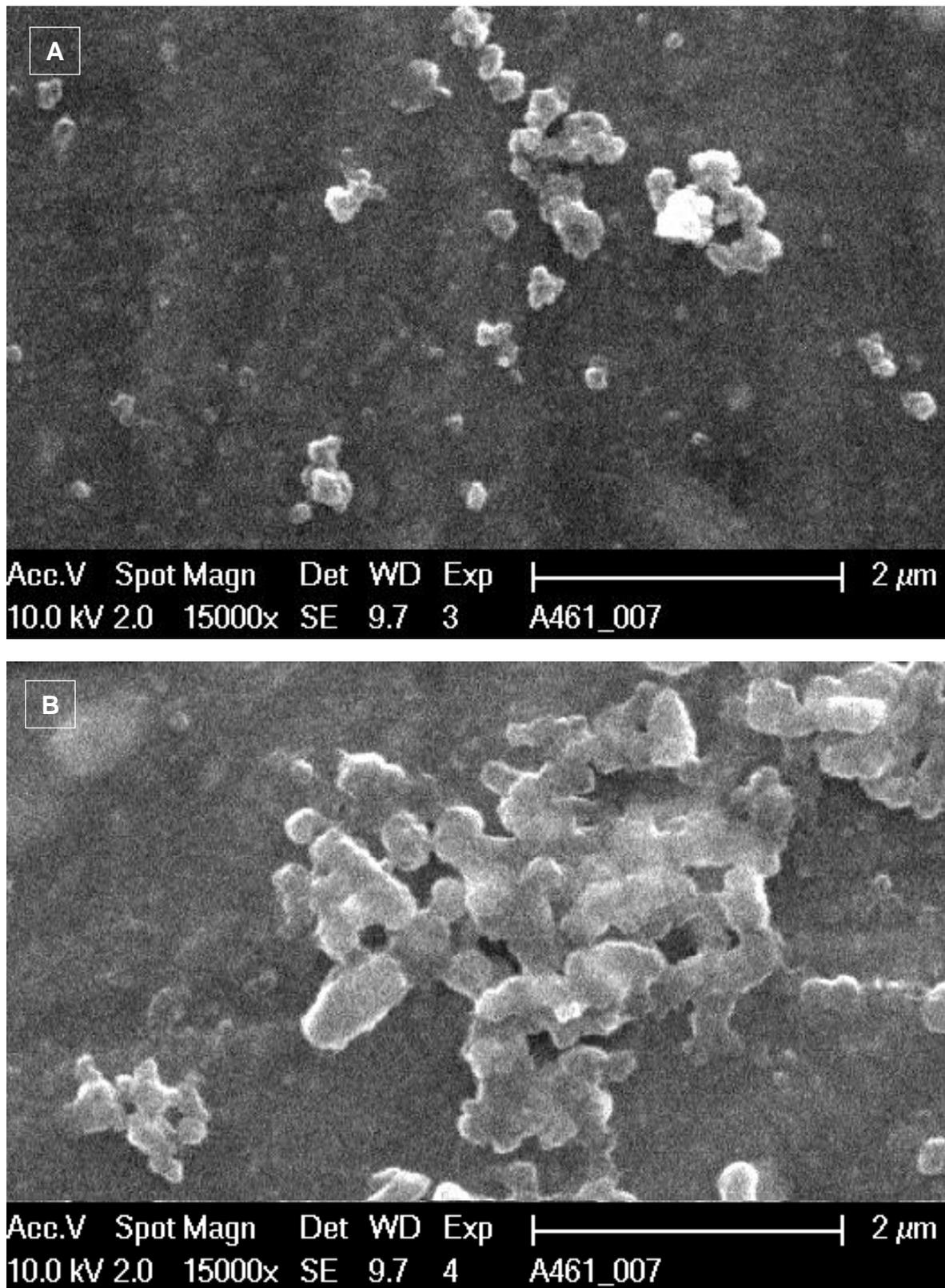


Abb. 29: REM-Aufnahmen von β -Carotin-haltigen Liposomen wahrend der Aggregation. (A): 15 min nach Sonifizierung. (B): 60 min nach Sonifizierung. Gesamt-Lipidkonzentration (90 mol% Phosphatidylcholin, 10 mol% Phosphatidylethanolamin): 5 mM. β -Carotin: 0,2 mM.

Eine schärfere Abbildung, insbesondere der SUV mit mittlerem Durchmesser um 20 nm war mit der verfügbaren Graphitstaub-Beschichtungstechnik nicht möglich. Um sicherzustellen, dass sowohl die kleinen hellen Punkte als auch die deutlich sichtbaren Strukturen Phospholipidvesikel darstellen, wurde ihre Elementzusammensetzung mittels EDX bestimmt. Nur in den beschriebenen Regionen wurde ein deutliches Phosphor-Signal erhalten. Alkalimetalle, wie sie für Salzkristalle charakteristisch sind, wurden in den Elementzusammensetzungen nicht vorgefunden.

5.1.2.5 Enzymkinetische Parameter für Carotinoideumsetzungen aus Liposomen

Das Enzym AtCCD1 weist eine hohe Substratpromiskuität auf und setzt neben verschiedenen funktionalisierten C₄₀-Carotinoiden auch Apocarotinoide mit niedrigerer Kettenlänge um. Der Umsatz verschiedener Carotinoide durch CCDs wurde in der Vergangenheit von verschiedenen Autoren zumeist qualitativ und stichprobenartig beschrieben (Auldridge et al., 2006b). Die Untersuchungen erfolgten zum Teil mithilfe von *in vivo* - Komplementationstests, teilweise aber auch *in vitro* bei mizellarer Substratvermittlung und unterschieden sich in Bezug auf die Temperatur und die Zusammensetzung der Reaktionslösungen deutlich. Im Jahr 2008 wurde erstmals eine geordnete quantitative Untersuchung der strukturellen Substratpräferenz von AtCCD1 *in vitro* im mizellaren System durchgeführt (Schilling, 2008). Die Untersuchung erfolgte mit einer Serie von Carotinoiden, die sich in Bezug auf die Funktionalisierung der endständigen Ionon-Ringe unterschieden und beinhaltete darüber hinaus auch ein asymmetrisches, apocarotinoides Substrat. Die Ergebnisse zeigten, dass bei mizellarer Substratvermittlung V_{MAX} einer Spaltung von C₄₀-Carotinoiden durch AtCCD1 mit dem Oxyfunktionalisierungsgrad zunimmt. Die Spaltung von β -Carotin konnte photometrisch nicht nachgewiesen werden. Der Umsatz des C₃₀-Apocarotinoids 8'-Apo- β -Carotin-8'-al erfolgte schneller als alle C₄₀-Carotinoide außer Astaxanthin. Der dieser Staffelung zugrunde liegende Mechanismus ist bisher unbekannt und kann im Enzym oder im mizellaren Substratvermittlungssystem begründet sein.

Um weitere Informationen über das kinetische Verhalten von AtCCD1 *in vitro* zu gewinnen, wurden mit der gleichen Serie von Carotinoiden die kinetischen Parameter K_M , k_{CAT} und V_{MAX} bei liposomaler Substratvermittlung ermittelt. Die

Reaktion erfolgte mit aufgereinigter, GST-fusionierter AtCCD1 und Liposomen aus reinem Phosphatidylcholin. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 4 dargestellt. Die Strukturformeln der Substrate sind in Abschnitt 5.1.1.1 dargestellt.

Tab. 4: Kinetische Parameter bei Umsetzung verschieden funktionalisierter C₄₀-Carotinoide beziehungsweise eines asymmetrischen C₃₀-Apocarotinoids aus Liposomen mit aufgereinigter GST-AtCCD1. Für alle Substrate wurde ein gleiches molares Carotinoid/Phospholipid-Verhältnis eingesetzt.

Substrat	K _M [μM]	V _{MAX} [μM*min ⁻¹]	k _{CAT} [min ⁻¹]
8'-Apo-β-carotin-8'al	19,3	0,13	0,016
Astaxanthin	14,6	0,36	0,044
Zeaxanthin	94,1	1,1	0,133
Canthaxanthin	11,3	0,02	0,002
β-Carotin	-	-	-

Die kinetischen Parameter zeigen eine gegenüber der Substratvermittlung mittels Mizellen veränderte Staffelung. Insbesondere das asymmetrische, verkürzte C₃₀-Substrat 8'-Apo-β-Carotin-8'-al wurde bei liposomaler Vermittlung wesentlich schlechter umgesetzt. Carotinoide werden in Phospholipidmembranen in Abhängigkeit von ihrer Struktur und Funktionalisierung unterschiedlich eingelagert (Milon et al., 1986, Strzalka und Gruszecki, 1994). Möglicherweise ist die veränderte Staffelung der kinetischen Parameter der Carotinoidserie in den unterschiedlichen Einlagerungsorten und -orientierungen der Carotinoide begründet. Die Umsetzung von β-Carotin konnte photometrisch nicht detektiert werden.

5.1.3 Nanoemulsionen

Nanoemulsionen stellen die dritte Vermittlungsform für Carotinoide dar, die untersucht wurde. Es wurden Präparate vom Typ NanoSolve der Firma Lipoid GmbH eingesetzt. Gegenüber Emulsionen mit größerem Partikeldurchmesser und konventionellen Nanoemulsionen zeichnen sie sich durch eine höhere Stabilität, beliebige Verdünnbarkeit in Wasser und insbesondere durch Transparenz im

sichtbaren Wellenlängenbereich aus. Transparenz und Verdünnbarkeit waren notwendige Voraussetzungen, um die Carotinoidvermittlung mit diesem System in Mikrotiterplatten photometrisch untersuchen zu können. Die Messung in Mikrotiterplatten war eine notwendige Voraussetzung für die Vermessung einer ausreichend hohen Anzahl an Replikaten bei quantitativen oder kinetischen Untersuchungen. Darüber hinaus erlauben Mikrotiterplatten die parallele Vermessung breiter Parameterfelder bei der Optimierung von Reaktionsbedingungen.

5.1.3.1 Kompatibilität verschiedener Puffer mit Nanoemulsionen

Nanoemulsionen können durch starke Änderungen des pH oder Veränderungen der Elektrolytkonzentration destabilisiert werden. Für die Umsetzung von 8'-Apo- β -carotin-8'-al und β -Carotin wurden bei AtCCD1 optimale pH-Werte von 7,5 (Schilling, 2008) respektive 8,5 (Abschnitt 5.2.1.1) ermittelt. Als optimale Puffer im mizellaren Reaktionssystem wurden für 8'-Apo- β -carotin-8'-al 100 mM PBS (Schilling, 2008) und für β -Carotin 20 mM Tris (Daten nicht dargestellt) ermittelt.

Die Stabilität der zur Verfügung stehenden NanoSolve-Präparationen mit 8'-Apo- β -carotin-8'-al und β -Carotin wurde für verschiedene Puffertypen und pH-Werte untersucht. Die Nanoemulsionen wurden mit dem jeweiligen Solvens auf 10% verdünnt und über 24 h bei 30°C gelagert. Puffer mit zweiwertigen Ionen wie Phosphat-basierte Puffer verursachten eine durch Trübung erkennbare Destabilisierung. Nicht destilliertes Leitungswasser führte ebenfalls zur Destabilisierung, während vollentsalztes Wasser für beliebige Verdünnungen verwendet werden konnte (Abb. 30). Puffer mit einwertigen Ionen wie Tris konnten bis 20 mM eingesetzt werden, ohne innerhalb von 24 Stunden Destabilisierung hervorzurufen. Alle Untersuchungen zur Verwendung von Nano-Solve-Präparaten wurden aus diesem Grund mit 20 mM Tris pH 8,0 durchgeführt.

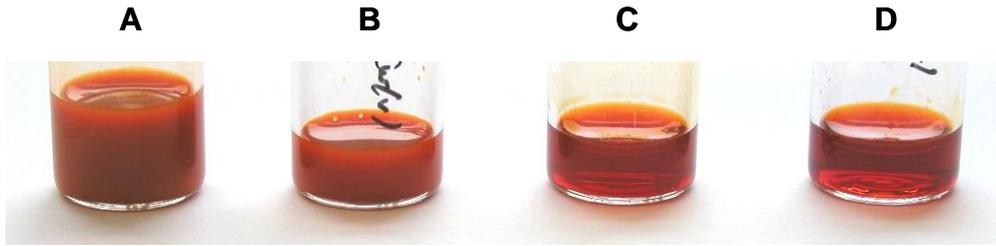


Abb. 30: Durch Trübung erkennbare Destabilisierung von auf 10% (v/v) verdünnter Nano-Solve-Präparation von 8'-Apo- β -carotin-8'-al durch verschiedene wässrige Lösungsmittel nach 24 h Lagerung bei 30°C. (A) 100 mM PBS pH 7,5. (B) Leitungswasser. (C) 20 mM Tris pH 7,5. (D) Vollentsalztes Wasser.

5.1.3.2 Umsetzung von Carotinoiden aus Nanoemulsionen

In der Literatur sind bisher keine Angaben darüber zu finden, ob CCDs in organischen Lösungsmitteln oder in Öl-in-Wasser-Emulsionen eingesetzt werden können. Es wurde deshalb untersucht, ob die Spaltung des Modellsubstrats 8'-Apo- β -carotin-8'-al und des Prozess-Substrats β -Carotin unter Verwendung von transparenten Nanoemulsionen (NanoSolve) möglich ist. Darüber hinaus wurde untersucht, ob die Beimischung von wasserlöslichen organischen Cosolventien eine Umstrukturierung der o/w-Emulsion verursacht, die analog zum mizellaren System zu einer erhöhten Reaktionsgeschwindigkeit führt.

Die Reaktion erfolgte mit Zellextrakt GST-AtCCD1 exprimierender *E.coli* in vollentsalztem Wasser bei 30°C und wurde photometrisch bei 510 nm (β -Carotin) und 535 nm (8'-Apo- β -carotin-8'-al) verfolgt. Als Kontrollen wurden Ansätze ohne Substrat und Ansätze mit Zellextrakt Leervektor-transformierter und identisch kultivierter Zellen mitgeführt. Der Zellaufschluss erfolgte ohne Tensid zur Solubilisierung des Enzyms. Die Absorptionsverläufe der Reaktionen wurden um die Absorptionswerte der Kontrollen rechnerisch korrigiert. Alle Reaktionen erfolgten parallel unter Verwendung der selben Enzymcharge.

Die Spaltung von 8'-Apo- β -carotin-8'-al aus Nanoemulsionen war möglich, verlief jedoch sehr langsam (Abb. 31). Die volumetrische Aktivität über die ersten 60 Minuten betrug $12 \mu\text{M} \cdot \text{h}^{-1}$ gegenüber $36 \mu\text{M} \cdot \text{h}^{-1}$ bei mizellarer Substratvermittlung, gleicher Enzymkonzentration und um 60% niedrigerer Substratkonzentration in der mizellaren Reaktion. Die Zugabe von wasserlöslichem organischem Cosolvens führte zu keiner Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit, jedoch zu einer geringfügig schnelleren Denaturierung des Enzyms. Die

enzymatische Spaltung von β -Carotin aus Nanoemulsionen war mit den eingesetzten Messmethoden nicht feststellbar (Abb. 31).

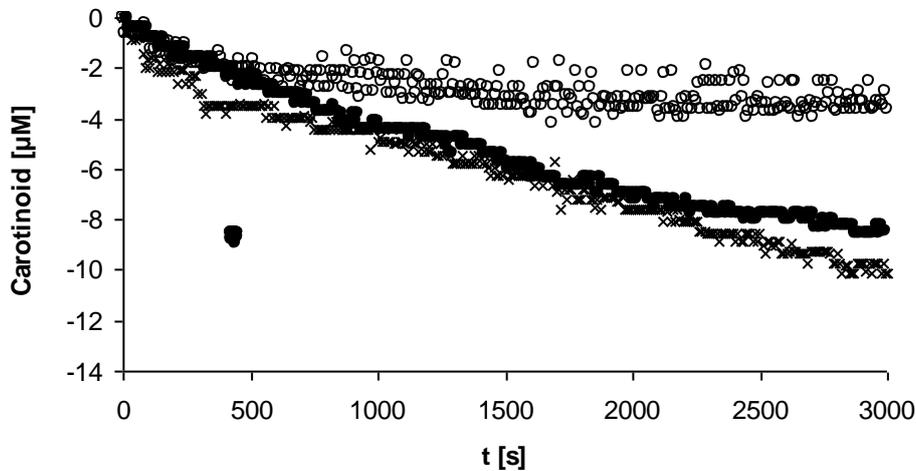


Abb. 31: Reaktionsverläufe der Umsetzung von Carotinoiden aus transparenten Nanoemulsionen (NanoSolve) mit GST-AtCCD1 und Effekt von organischem Cosolvens auf die Reaktionsgeschwindigkeit. (o) 120 mM β -Carotin; (●) 120 mM 8'-Apo- β -carotin-8'-al; (x) 120 mM 8'-Apo- β -carotin-8'-al mit 10 % (v/v) Ethanol. Reaktion bei 30°C, Vermessung photometrisch bei 510 nm (β -Carotin) und 535 nm (8'-Apo- β -carotin-8'-al). Kontrollen ohne Enzym sowie mit Zellextrakt von Leervektor exprimierenden Zellen wurden mitgeführt und verrechnet.

5.1.4 Vergleich der erzielten Reaktionsgeschwindigkeiten

Der Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten für die drei Substratvermittlungssysteme bei gleicher Substrat- und Enzymkonzentration war nur mit dem in allen drei Systemen umsetzbaren Modellsubstrat 8'-Apo- β -carotin-8'-al möglich.

Die Ergebnisse zeigen, dass mit den drei Vermittlungssystemen sehr unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeiten erzielt werden (Abb. 32). Die Substratvermittlung mittels Nanoemulsion führte mit $0,46 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ zu einer sehr langsamen Reaktion. Bei mizellarer Substratvermittlung wurde unter identischen Bedingungen mit $3,61 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ eine knapp achtmal höhere Reaktionsgeschwindigkeit erzielt.

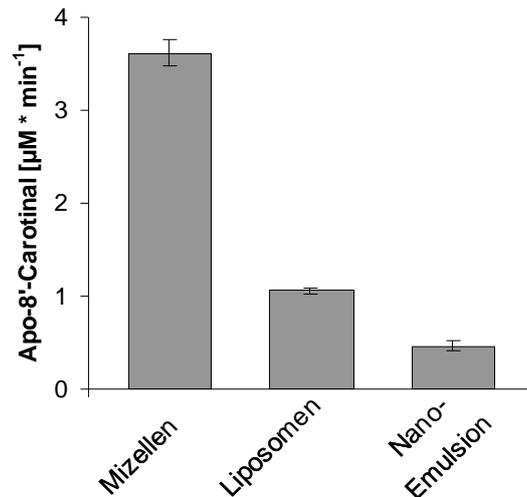


Abb. 32: Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten für die Spaltung von $144 \mu\text{M}$ 8'-Apo- β -carotin-8'-al mit AtCCD1 aus den drei untersuchten Substratvermittlungssystemen. Alle Reaktionen wurden parallel mit der selben Enzymcharge bei 30°C durchgeführt und bei 510 nm photometrisch verfolgt. Es wurden die für die Umsetzung von 8'-Apo- β -carotin-8'-al optimalen Parameter des jeweiligen Darreichungssystems gewählt. Mizellen: $0,1 \text{ \% (w/v)}$ Triton X-100, 10 \% (v/v) Ethanol. Liposomen: 100 mol\% Phosphatidylcholin, Nanoemulsion: Vorlösung in vollentsalztem Wasser. Reaktionspuffer: 20 mM Tris pH 8,8.

5.1.5 Zusammenfassung: Wahl des Substratvermittlungssystems

Für den Transfer in eine Demonstrationsanlage im Labormaßstab musste aus den getesteten Substratvermittlungssystemen das am besten geeignete ausgewählt werden. Ausschlaggebend war dabei die Eignung zur Vermittlung des besonders hydrophoben Zielsubstrates β -Carotin und nicht des Modellsubstrates 8'-Apo- β -carotin-8'-al, welches für einen kommerziellen Einsatz zu teuer ist.

Die Substratvermittlung durch Nanoemulsionen bietet gegenüber den anderen Verfahren den Vorteil, dass mit ihr die höchsten Carotinoidkonzentrationen monomolekular solubilisiert werden können. Die eingesetzten Nano-Solve-Präparate wiesen eine β -Carotin-Konzentration von 24 mM auf, während bei mizellarer Solubilisierung mit Tween 40 bisher ein maximales molares Verhältnis von β -Carotin zu Tween 40 von $0,085$ erreicht wurde (siehe Abschnitt 5.1.1.4). Bei einer realistischen maximalen Tensidkonzentration von rund 50 mM können in Tween 40-Mizellen nur rund $4,25 \text{ mM}$ und damit deutlich niedrigere β -Carotin-Konzentrationen solubilisiert werden. Jedoch wurde in mehreren Versuchen bei Substratvermittlung durch Nanoemulsionen keine biokatalytische 9,10-/9',10'-

Spaltung von β -Carotin, sondern nur von 8'-Apo- β -carotin-8'-al beobachtet. Die Möglichkeiten zur Variation der Reaktionsbedingungen sind bei Substratvermittlung mit Nanoemulsionen geringer als bei Mizellen oder Liposomen. Die Gründe hierfür sind einerseits die externe Herstellung der Nano-Solve-Präparate durch ein Unternehmen, andererseits zeigen Öl/Wasser-Emulsionen ein sehr komplexes Phasenverhalten (Orlich, 2000). Dieses setzt einer Veränderung der Reaktionsbedingungen ohne Destabilisierung der Emulsion enge Grenzen. Aus diesem Grund wurde die Substratvermittlung durch Nanoemulsionen für eine Demonstrationsanlage nicht in Betracht gezogen.

Liposomen stellen unter den getesteten Substratvermittlungsformen die beste Imitation der natürlichen Wirkumgebung von AtCCD1 dar. Das liposomale Substratvermittlungssystem ermöglichte in dieser Arbeit erstmals eine *in vitro*-Spaltung von β -Carotin. Die erzielten Reaktionsgeschwindigkeiten konnten durch Anpassung der Phospholipidzusammensetzung sowie durch Einbringung von Galaktolipiden in die Membran um etwa eine Größenordnung gesteigert werden. Im Vergleich zu Tensidmizellen sind das physikochemische Verhalten und die Handhabung von Liposomen jedoch deutlich komplizierter, da Liposomen sehr unterschiedliche Strukturen ausbilden können und thermodynamisch nicht stabil sind (Deems, 2000, Sackmann und Feder, 1995). Die Untersuchungen zur Eignung von Liposomen für die Vermittlung verschiedener carotinoider Substrate zeigten, dass gerade das langfristig angestrebte Substrat β -Carotin besonders ungeeignet für liposomale Vermittlung ist. Die Einlagerung dieses besonders hydrophoben Substrates in die Phospholipidmembran verursachte eine beschleunigte Aggregation und Koaleszenz der Liposomen.

Im Gegensatz dazu ermöglicht das mizellare Substratvermittlungssystem die höchsten Reaktionsgeschwindigkeiten und zeichnet sich in der Herstellung und Handhabung durch größere Robustheit aus. Ausgehend von den Erkenntnissen mit Liposomen konnte auch mit diesem Vermittlungssystem die biokatalytische Umsetzung von β -Carotin erreicht werden. Von allen untersuchten Substratvermittlungssystemen ist das mizellare am umfangreichsten charakterisiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zusätzliche Eigenschaften des mizellaren Systems beschrieben: Universell geeignete Tenside für die Vermittlung von

carotinoiden Substraten gibt es nicht. Für jedes Substrat wurde ein individuelles Spektrum an geeigneten Tensiden vorgefunden. Die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion kann vermittlungsseitig durch die Hydrophobizität des wasserbasierten Mediums gesteigert werden. Innerhalb einer Familie von strukturell ähnlichen Tensiden wurde der Einfluss von Länge und Sättigung der hydrophoben Tensidseitenkette auf die beschriebene Reaktionsaktivierung durch Cosolventien untersucht. Die Ergebnisse deuten auf die Existenz eines optimalen Abstands zwischen Vesikeloberfläche und dem Substrat im hydrophoben Kern hin. Enzymatische Umsetzungen von Xanthophyllen aus Mizellen weisen Verzögerungsphasen auf. Es konnte gezeigt werden, dass diese enzymspezifisch sind und dass ihre Dauer sowohl durch den pH-Wert als auch durch die Hydrophobizität des Mediums gesteuert werden kann.

Insgesamt erlaubt das mizellare System eine Variation der Reaktionsparameter in einem deutlich weiteren Rahmen als die anderen Vermittlungssysteme. Die Materialkosten und der Arbeitsaufwand für die Herstellung optimal gestalteter mizellarer Carotinoid-Solubilisate liegen deutlich unter denen für liposomale Carotinoid-Solubilisate. Aus den geschilderten Gründen wurde für den Demonstrationsprozess im Labormaßstab die Substratvermittlung mit Mizellen ausgewählt.

5.2 Enzymexpression und Enzymcharakterisierung

5.2.1 Stabilität und Aktivität von AtCCD1

Für einen effektiven Einsatz von AtCCD1 als technischer Biokatalysator ist eine genaue Kenntnis der Enzymeigenschaften notwendig. Dabei sind die Bedingungen für optimale Aktivität und Stabilität von besonderem Interesse. Zahlreiche Eigenschaften von AtCCD1 sind in den vergangenen Jahren untersucht und charakterisiert worden (siehe Abschnitt 3.2.3). Viele dieser Arbeiten wurden jedoch mit dem Modellsubstrat 8'-Apo- β -carotin-8'-al durchgeführt. Für die angestrebte biokatalytische Herstellung von β -Ionon aus β -Carotin ist es daher notwendig zu wissen, ob mit Modellsubstraten wie Apocarotinoiden oder Xanthophyllen gewonnene Daten auf die Umsetzung von β -Carotin übertragbar sind. Weiterhin müssen mögliche negative Einflüsse auf die Aktivität aufgrund von

Proteinmodifikationen zur Expressionsverbesserung überprüft und vermieden werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden daher folgende Untersuchungen bezüglich der Stabilität und Aktivität von AtCCD1 durchgeführt: Einerseits die Bestimmung des pH-Wertes für maximale spezifische Aktivität bei Umsetzung von β -Carotin sowie von Xanthophyllen, andererseits die Bestimmung der Stabilität des Enzyms unter Reaktionsbedingungen in Abhängigkeit vom pH-Wert. Außerdem wurden die Auswirkungen verschiedener N- und C-terminaler Modifikationen auf die erzielbare volumetrische Aktivität bei der Expression und auf die spezifische Aktivität von AtCCD1 gegenüber β -Carotin untersucht.

5.2.1.1 Aktivität in Abhängigkeit vom pH für verschiedene Substrate

Die spezifische Aktivität von AtCCD1 in Abhängigkeit vom pH-Wert wurde bereits für das Modellsubstrat 8'-Apo- β -carotin-8'-al, vermittelt durch Triton X-100-Mizellen, untersucht (Schilling, 2008). Für den Einsatz zur biokatalytischen Herstellung von β -Ionon aus β -Carotin muss überprüft werden, ob der Verlauf der spezifischen Aktivität für verschiedene pH bei Umsetzung des Prozesssubstrates sich ähnlich verhält wie bei Umsetzung des Modellsubstrates. Veränderungen des pH-Wertes können die Struktur des Substratkanals von Enzymen verändern und aufgrund elektrostatischer Abstoßung die Affinität zu stark hydrophilen oder hydrophoben Substraten beeinflussen (Tsai et al., 2002). Außerdem muss untersucht werden, ob das zur Umsetzung von β -Carotin benötigte Tensid Tween 40 für einen veränderten Zusammenhang von pH und Aktivität sorgt. Die Untersuchungen erfolgten gemäß Abschnitt 6.1.2.2 und 6.3.3 mit nicht modifizierter AtCCD1 bei einer Substratkonzentration von 48 μ M in 8 mM Tween 40 - Mizellen. Der pH-Wert bei maximaler spezifischer Aktivität ist für drei sehr verschieden hydrophobe Carotinoide aus Tween 40 - Mizellen gleich und beträgt 8,0 (Abb. 33). Für die Umsetzung von Apocarotinoiden aus Triton X-100-Mizellen ist ein optimaler pH von 7,0 publiziert (Schilling, 2008).

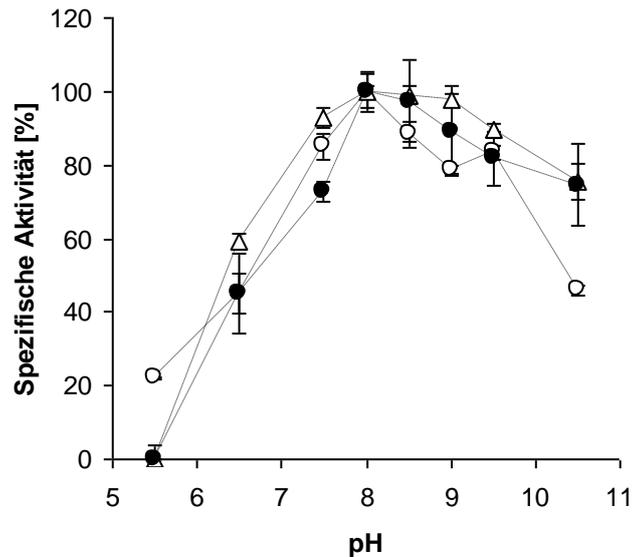


Abb. 33: Spezifische Aktivität von nicht modifizierter AtCCD1 in Abhängigkeit vom pH-Wert für drei unterschiedlich hydrophobe Substrate: β -Carotin (\bullet), Zeaxanthin (\circ) und Astaxanthin (Δ). Die Reaktion erfolgte bei einer Substratkonzentration von $48 \mu\text{M}$ bei Substratvermittlung in 8 mM Tween 40 - Mizellen.

5.2.1.2 Stabilität unter Reaktionsbedingungen in Abhängigkeit vom pH

Um eine hohe Volumen-Zeit-Ausbeute zu erzielen, ist es notwendig, einen biokatalytischen Prozess unter möglichst geringem zeitlichem Aktivitätsverlust zu führen. Für AtCCD1 wurden bereits verschiedene Lagerungsbedingungen im Hinblick auf Puffer und Tenside untersucht (Schilling, 2008). Ziel der hier dargestellten Untersuchungen war die Bestimmung der Stabilität von AtCCD1 in Abhängigkeit vom pH-Wert unter Reaktionsbedingungen (erhöhte Temperatur, Anwesenheit von Tensiden und Puffersalzen). Das Ergebnis sollte klären, ob der pH-Wert für maximale Stabilität unter Reaktionsbedingungen sich vom pH-Wert für maximale Aktivität gegenüber β -Carotin (Abschnitt 5.2.1.1) unterscheidet. Als Substrat wurde Astaxanthin gewählt, da damit innerhalb der Xanthophylle die stabilsten mizellaren Lösungen gebildet werden können. Die Untersuchung wurde mit nicht modifizierter AtCCD1 bei $48 \mu\text{M}$ Substratkonzentration in 8 mM Tween 40 - Mizellen durchgeführt. Die Lagerung erfolgte bei 20°C im entsprechenden Puffer (Abschnitt 6.1.2.2) bei einer Tensidkonzentration von 8 mM . Zur Reaktion wurden $40 \mu\text{L}$ Enzymlösung entnommen und mit $40 \mu\text{L}$ Puffer sowie $20 \mu\text{L}$ entsprechend höher konzentrierter mizellarer Substratlösung vermischt. Die Reaktion wurde photometrisch verfolgt, alle Komponenten wurden vor der Messung temperiert. Als Kontrollen dienten gleich inkubierte Zellextrakte Leervektor-exprimierender *E.coli*.

Die spezifische Aktivität ist in diesem Fall auf die Gesamtproteinkonzentration im Zellextrakt bezogen. Alle Proben wurden mit demselben Zellextrakt angesetzt. Die pH-Werte für maximale spezifische Aktivität und Stabilität unter Reaktionsbedingungen fallen zusammen (Abb. 34). Nach 222 Stunden Lagerung bei pH 8,0 in 50 mM Tris bei einer Gesamtionenkonzentration von $I_{GES} = 100 \text{ M}$ sind noch 52 % der spezifischen Aktivität von AtCCD1 erhalten.

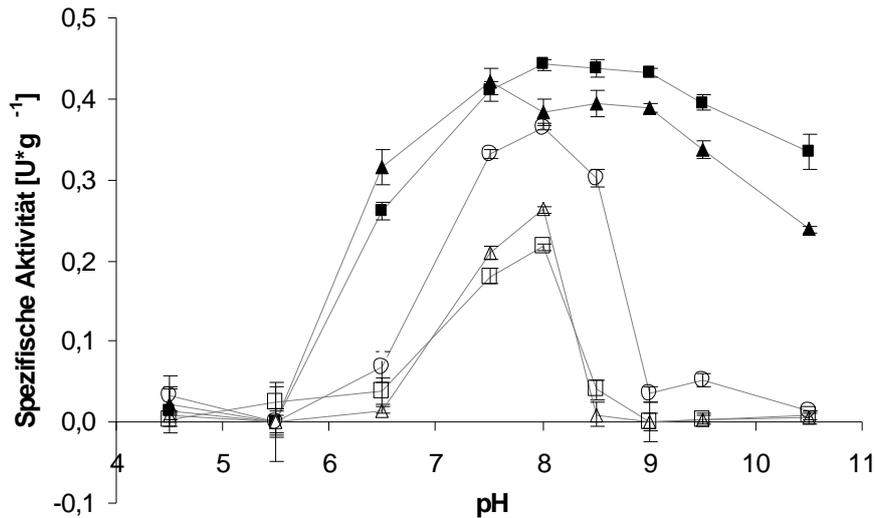


Abb. 34: Stabilität von nicht modifizierter AtCCD1 unter Reaktionsbedingungen in Abhängigkeit vom pH-Wert. Lagerungsdauer: 0h (■), 30h (▲), 145h (○), 172h (□) und 222h (△). Substratkonzentration: 48 μM in 8 mM Tween 40 - Mizellen. Lagerung bei 20°C im entsprechenden Puffer (Abschnitt 6.1.2.2) bei einer Tensidkonzentration von 8 mM.

5.2.1.3 Einfluss von Proteinmodifikationen auf die Aktivität

Die Fusion mit Polypeptiden zum Zweck der erleichterten Aufreinigung oder verbesserten Löslichkeit (Cabrita et al., 2006) kann zu reduzierten spezifischen Aktivitäten von Enzymen führen. Dieser Nachteil wird unter Umständen durch den erzielten Vorteil, zum Beispiel eine höhere Konzentration von löslichem Protein, überkompensiert (Schilling et al., 2007). Unter Verwendung des Modells substrats 8'-Apo- β -carotin-8'-al in Triton X-100-Mizellen wurde bereits gezeigt, dass die Fusion mit Glutathion S-Transferase (GST) oder dem Transkriptionsfaktor NusA zu deutlich verringerten spezifischen Aktivitäten führt. Im Fall von GST-AtCCD1 wurde jedoch eine deutlich gesteigerte volumetrische Aktivität festgestellt, die von einem erhöhten Anteil an löslich exprimiertem Enzym herrührt (Schilling et al., 2007). Die Substrate Zeaxanthin und β -Carotin stellen in den später untersuchten technischen

Substraten die Hauptcarotinoide dar und weisen eine vom Apocarotinoid deutlich verschiedene Größe und Hydrophobizität auf. Aufgrund dieser Unterschiede in den Substrateigenschaften besteht die Möglichkeit einer unterschiedlichen Interaktion, insbesondere mit sehr großen Fusionspartnern wie GST (26,3 kDa) und NusA (64,6 kDa). Es wurden Untersuchungen mit denselben AtCCD1-Modifikationen durchgeführt, um zu bestimmen, ob die Veränderung der AtCCD1-Aktivität durch Fusion für Zeaxanthin und β -Carotin anders ausgeprägt ist. Die eingesetzten Plasmide (Tab. 5) stammten aus dem vorangegangenen Projektabschnitt und waren ausgehend von einem Konstrukt (pGEX4T-1::AtCCD1) des Projektpartners (Prof. Wilfried Schwab, TU München, Biotechnologie der Naturstoffe) kloniert und durch Sequenzierung auf Richtigkeit geprüft worden.

Tab. 5: Eingesetzte Plasmide zur Überexpression verschiedener Modifikationen von AtCCD1 in *E. coli*.

Plasmid	Protein	N-terminal	C-terminal	M _w [kDa]
pET29a::AtCCD1nat	AtCCD1	-	-	60,9
pET29a::AtCCD1	AtCCD1-His6	S-Tag	His6	66,0
pGEX4T-1::AtCCD1	GST-AtCCD1	GST	-	87,2
pET43a::AtCCD1	NusA-AtCCD1	NusA	His6	125,5

Die Untersuchungen erfolgten bei Substratvermittlung durch 16 mM Tween 40 - Mizellen mit lysierten und zentrifugierten Zellextrakten. Die Gesamtproteinkonzentration in Zellextrakten wurde mittels Bicinchonin-Test ermittelt. Die Bestimmung der Enzymkonzentration erfolgte anhand SDS-PAGE und densitometrischer Analyse. Als Kontrolle wurden Extrakte von Zellen eingesetzt, die mit dem jeweiligen Leervektor transformiert und identisch kultiviert waren. Die Fusion mit großen Polypeptiden wie NusA und GST führte auch bei Umsetzung von Zeaxanthin und dem Zielsubstrat β -Carotin zu einer Verringerung der spezifischen Aktivität um rund 60 % (Abb.35 B). Aufgrund der Löslichkeitsverbessernden Wirkung war die Konzentration löslich exprimierten Enzyms mit diesen Fusionsproteinen jedoch deutlich höher (Abb. 35 A). Die Modifikation von AtCCD1 mit C- beziehungsweise N-terminalem Polyhistidin- und S-Tag führte bei nahezu unveränderter spezifischer Aktivität zu erhöhter

volumetrischer Ausbeute. Ursache ist möglicherweise die verbesserte Löslichkeit aufgrund der eingeführten hydrophilen Modifikationen.

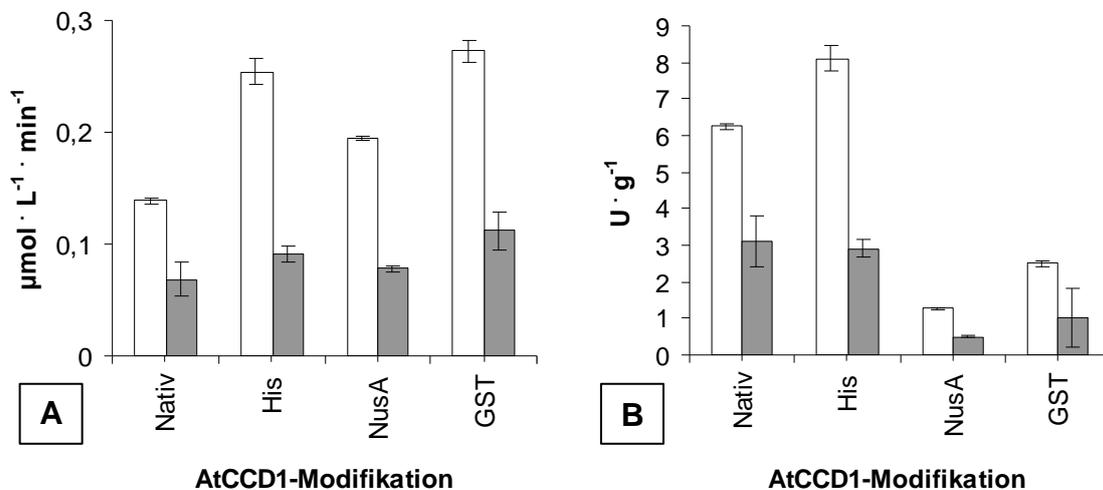


Abb. 35: Volumetrische (A) und spezifische (B) Aktivität verschiedener Modifikationen von AtCCD1 bei Umsetzung von 48 μM Zeaxanthin (weiß) und 48 μM β -Carotin (grau) aus 16 mM Tween 40 - Mizellen.

GST-AtCCD1 stellt für die biokatalytische Spaltung von β -Carotin in β -Ionon die am besten geeignete Modifikation dar, da bei Expression in *E.coli* die volumetrische Aktivität am höchsten ist. Der Einfluss von fusionierten Polypeptiden auf die Aktivität von AtCCD1 erwies sich als nahezu unabhängig von Größe und Hydrophobizität des Substrats.

5.2.2 Heterologe Expression unter Coexpression molekularer Chaperone

Die heterologe Expression von AtCCD1 in *E.coli* führt zu einem Anteil von über 90% teilweise oder ganz fehlgefaltetem Enzym, welches in aggregierter Form in Einschlusskörpern (*inclusion bodies*) vorliegt. Aufgrund der genetischen und biochemischen Einflussmöglichkeiten wird ein Wechsel des Expressionssystems häufig nicht angestrebt. Es existieren inzwischen zahlreiche Methoden, um den Anteil an fehlgefaltetem Protein bei der Expression in *E.coli* zu verringern (Baneyx, 1999, Sorensen und Mortensen, 2005). Zur Überexpression von AtCCD1 sind bisher nur wenige Arbeiten veröffentlicht worden. Schilling et al. (2007) konnten durch N-terminale Fusion des Enzyms mit löslichkeitsverbessernden Trägerproteinen wie dem Transkriptionsfaktor NusA oder Glutathion-S-Transferase (GST) eine deutliche Erhöhung der volumetrischen Aktivität im Kulturmedium um

ca. 100% erzielen. Dabei wurde eine verringerte molare Aktivität des Enzyms durch einen erhöhten Anteil an korrekt gefaltetem und löslichem Enzym überkompensiert. Durch Optimierung der Expressionsbedingungen konnten weitere Verbesserungen der spezifischen Aktivität erreicht werden, wobei insbesondere die Expressionstemperatur großen Einfluss auf die Faltungsqualität zeigte. Die funktionale Überexpression von AtCCD1 im eukaryotischen Expressionssystem *Pichia pastoris* gelang bisher nicht (Schilling, 2008).

Die Coexpression von molekularen Chaperonen stellt eine Möglichkeit dar, um bei Überexpressionen den Anteil korrekt gefalteter Zielproteine zu erhöhen (Fink, 1999). Aus diesem Grund wurden verschiedene Kombinationen von Chaperonen auf eine erhöhte volumetrische Aktivität der coexprimierten AtCCD1 oder deren Modifikationen untersucht. Nach Selektion einer geeigneten Chaperon-Kombination wurde die Coexpression mit AtCCD1 optimiert, um keine zellulären Ressourcen für die Expression überschüssiger Chaperone zu binden. Weiterhin wurde versucht, durch physiologischen Stress zelluläre Systeme zu aktivieren, die die Chaperonwirkung unterstützen. Zuletzt wurde untersucht, wie zuverlässig sich die Faltungsqualität von Passagierproteinen anhand der Aktivität damit fusionierter Trägerproteine (*tags*) beurteilen lässt.

5.2.2.1 Selektion der optimalen Chaperon-Kombination

Chaperone wirken durch sehr verschiedene Mechanismen und an sehr unterschiedlichen Punkten der Proteinbiosynthese. Bei zahlreichen Chaperonen ist bekannt, dass sie erst gemeinsam mit weiteren Chaperonen ihre Wirkung entfalten oder ihre Effizienz steigt (Nishihara et al., 1998, Nishihara et al., 2000). Es ist daher sinnvoll, Chaperone zur Verbesserung der Proteinüberexpression nicht nur einzeln, sondern in bewusst gewählten Kombinationen einzusetzen.

Aus diesem Grund wurden fünf Kombinationen von Chaperonen auf Verbesserung der spezifischen und volumetrischen Aktivität von verschiedenen AtCCD1-Modifikationen getestet. Die zur Chaperon-Coexpression eingesetzten Plasmide waren Teil des Chaperone Coexpression Kits von Takara Bio Inc (#3340, Version 0906).

