

Untersuchungen zur biotechnischen Nutzung der löslichen Methan-Monooxygenase aus *Methylosinus trichosporium* OB3b

Dissertation

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn Andreas Griethe

geb. am 12.02.1988 in Leinefelde

Gutachter:

1. Prof. Dr. Markus Pietzsch
2. Prof. Dr. Bruno Bühler
3. Prof. Dr. Dieter Bryniok

Tag der öffentlichen Verteidigung: 27.11.2018

Do or do not. There is no try. Only do.
Frank Oz

Failure. The greatest teacher, failure is!

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, **Andreas Griethe**, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, dass keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht worden sind.

Die Dissertation hat in der gegenwärtigen bzw. in einer anderen Fassung noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Halle (Saale), den

Danksagung

Danke an Prof. Dr. Markus Pietzsch der mir das Thema im Rahmen des ECOX-Projektes anvertraute. Dabei überließ er mir die nötige Freiheit dieses komplexe und interessante Themengebiet zu bearbeiten. Weiterhin danke ich Ihm für seine Unterstützung bei verschiedensten Fragestellungen, die mich über den Tellerrand hinaus blicken ließen.

Ein nicht groß genug ausfallendes Dankeschön richte ich an Dr. Franziska Seifert, ohne die das gesamte Projekt ECOX, inclusive meiner Dissertation, niemals in dieser Weise hätte beendet werden können.

Mein Dank gilt dem Fraunhofer CBP in Leune, besonders Frau Sandra Torkler, Herrn Tino Elter und Herrn Andy Leschnik die, trotz der aufgetretenen technischen Schwierigkeiten, für eine optimale Betreuung der Fermentationsversuche sorgten.

Herrn Dr. Matthias Stier und Frau Lisa Blaschke vom Fraunhofer IGB in Stuttgart danke ich für ihre gute Zusammenarbeit im Projekt ECOX. Weiterhin danke ich Herrn Dr. Stier für die Bereitstellung des Reaktorsystems und der MS-Analyse sowie seine ausdauernde Hilfe bezüglich der Reaktorversuche, auch zu fortgeschrittener Stunde.

Ich danke Herrn Dr. Gerd Hause und seinen Mitarbeiterinnen für die kompetente Betreuung der Transmissionselektronenmikroskopie.

Frau Dr. Angelika Schierhorn danke ich für die durchgeführten massenspektrometrischen Untersuchungen der Proteine.

Vielen Dank an Alwina Dillmann, Matthias Schöpfer, Constanze Zwies, Anne Kind, Juliane Flindt und Hannes Petruschke, die mich im Rahmen ihrer Masterarbeit bzw. Praktika tatkräftig unterstützten.

Ich danke der gesamten AG Pietzsch für ein sehr angenehmes Arbeitsklima, für die unzähligen Hilfen und die kritischen Nachfragen.

Danke an meine beiden Korrekturleser JoHeMü aus dem Tal der Solms und Isabelladonna vom Fuße des Langenberges.

Danke an meine Familie und alle die, in welcher Form auch immer, zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Danke 犬天空

Abkürzungen

Abkürzung	Bezeichnung
A	Ampere
A_{280}	Absorption bei 280 nm
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATU	N-Allylthioharnstoff (<i>N-Allylthiourea</i>)
AS	Aminosäure(n)
BFM	Biofeuchtmasse
BSA	Bovines Serumalbumin
BTM	Biotrockenmasse
CV	Säulenvolumen (<i>Column volume</i>)
Da	Dalton
DTE	Dithioerythrit
DTT	Dithiothreitol
DCPIP	2,6-Dichlorphenolindophenol
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fd	Ferredoxin
FID	Flammenionisationsdetektor
g	Gramm
g	Schleuderziffer/relative Zentrifugalbeschleunigung
h	Stunde
GC	Gaschromatographie
GTL	Gas zu flüssig (<i>Gas to liquid</i>)
HCl	Salzsäure
HDH	Hochdruckhomogenisator
HPLC	high performance liquid chromatography
IC ₅₀	Mttl. inhibitorische Konzentration (Enzymrestaktivität = 50 %)
k	Kilo
K_i	Inhibitionskonstante (Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor Komplexes)
L	Liter
m	Meter
m	Milli
M	Molar [mol/L]
min	Minuten
<i>M. capsulatus</i> Bath	<i>Methylococcus capsulatus</i> Bath
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MMOB	Regulatorisches Protein B der löslichen Methanmonooxygenase
MMOB'	N-terminal verkürzte Form von MMOB
MMOB _{rek}	rekombinant gewonnenes MMOB
MMOH	Hydroxylase der löslichen Methanmonooxygenase

Abkürzung	Bezeichnung
MMOH _{Aktive Zentren}	Aktive Zentren der α -Untereinheit der Hydroxylase der löslichen Methanmonooxygenase
MMOR	Reduktase der löslichen Methanmonooxygenase
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
<i>M. trichosporium</i> OB3b	<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b
MW	Molekulargewicht
n	Nano
n	Anzahl biologischer Replikate
NaOH	Natriumhydroxid
n.b.	Nicht bestimmt
NCIMB	National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria
NMS	Nitrat-Mineral-Salz
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PDB	Proteindatenbank (<i>Protein data base</i>)
pH	<i>potentia hydrogenii</i> [-]
pMMO	Partikuläre Methanmonooxygenase
PPL	Vorgefärbte Proteinleiter (<i>prestained protein ladder</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RuMP	Ribulose-Monophosphat
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
s	Sekunde
sMMO	Lösliche Methanmonooxygenase (<i>soluble methane monooxygenase</i>)
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
TA	Totalacrylamidkonzentration
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TTN	<i>Total turnover number</i> [Produkt*Enzymmenge ⁻¹ *Zeit ¹]
U	Unit Enzymaktivität [μmol Substrat bzw. Produkt*min ⁻¹]
UE	Untereinheit
UV/Vis	Ultraviolett/visible (Spektralbereich im ultraviolett und sichtbaren Bereich)
V	Volt
V	Volumen [L]
μ	Mittlere spezifische Wachstumsrate [h ⁻¹]
μ_{max}	Maximale spezifische Wachstumsrate [h ⁻¹]
% v/v	Volumenprozent [%]
vvm	Volumen Luft*Volumen Flüssigkeit ⁻¹ *min ⁻¹
% w/v	Masseprozent [%]

Für naturwissenschaftliche bzw. biochemische Fachausdrücke wurden die international üblichen Abkürzungen verwendet. Englische Begriffe sind kursiv dargestellt. Das Fusionsprotein His₆-SUMO-MMOB wird im Folgenden als SUMO-MMOB beschrieben