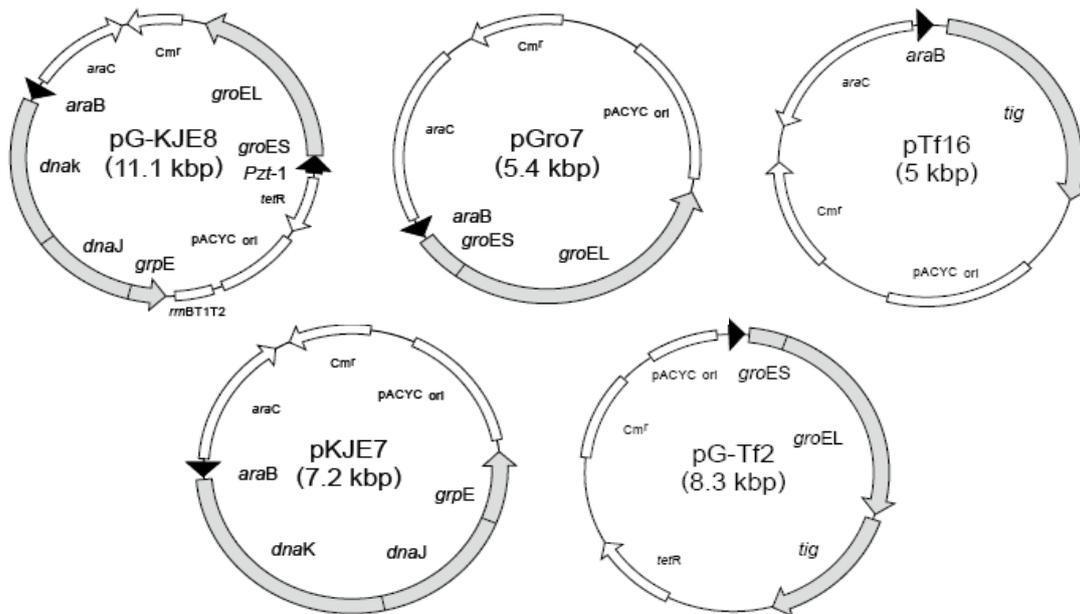


Abb. 36: Karten eingesetzter Plasmide zur Chaperon-Coexpression. Die Promotoren erlauben in allen Fällen eine von AtCCD1 getrennte Induktion der Chaperon-Gruppen. Die Selektionsmarker sind ebenfalls von allen eingesetzten AtCCD1-Expressionsplasmiden verschieden.

Die eingesetzten Chaperone wirken an den folgenden Stellen der Proteinbiosynthese (Wall und Pluckthun, 1995): GroEL und GroES (Chaperonin, Hsp70-Gruppe) bilden große, oligomere Komplexe und ermöglichen im Inneren des Komplexes die selbständig ablaufende Fertigfaltung von Proteinen. DnaK und DnaJ (Hsp60-Gruppe) binden an hydrophobe Bereiche der an den Ribosomen naszierenden Polypeptidkette und verhindern dadurch die Aggregation dieser Gruppen. GrpE (Hsp60-Gruppe) stimuliert die Freisetzung der Polypeptidkette aus den Ribosomen. Tig („Trigger Faktor“, chaperonähnlicher Faktor) erhöht auf bisher nicht bekannte Weise die Wirkung von GroEL/ES und wirkt alleine durch Anlagerung an das Zielprotein aggregationsverhindernd.

Tab. 6: Daten der eingesetzten Plasmide zur Chaperon-Coexpression. Cm: Chloramphenicol. Quelle: Takara Chaperone Coexpression Kit Manual.

Plasmid	Chaperone	Promoter	Induktor	Resistenz
pG-KJE8	Dna K/J GrpE Gro ES/EL	<i>araB</i> <i>Pzt-1</i>	L-Arabinose Tetracyclin	Cm
pGro7	Gro ES/EL	<i>araB</i>	L-Arabinose	Cm
pKJE7	Dna K/J GrpE	<i>araB</i>	L-Arabinose	Cm
pG-Tf2	Gro ES/EL Tig	<i>Pzt-1</i>	Tetracyclin	Cm
pTf16	Tig	<i>araB</i>	L-Arabinose	Cm

Da die Expression von Chaperonen zelluläre Ressourcen bindet, gehen damit eine veränderte Wachstumskinetik sowie häufig eine Verringerung der Zielproteinkonzentration und Veränderung der spezifischen Aktivität einher. Die Kriterien für die Auswahl der optimalen Chaperon-Kombination sind vom beabsichtigten Einsatz des exprimierten Enzyms abhängig. Soll das Enzym aufgereinigt und gegebenenfalls immobilisiert eingesetzt werden, muss eine möglichst hohe spezifische Aktivität erreicht werden. Soll das Enzym in Form eines Zellextraktes, also im Überstand aufgeschlossener und zentrifugierter Expressionszellen, eingesetzt werden, ist eine möglichst hohe volumetrische AtCCD1-Aktivität zu erzielen. Im der Demonstrationsanlage ist die Verwendung von AtCCD1 in Form von Zellextrakt vorgesehen, da gezeigt wurde, dass die enthaltenen Zellbestandteile keine Nebenreaktion hervorrufen (Schilling, 2008). Die Aufreinigung des Enzyms würde die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens erheblich einschränken. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei der Expression eine möglichst hohe volumetrische Aktivität erzielt werden sollte, wird in den folgenden Abschnitten häufig Bezug auf diese Größe genommen.

Alle möglichen Kombinationen von AtCCD1-Modifikationen (nativ, His-Tag, NusA-Tag, GST-Tag) und Chaperon-Gruppen wurden durch Cotransformation von *E.coli* BL21 DE3 hergestellt. Die erhaltenen Stämme wurden unter identischen Bedingungen kultiviert, induziert und geerntet. Die Bestimmung der volumetrischen und spezifischen Aktivitäten erfolgte nach 5, 10, 16,5 und 22 Stunden mit 12 mM 8'-

Apo- β -carotin-8'-al in Triton X-100-Mizellen bei 10 % (v/v) Ethanol. Die Gesamtproteinkonzentration wurde durch einen Bicinchonin (BCA) - Test mit 10 Kalibrierpunkten ermittelt. Der AtCCD1-Anteil an der Gesamtproteinkonzentration wurde durch SDS-PAGE, Coomassie-Blau-Färbung und anschließende densitometrische Auswertung bestimmt. Als Bezugsgröße für die Berechnung der spezifischen Aktivität diente die Proteinkonzentration von AtCCD1 im durch Aufschluss und Zentrifugation gewonnenen Zellextrakt. Die spezifische Aktivität liefert aus diesem Grund eine Aussage über die Faltungsqualität in Bezug auf den löslichen Enzymanteil. Die Standardabweichungen der spezifischen und volumetrischen Aktivitäten aus drei parallelen Messreihen wurden gemäß der Fehlerfortpflanzungsgesetze ermittelt und enthalten die Standardabweichungen aller enthaltenen Faktoren in entsprechender Gewichtung. Abbildung 37 zeigt beispielhaft die volumetrische Aktivität von GST-AtCCD1 zu verschiedenen Zeitpunkten bei Coexpression verschiedener Chaperon-Gruppen und bei Expression ohne Chaperone.

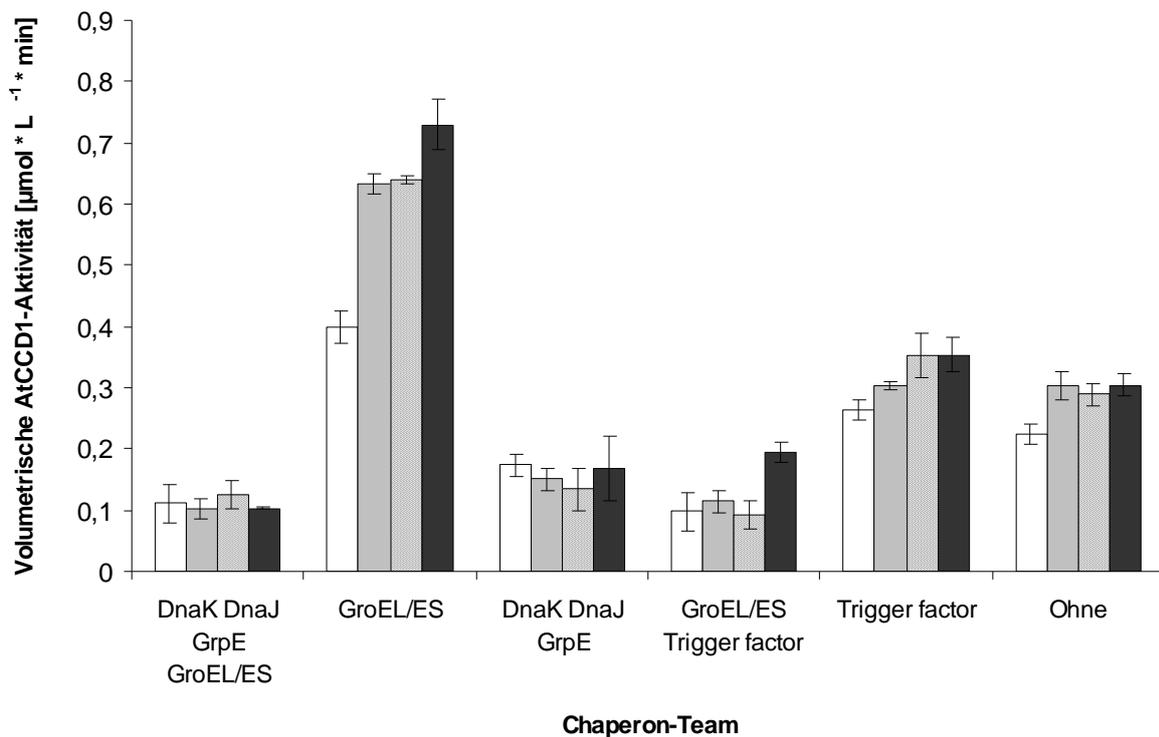


Abb. 37: Volumetrische Aktivität von GST-AtCCD1 über die Expressionsdauer bei Coexpression verschiedener Chaperon-Gruppen. Weiß: 5h, grau: 10h, schraffiert: 16,5h, schwarz: 22h Expressionsdauer. Expression bei 20°C in 100 ml LB-Medium in 500 ml Erlenmeyer-Kolben ohne Schikane. Gemeinsame Induktion von AtCCD1- und Chaperon-Expression bei O.D.₆₁₀=0,6. Substrat: 12 mM 8'-Apo- β -carotin-8'-al in Triton X-100 Mizellen. Puffer: Tris 20 mM pH 8 mit 10% (v/v) Ethanol.

Die volumetrische Aktivität nach 22 Stunden Expression bei 20°C wurde für alle möglichen Kombinationen von AtCCD1-Modifikationen und Chaperon-Gruppen ermittelt (Abb. 38). Die Untersuchung ermöglichte einerseits die Selektion der optimalen Chaperon-Kombination für die Expression der für den Modellprozess ausgewählten Enzymvariante. Andererseits gaben die Daten einen Hinweis auf die Interaktion von Löslichkeitsverbessernden Trägerproteinen und coexprimierten molekularen Chaperonen.

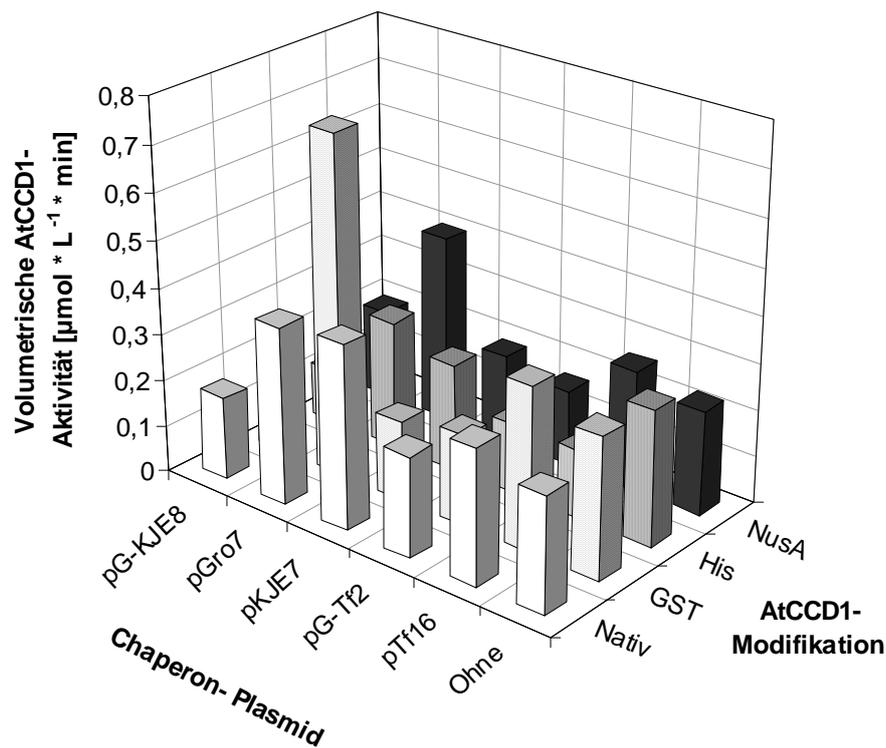


Abb. 38: Vergleich der erzielten volumetrischen Aktivitäten für verschiedene Kombinationen von Chaperon-Gruppen und AtCCD1-Modifikationen. Expressionsdauer: 22h. Expression bei 20°C in 100 ml LB-Medium in 500 ml Erlenmeyer-Kolben ohne Schikane. Gemeinsame Induktion von AtCCD1- und Chaperon-Expression bei $O.D._{610}=0,6$. Substrat: 12 mM 8'-Apo- β -carotin-8'-al in Triton X-100 Mizellen. Puffer: Tris 20 mM pH 8 mit 10% (v/v) Ethanol.

Die höchste volumetrische AtCCD1-Aktivität wurde durch Coexpression von GST-AtCCD1 und den Chaperonen GroES und GroEL erreicht. Die Coexpression der Chaperone führte gegenüber der Expression ohne Chaperone zu einer Erhöhung der volumetrischen Aktivität um den Faktor 2,4. GroEL und GroES bilden große, oligomere Komplexe und bewirken durch Bereitstellung eines hydrophilen Milieus in ihrem Inneren die selbständige Fertigfaltung von Proteinen (Horwich et al., 2007).

Die Coexpression von GroEL und GroES führte bei allen AtCCD1-Modifikationen und bei nativer AtCCD1 zu einer Erhöhung der erzielten volumetrischen Aktivität.

Es fällt auf, dass besonders große Verbesserungen der volumetrischen Aktivität bei AtCCD1-Modifikationen mit großen Fusionspartnern auftraten, die mit GroEL/ES coexprimiert wurden: GST-AtCCD1 (23 kDa) und NusA-AtCCD1 (62 kDa). Die Daten deuten darauf hin, dass zwei Faktoren zusammenkommen müssen, um erhöhte volumetrische Aktivität zu erzielen: Einerseits die Fusion mit einem stark löslichkeitsverbessernden Trägerprotein, wodurch die Löslichkeit des eigentlich membranassoziierten Enzyms (Tan et al., 2001) bei hoher Gesamtproteinkonzentration gesteigert wird. Andererseits die Coexpression mit geeigneten Chaperonen, die eine korrekte Faltung der Fusionsproteine durch Bereitstellung eines geeigneten Faltungsmilieus ermöglichen.

Die ermittelten Werte für die spezifische Aktivität wiesen eine ähnliche Variation auf, wie die in Abbildung 38 dargestellten Werte für die volumetrische Aktivität. Dabei traten eine erhöhte volumetrische und eine erhöhte spezifische Aktivität häufig, jedoch nicht immer, zusammen auf. Bei der als optimal ermittelten Coexpression von GST-AtCCD1 mit GroEL/ES ist die spezifische Aktivität gegenüber der Expression ohne Chaperone um 52% erniedrigt (siehe Abschnitt 5.2.2.3). Die durchschnittliche Faltungsqualität der löslichen Fusionsproteine wurde durch Chaperon-Coexpression demnach verringert, wobei die Konzentration an überhaupt gelöstem Fusionsprotein stark zunahm (Ergebnis nicht dargestellt). Die löslichen Produkte einer Proteinüberexpression sind nicht notwendigerweise vollständig gefaltet und besitzen uneingeschränkte Funktionalität. Vielmehr stellen sie ein Kontinuum an Faltungs-Zuständen dar (Gonzalez-Montalban et al., 2007). Die Coexpression von GroEL/ES führte offenbar zu einer Verschiebung dieses Kontinuums an Faltungszuständen. Mehr GST-AtCCD1-Moleküle sind soweit gefaltet, dass sie löslich sind, wobei sich die durchschnittliche spezifische Carotinaseaktivität der löslichen Enzyme verringert hat.

5.2.2.2 Chaperon-Induktionszeitpunkt und Induktion künstlicher Hitzeschock

Sind *E.coli*-Zellen Stress-Einflüssen wie Temperaturerhöhung, organischen Lösungsmitteln oder Akkumulation von aggregierten Proteinen ausgesetzt, wird

vorübergehend die Synthese von 20-30 sogenannten Hitzeschock-Proteinen (*heat shock proteins, hsp*) hochreguliert (Neidhardt und VanBogelen, 1987). Ethanol stellt einen der effizientesten Auslöser der hsp-Reaktion dar. Die Hochregulation der Hitzeschock-Antwort wurde bereits bei mehreren Proteinüberexpressionen eingesetzt, um die Effizienz bereits coexprimierter Chaperone zu verbessern (Thomas und Baneyx, 1997). Um das Potential einer künstlichen *heat shock*-Induktion für die heterologe Überexpression von AtCCD1 in *E.coli* zu untersuchen, wurde GST-AtCCD1 mit und ohne 3 % (v/v) Ethanol im Kulturmedium exprimiert. Es wurden Stämme ohne Chaperon-Plasmid und mit pGro7 cotransformierte Stämme eingesetzt und die Wirkung der Hitzeschock-Reaktion verglichen. Entgegen der veröffentlichten Daten wurde sowohl ohne als auch mit Chaperon-Coexpression eine deutliche Verringerung der volumetrischen Aktivität bei der GST-AtCCD1-Expression festgestellt (Abb. 39 A). Die spezifischen Aktivitäten wurden ebenfalls nicht durch die Hitzeschock-Reaktion verbessert, sondern blieben nahezu unverändert. Die Induktion eines künstlichen Hitzeschocks ist damit für die AtCCD1-Überexpression nicht sinnvoll.

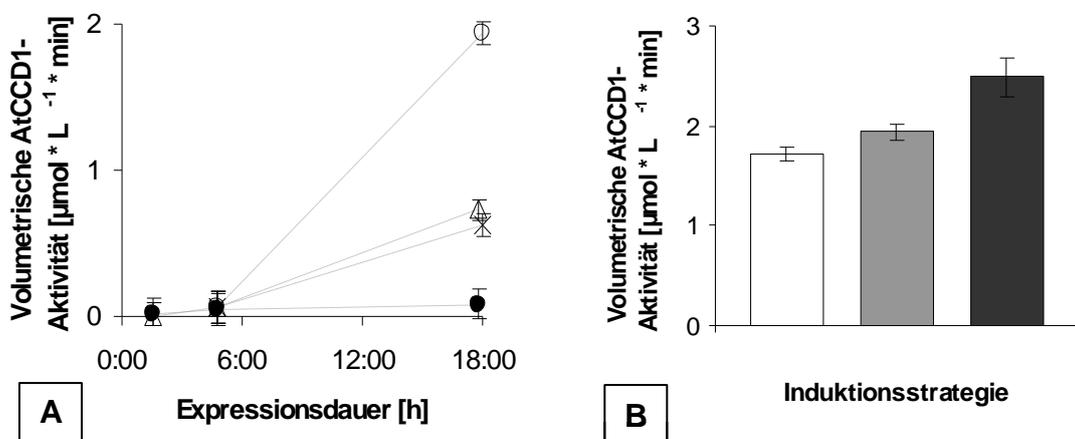


Abb. 39: Effekt von künstlich induzierter Hitzeschock-Reaktion (A) sowie verschiedener Induktionsstrategien (B) auf die volumetrische Aktivität von GST-AtCCD1. Expression bei 20°C in 100 ml LB-Medium in 500 ml Erlenmeyer-Kolben ohne Schikane. A: Expression ohne Chaperone mit (●) und ohne (Δ) 3 % (v/v) Ethanol. Coexpression von GroEL/ES mit (x) und ohne (o) 3 % (v/v) Ethanol. B: Induktion der Chaperon-Expression einmalig bei $\text{OD}_{600}=0,8$ mit 0,25 g/L Arabinose (weiß); einmalig bei $\text{OD}_{600}=0,8$ mit 0,5 g/L Arabinose (grau); nach Inokulierung auf $\text{OD}_{600}=0,1$ und bei $\text{OD}_{600}=0,8$ mit je 0,25 g/L Arabinose (schwarz).

Der Zeitpunkt und die Stärke der Induktion von coexprimierten Chaperonen besitzen deutlichen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von Zellen und die Effizienz der Proteinüberexpression (Blum et al., 1992, Kohda, 2002). GST-AtCCD1

exprimierende und GroEL-GroES coexprimierende Zellen wurden mit verschiedenen Induktionsstrategien kultiviert. Die Induktorkonzentrationen wurden innerhalb des angegebenen Bereiches im Handbuch der Chaperonplasmide gewählt. Die Induktion der Enzymexpression wurde nicht variiert und erfolgte bei $O.D._{600}=0,8 \pm 0,2$. Die Chaperon-Induktion erfolgte in zwei verschiedenen Induktorkonzentrationen ($0,25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ beziehungsweise $0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Arabinose) zusammen mit der Enzyminduktion oder sowohl bei Inokulierung als auch bei Enzyminduktion mit $0,25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Die zweistufige Induktion verbesserte die volumetrische Aktivität für AtCCD1 um 46% (Abb. 39 B). Die Bereitstellung von Faltungshelfermolekülen vor Beginn der Überexpression und eine Konzentrationserhöhung während der Coexpression erhöhten das Wirkpotential von GroES und GroEL bei der Überexpression von GST-AtCCD1.

5.2.2.3 Differenzielle Wirkung von Chaperonen auf Fusionsprotein-Untereinheiten

Für den Einsatz im Modellprozess wurde eine Modifikation von AtCCD1 ausgewählt, die N-terminal mit dem sehr gut wasserlöslichen Entgiftungsenzym Glutathion-S-Transferase (GST) fusioniert ist. GST-AtCCD1 stellt ein Fusionsprotein dar, dessen Untereinheiten jeweils messbare katalytische Aktivität besitzen (Abb. 40).

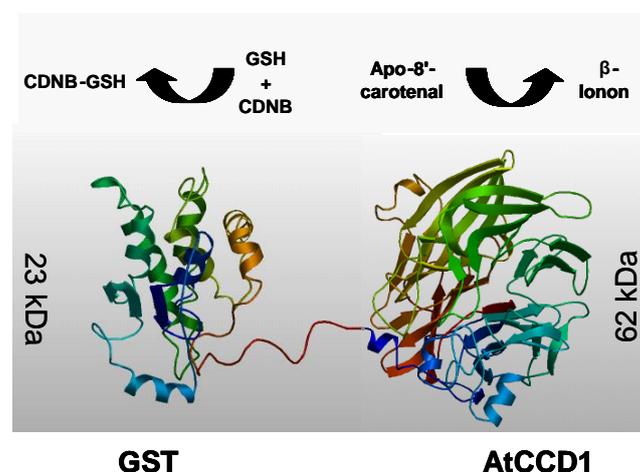


Abb. 40: Schematische Abbildung des Fusionsenzym GST-AtCCD1, das eingesetzt wurde, um die unterschiedliche Wirkung von Chaperonen auf die Faltungsqualität der Untereinheiten des Fusionsenzym zu untersuchen. CDNB: 1-Chloro-2,4-dinitrobenzol. GSH: L-Glutathion.

Für die angestrebte Löslichkeitsverbesserung des Fusionsenzym ist es notwendig, dass neben der Carotinase-Untereinheit auch die GST-Untereinheit optimal gefaltet ist. Die Auswahl coexprimierter Chaperone und die Festlegung der Expressionsbedingungen geschah bisher allein basierend auf der Carotinaseaktivität. Es wurde davon ausgegangen, dass die Faltungsqualität von AtCCD1 direkt mit der Faltungsqualität des Fusionspartners GST korreliert. In der Literatur wird die Verwendung von Fusionspartnern mit leicht messbarer Aktivität wie GST oder GFP (*green fluorescent protein*) als Faltungs-Reporter-Tag mehrfach beschrieben (Martinez-Alonso et al., 2007, Waldo et al., 1999), wobei jedoch als Kriterium für korrekte Faltung des Passagierproteins die Löslichkeit und nicht eine tatsächlich gemessene Aktivität herangezogen wird.

Test-Messungen der GST-Aktivität deuteten darauf hin, dass der Faltungszustand der Fusions-Untereinheiten durch Chaperon-Coexpression nicht immer in der selben Richtung und im selben Maß beeinflusst wurde. Aus diesem Grund wurden Versuchsreihen durchgeführt, um anhand von GST-AtCCD1 eine mögliche differentielle Wirkung von Chaperonen auf die Untereinheiten von Fusionsproteinen zu untersuchen. *E.coli* BL21 DE3 wurde mit pGEX4T-1::AtCCD1 (GST-AtCCD1-Expressionsvektor) und Chaperon-Expressionsvektoren (siehe Abschnitt 5.2.2.1) cotransformiert und bei 20°C in LB-Medium kultiviert. Die Induktion von AtCCD1- und Chaperon-Expression erfolgte gleichzeitig bei O.D.₆₀₀ = 0,8. Die spezifische Aktivität der AtCCD1- und GST-Untereinheiten wurde photometrisch in der späten exponentiellen Phase (16,5 Stunden) und der stationären Phase (22 Stunden) bestimmt, um Einflüsse durch unterschiedliche Zustände des Zellmetabolismus auszuschließen. In Abbildung 41 sind die spezifischen Aktivitäten der beiden Untereinheiten von GST-AtCCD1 bei Coexpression verschiedener Chaperon-Gruppen dargestellt.

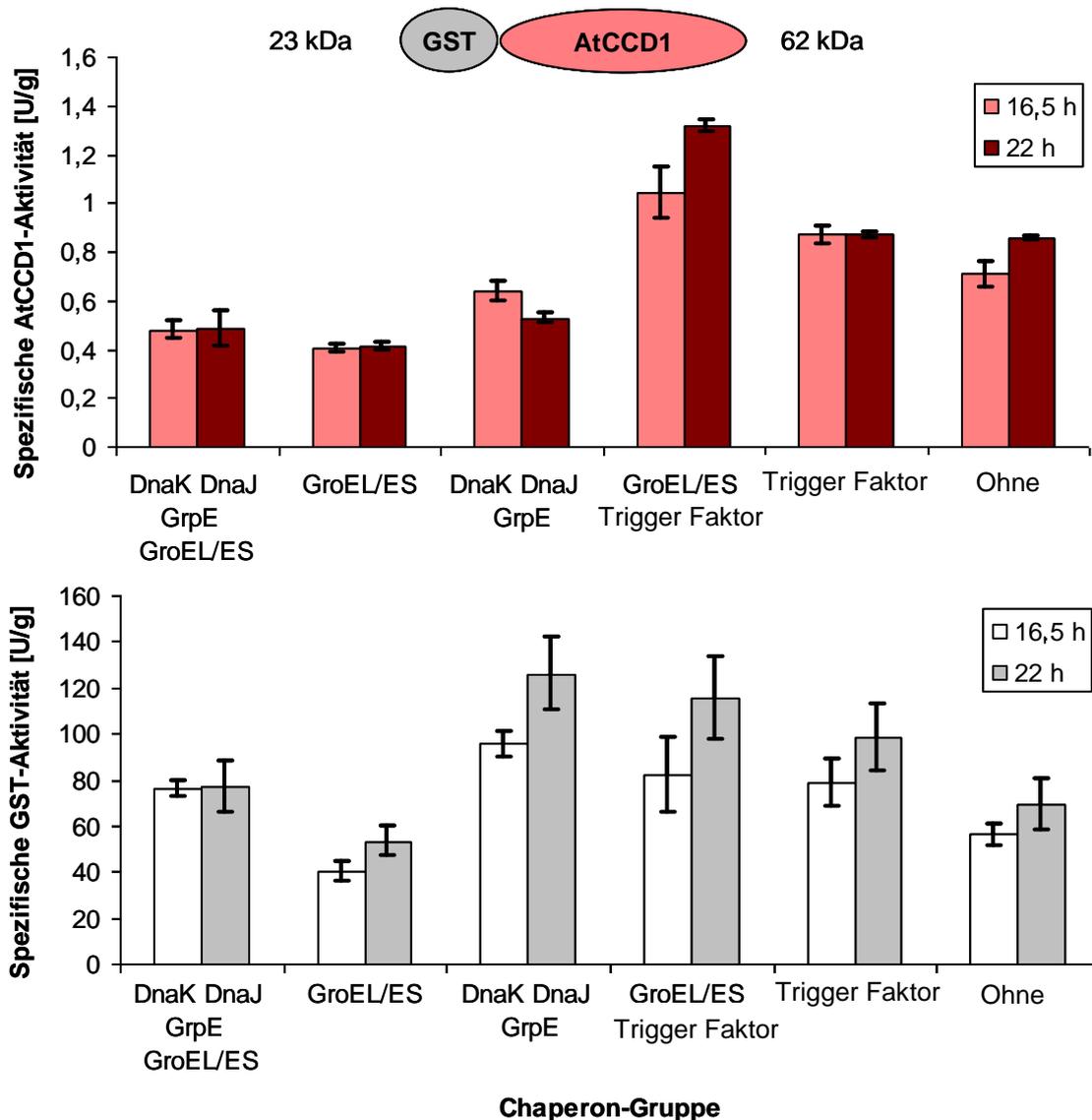


Abb. 41: Spezifische Aktivität der AtCCD1- (oben) und GST- (unten) Untereinheiten nach Coexpression mit verschiedenen Chaperon-Gruppen. Eine Kontrolle ohne Chaperon-Coexpression ist für jede Untereinheit dargestellt.

Die Chaperon-Gruppen 1 (DnaK-DnaJ-GrpE + GroEL-GroES) und 3 (DnaK-DnaJ-GrpE) reduzierten die spezifische Aktivität der AtCCD1-Untereinheit des Fusionsproteins, während die Aktivität der GST-Untereinheit erhöht wurde. Die von diesen Chaperon-Gruppen hervorgerufenen Effekte sind von besonderem Interesse, da ein Einfluss auf die spezifische Aktivität zweier Untereinheiten in entgegengesetzter Richtung beobachtet wurde. Chaperon-Gruppe 2 (GroEL-GroES) reduzierte die spezifische Aktivität beider Untereinheiten, während Chaperon-Gruppe 5 (Trigger Faktor) die spezifische Aktivität der GST-Untereinheit erhöhte, jedoch keinen Einfluss auf die AtCCD1-Untereinheit ausübte. Nur Chaperon-Gruppe 4 (GroES-GroEL + Trigger Faktor) verursachte eine koordinierte

Erhöhung der spezifischen Aktivitäten beider Untereinheiten des Fusionsproteins. Eine synergistische Wirkung von GroEL/ES-Chaperonen und dem chaperon-ähnlichen Trigger Faktor wurde bereits für andere Modellproteine mit Aggregationsneigung publiziert (Kandror et al., 1997). Trigger Faktor kann einen Komplex mit GroEL bilden und erhöht dessen Affinität für inkorrekt gefaltete Proteine (Kandror et al., 1995).

Da es sich bei den untersuchten Enzymen um Fusionspartner handelt, ist der direkte Vergleich von Veränderungen in der spezifischen Aktivität ohne die fehlerbehaftete separate Bestimmung der jeweiligen Enzymkonzentrationen möglich: Wenn kein proteolytischer Abbau oder eine Spaltung der Fusion erfolgen, sind äquimolare Konzentrationen der beiden Fusionspartner vorhanden. Mittels *western blot* und anschließendem immunhistochemischem Nachweis über einen polyklonalen, C-terminal HRP-gekoppelten Anti-GST-Antikörper wurde nachgewiesen, dass kein Abbau und keine Spaltung der Fusion vor und während des enzymatischen Tests stattfanden (Abb. 42).

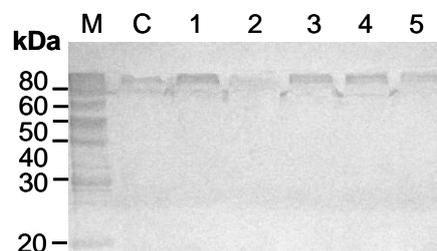


Abb. 42: Kontrolle auf proteolytischen Abbau oder Spaltung des Fusionsproteins. *Western blot* nach immunhistochemischer Färbung mittels polyklonalem, HRP-gekoppeltem Anti-GST-Antikörper. M: Marker. C: Kontrolle ohne Chaperon-Coexpression. 1: Coexpression DnaK, DnaJ, GrpE, GroEL/ES. 2: GroEL/ES. 3: DnaK, DnaJ, GrpE. 4: GroEL/ES, Trigger Faktor. 5: Trigger Faktor. Das Ergebnis zeigt, dass vor und während des enzymatischen Tests keine Proteolyse oder Spaltung stattfanden. GST und AtCCD1-Untereinheiten waren daher in äquimolaren Konzentrationen vorhanden.

Durch Bildung des Verhältnisses von volumetrischer GST-Aktivität zu volumetrischer AtCCD1-Aktivität kann eine unterschiedliche Wirkung von Chaperonen auf die Faltungsqualität von Fusionsenzym-Untereinheiten bewertet werden, ohne die Gesamtproteinkonzentration, die Fusionsenzymkonzentration oder den Anteil an Fusionsenzym im Zellextrakt einzurechnen. Die Verhältnisbildung aus den Aktivitäten eines Fusionsenzym stellt eine einfache und

zuverlässige Form der internen Standardisierung für die Konzentrationen der Fusionsenzym-Untereinheiten dar, welche auf anderem Weg schwer zu erreichen ist.

Das Verhältnis der volumetrischen Aktivitäten ($A_{\text{GST}} / A_{\text{AtCCD1}}$) wurde normalisiert, indem es für die Expression von GST-AtCCD1 ohne Coexpression von Chaperonen auf 1 gesetzt wurde. Die Coexpression von Chaperonen veränderte das Verhältnis ($A_{\text{GST}} / A_{\text{AtCCD1}}$) um einen Faktor von bis zu 2,93 (Tab. 7). Die Werte für ($A_{\text{GST}} / A_{\text{AtCCD1}}$) erlauben nicht die Ermittlung der Chaperon-Gruppe mit der höchsten spezifischen Ausbeute an GST- und AtCCD1-Aktivität. Werte von ($A_{\text{GST}} / A_{\text{AtCCD1}}$), die <1 beziehungsweise >1 sind, zeigen jedoch, dass Chaperon-Coexpression die biologische Aktivität von Fusionsprotein-Untereinheiten unterschiedlich und nicht in gleichem Maß und in gleicher Richtung beeinflusst, wie von (Martinez-Alonso et al., 2007, Waldo et al., 1999) postuliert.

Tab. 7: Verhältnis von volumetrischer GST-Aktivität (A_{GST}) zu volumetrischer AtCCD1-Aktivität (A_{AtCCD1}) nach 22 Stunden Expressionszeit, normalisiert auf das Verhältnis ohne Chaperon-Coexpression. Durch Bildung des Aktivitätsverhältnisses zweier fusionierter Enzyme zur Untersuchung der Chaperonwirkung können Konzentrationseffekte ausgeschlossen werden. Das Verhältnis zeigt an, in welchem Maß die Faltung der Fusions-Untereinheiten unterschiedlich von den Faltungsbedingungen beeinflusst wird. Es zeigt nicht die Orientierung des Einflusses an, die in Abb. 41 dargestellt ist.

	Chaperon-Gruppe	$A_{\text{GST}} / A_{\text{AtCCD1}}$
1	DnaK DnaJ GrpE GroEL/ES	1,98 ± 0,14
2	GroEL/ES	1,60 ± 0,08
3	DnaK DnaJ GrpE	2,93 ± 0,20
4	GroEL/ES Trigger Faktor	1,08 ± 0,22
5	Trigger Faktor	1,39 ± 0,18
C	Ohne	1 ± 0,14

Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchung unterstützen die Theorie eines Kontinuums an Zwischenstufen zwischen korrekt gefalteten und nicht korrekt gefalteten Polypeptiden in löslichen Zellfraktionen (Gonzalez-Montalban et al., 2007). Bei äquimolaren Konzentrationen der Fusionspartner können verschiedene Verhältnisse von ($A_{\text{GST}} / A_{\text{AtCCD1}}$) nur durch Zwischenstufen von biologischer

Aktivität erklärt werden. Die Zwischenstufen können entweder das Ergebnis von teilweiser Aggregation sein (Nomine et al., 2001) oder von Subpopulationen teilgefalteter und eingeschränkt aktiver Proteine. Eine Einschränkung verbleibt jedoch: Mit der zur Verfügung stehenden Messmethodik wäre es nicht möglich zu detektieren, wenn eine fehlgefaltete Untereinheit A an das aktive Zentrum einer Untereinheit B binden und diese blockieren würde.

Die Veränderung der spezifischen Aktivitäten beider Untereinheiten von GST-AtCCD1 wurde nicht durch Komplexbildung mit Chaperonen hervorgerufen. Die Inkubation von Fusionsenzymen aus Zellen ohne Chaperon-Coexpression mit Zellextrakten Chaperon-exprimierender Zellen veränderte die spezifischen Aktivitäten der Fusionsenzym-Untereinheiten nicht (Abb. 43). Die gewählte Inkubationsdauer von 5 min war deutlich höher als die Relaxationszeit von Hsp70-Chaperonen, die bei 25°C in Anwesenheit von ATP rund 0,4 s beträgt (Schmid et al., 1994).

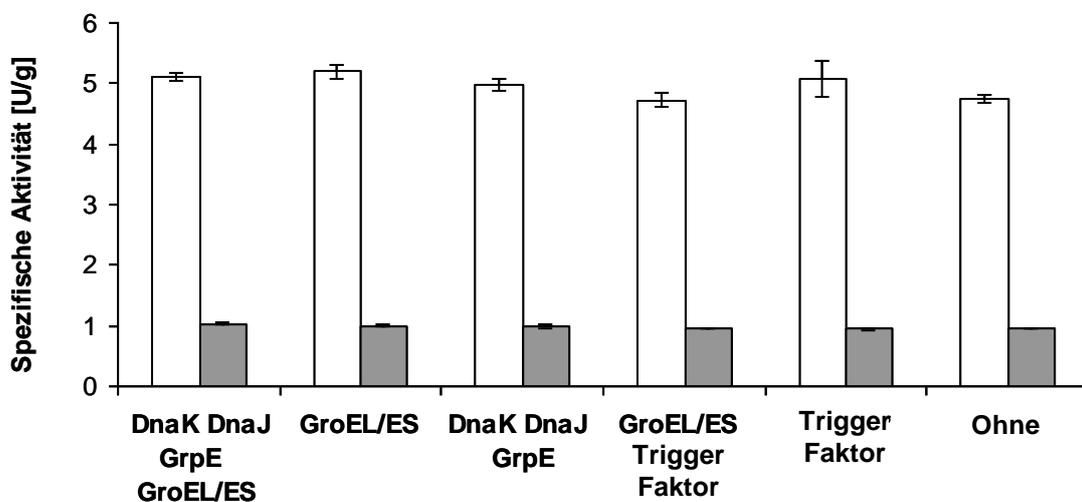


Abb. 43: Inkubation von unabhängig exprimiertem GST-AtCCD1-Fusionsenzym mit Chaperonen. Spezifische Aktivität von AtCCD1- (schwarze Balken) und GST-Untereinheit (weiße Balken) nach 5 min Inkubation mit Chaperon enthaltenden Zellextrakten. Die spezifische Aktivität beider Untereinheiten wird durch Inkubation mit Chaperonen nicht signifikant verändert.

Zusammenfassend wurde für die Expression von GST-AtCCD1 im Hinblick auf den Einsatz in einer Demonstrationsanlage festgestellt: Die durchschnittliche spezifische Aktivität beider Fusions-Untereinheiten sank durch Coexpression der ausgewählten Chaperon-Kombination GroEL-GroES leicht. Die verringerte

durchschnittliche spezifische Aktivität wurde jedoch durch eine deutlich erhöhte Konzentration an gelöstem Fusionsprotein überkompensiert. Die Funktionalität der GST-Untereinheit konnte gezeigt werden. Die Möglichkeit zur affinitätschromatographischen Aufreinigung und der löslichkeitsverbessernde Effekt durch GST sind damit gewährleistet.

Zu Fusionsproteinen im Allgemeinen kann zusammengefasst werden: Die Verwendung sogenannter Faltungs-Reporter-Tags sollte mit Vorsicht erfolgen. Die Veränderung der Faltungsqualität solcher hinzugefügter Polypeptide durch modifizierte Faltungsbedingungen ist nicht immer gleichsinnig und gleich stark wie die Veränderung der Faltungsqualität des Passagierproteins. Sofern möglich, sollte der Faltungszustand des Passagierproteins durch Messung seiner biologisch/chemischen Aktivität kontrolliert werden. Besitzt ein Passagierprotein keine messbare Aktivität, sollten alternative Methoden zur Kontrolle des Faltungszustandes eingesetzt werden. So erlauben die fluorimetrische Lichtstreuungsmessung (Nomine et al., 2001) oder die fourier-transformierte Infrarotspektroskopie (FTIR) (Doglia et al., 2008) die Messung der Monodispersität beziehungsweise die Packungsstruktur aufgereinigter Proteine und könnten in Kombination für diesen Zweck eingesetzt werden.

5.2.3 Untersuchung alternativer Carotinasen

Aktuelle Veröffentlichungen deuten an, dass die natürlichen Substrate von Enzymen der CCD1-Gruppe nicht C₄₀-Substrate wie β -Carotin, das Zielsubstrat dieser Arbeit, sind (Floss et al., 2008), sondern C₃₀-Apocarotinoide. Aus diesem Grund wurde nach einem Vertreter der CCD1-Familie gesucht, der eine Ausnahme zu dem genannten Postulat darstellt und bevorzugt C₄₀-Substrate umsetzt. Ziel war die Ermittlung einer Carotinoid-Dioxygenase, die eine höhere spezifische Aktivität für das allgemein von CCDs sehr langsam umgesetzte β -Carotin besitzt. Für die CCD1 aus *Rosa damascena* ergaben Untersuchungen zur Substrat-Promiskuität, dass entgegen des üblichen Verhaltens von CCD-Enzymen C₄₀-Carotinoide bessere Substrate als C₃₀-Apocarotinoide darstellen (Huang et al., 2009a). Zusätzlich zur Suche nach einem Vertreter der CCD1-Enzymgruppe, der mit höherer Aktivität als AtCCD1 β -Carotin spaltet, wurde die Suche nach alternativen

Enzymen auf prokaryotische und aus Vertebraten stammende Enzyme ausgeweitet. Ziel war, ein Enzym zu finden, das entweder AtCCD1 in der Biokonversion von β -Carotin ersetzt oder in Kombination damit eingesetzt werden kann. Ein solches Enzym muss als Hauptsubstrat β -Carotin und als Aktivität mindestens eine asymmetrische oxidative 9,10-Spaltungsaktivität besitzen.

RdCCD1 wurde in Bezug auf seine Aktivität gegenüber dem Zielsubstrat β -Carotin sowie dem Xanthophyll Zeaxanthin untersucht. Das murine Enzym Bcmo2 ist bisher kaum charakterisiert und wurde deshalb umfassender untersucht: Das pH-Optimum und eine mögliche Aktivierung durch organische Cosolventien wurden bestimmt und eine zweistufige β -Carotin-Umsetzung zusammen mit AtCCD1 geprüft.