Verwendung gemeinsam mit anderen erarbeiteter Daten

In dieser Arbeit werden Daten aus den Masterarbeiten von Alwina Dillmann, Matthias Schöpfer, Constanze Zwies und Anne Kind gezeigt. Diese Masterarbeiten wurden im Rahmen des Projektes „Enzymatisch-chemokatalytische Oxidationskaskaden in der Gasphase (ECOX)“ angefertigt und teilweise von mir betreut. Die verwendeten Daten sind entsprechend gekennzeichnet und die Arbeiten in der Literaturliste aufgeführt.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	II
Danksagung	III
Abkürzungen	V
Verwendung gemeinsam mit anderen erarbeiteter Daten	VII
Inhaltsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Stand des Wissens.....	3
1.1.1 Methanotrophe Bakterien.....	3
1.1.1.1 CH ₄ -Metabolismus	4
1.1.1.2 <i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b	4
1.1.2 Lösliche Methan-Monooxygenase (sMMO).....	6
1.1.2.1 Regulation der Methan-Monooxygenase-Bildung	6
1.1.2.2 Aufbau und Struktur der sMMO	7
1.1.2.2.1 MMOH.....	8
1.1.2.2.2 MMOB.....	9
1.1.2.2.3 MMOR.....	10
1.1.2.3 Interaktion und Reaktionszyklus.....	12
1.1.3 Cofaktor-Regeneration mittels Glucose 1-Dehydrogenase	16
1.1.4 Immobilisierung von Enzymen	17
1.2 Motivation und Zielsetzung	19
2 Material und Methoden	21
2.1 Chemikalien.....	21
2.2 Geräte	24
2.3 Methoden	27
2.3.1 Kultivierung von <i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b	27
2.3.1.1 Kultivierung von <i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b mit CH ₄ als C-Quelle	28
2.3.1.1.1 Herstellung von 1/OD ₆₀₀ -Proben.....	28
2.3.1.1.2 Bestimmung der OD ₆₀₀ -BTM-Korrelation.....	28
2.3.1.2 Kultivierung von <i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b mit CH ₃ OH als C-Quelle.....	29
2.3.1.3 Stammhaltung von <i>M. trichosporium</i> OB3b	29
2.3.1.4 Analyse der Zellen mittels Transelektronenmikroskopie.....	29
2.3.1.5 Kultivierung von <i>M. trichosporium</i> OB3b im 6,8 L und 68 L-Maßstab mit CH ₃ OH als C-Quelle	29
2.3.1.6 Zellernte über Zentrifugation in Röhrenzentrifuge.....	30

2.3.2	Reinigung der sMMO nach Kultivierung mit CH ₃ OH.....	30
2.3.2.1	Trennung der sMMO-Komponenten	30
2.3.2.2	Reinigung der Hydroxylase (MMOH)	31
2.3.2.3	Reinigung des regulatorischen Proteins B (MMOB)	31
2.3.2.3.1	Untersuchungen zur autokatalytischen Spaltung von MMOB .	32
2.3.2.4	Reinigung der Reduktase (MMOR)	32
2.3.3	Einsatz der sMMO im 10 und 250 mL-Reaktormaßstab.....	33
2.3.3.1	10 mL-Maßstab	33
2.3.3.2	250 mL-Maßstab	34
2.3.4	Untersuchungen zur Immobilisierung der sMMO	34
2.3.4.1	Ungerichtete Immobilisierung der MMOH.....	34
2.3.4.1.1	Bindung von MMOH an ReliZyme™	34
2.3.4.1.2	Untersuchung der Adsorption von Substraten und Produkten an ReliZyme™	34
2.3.4.2	Gerichtete Immobilisierung von SUMO-MMOB	35
2.3.4.2.1	Bindung von SUMO-MMOB an <i>Streamline Chelating</i>	35
2.3.4.2.2	Adsorption von Substraten und Produkten an <i>Streamline Chelating</i>	35
2.4	Analyse	35
2.4.1	Reinheitsbestimmung mittels SDS-PAGE	35
2.4.2	Färbung von SDS-PA-Gelen mittels Coomassie	37
2.4.2.1	Hintergrund und Nachweisprinzip.....	37
2.4.2.2	Coomassie-Färbung.....	37
2.4.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	37
2.4.3.1	Bradford-Test	37
2.4.3.2	Absorption bei 280 nm	38
2.4.4	Analyse der sMMO-Aktivität.....	38
2.4.4.1	Ganzzell-Naphthalin-Assay	38
2.4.4.2	Nitrobenzol-Assay	39
2.4.4.2.1	Rohextrakt-Aktivität von Zellen mit CH ₄ oder CH ₃ OH als C-Quelle.....	40
2.4.4.2.2	Analyse mit gereinigten Proteinen	40
2.4.4.2.3	Eisen-Rekonstitution der Hydroxylase.....	40
2.4.4.2.4	Einfluss des pH Wertes.....	41
2.4.4.2.5	Einfluss der Salzkonzentration	41
2.4.4.2.6	Einfluss der Temperatur.....	41
2.4.4.2.7	Vergleich des homolog produzierten Protein B mit dem rekombinant in <i>E. coli</i> produziertem Protein B	41

2.4.4.2.8	sMMO-Aktivität bei unterschiedlichen SUMO-MMOB-Konzentrationen.....	41
2.4.4.2.9	Umsatz im Nitrobenzol-Assay.....	42
2.4.4.2.10	Untersuchung der sMMO-Aktivität im Nitrobenzol-Assay nach Trennung der sMMO von der Reaktionslösung.....	42
2.4.4.2.11	HCHO-Stabilität der sMMO	42
2.4.4.2.12	Einfluss von H ₂ O ₂ auf die Aktivität und Stabilität der sMMO ...	42
2.4.4.2.13	HPLC-Analyse	42
2.4.4.2.14	sMMO-Aktivität mit immobilisierter MMOH an ReliZyme™	43
2.4.4.2.15	sMMO-Aktivität mit immobilisiertem SUMO-MMOB an <i>Streamline Chelating</i>	43
2.4.4.3	CH ₄ -Assay.....	43
2.4.4.3.1	Analyse mit gereinigten Proteinen	43
2.4.4.3.2	Immobilisierte MMOH an ReliZyme™	43
2.4.4.3.3	Immobilisiertes SUMO-MMOB an <i>Streamline Chelating</i>	44
2.4.4.4	CH ₃ OH-Assay	44
2.4.4.5	Einsatz von Katalase und Glucose 1-Dehydrogenase innerhalb der sMMO-Aktivitätsmessung.....	44
2.4.4.6	MMOR-Aktivität im DCPIP-Assay.....	44
2.4.5	Analyse der HCHO-Konzentration mittels Hach Test Kit nach Nash	45
2.4.6	Analyse der H ₂ O ₂ -Konzentration mittels YSI 2700 Biochemistry Analyzer	45
2.4.6.1	H ₂ O ₂ -Bildung.....	45
2.4.6.2	H ₂ O ₂ -Abbau	45
2.4.7	Gaschromatographische Analysen	45
2.4.7.1	CH ₄ -Konzentration in der Gasphase.....	45
2.4.7.2	CH ₃ OH-Konzentration mittels GC-Headspace-Analyse	46
2.4.8	Nachweis der Nitrat-Konzentration	46
2.4.9	Analyse der Metallkonzentrationen mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS).....	46
2.4.9.1	Metallgehalt der Medien und der gereinigten Proteine.....	46
2.4.9.2	Metallgehalt der Zellen und der Fermentationsüberstände.....	47
2.4.10	Analyse mittels Massenspektrometrie.....	47
3	Ergebnisse und Diskussion	48
3.1	Untersuchungen zur Kultivierung von <i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b	48
3.1.1	Kultivierung von <i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b mit CH ₄ als C-Quelle	48
3.1.1.1	Einfluss der Kupferionenkonzentration	48
3.1.1.2	Einfluss von N-Allylthioharnstoff als Cu(II)-Komplexbildner	50
3.1.2	Kultivierung mit CH ₃ OH als C-Quelle	53