5.2.3.1 Enzym RdCCD1

Das Gen *RdCCD1* wurde im Expressionsplasmid pGEX4T-1 vom Projektpartner (Prof. Wilfried Schwab, TU München, Biotechnologie der Naturstoffe) zur Verfügung gestellt. Es wurden sowohl die volumetrische Aktivität als auch die spezifische Aktivität von AtCCD1 und RdCCD1 für β -Carotin und Zeaxanthin verglichen. Beide CCDs wurden mithilfe desselben Plasmids und unter identischen Bedingungen exprimiert. Die Untersuchungen erfolgten bei Substratvermittlung in 16 mM Tween 40 - Mizellen mit durch Lyse und Zentrifugation erhaltenen Zellextrakten. Die Gesamtproteinkonzentration in Zellextrakten wurde mittels Bicinchonin-Test ermittelt. Die Bestimmung der Enzymkonzentration erfolgte anhand SDS-PAGE und densitometrischer Analyse. Als Kontrolle wurden Extrakte von Zellen eingesetzt, die mit dem jeweiligen Leervektor transformiert und identisch kultiviert waren. Bei Umsetzung des Zielsubstrats β -Carotin konnten keine signifikanten Unterschiede in der spezifischen Aktivität und der volumetrischen Aktivität bei der Expression festgestellt werden (Abb. 44 A und B).

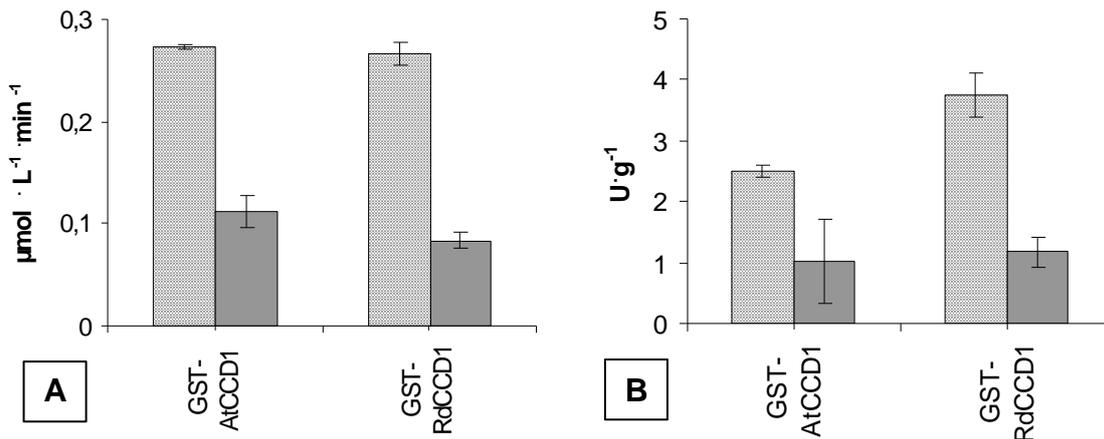


Abb. 44: Volumetrische (A) und spezifische (B) Aktivität von GST-AtCCD1 und GST-RdCCD1 bei Umsetzung von 48 μ M Zeaxanthin (schraffiert) und 48 μ M β -Carotin (grau) aus 16 mM Tween 40 - Mizellen.

Da das Enzym RdCCD1 für den beabsichtigten Modellprozess im Labormaßstab keine signifikanten Vorteile hinsichtlich Enzymgewinnung oder Aktivität gegenüber β -Carotin bietet, wurde von einer weiteren Verwendung des Enzyms abgesehen. Das bisher eingesetzte Enzym AtCCD1 ist wesentlich umfangreicher charakterisiert und aus diesem Grund für den beabsichtigten Einsatz besser geeignet.

5.2.3.2 Enzym Bcmo2

Die Suche nach einem Vertreter der CCD1-Enzymgruppe, der mit höherer Aktivität als AtCCD1 β -Carotin spaltet, war bisher nicht erfolgreich. Aus diesem Grund wurde die Suche nach alternativen Enzymen auf prokaryotische und aus Vertebraten stammende Enzyme ausgeweitet. Das murine Enzym *Beta-carotene monooxygenase 2* (Bcmo2) schneidet *all-trans* β -Carotin asymmetrisch an der 9,10-Position und prozessiert keine apocarotinoiden Substrate, für welche CCD1-Enzyme üblicherweise die höchste Aktivität zeigen (Kloer und Schulz, 2006). Bcmo2 und seine Homologe in anderen Vertebraten sind *in vivo* Teil eines alternativen Vitamin A - Synthesewegs (Biesalski et al., 2007). Der erste Vertreter dieser Enzymgruppe wurde 2000 aus *Gallina* (Huhn) isoliert (Wyss et al., 2000). Unter Einsatz von EST-Datenbanken gelang die Isolierung der cDNA von Bcmo2 aus dem Mausgenom (Kiefer et al., 2001). Bcmo2 trägt zwar die Information Monooxygenase im Namen, der Reaktionsmechanismus ist jedoch noch nicht endgültig geklärt (Kloer und Schulz, 2006). Die Zuordnung erfolgte bisher aufgrund

von Sequenzhomologie. Aufgrund der relativen Neuheit und der Unklarheit über den Reaktionsmechanismus des Enzyms ist noch keine einheitliche Nomenklatur etabliert. Es existieren neben *Bcmo2* noch die Bezeichnungen β -diox2 und BCO2, an dieser Stelle soll aber die Bezeichnung aus dem aktuellen Review zu dieser Enzymfamilie verwendet werden (Biesalski et al., 2007). Das untersuchte murine *Bcmo2*-Gen wurde von PD Dr. Johannes von Lintig, Universität Freiburg, Institut für Biologie I (Zoologie) zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um das native, nicht modifizierte Gen im Expressionsplasmid pBAD. Die korrekte Klonierung in das Plasmid war durch Sequenzierung überprüft worden.

Ziel der Untersuchung von *Bcmo2* war, dieses Enzym in einem zweistufigen enzymatischen Verfahren mit *AtCCD1* einzusetzen (siehe Abschnitt 5.2.3.4). Dabei sollte eine schnelle asymmetrische Spaltung von β -Carotin durch *Bcmo2* erfolgen und das entstehende Apocarotinoid durch *AtCCD1* weiter umgesetzt werden. Um den kombinierten Einsatz von *AtCCD1* und *Bcmo2* zu untersuchen, musste zunächst bestimmt werden, inwiefern sich die Reaktionsbedingungen der beiden Enzyme decken. Dies gilt insbesondere für den pH-Wert der Reaktion und den Einsatz von organischen Cosolventien, mit denen die Aktivität von *AtCCD1* im mizellaren System deutlich erhöht werden kann. Der Einfluss des pH-Wertes auf die spezifische Aktivität bei 30°C wurde in 20 mM Pufferlösung mit 14 mM Tween 40 - Mizellen bestimmt. Als Substrat wurde 36 μ M Astaxanthin eingesetzt, da in Vorversuchen damit die höchste Aktivität und die geringste Standardabweichung ermittelt wurden. Die maximale spezifische Aktivität bezogen auf das Gesamtprotein im Zellextrakt wurde bei pH 8,7 erreicht. Die pH-Optima von *AtCCD1* (pH 8,2) und *Bcmo2* erlauben einen gemeinsamen Einsatz (Abb. 45 A). Im mizellaren Substratvermittlungssystem mit Tween 40 wurde für *Bcmo2* keine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit durch Zugabe organischer Cosolventien gemessen (Abb. 45). Statt dessen tritt Denaturierung des Enzyms auf. Das Ausmaß der Enzymdenaturierung steigt mit ansteigender Hydrophobizität des Cosolvens, dargestellt durch den Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten $\log P$ (o/w) (Abb. 45 B, C).

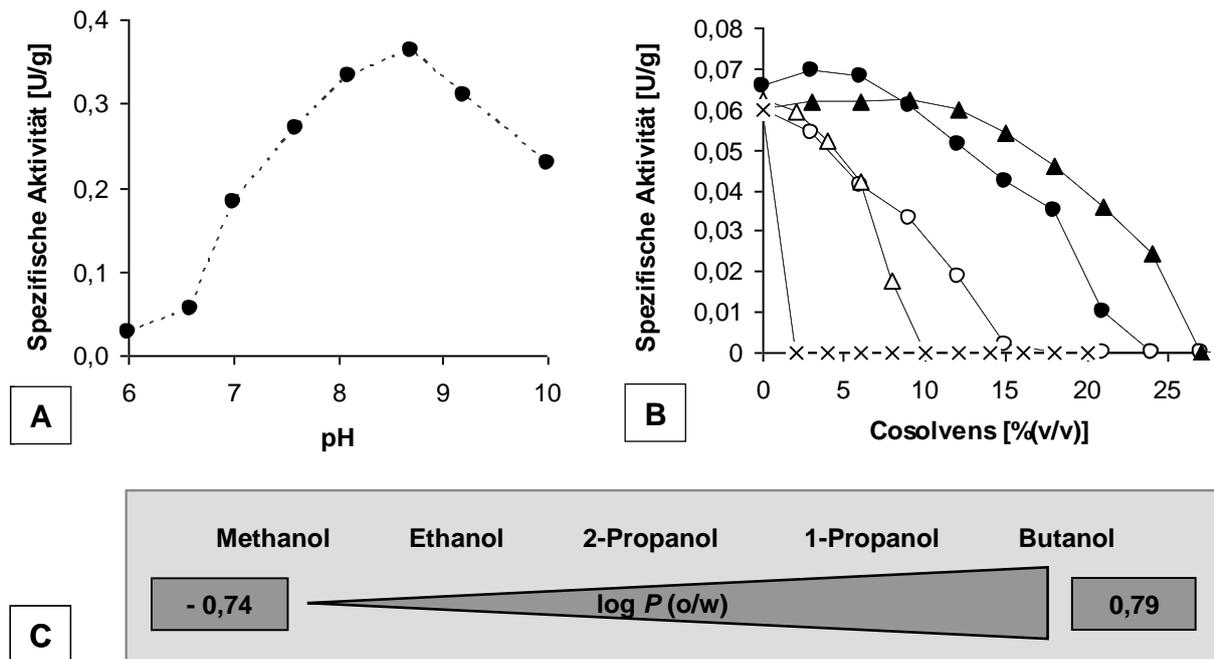


Abb. 45: Spezifische Aktivität von Bcmo2 bezogen auf die Gesamteproteinkonzentration im Zellextrakt in Abhängigkeit vom pH-Wert in einer 20 mM gepufferten Reaktionslösung (A) und in Abhängigkeit von der Konzentration und Hydrophobizität von Cosolventien, dargestellt durch $\log P$ (o/w) (B): Methanol (▲), Ethanol (●), 2-Propanol (○), 1-Propanol (△), Butanol (x). Staffellung der Hydrophobizität der eingesetzten Cosolventien nach $\log P$ (o/w)-Wert (C).

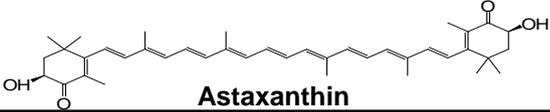
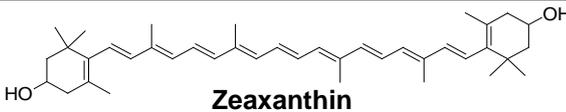
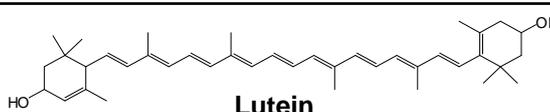
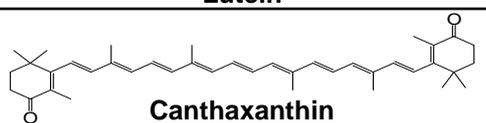
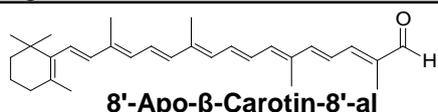
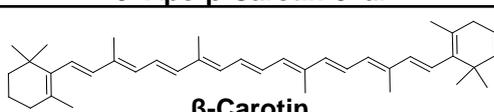
Bei Verwendung desselben mizellaren Substrat-Vermittlungssystems mit AtCCD1 trat eine deutliche Aktivierung der Carotinoidspaltung durch Cosolventien auf, während mit Bcmo2 keine Aktivierung stattfand. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Aktivierung der AtCCD1-Aktivität durch wassermischbare organische Cosolventien in einer Veränderung der Enzym-Mizell-Interaktion oder rein enzymseitig begründet ist und nicht in einer Veränderung des mizellaren Systems.

5.2.3.3 Substratspektrum von Bcmo2

Für Bcmo2 sind bisher nur *all-trans*- β -Carotin und Lycopin als Substrate publiziert (Biesalski et al., 2007). Über weitere Substrate sowie über mögliche strukturelle Präferenzen und Einschränkungen ist nichts bekannt. Um den Einfluss von Kettenlänge, Substitution der Ionon-Ringe und allgemeiner Hydrophobizität von Carotinoiden auf die Umsetzbarkeit durch Bcmo2 zu untersuchen, wurden enzymatische Reaktionen mit einer Serie von unterschiedlich stark oxyfunktionalisierten Carotinoiden und einem Apocarotinoid durchgeführt. Die

Reaktionen wurden photometrisch in Mikrotiterplatten verfolgt. In allen Reaktionsansätzen wurde die selbe Charge Enzymlösung eingesetzt. Die Enzymkonzentration wurde mittels SDS-PAGE und densitometrischer Analyse ermittelt. Für jedes Substrat wurden Dreifachbestimmungen der Reaktionsgeschwindigkeit bei 8 verschiedenen Substratkonzentrationen durchgeführt und die kinetischen Systemparameter k_{CAT} und K_{M} durch Auftragung nach Hanes ermittelt (Cornish-Bowden und Eisenthal, 1974). Es wurde in allen Reaktionsansätzen ein konstantes molares Verhältnis von Tween 40 zu Substrat von 500 eingehalten, um einen möglichen kinetischen Einfluss des *surface dilution* Effektes (Dennis, 1973) auszuschließen. Die Spaltung von β -Carotin erfolgte zu langsam, um kinetische Daten mit ausreichend kleinem Fehler aufzunehmen. Der Abbau von β -Carotin wurde aber per GC-MS und HPLC bestätigt. Die in Tabelle 8 dargestellten Werte für k_{CAT} und K_{M} sind naturgemäß in ihrer absoluten Höhe spezifisch für das untersuchte Reaktionssystem. Sie stellen dennoch eine verlässliche Aussage über die relative Höhe der Aktivitäten von Bcmo2 gegenüber den untersuchten Substraten dar.

Tab. 8: k_{CAT} und K_{M} -Werte für Bcmo2-Umsätze der untersuchten Substrate aus Tween 40 - Mizellen. In allen Reaktionsansätzen wurde ein molekulares Verhältnis von Tensid zu Substrat von 500 eingesetzt. Die dargestellten Werte unterliegen experimentellen Fehlern, die aufgrund der eingesetzten Regressionsfunktionen aber nicht in Form einer Standardabweichung darstellbar sind.

Carotinoid	k_{CAT} [min^{-1}]	K_{M} [μM]
 Astaxanthin	21,6	17,7
 Zeaxanthin	21,3	49,4
 Lutein	15	30,6
 Canthaxanthin	8,5	15,7
 8'-Apo- β -Carotin-8'-al	1,9	48,7
 β -Carotin	n.b.	n.b.

Der Vergleich mit bereits veröffentlichten Daten dieser Art zu AtCCD1 (Schilling, 2008) zeigt einen zentralen Unterschied zwischen den Enzymen auf: Während AtCCD1 8'-Apo- β -carotin-8'-al am zweitschnellsten nach Astaxanthin umsetzt, wird das Apocarotinoid von Bcmo2 nur sehr langsam gespalten. Die Symmetrie des Substratmoleküls scheint auf die Aktivität von Bcmo2 einen entscheidenden Einfluss zu haben. Eine sterische Hinderung ist in Anbetracht der kleineren Molekülgröße von 8'-Apo- β -carotin-8'-al gegenüber Xanthophyllen unwahrscheinlich. Unter den übrigen Carotinoiden ist die ermittelte Reaktionsgeschwindigkeit vom Oxyfunktionalisierungsgrad abhängig.

Mit den in Tabelle 8 dargestellten Daten wurde erstmalig die Aktivität von Bcmo2 gegenüber Xanthophyllen und insbesondere gegenüber einem Apocarotinoid gezeigt. Die regiospezifische 9,10-Spaltung von 8'-Apo- β -carotin-8'-al war zwar sehr langsam, gegenüber den mitgeführten Kontrollen aber eindeutig. Die für AtCCD1 und Bcmo2 ermittelten Ergebnisse stützen die postulierten Funktionen *in*

in vivo, die für AtCCD1 C₃₀-Apocarotinoide und für Bcmo2 C₄₀-Xanthophylle als Hauptsubstrate zuordnen (Biesalski et al., 2007).

5.2.3.4 Untersuchung einer zweistufigen Biotransformation mit AtCCD1 und Bcmo2

Mit Bcmo2 steht ein Enzym zur Verfügung, für das C₄₀-Xanthophylle *in vivo* die Hauptsubstrate darstellen und das Apocarotinoide nur sehr langsam umsetzt (Kloer und Schulz, 2006). Eine zweistufige Biotransformation mit Bcmo2 und AtCCD1 wurde untersucht, um festzustellen, ob der kombinierte Einsatz der beiden Enzyme zu schnellerer Reaktion führt als bei Einsatz eines einzelnen Enzyms (Abb. 46 A). Der beabsichtigte Effekt war eine synergistische Wirkung von Bcmo2 und AtCCD1: Bcmo2 schneidet β -Carotin zu β -Ionon und β -Apo-10'-Carotinal. AtCCD1 setzt das entstehende Apocarotinoid zu einem weiteren Molekül β -Ionon und einem C₁₄-Dialdehyd um und verhindert auf diese Weise einerseits eine mögliche Produktinhibition von Bcmo2 und andererseits die Blockade von Bcmo2 durch die sehr langsame Umsetzung von entstandenen Apocarotinoiden.

Der pH-Wert wurde mit 9,0 optimal für Bcmo2 gewählt, da der oxidative 9,10-Schnitt von β -Carotin geschwindigkeitsbestimmend für die Gesamtreaktion ist. Die Reaktion wurde bei 30°C mit 48 μ M β -Carotin in Tween 40 - Mizellen durchgeführt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben genommen, mit Chloroform extrahiert und per HPLC unter Verwendung externer Standards vermessen. Aufgrund von ungenauer Pipettierung unterschieden sich die Substrat-Anfangskonzentrationen der Reaktionsansätze geringfügig. Die β -Carotin-Konzentration wurde daher auf den Zeitpunkt 0:00 normalisiert und ist in % angegeben (Abb. 46 B). Der kombinierte Reaktionsansatz mit Bcmo2 und AtCCD1 enthielt jeweils die halbe molare Konzentration beider Enzyme im Vergleich zu den Umsätzen mit einem Enzym.

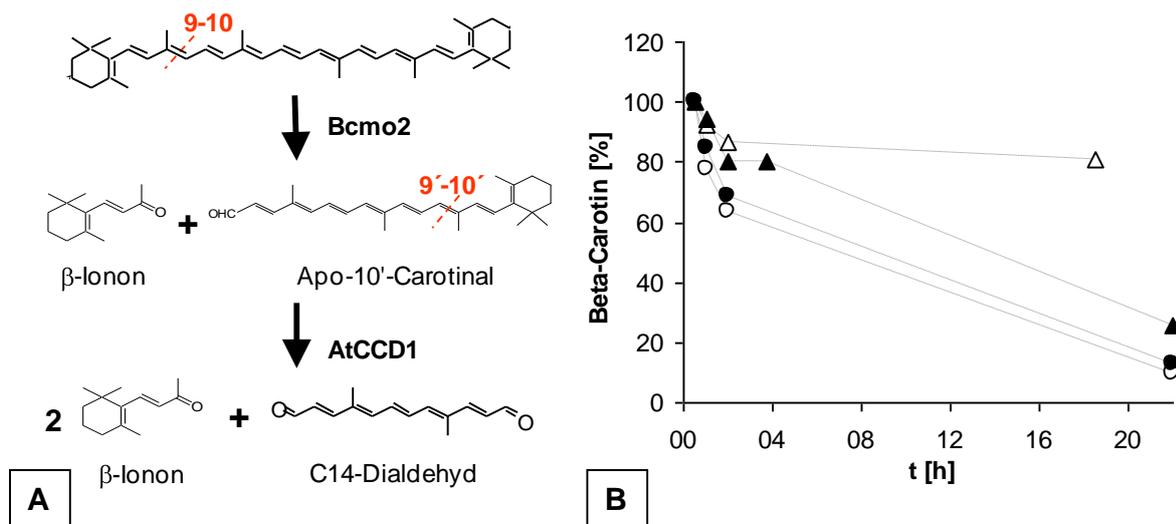


Abb. 46: (A) Schematische Abbildung des zweistufigen Verfahrens zur biokatalytischen Herstellung von β -Ionon aus β -Carotin. (B) Umsetzung von 48 μ M β -Carotin aus Tween 40 - Mizellen mit AtCCD1 (o), Bcmo2 (\blacktriangle) und der Kombination beider Enzyme bei jeweils halber molarer Konzentration (\bullet). Negativkontrolle mit Zellextrakt Leervektor-transformierter *E. coli* (Δ).

Durch den kombinierten Einsatz von Bcmo2 und AtCCD1 konnte in den ersten drei Stunden der Reaktion kein beschleunigter Umsatz von β -Carotin festgestellt werden. Die Abnahme der β -Carotin-Konzentration in der Negativkontrolle beruht auf autoxidativem Carotinoidabbau. In den ersten drei Stunden der Reaktion war den Ergebnissen von Abschnitt 5.2.1.1 nach mit keiner signifikanten Denaturierung der Enzyme zu rechnen, die das Ergebnis verfälscht hätte. Nach 22 Stunden Reaktionszeit war bei kombiniertem Enzymeinsatz weiterhin kein erhöhter β -Carotin-Umsatz festzustellen. Eine Synergie beim kombinierten Einsatz von Bcmo2 und eines CCD-Enzyms zur Umsetzung von β -Carotin konnte nicht gezeigt werden.

5.2.4 Zusammenfassung: Enzymexpression und -charakterisierung

In Abschnitt 5.2.1 wurden für das Verfahrenskonzept relevante, bisher unbekannte Eigenschaften von AtCCD1 bestimmt. Der pH-Wert für maximale spezifische Aktivität gegenüber drei unterschiedlich oxyfunktionalisierten C_{40} -Carotinoiden lag in allen Fällen bei 8,0 und damit um 1,0 über dem von Schilling ermittelten Wert für C_{30} -Apocarotinoide. Der pH-Wert für maximale Stabilität unter Reaktionsbedingungen wurde ebenfalls bestimmt und betrug pH 8,0. Nach 222 Stunden Lagerung bei Reaktionsbedingungen wurde eine spezifische Restaktivität

von 52 % ermittelt. Der Einfluss von fusionierten Polypeptiden auf die spezifische Aktivität von AtCCD1 gegenüber verschiedenen hydrophoben Substraten erwies sich als nahezu unabhängig von Substratgröße und –hydrophobizität.

In Abschnitt 5.2.2 wurde die Expression unter Coexpression molekularer Chaperone untersucht. Hauptaugenmerk waren die Ermittlung der optimalen Chaperon-Kombination sowie der genaue Einfluss von Chaperonen auf die spezifischen Aktivitäten der fusionierten Polypeptid-Untereinheiten. Es wurde eine optimale Chaperon-Kombination identifiziert, die eine um den Faktor 2,4 verbesserte volumetrische Aktivität bei der Expression ermöglichte. Die Wirkung von Chaperonen auf Fusionsprotein-Untereinheiten wurde untersucht und eine unterschiedlich ausgeprägte, manchmal sogar gegensinnige Wirkung nachgewiesen.

Da nach aktuellen Veröffentlichungen C₄₀-Substrate nicht die Hauptsubstrate von AtCCD1 darstellen (Floss et al., 2008, Floss und Walter, 2009) wurden in Abschnitt 5.2.3 die alternativen Carotinasen RdCCD1 und Bcmo2 untersucht, um möglicherweise effektivere Biokatalysatoren zu identifizieren. RdCCD1 wies in Bezug auf spezifische Aktivität und Expressionsausbeute keine wesentlichen Unterschiede zu AtCCD1 auf. Das murine Enzym Bcmo2 wurde charakterisiert. Die spezifischen Aktivitäten gegenüber verschiedenen C₃₀- und C₄₀-Carotinoiden deuten auf Xanthophylle als *in vivo* Substrate des Enzyms hin. Für das angestrebte Verfahrenskonzept erwies sich Bcmo2 jedoch weder alleine noch in einem zweistufigen Verfahren mit AtCCD1 besser geeignet als AtCCD1.

5.3 Biomasse als Substratquelle

Die Herstellung von als „natürlich“ deklarierbaren Aromastoffen erfordert Substrat natürlicher Herkunft. Der Marktpreis von kristallinem β -Carotin aus natürlichen Quellen liegt bei Abnahme großindustrieller Mengen mit 150-200 €/kg deutlich über dem für synthetisches β -Carotin. Die Wirtschaftlichkeit eines biokatalytischen Herstellungsprozesses für β -Ionon hängt in hohem Maß von den Kosten des eingesetzten natürlichen Substrats ab. Die Nutzung von carotinoidhaltiger Biomasse als Ausgangsmaterial würde neben einem möglichen ökonomischen

Vorteil auch nicht-monetäre Vorteile bei der Vermarktung des natürlichen Aromaproduktes bieten.

Verschiedene Typen von carotinoidhaltiger Biomasse kommen als Substratquelle für das beabsichtigte Modellverfahren im Labormaßstab in Frage: Carotinoidhaltige Trester aus der Safftherstellung sowie carotinoidhaltige Pilz-, Pflanzen-, Algen- oder cyanobakterielle Biomasse. Zwei Kriterien waren bei der Auswahl des eingesetzten Biomassetyps maßgeblich: Die Konzentration an Carotinoiden und das Carotinoidspektrum im jeweiligen Biomassetyp. Insbesondere Punkt zwei ist für den technischen Einsatz von Relevanz, da das eingesetzte Enzym AtCCD1 eine große Bandbreite verschiedener Carotinoide und Apocarotinoide spaltet. Hochwertige Aromastoffe entstehen jedoch vornehmlich bei der symmetrischen 9,10/9',10'-Spaltung von β -Carotin und Zeaxanthin, wobei β -Ionon beziehungsweise 3-Hydroxy- β -Ionon erzeugt werden. Um die grundsätzliche Durchführbarkeit der *in vitro* - Umsetzung von β -Carotin aus Biomasse zu zeigen, wurde zunächst die Nutzung von Carotinoid produzierenden *E. coli* - Zellen untersucht. Anschließend wurde die enzymatische Umsetzung von Carotinoiden aus Cyanobakterienbiomasse untersucht und erste Verbesserungsschritte durchgeführt.

5.3.1 Rekombinant in *E.coli* produziertes β -Carotin

Die *de novo* Synthese von β -Carotin in rekombinanten Mikroorganismen als Ausgangsstoff für die biokatalytische Herstellung von β -Ionon stellt für die Aromastoffindustrie aufgrund der gültigen Auslegung der europäischen Aromenverordnung und der Konsumentenhaltung keine gangbare Option dar. Langfristig könnte die bereits beschriebene *de novo* Synthese von β -Ionon in *E. coli* (Schilling, 2008) oder anderen Organismen jedoch auch für den Markt natürlicher Aromen einsetzbar werden. Bis dahin kann die marktgerechte Herstellung nur durch Umsetzung von natürlichem β -Carotin in aufgereinigter Form oder in Form von Biomasse mit isoliertem, rekombinant exprimiertem Enzym erfolgen. Um die Durchführbarkeit der *in vitro* - Umsetzung von β -Carotin aus Biomasse zu zeigen, wurde zunächst die Nutzung von β -Carotin produzierenden *E. coli* - Zellen untersucht. Diese Herangehensweise stellt die kleinste Veränderung gegenüber dem häufig verwendeten *in vivo* Komplementations-Test in *E. coli* (Cunningham

und Gantt, 2007) dar, in welchem die symmetrische 9,10 / 9',10'-Spaltung von β -Carotin bereits gezeigt wurde (Schwartz et al., 2001). Die eingesetzten β -Carotin bildenden *E. coli* - Stämme wurden von Prof. Gerhard Sandmann, Universität Frankfurt, zur Verfügung gestellt. Sie waren mit einem Plasmid transformiert, welches den Biosynthesecoluster von *Erwinia herbicola* für β -Carotin beziehungsweise Zeaxanthin beinhaltete. Die eingesetzte AtCCD1-Modifikation war GST-AtCCD1. Die Zellpellets wurden gemischt, gemeinsam sonifiziert und die Reaktion bei 30°C in 20 mM Tris pH 7,5 durchgeführt. Die Reaktionslösung wurde mit dem halben Probenvolumen Chloroform extrahiert und der Extrakt per GC/MS auf die Reaktionsprodukte β -Ionon und 3-Hydroxy- β -Ionon analysiert. Für beide Carotinoide konnten die entsprechenden Produkte nachgewiesen werden. Die Umsetzung von Zeaxanthin erfolgte schnell und vollständig: Die Reaktionslösung entfärbte sich, und es trat gegenüber der Kontrolle im Totalionenchromatogramm ein neuer Peak auf (Abb. 47 A). Die Substanz konnte durch Datenbankvergleich anhand des Massenspektrums als 3-Hydroxy- β -Ionon identifiziert werden (Abb. 47 B).

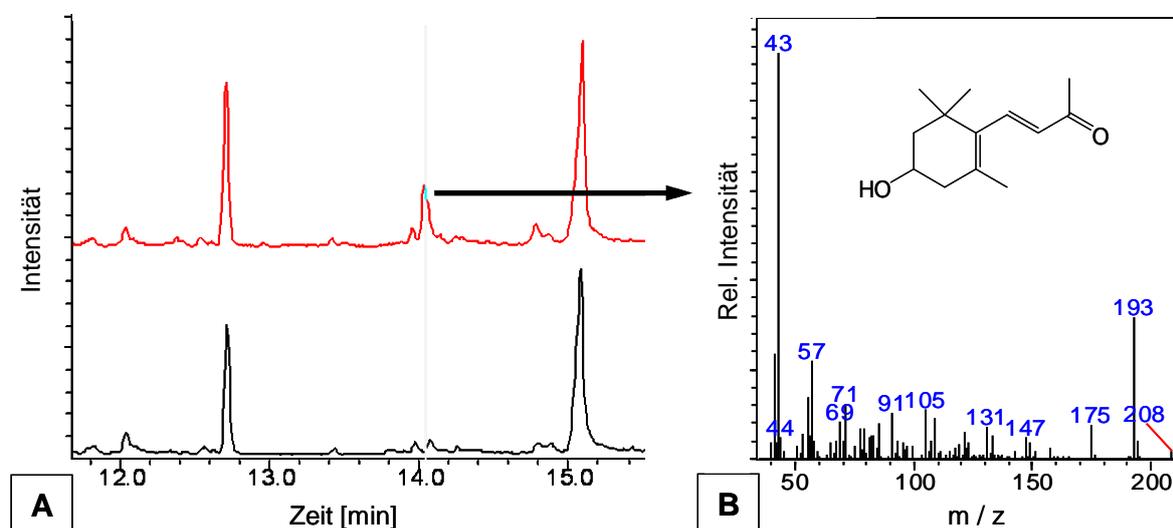


Abb. 47: (A) Totalionenchromatogramm einer GC/MS-Analyse der Reaktionsprodukte von Lysat GST-AtCCD1 exprimierender *E. coli* mit Lysat Zeaxanthin bildender *E. coli* (oben). Als Kontrolle (unten) diente das Lysat mit dem Leervektor pGEX-4T-1 transformierter und identisch kultivierter Zellen. (B) Massenspektrum zum Zeitpunkt 14,1 min. Das Produkt konnte anhand seiner Retentionszeit und des Massenspektrums identifiziert werden.

Die Umsetzung von β -Carotin aus *E. coli* Biomasse führte zu einem sehr schwachen β -Ionon-Signal, das erst bei der Ionenspur $m/z = 177$ deutlich erkennbar ist (Abb. 48 A). Anhand der Retentionszeit und durch Vergleich des Massenspektrums (Abb. 48 B) konnte die Substanz als β -Ionon identifiziert werden. Die Reaktionslösung entfärbte sich nicht, der Umsatz war demnach nicht vollständig.

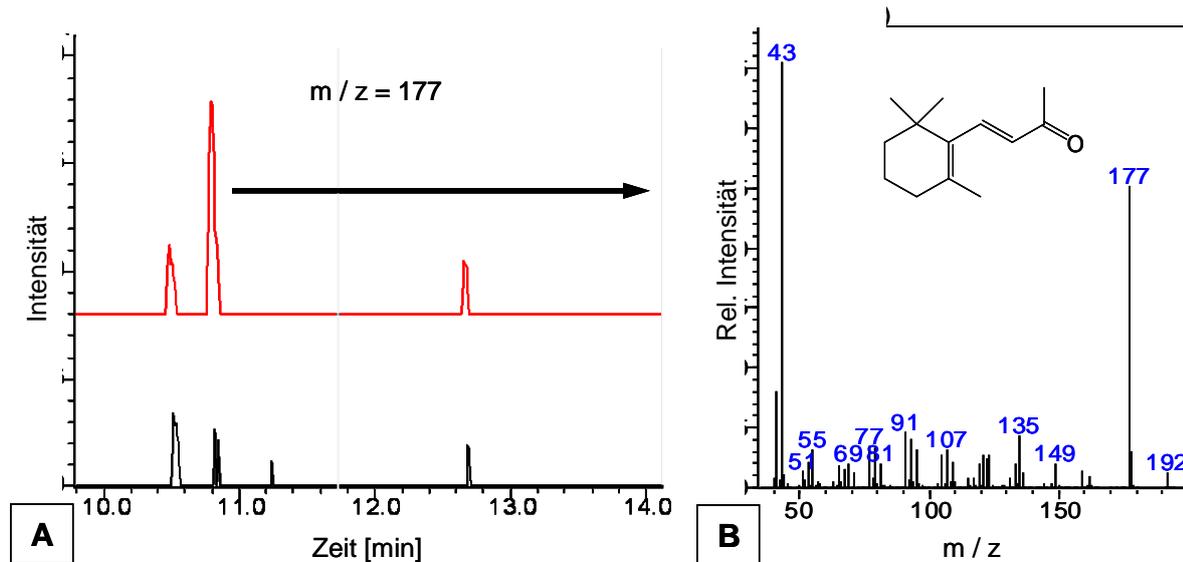


Abb. 48: (A) Ionenchromatogramm von $m/z=177$ für GC/MS-Analyse der Reaktionsprodukte von Lysat GST-AtCCD1 exprimierender *E. coli* mit Lysat β -Carotin bildender *E. coli* (oben). Als Kontrolle diente das Lysat mit dem Leervektor pGEX-4T-1 transformierter und identisch kultivierter Zellen (unten). (B) Massenspektrum zum Zeitpunkt 10,7 min. Das Produkt konnte anhand seiner Retentionszeit und dem Massenspektrum identifiziert werden.

5.3.2 *Spirulina platensis* Biomasse

Nach umfangreicher Literaturrecherche wurde Biomasse der Blaualge *Spirulina platensis* als zu untersuchender Biomassetyp ausgewählt. Die Biomasse dieses Organismus ist für den beabsichtigten Einsatz als Substratquelle bei der biokatalytischen Herstellung von natürlichem β -Ionon besonders geeignet. Im Gegensatz zu vielen anderen Biomassetypen sind in *Spirulina platensis* nur die zwei benötigten Carotinoide wertbestimmend: β -Carotin und Zeaxanthin (Tab. 9). Außerdem sind geringe Konzentrationen von Lutein vorhanden, woraus bei 9,10-Spaltung die Aromastoffe 3-Hydroxy- α -Ionon und 3-Hydroxy- β -Ionon entstehen. Die Anzahl und die maximal mögliche Konzentration von Nebenprodukten sind bei Einsatz dieses Biomassetyps besonders gering.

Tab. 9: Carotinoidgehalt von *Spirulina platensis* Biomasse bezogen auf die Trockensubstanz. Quelle: IGV Institut für Getreideverarbeitung GmbH, persönliche Kommunikation. TS: Trockensubstanz.

Carotinoid	Konzentration [mg / 100 g TS]
Zeaxanthin	80,8
β-Carotin	96,2
Lutein	10,4

Bei *Spirulina platensis* handelt es sich um ein halophiles, phototrophes Cyanobakterium, das *in natura* in alkalischen Süßwasservorkommen in Süd- und Ostafrika wächst. Die Kultivierung in Photobioreaktoren und die Techniken zur konsumgütergerechten Zellernte sind intensiv untersucht und optimiert worden (Travieso et al., 2001, Morist et al., 2001). Die kontinuierliche Kultur ist möglich und wird im sogenannten *Raceway*-Verfahren auch industriell durchgeführt (Jimenez et al., 2002). Der CO₂-Bedarf von *Spirulina* in der industriellen Kultur ist sehr hoch und wird in Farmen in Kalifornien und auf Hawaii über Druckbegasung des Kulturmediums gedeckt. Eine parallele Nutzung zur industriellen CO₂-Fixierung ist denkbar. In getrockneter Form ist *Spirulina* Biomasse für ein Naturprodukt hervorragend technisch handhabbar und lagerungsbeständig und kann damit leicht in industrielle Versorgungsketten eingebunden werden (Kumar et al., 1995).

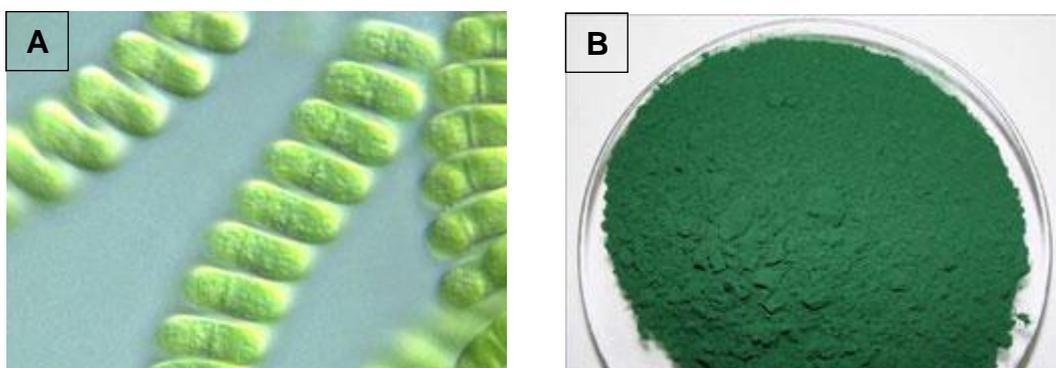


Abb. 49: Wendelförmige mehrzellige Strukturen (A) und getrocknete pulverförmige Biomasse (B) von *Spirulina platensis*. Quelle von A: www.spirulina.com.

Bisher findet *Spirulina platensis* vor allem Anwendung als Nahrungsergänzungsmittel: Das Cyanobakterium besitzt mit rund 60 % (w/w) den höchsten bekannten Proteingehalt eines Nahrungsmittels und enthält hohe Konzentrationen an Vitaminen und Mineralien. Aufgrund dieser Eigenschaften wird *Spirulina* unter anderem auch von der europäischen Weltraumbehörde ESA als kultivierbare Nahrungsquelle bei interplanetaren Reisen erforscht (Godia et al., 2004). Die untersuchte *Spirulina platensis* Biomasse wurde von der IGV GmbH, Nuthetal, zur Verfügung gestellt.

5.3.2.1 Umsetzung von β -Carotin aus *Spirulina platensis* Biomasse

Die biokatalytische *in vitro* - Umsetzung von Carotinoiden aus cyanobakterieller Biomasse ist bisher nicht untersucht. Welche Prozessierungsschritte notwendig sind, um die enthaltenen Carotinoide enzymatisch zugänglich zu machen, kann nur in begrenztem Umfang anhand von Arbeiten zur Bioverfügbarkeit von Carotinoiden aus Algen abgeleitet werden. Cyanobakterien wie *Spirulina platensis* akkumulieren Carotinoide nahezu ausschließlich innerhalb von Membranen. Die Carotinoide werden als Protein-Carotinoid-Komplexe in der photosynthetischen Membran, der Zellmembran und der Zellwand akkumuliert (Hirschberg und Chamovitz, 1996). Die zwei zentralen Herausforderungen für eine biokatalytische Umsetzung der Carotinoide sind daher einerseits der Zellaufschluss und die Freilegung carotinoidhaltiger Membranen aus dem Zellinneren, andererseits die Trennung der Protein-Carotinoid-Komplexe, um eine enzymatische Umsetzung der Substrate zu ermöglichen.

Zunächst wurden Untersuchungen zur Umsetzung von β -Carotin aus *Spirulina platensis* durchgeführt, in denen die Biomasse allein durch ein Zellaufschlussverfahren behandelt wurde. Anschließend wurden Maßnahmen zur Verbesserung der Reaktionsausbeute durchgeführt, die eine verbesserte Mobilisierung des Carotinoids aus seinen Depots (Abschnitt 5.3.2.2) oder eine verbesserte Substratzugänglichkeit durch Hydrolyse der Carotinoid-Protein-Komplexe (Abschnitt 5.3.2.3) verfolgten.

Der Aufschluss von Cyanobakterien-Zellen führt in der Regel zur Bildung einer Lipid-in-Wasser-Emulsion. Da AtCCD1 in Emulsionen nur geringe Aktivität zeigte,

ist für die biokatalytische Umsetzung die Überführung der Emulsion in ein System aus gemischten Mizellen sinnvoll, in dem die AtCCD1-Aktivität bereits optimiert wurde. Der Übergang von Carotinoiden und Carotinoid-Protein-Komplexen aus Biomasse-Emulsionen in gemischte Mizellen durch Zugabe von Tensidkonzentrationen oberhalb der jeweiligen CMC wurde bereits nachgewiesen und in einigen Aspekten charakterisiert (Tyssandier et al., 2001, Milicua et al., 1991).

Zum Aufschluss der *Spirulina*-Zellen wurde aufgrund der geringen benötigten Probenvolumina Ultraschall eingesetzt. Im technischen Maßstab ist dieses Verfahren nicht praktikabel und kann durch Hochdruckhomogenisation ersetzt werden. Da es sich bei beiden Methoden um kavitative Zellaufschlussverfahren handelt, sind Ergebnisse zwischen ihnen bei Berücksichtigung des spezifischen Leistungseintrags und systemspezifischer Parameter übertragbar (Chisti und Moo-Young, 1986). Getrocknete *Spirulina platensis* Biomasse wurde in 50 mM Tris pH 8,5 suspendiert und bei 20 W Schalleistung mit einem Gesamtenergieeintrag von $2,4 \text{ kJ} \cdot \text{ml}^{-1}$ in Intervallen von 0,5 s Beschallung und 0,5 s Pause in einem 20°C Wasserbad aufgeschlossen. Nach der Zellyse wurde 8 mM Tween 40 zugegeben und die Mizellarisierung für 60 min bei 40°C und 1400 rpm in einem Reaktionsgefäß-Schüttler durchgeführt. Die Reaktion erfolgte für 14 Stunden bei 30°C und 1000 rpm in geschlossenen 2 ml - Kunststoffgefäßen mit Lysat AtCCD1 exprimierender *E.coli*. Die Konzentrationen von β -Carotin, Zeaxanthin und β -Ionon wurden per HPLC unter Verwendung externer Standards bestimmt.

Innerhalb der Versuchszeit wurden rund 18 % des vorhandenen β -Carotins und rund 35 % des vorhandenen Zeaxanthins umgesetzt (Abb. 50 A und B). Die β -Ionon-Konzentration stieg im selben Zeitraum von $1,8 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ auf $6,8 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (Abb. 50 C). Es wurden geringe Verluste beider Carotinoide durch Autoxidation oder unspezifische Reaktion mit Lysatbestandteilen festgestellt.

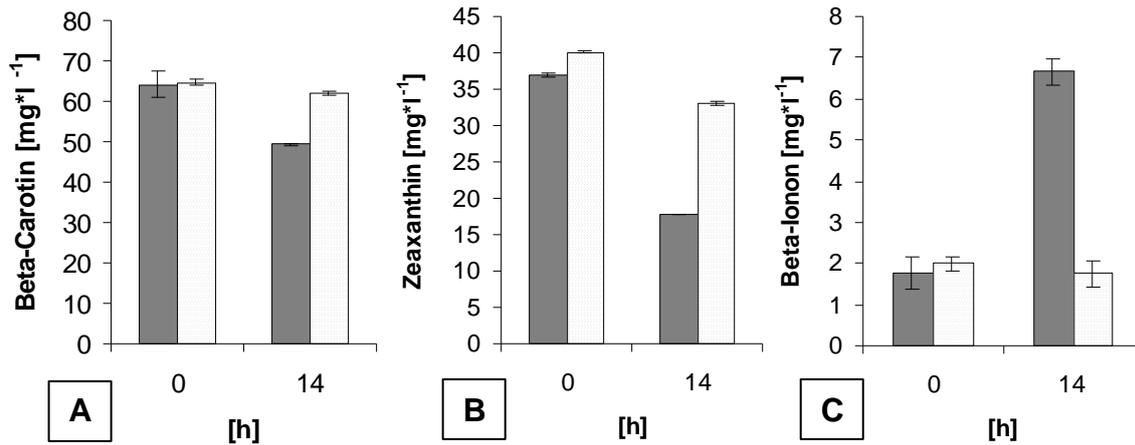


Abb. 50: Veränderung der Konzentrationen von β -Carotin (A), Zeaxanthin (B) und β -Ionon (C) nach 14 h Inkubation von aufgeschlossener *Spirulina platensis* Biomasse mit Lysat von GST-AtCCD1 exprimierenden *E. coli*-Zellen. Grau: GST-AtCCD1. Gepunktet: Kontrolle mit Leervektor-transformierten Zellen. Reaktion bei 30°C und 1000 rpm. Die Carotinoide wurden nach Zellaufschluss für 60 min bei 40°C und 1400 rpm mit 8 mM Tween 40 solubilisiert.

5.3.2.2 Verbesserung der Mizellarisierung durch organische Lösungsmittel

Der Übergang von Carotinoiden aus Emulsionstropfen in gemischte Mizellen wurde bereits im Rahmen von Untersuchungen zur intestinalen Absorption von Carotinoiden untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass insbesondere stark hydrophobe Carotinoide wie β -Carotin schlecht aus den Lipid-Vesikeln in gemischte Mizellen mobilisiert werden können (Tyssandier et al., 2001). Es ist anzunehmen, dass der Transfer der Carotinoide durch eine Hydrophobisierung des Soluten verbessert wird. Die Hydrophobizität von Wasser kann unter anderem durch die Mischung mit Cosolventien beeinflusst werden.

Es wurden Untersuchungen zur Auswirkung von organischen Lösungsmitteln auf die Mizellarisierung und Biokonversion von Carotinoiden aus *Spirulina* Biomasse durchgeführt. Getestet wurden mit Ethanol ein wassermischbares Lösungsmittel und mit Oleylalkohol und Butylstearat zwei nicht wassermischbare, biokompatible Lösungsmittel. Die Lösungsmittelzugabe erfolgte nach dem Zellaufschluss und vor dem Mizellarisierungsschritt. Es wurde jeweils eine Lösungsmittelkonzentration von 27 % (v/v) während der Mizellarisierung eingestellt, die zu einer Konzentration von 10 % (v/v) während der enzymatischen Reaktion führte. Die Reaktionsbedingungen entsprachen ansonsten den in Abschnitt 5.3.2.1 geschilderten. Die Reaktion wurde nur 14 h durchgeführt, weshalb die

beschriebenen Umsätze nicht die maximal erreichbaren Werte darstellen. Negativkontrollen wurden wie bereits beschrieben mitgeführt und anhand von ihnen autoxidativer oder unspezifischer Carotinoidabbau aus den Umsätzen herausgerechnet. Für β -Carotin konnte mit allen getesteten Lösungsmitteln eine verbesserte Mizellarisierung und damit ein erhöhter Umsatz innerhalb von 14 Stunden erreicht werden (Abb. 51 A). Für Zeaxanthin wurde nur mit dem wassermischbaren Cosolvens Ethanol eine deutliche Verbesserung des Umsatzes erzielt (Abb. 51 B).

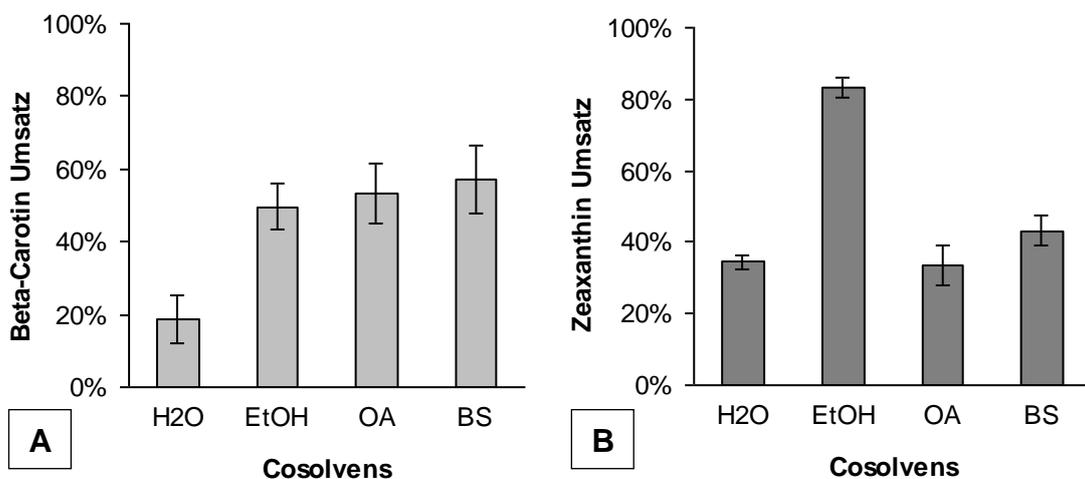


Abb. 51: Umsatz nach 14h der Carotinoide β -Carotin (A) und Zeaxanthin (B) aus *Spirulina platensis* Biomasse bei Einsatz verschiedener organischer Lösungsmittel während der Mizellarisierung. Lösungsmittelkonzentration: 27 % (v/v) während Mizellarisierung, 10 % (v/v) während Reaktion. H2O: Wasser, EtOH: Ethanol, OA: Oleylalkohol (cis-9-Octadecen-1-ol), BS: Butylstearat.

Möglicherweise beruht der erhöhte Umsatz von Zeaxanthin auf einer erhöhten Reaktionsgeschwindigkeit infolge einer Umstrukturierung des mizellaren Systems durch das Cosolvens (Schilling et al., 2007). In hier nicht dargestellten Untersuchungen wurde beobachtet, dass die Beschleunigung der AtCCD1-Reaktion nur bei Xanthophyllen und Apocarotinoiden, nicht jedoch bei β -Carotin auftritt. Da ein erhöhter Zeaxanthin-Umsatz nur mit einem wassermischbaren Cosolvens erreicht wurde, ist möglicherweise nicht eine verbesserte Mizellarisierung, sondern eine schnellere Reaktion des ohnehin leichter zu mizellarisierenden Zeaxanthins (Tyssandier et al., 2001) die Ursache. Die Möglichkeit zur Mobilisierung von β -Carotin aus cyanobakterieller Biomasse mithilfe biokompatibler organischer Lösungsmittel wie Oleylalkohol und Butylstearat ist in mehrfacher Hinsicht erfreulich: Die kontinuierliche biokompatible Extraktion von β -

Carotin aus wachsenden Grünalgenkulturen mit solchen Solventien ist bereits beschrieben (Mojaat et al., 2008). Das Verfahren könnte in Zukunft genutzt werden, um eine kontinuierliche Carotinoidbiokonversion mit einer kontinuierlichen Substratdarstellung zu koppeln.

5.3.2.3 Mizellarisierung nach saurer Hydrolyse von Carotino-Proteinen

Verschiedene Arbeiten beschreiben, dass β -Carotin in natürlichen Quellen üblicherweise als Komplex mit carotinoidbindenden Proteinen vorliegt (Milicua et al., 1991, Borowska et al., 2003). Auch für Cyanobakterien wie *Spirulina* existieren entsprechende Arbeiten (Kirilovsky, 2007). Die Zugänglichkeit für das Verdauungssystem ist bei komplexierten Carotinoiden sehr schlecht. Eine Hydrolyse von Carotino-Protein-Komplexen und Auflösung der Membranstrukturen ist durch Inkubation der Biomasse für 30 Minuten mit 4 % Essigsäure möglich und verbessert die Extrahierbarkeit von β -Carotin stark (Jaramillo-Flores et al., 2005). Es wurde untersucht, ob eine Inkubation von *Spirulina*-Biomasse unter hydrolytischen Bedingungen während des Zellaufschlusses gefolgt von einer Neutralisierung vor der enzymatischen Reaktion zu einer verbesserten Carotinoid-Mizellarisierung und -umsetzung führt. Alle übrigen experimentellen Parameter wurden wie in Abschnitt 5.3.2.2 gewählt. Die Inkubation in Essigsäure während Zellyse und anschließende Neutralisierung nach der Mizellarisierung verschlechterte die Umsetzung beider Carotinoide deutlich (Abb. 52).

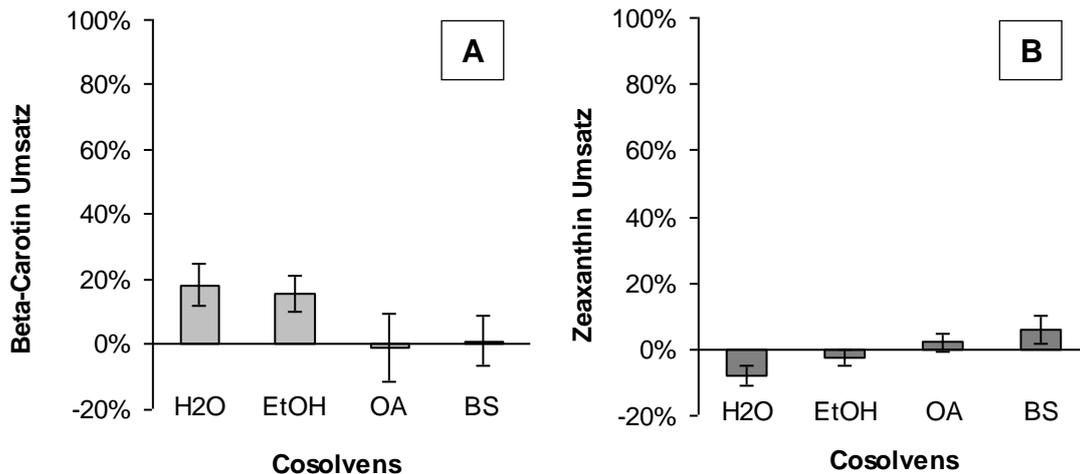


Abb. 52: Umsatz der Carotinoide β -Carotin (A) und Zeaxanthin (B) aus *Spirulina platensis* Biomasse bei Zellaufschluss und Mizellarisierung in 4 % (v/v) Essigsäure. Einsatz verschiedener organischer Lösungsmittel während der Mizellarisierung. Lösungsmittelkonzentration: 27 % (v/v) während Mizellarisierung, 10 % (v/v) Endkonzentration während Reaktion. H₂O: Wasser, EtOH: Ethanol, OA: Oleylalkohol (cis-9-Octadecen-1-ol), BS: Butylstearat.

Die HPLC-Ergebnisse der mitgeführten Negativkontrollen zeigten, dass die Carotinoidkonzentration durch die hydrolytische Inkubation mit Essigsäure nicht signifikant abnahm. Möglicherweise wurde das Tensid durch die Mizellarisierung bei saurem pH hydrolysiert und die Ausbildung carotinoidbeladener Vesikel konnte nicht mehr stattfinden.

5.3.3 CO₂-Extrakt aus *Spirulina*-Biomasse

Die Geschwindigkeit der biokatalytischen Umsetzung von β -Carotin aus *Spirulina*-Biomasse zu β -Ionon ist niedrig. Dies ist einerseits in der grundsätzlich niedrigen Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms AtCCD1 begründet, andererseits aber auch in der niedrigen Substratkonzentration, die beim Einsatz von Biomasse als Substrat vorherrscht. Durch den Einsatz von carotinoidhaltigen Primärprodukten könnte gegenüber dem Einsatz von Biomasse eine höhere Substratkonzentration erreicht werden, ohne dabei die Substratkosten soweit zu erhöhen, wie es bei Verwendung von kristallinem natürlichem β -Carotin der Fall wäre.

Die Extraktion von hydrophoben Substanzen mittels überkritischem CO₂ stellt einen einfachen ersten Verarbeitungsschritt für Biomasse dar. Durch die Wahl der Extraktionsbedingungen kann das Spektrum an extrahierten Carotinoiden gesteuert

werden (Gamlieli-Bonshtein et al., 2002). Das Cyanobakterium *Spirulina platensis* enthält nur die beiden Carotinoide β -Carotin und Zeaxanthin sowie geringe Konzentrationen von Lutein. Durch Verwendung eines CO₂-Extraktes kann das Carotinoidspektrum weiter auf β -Carotin eingeeengt werden. In Tabelle 10 sind die Konzentrationen der im CO₂-Extrakt enthaltenen Carotinoide aufgeführt.

Tab. 10: Carotinoidgehalt des CO₂-Extrakt aus *Spirulina platensis* Biomasse bezogen auf die Trockensubstanz (TS).
Quelle: IGV Institut für Getreideverarbeitung GmbH, persönliche Kommunikation.

Carotinoide	Konzentration [mg / 100 g TS]
β -Carotin	8948
Zeaxanthin	482
Echinenon	218

Die Trockenmasse-Konzentration von β -Carotin war im CO₂ - Extrakt um den Faktor 93 höher als in *Spirulina platensis* Biomasse. Das molare Verhältnis von β -Carotin zur Summe anderer Carotinoide und das daraus resultierende maximale Verhältnis von β -Ionon zu Nebenprodukten ist im CO₂ - Extrakt mit 12,8 : 1 wesentlich höher als in Biomasse mit 0,76 : 1.

5.3.3.1 Umsetzung in Gegenwart von Detergenzien und organischen Cosolventien

Die Umsetzung von CO₂ - Extrakt aus *Spirulina platensis* Biomasse mit GST-AtCCD1 wurde untersucht. Verschiedene Zusammensetzungen des Reaktionssystems wurden parallel getestet, um den Effekt von nichtionischem Tensid und von wassermischbarem organischem Cosolvens auf die enzymatische Reaktion zu bestimmen. Der CO₂ - Extrakt wurde entweder unverändert, mit 16 mM Tween 40 oder mit 10 %(v/v) Ethanol umgesetzt. Die β -Carotin-Konzentration betrug in allen Ansätzen 90 μ M. Im Reaktionsansatz mit Tensid wurde keine Mizellarisierung durchgeführt, sondern der CO₂-Extrakt mit dem Tensid in THF gelöst und das Lösungsmittel unter Vakuum abgezogen. Der entstandene Tensidfilm wurde in Reaktionspuffer gelöst. Als Negativkontrollen wurden

Reaktionsansätze mit Zellextrakten Leervektor-transformierter und identisch kultivierter Zellen angesetzt und der in diesen Proben gemessene, unspezifische Carotinoidverlust rechnerisch berücksichtigt. Die β -Carotin-Konzentration wurde nach dreifacher Aceton-Extraktion mittels HPLC unter Verwendung externer Standards ermittelt.

Alle drei Reaktionszusammensetzungen führten über 8,5 Stunden zu einem enzymatischen β -Carotin-Umsatz zwischen 12 und 18 % (Abb. 53). Der Einsatz von 16 mM Tween 40 verringerte den Umsatz, der Einsatz von 10 % (v/v) Ethanol als Cosolvens führte über 8,5 Stunden zu keiner Veränderung. Für die Umsetzung von β -Carotin durch AtCCD1 notwendige vesikelbildende Substanzen sind offensichtlich bereits im CO_2 -Extrakt enthalten.

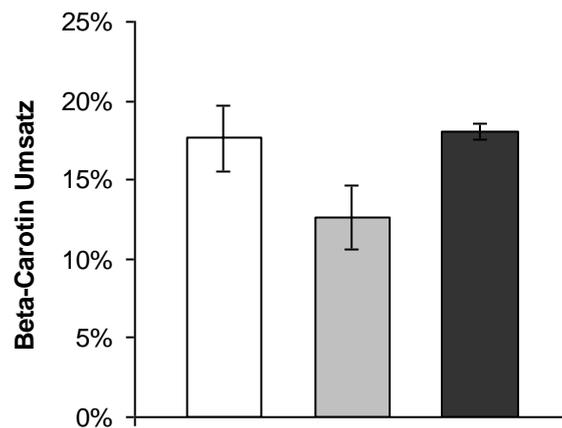


Abb. 53: Umsatz des CO_2 -Extrakt aus *Spirulina platensis* nach 8,5 h ohne Zusatzstoffe (weiß), mit 16 mM Tween 40 (grau) und mit 10 % (v/v) Ethanol (schwarz). Reaktion: 30°C und 1000 rpm in 50 mM Tris pH 8,5. β -Carotin-Konzentration: 90 μM .

Die CO_2 -Extraktion von Carotinoiden aus *Spirulina* Biomasse führt immer zu einer Mitextraktion anderer hydrophober Substanzen wie Fettsäuren. Aus *Spirulina* werden insbesondere Palmitinsäure, Linolensäure und Linolsäure mitextrahiert (Wang et al., 2007). Fettsäuren können spontan stabile Vesikel bilden (Apel et al., 2002) und sind möglicherweise die Ursache dafür, dass β -Carotin aus CO_2 -Extrakt von *Spirulina platensis* auch ohne Einsatz von Tensiden oder Phospholipiden umgesetzt wird.

Der innerhalb der Reaktionszeit umgesetzte Anteil an β -Carotin erscheint bei Verwendung von CO_2 -Extrakt als Substratquelle deutlich niedriger als bei

Verwendung von aufgeschlossener Biomasse (siehe Abschnitt 5.3.2). In den Untersuchungen zur Umsetzung von CO₂-Extrakt wurde jedoch eine höhere β -Carotin-Konzentration eingesetzt und die Reaktion nur 8,5 anstatt 14 Stunden durchgeführt. Die Berechnung der umgesetzten Stoffmenge pro Zeit zeigt, dass die Geschwindigkeiten der β -Carotin-Spaltung aus aufgeschlossener Biomasse ($1,97 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) und CO₂-Extrakt ($1,89 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) bei gleicher Enzymkonzentration in der selben Größenordnung sind. Die Ähnlichkeit der Werte beruht auf dem Substratüberschuss, der in beiden Reaktionen bis zum Ende der Messung vorherrschte.

5.3.4 Biomasse als Substratquelle: Zusammenfassung und Ausblick

Die Nutzung preisgünstiger, sogenannter „technischer“ Substratquellen wie carotinoidhaltige Biomasse für die biokatalytische Herstellung von β -Ionon aus β -Carotin ist möglich. Die erzielten Reaktionsgeschwindigkeiten und -ausbeuten waren für ein nur teilweise definiertes Reaktionssystem überraschend hoch. Durch Einsatz verschiedener biokompatibler organischer Lösungsmittel konnte der Übergang des stark apolaren Substrats β -Carotin in gemischte Mizellen deutlich verbessert und der erzielte Umsatz mehr als verdoppelt werden. Für das polar substituierte Substrat Zeaxanthin war eine Erhöhung des Umsatzes nur mithilfe eines einzigen wassermischbaren kurzkettigen Alkohols möglich. Anders als im Fall von β -Carotin beruht dieser Effekt vermutlich nicht auf verbesserter Mizellarisierung, sondern auf einer erhöhten Reaktionsgeschwindigkeit analog zu dem in Mizellen beschriebenen Effekt. Auch der Einsatz von CO₂-Extrakt aus *Spirulina platensis* Biomasse zur biokatalytischen Herstellung von β -Ionon ist möglich. Der Extrakt enthält bereits die für einen biokatalytischen β -Carotin-Umsatz notwendigen Substanzen zur monomolekularen Solubilisierung des Carotinoids in Pufferlösung. Gegenüber dem Einsatz von kristallinem Substrat entfallen die Kosten für Tensid zur Mizellarisierung sowie der Arbeitsaufwand für die Herstellung mizellarer Carotinoidlösungen. Die Einkaufskosten für carotinoidhaltige Biomasse sind schwierig anzugeben. Nur wenige Angaben sind öffentlich zugänglich. Bei einem Biomassepreis für *Spirulina* im Bereich von 6 - 8 US\$/kg (Vonshak, 1997) ist die Preisdifferenz gegenüber kristallinem natürlichem β -Carotin maßgeblich von der erzielten β -Carotin-Konzentration in der Biomasse abhängig. Die Wirtschaftlichkeit

des Einsatzes von technischen Substratquellen hängt darüberhinaus von den Kosten für weitere Komponenten der Reaktionslösung ab, deren Bedarf wiederum vom Carotinoidgehalt und der notwendigen Prozessierung der eingesetzten Biomasse abhängt. Langfristig ist zu erwarten, dass eine vollständige *in vivo* Synthese für natürliches β -Ionon mittels gentechnisch veränderter Mikroorganismen am Markt durchsetzbar ist. Cyanobakterien (Blualgen) bieten sich als Plattform für ein solches Verfahren an. Sie sind in der Lage, hohe Carotinoidkonzentrationen unter geringem Kultivierungsaufwand zu bilden und können gleichzeitig für die politisch geförderte CO₂-Fixierung eingesetzt werden. Es sind bereits carotinoidspaltende Oxygenasen aus Cyanobakterien publiziert (Kloer et al., 2005), bei denen eine hohe Chance auf funktionale Überexpression in carotinoidbildenden Cyanobakterienstämmen besteht.

5.4 *In situ*-Produktabtrennung durch organophile Pervaporation

5.4.1 Auswahl und Charakterisierung der Pervaporationsmembran

Die organophile Pervaporation wird in der industriellen Praxis noch sehr selten angewendet, während die hydrophile Pervaporation bereits in weit verbreiteten Prozessschritten wie der Entwässerung oder Trennung von Lösungsmitteln eingesetzt wird (Bowen et al., 2004). Organophile Pervaporationsmembranen sind - insbesondere im Labormaßstab - entsprechend schwierig zu bekommen. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen standen drei Membrantypen zur Verfügung: „2420G/V-1“ und „2421G/V-2“ (GMT Membrantechnik, Rheinfelden) und „POMS/PEI“ (GKSS Forschungszentrum Geesthacht GmbH). Die Charakterisierung der Pervaporationsmembranen umfasste folgende Schritte: Bestimmung des Durchmessers der aktiven Membranschicht, Bestimmung der Flussraten aller Komponenten sowie des Aufreinigungsfaktors für β -Ionon aus einer prozessähnlichen Modellösung.

5.4.1.1 Aufbau untersuchter Pervaporationsmembranen

Bei allen drei Membranen handelte es sich um Membranen mit einem zweischichtigen Stützsystm und einer aktiven Schicht aus einem Polysiloxan. Der

grundlegende Aufbau der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten organophilen Pervaporationsmembranen ist in Abbildung 54 A dargestellt.

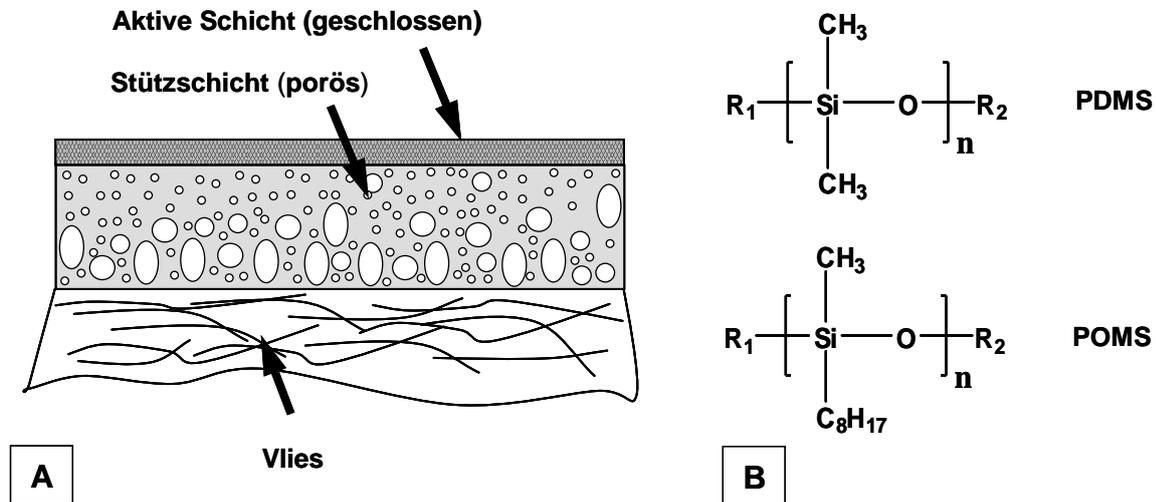


Abb. 54: (A) Schematischer Aufbau einer Komposit-Pervaporationsmembran. (B) Polymertypen der aktiven Schichten untersuchter Membranen. PDMS: Polydimethylsiloxan. POMS: Polyoctylmethylsiloxan.

Die Membran „POMS/PEI“ des GKSS-Forschungszentrums Geesthacht besaß eine aktive Schicht aus Polyoctylmethylsiloxan (POMS), welche auf einer Stützschrift aus Polyetherimid (PEI) aufgebracht war. Der Durchmesser der aktiven Trennschicht war mit 10 µm angegeben. Die Membranen der GMT Membrantechnik Rheinfelden wiesen aktive Schichten aus PDMS (2420G/V-1) beziehungsweise POMS (2421G/V-2) auf. Die Durchmesser der aktiven Schichten waren für diese Membranen nicht angegeben. Die Strukturformeln der beiden Materialien für die aktive Schicht sind in Abbildung 54 B dargestellt.

Die Dicke der aktiven Schicht ist ein zentrales Charakteristikum einer Pervaporationsmembran und beeinflusst die Diffusion, den Fluss und die Selektivität der Membran stark (Groot et al., 1992). Die Dicke der aktiven Schichten wurde für alle verwendeten Membrantypen elektronenmikroskopisch bestimmt beziehungsweise überprüft. Die Pervaporationsmembran der GKSS-Forschungszentrums Geesthacht GmbH „POMS/PEI“ betrug 12 µm und wich damit um etwa 2 µm von der Spezifikation ab. Sie wies eine sechsfach höhere Dicke der aktiven Schicht auf als die Membranen der Firma GMT Membrantechnik mit 2 - 2,5

μm (Abb. 55 bis 57). Die Dicke der porösen Stützsichten unterschied sich zwischen den Membranen deutlich. Die Membran 2421G/V-2 wies mit $80\ \mu\text{m}$ die größte Stützschichtdicke auf, während 2420G/V-1 und POMS/PEI Membranen mit $32\ \mu\text{m}$ und $40\ \mu\text{m}$ dünnere Stützsichten besaßen.

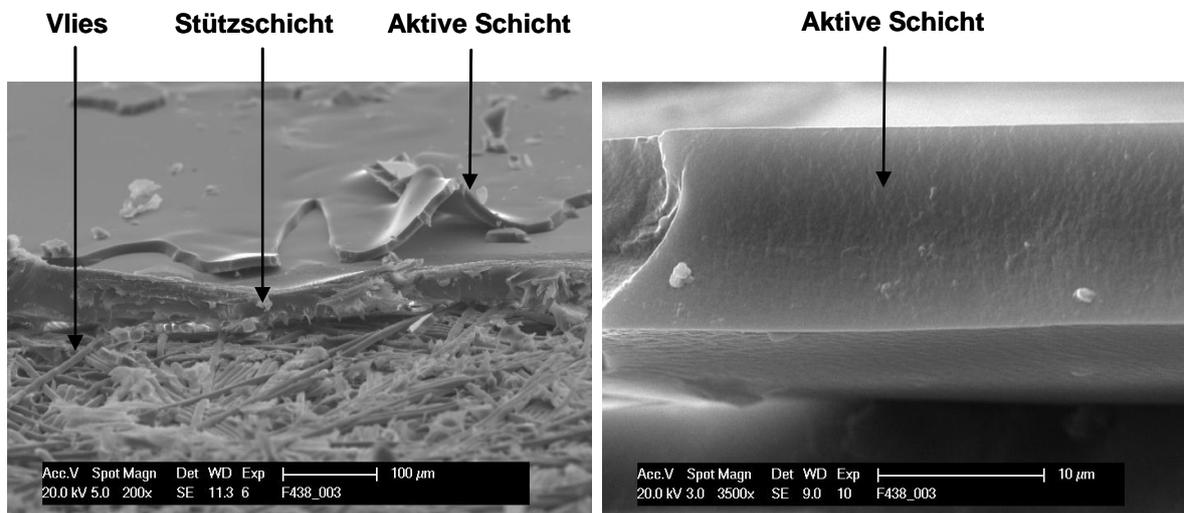


Abb. 55: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der POMS/PEI-Membran (GKSS Forschungszentrum Geesthacht GmbH). Die aktive Schicht ist im Aufnahmebereich durch das Knicken der Membran teilweise abgelöst. Aktive Schicht: $d_1 = 12\ \mu\text{m}$, Stützsicht: $d_2 = \text{ca. } 40\ \mu\text{m}$, Vlies: Schichtdicke nicht vermessen.

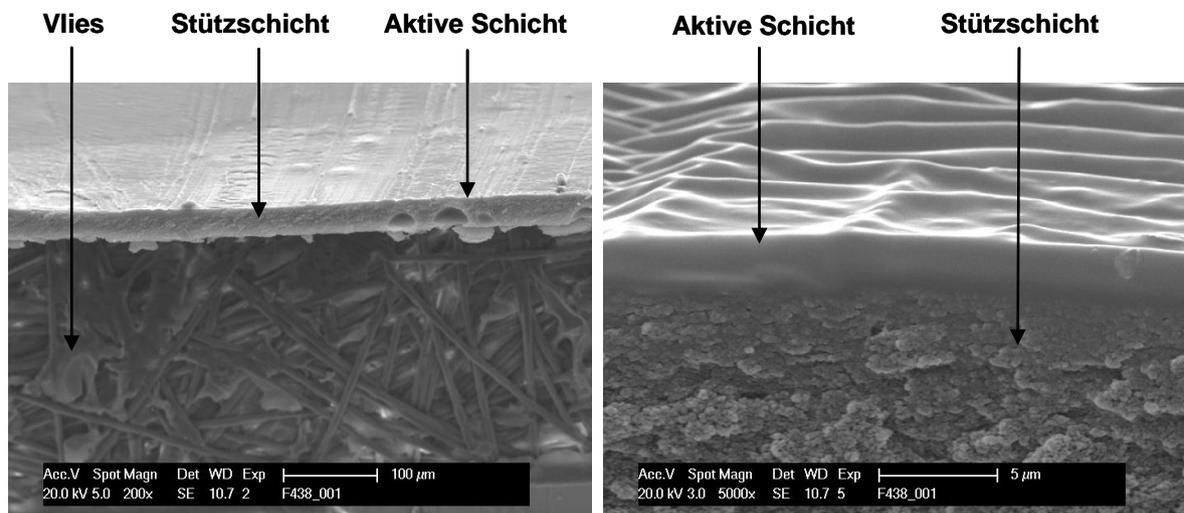


Abb. 56: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der 2420G/V-1 Membran (GMT Membrantechnik, Rheinfelden). Aktive Schicht: $d_1 = 2\text{-}2,5\ \mu\text{m}$, Stützsicht: $d_2 = 32\ \mu\text{m}$, Vlies: Schichtdicke nicht vermessen.

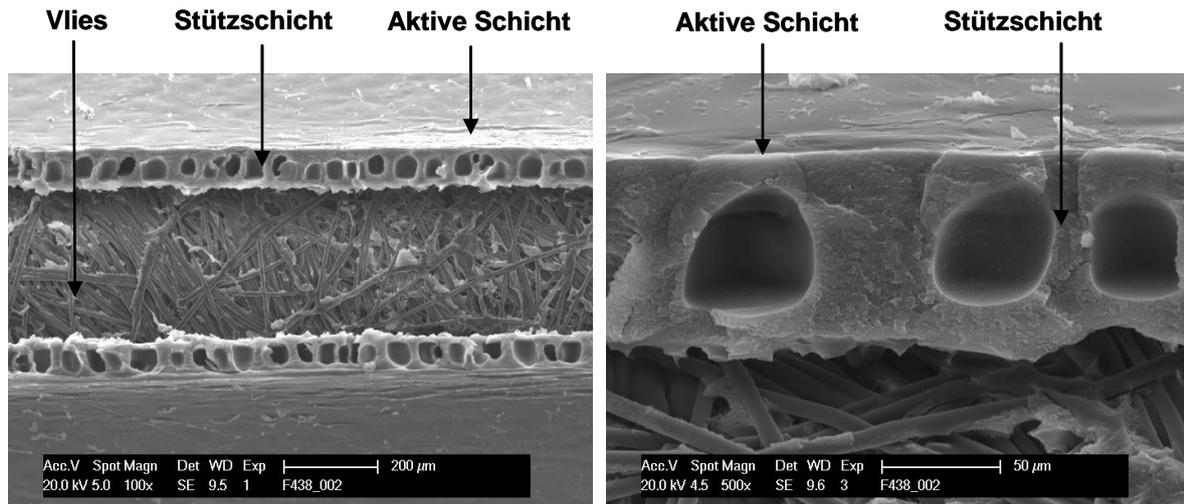


Abb. 57: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der 2421G/V-2 Membran (GMT Membrantechnik, Rheinfelden).
Aktive Schicht: $d_1 = 2\text{--}2,5 \mu\text{m}$, Stützschrift: $d_2 = 80 \mu\text{m}$, Vlies: Schichtdicke nicht vermessen.

5.4.1.2 Partialflussdichten und Anreicherungsfaktor mit Modellösungen

Mit allen drei Membrantypen wurden Untersuchungen zur Bestimmung der Flussraten verschiedener Komponenten und der resultierenden Selektivität durchgeführt. Zweck war, diejenige Membran zu identifizieren, die am besten für das Modellverfahren im Labormaßstab geeignet war. Die Untersuchungen erfolgten mit Modellösungen, in denen die Zusammensetzung einer Reaktionslösung nachgebildet war. Dabei war insbesondere die sehr niedrige Produktkonzentration bei biokatalytischer Herstellung von β -Ionon zu berücksichtigen. Mit $9,6 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ wurde die β -Ionon-Konzentration eingesetzt, die bei einer üblichen Substratkonzentration von $50 \mu\text{M}$ β -Carotin im mizellaren Reaktionssystem nach 50% Umsatz vorherrschen würde. In Abhängigkeit von der gewählten Substratquelle und dem Substratvermittlungssystem werden bei der biokatalytischen Herstellung von β -Ionon aus β -Carotin organische Cosolventien zugegeben. Die Modellösung enthielt aus diesem Grund 10 % (v/v) Ethanol. Cosolventien reduzieren die Trennleistung organophiler Pervaporationsprozesse aufgrund des Kopplungseffektes (Huang und Feng, 1992, Verhoef et al., 2007). Basis der Modellösung war 20 mM Tris pH 8,5. Die Messung der β -Ionon-Konzentration erfolgte gaschromatographisch unter Verwendung interner und externer Standards, die Messung der Ethanolkonzentration mittels HPLC und externem Standard. Die Untersuchungen wurden bei 30°C und einem

Volumenstrom über die 0,099 m² große Membran von 157 l·h⁻¹ durchgeführt. Der Druck auf der Permeatseite betrug 0,2 mbar.

Abbildung 58 A zeigt, dass der Membrantyp „POMS/PEI“ bei der selben Feedkonzentration deutlich höhere Partialflussdichten der Zielsubstanz β -Ionon erlaubt als die Membrantypen 2420G/V-1 und 2421G/V-2.

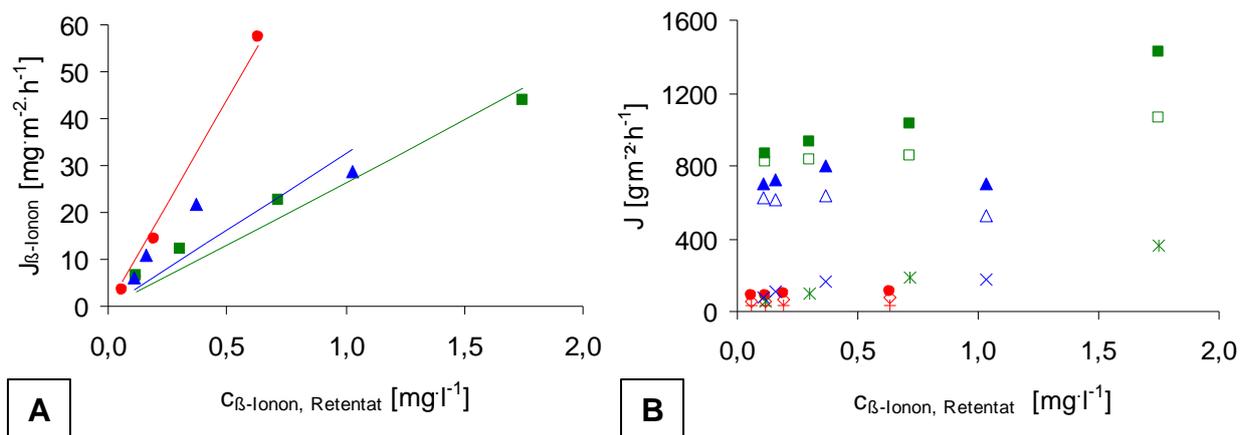


Abb. 58: (A) Partialflussdichte von β -Ionon sowie (B) Gesamtflussdichte (gefüllte Symbole) und Partialflussdichten von Wasser (ungefüllte Symbole) und Ethanol (Kreuze) für die drei untersuchten Pervaporationsmembranen (2420G/V-1: ■, □, ж; 2421G/V-2: ▲, △, x; POMS/PEI: ●, ○, +).

Um die Eignung einer Membran für den Prozesseinsatz zu bewerten, muss die Partialflussdichte der Zielsubstanz im Verhältnis zur Partialflussdichte des Lösungsmittels - in diesem Fall Wasser - und der Gesamtflussdichte bewertet werden. Die Partialflussdichte des Lösungsmittels Wasser ist insbesondere bei der Abtrennung extrem gering konzentrierter Komponenten von Interesse, da sie im niedrigen Konzentrationsbereich unabhängig von der Feedkonzentration der abzutrennenden Komponente ist (siehe Abschnitt 3.6.3). Sie beeinflusst den erzielten Aufreinigungsfaktor daher stark. In Abbildung 58 B sind die ermittelten Partialflussdichten für Wasser und Ethanol sowie die Gesamtflussdichte für die drei untersuchten Membranen aufgetragen. Die Wasserflussdichten aller untersuchten Membranen waren wie erwartet unabhängig von der Feedkonzentration der organischen Komponente. Die Daten zeigen außerdem zu Beginn des Pervaporationsprozesses allgemein deutlich erhöhte Flussdichten. Dieser Effekt beruht auf der Quellung der Membranen mit der zu pervaporierenden Lösung vor

Beginn des Vakuumaufbaus. Die Kompression der Membran durch den Aufbau des Druckgradienten führt zu temporär erhöhten Flussdichten. Die mittleren Gesamtflussdichten der drei Membranen unterscheiden sich stark: 2420G/V-1 und 2421G/V-2 wiesen mit $1063,4 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ und $728,5 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ deutlich höhere Gesamtflussdichten als die POMS/PEI Membran mit $95,5 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ auf. Die höheren Gesamtflussdichten der GMT-Membranen sind in erster Linie eine Folge der rund sechsfach dünneren aktiven Schicht dieser Membranen. Der Unterschied in den Gesamtflussdichten innerhalb der GMT-Membranen beruht auf der Hydrophobizität des Membranmaterials. Die Membran 2420G/V-1 wies einen um rund 31 % höheren Gesamtfluss auf als 2421G/V-2. Das Material der Membran 2421G/V-2 (POMS) ist aufgrund der darin enthaltenen Octylketten deutlich hydrophober als das Material von 2420G/V-1 (PDMS). Die Hydrophobizität sorgt bei gleicher Schichtdicke für eine geringere Partialflussdichte von Wasser und eine höhere Selektivität für die organische Komponente.

Die verschiedenen Flussdichten der abzutrennenden Komponente, des Lösungsmittels und dritter Komponenten führen zu verschiedenen Zusammensetzungen des in der Kühlfalle ausgefrorenen Produktes. Der Aufreinigungsfaktor β beschreibt die Erhöhung der β -Ionon-Konzentration im Permeat gegenüber dem Retentat. Für das anschließende *downstream processing* der Permeatlösung ist ein hoher Aufreinigungsfaktor von erheblichem Vorteil. Dabei wird im untersuchten System eine möglichst geringe Abtrennung des Cosolvens Ethanol bei gleichzeitig hohem Aufreinigungsfaktor für β -Ionon angestrebt. Der Anreicherungsfaktor ergibt sich aus der Steigung der interpolierten Gerade bei Auftragung der Permeat- über der Retentatkonzentration der abzutrennenden Komponente. Mit der Membran POMS/PEI der GKSS GmbH konnte ein deutlich höherer Aufreinigungsfaktor von rund 770 erzielt werden als mit Membranen der Firma GMT (Abb. 59 A), mit denen Werte von 19 (2420G/V-1) und 43 (2421G/V-2) erzielt wurden. Die für das Cosolvens Ethanol ermittelten Anreicherungsfaktoren sind für alle drei untersuchten Membranen ähnlich und mit 4,9 bis 6,4 vergleichsweise niedrig.

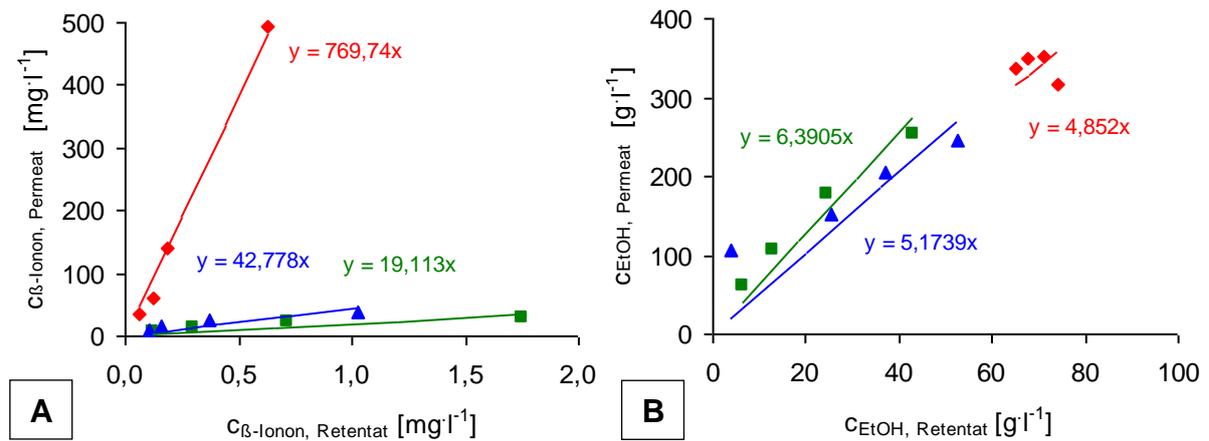


Abb. 59: Konzentration von (A) β -Ionon und (B) Ethanol im Permeat in Abhängigkeit von der Konzentration im Retentat für die drei untersuchten Membranen: 2420G/V-1 (■), 2421G/V-2 (▲), POMS/PEI (◆). Die Steigung der interpolierten Geraden repräsentiert den Aufreinigungsfaktor der Komponente bei Einsatz der jeweiligen Membran.