3.1.2.1	Medienoptimierung zum Nachweis des direkten Wachstums mit CH ₃ OH mit sMMO-Aktivität	54
3.1.2.2	Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b mit und ohne Cu(II)-Zusatz mit CH ₃ OH als C-Quelle.....	59
3.1.2.3	Einfluss von CH ₃ OH auf die sMMO-Aktivität im Ganzzell-Naphthalin-Assay	59
3.1.2.4	sMMO-Aktivität im Rohextrakt nach Kultivierung mit CH ₄ oder CH ₃ OH als C-Quelle.....	60
3.1.3	Zusammenfassung und Diskussion der Kultivierungsexperimente mit CH ₄ und CH ₃ OH als C-Quelle	63
3.2	Fermentation von <i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b im 6,8 L und 68 L-Maßstab mit CH ₃ OH als C-Quelle	68
3.2.1	Fermentation im 6,8 L-Maßstab	69
3.2.1.1	Fermentation mit Nitratlimitierung (Fermentation A)	69
3.2.1.2	Fermentation mit Nitrat-Feed (Fermentation B)	75
3.2.2	Fermentation im 68 L-Maßstab (Fermentation C)	79
3.2.3	Zusammenfassung und Diskussion der Fermentationen von <i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b mit CH ₃ OH als C-Quelle.....	80
3.3	Reinigung der sMMO aus <i>M. trichosporium</i> OB3b	84
3.3.1	Separation der sMMO-Komponenten.....	85
3.3.2	Reinigung MMOH	87
3.3.3	Reinigung MMOB	89
3.3.3.1	Untersuchungen zur Spaltung von MMOB	92
3.3.4	Reinigung MMOR	94
3.3.5	Zusammenfassung und Diskussion der Reinigung der sMMO-Komponenten.....	97
3.4	Biochemische Charakterisierung der sMMO.....	100
3.4.1	Untersuchungen zur sMMO-Aktivität unter Reaktionsbedingungen	100
3.4.1.1	Eisenionen-Rekonstitution und Eisenbeladung des aktiven Zentrums der MMOH	100
3.4.1.2	pH Einfluss.....	102
3.4.1.3	Einfluss der Salzkonzentration	103
3.4.1.4	Einfluss der Temperatur	105
3.4.1.5	Kinetische Untersuchungen der sMMO-Reaktion mit Nitrobenzol.....	106
3.4.2	Untersuchungen zur Stöchiometrie der sMMO-Komponenten im Nitrobenzol-Assay.....	107

3.4.3	Vergleich der sMMO-Aktivität von homolog produzierten MMOB mit rekombinant in <i>E. coli</i> produziertem MMOB _{rek}	108
3.4.4	Umsatz von CH ₄	109
3.4.5	Zusammenfassung und Diskussion der Charakterisierung der sMMO.....	112
3.5	Untersuchung zur Umsatzsteigerung der sMMO.....	116
3.5.1	Umsatz im Nitrobenzol-Assay.....	116
3.5.1.1	Umsatz bei verschiedenen Nitrobenzolkonzentrationen.....	116
3.5.1.2	Untersuchung der sMMO-Inaktivierung im Nitrobenzol-Assay.....	118
3.5.1.2.1	sMMO-Aktivität nach Trennung der sMMO von der Reaktionsbrühe.....	119
3.5.2	Untersuchungen zu Produkten und Nebenprodukten der sMMO-Reaktion.....	119
3.5.2.1	NADH-Regeneration durch die Glucose 1-Dehydrogenase.....	119
3.5.2.2	H ₂ O ₂ als Nebenprodukt der sMMO.....	120
3.5.2.2.1	H ₂ O ₂ -Bildung.....	121
3.5.2.2.2	H ₂ O ₂ Einfluss auf die sMMO-Aktivität und Stabilität.....	122
3.5.2.3	Stabilität der sMMO gegenüber HCHO.....	126
3.5.3	Einsatz von Katalase im sMMO-Aktivitätsassay.....	127
3.5.4	sMMO Reaktion mit Katalase Zusatz und NADH-Regeneration durch GDH129	
3.5.5	Zusammenfassung und Diskussion der Untersuchungen zur Umsatzsteigerung der sMMO.....	131
3.6	Untersuchung der sMMO-Aktivität im Enzymreaktor mit CH ₄ als Substrat.....	136
3.6.1	Echtzeit-Analyse der CH ₄ - und CH ₃ OH-Konzentrationen in der Flüssigphase während der sMMO-Reaktion mit NADH.....	139
3.6.2	Einfluss von Cofaktor-Regeneration und Zusatz von Katalase.....	141
3.6.3	Anpassung der MMOR-Konzentration.....	143
3.6.4	Maßstabsvergrößerung in den 250 mL-Maßstab.....	145
3.6.5	Untersuchungen der sMMO-Reaktion mit CH ₃ OH als Substrat.....	148
3.6.6	Zusammenfassung und Diskussion der <i>in vitro</i> -Messungen im Enzymreaktor mit CH ₄ als Substrat.....	149
3.7	Untersuchungen zur Immobilisierung der sMMO.....	152
3.7.1	Ungerichtete Immobilisierung der MMOH.....	152
3.7.2	Gerichtete Immobilisierung von SUMO-MMOB.....	155
3.7.3	Zusammenfassung und Diskussion der Immobilisierungsversuche.....	159
4	Zusammenfassung.....	161
5	Ausblick.....	163
6	Literatur.....	165
7	Anhang.....	175