Zusammenfassend ist die Membran „POMS/PEI“ (GKSS Forschungszentrum Geesthacht GmbH) am besten geeignet zur pervaporativen *in situ* Produktabtrennung bei der biokatalytischen Herstellung von β -Ionon aus β -Carotin mittels AtCCD1. Aufgrund der sehr dicken aktiven Schicht dieser Membran ist sie für die Abtrennung extrem niedrig konzentrierter, flüchtiger organischer Komponenten besonders geeignet. Die mit dieser Membran erzielbare Gesamtflussdichte ist niedrig, aufgrund des sehr geringen Wasser- und Ethanolflusses aber mit einem sehr hohen Aufreinigungsfaktor verbunden. Da die Reaktionsgeschwindigkeit des eingesetzten Biokatalysators niedrig ist, stellt die geringe Partialflussdichte von β -Ionon kein Hindernis für den Einsatz der Membran dar.

5.4.2 Verringerung der Produktinhibition durch *in situ* Produktabtrennung

Primäres Ziel der organophilen Pervaporation im angestrebten Demonstrationsprozess ist die Produktabtrennung und gleichzeitige -aufreinigung als erster Schritt des *downstream processing*. Für das eingesetzte Enzym AtCCD1 ist die Inhibition durch das Reaktionsprodukt β -Ionon beschrieben (Schilling, 2008). Ein erhoffter Zusatzeffekt der *in situ* Produktabtrennung ist deshalb die Vermeidung

von Produktinhibition bei der enzymatischen Reaktion. Um die Produktabtrennung aus einer laufenden Biokonversion zu demonstrieren und eine mögliche Verringerung der Produktinhibition zu untersuchen, wurde das Modells substrat 8'-Apo- β -carotin-8'-al mit GST-AtCCD1 bei mizellarer Substratvermittlung umgesetzt und die Reaktionslösung durch die Pervaporationseinheit zirkuliert. Die Untersuchung wurde mit dem Modells substrat durchgeführt, weil damit eine wesentlich höhere Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird. Eine schnelle Reaktion ist notwendig für ein ausreichend kleines Verhältnis von Mess-Standardabweichung zu den gemessenen Wertveränderungen. Die Reaktion ($V = 0,5$ l) wurde in 20 mM Tris pH 8,0 bei 30°C in einer abgedichteten Glasflasche ($V = 1$ l) durchgeführt. Als Kontrolle diente die Reaktion der mizellaren Substratlösung mit Lysat Leervektor-transformierter und identisch exprimierter Zellen. Die Pervaporation erfolgte mit 0,099 m² POMS/PEI-Membran bei einem Volumenstrom von 157 l h⁻¹. In Abbildung 60 A sind die Verläufe der Substratkonzentration für Versuche mit und ohne Pervaporation sowie für den Kontrollversuch dargestellt. Die Verläufe von enzymatischen Umsätzen mit und ohne Produktabtrennung durch Pervaporation verlaufen sehr ähnlich.

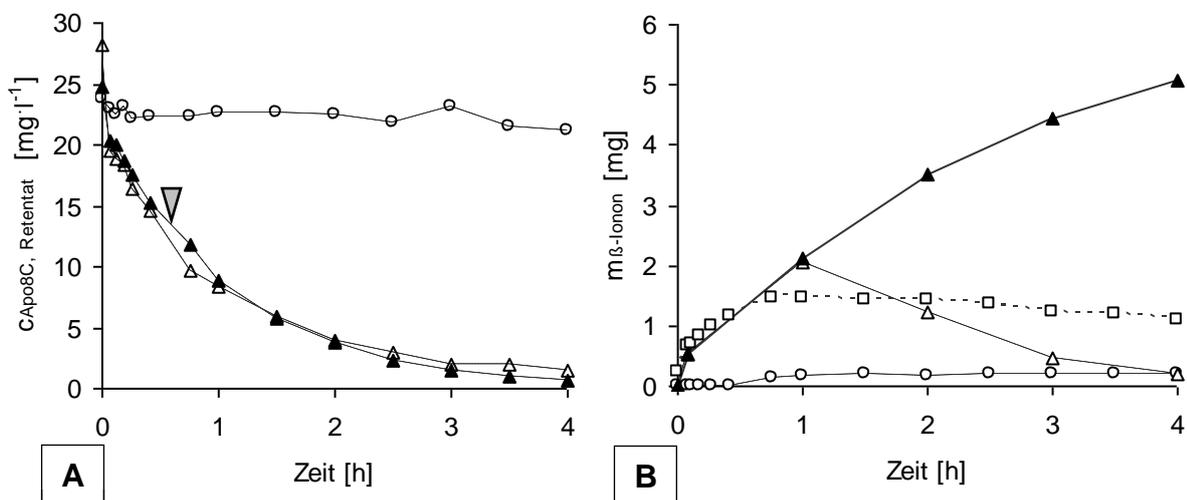


Abb. 60: Umsetzung des Modells substrats 8'-Apo- β -carotin-8'-al mit und ohne Produktabtrennung durch organophile Pervaporation. (A) Substratkonzentration in Reaktion ohne Pervaporation (Δ), mit Pervaporation (\blacktriangle) und Kontrollversuch (o). Das Erreichen von stabilem permeatseitigem Druck >0,2 mbar ist mit Pfeil gekennzeichnet. (B) Produktmasse: Kumuliert in Permeat und Retentat bei Reaktion mit Pervaporation (\blacktriangle); im Retentat bei Reaktion mit Pervaporation (Δ); in der Reaktionslösung bei Reaktion ohne Pervaporation (\square); in der Reaktionslösung bei Kontrollversuch (o).

In Abbildung 60 B sind die Produktmassen im jeweiligen System für Versuche mit und ohne Pervaporation dargestellt. Die theoretisch erreichbare Produktmasse β -Ionon lag bei 7,4 mg. Bei Versuchen mit Produktabtrennung durch Pervaporation wurden die Produktmassen im Retentat und Permeat summiert, bei Versuchen ohne Produktabtrennung ist nur die Masse in der Reaktionslösung angegeben. Bei Umsetzung mit Pervaporation wurde der erwartete Verlauf beobachtet. Die kumulative Produktmasse wies einen asymptotisch ansteigenden Verlauf mit einem Maximum zwischen sechs und sieben mg auf. Bei Umsetzung ohne Pervaporation wurde nur eine maximale Produktmasse von 1,5 mg erreicht, die nach 2 Stunden langsam abnahm. Die Abnahme der gemessenen Produktmasse deutet auf einen konstanten Verlust des sehr flüchtigen β -Ionons im System hin, der mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die Abdichtung des Reaktionsgefäßes stattfand.

In Abbildung 61 ist der Verlauf der Substratkonzentration im Zeitraum 1 bis 2,5 Stunden bei Umsetzung mit und ohne Pervaporation vergrößert dargestellt. Im dargestellten Zeitfenster lag der permeatseitige Druck stabil bei 0,14 mbar. Die Substratkonzentration war noch so hoch, dass keine Substratlimitierung zu erwarten war. Die durch lineare Interpolation ermittelte Steigung der Konzentrationskurve war bei Reaktion mit Pervaporation nur um 16% steiler als ohne Pervaporation. Die Produktabtrennung beschleunigt die Reaktion durch Verhindern einer Produktinhibition kaum.

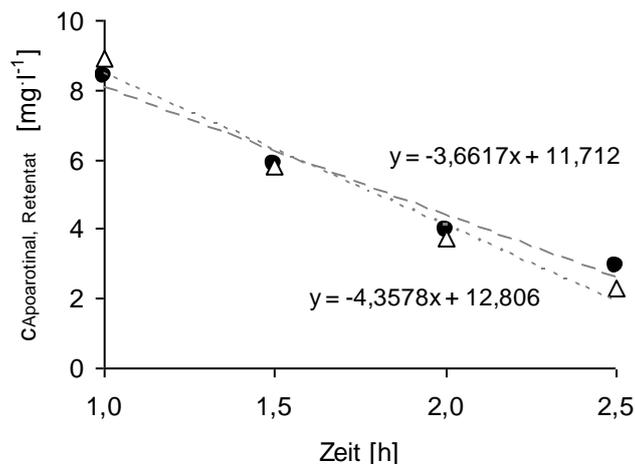


Abb. 61: Verlauf der Substratkonzentration bei Umsetzung von 8'-Apo- β -carotin-8'-al durch GST-AtCCD1 mit (Δ) und ohne (\bullet) Produktabtrennung durch Pervaporation. Der Zeitraum 1 bis 2,5 Stunden wurde gewählt, weil der permeatseitige Druck in dieser Phase $< 0,2$ mbar und die Substratkonzentration noch ausreichend hoch war.

Es ist zu erwarten, dass der positive Effekt der *in situ* Produktabtrennung größer wäre, wenn höhere Substratkonzentrationen eingesetzt würden, wie es bei Verwendung von CO₂-Extrakt aus Biomasse möglich wäre. Für die Reaktion von AtCCD1 im mizellaren System ist das Auftreten von Produktinhibition ab 50 µM β-Ionon beschrieben (Schilling, 2008). Die in diesem Versuch eingesetzte Substratformulierung erlaubte nur eine maximale theoretische Produktkonzentration von 72 µM bei 100% Umsatz.

5.4.3 *In situ* Produktabtrennung: Zusammenfassung

Für drei zur Verfügung stehende organophile Pervaporationsmembranen wurden folgende technische Parameter ermittelt: Durchmesser der aktiven Schicht, Gesamt- und Partialflussdichten der Einzelkomponenten von prozessähnlichen Modellösungen sowie der Anreicherungsfaktor für β-Ionon. Anhand der ermittelten Parameter wurde der am besten geeignete Membrantyp ausgewählt. Mit diesem wurde aus prozessähnlichen Modellösungen ein Aufreinigungsfaktor für β-Ionon von rund 770 bei gleichzeitig hoher Selektivität erreicht. Mit dem am besten geeigneten Membrantyp wurde eine mögliche Abnahme der Produktinhibition von AtCCD1 durch *in situ* Produktabtrennung untersucht. Es konnte nur eine geringe Abnahme der Produktinhibition gezeigt werden. Der Grund für die nur geringe Verbesserung war, dass das eingesetzte mizellare Substratvermittlungssystem nur vergleichsweise niedrige Substratkonzentrationen erlaubte. Es ist zu erwarten, dass die Verringerung von Produktinhibition ausgeprägter wäre, wenn höher konzentrierte Substratquellen eingesetzt würden.

5.5 Demonstrationsanlage im Labormaßstab

Ziel dieser Arbeit war ein *proof of concept* für die selektive biokatalytische *in vitro* Herstellung des natürlichen Aromastoffs β-Ionon aus β-Carotin. Dazu sollte eine Demonstrationsanlage im Labormaßstab aufgebaut werden. Die einzelnen Prozessschritte waren bisher nur getrennt untersucht worden und mussten dazu in kompatibler Form verbunden und betrieben werden. Zunächst sollen die konstruktiven Eigenschaften der Demonstrationsanlage beschrieben und technische Besonderheiten erläutert werden. Anschließend soll anhand des

Sauerstoffeintrags durch Begasung gezeigt werden, wie die Regelungsmöglichkeiten eines Enzymreaktors zur weiteren Verbesserung der Reaktionsgeschwindigkeit eingesetzt werden können. Abschließend werden die Ergebnisse der ersten selektiven biokatalytischen Herstellung von β -Ionon aus β -Carotin im Labormaßstab dargestellt.

5.5.1 Aufbau der Demonstrationsanlage

Die Auslegung und der technische Aufbau der Demonstrationsanlage erfolgten in Anlehnung an vorangegangene Arbeiten zur biotechnologischen Produktion von 2-Phenylethanol durch Ganzzell-Biotransformation unter Einsatz organophiler Pervaporation (Etschmann, 2004), (Maltzahn, 2005).

Als Enzymreaktor wurde ein 2,3 l Glaskörper-Bioreaktor mit Temperatur- und Rührerdrehzahlregelung eingesetzt. Die auf 30°C temperierte Reaktionslösung im Enzymreaktor wurde kontinuierlich durch das Pervaporationsmodul zirkuliert. Auf der Permeatseite des Pervaporationsmoduls wurde der Gasstrom über zwei Edelstahl-Rohrleitungen in einen Kollektor geleitet, in welchem der permeatseitige Druck gemessen wurde. Aus dem Kollektor wurde der Gasstrom durch eine Flüssigstickstoff-gekühlte Kühlfalle geleitet, in welcher sich Gase mit Siedepunkt oberhalb der Kühlfallentemperatur niederschlugen. Zur Messung von Permeatmenge und -zusammensetzung wurden die Kühlfallen in regelmäßigen Abständen ausgetauscht.

β -Ionon lagert sich sehr bereitwillig in hydrophobe polymere Substanzen ein - eine Eigenschaft, die technisch bei der Parfümierung von Scheuermitteln oder bei der Duftfreisetzung in Waschmitteln genutzt wird (Michael, 1990, Hoshino und Sakurai, 2002). Für die technische Umsetzung der biokatalytischen β -Ionon-Herstellung stellte diese Eigenschaft eine Herausforderung dar. Die Verwendung von Polymeren in einer Demonstrationsanlage lässt sich - insbesondere bei flexiblen Leitungen - kaum vermeiden. Der Einsatz konventioneller Chemie- oder Pharmatechnik-Schläuche führte zu deutlichen Produktverlusten durch Diffusion von β -Ionon in die Kunststoffkomponenten der Anlage. Durch Sorptionsuntersuchungen mit zahlreichen Schlauchtypen und durch weitgehenden

Verzicht auf Kunststoffteile in der Anlage konnte der Produktverlust minimiert werden. Der für die Förderung der Reaktionslösung am besten geeignete Schlauch war ein doppelwandiger Schlauch mit einer Außenwandung aus PVC und einer Innenwandung aus Perfluorethylenpropylen (FEP). Dieser Schlauchtyp wies nur eine minimale Einlagerung von β -Ionon aus geförderten Modellösungen auf. In Abbildung 62 ist das Rohrleitungs- und Instrumentierungsschema der Demonstrationsanlage gemäß DIN 10628 dargestellt.

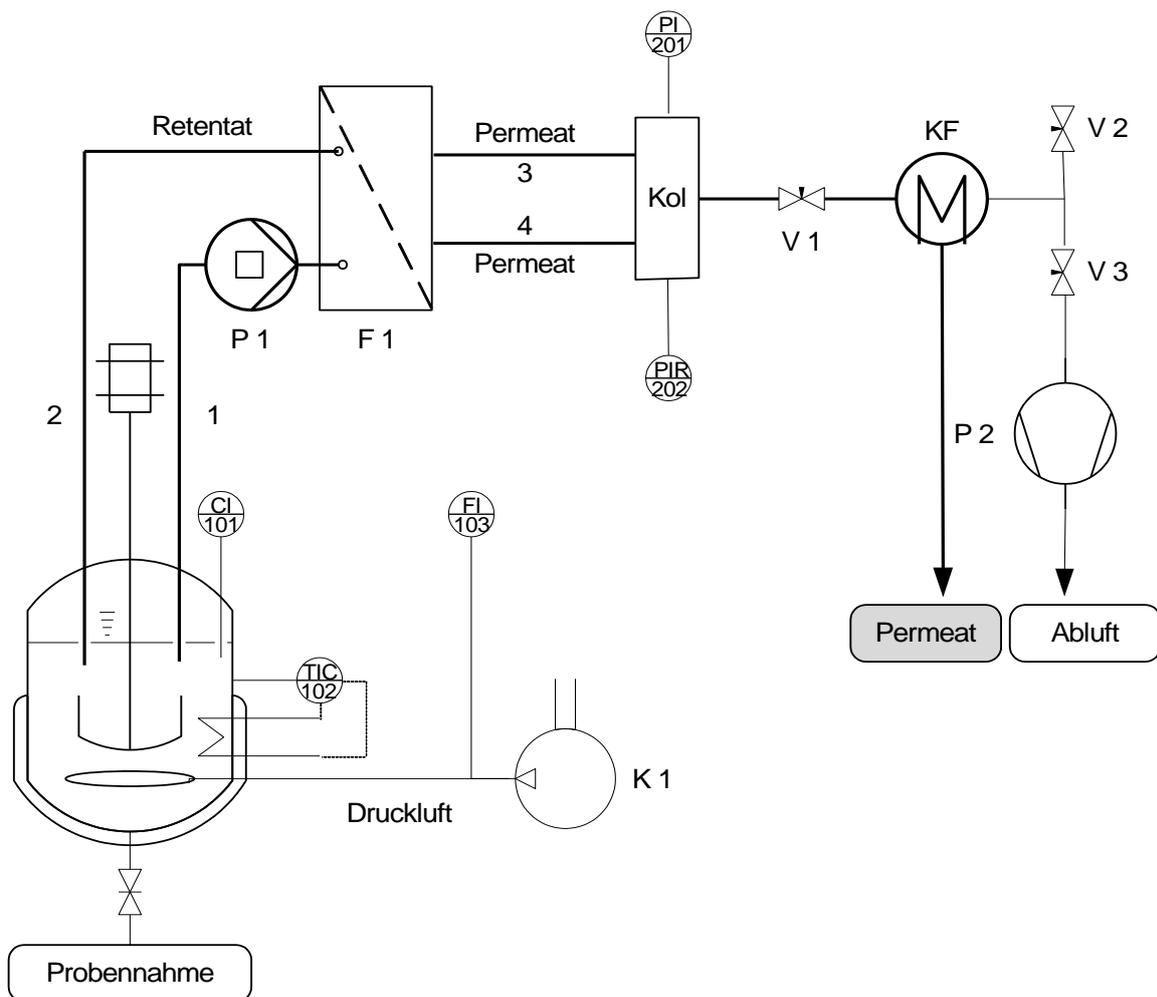


Abb. 62: Rohrleitungs- und Instrumentierungsschema der Demonstrationsanlage im Labormaßstab. P1: Schlauchquetschpumpe, P2: Vakuumpumpe, K1: Druckluftkompressor, Kol: Kollektor, KF: Kühlfalle, V1: Drehschieberventil, V2-3: Nadelventile, Cl 101: Sauerstoffsensoren, TIC 102: Temperatursensoren und -regelung, FI 103: Gasflusssensoren, PI 201: Drucksensoren grob, PIR 202: Drucksensoren fein, 1-2: PVC-Verbundschläuche mit den Längen 301 cm und 164 cm, 3-4: Flexible Vakuum-Rohrleitungen.

Beim Betrieb der Demonstrationsanlage wurde eine sehr niedrige Rührerdrehzahl von 150 rpm gewählt, da die Denaturierungsgeschwindigkeit gelöster Proteine

linear mit der Rührerdrehzahl zunimmt (Colombie et al., 2001). Außerdem wurde die Rührerdrehzahl niedrig gewählt, um ein Überschäumen zu vermeiden. Die bisher untersuchten Reaktionslösungen neigten zum Teil stark zur Schaumbildung, da sie im Fall mizellarer Substratvermittlung hohe Konzentrationen an Tensid und im Fall aufgeschlossener Cyanobakterienbiomasse hohe Konzentrationen an Protein enthielten.

5.5.2 Eintrag des Cosubstrates Sauerstoff durch Begasung

In Bioreaktoren erfüllt der Rührer neben der Durchmischung des Reaktorinhalts eine weitere Aufgabe: Die Steuerung des Gaseintrags. Für die Spaltung von einem Mol β -Carotin durch AtCCD1 werden zwei Mol molekularer Sauerstoff benötigt. Eine hohe Konzentration an gelöstem Sauerstoff ist daher Voraussetzung für eine effiziente Biokatalyse. Durch die Begrenzung der Rührerdrehzahl auf 150 rpm konnte nur ein geringer Sauerstoffeintrag durch den Rührer erfolgen. Zur Vermeidung einer Sauerstofflimitation wurde zusätzlich Sauerstoff über das Begasungssystem des Fermenters eingetragen.

Wie eine hohe Rührerdrehzahl führt in Tensid- oder proteinhaltigen Lösungen auch eine hohe Begasungsrate zu Schaumbildung. Es musste aus diesem Grund ein Weg gefunden werden, mit hoher Effizienz nur kleine Volumenströme Gas in das Reaktionsgemisch einzutragen. Die Verwendung konventioneller Ringloch-Sparger führte in Voruntersuchungen schon bei geringen Volumenströmen zum Überschäumen, wobei aufgrund des hohen Blasendurchmessers nur ein geringer Sauerstoffeintrag stattfand. Die Sauerstofftransportrate OTR (*oxygen transfer rate*) ist für den Übergang von der Gas- in die Flüssigphase definiert als

$$\text{OTR} = k_{\text{L}}a \cdot (c_{\text{O}_2}^* - c_{\text{O}_2})$$

wobei $c_{\text{O}_2}^*$ die maximale Gelöstsauerstoffkonzentration und c_{O_2} die tatsächlich gelöste Sauerstoffkonzentration darstellen. Der Term $k_{\text{L}}a$ wird als volumenbezogener Sauerstoffübergangskoeffizient bezeichnet und ist ein Maß für die Effizienz des Sauerstoffeintrags. Der Faktor k_{L} stellt die Stoffübergangszahl des Gas/Flüssigkeitssystems dar und a die volumenbezogene Phasengrenzfläche. Da

der $k_L a$ -Term proportional zur volumenbezogenen Phasengrenzfläche ist, wird der Gaseintrag mit sinkendem mittlerem Blasendurchmesser immer effizienter. Es wurde aus diesem Grund ein Verfahren gesucht, um reproduzierbar möglichst kleine Gasblasen zu erzeugen.

Als geeignetes Verfahren wurde die Begasung mittels eines gaspermeablen Membranschlauchs ermittelt. Eine 10 cm lange, vom Fermenterdeckel aus gespeiste Schleife des Membranschlauchs (Membrana Acurel #6114) wurde unterhalb des Blattrührers im Enzymreaktor angebracht (Abb. 63). Bei 150 rpm Rührerdrehzahl führte die Begasung mit $20 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ mittels Membranschlauch zu einem feinen Blasenebel mit einem mittleren Blasendurchmesser unterhalb von 1 mm.

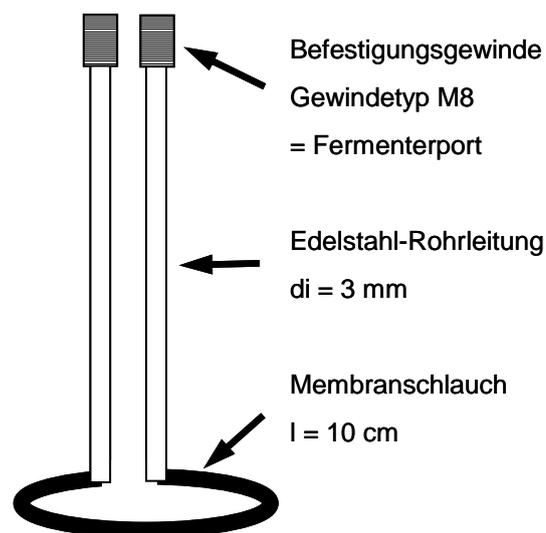


Abb. 63: Schematischer Aufbau des zur Begasung eingesetzten Membranschlauch-Elements. Befestigung und Gasspeisung erfolgten mittels der Gewinde über den Fermenterdeckel.

Der Effekt des Gaseintrags mittels Membranschlauch auf die Umsetzung von mizellar vermitteltem β -Carotin durch AtCCD1 wurde untersucht. Die Reaktion erfolgte bei einer Substratkonzentration von $48 \mu\text{M}$ ohne Betrieb der Pervaporationseinheit. Die Bestimmung der Substrat- und Produktkonzentration erfolgte per HPLC unter Verwendung externer Standards. Der Eintrag von Druckluft mittels Membranschlauch führte zu einer deutlichen Beschleunigung der biokatalytischen Umsetzung um ca. 75 % (Abb. 64 A). Der Gaseintrag verursachte allerdings in der Kontrolle mit Lysat Leervektor-transformierter Zellen einem leicht

beschleunigten unspezifischen Carotinoidabbau, vermutlich aufgrund von Autoxidation durch gelösten Sauerstoff. Die beschleunigte enzymatische Reaktion spiegelt sich auch im Verlauf der Produktkonzentrationen wieder. Der Eintrag von Sauerstoff durch Druckluftbegasung führt zu einer schneller ansteigenden β -Ionon-Konzentration in der Reaktionslösung (Abb. 64 B).

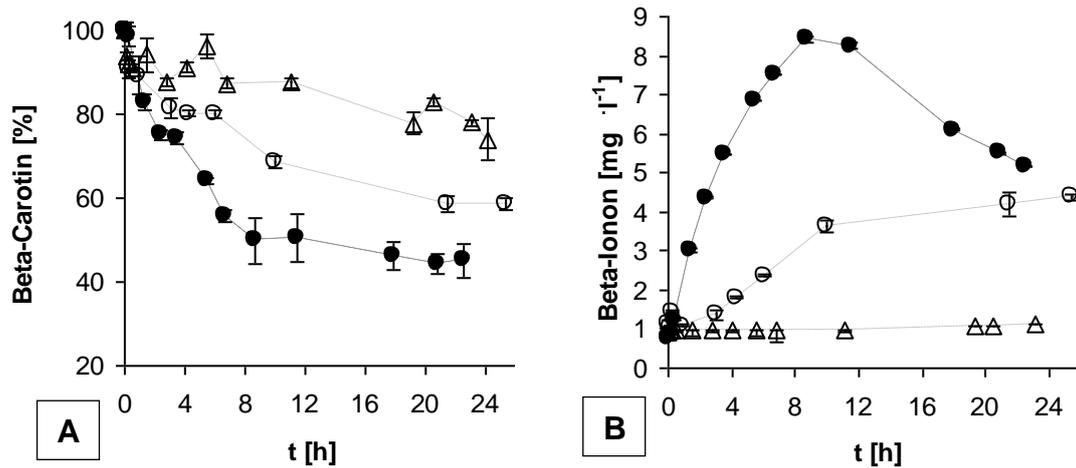


Abb. 64: Verlauf der (A) Substrat- und (B) Produktkonzentration in der Reaktionslösung bei Umsetzung von mizellar vermitteltem β -Carotin mit GST-AtCCD1 in der Demonstrationsanlage ohne Betrieb der Pervaporations-einheit. Umsetzung ohne Gaseintrag über Membranschlauch: o. Umsetzung mit $20 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ Drucklufteintrag über Membranschlauch: •. Kontrollversuch mit Lysat Leervektor-transformierter Zellen und Gaseintrag: Δ . Aufgrund geringer Unterschiede in der Anfangskonzentration des Substrats erfolgte die Darstellung in (A) normalisiert.

Nach neun Stunden Reaktionsdauer war ein Abfall der β -Ionon-Konzentration in der Reaktionslösung zu beobachten. Anhand des Verlaufes der Substratkonzentration war erkennbar, dass die Reaktionsgeschwindigkeit ab diesem Zeitpunkt deutlich abnahm, die Reaktion aber weiterlief. Der Abfall der Produktkonzentration in der Reaktionslösung ist eine Folge des Austrags des sehr flüchtigen Produktes (Dampfdruck $1,32 \text{ Pa}$ bei 298 K) durch den Gasstrom im Enzymreaktor. Die in Abbildung 64 B dargestellten Daten sind demzufolge überlagert mit einem nicht bestimmten Produktaustrag durch *gas phase stripping*. Bei Einsatz der Pervaporations-einheit sind eine Abtrennung des Produkts direkt nach seiner Entstehung und eine sehr niedrige transiente Produktkonzentration zu erwarten. Der Verlust durch Gasaustrag ist in einem solchen Fall wesentlich geringer. In Folgeexperimenten mit Pervaporation konnte mittels adsorberbasierter Abluftanalytik kein β -Ionon in der Abluft nachgewiesen werden.

Die Messung der Sauerstoffsättigung in der Reaktionslösung während der ersten zehn Stunden ergab eine geringere Differenz der Gelöstsauerstoff-Konzentrationen in Reaktionen mit und ohne Gaseintrag als erwartet (Abb. 65). Bei einem Gaseintrag von $20 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ war die Sauerstoffkonzentration gegenüber der Umsetzung ohne Gaseintrag im Durchschnitt um 15 % erhöht. Zu Beginn der Reaktion sank die Sauerstoffkonzentration im Versuch mit Begasung stark ab. Möglicherweise war die reaktionsbedingte Sauerstoffzehrung in diesem Zeitraum höher als der Stoffübergang von Sauerstoff in die Reaktionslösung. Eine Begründung für das nur sehr kurze und schwache Auftreten dieses Effektes in der Reaktion ohne Sauerstoffeintrag kann nicht gegeben werden. Insgesamt kann mit der gewählten Sauerstoffeintragsmethode noch keine vollständige Sättigung der Reaktionslösung mit Sauerstoff während der Reaktion erreicht werden. Es besteht noch immer die Möglichkeit einer Limitierung der Reaktion durch Sauerstoff.

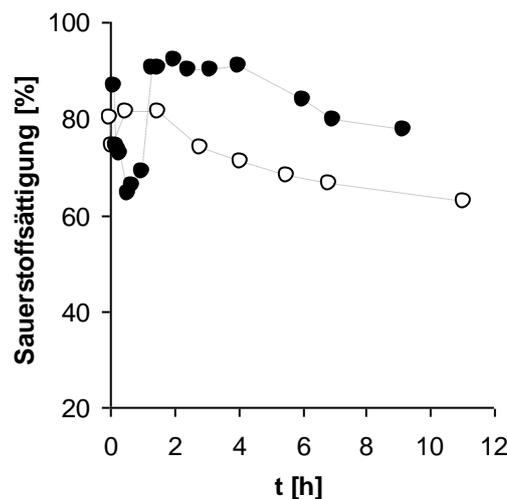


Abb. 65: Verlauf der Sauerstoffsättigung in der Reaktionslösung bei Umsetzung von mizellar vermitteltem β -Carotin mit GST-AtCCD1 in der Demonstrationsanlage ohne Betrieb der Pervaporationseinheit. Umsetzung ohne Gaseintrag: (○). Umsetzung mit $20 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ Drucklufteintrag über Membranschlauch: (●).

Die eingesetzte Druckluft enthielt nur 21 % Sauerstoff. Durch die Verwendung von reinem Sauerstoff zur Begasung könnte die Effizienz der biokatalytischen Umsetzung weiter gesteigert werden, ohne durch erhöhten Gaseintrag eine starke Schaumbildung zu verursachen. Eine Verwendung von Reinsauerstoff birgt jedoch die Gefahr einer verstärkten Autoxidation des Substrats.

5.5.3 Biokatalytische Herstellung von β -Ionon aus β -Carotin

Ziel dieser Arbeit war, die biokatalytische *in vitro* Herstellung von β -Ionon aus β -Carotin einschließlich einer geeigneten Produktabtrennung in einer Demonstrationsanlage im Labormaßstab zu zeigen. Eine lauffähige Demonstrationsanlage würde nach aktuellem Kenntnisstand das erste selektiv-biokatalytische Herstellungsverfahren für als natürlich deklariertes β -Ionon darstellen. Ein entsprechender Versuch wurde aufgrund der präziser definierten Reaktionszusammensetzung mit mizellar vermitteltem natürlichem β -Carotin anstatt von Biomasse oder CO_2 -Extrakt durchgeführt. Die Reaktion erfolgte bei einer Substratkonzentration von $48 \mu\text{M}$ bei einem Gasvolumenstrom von $20 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ mit Druckluft als eingetragemem Gas. Die Pervaporation erfolgte mit einer POMS/PEI-Membran bei einem permeatseitigen Druck von $0,2 \text{ mbar}$ und einer Feed-Förderrate von $73 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$. Die Bestimmung der Substrat- und Produktkonzentration erfolgte per HPLC unter Verwendung externer Standards.

Der Verlauf der kumulativen Substrat- und Produktstoffmengen zeigt, dass die Reaktion erfolgreich durchgeführt werden konnte (Abb. 66 A). Wie die Zusammensetzung der kumulierten β -Ionon-Stoffmenge im System (Abb. 66 B) zeigt, wurde im Messzeitraum $> 95 \%$ des entstandenen Produktes *in situ* aus der laufenden Reaktion abgetrennt.

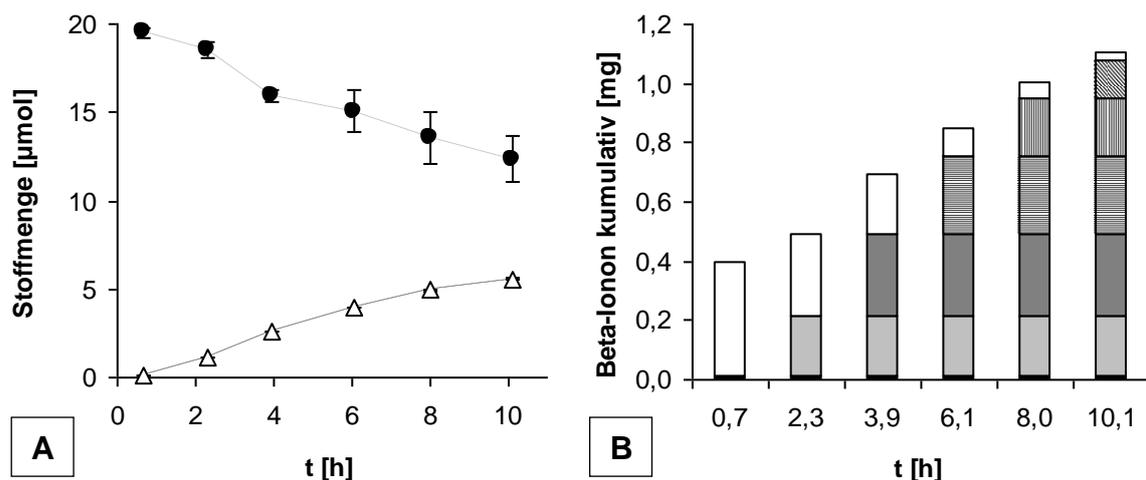


Abb. 66: (A) Verlauf der kumulierten Produkt- und Substratstoffmengen bei Umsetzung von mizellar vermitteltem β -Carotin mit GST-AtCCD1 in der Demonstrationsanlage bei Betrieb der Pervaporationseinheit. β -Carotin: (●), β -Ionon: (Δ). (B) Zusammensetzung der kumulativen Produktmasse über die Reaktionsdauer. Reaktionslösung: weiß, Kühlfalle (KF) 1: schwarz, KF 2: hellgrau, KF 3: dunkelgrau, KF 4: horizontal schraffiert, KF 5: vertikal schraffiert, KF 6: diagonal schraffiert.

Das in Kühlfallen aus dem Gasstrom ausgefrorene Permeat wurde mittels HPLC und GC-MS auf seine Zusammensetzung untersucht. Die Analysen ergaben, dass das Pervaporationsprodukt eine weitestgehend reine konzentrierte wässrige Lösung von β -Ionon darstellte (Abb. 67). Insbesondere für die sensorische Qualität des Produktes abträgliche Verunreinigungen wie Indol aus dem Lysat aufgeschlossener *E. coli* – Zellen wurden nicht detektiert. Als Nebenkomponenten wurden nur Spuren von Butylhydroxytoluol (BHT) und α -Ionon gemessen. BHT ist ein experimentell vermeidbarer Stabilisator aus dem zur Mizellformulierung eingesetzten Tetrahydrofuran. α -Ionon entsteht mit hoher Wahrscheinlichkeit während der Lagerung und Analytik durch Isomerisierung aus β -Ionon.

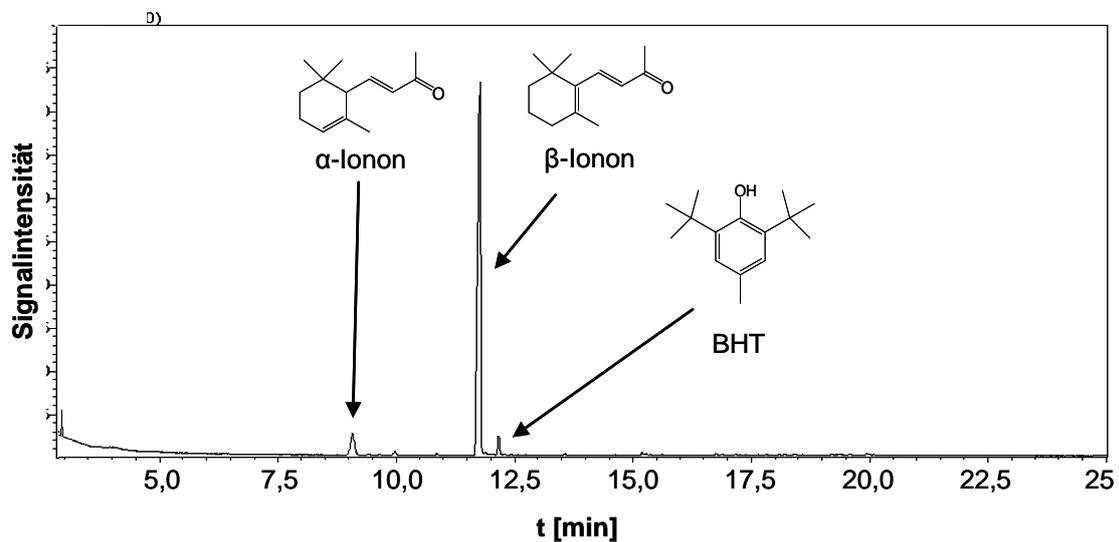


Abb. 67: GC-MS-Totalionenchromatogramm von Hexan-Extrakt des Permeats bei Umsetzung von β -Carotin mit GST-AtCCD1 in der Demonstrationsanlage. BHT (Butylhydroxytoluol) und β -Ionon wurden anhand von Standards verifiziert. α -Ionon wurde durch Abgleich mit einer MS-Fragmentierungsdatenbank identifiziert.

Die symmetrische 9,10 / 9',10' - Spaltung von β -Carotin durch AtCCD1 führt theoretisch zu zwei Mol β -Ionon pro Mol β -Carotin. In Abbildung 66 A kann dieses Verhältnis nicht wiedergefunden werden. Es tritt offensichtlich ein Verlust von β -Ionon in der eingesetzten Demonstrationsanlage auf. Drei Faktoren spielen für den Produktverlust vermutlich eine Rolle: Produktaustrag durch den Gasstrom während der Kühlfallenwechsel, Verlust durch Diffusion in Membran und Schlauchleitungen sowie chemischer und enzymatischer Produktabbau durch Inhaltsstoffe der Reaktionslösung.

Um den Verlauf der Reaktion und der Produktabtrennung darstellen zu können, mussten die eingesetzten Kühlfallen regelmäßig getauscht und ihr Inhalt analysiert werden. Während des Austausches von Kühlfallen wurde die Pervaporationseinheit mithilfe von Ventilen vom Enzymreaktor getrennt und belüftet. Nach Tausch der Kühlfalle musste zunächst ein ausreichendes Vakuum im Kühlfallenabschnitt aufgebaut werden, um die Ventile wieder zu öffnen und die *in situ* Produktabtrennung fortzusetzen. Die Zeit vom Beginn des Kühlfallenwechsels bis zum Wiedererreichen eines permeatseitigen Drucks von 0,2 mbar betrug 10 – 12 min (Abb. 68). In diesem Zeitraum fand keine Produktabtrennung statt und Teile des gelösten Produkts wurden durch den Gasstrom ausgetragen.

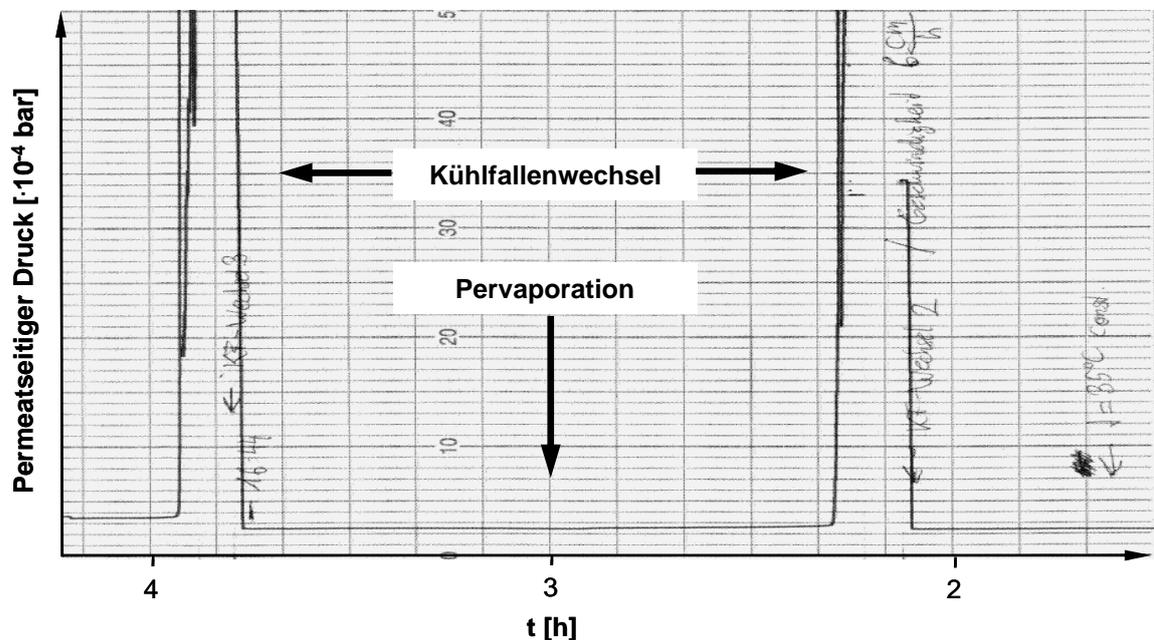


Abb. 68: Ausschnitt des permeatseitigen Druckverlaufs bei biokatalytischer Spaltung von β -Carotin zu β -Ionon in der Demonstrationsanlage. Zeitachse technisch bedingt von rechts nach links.

Die Bestimmung des Aufreinigungsfaktors bei Pervaporation unter realen Prozessbedingungen konnte nicht auf dem üblichen Weg erfolgen: Die Auftragung der Permeat- über der Retentatkonzentration führte aufgrund der fortlaufenden Nachproduktion von β -Ionon zu einem nichtlinearen Verlauf der Datenpunkte (Abb. 69 A). Die Datenpunkte sind infolge der Nachproduktion in Abszissenrichtung verschoben. Der Datenpunkt mit der höchsten Iononkonzentration ist aufgrund von Membranquellung bei Beginn der Pervaporation zusätzlich in negativer Ordinateenrichtung verschoben. Abbildung 69 B zeigt die errechneten Anreicherungsfaktoren für die nacheinander eingesetzten Kühlfallen. Die zu Beginn

der Reaktion eingesetzten Kühlfallen enthalten hohe Massen von β -Ionon im Retentat. Der errechnete Aufreinigungsfaktor für diese Kühlfallen war gering, da aufgrund der noch hohen Reaktionsgeschwindigkeit eine hohe transiente β -Ionon-Konzentration in der Reaktionslösung vorlag. Bei geringer Retentatkonzentration werden Bereiche abgebildet, in denen nur noch eine geringe Reaktionsgeschwindigkeit vorherrscht. Diese kommen dem Modelllösungssystem am nächsten. Der Aufreinigungsfaktor nähert sich dort einem Wert von 140 an. Während die β -Ionon-Flussraten unter Prozessbedingungen vergleichbar mit den Flussraten bei Modellösungen waren, ist der erzielte Aufreinigungseffekt geringer. Mit einem Aufreinigungsfaktor von rund 140 stellt die organophile Pervaporation dennoch eine wertvolle Kombination von *in situ* Produktabtrennung und Aufreinigung dar.