1 Einleitung

Methanhydrat besteht aus von Wassermolekülen umschlossenen CH_4 -Molekülen (Abbildung 1-1). Diese sogenannten Clathrate (lat. *clatratus* = vergittert) entstehen bei Temperaturen unter $10\text{ }^\circ\text{C}$ und Drücken über 30 bar. Methanhydratvorkommen befinden sich im Meeresboden in Tiefen zwischen 500 und 3.000 Metern. Das CH_4 entsteht durch mikrobiellen Abbau von Biomasse. Weiterhin kann sich CH_4 auch durch chemische Umwandlung von organischer Materie bei hohen Drücken und Temperaturen ($>100\text{ }^\circ\text{C}$) in tieferen Sedimentschichten bilden und durch Risse im Gestein in höhere Bereiche aufsteigen. Schätzungen zufolge lagert im Vergleich zu herkömmlichen Erdgaslagerstätten die zehnfache Menge an CH_4 als Hydrat im Meeresboden [Lehmköster, 2014]. Besonders in Küstenregionen befinden sich große Methanhydratlagerstätten. Der Abbau des Methanhydrats ist zurzeit durch den hohen Energieverbrauch und die niedrigen Förderraten unwirtschaftlich. Jedoch wurden von China und Japan im Mai 2017 erste Erfolge bei der Förderung veröffentlicht. Im Zuge der Bohrungen bezeichnete der zuständige chinesische Minister die Bohrungen als „einen großen Durchbruch, der zu einer weltweiten Energierevolution führen könnte“. Laut Energieministerium der Vereinigten Staaten belaufen sich die Methanhydrat Vorräte auf etwa 2800 bis 28.000 Billionen m^3 CH_4 ($1.500\text{ m}^3 = 1\text{ t}$) [Behrens, 2017]. Ökologische und klimatische Folgen des Methanhydratabbaus spielen bei der potentiellen großtechnischen Förderung ebenfalls eine wichtige Rolle.

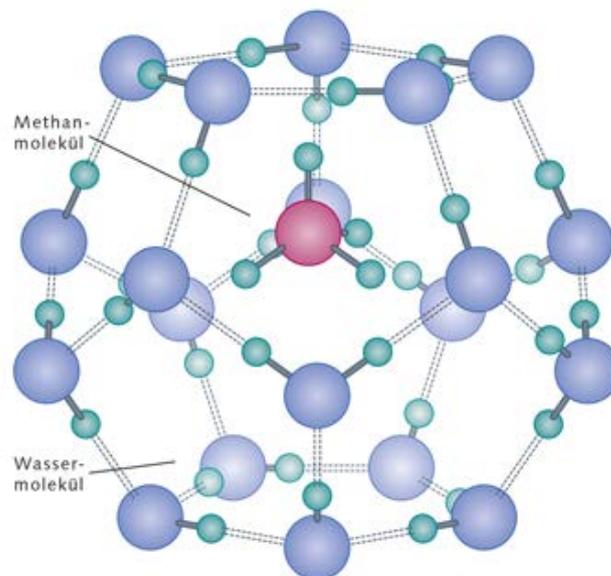


Abbildung 1-1: Darstellung von Methanhydrat. Das CH_4 -Molekül (C-rot; H-grün) im Zentrum des Clathrats wird von mehreren H_2O -Molekülen (O-blau; H-grün) umschlossen. Abbildung aus [Lehmköster, 2014].