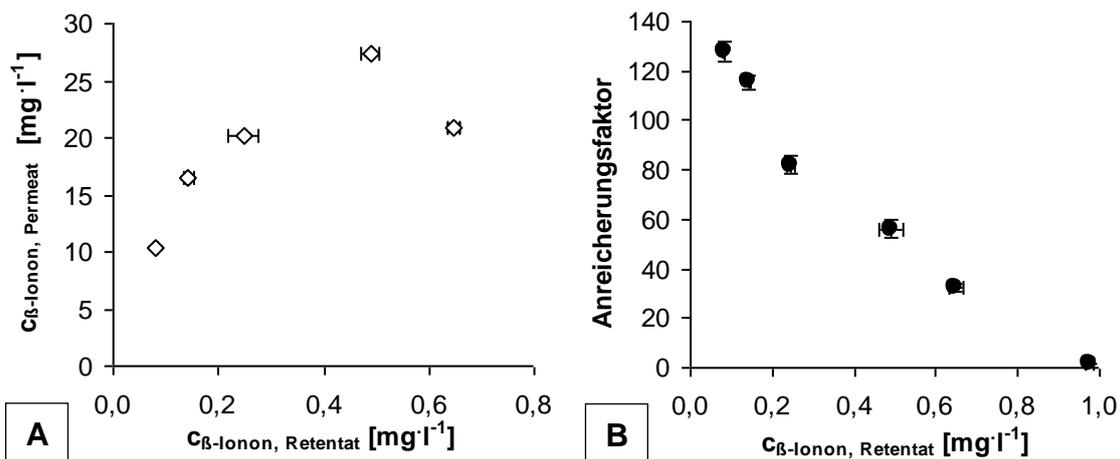


Abb. 69: Abschätzung des erzielten Aufreinigungsfaktors für β -Ionon bei Pervaporation aus enzymatischer Umsetzung von β -Carotin in der Demonstrationsanlage. (A) Aus der Auftragung der Permeat- über der Retentatkonzentration ist aufgrund der fortlaufenden Nachproduktion von β -Ionon kein Aufreinigungsfaktor bestimmbar. (B) Aufreinigungsfaktoren für die im Lauf der Reaktion nacheinander eingesetzten Kühlfallen. Bei geringer Retentatkonzentration werden Bereiche abgebildet, in denen nur noch eine geringe Reaktionsgeschwindigkeit vorherrscht. Der Aufreinigungsfaktor nähert sich dort einem Wert von 140 an.

Insgesamt wurde innerhalb der Reaktionszeit von zehn Stunden ein Umsatz von 38 mol % erreicht. Da trotz laufender pervaporativer Produktabtrennung noch eine Produktkonzentration im Retentat gemessen wurde, war die Aktivität des Enzyms bei Abbruch der Messung noch teilweise vorhanden (Abb. 69 A). Bei verlängerter Reaktionsdauer wurden in Biokonversionen ohne Pervaporation bereits Ausbeuten um 60 mol % β -Carotin erreicht (siehe Abschnitt 5.5.2). Durch eine verbesserte

Reaktionsführung kann der Substratumsatz mit hoher Wahrscheinlichkeit erhöht werden. Zentrale Ansatzpunkte zur reaktionskinetischen Verbesserung wären die Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit durch Eintrag von Reinsauerstoff sowie eine enzymschonende Thermostatisierung des Bioreaktors. In den dargestellten Versuchen erfolgte die Temperaturregelung über Heizstäbe, die Wärme über kleine und sehr heiße Oberflächen in das System eintrugen und zur teilweisen Denaturierung des Enzyms führten. Durch die benötigte Verdampfungsenthalpie fand auf der Permeatseite der Pervaporationsmembran eine ständige Kühlung statt, die durch Wärmeeintrag im Enzymreaktor ausgeglichen werden musste. Zusammen mit dem Wärmeverlust an die Umgebung war ein relativ hoher permanenter Energieeintrag notwendig.

5.5.4 Demonstrationsanlage: Zusammenfassung und Ausblick

Der vollständige Verfahrensablauf einer selektiven biokatalytischen Herstellung von β -Ionon ausgehend von kristallinem β -Carotin konnte in einer Demonstrationsanlage mit 2,3 l Reaktorvolumen erstmalig durchgeführt werden. Das Verfahrensprodukt war eine konzentrierte wässrige Lösung von β -Ionon, die keine messbaren Konzentrationen sensorisch störender Verunreinigungen wie Indol enthielt. Als Nebenkomponenten wurden nur Spuren von α -Ionon sowie des experimentell vermeidbaren Stabilisators Butylhydroxytoluol gemessen. Mithilfe der *in situ* Produktabtrennung durch organophile Pervaporation konnten im Messzeitraum > 95 % des entstandenen β -Ionon aus der laufenden Reaktion abgetrennt werden. Mittels eines selbst entworfenen gaspermeablen Membranschlaucheinsatzes wurde ein kontinuierlicher Eintrag des Cosubstrats Sauerstoff in die Reaktionslösung ohne Übersäumen erreicht. Die erhöhte transiente Gelöstsauerstoffkonzentration führte zu einer Beschleunigung der biokatalytischen Umsetzung um rund 75 %, die Daten zeigten jedoch trotz aktivem Gaseintrag eine Limitierung der Reaktion durch Sauerstoffmangel an. Durch eine verbesserte Reaktionsführung und angepasste technische Ausführung des Reaktors kann eine Erhöhung des Substratumsatzes erwartet werden. Zentrale Ansatzpunkte sind dabei einerseits eine enzymschonendere Thermostatisierung über den Reaktormantel und andererseits eine Verbesserung des Sauerstoffeintrags durch Einsatz von Reinsauerstoff anstatt Druckluft zur Begasung.

6 MATERIAL UND METHODEN

6.1 Material

6.1.1 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben wurden alle Chemikalien von den Firmen Fluka, Riedel de Haen, Sigma Aldrich (alle Taufkirchen, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Bis auf kristallines β -Carotin und 8'-Apo- β -carotin-8'-al wurden kristalline Carotinoide bzw. Xanthophylle sowie Emulsionen von β -Carotin und Marigoldextrakten (*Tagetes erecta*) von der Firma Wild Flavours Berlin GmbH & Co. KG zur Verfügung gestellt. Teilweise oder ganz aufgereinigte Phospholipide aus Ei bzw. Soja sowie Nanoemulsionen (Nano-Solve) von β -Carotin und 8'-Apo- β -carotin-8'-al wurden von der Firma LIPOID GmbH, Ludwigshafen, Deutschland zur Verfügung gestellt. Carotinoidhaltige cyanobakterielle Biomasse (*Spirulina platensis*) sowie einen CO₂-Extrakt davon stellte die IGV Institut für Getreideverarbeitung GmbH, Nuthetal, Deutschland, zur Verfügung.

Die Extrakte und Emulsionen der Firma Wild Flavours Berlin GmbH sind für den Einsatz als Lebensmittelzutat zugelassen und bestehen gemäß Lebensmittelkennzeichnungsverordnung aus folgenden Inhaltsstoffen: Totalextrakt aus *Tagetes*, Invertzuckersirup, Zitronensäureester von Mono- und Diglyceriden von Fettsäuren, α -Tocopherol.

Für die eingesetzten Phospholipide und Nanoemulsionen der Firma LIPOID GmbH wurden Analysezertifikate zur Verfügung gestellt, die im Anhang aufgeführt sind.

Tabelle 11: Eingesetzte Phospholipid-Präparationen (Lipoid GmbH)

Bezeichnung	Zusammensetzung	Quelle
E PE	Phosphatidylethanolamin, rein	Ei
S 100	Phosphatidylcholin, rein	Soja
S 45	53,8% (w/w) (Lyso-) Phosphatidylcholin 16,6% (w/w) Phosphatidylethanolamin	Soja
S 75	69,9% (w/w) (Lyso-) Phosphatidylcholin 8,4% (w/w) Phosphatidylethanolamin	Soja

Die von der IGV Institut für Getreideverarbeitung zur Verfügung gestellte Biomasse aus *Spirulina* sowie der CO₂-Extrakt davon wurden von der IGV GmbH bezüglich ihres Carotinoidgehaltes untersucht und folgende Analysewerte ermittelt. Die Trockensubstanzgehalte sind in den Angaben nicht berücksichtigt und betragen für die Biomasse 94,4% und den CO₂-Extrakt 63,8%.

Tabelle 12: Carotinoid-Analysewerte der *Spirulina platensis* Biomasse.

Substanz	Konzentration [mg/100g]
Beta-Carotin	90,8
Zeaxanthin	76,2
Lutein	9,8
Gesamt	176,8

Tabelle 13: Carotinoid-Analysewerte des CO₂-Extraktes von *Spirulina platensis* Biomasse.

Substanz	Konzentration [mg/100g]
Beta-Carotin	5708,8
Zeaxanthin	307,4
Lutein	0
Echinenon	140,2
Gesamt	6156,4

6.1.2 Medien, Puffer, Lösungen

6.1.2.1 Medien

LB-Medium / LB-Agar:

10 g/L	Trypton
5 g/L	Hefeextrakt
10 g/L	NaCl
15 g/L	Agar agar (nur für Herstellung LB-Agar)
pH 7,0	

SOC-Medium

20 g/L	Trypton
5 g/L	Hefeextrakt
0,5 g/L	NaCl
2,5 mM	KCl

1 mM	MgCl ₂
2 mM	D-Glucose

6.1.2.2 Puffer

PBS-Puffer

1,8 mM	KH ₂ PO ₄
10 mM	Na ₂ HPO ₄
140 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
pH 7,4	

Tris-Puffer

20 mM	Tris
pH 7,4 sofern nicht anders angegeben	

Puffer für Bestimmung pH-Optima:

Die Pufferstärke betrug in allen Fällen 100 mM. Die Gesamtionenstärke wurde mit NaCl auf 200 mM eingestellt. Die Pufferzubereitung erfolgte bei 20°C, die Werte für pH und Ionenstärken sind für die Einsatztemperatur 30°C berechnet. Thermodynamisch korrekte Pufferzusammensetzungen wurden mithilfe eines Programms der University of Liverpool berechnet (<http://www.liv.ac.uk/buffers/buffercalc.html>).

pH	Puffersubstanz	Pufferkonzentration	NaCl-Konzentration
4	Essigsäure	6 g/L	10,58 g/L
4,5	Essigsäure	6 g/L	9,19 g/L
5	Essigsäure	6 g/L	7,58 g/L
5,5	Essigsäure	6 g/L	6,53 g/L
6	Bis-Tris	20,09 g/L	7,03 g/L
6,5	Bis-Tris	20,09 g/L	8,45 g/L
7	Bis-Tris	20,09 g/L	10,04 g/L
7,5	Tris Base	12,14 g/L	6,83 g/L
8	Tris Base	12,14 g/L	8,12 g/L
8,5	Tris Base	12,14 g/L	9,76 g/L
9	Tris Base	12,14 g/L	10,91 g/L

9,5	Ethanolamin	6,11 g/L	8,32 g/L
10	Ethanolamin	6,11 g/L	9,93 g/L

Elektrophoresepuffer:a) *SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese*

Probenpuffer (5x)	0,25 M Tris-Base 0,5 M β -Mercaptoethanol 10% (w/v) SDS 0,5% (w/v) Bromphenolblau 50% (v/v) Glycerin pH 6,8
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-Base pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-Base pH 6,8
Laufpuffer	0,125 M Tris-Base 1,25 M Glycin 0,5% (w/v) SDS pH 8,3
Färbelösung	0,05% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 50% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung	20% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Essigsäure

b) *Western Blotting*

Transfer-Puffer	3,03 g/L Tris-Base 14,4 g/L Glycin
Blockier-Puffer	2,5% (w/v) Rinderserumalbumin Fraktion V in PBST
PBST	PBS 500 μ L/L Tween 40

Puffer für Affinitätschromatographiea) *GST-Affinitätschromatographie*

Binde- und Waschpuffer	140 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	10 mM Na ₂ HPO ₄
	1,8 mM KH ₂ PO ₄
Elutionspuffer	50 mM Tris-HCl
	10 mM Glutathion (reduziert)
	pH 8,0

b) *Polyhistidin-basierte Affinitätschromatographie*

Ni-Beladung der Säulen	100 mM NiSO ₄
Ni-Elution von Säulen	50 mM EDTA
Binde- und Waschpuffer	20 mM Na ₂ HPO ₄
	500 mM NaCl
	pH 7,4
Elutionspuffer	20 mM Na ₂ HPO ₄
	500 mM NaCl
	500 mM Imidazol
	pH 7,4

6.1.3 Mikroorganismen*Escherichia coli* - Stämme:

BL21(DE3)	Novagen, Darmstadt
DH5α	Invitrogen, Karlsruhe
JM101 pACCAR16ΔcrtX	Prof. Sandmann, Univ. Frankfurt
JM101 pACCAR25ΔcrtX	Prof. Sandmann, Univ. Frankfurt

6.1.4 Plasmide

Die zur Selektion eingesetzten Antibiotikakonzentrationen in Flüssigmedium und Agar waren gleich und sind jeweils angegeben. Plasmidkarten und Karten der *multiple cloning sites* sind im Anhang dargestellt.

Plasmid	Antibiotikum / Konzentration	Quelle
pET29 a	Kanamycin (30 mg/L)	Novagen, Darmstadt
pET43 a	Ampicillin (50 mg/L)	Novagen, Darmstadt
pGEX-4-T-1	Ampicillin (50 mg/L)	GE Healthcare, München

6.1.5 Marker

SDS-PAGE:	Unstained Molecular Weight Marker #SM0431 (Fermentas)
Western blot:	Chemichrome Western Control (Sigma-Aldrich) Roti-Mark Western HRP-Konjugat (Carl Roth)

6.1.6 Antikörper

Invitrogen Anti-GST-(C-terminal), HRP (*horseradish peroxidase*) gekoppelt

6.1.7 Kommerzielle Kits

Plasmidpräparation:	GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)
Proteinquantifizierung:	BCA Protein Assay Kit (Pierce)
Western blot Proteingrößen- standard und Transferkontrolle:	RotiMark Western (Carl Roth)

6.2 Geräte

6.2.1 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie

Steuerungseinheit:	Shimadzu SCL-10 A
Pumpen:	Shimadzu LC-10 AT
Detektoren:	a) Dioden-Array-Detektor: Shimadzu SPD-M10A b) UV-Detektor: Shimadzu SPD-20 A

- c) Brechungsindex-Detektor: Shimadzu RID-10A
- Säulen:
- a) Kombinierte Carotinoid- und Dialdehyd-Analytik:
 Alltech Prevail C18 (250 x 4,6 mm, Partikelgröße 5 µm)
 Vorsäule: Alltech AllGuard C18 (7,5 x 4,6 mm, Partikelgröße 5 µm)
- b) Kombinierte Carotinoid- und β-Ionon-Analytik:
 Alltech Prevail C18 (250 x 4,6 mm, Partikelgröße 10 µm)
 Vorsäule: Alltech AllGuard C18 (7,5 x 4,6 mm, Partikelgröße 5 µm)
- c) Ethanol-Analytik:
 Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm, Partikelgröße 2 µm)
 Vorsäule: Carbo-P Cartridge (30 x 4,6 mm, Partikelgröße 2 µm)

6.2.2 Photometrische Messungen

- Temperatur: 30°C (AtCCD1- und Bcmo2-Assay sofern nicht anders angegeben; Fluoreszenzmessungen)
 37°C (BCA-Test)

6.2.2.1 Absorptionsmessung

- Mikrotiterplatten-Lesegeräte: Genios (Tecan, Österreich)
 Filter (Gerät Genios): 510, 560, 590 nm
 Infinite 200 + Dispenser Unit (Tecan, Österreich)
- Küvetten-Spektrophotometer: UV-1700 PharmaSpec (Shimadzu, Japan)

6.2.2.2 Fluoreszenzmessung

- Mikrotiterplatten-Lesegerät: Infinite 200 (Tecan, Österreich)

6.2.3 Gaschromatographie

- Gaschromatograph: Shimadzu GC17A
- Säule: J&W Scientific DB Wax extended temperature range
 L = 30m, $d_{\text{INNEN}} = 0,25$ mm, $d_{\text{FILM}} = 0,25$ µm
- Injektor: Split-Injektor (Splitverhältnis 1:15), Temperatur 220°C
- Mobile Phase: Helium
- Detektor: Flammenionisationsdetektor (FID)
- Detektortemperatur: 270°C
- Druck: 100 kPa

Säulenfluss:	1 ml/min
Gesamtfluss:	19 ml/min
Temperatur-Programm:	100°C → (15°C/min) → 200°C, 5 min isokratisch
Injektionsvolumen:	3 µl

6.2.4 Kombinierte Gaschromatographie / Massenspektrometrie (GC/MS)

Gaschromatograph:	Shimadzu GC17A
Säule:	ValcoBond VB-5 (5% Phenyl- / 95% Methypolysiloxan) L = 30m, d _{INNEN} = 0,25 mm, d _{FILM} = 0,25 µm Alltech, Deutschland
Injektor:	Split-Injektor (Splitverhältnis 1:22), Temperatur 220°C
Mobile Phase:	Helium
Druck:	67,5 kPa
Säulenfluss:	1 ml/min
Gesamtfluss:	25 ml/min
Temperatur-Programm:	80°C → (8°C/min) → 240°C, 5 min isokratisch
GC/MS-Schnittstellentemperatur:	270°C
Scan range MS:	40 – 400 m/z
Injektionsvolumen:	3 µl

6.2.5 Infrarot-Spektrometer

Nicolet 5 PC FT-IR (Nicolet, Frankreich)
Material für Herstellung Presskristalle: KBr

6.2.6 Dynamische Lichtstreuungsmessung (DLS)

Alternative Bezeichnung: Photonenkorrelations-Spektroskopie (PCS).

Gerät:	Nano ZS (Malvern)	
Küvetten:	Polystyrol, 4 ml, Verschlusskappe	
Messtemperatur:	25°C	
Dispersionsmittel:	Reinstwasser; Berechnete Viskosität bei 25°C: 0,8872 cP	
Brechungsindizes:	Wasser	1,330
	Phospholipide	1,370
Betriebsmodus:	170° Rückstreuung	

6.2.7 Enzymreaktor

Verbindungsschläuche:

a) Flexibler Schlauch in Schlauchquetschpumpe

EPDM/PP-Chemieschlauch 8,0 x 11,1 mm

Reichelt Chemietechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland

Getestet, aber verworfen:

PharMed Hose 4,0 x 8,0 mm

Saint-Gobain Performance Plastics, Charny, Frankreich

b) Starrer Schlauch für Komponentenverbindung

PVC-FEP-Schlauch 6,4 x 9,5 mm

Reichelt Chemietechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland

Getestet, aber verworfen:

Teflon-Schlauch 5,0 x 7,0 mm

Reichelt Chemietechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland

PVC-Schlauch 8,0 x 11,0 mm

Reichelt Chemietechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland

Schlauchquetschpumpe: Evoline VC ISM912 C, Ismatec GmbH, Schweiz

Sauerstoffeintrag über Membranschlauch:

Membranschlauch:	Membrana Acurel Nr. 6114; Charge 03036
Länge:	10 cm
Gas:	Druckluft
Volumenstrom:	0,02 l/min
Einbautiefe:	1 cm über Reaktorboden

Fermenter:

Typ:	Bioengineering KLF 2,4 l (Glas)
Impeller:	Bioengineering BioB 128/012 B1 EG2 Angetrieben von unten
Heizstäbe:	2x Bioengineering Mod. 33519, je 250 W max.
Temperatursonde:	Bioengineering Mod. Pt100
O ₂ -Sonde:	Mettler-Toledo InPro 6800 320mm Länge

6.2.8 Pervaporationsmodul und Kühlfälle

Vakuumpumpe:	RV3, Edwards High Vacuum Int., Crawley/Sussex, UK
Drucksensor 1:	DI 200, Leybold Vakuum GmbH, Köln Messbereich: 0,1 – 200 mbar
Anzeigegerät 1:	Piezovac PV 20, LD Systeme GmbH & Co. KG, Hürth
Drucksensor 2:	Baratron 627B11MDE1B, MKS Instruments, Andover, UK Messbereich: 0,01 – 1 mbar
Anzeigegerät 2:	PR4000 S2V1N, MKS Instruments Deutschland GmbH
Messschreiber:	Servogor 124, NGI Norma Goertz Instruments GmbH, Wiener Neustadt, Österreich

6.2.8.1 Pervaporationsmodul und Kühlfällen

Pervaporationsmodul:	Prototypenmodell der Firma GKSS FZ Geesthacht GmbH (Lapostolet-Resch, 2001) Nutzbare Membranfläche: 0,099 m ²
Kühlfällen:	Sonderanfertigung, KGW-Isotherm

6.2.8.2 Pervaporationsmembranen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden grundsätzlich Kompositmembranen eingesetzt, die aus einem Stützgewebe, einer Verbindungsschicht und der aktiven Schicht aufgebaut waren. Die eingesetzten Membrantypen waren:

Produktname	Material der aktiven Schicht	Hersteller
1. 2420 G/V-1	Polydimethylsiloxan (PDMS)	GMT Membrantechnik Rheinfelden
2. 2420 G/V-2	Polyoctylmethylsiloxan (POMS)	GMT Membrantechnik Rheinfelden
3. POMS/PEI	Polyoctylmethylsiloxan (POMS) Polyethermimid	GKSS Forschungsz. Geesthacht GmbH

6.2.9 Rasterelektronenmikroskopie

Rasterelektronenmikroskop:	XL 40, Philipps, Hamburg
Energiedispersives Röntgenspektroskop:	EDAX CDU Leap-Detektor

Detektortyp EDX:	Si(Li)
Material Probenhalter:	Aluminium

6.2.10 Sonstige Geräte

Spektrophotometer:	Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS, temperierbar, 8 Messzellen Shimadzu UV-1700 PharmaSpec, temperierbar, 6 Messzellen
Ultraschall-Sonotrode:	Branson W-250 D
Zentrifugen:	Eppendorf Centrifuge 5415 R (Eppendorfgefäße) Sigma 6K15 (Falcon-Röhrchen) Kontron Centrikon H-401 (Zentrifugenbecher 500 ml)
Homogenisator:	Emulsiflex C3, Avestin Inc., Ottawa, Kanada

6.3 Methoden

6.3.1 Molekularbiologische und proteinbiochemische Methoden

6.3.1.1 Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen

Ersttransformationen kommerziell erworbener, kompetenter *E. coli* – Zellen erfolgten mittels Temperatur-Schock nach folgendem Protokoll:

- 20 µl kompetenter Zellen in einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß mit 1 µl Plasmidpräparation (entspr. 5-10 ng DNA) versetzen, vorsichtig mischen und 30 min auf Eis inkubieren
- Inkubation für 70 s bei 42°C in Thermoblock
- Überführung auf Eis, Zugabe 980 µl SOC-Medium
- Inkubation für 60 min bei 37°C, 1000 rpm in Thermoblock
- Ausplattierung von 10 und 100 µl auf LB-Agarplatten, die das entsprechende Selektionsantibiotikum enthielten
- Inkubation bei 37°C für 12 h
- Selektion eines Klonen für die Expression, Herstellung eines Glycerol-Stocks davon

Co-Transformationen von kompetenten, Carotinasen exprimierenden *E. coli* erfolgten mittels Elektroporation nach folgendem Protokoll:

- Mischung von 40 µl elektrokompetenten Zellen mit 1 µl Plasmidpräparation (entspr. 5-10 ng DNA) in auf –20°C gekühlter Elektroporationsküvette (Spaltbreite 1 mm)
- Elektroporation mit 1,8 kV, 25 µF, 200 Ω
- Zugabe von 1 ml SOC-Medium und Inkubation für 90 min in 1,5 ml-Eppendorfgefäß bei 37°C, 200 rpm im Thermoblock
- Ausplattierung von 10 und 100 µl auf LB-Agarplatten, die das entsprechende Selektionsantibiotikum enthielten,
- Inkubation bei 37°C für 12 h
- Selektion eines Klonen für die Expression, Herstellung eines Glycerol-Stocks davon

6.3.1.2 Plasmidpräparation und Sequenzierung

Um Plasmide für Neutransformationen zu vermehren, wurden *E. coli* DH5α mit dem jeweiligen Plasmid transformiert und bei 37° und 200 rpm in LB-Medium bis zu einer O.D.₆₀₀ von 2,0 kultiviert. Die Plasmidpräparation erfolgte mithilfe eines Kits (Genelute Mini / Midi Prep Kit, Sigma, Taufkirchen). Die Sequenzierung wurde mit bereits beschriebenen Primern (Schilling, 2008) von der Firma SRD, Bad Homburg, durchgeführt.

6.3.1.3 Herstellung von Glycerol-Kulturen

E. coli wurde in LB-Medium bis zur mittleren exponentiellen Phase kultiviert und 750 µl davon zu 250 µl steriler, wässriger 80% (w/v) Glycerol-Lösung in Schraubdeckel-Cryokulturgefäßen gegeben. Nach kurzem, intensivem Mischen wurden die Gefäße in flüssigem Stickstoff gefroren und bei –80°C gelagert. *E. coli* BL21 (DE3)-Expressionsstämme wurden vor der Kultivierung jeweils frisch transformiert und Glycerol-Kulturen nur zur späteren Überprüfung angelegt.

6.3.1.4 Proteinexpression

Für Proteinexpressionen wurden *E. coli* BL21 (DE3) jeweils frisch mit den entsprechenden Plasmiden transformiert. Es wurden Vorkulturen in 10 ml LB-Medium in 50 ml Erlenmeyerkolben angesetzt und in Gegenwart des jeweiligen

Selektionsantibiotikums bei 37°C und 200 rpm für 10h kultiviert. Hauptkulturen wurden in 2l-Erlenmeyerkolben in 400 ml LB-Medium angesetzt. Es wurde auf eine O.D.₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bei 30°C und 200 rpm bis zu einer O.D.₆₀₀ von 0,4 kultiviert und anschließend die Inkubatortemperatur auf die jeweilige Expressionstemperatur eingestellt. Bei einer O.D.₆₀₀ von 0,6 ± 0,1 wurde mit der entsprechenden Konzentration IPTG bzw. L(+)-Arabinose induziert und bei 18°C und 200 rpm für die angegebene Zeit exprimiert. Die Zellernte nach Ende der Expression erfolgte durch Zentrifugation für 12 min bei 5200g und 4°C. Geerntete Zellen wurden ohne weitere Waschschrte sofort bei -20°C eingefroren.

6.3.1.5 Herstellung von Zelllysaten und Enzym-Rohextrakten

Bei -20°C gelagerte Zellpellets wurden mit dem angegebenen Volumen Reaktionspuffer bzw. Bindepuffer auf Eis aufgetaut und durch vortexen resuspendiert. Nach Zugabe von 1 mmol/l PMSF erfolgte der Aufschluss der Zellen bei 4°C entweder mithilfe einer Sonotrode (Volumina < 20 ml) oder eines Hochdruck-Homogenisators (V > 20 ml).

Sonotrode: Es wurde eine Beschallungsspitze mit 5 mm Durchmesser eingesetzt. Sofern nicht anders angegeben erfolgte die Sonifizierung bei einer Leistung von 30 W und einer Gesamtbeschallungsdauer von 120 s. Die Beschallung erfolgte in Intervallen von 0,5 s mit Pausen von jeweils 0,5 s.

Hochdruck-Homogenisierung: Der Zellaufschluss erfolgte bei einem Homogenisierungsdruck von 100 000 kPa für insgesamt fünf Passagen. An das Homogenisator-Auslassventil war ein Wärmetauscher mit 4°C Betriebstemperatur angeschlossen.

Zur verbesserten Solubilisierung der heterolog exprimierten Carotinasen wurde, sofern nicht anders angegeben, 0,3 % (w/v) Na-Cholat zugegeben, geschüttelt und für 10 min auf Eis inkubiert. Zur Gewinnung von Enzym-Rohextrakt wurden die Lysate anschließend für 8 min bei 16100 g zentrifugiert.

6.3.1.6 Affinitätschromatographische Proteinaufreinigung

Affinitätschromatographische Proteinaufreinigungen erfolgten mithilfe eines Äkta Explorer FPLC-Systems (Amersham Biosciences) mit einer Standard-Flussrate von

1 ml/min. Der Aufschluss der Zellen erfolgte im jeweiligen Bindepuffer. Enzym-Rohextrakte wurden mithilfe der Probenpumpe 3 mal über die entsprechende Affinitätssäule geleitet und die verbleibende Fraktion als Durchfluss aufbewahrt. Die Säulen wurden mit 5 Säulenvolumina Bindepuffer gewaschen und das gebundene Protein mithilfe des Elutionspuffers eluiert. Im Fall von His₆-modifizierten Proteinen wurde ein Elutionsmittelgradient eingesetzt, um unspezifisch gebundenes, histidinreiches Protein vorab zu eluieren. Die Sammlung des Eluats erfolgte in Fraktionen zu 2 ml. Die Überwachung der Aufreinigung erfolgte anhand der Absorption des Säulen-Ausflusstromes bei 280 nm. Fraktionen, die aufgereinigtes His₆-modifiziertes Protein enthielten, wurden vereinigt und durch Ultrafiltration in Zentrifugenröhrchen mit 30 kDa Größenausschluss in Reaktionspuffer umgepuffert. Der minimal zu erreichende Verdünnungsfaktor für den Elutionspuffer betrug 100.

6.3.1.7 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Test

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte aufgrund seiner Unempfindlichkeit gegenüber hohen Tensidkonzentrationen mit dem Bicinchoninsäure- (BCA) Test. Konzentrationsbestimmungen erfolgten mit einem kommerziell erhältlichen BCA-Assay-Kit (Pierce, USA) in Mikrotiterplatten. Dabei wurde Fraktion V von Rinderserumalbumin (BSA) als Standard eingesetzt. Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung nach einer Inkubationsdauer von 20 min bei 37°C. Zur Erstellung der 8-Punkt-Kalibriergeraden wurden BSA-Konzentrationsstandards in einem Bereich von 0 bis 2000 µg/ml mitgeführt.

6.3.1.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und densitometrische Gelanalyse

In Abhängigkeit von der Größe des Zielproteins wurden 10% und 15% SDS-Polyacrylamidgele für die elektrophoretische Trennung von Proteinmischungen eingesetzt. Die Zusammensetzung der Gele war wie folgt:

	<u>10% SDS-PA-Gel</u>	<u>15% SDS-PA-Gel</u>
<u>Trenngel</u>		
Puffer	1,25 ml	1,25 ml
H ₂ O	5,645 ml	4,4 ml
Poly-/Bisacrylamid 29:1, 40%	2,5 ml	3,75 ml
10 % SDS	100 µl	100 µl
1,5 % APS	500 µl	500 µl
TEMED	5 µl	5 µl
<u>Sammelgel</u>		
Puffer	1,67 ml	1,67 ml
H ₂ O	3,77 ml	3,77 ml
Poly-/Bisacrylamid 29:1, 40%	0,83 ml	0,83 ml
10 % SDS	67 µl	67 µl
1,5 % APS	333 µl	333 µl
TEMED	5 µl	5 µl

Zu analysierende Proteinlösungen wurden mit 5x Probenpuffer versetzt und durch 5 min Erhitzen auf 95°C denaturiert. Gele wurden sofern nicht anders angegeben mit 10 µl Probe pro Tasche beladen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 200V für 40 min (10% Gele) bzw. 60 min (15% Gele). Die Gele wurden für 60 min in einem Bad mit Coomassie-Lösung gefärbt und anschließend für in einem Bad mit Entfärbelösung (Wasser, 10% (v/v) EtOH, 20% (v/v) Eisessig) mit mehrmaligem Wechsel der Lösung entfärbt, bis die Proteinbanden ausreichend kontrastiert waren. Die Bestimmung der Reinheit analysierter Proteine erfolgte mittels densitometrischer Gelanalyse (BioDoc Analyze Software, Biometra). Die Linearität der Färbung mit der Proteinkonzentration wurde mit definierten Proben von BSA kontrolliert. Die automatische Bestimmung der Molekülmasse einer Bande anhand des Retentionsfaktors erfolgte anhand des Proteingrößenmarkers. Die Konzentration eines Proteins in der untersuchten Lösung wurde errechnet, indem ihr densitometrisch ermittelter Anteil am Gesamtprotein mit der aus dem BCA-Test bekannten Gesamtproteinkonzentration multipliziert wurde. Molare Konzentrationen für die Berechnung enzymkinetischer Parameter wurden über die molare Masse des Proteins berechnet.

6.3.1.9 Western blot

Der Nachweis von Glutathion-S-Transferase-gekoppelten Proteinen erfolgte mithilfe polyklonaler Kaninchen Anti-GST-HRP-Antikörper (Invitrogen, Göttingen). Zur Bestimmung der Größen markierter Proteine und zur Kontrolle von Elektrotransfer und Färbereaktion wurde ein Proteingrößenmarker eingesetzt, der selbst über einen ebenfalls HRP-gekoppelten Nachweisantikörper markiert wird (Roti-Mark Western, Carl Roth). Nach Auftrennung per SDS-PAGE wurden die Proteine gemäß dem Herstellerprotokoll elektrophoretisch aus dem Gel auf eine PVDF-Membran (BioRad) transferiert. Der Elektrotransfer erfolgte bei konstant gehaltener elektrischer Flussdichte von $5,5 \text{ mA/cm}^2$ in 4°C Transferpuffer für 1,5 Stunden. Die Membran wurde dreimal mit Tris-Puffer gespült und eine Stunde in Blockier-Puffer geschwenkt. Anschließend wurde die Membran fünfmal mit Tris-Puffer gespült und für 1,5 Stunden in 25 ml Blockierpuffer mit 1:5000 verdünntem Anti-GST-HRP-Antikörper und 1:1000 verdünntem Anti-Marker-HRP-Antikörper unter schwenken inkubiert. Die Membran wurde dreimal mit Tris-Puffer gespült und anschließend in 25 ml Entwicklungslösung (TMB Substrat Solution, Sigma) geschwenkt, bis deutliche Banden zu sehen waren. Die Färbereaktion wurde durch Spülen mit destilliertem Wasser gestoppt und die Membran zwischen zwei Filterpapieren getrocknet.

6.3.1.10 Glutathion-S-Transferase (GST)-Aktivitätstest

Die Bestimmung der Glutathion-S-Transferase-Aktivität von GST-fusionierten Proteinen erfolgte photometrisch in Mikrotiterplatten über einen 1-Chlordinitrobenzol (CDNB) – Test. Pro Mikrotiterplattenvertiefung wurden 10 μl Enzym-Rohextrakt und 90 μl direkt vorher angesetzter Test—Reagenz vermischt und bei 25°C die Absorption bei 340 nm Wellenlänge über 20 min vermessen.

Zusammensetzung der Test-Reagenz:

94,5 % (v/v)	PBS
2,5 % (v/v)	Ethanol
203 mg/l	1-Chlordinitrobenzol (CDNB)
615 mg/l	Glutathion (reduziert)

Molarer Extinktionskoeffizient von CDNB (340 nm): $9,6 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

6.3.2 *In vitro* Vermittlung carotinoider Substrate an Enzyme

Die eingesetzten Substratvermittlungsformen waren für alle untersuchten Enzyme grundsätzlich gleich und unterschieden sich nur in Typ und pH-Wert des eingesetzten Puffers oder Zusatzstoffen wie gegebenenfalls angegeben.

6.3.2.1 Solubilisierung von Carotinoiden mittels Mizellen

Die Solubilisierung von Carotinoiden in mizellaren Lösungen erfolgte durch einen vierstufigen Prozess:

- Vorlösung des carotinoiden Substrats in organischem Lösungsmittel (THF, stabilisiert)
- Mischung der organischen Lösung von Carotinoid mit reinem Tensid. Insbesondere bei der Lösung von hohen Carotinoidkonzentrationen oder stark hydrophoben Carotinoiden wie β -Carotin muss die Mischung bei erhöhter Temperatur erfolgen und wurde bei 50°C in einem Wasserbad durchgeführt. Die Zugabe der organischen Carotinoidlösung erfolge direkt in die viskose Tensidphase hinein. Herabfließen an der Gefäßwand hatte die Verdampfung von Lösungsmittel und Bildung von Carotinoid-Mikrokristallen zu Folge. Diese wirkten während der Entfernung des Lösungsmittels als Kristallisationskeime und führten zu einem Ausfallen des Substrats.
- Entfernung des organischen Lösungsmittels im Rotavapor. Während des Prozesses muss gewährleistet sein, dass durch den Entzug der Verdampfungsenthalpie die Phasenübergangstemperatur des Tensids („Cloud point“, insbesondere Tenside der Tween-Serie) nicht unterschritten wird. Die Entfernung des Lösungsmittels erfolgte aus diesem Grund bei 50°C Wasserbadtemperatur, 230 mbar und 30 rpm Rotationsgeschwindigkeit.
- Zugabe von Puffer und Ausbildung carotinoidbeladener Mizellen. Puffer und Tensid-Carotinoid-Mischung wurden vor der Mischung auf 50°C erwärmt, um oberhalb der Phasenübergangstemperatur der Tenside zu bleiben. Nach intensivem Mischen wurden die Lösungen visuell auf Präzipitation überprüft, mit Stickstoff überschichtet und unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gelagert.

6.3.2.2 Solubilisierung von Carotinoiden mittels Liposomen

Die Solubilisierung von Carotinoiden in Liposomenlösungen erfolgte durch einen vierstufigen Prozess, einschließlich einer Größenvereinheitlichung der Vesikel:

- Vorlösung des carotinoiden Substrats in THF (stabilisiert)
- Mischung der organischen Lösung von Carotinoid mit reinen Phospholipiden (Lipoid GmbH, Ludwigshafen) beziehungsweise Galaktolipiden (Nutfield Nurseries, Großbritannien). Insbesondere bei der Lösung von hohen Carotinoidkonzentrationen oder stark hydrophoben Carotinoiden wie β -Carotin muss die Mischung bei erhöhter Temperatur erfolgen und wurde bei 50°C in einem Wasserbad durchgeführt.
- Entfernung des organischen Lösungsmittels durch Stickstoffbegasung und anschließende 60 min bei 230 mbar Unterdruck. Während des Prozesses muss gewährleistet sein, dass durch den Entzug der Verdampfungsenthalpie die Phasenübergangstemperatur der Lipidmischung (insbesondere bei hohem Phosphatidylethanolamin-Anteil) nicht unterschritten wird. Die Entfernung des Lösungsmittels durch Stickstoffbegasung erfolgte deshalb in einem 50°C Wasserbad, die Vakuumtrocknung in einem auf 50°C erwärmten Aluminium-Probenständer.
- Zugabe von Puffer und Ausbildung carotinoidbeladener Mizellen. Puffer und Lipid-Carotinoid-Mischung wurden vor der Mischung auf 50°C erwärmt, um oberhalb der Phasenübergangstemperatur der Phospholipide zu bleiben. Durch intensives Mischen wurden die carotinoidhaltigen Lipid-Schichten von den Gefäßwänden abgelöst und in multilamellare Vesikel überführt. Die multilamellaren Vesikel wurden mithilfe einer Sonotrode in kleine unilamellare Vesikel (*small unilamellar vesicles*, SUV) überführt, um vorher innenliegende Lipid-Doppelschichten enzymatisch zugänglich zu machen und eine photometrisch vermessbare, optisch transparente Lösung zu erhalten. Eine weitere Vereinheitlichung der Partikelgrößenverteilung durch Extrusion wurde nicht durchgeführt, da durch Rückstand im Filter die Lipidkonzentrationen undefiniert werden. Mittels dynamischer Lichtstreuungsmessung (alternative Bezeichnung: Photokorrelations-Spektroskopie (PCS)) wurde die Partikelgrößenverteilung der Liposomenpräparation bestimmt.

- Sonifizierte Lösungen wurden visuell auf Präzipitation überprüft, mit Stickstoff überschichtet und unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur für maximal 24h gelagert.

6.3.2.3 Solubilisierung von Carotinoiden in Nanoemulsionen

Im Gegensatz zu Emulsionen mit größeren Partikeldurchmessern, sind Mikro- und Nanoemulsionen thermodynamisch nahezu stabil und optisch transparent. 8'-Apo- β -carotin-8'-al beziehungsweise β -Carotin enthaltende Nanoemulsionen wurden von der Firma Lipoid GmbH, Ludwigshafen, bereitgestellt. Die durchschnittliche Teilchengröße betrug in diesen Präparationen 78,7 nm (β -Carotin) beziehungsweise 77,1 nm (8'-Apo- β -carotin-8'-al). Die Carotinoidkonzentration in den Präparationen betrug 1% (w/w). Die wesentlichen Inhaltsstoffe der Präparationen (Konzentrationsangaben können aus Geheimhaltungsgründen nicht gegeben werden) waren:

Glycerin
 Capryl- und Capron-Triglyceride
 Sojaphospholipide
 Carotinoid (β -Carotin oder 8'-Apo- β -carotin-8'-al)
 Tocopherol

6.3.3 Carotinase-Aktivitätstests

6.3.3.1 Carotinase-Aktivitätstest in Mikrotiterplatten

Carotinase-Aktivitätsmessungen für Expressions-Untersuchungen und zur kinetischen Charakterisierung von Enzymvarianten oder Substrat-Vermittlungssystemen wurden, sofern nicht anders angegeben, immer mit dem gleichen Test in Mikrotiterplatten durchgeführt:

In Reaktionspuffer solubiliertes Carotinoid	10 μ l
Reaktionspuffer	60 - x μ l
Organisches Cosolvens	x μ l
Enzym-Rohextrakt bzw. Lösung aufgereinigten Enzyms	20 μ l

Gesamtvolumen	100 μ l

Die eingesetzten Carotinoid-Solubilisate in Reaktionspuffer hatten, sofern nicht anders angegeben, folgende Zusammensetzung:

- a) Mizellare Carotinoidlösung: 80 mmol/l Tensid, 0,64 mmol/l Carotinoid
- b) Liposomale Carotinoidlösung: 5 mmol/l Phospholipide, 0,2 mmol/l Carotinoid
- c) Carotinoid-Nanoemulsion: 0,5 mmol/l Carotinoid

Der Reaktionsfortschritt wurde photometrisch anhand der Substratabnahme verfolgt. Die Messung erfolgte nicht im Absorptionsmaximum des jeweiligen Substrates, sondern bathochrom versetzt. Auf diese Weise wurden Überlagerungen mit dem Absorptionsspektrum des bei der Reaktion entstehenden Dialdehyds vermieden (Schilling, 2008). Die Absorptionsspektren von Carotinoiden variieren deutlich in Abhängigkeit vom Lösungsmittel und dem Anteil monomolekular gelöster Moleküle (Auweter et al., 1999). Die Absorptionsspektren der Carotinoide in der jeweiligen Vermittlungsform wurden deshalb vor den Experimenten bestimmt und sichergestellt, dass die beabsichtigte Messwellenlänge im Absorptionsspektrum enthalten war. Sofern nicht anders angegeben, wurden Carotinoid-Spaltungsexperimente bei folgenden Wellenlängen vermessen:

8'-Apo- β -carotin-8'-al	510 nm
β -Carotin	490 nm
Zeaxanthin	490 nm
Astaxanthin	510 nm
Canthaxanthin	510 nm
Cryptoxanthin	510 nm
Retinal	490 nm

Zur Bestimmung des autoxidativen Carotinoidabbaus wurden Kontrollansätze mitgeführt, in denen Zellextrakt von Leervektor tragenden *E.coli* eingesetzt wurde. Die Zellen waren unter identischen Bedingungen kultiviert und induziert worden. Die Gesamtproteinkonzentration pro Ansatz wurde in Ansätzen mit und ohne Carotinasen gleich gehalten.

Die Reaktionstemperatur betrug, sofern nicht anders angegeben, 30°C. Die Mikrotiterplatten wurden nach der Mischung der Reaktionskomponenten

Temperatur:	30°C (alle Komponenten vorgewärmt)
Impellerdrehzahl:	150 rpm
O ₂ -Eintrag durch Begasung:	Mit Druckluft, gemäß Versuchsangaben
Abluftkühlung:	4°C
Innendruck im Enzymreaktor:	1 bar

Der Reaktionsfortschritt wurde anhand der Abnahme der Substratkonzentration und der Zunahme des Produktes β -Ionon verfolgt. Der autoxidative Carotinoidabbau wurde in Kontrollmessungen mit Lysat von Leervektor tragenden Zellen gemessen und vom Ergebnis subtrahiert. Die in den Kontrollversuchen eingesetzten Zellen waren unter identischen Bedingungen kultiviert und exprimiert worden wie die Zellen in enzymatischen Umsetzungen. Die in den Kontrollversuchen eingesetzte Gesamtproteinkonzentration wurde gleich gewählt, wie in den enzymatischen Umsetzungen.

Zu den Probennahmezeitpunkten wurde über ein Septum im Reaktorboden mit einer Spritze 1 ml der Reaktionslösung aus dem Enzymreaktor entnommen und die Reaktion mit 1 ml Ethanol gestoppt. Die Probenaufarbeitung erfolgte in drei Schritten:

- Zentrifugation der mit Ethanol versetzten Reaktionslösung bei 18100 g und 4°C für 2 min, Entnahme des Überstandes
- Vermischung des Zellpellets mit 500 μ l Aceton, Extraktion im Thermoblock bei 50°C, 1500 rpm für 5 min
- Zentrifugation bei 18100 g, 4°C für 2 min, Entnahme des Überstandes
- Vermischung des Zellpellets mit 500 μ l Aceton, Extraktion im Thermoblock bei 50°C, 1500 rpm für 5 min
- Zentrifugation bei 18100 g, 4°C für 2 min, Entnahme des Überstandes

In allen Proben wurden unter Verwendung eines externen Standards (3 Punkte) per HPLC die Konzentration von β -Carotin und β -Ionon in Dreifachbestimmung ermittelt. Die drei Messwerte für einen Probennahmezeitpunkt (Überstand der Reaktionslösung + Aceton-Extrakte 1 und 2 aus dem Zellpellet) wurden addiert.

b) Carotinas-Aktivitätstest mit 8'-Apo- β -carotin-8'-al als Substrat zur Charakterisierung der *in situ* Produktabtrennung mittels Pervaporation

Zur Charakterisierung der *in situ* Produktabtrennung von β -Ionon aus einer enzymatischen Umsetzung wurden Versuche mit dem Modells substrat 8'-Apo- β -carotin-8'-al durchgeführt. Dieses wird durch die verwendeten Carotinasen mit höherer Geschwindigkeit umgesetzt, wodurch höhere transiente Produktkonzentrationen entstehen. Die Untersuchung des Pervaporationsverhalten aus einer Reaktionsbrühe wird auf diese Weise erleichtert. Die Reaktion wurde nicht im Enzymreaktor durchgeführt, sondern in einem 1000 ml Becherglas, dessen Öffnung mit Parafilm abgedichtet wurde. Die Reaktionslösung wurde mit einem Magnet rührer gerührt, ein aktiver Sauerstoffeintrag fand nicht statt. Reaktionsansätze zur enzymatischen Spaltung des Modells substrates 8'-Apo- β -carotin-8'-al enthielten 10 % (v/v) Ethanol, da die enzymatische Umsetzung des Modells substrats in Gegenwart dieser Cosolvenskonzentration beschleunigt ist (Schilling et al., 2007).

Carotinas-Aktivitätstests im Becherglas wurden mit folgender Zusammensetzung durchgeführt:

Zellysat in Reaktionspuffer	250 ml
Ethanol	50 ml
Tris-Puffer (20 mM, pH 7,4)	182 ml
Mizellare 8'-Apo- β -carotin-8'-al -Lösung	17,24 ml

Gesamtvolumen	500 ml

Mizellare 8'-Apo- β -carotin-8'-al -Lösung: 2,2 mmol/l 8'-Apo- β -carotin-8'-al
10 % (w/v) Tween 40

Temperatur: 30°C (alle Komponenten vorgewärmt)

Magnet rührergeschwindigkeit: 300 rpm

Der Reaktionsfortschritt wurde anhand der Abnahme der Substratkonzentration verfolgt. Der autoxidative Carotinoidabbau wurde in Kontrollmessungen mit Lysat

von Leervektor tragenden Zellen gemessen und vom Ergebnis subtrahiert. Die in den Kontrollversuchen eingesetzten Zellen waren unter identischen Bedingungen kultiviert und exprimiert worden wie die Zellen in enzymatischen Umsetzungen. Die in den Kontrollversuchen eingesetzte Gesamtproteinkonzentration wurde gleich gewählt, wie in den enzymatischen Umsetzungen.

Zu den Probennahmezeitpunkten wurde 5 ml der Reaktionslösung aus dem Enzymreaktor entnommen und die Reaktion mit 2,5 ml THF gestoppt. Die Proben wurden 2 min bei 18100 g und 4°C zentrifugiert und im Überstand die Substratkonzentration per HPLC mit externem Standard (3 Punkte) vermessen.

6.3.4 Produktabtrennung durch organophile Pervaporation

In allen Versuchen mit enzymatischer Umsetzung von Carotinoiden unter gleichzeitiger *in situ* Produktabtrennung mittels organophiler Pervaporation wurde die im Membranscreening ausgewählte POMS/PEI-Membran (GKSS-Forschungszentrum Geesthacht GmbH) eingesetzt. Die Vorquellung der Membran erfolgte durch Spülung der Pervaporationseinheit mit 30°C warmem, bidestilliertem Wasser für 60 Minuten direkt vor dem Versuch.

Es standen vier Kühlfallen zur Verfügung, die nacheinander eingesetzt wurden. Verwendete Kühlfallen wurden geleert, gespült, getrocknet und anschließend im selben Versuch wieder eingesetzt. Die Leermassen der trockenen Kühlfallen wurden zu Beginn des Versuches bestimmt. Die jeweils eingesetzte Kühlfalle war in einem Isolationsgefäß 7 cm tief in flüssigem Stickstoff getaucht und der Innenkorpus der Kühlfalle 10 cm hoch mit flüssigem Stickstoff gefüllt. Die Flüssigstickstoffpegel wurden während des Versuches konstant gehalten.

In Versuchen zur enzymatischen Spaltung des Modellsubstrates 8'-Apo- β -carotin-8'-al fand die Reaktion in einem Becherglas in einem thermostatisierten Wasserbad statt. Die Feedlösung wurde aus dem Gefäß in die Pervaporationseinheit und von dort zurück in das Becherglas gepumpt. Entnahme- und Rückfluss-Position lagen an entgegengesetzten Seiten des Gefäßes.

In Versuchen zur enzymatischen Spaltung des Zielsubstrates β -Carotin fand die Reaktion in einem Enzymreaktor statt, wie in Abschnitt 6.2.7 beschrieben. Organische Cosolventien wurden nicht eingesetzt, da Untersuchungen bei diesem Substrat keine Aktivierung der Reaktion gezeigt hatten.

Die Retentat-Förderrate durch die Pervaporationseinheit betrug 73 l/h. Vor Versuchsbeginn wurden der Enzymreaktor und die Pervaporationseinheit durch Umwälzung von Reinstwasser bei eingeschaltetem Thermostat auf 30°C erwärmt. Diese Temperatur wurde während der Versuche beibehalten.

Probennahme und Probenaufarbeitung:

Permeatproben wurden bei jedem Kühlfallenwechsel genommen. Entnommene Kühlfallen wurden verschlossen und der flüssige Stickstoff aus dem Innenkorpus ausgegossen. Kühlfallen wurden im Abzug auf Raumtemperatur gebracht und die Oberfläche sorgfältig getrocknet. Durch Wägung wurde die in der Kühlfalle enthaltene Permeatmasse bestimmt. Das Permeat wurde ausgegossen und in gasdichten Gefäßen bei -20°C bis zur Analyse aufbewahrt. Vor den folgenden zwei Spülschritten wurde jeweils die Masse der innen feuchten Kühlfalle bestimmt und während der Spülung die eingesetzte Alkoholmasse durch Differenzwägung bestimmt. Proben der beiden Spülfractionen wurden ebenfalls in gasdichten Gefäßen bei -20°C bis zur Analyse aufbewahrt.

Für die enzymatische Umsetzung von 8'-Apo- β -carotin-8'-al hatten vorhergehende Versuche eine Aktivierung der Reaktion durch Anwesenheit von organischen Cosolventien ergeben. In Versuchen mit diesem Substrat war deshalb 10 % (v/v) Ethanol im Reaktionsansatz enthalten und es war eine Bestimmung des Ethanolflusses notwendig. Die Spülung verwendeter Kühlfallen erfolgte in diesen Fällen mit Methanol, um eine separate Analytik von pervaporisiertem Ethanol und Methanol aus dem Spülvorgang zu ermöglichen. Für die enzymatische Umsetzung von β -Carotin war keine Aktivierung der Reaktion durch Cosolventien festgestellt worden und die Versuche wurden deshalb ohne Ethanol im Reaktionsansatz durchgeführt. Die Kühlfallen wurden mit Ethanol gespült, eine Ethanol-Analytik war nicht notwendig.

Mittels GC und HPLC wurden die β -Ionon- und, wo notwendig, die Ethanolkonzentration bestimmt. HPLC-Messungen wurden mit externem Standard, GC-Messungen mit internem und externem Standard durchgeführt.

HPLC-Analytik: Proben wurden ohne Veränderung eingesetzt

GC-Analytik: 900 μ l Probe + 100 μ l Lösung des internen Standards
(100 mg/l Kampfer in Ethanol)

6.3.5 Analytische Methoden

6.3.5.1 Spektrophotometrie

In spektrophotometrischen Messungen zur enzymatischen Carotinoidspaltung wurden drei Arten von Kontrollen mitgeführt:

1. Kontrollen mit Zellextrakten von Stämmen, die nur mit dem leeren jeweiligen Expressionsplasmid transformiert, jedoch identisch kultiviert und induziert waren. Mithilfe dieser Kontrollen wurde sichergestellt, dass neben den exprimierten Carotinasen keine zelleigene Carotinoid-Spaltungsaktivität vorhanden war.
2. Kontrollen mit Puffer anstatt Zellextrakt. Diese Kontrollen dienten zur Bestimmung der chemischen (Autoxidation) beziehungsweise physikochemischen (Präzipitation) Substratstabilität.
3. Kontrollen mit Puffer anstatt Substratlösung (eingesetzt insbesondere bei Reaktionen mit organischen Cosolventien). Mithilfe dieser Kontrollen wurde der Einfluss der beschleunigten Proteindenaturierung und der damit verbundene Absorptionsanstieg bestimmt.

a) Messungen in Mikrotiterplatten

Kinetische Messungen zur Carotinoidspaltung erfolgten üblicherweise in einem Reaktionsvolumen von 100 μ l in Polystyrol-Mikrotiterplatten mit Deckel. Auf diese Weise konnten alle Reaktionen und Kontrollen drei- beziehungsweise fünffach durchgeführt und eine geringe Standardabweichung der Messwerte erreicht werden. Sofern nicht anders angegeben erfolgten die Messungen bei 30°C. In Abhängigkeit vom eingesetzten Substrat wurde eine Messwellenlänge gewählt, die möglichst nahe am Absorptionsmaximum des Substrates, jedoch nicht im

Absorptionsspektrum des bei der Reaktion entstehenden Dialdehyds lag (Abschnitt 6.3.3.1).

Um Vergleichbarkeit zwischen den auf zwei verschiedenen Geräten aufgenommenen Daten zu gewährleisten, wurden identische Messintervalle eingehalten. Das Gerät Genios (Tecan, Österreich) benötigte für die Messung einer 96-Well-Mikrotiterplatte minimal 42 Sekunden. Dieses Messintervall wurde auch im zweiten Gerät verwendet. Pro Well und Messpunkt wurden fünf Blitze gemessen und der Mittelwert gebildet. Eine Variation der Messposition im Well innerhalb der Einzelmessungen eines Messpunktes wurde nicht durchgeführt. Für beide Geräte wurden unabhängige Kalibrationen mit Standardlösungen der Substrate durchgeführt. Wenn möglich (Gerät Infinite 200, Tecan, Österreich) erfolgte der Start der Reaktion durch automatische Pipettierung der Enzymlösung. Die Mikrotiterplatten wurden vor Beginn der Messung für zwei Sekunden bei hoher Intensität orbital geschüttelt.

b) Messungen in Küvetten

Kinetische Messungen zur Carotinoidspaltung in Küvetten erfolgten in 800 μ l Reaktionsvolumen. Sofern nicht anders angegeben erfolgten die Messungen bei 30°C. Proben wurden vor Beginn der Messung für zwei Sekunden gemischt und Gasblasen durch eintauchen in ein Ultraschallbad aus dem Lichtstrahl entfernt. In Abhängigkeit vom eingesetzten Substrat wurden dieselben Messwellenlängen wie in Mikrotiterplattenmessungen verwendet (Abschnitt 6.3.3.1).

6.3.5.2 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie

Wenn ein Reaktionssystem im UV/VIS-Bereich nicht transparent war, wurde die Abnahme der Substratkonzentration und die Zunahme der Produktkonzentrationen per HPLC gemessen. Dies war unter anderem der Fall bei der Umsetzung von Carotinoiden aus technischen Substraten, bei Umsetzungen von Carotinoiden im Enzymreaktor sowie bei Versuchen mit multilamellaren Liposomen und Nanoemulsionen. Dazu wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben eines Reaktionsansatzes genommen und durch Zugabe des gleichen Volumens Ethanol gestoppt. Sofern nicht anders angegeben, wurden präzipitierte Zellbestandteile durch Zentrifugation für zwei Minuten bei 18100 g sedimentiert und der Überstand mittels HPLC analysiert. Mit dem Pellet wurden anschließend zwei Aceton-

Extraktionen durchgeführt. Dazu wurde jeweils das ursprüngliche Probenvolumen in Aceton zugegeben, das Pellet gelöst und anschließend für 5 Minuten bei 50°C und 1000 rpm im Thermoblock extrahiert. Nach Zentrifugation bei 18100 g für 2 Minuten wurde der Überstand per HPLC vermessen. Die Identifizierung einer Substanz erfolgte durch Vergleich der Retentionszeit und Absorptionsspektrum mit einem Standard. Die Quantifizierung erfolgte über externe Standards.

- Flussraten:
- a) Kombinierte Carotinoid- und Dialdehyd-Analytik: 1 ml/min
 - b) Kombinierte Carotinoid- und β -Ionon-Analytik: 1 ml/min
 - c) Ethanol-Analytik: 0,6 ml/min
- Temperatur:
- a) Kombinierte Carotinoid- und Dialdehyd-Analytik: 30°C
 - b) Kombinierte Carotinoid- und β -Ionon-Analytik: 20°C
 - c) Ethanol-Analytik: 27°C
- Laufmittel:
- a) Kombinierte Carotinoid- und Dialdehyd-Analytik:
 - Laufmittel A: 100% Methanol
 - Laufmittel B: 25:75 (v/v) THF:Methanol
 - b) Kombinierte Carotinoid- und β -Ionon-Analytik:
 - Laufmittel A: 99:1 (v/v) Methanol:Wasser
 - Laufmittel B: THF
 - c) Ethanol-Analytik:
 - Laufmittel: 3 mmol/l H₂SO₄
- Pumpenprogramm:
- a) Kombinierte Carotinoid- und Dialdehyd-Analytik:
 - 0 - 8 min: 0% B
 - 8 - 9 min: Gradient 0% B auf 100% B
 - 9 - 18 min: 100% B
 - 18 - 18,1 min: Gradient 100% B auf 0% B
 - 18,1 - 31 min: 0% B
 - b) Kombinierte Carotinoid- und β -Ionon-Analytik:
 - 0 - 10,5 min: Gradient 0% B auf 47,25 % B
 - 10,5 - 10,6 min: Gradient 47,25% B auf 0% B
 - 10,6 - 21,5 min: 0% B
 - c) Ethanol-Analytik:
 - 0 – 20 min: 100 % A

6.3.5.3 Gaschromatographie

Quantitative β -Ionon-Analytik:

900 μ l Probe wurden mit 100 μ l Lösung des internen Standards versetzt (100 mg/l Kampfer in Ethanol), mit NaSO_4 getrocknet und direkt vermessen. Die Quantifizierung erfolgte über den internen Standard.

Qualitative β -Ionon- / Hydroxyionon- Analytik:

Proben wurden mit 1/5 des Probenvolumens Chloroform extrahiert, mit NaSO_4 getrocknet und mittels GC analysiert. Die Identifikation erfolgte anhand des Vergleichs der Retentionszeit mit Standards.

6.3.5.4 Kombinierte Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS)

Proben wurden mit 1/5 des Probenvolumens Chloroform extrahiert, mit NaSO_4 getrocknet und mittels GC/MS analysiert. Die Identifikation erfolgte anhand des Vergleichs der Retentionszeit mit Standards oder durch Vergleich des Massenspektrums mit einer Bibliothek von Massenspektren.

6.3.5.5 FTIR-Messungen

Mit einem Skalpell wurden je 0,5 mg der aktiven Schicht von Membranproben abgekratzt, ohne dabei die Stützsicht mit abzulösen. In einem Mörser wurde die Probe mit 300 mg KBr-Pulver intensiv vermischt und in möglichst kleine Partikel verrieben. In einer manuellen Presse wurden KBr-Presslinge hergestellt und im Transmissionsmodus das FTIR-Spektrum aufgenommen. Das Spektrum wurde im Wellenlängenbereich 4000 cm^{-1} bis 400 cm^{-1} mit einer Auflösung von 2 cm^{-1} aufgenommen. Pro Probe wurden 100 Spektren aufgenommen und das Ergebnisspektrum daraus gemittelt.

6.3.5.6 Rasterelektronenmikroskopie

Pervaporationsmembranen:

Um scharfe Bruchkanten zu erhalten, wurden die Membranproben zunächst in flüssigen Stickstoff getaucht und anschließend an einer Metallkante gebrochen. Die Oberfläche der Probe wurde mittels Kathodensputtering mit Gold beschichtet und im Rasterelektronenmikroskop analysiert.

Liposomen:

Liposomenlösungen wurden in Reinstwasser 1:1000 verdünnt und 20 µl der Lösung auf Aluminium-Probenträger pipettiert. Die Proben wurden ohne vorheriges Einfrieren für 1 h im Vakuum-Gefriertrockner entwässert. Aufgrund der Temperaturempfindlichkeit der Proben konnten die getrockneten Liposomen nicht mit Gold beschichtet werden. Statt dessen wurde durch Vakuum-Kohlenstoffbedampfung eine leitfähige Oberfläche geschaffen. Verschiedene Strukturen der Proben wurden mittels energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) auf ihre Elementzusammensetzung untersucht, um die in der Probe enthaltenen Substanzen zu den Strukturen zuzuordnen.

6.3.5.7 Dynamische Lichtstreuungsmessung (DLS)

Alternative Bezeichnung: Photonenkorrelations-Spektroskopie (PCS).

Zu untersuchende Liposomen-Lösungen wurden nach der Überführung in unilamellare Vesikel mittels Ultraschall für 15 Minuten bei 25°C aufbewahrt. Die Liposomen-Lösungen wurden gemäß den Herstellerangaben mit Reinstwasser so verdünnt, dass eine Signalintensität zwischen 50 und 150 counts / Minute erreicht wurde. Nach dem einsetzen der Probenküvette in das Messgerät wurde eine Setzzeit von 120 Sekunden eingehalten, um die Flüssigkeitsbewegung zu stoppen. Die Ermittlung der Messparameter (Anzahl und Dauer der Messung, Ablage des Messpunktes von der Küvettenmitte) erfolgte automatisch.

6.3.6 Auswertung und Datenprozessierung

6.3.6.1 Auswertung spektrophotometrischer Messungen

Kinetische Messungen wurden für zwei Enzymaktivitäten durchgeführt: Carotinoidspaltung und Glutathion-S-Transferase-Aktivität. Weil die Datenprozessierung gleich war, sind die Messungstypen im Folgenden nicht getrennt aufgeführt.

Die Prozessierung der Rohdaten wurde mit der Software Magellan 5.1 (Tecan, Österreich) durchgeführt. Im ersten Schritt wurde eine Netto-Datenkurve erstellt, indem für jeden Datenpunkt vom Absorptionswert des Umsatzes der Absorptionswert der Kontrollmessung subtrahiert wurde. Die Bestimmung der maximalen Steigung erfolgte anhand der Netto-Datenkurve. Dabei wurde eine

lineare Interpolation in einem Datenfenster von zehn Datenpunkten durchgeführt und die Steigung der interpolierten Gerade berechnet. Obwohl eine lineare Interpolation über die hohe Anzahl von zehn Datenpunkten die Kurvenform der Datenpunkte nicht vollkommen korrekt abbildet, erwies sich diese Auswertung als am besten geeignet. Ihr Vorteil bestand in einer hohen Stabilität der ausgegebenen Werte und geringer Anfälligkeit gegenüber Fehlmessungen, die durch herumfliegende Staubpartikel oder Gasblasen entstehen können. In der resultierenden Kurve, die die Steigungswerte abbildet, wurde eine Maximumssuche durchgeführt. Aufgrund des maschinellen Schüttelns vor Beginn der Messung waren in seltenen Fällen die ersten Datenpunkte aufgrund von Gasblasen nicht auswertbar. In diesen Fällen wurde der Beginn der Steigungsberechnung hinter den letzten nicht auswertbaren Wert gesetzt. Für die Bestimmung der Michaelis-Menten-Parameter wurden die Datenpunkte nach Hanes und Wilkinson (S/v über S) aufgetragen und eine nicht gewichtete, lineare Regression durchgeführt.

6.3.6.2 Auswertung von Versuchen zur organophilen Pervaporation

Die Berechnung der Konzentrationen oder Flüsse von Einzelkomponenten des Permeats einer Pervaporation setzt ein bekanntes Permeatvolumen voraus, das aus Dichte und Masse errechnet werden muss. Um das Permeat vollständig aus den Kühlfallen zu gewinnen, wurden die Kühlfallen mit einem Alkohol gespült. Enthielt die Reaktionslösung, aus welcher pervaporiert wurde, selbst Ethanol, war die Gesamtmasse an Ethanol im Permeat unbekannt und eine direkte Dichteberechnung nicht möglich. In diesen Fällen fand die Spülung der Kühlfallen mit einem anderen Alkohol (Methanol) statt und die Dichte des Permeats wurde durch ein iteratives Verfahren (Lapostolet-Resch, 2001) gemäß Gleichung (8) bis (12) bestimmt.

Permeatmasse:

Zur Bestimmung der Permeatmasse m_p wurden die Masse der leeren $m_{KF,leer}$ und der vollen Kühlfalle $m_{KF,voll}$ nach der Pervaporation gemessen. Die Differenz der Massen ergibt die Permeatmasse.

$$m_p(t_i) = m_{KF,voll}(t_i) - m_{KF,leer}(t_i) \quad (6)$$

Flussdichte:

Der Gesamtfluss J_{ges} errechnet sich nach folgender Gleichung aus der Permeatmasse m_p , der Pervaporationsdauer t_{pv} und der Membranfläche A_M :

$$J_{ges}(t_{PV_i}) = \frac{m_p(t_{PV_i})}{A_M \cdot t_{PV}} \quad (7)$$

Bei einem Mehrkomponentengemisch setzt sich der Gesamtfluss aus der Summe der Partialflüsse aller Einzelkomponenten zusammen. Die Berechnung der Partialflüsse der Einzelkomponenten ist im Folgenden dargestellt.

Partialfluss von β -Ionon:

Der β -Iononfluss $J_{\beta\text{-Ionon},P}$ errechnet sich aus der errechneten β -Iononmasse im Permeat $m_{\beta\text{-Ionon},P}$, der Pervaporationsdauer t_{pv} und der Membranfläche A_M :

$$J_{\beta\text{-Ionon},P}(t_{PV_i}) = \frac{m_{\beta\text{-Ionon},P}(t_{PV_i})}{A_M \cdot t_{PV}} \quad (8)$$

Partialfluss von Ethanol:

Der Ethanolfluss $J_{EtOH,P}$ berechnet sich aus der errechneten Ethanolmasse im Permeat $m_{EtOH,P}$, der Pervaporationsdauer t_{pv} und der Membranfläche A_M :

$$J_{EtOH,P}(t_{PV_i}) = \frac{m_{EtOH,P}(t_{PV_i})}{A_M \cdot t_{PV}} \quad (9)$$

Partialfluss von Wasser:

Der Wasserfluss J_W ergibt sich aus der Differenz zwischen dem Gesamtfluss J_{ges} und den addierten Partialflüssen von Ethanol $J_{EtOH,P}$ und β -Ionon $J_{\beta\text{-Ionon},P}$:

$$J_W(t_{PV_i}) = J_{ges}(t_{PV_i}) - J_{\beta\text{-Ionon},P}(t_{PV_i}) - J_{EtOH,P}(t_{PV_i}) \quad (10)$$

Masse an zugesetztem Methanol:

Zur vollständigen Gewinnung des Permeats wurden die Kühlfallen mit Methanol oder Ethanol gespült. Die eingesetzte Alkoholmasse m_{MeOH} ergibt sich aus der

Massendifferenz zwischen voller Kühlfalle mit Alkohol $m_{KF,voll+MeOH}$ und voller Kühlfalle ohne Alkohol $m_{KF,voll}$.

$$m_{MeOH}(t_{PV_i}) = m_{KF,voll+MeOH}(t_{PV_i}) - m_{KF,voll}(t_{PV_i}) \quad (11)$$

Volumen des zugesetzten Alkohols:

Das Volumen des zugesetzten Alkohols berechnet sich aus den o.g. Massen und der Dichte von Methanol ρ_{MeOH} und Ethanol ρ_{EtOH} :

$$V_{MeOH}(t_{PV_i}) = \frac{m_{KF,voll+MeOH}(t_{PV_i}) - m_{KF,voll}(t_{PV_i})}{\rho_{MeOH}} = \frac{m_{MeOH}(t_{PV_i})}{\rho_{MeOH}} \quad (12)$$

mit $\rho_{MeOH} = 0,793 \frac{g}{cm^3}$

beziehungsweise $\rho_{EtOH} = 0,789 \frac{g}{cm^3}$

Permeatdichte:

Zur Berechnung des Permeatvolumens wird die Permeatdichte benötigt. Enthält die pervaporierte Reaktionslösung neben Wasser auch Ethanol als Lösungsmittel, wird dieses ebenfalls pervaporiert. Neben dem zum spülen zugegebenen Methanol enthält das Permeat in diesem Fall einen unbekanntem Anteil an Ethanol. Die Permeatdichte kann mittels eines Iterationsverfahrens ermittelt werden (Lapostolet-Resch, 2001). Hierzu wurde für die anfängliche Berechnung der Zielgrößen eine Permeatdichte von $\rho_p = 1 \text{ kg/L}$ angenommen. In jedem Iterationsschritt erfolgt die Berechnung der neuen Permeatdichte nach Gleichung (13) anhand der im vorhergehenden Iterationsschritt berechneten Ethanolkonzentration und –masse.

$$\rho_p(t_{PV_i}) = \frac{1}{\frac{m_{EtOH,P}(t_{PV_i})}{m_p(t_{PV_i})} \cdot \frac{1}{\rho_{EtOH}} + \frac{m_p(t_{PV_i}) - m_{EtOH,P}(t_{PV_i})}{m_p(t_{PV_i})} \cdot \frac{1}{1000 \frac{g}{L}}} \quad (13)$$

Sind die Änderungen bei der iterativen Berechnung der Permeatdichte kleiner als ein Prozent, wurde ein ausreichend präziser Näherungswert für die Konzentration und die Masse von Ethanol im Permeat erreicht.

Permeat- und Retentatvolumen:

Die approximierte Permeatdichte wird zur Berechnung des Permeatvolumens V_P eingesetzt.

$$V_P(t_{PV_i}) = \frac{m_P(t_{PV_i})}{\rho_P} \quad (14)$$

Anhand des Permeatvolumens V_P kann das Retentatvolumen V_R errechnet werden.

$$V_R(t_{PV_i}) = V_R(t_{PV_{i-1}}) - V_P(t_{PV_i}) \quad (15)$$

Ethanolkonzentration im Permeat:

Die Berechnung der Ethanolkonzentration im Permeat erfolgte als Teil des Iterationsverfahrens wie folgt (Lapostolet-Resch, 2001):

$$c_{EtOH, P}(t_{PV_i}) = \frac{c_{EtOH, P+MeOH}(t_{PV_i}) \cdot (V_P(t_{PV_i}) + V_{MeOH}(t_{PV_i}))}{V_P(t_{PV_i})} \quad (16)$$

$$= \frac{c_{\beta\text{-Ionon, P+MeOH}}(t_{PV_i}) \cdot \left(V_P(t_{PV_i}) + \frac{m_{MeOH}(t_{PV_i})}{\rho_{MeOH}} \right)}{V_P(t_{PV_i})}$$

Die Iteration beginnt mit einer angenommen Permeatdichte von $\rho_P = 1 \text{ kg} \cdot \text{l}^{-1}$. In diesem Fall gilt:

$$\rho_P = \frac{m_P(t_{PV_i})}{V_P(t_{PV_i})} = 1 \quad (17)$$

Es kann in Gleichung (17) anstatt des Permeatvolumens die Permeatmasse eingesetzt werden.

Ethanolmasse im Permeat:

Die Ethanolmasse im Permeat stellt den Faktor dar, der nach jeder Iterationsrunde als präzisiertes Wert in Gleichung (13) eingesetzt wird. Sie berechnet sich wie folgt:

$$m_{EtOH, P}(t_{PV_i}) = c_{EtOH, P}(t_{PV_i}) \cdot m_P(t_{PV_i}) \quad (18)$$

Konzentration von β -Ionon im Permeat:

Die Permeatkonzentration von β -Ionon wird berechnet nach (Lapostolet-Resch, 2001):

$$c_{\beta\text{-Ionon}, P}(t_{PV_i}) = \frac{c_{\beta\text{-Ionon}, P+MeOH}(t_{PV_i}) \cdot (V_P(t_{PV_i}) + V_{MeOH}(t_{PV_i}))}{V_P(t_{PV_i})} \quad (19)$$

$$= \frac{c_{\beta\text{-Ionon}, P+MeOH}(t_{PV_i}) \cdot \left(V_P(t_{PV_i}) + \frac{m_{MeOH}(t_{PV_i})}{\rho_{MeOH}} \right)}{V_P(t_{PV_i})}$$

Masse von β -Ionon im Permeat:

Die Masse von β -Ionon im Permeat errechnet sich anschließend aus Konzentration und Volumen:

$$m_{\beta\text{-Ionon}, P}(t_{PV_i}) = c_{\beta\text{-Ionon}, P}(t_{PV_i}) \cdot V_P(t_{PV_i}) \quad (20)$$

6.4 Software

GC/MS:	GCMSolution, Version 1.20 (Shimadzu)
HPLC:	Class Vp, Version 6.14 (Shimadzu)
Mikrotiterplattenleser:	Gerät Genios: Magellan, Version 3.11 (Tecan) Gerät Infinite 200: Magellan, Version 5.1 (Tecan)
FPLC:	Unicorn Explorer, Version 4.10 (Amersham Äkta)
DLS / PCS:	Zetasizer Nano series software, Version 6.01 (Malvern)
Geldokumentation:	BioDoc Analyze, Biometra
Datenauswertung:	Origin, Version 6.0 (Origin Labs)

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Aguedo, M., Ly, M. H., Belo, I., Teixeira, J., Belin, J.-M. & Waché, Y.** (2004) The use of enzymes and microorganisms for the production of aroma compounds from lipids. *Food Technol Biotechnol*, 42, 327-336.
- Alexandre, T., Rehbock, S. & Blümke, W.** (2000) Study of pervaporation to recover 2-phenylethanol from a life bioreactor. *Poster, EMS XVI Annual Summer School - 23.-28. August, 1999, Veszprem, Hungary.*
- Apel, C. L., Deamer, D. W. & Mautner, M. N.** (2002) Self-assembled vesicles of monocarboxylic acids and alcohols: conditions for stability and for the encapsulation of biopolymers. *Biochim Biophys Acta*, 1559, 1-9.
- Aramaki, K., Olsson, U., Yamaguchi, Y. & Kunieda, H.** (1999) Effect of water-soluble alcohols on surfactant aggregation in the C₁₂EO₈ system. *Langmuir*, 15, 6226-6232.
- Auldridge, M. E., Block, A., Vogel, J. T., Dabney-Smith, C., Mila, I., Bouzayen, M., Magallanes-Lundback, M., Dellapenna, D., Mccarty, D. R. & Klee, H. J.** (2006a) Characterization of three members of the Arabidopsis carotenoid cleavage dioxygenase family demonstrates the divergent roles of this multifunctional enzyme family. *Plant J*, 45, 982-993.
- Auldridge, M. E., Mccarty, D. R. & Klee, H. J.** (2006b) Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Curr Opin Plant Biol*, 9, 315-321.
- Auweter, H., Haberkorn, H., Heckmann, W., Horn, D., Luddecke, E., Rieger, J. & Weiss, H.** (1999) Supramolecular Structure of Precipitated Nanosize beta-Carotene Particles. *Angew Chem Int Ed Engl*, 38, 2188-2191.
- Baneyx, F.** (1999) Recombinant protein expression in Escherichia coli. *Curr Opin Biotech*, 10, 411.
- Bangham, A. D.** (1963) Physical Structure and Behavior of Lipids and Lipid Enzymes. *Adv Lipid Res*, 64, 65-104.
- Baudot, A. & Marin, M.** (1997) Pervaporation of Aroma Compounds. Comparison of Membrane Performances with Vapour-Liquid Equilibria and Engineering Aspects of Process Improvement. *Trans Inst Chem Eng*, 72, 117-142.
- Belin, J. M., Dumont, B. & Ropert, F.** (1998) Enzymatic process for the preparation of flavours, in particular the ionones and C6 to C10 aldehydes. USPTO Patent-Nr.: 5705372 United States, BFA Laboratories (Rocheville, FR).
- Ben Aziz, A., Grossman, S., Ascarelli, I. & Budowski, P.** (1971) Carotene-bleaching activities of lipoxygenase and heme proteins as studied by a direct spectrophotometric method. *Phytochemistry*, 10, 1445-1452.

- Bengtson, G. & Bøddeker, K. W.** (1995) Extraction of bioproducts with homogeneous membranes. IN Etievant, P. & Schreier, P. (Eds.) *Bioflavour 95*. INRA Editions, Versailles, France.
- Bergantino, E., Segalla, A., Brunetta, A., Teardo, E., Rigoni, F., Giacometti, G. M. & Szabo, I.** (2003) Light- and pH-dependent structural changes in the PsbS subunit of photosystem II. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 15265-15270.
- Berger, R. G.** (1995) Aroma Compounds in Food. *Aroma Biotechnology*. Springer, Germany.
- Berger, R. G., Krings, U. & Zorn, H.** (2001) Biotechnological Flavour Generation. IN Taylor, A. (Ed.) *Food Flavour Technology*. Sheffield Acad. Press, UK.
- Bester-Rogac, M.** (2007) Micellar properties of nonionic surfactant Tween 40 in water: Small-angle x-ray scattering study. *Acta Chim Slov*, 54, 452-459.
- Bhairi, S.** (2001) *Detergents - A guide to the properties and uses of detergents in biological systems*. Calbiochem.
- Bhattacharya, S. C. & Palepu, R. M.** (2004) Micellization of Nonionic Surfactants: Tweens - A Review. *J Surface Sci Technol*, 20, 159-177.
- Bhosale, P.** (2004) Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 63, 351-361.
- Bhosale, P. & Gadre, R. V.** (2002) Manipulation of temperature and illumination conditions for enhanced beta-carotene production by mutant 32 of *Rhodotorula glutinis*. *Lett Appl Microbiol*, 34, 349-353.
- Biesalski, H. K., Chichili, G. R., Frank, J., Von Lintig, J. & Nohr, D.** (2007) Conversion of beta-carotene to retinal pigment. *Vitam Horm*, 75, 117-130.
- Blaser, H. U. & Schmidt, E.** (2004) *Asymmetric catalysis on industrial scale*. Wiley VCH, Germany.
- Bloor, J. R., Morrison, J. C. & Rhodes, C. T.** (1970) Effect of pH on the micellar properties of a nonionic surfactant. *J Pharm Sci*, 59, 387-391.
- Bluemke, W. & Schrader, J.** (2001) Integrated Bioprocess for Enhanced Production of Natural Flavors and Fragrances by *Ceratocystis moniliformis*. *Biomol Eng*, 17, 137-142.
- Blum, P., Ory, J., Bauernfeind, J. & Krska, J.** (1992) Physiological consequences of DnaK and DnaJ overproduction in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 174, 7436-7444.
- Bøddeker, K.** (1986) *Pervaporation durch Membranen und ihre Anwendung zur Trennung von Flüssigkeitsgemischen*. VDI-Verlag, Germany.
- Bonaventure, G., Salas, J. J., Pollard, M. R. & Ohlrogge, J. B.** (2003) Disruption of the FATB gene in *Arabidopsis* demonstrates an essential role of saturated fatty acids in plant growth. *Plant Cell*, 15, 1020-1033.

- Bonk, M., Hoffmann, B., Von Lintig, J., Schledz, M., Al-Babili, S., Hobeika, E., Kleinig, H. & Beyer, P.** (1997) Chloroplast import of four carotenoid biosynthetic enzymes in vitro reveals differential fates prior to membrane binding and oligomeric assembly. *Eur J Biochem*, 247, 942-950.
- Borowska, J., Kowalska, M., Czaplicki, S. & Zadernowski, R.** (2003) Effect of hydrothermal processing on carrot carotenoids changes and interactions with dietary fiber. *Nahrung*, 47, 46-48.
- Bosser, A. & Belin, J. M.** (1994) Synthesis of beta-Ionone in an Aldehyde/Xanthine Oxidase/beta-Carotene System Involving Free Radical Formation. *Biotechnol Prog*, 10, 129-133.
- Bowen, T. C., Noble, R. D. & Falconer, J. L.** (2004) Fundamentals and applications of pervaporation through zeolite membranes *J Membrane Sci*, 245, 1-33.
- Breitenbach, J. & Sandmann, G.** (2005) Zeta-Carotene cis isomers as products and substrates in the plant poly-cis carotenoid biosynthetic pathway to lycopene. *Planta*, 220, 785-793.
- Britton, G.** (1995) Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J*, 9, 1551-1558.
- Buchwald, M. & Jencks, W. P.** (1968) Optical properties of astaxanthin solutions and aggregates. *Biochemistry*, 7, 834-843.
- Buttery, R. G., Seifert, R. M., Guadagni, D. G. & Ling, L. C.** (1971) Characterisation of additional volatile components of tomato. *J Agric Food Chem*, 19, 524-529.
- Cabrita, L. D., Dai, W. & Bottomley, S. P.** (2006) A family of E. coli expression vectors for laboratory scale and high throughput soluble protein production. *BMC Biotechnol*, 6, 12.
- Carnero Ruiz, C., Molina-Bolivar, J. A., Aguiar, J., Macisaac, G., Moroze, S. & Palepu, R. M.** (2003) Effect of ethylene glycol on the thermodynamic and micellar properties of Tween 20. *Colloid & Polymer Sci*, 281, 531-541.
- Chen, S. C., Sturtevant, J. M. & Gaffney, B. J.** (1980) Scanning calorimetric evidence for a third phase transition in phosphatidylcholine bilayers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77, 5060-5063.
- Chernys, J. T. & Zeevart, J. A. D.** (2000) Characterization of the 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado. *Plant Physiology*, 124, 343-353.
- Chisti, Y. & Moo-Young, M.** (1986) Disruption of microbial cells for intracellular products. *Enzyme Microb Technol*, 8, 194-204.
- Colombie, S., Gaunand, A. & Lindet, B.** (2001) Lysozyme inactivation under mechanical stirring: effect of physical and molecular interfaces. *Enzyme Microb Technol*, 28, 820-826.

- Cooper, D. A., Webb, D. R. & Peters, J. C.** (1997) Evaluation of the potential for olestra to affect the availability of dietary phytochemicals. *J Nutr*, 127, 1699-1709.
- Cornish-Bowden, A. & Eisenthal, R.** (1974) Statistical considerations in the estimation of enzyme kinetic parameters by the direct linear plot and other methods. *Biochem J*, 139, 721-730.
- Craft, N. E. & Soares, J. H.** (1992) Relative Solubility, Stability, and Absorptivity of Lutein and beta-Carotene in Organic Solvents. *J Agric Food Chem*, 40, 431-434.
- Creelman, R. A. & Zeevaart, J. A.** (1984) Incorporation of Oxygen into Abscisic Acid and Phaseic Acid from Molecular Oxygen. *Plant Physiol*, 75, 166-169.
- Cunningham, F. X. & Gantt, E.** (1998) Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev: Plant Physiol Mol Biol*, 49, 557-583.
- Cunningham, F. X., Jr. & Gantt, E.** (2007) A portfolio of plasmids for identification and analysis of carotenoid pathway enzymes: *Adonis aestivalis* as a case study. *Photosynth Res*, 92, 245-259.
- Deems, R. A.** (2000) Interfacial enzyme kinetics at the phospholipid/water interface: practical considerations. *Anal Biochem*, 287, 1-16.
- Dennis, E. A.** (1973) Phospholipase A2 activity towards phosphatidylcholine in mixed micelles: surface dilution kinetics and the effect of thermotropic phase transitions. *Arch Biochem Biophys*, 158, 485-493.
- Doglia, S. M., Ami, D., Natalello, A., Gatti-Lafranconi, P. & Lotti, M.** (2008) Fourier transform infrared spectroscopy analysis of the conformational quality of recombinant proteins within inclusion bodies. *Biotechnol J*, 3, 193-201.
- Donbrow, M., Azaz, E. & Pillersdorf, A.** (1978) Autoxidation of polysorbates. *J Pharm Sci*, 67, 1676-1681.
- Dormann, P., Balbo, I. & Benning, C.** (1999) Arabidopsis galactolipid biosynthesis and lipid trafficking mediated by DGD1. *Science*, 284, 2181-2184.
- Dufosse, L.** (2006) Microbial production of food grade pigments. *Food Technol Biotechnol*, 44, 313-321.
- Dwars, T., Paetzold, E. & Oehme, G.** (2005) Reactions in micellar systems. *Angew Chem Int Ed Engl*, 44, 7174-7199.
- Esposito, D. & Chatterjee, D. K.** (2006) Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. *Curr Opin Biotechnol*, 17, 353-358.
- Etschmann, M. M., Sell, D. & Schrader, J.** (2005) Production of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate from L-phenylalanine by coupling whole-cell biocatalysis with organophilic pervaporation. *Biotechnol Bioeng*, 92, 624-634.

- Etschmann, M. M. W.** (2004) *Entwicklung eines integrierten Verfahrens zur biotechnologischen Produktion von 2-Phenylethanol*. Books on Demand, Germany.
- Fabry, B.** (1991) Tenside. Eigenschaften, Rohstoffe, Produktion, Anwendungen. *Chemie in unserer Zeit*, 25, 214-222.
- Fink, A. L.** (1999) Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev*, 79, 425-449.
- Floss, D. S., Schliemann, W., Schmidt, J., Strack, D. & Walter, M. H.** (2008) RNA interference-mediated repression of MtCCD1 in mycorrhizal roots of *Medicago truncatula* causes accumulation of C27 apocarotenoids, shedding light on the functional role of CCD1. *Plant Physiol*, 148, 1267-1282.
- Floss, D. S. & Walter, M. H.** (2009) Role of carotenoid cleavage dioxygenase 1 (CCD1) in apocarotenoid biogenesis revisited. *Plant Signal Behav*, 4, 172-175.
- Fraser, P. D. & Bramley, P. M.** (2004) The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res*, 43, 228-265.
- Fraser, P. D., Shimada, H. & Misawa, N.** (1998) Enzymic confirmation of reactions involved in routes to astaxanthin formation, elucidated using a direct substrate in vitro assay. *Eur J Biochem*, 252, 229-236.
- Gamlieli-Bonshtein, I., Korin, E. & Cohen, S.** (2002) Selective separation of cis-trans geometrical isomers of beta-carotene via CO₂ supercritical fluid extraction. *Biotechnol Bioeng*, 80, 169-174.
- Glenn, K. M., Moroze, S., Bhattacharya, S. C. & Palepu, R. M.** (2005) Effect of ethylene glycol on the thermodynamic and micellar properties of Tween 40, 60, and 80. *J Disper Sci Technol*, 26, 79-86.
- Godia, F., Albiol, J., Perez, J., Creus, N., Cabello, F., Montras, A., Masot, A. & Lasseur, C.** (2004) The MELISSA pilot plant facility as an integration test-bed for advanced life support systems. *Adv Space Res*, 34, 1483-1493.
- Gonzalez-Montalban, N., Garcia-Fruitos, E. & Villaverde, A.** (2007) Recombinant protein solubility - does more mean better? *Nat Biotechnol*, 25, 718-720.
- Goodman, D. S. & Huang, H. S.** (1965) Biosynthesis of Vitamin A with Rat Intestinal Enzymes. *Science*, 149, 879-880.
- Goodman, D. S., Huang, H. S., Kanai, M. & Shiratori, T.** (1967) The Enzymatic Conversion of All-trans beta-Carotene into Retinal. *J Biol Chem*, 242, 3543-3554.
- Granado, F., Olmedilla, G., Blanco, I. & Rojas-Hidalgo, I.** (1992) Carotenoid composition in raw and cooked Spanish vegetables. *J Agric Food Chem*, 40, 2135-2140.

- Groger, H., May, O., Husken, H., Georgeon, S., Drauz, K. & Landfester, K.** (2006) Enantioselective enzymatic reactions in miniemulsions as efficient "nanoreactors". *Angew Chem Int Ed Engl*, 45, 1645-1648.
- Groot, W. J., Kraayenbrink, M. R., Waldram, R. H., Lans Van Der, R. G. J. M. & Luyben, K. C. A. M.** (1992) Ethanol production in an integrated process of fermentation and ethanol recovery by pervaporation. *Bioprocess Eng*, 8, 99-111.
- Gruszecki, W. I.** (2004a) The phytochemistry of carotenoids. IN Frank, H. A., Young, A. J., Britton, G. & Codgell, R. J. (Eds.) *Advances in photosynthesis and respiration*. Springer, Netherlands.
- Gruszecki, W. I.** (2004b) *The phytochemistry of carotenoids*. Springer, Netherlands.
- Günzler, H. & Gremlich, H.-U.** (2003) *IR - Spektroskopie: Eine Einführung*. Wiley-VCH, Germany.
- Guo, S., Boyd, J., Sammynaiken, R. & Loewen, M. C.** (2008) Identification and characterization of a unique cysteine residue proximal to the catalytic site of Arabidopsis thaliana carotenoid cleavage enzyme 1. *Biochem Cell Biol*, 86, 262-270.
- Hausmanns, S.** (1999) *Organophile Pervaporation wäßriger Mehrkomponentensysteme*. VDI Verlag, Germany.
- Hirschberg, J. & Chamovitz, D.** (1996) Carotenoids in Cyanobacteria. IN Bryant, D. E. (Ed.) *The molecular biology of Cyanobacteria*. Springer, Netherlands.
- Hoffmann, F., Van Den Heuvel, J., Zidek, N. & Rinas, U.** (2004) Minimizing inclusion body formation during recombinant protein production in Escherichia coli at bench and pilot plant scale. *Enzyme Microb Technol*, 34, 235-241.
- Hope, M. J., Bally, M. B., Mayer, L. D., Janoff, A. S. & Cullis, P. R.** (1986) Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles. *Chem phys lipids*, 40, 89-107.
- Horwich, A. L., Fenton, W. A., Chapman, E. & Farr, G. W.** (2007) Two families of chaperonin: physiology and mechanism. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23, 115-145.
- Hoshino, K. & Sakurai, K.** (2002) Perfume composition for laundry detergent. USPTO Patent-Nr.: US 2002/0010107 A1, Takasago Intl. Corp.
- Huang, C.** (1969) Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. *Biochemistry*, 8, 344-352.
- Huang, F. C., Horvath, G., Molnar, P., Turcsi, E., Deli, J., Schrader, J., Sandmann, G., Schmidt, H. & Schwab, W.** (2009a) Substrate promiscuity of RdCCD1, a carotenoid cleavage oxygenase from Rosa damascena. *Phytochemistry*, 70, 457-464.

- Huang, F. C., Molnar, P. & Schwab, W.** (2009b) Cloning and functional characterization of carotenoid cleavage dioxygenase 4 genes. *J Exp Bot*, 60, 3011-3022.
- Huang, R. Y. M. & Feng, X.** (1992) Pervaporation of water/ethanol mixtures by an aromatic polyetherimide membrane. *Separation Sci Technol*, 27, 1583-1597.
- Jaramillo-Flores, M., Lugo-Martinez, J. J., Ramirez-Sanjuan, E., Montellano-Rosales, H., Dorantes-Alvarez, L. & Hernandez-Sanchez, H.** (2005) Effect of sodium chloride, acetic acid, and enzymes on carotene extraction in carrots (*Daucus carota* L.). *J Food Sci*, 70, 136-142.
- Jimenez, C., Cossio, B. R., Labella, D. & Niell, F. X.** (2002) The Feasibility of industrial production of *Spirulina* (*Arthrospira*) in Southern Spain *Aquaculture*, 217, 179-190.
- Jüttner, F. & Höflacher, B.** (1985) Evidence of beta-carotene 7,8(7',8') oxygenase (beta-cyclocitral, crocetinial generating) in *Microcystis*. *Arch Microbiol*, 141, 337-343.
- Kandror, O., Sherman, M., Moerschell, R. & Goldberg, A. L.** (1997) Trigger factor associates with GroEL in vivo and promotes its binding to certain polypeptides. *J Biol Chem*, 272, 1730-1734.
- Kandror, O., Sherman, M., Rhode, M. & Goldberg, A. L.** (1995) Trigger factor is involved in GroEL-dependent protein degradation in *Escherichia coli* and promotes binding of GroEL to unfolded proteins. *EMBO J*, 14, 6021-6027.
- Karlsson, H. O. E. & Trägårdh, G.** (1997) Aroma Recovery During Beverage Processing. *J Food Eng*, 34, 159-178.
- Kiefer, C., Hessel, S., Lampert, J. M., Vogt, K., Lederer, M. O., Breithaupt, D. E. & Von Lintig, J.** (2001) Identification and Characterization of a Mammalian Enzyme Catalyzing the Asymmetric Oxidative Cleavage of Provitamin. *J Biol Chem*, 276, 14110-14116.
- Kiefer, F., Arnold, K., Kunzli, M., Bordoli, L. & Schwede, T.** (2009) The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Res*, 37, 387-392.
- Kim, N. H., Kim, Y. S., Kim, H. J. & Oh, D. K.** (2008) Optimized formation of detergent micelles of beta-carotene and retinal production using recombinant human beta,beta-carotene 15,15'-monooxygenase. *Biotechnol Prog*, 24, 227-231.
- Kim, S.-W., Seo, W.-T. & Park, Y.-H.** (1997) Enhanced production of beta-carotene from *Blakeslea trispora* with Span 20. *Biotechnol Lett*, 19, 561-562.
- Kirilovsky, D.** (2007) Photoprotection in cyanobacteria: the orange carotenoid protein (OCP)-related non-photochemical-quenching mechanism. *Photosynth Res*, 93, 7-16.

- Klingenberg, A. & Hanssen, H. P.** (1988) Enhanced Production of Volatile Flavour Compounds from Yeasts by Adsorber Techniques. I. Model Investigations. *Chem Biochem Eng J*, 2, 222-224.
- Kloer, D. P., Ruch, S., Al-Babili, S., Beyer, P. & Schulz, G. E.** (2005) The structure of a retinal-forming carotenoid oxygenase. *Science*, 308, 267-269.
- Kloer, D. P. & Schulz, G. E.** (2006) Structural and biological aspects of carotenoid cleavage. *Cell Mol Life Sci*, 63, 2291-2303.
- Kohda** (2002) Improvement of productivity of active form of glutamate racemase in *Escherichia coli* by coexpression of folding accessory proteins. *Biochem Eng J*, 10, 39-45.
- Köhn, S., Kolbe, H., Korger, M., Köpsel, C., Mayer, B., Auweter, H., Lüddecke, E., Bettermann, H. & Martin, H. D.** (2008) *Aggregation and Interface Behaviour of Carotenoids*. Birkhäuser, Switzerland.
- Korger, M.** (2005) *Aggregationsverhalten von Carotinoiden in Membranen unilamellarer Liposomen*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Germany.
- Kumar, K. R., Mahadevasmamy, M. & Venkataraman, L. V.** (1995) Storage quality of powdered cyanobacterium - *Spirulina platensis*. *Z Lebensm Unters Forsch*, 201, 289-292.
- Lapostolet-Resch, S.** (2001) *Aufbau und Charakterisierung einer Pervaporationsanlage zur Kopplung an einen Biokonversionsprozeß im Labormaßstab*. Diplomarbeit, FH Frankfurt/Main, FB Verfahrenstechnik, Germany.
- Latowski, D., Akerlund, H.-E. & Strzalka, K.** (2004) Violaxanthin de-epoxidase, the xanthophyll cycle enzyme, requires lipid inverted hexagonal structures for its activity. *Biochemistry*, 43, 4417-4420.
- Latowski, D., Kruk, J., Burda, K., Skrzynecka-Jaskier, M., Kostecka-Gugala, A. & Strzalka, K.** (2002) Kinetics of violaxanthin de-epoxidation by violaxanthin de-epoxidase, a xanthophyll cycle enzyme, is regulated by membrane fluidity in model lipid bilayers. *Eur J Biochem*, 269, 4656-4665.
- Lazrak, T., Milon, A., Wolff, G., Albrecht, A. M., Miede, M., Ourisson, G. & Nakatani, Y.** (1987) Comparison of the effects of inserted C40- and C50-terminally dihydroxylated carotenoids on the mechanical properties of various phospholipid vesicles. *Biochim Biophys Acta*, 903, 132-141.
- Lee, D. H., Kim, M. D., Lee, W. H., Kweon, D. H. & Seo, J. H.** (2004) Consortium of fold-catalyzing proteins increases soluble expression of cyclohexanone monooxygenase in recombinant *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 63, 549-552.
- Leuenberger, M. G., Engeloch-Jarret, C. & Woggon, W. D.** (2001) The reaction mechanism of the enzyme-catalyzed central cleavage of *b*-carotene to retinal. *Angew Chem*, 113, 2684-2687.

- Li, Y. & Walton, D. C.** (1990) Violaxanthin Is an Abscisic Acid Precursor in Water-Stressed Dark-Grown Bean Leaves. *Plant Physiol*, 92, 551-559.
- Lillie, H., Schwarz, E. & Rudolph, R.** (1998) Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr Opin Biotechnol*, 9, 497-501.
- Maltzahn, B.** (2005) *Design und Modellierung eines integrierten Bioprozesses zur Produktion natürlicher Aromastoffe*. Dissertation, Technische Fakultät Universität Erlangen-Nürnberg, Germany.
- Marasco, E. K., Vay, K. & Schmidt-Dannert, C.** (2006) Identification of Carotenoid Cleavage Dioxygenases from *Nostoc* sp. PCC 7120 with Different Cleavage Activities. *J Biol Chem*, 281, 31583-31593.
- Martinez-Alonso, M., Vera, A. & Villaverde, A.** (2007) Role of the chaperone DnaK in protein solubility and conformational quality in inclusion body-forming *Escherichia coli* cells. *FEMS Microbiol Lett*, 273, 187-195.
- Mathieu, S., Bigey, F., Procureur, J., Terrier, N. & Gunata, Z.** (2007) Production of a recombinant carotenoid cleavage dioxygenase from grape and enzyme assay in water-miscible organic solvents. *Biotechnol Lett*, 29, 837-841.
- Merchant, S. & Sawaya, M. R.** (2005) The light reactions: a guide to recent acquisitions for the picture gallery. *Plant Cell*, 17, 648-663.
- Meyer, K.** (2002) Carotinoide - Bedeutung und technische Synthese. *Chemie in unserer Zeit*, 36, 178-192.
- Michael, D. W.** (1990) Powdered abrasive cleansers with encapsulated perfume. USPTO Patent-Nr.: 4961871, The Procter & Gamble Company, USA.
- Milicua, J. G. C., Juarros, J. L., De Las Rivas, J., Ibarrodo, J. & Gomez, R.** (1991) Isolation of a yellow carotenoprotein from carrot. *Phytochemistry*, 30, 1535-1537.
- Milon, A., Wolff, G., Ourisson, G. & Nakatani, Y.** (1986) Organization of carotenoid-phospholipid bilayer systems. *Helv Chim Acta*, 69, 12-24.
- Mojaat, M., Foucault, A., Pruvost, J. & Legrand, J.** (2008) Optimal selection of organic solvents for biocompatible extraction of beta-carotene from *Dunaliella salina*. *J Biotechnol*, 133, 433-441.
- Molina Grima, E., Belarbi, E. H., Acien Fernandez, F. G., Robles Medina, A. & Chisti, Y.** (2003) Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol Adv*, 20, 491-515.
- Mordi, R. C., Walton, J. C., Burton, G. W., Hughes, L., Ingold, K. U. & Lindsay, D. A.** (1991) Exploratory Study of beta-Carotene Autoxidation. *Tetrahedron Letters*, 32, 4203-4206.
- Mordi, R. C., Walton, J. C., Burton, G. W., Hughes, L., Ingold, K. U., Lindsay, D. A. & Moffatt, D. J.** (1993) Oxidative Degradation of beta-Carotene and beta-Apo-8'-carotenal. *Tetrahedron*, 49, 911-928.

- Morist, A., Montesinos, J. L., Cusido, J. A. & Godia, F.** (2001) Recovery and treatment of *Spirulina platensis* cells cultured in a continuous photobioreactor to be used as food. *Process Biochemistry*, 37, 535-547.
- Moya, M. L., Rodriguez, A., Graciani Mdel, M. & Fernandez, G.** (2007) Role of the solvophobic effect on micellization. *J Colloid Interface Sci*, 316, 787-795.
- Neidhardt, F. C. & Vanbogelen, R. A.** (1987) The heat shock response. IN Neidhardt., F. C. (Ed.) *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*. American Society for Microbiology Press, USA.
- Nishihara, K., Kanemori, M., Kitagawa, M., Yanagi, H. & Yura, T.** (1998) Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 64, 1694-1699.
- Nishihara, K., Kanemori, M., Yanagi, H. & Yura, T.** (2000) Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 66, 884-889.
- Nomine, Y., Ristriani, T., Laurent, C., Lefevre, J. F., Weiss, E. & Trave, G.** (2001) A strategy for optimizing the monodispersity of fusion proteins: application to purification of recombinant HPV E6 oncoprotein. *Protein Eng*, 14, 297-305.
- Ojima, K., Breitenbach, J., Visser, H., Setoguchi, Y., Tabata, K., Hoshino, T., Van Den Berg, J. & Sandmann, G.** (2006) Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a beta-carotene 3-hydroxylase/4-ketolase. *Mol Genet Genomics*, 275, 148-158.
- Olaizola, M.** (2003) Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomol Eng*, 20, 459-466.
- Olson, J. A. & Hayaishi, O.** (1965) The enzymatic cleavage of beta-carotene into vitamin A by soluble enzymes of rat liver and intestine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 54, 1364-1370.
- Orlich, B.** (2000) *Biokatalyse an hydrophoben Substraten mit Tensiden und Membranen als reaktionstechnische Werkzeuge*. Dissertation, TU Berlin, Germany.
- Orset, S. C. & Young, A. J.** (2000) Exposure to low irradiances favors the synthesis of 9-cis beta, beta-carotene in *Dunaliella salina* (Teod.). *Plant Physiol*, 122, 609-618.
- Patist, A., Kanicky, J. R., Shukla, P. K. & Shah, D. O.** (2002) Importance of micellar kinetics in relation to technological processes. *J Colloid Interface Sci*, 245, 1-15.
- Philippot, J. R. & Schuber, F.** (1995) *Liposomes as Tools in Basic Research & Industry*. CRC Press, USA.

- Pommer, H., Reif, W., Pasedach, H. & Hoffmann, W.** (1967) Verfahren zur Herstellung von 6, 10-Dimethyl-undecatrien-(3, 5, 10)-on-(2). DPMA Patent-Nr.: Germany, BASF AG (Ludwigshafen, 67056, DE)
- Prado-Cabrero, A., Scherzinger, D., Avalos, J. & Al-Babili, S.** (2007) Retinal biosynthesis in fungi: characterization of the carotenoid oxygenase CarX from *Fusarium fujikuroi*. *Eukaryot Cell*, 6, 650-657.
- Rautenbach, R.** (1996) *Membranverfahren*. Springer, Germany.
- Redmond, T. M., Gentleman, S., Duncan, T., Yu, S., Wiggert, B., Gantt, E. & Cunningham, F. X.** (2001) Identification, Expression, and Substrate Specificity of a Mammalian beta-carotene 15,15'-Dioxygenase. *J Biol Chem*, 276, 6560-6565.
- Rehage, H.** (2005) Selbstorganisation von Tensiden: Biomimetische Synthesen von Nanomaterialien. *Chemie in unserer Zeit*, 39, 36-44.
- Reverchon, E. & De Marco, I.** (2006) Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *J of Supercritical Fluids*, 38, 146-166.
- Rharbi, Y. & Winnik, M. A.** (2001) Solute exchange between surfactant micelles by micelle fragmentation and fusion. *Adv Colloid Interface Sci*, 89-90, 25-46.
- Rharbi, Y., Winnik, M. A. & Hahn, K. G.** (1999) Kinetics of Fusion and Fragmentation Nonionic Micelles: Triton X-100. *Langmuir*, 15, 4697-4700.
- Sackmann, E. & Feder, T.** (1995) Budding, fission and domain formation in mixed lipid vesicles induced by lateral phase separation and macromolecular condensation. *Mol Membr Biol*, 12, 21-28.
- Sandmann, G.** (2001) Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. *Arch Biochem Biophys*, 385, 4-12.
- Scherzinger, D., Ruch, S., Kloer, D. P., Wilde, A. & Al-Babili, S.** (2006) Retinal is formed from apo-carotenoids in *Nostoc* sp. PCC7120: in vitro characterization of an apo-carotenoid oxygenase. *Biochem J*, 398, 361-369.
- Schilling, M.** (2008) *Gewinnung von Aromastoffen durch enzymatische Spaltung von Carotinoiden mit der rekombinanten Dioxygenase AtCCD1*. Dissertation, Technische Universität München, Germany.
- Schilling, M., Haetzelt, F., Schwab, W. & Schrader, J.** (2008) Impact of surfactants on solubilization and activity of the carotenoid cleavage dioxygenase, AtCCD1, in an aqueous micellar reaction system. *Biotechnol Lett*, 30, 701-706.
- Schilling, M., Patett, F., Schwab, W. & Schrader, J.** (2007) Influence of solubility-enhancing fusion proteins and organic solvents on the in vitro biocatalytic performance of the carotenoid cleavage dioxygenase AtCCD1 in a micellar reaction system. *Appl Microbiol Biotechnol*, 75, 829-836.

- Schmid, D., Baici, A., Gehring, H. & Christen, P.** (1994) Kinetics of molecular chaperone action. *Science*, 263, 971-973.
- Schmidt, H., Kurtzer, R., Eisenreich, W. & Schwab, W.** (2006) The carotenase AtCCD1 from *Arabidopsis thaliana* is a dioxygenase. *J Biol Chem*, 281, 9845-9851.
- Schwartz, S. H., Qin, X. & Loewen, M. C.** (2004) The biochemical characterization of two carotenoid cleavage enzymes from *Arabidopsis* indicates that a carotenoid-derived compound inhibits lateral branching. *J Biol Chem*, 279, 46940-46945.
- Schwartz, S. H., Qin, X. & Zeevaart, J. A.** (2001) Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants. *J Biol Chem*, 276, 25208-25211.
- Schwartz, S. H., Qin, X. & Zeevaart, J. A. D.** (2003) Elucidation of the Indirect Pathway of Abscisic Acid Biosynthesis by Mutants, Genes, and Enzymes. *Plant Physiology*, 131, 1591-1601.
- Schwartz, S. H., Tan, B. C., Gage, D. A., Zeevaart, J. A. D. & Mccarty, D. R.** (1997) Specific Oxidative Cleavage of Carotenoids by VP14 of Maize. *Science*, 276, 1872-1874.
- Sergeant, M. J., Li, J. J., Fox, C., Brookbank, N., Rea, D., Bugg, T. D. & Thompson, A. J.** (2009) Selective inhibition of carotenoid cleavage dioxygenases: phenotypic effects on shoot branching. *J Biol Chem*, 284, 5257-5264.
- Simkin, A. J., Underwood, B. A., Auldrige, M., Loucas, H. M., Shibuya, K., Schmelz, E., Clark, D. G. & Klee, H. J.** (2004) Circadian regulation of the PhCCD1 carotenoid cleavage dioxygenase controls emission of beta-ionone, a fragrance volatile of petunia flowers. *Plant Physiol*, 136, 3504-3514.
- Socaciu, C., Bojarski, P., Aberle, L. & Diehl, H.** (2002) Different ways to insert carotenoids into liposomes affect structure and dynamics of the bilayer differently. *Biophys Chem*, 99, 1-15.
- Socaciu, C., Jessel, R. & Diehl, H. A.** (2000) Carotenoid incorporation into microsomes: yields, stability and membrane dynamics. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 56, 2799-2809.
- Sorensen, H. P. & Mortensen, K. K.** (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 115, 113-128.
- Strzalka, K. & Gruszecki, W. I.** (1994) Effect of beta-carotene on structural and dynamic properties of model phosphatidylcholine membranes. I. An EPR spin label study. *Biochim Biophys Acta*, 1194, 138-142.
- Szoka, F., Jr. & Papahadjopoulos, D.** (1980) Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Annu Rev Biophys Bioeng*, 9, 467-508.

- Tadros, T. F.** (2005) *Applied surfactants*. Wiley VCH, Germany.
- Tan, B.-C., Joseph, L. M., Deng, W.-T., Liu, L., Li, Q.-B., Cline, K. & McCarty, D. R.** (2003) Molecular characterization of the Arabidopsis 9-cis epoxy-carotenoid dioxygenase gene family. *Plant J*, 35, 44-56.
- Tan, B. C., Cline, K. & McCarty, D. R.** (2001) Localization and targeting of the VP14 epoxy-carotenoid dioxygenase to chloroplast membranes. *Plant J*, 27, 373-382.
- Tan, B. C., Schwartz, S. H., Zeevaart, J. A. D. & McCarty, D. R.** (1997) Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 12235-12240.
- Taylor, T. M., Davidson, P. M., Bruce, B. D. & Weiss, J.** (2005) Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 45, 587-605.
- Thomas, J. G. & Baneyx, F.** (1997) Divergent effects of chaperone overexpression and ethanol supplementation on inclusion body formation in recombinant Escherichia coli. *Protein Expr Purif*, 11, 289-296.
- Tian, X., Zhu, B. & Xu, Y.** (2005) P(VDF-co-HFP) membrane for recovery of aroma compounds from aqueous solutions by pervaporation I. Ethyl acetate/water system. *J Membrane Sci*, 248, 109-117.
- Torchilin, V. P.** (2005) Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov*, 4, 145-160.
- Travieso, L., Hall, D. O., Rao, K. K., Sanchez, E. & Borja, R.** (2001) A helical tubular photobioreactor producing Spirulina in a semicontinuous mode. *Int Biodet and Biodegr*, 47, 151-155.
- Tsai, S. C., Lu, H., Cane, D. E., Khosla, C. & Stroud, R. M.** (2002) Insights into channel architecture and substrate specificity from crystal structures of two macrocycle-forming thioesterases of modular polyketide synthases. *Biochemistry*, 41, 12598-12606.
- Tyssandier, V., Lyan, B. & Borel, P.** (2001) Main factors governing the transfer of carotenoids from emulsion lipid droplets to micelles. *Biochim Biophys Acta*, 1533, 285-292.
- Veddeler, B.** (2004) *Biotransformation terpenoider Substrate mit Mikroorganismen*. Dissertation, Universität Hannover, Germany.
- Verhoef, A., Figoli, A., Leen, B., Bettens, B., Drioli, E. & Van Der Bruggen, B.** (2007) Performance of a nanofiltration membrane for removal of ethanol from aqueous solutions by pervaporation. *Separation and Purification Technology*, 60, 54-63.
- Viparelli, P., Alfani, F. & Cantarella, M.** (1999) Models for enzyme superactivity in aqueous solutions of surfactants. *Biochem J*, 344, 765-773.

- Vogel, J. T., Tan, B. C., Mccarty, D. R. & Klee, H. J.** (2008) The carotenoid cleavage dioxygenase 1 enzyme has broad substrate specificity, cleaving multiple carotenoids at two different bond positions. *J Biol Chem*, 283(17), 11364-11373.
- Von Lintig, J. & Vogt, K.** (2000) Filling the Gap in Vitamin A Research - Molecular Identification of an Enzyme Cleaving beta-carotene to Retinal. *J Biol Chem*, 275, 11915-11920.
- Vonshak, A.** (1997) *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology, and biotechnology*. CRC Press, USA.
- Wache, Y., Bosser De Ratuld, A. & Belin, J.-M.** (2006) Dispersion of beta-carotene in processes of production of beta-ionone by cooxidation using enzyme-generated reactive oxygen species. *Process Biochem*, 41, 2337-2341.
- Waché, Y., Bosser-Deratuld, A., Mai Ly, H. & Belin, J. M.** (2002) Co-oxidation of beta-carotene in biphasic media. *J Mol Catal B: Enzymatic*, 19-20, 197-201.
- Wadja, R.** (2003) Emulsive water-soluble concentrates. WIPO Patent-Nr.: WO200404779 Germany, Lipoid GmbH, Germany.
- Waldo, G. S., Standish, B. M., Berendzen, J. & Terwilliger, T. C.** (1999) Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, 17, 691-695.
- Wall, J. G. & Pluckthun, A.** (1995) Effects of overexpressing folding modulators on the in vivo folding of heterologous proteins in Escherichia coli. *Curr Opin Biotechnol*, 6, 507-516.
- Wang, L., Pan, B., Sheng, J., Xu, J. & Hu, Q.** (2007) Antioxidant activity of Spirulina platensis extracts by supercritical carbon dioxide extraction. *Food Chemistry*, 105, 36-41.
- Willemsen, J. H. A., Dijkink, B. H. & Togtema, A.** (2004) Organophilic pervaporation for aroma isolation - industrial and commercial prospects. *Membrane Technology*, 2004, 5-10.
- Winterhalter, P. & Rouseff, R.** (2002) *Carotenoid-derived aroma compounds: an introduction*. ACS, USA.
- Wyss, A., Wirtz, G., Woggon, W., Brugger, R., Wyss, M., Friedlein, A., Bachmann, H. & Hunziker, W.** (2000) Cloning and expression of beta,beta-carotene 15,15'-dioxygenase. *Biochem Biophys Res Commun*, 271, 334-336.
- Yamamoto, H. Y. & Bangham, A. D.** (1978) Carotenoid organization in membranes. Thermal transition and spectral properties of carotenoid-containing liposomes. *Biochim Biophys Acta*, 507, 119-127.

-
- Yamazaki, K., Imai, M. & Suzuki, I.** (2004) Soybean lecithin hydrolysis using hog pancreas phospholipase A2 influenced by the hydrophobic character of W/O microemulsion systems. *Biochem Eng J*, 19, 171-179.
- Zorn, H., Langhoff, S., Schreibner, M., Nimtz, M. & Berger, R. G.** (2003) A peroxidase from *Lepista irina* cleaves β -carotene to flavor compounds. *Biol Chem*, 384, 1049-1056.

8 ANHANG

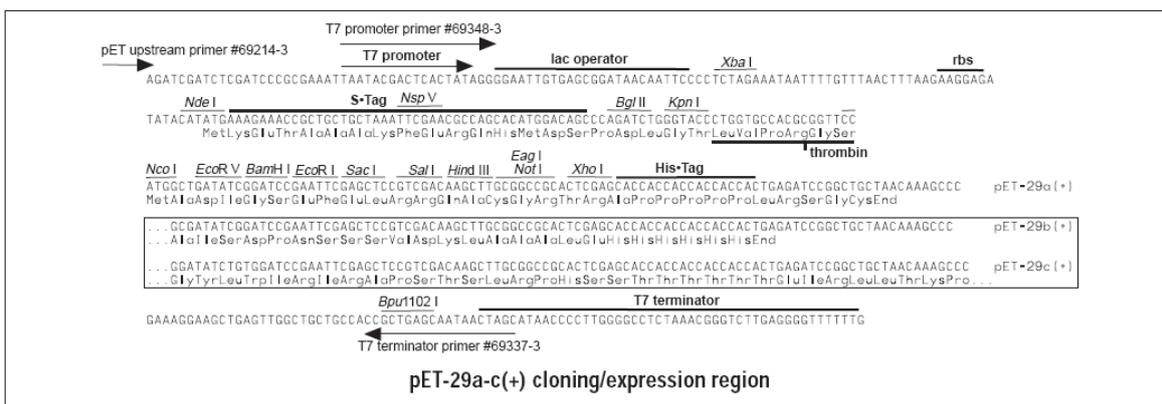
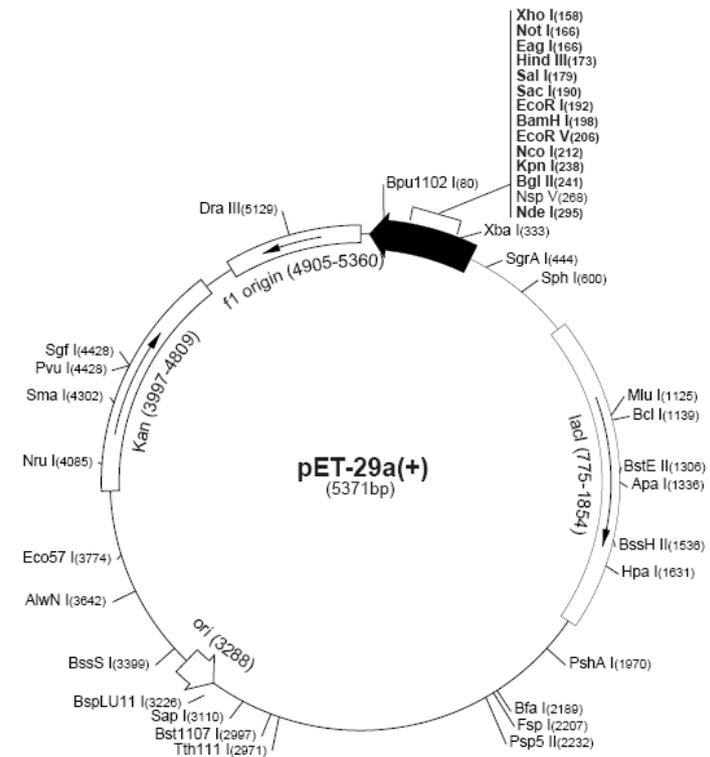
8.1 Karten und multiple cloning sites eingesetzter Plasmide

8.1.1 pET-29a

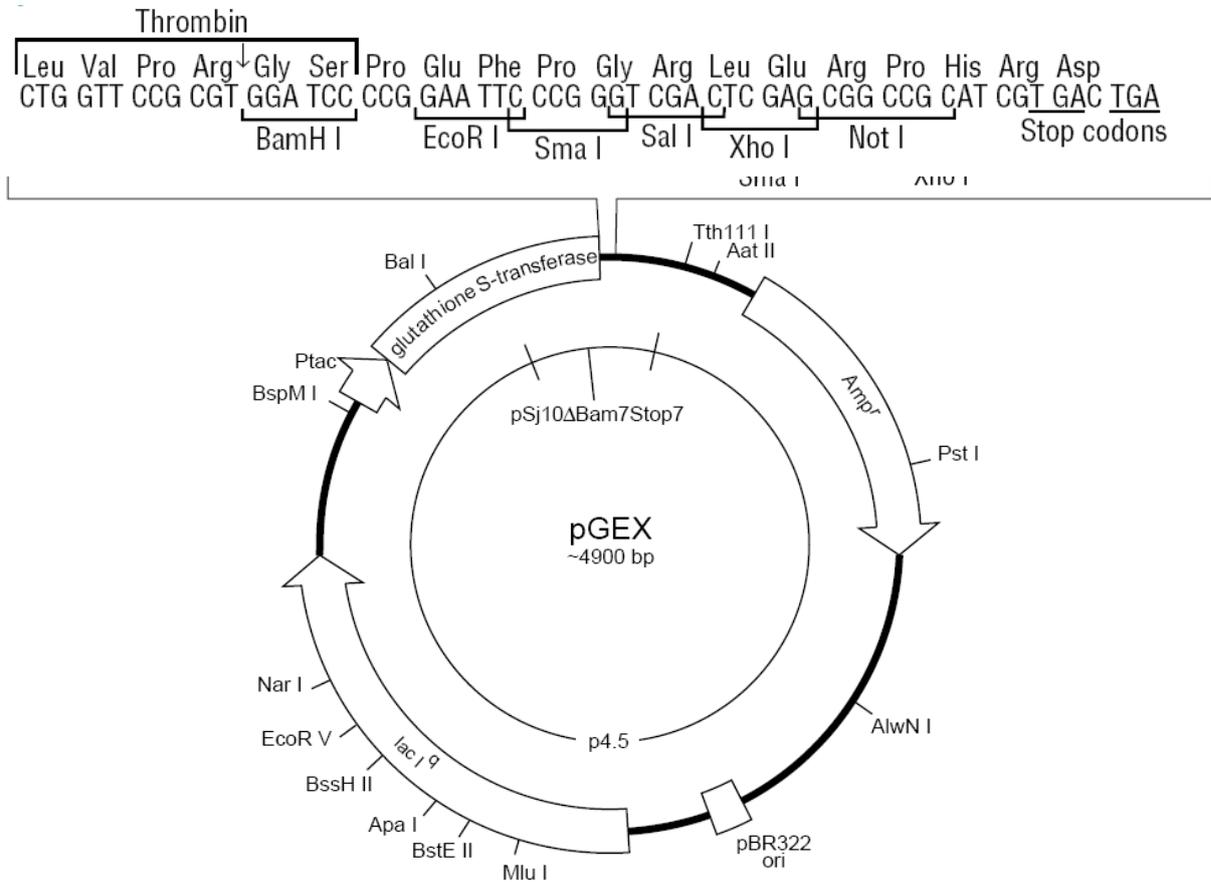
pET-29a(+) sequence landmarks

T7 promoter	368-384
T7 transcription start	367
S•Tag coding sequence	249-293
Multiple cloning sites	
(<i>Nco</i> I - <i>Xho</i> I)	158-217
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	775-1854
pBR322 origin	3288
Kan coding sequence	3997-4809
f1 origin	4905-5360

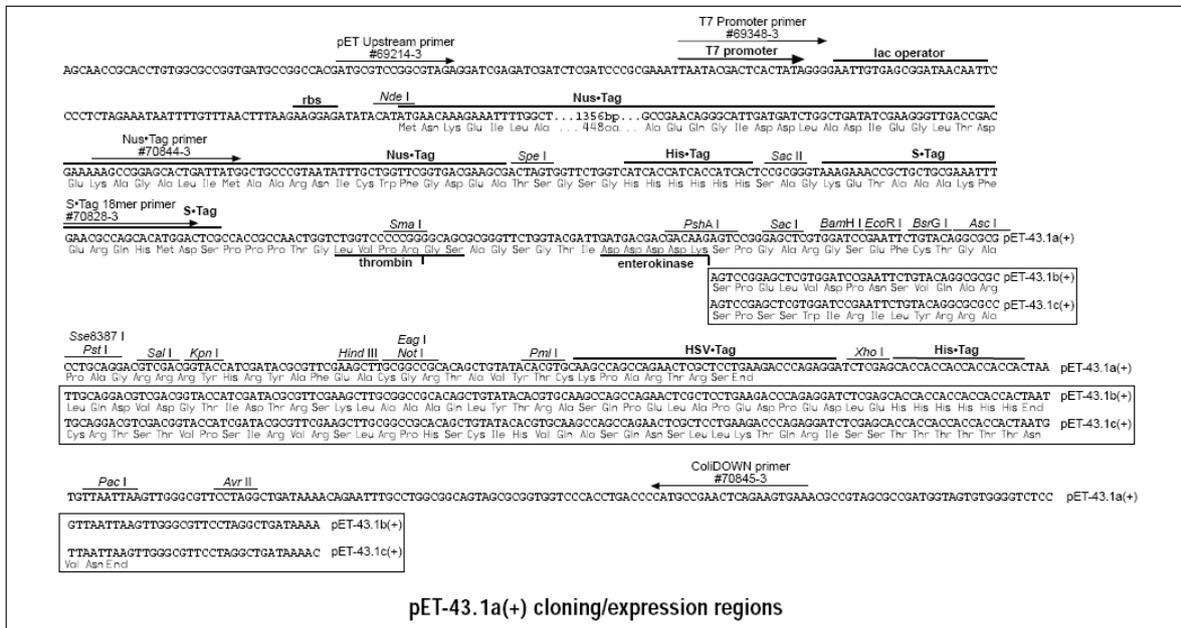
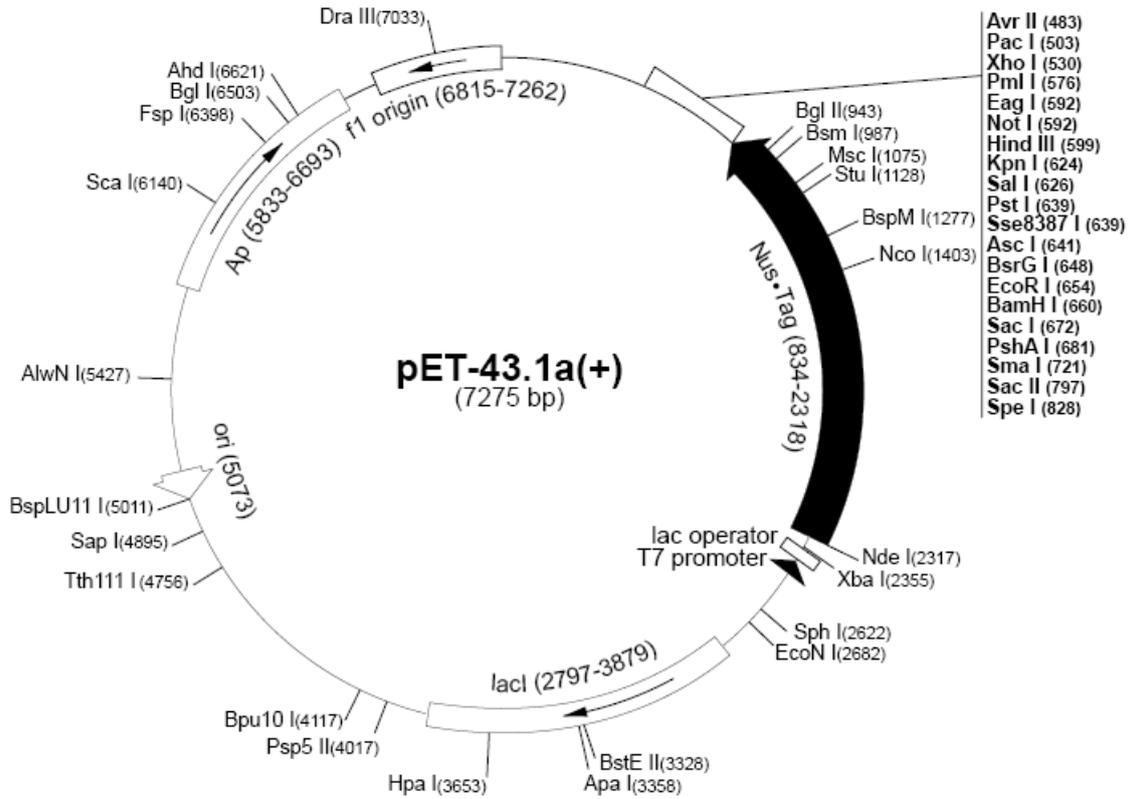
The maps for pET-29b(+) and pET-29c(+) are the same as pET-29a(+) (shown) with the following exceptions: pET-29b(+) is a 5370bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-29c(+) is a 5372bp plasmid; add 1bp to each site beyond *Bam*H I at 198.



8.1.2 pGEX-4T



8.1.3 pET-43a



8.2 Analysezertifikate Phospholipide

8.2.1 Phosphatidylcholin

Lipoid

A U S G A N G S - A N A L Y S E

Produkt:	LIPOID S 100	DECHEMA e.V.
Chargen-Nr.:	790558-7	Muster - Menge : 50 g
		Lieferung: 05.07.2007
		Herstellungsdatum: 04/2007
		empf. Lagertemp.: -20°C ± 5°C
		Verfallsdatum: 04/2010

TECHNISCHES MUSTER			
NICHT FÜR TIERISCHE ODER MENSCHLICHE ZWECKE GEEIGNET			
	<u>Spezifikation</u>	<u>Ergebnis</u>	<u>Methode</u>
Phosphatidylcholin	min. 94,0 % (bez. auf die Trockenmasse)	97,9 %	PC3
Phosphatidylethanolamin	max. 0,1 %	< 0,1 %	ADC3
N-Acyl-phosphatidyl- ethanolamin	max. 0,5 %	< 0,25 %	ADC3
Lysophosphatidylcholin	max. 3,0 %	0,4 %	ADC3
Phosphatidylinosit	max. 0,1 %	< 0,1 %	ADC3
Phosphor	3,7 - 4,0 %	3,8 %	TP
Unpolare Lipide	max. 3,0 %	1,1 %	ADC5
Freie Fettsäuren	max. 0,5 %	< 0,05 %	ADC5
Dl- α -Tocopherol	0,15 - 0,25 %	0,22 %	TO
Wasser (KF)	max. 2,0 %	0,6 %	KF
Ethanol	max. 0,2 %	< 0,2 %	ET
Säurezahl	max. 2	0,1	SZ
Peroxidzahl	max. 3	0	POZ
Iodzahl	97 - 107	103	JZ
Schwermetalle	max. 10 ppm	< 10 ppm	USP <231>II

8.2.2 Phosphatidylethanolamin

$$M_n = 794,15 \frac{g}{mol}$$

Lipoid

A U S G A N G S - A N A L Y S E

Product: LIPOID E PE

DECHEMA e.V.

Herstellungsdatum: 06/2006
 empf. Lagertemp.: $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$
 Verfallsdatum: 06/2009
 Lieferung: 05.07.2007

Chargen-Nr.: 899365-1

Muster-Menge: 1,0 g

TECHNISCHES MUSTER
 NICHT FÜR TIERISCHE ODER MENSCHLICHE ZWECKE GEEIGNET

	<u>Spezifikation</u>	<u>Ergebnis</u>	<u>Methode</u>
Phospholipide			
Phosphatidylethanolamin (P x 23,66, bzgl. Trockenmasse)	min. 97,0 %	101,7 %	TP-PC
Lysophosphatidylethanolamin	max. 1,0 %	< 1,0 %	ADC3
Phosphatidylcholin	max. 0,5 %	< 0,1 %	ADC3
Phosphatidsäure	max. 0,5 %	0,1 %	ADC3
Sphingomyelin	max. 0,1 %	< 0,1 %	ADC3
nicht identif. Verbindungen	max. 2,0 %	0,4 %	ADC3/ADC5
Phosphor	4,1 - 4,4 %	4,3 %	TP
Triglyceride	max. 0,5 %	0,1 %	ADC5
Cholesterol	max. 0,3 %	< 0,1 %	ADC5
Freie Fettsäuren	max. 0,3 %	< 0,05 %	ADC5
DL-a-Tocopherol	0,1 - 0,2 %	0,2 %	ADC5
Peroxidzahl	max. 5	2,1	POZ
Wasser(KF)	max. 2,0 %	0,3 %	USP<921>II