Aufgrund der enormen Menge an vorhandenem Methanhydrat wird es als ein potentieller Energieträger der Zukunft gehandelt. Neben der Förderung ist auch der Transport des CH_4 entscheidend. Der Transport des Gases unter Überdruck oder verflüssigt (Siedepunkt- $164\text{ }^\circ\text{C}$) ist kostenintensiv [Periana, 1993]. Eine Möglichkeit der Kostenreduktion wäre die Umwandlung in flüssige Komponenten z.B. CH_3OH (Gas to Liquid, GTL). Die praktizierte chemische Umwandlung erfolgt in drei Schritten. Zunächst wird aus CH_4 und zugesetztem Wasserdampf sogenanntes Synthesegas ($\text{CO} + \text{H}_2$) gebildet. Das Synthesegas wird über zwei weitere Ni(II)- bzw. Cu(II)/Zn(II)-katalysierte Reaktionsschritte ($250\text{ }^\circ\text{C}$; 70 bis 110 bar) zu

CH₃OH umgewandelt [Dalton, 2005]. Durch die hohen Temperaturen und Drücke sowie die Katalysatormittel ist die chemische Umwandlung von CH₄ in CH₃OH energieineffizient und teuer. Eine Alternative könnte die biologische Umwandlung mittels Mikroorganismen und Enzymen sein. Methanotrophe Bakterien können durch Enzyme wie die Methan-Monooxygenase CH₄ als C-Quelle nutzen und unter Umgebungsbedingungen in CH₃OH umwandeln [Jiang *et al.*, 2010].

CH₃OH kann als Ausgangsmaterial für die Chemikalienproduktion (HCHO, Ethylen, Biodiesel) und als Treibstoff eingesetzt werden [Johnson, 2012]. Bei Untersuchungen mit CH₃OH als Treibstoff für Ein-Zylinder-Maschinen wurde eine Steigerung der Leistung um 14 % und eine Reduktion der CO, CO₂ und NO_x-Emissionen um 22 bis 37 % im Vergleich zu herkömmlichem Benzin gemessen [Çelik *et al.*, 2011]. Das Fährschiff „Stena Germanica“ der Stena Line-Reederei, welches zwischen Kiel und Göteborg pendelt, wurde im Jahre 2015 auf einem CH₃OH-Teiltrieb umgerüstet (2 von 4 Motoren). Die Umrüstung erfolgte um den strengeren Abgasnormen der Europäischen Union in der Nord- und Ostsee zu entsprechen [Wolff, 2016]. Neben der Nutzung von CH₃OH als Treibstoff in Reinform können auch verschiedenen Mischungen u.a. mit Benzin, Diesel, Ethanol, Dimethylether und Wasser für den Antrieb von Verbrennungsmotoren verwendet werden. Eine Veränderung bzw. Verbesserung der Motoren für den Einsatz von CH₃OH spielt dabei eine entscheidende Rolle. Zusätzlich sind neue Entwicklungen in der CH₃OH-Produktion und der Lagerung nötig um eine effiziente und günstige Anwendung zu gewährleisten [Zhen und Wang, 2015]. Um die großen CH₄-Vorräte adäquat nutzen zu können, wäre eine Umwandlung in eine flüssige Komponente, wie CH₃OH von Vorteil, da ein Großteil der petrochemischen Industrie auf die Verwendung flüssiger Bestandteile ausgerichtet ist.

Neben der chemischen Umwandlung mittels Gas zu Flüssigverfahren (*Gas to Liquid*, GTL), wurden auch Untersuchungen zur kommerziellen Nutzung biologischer GTL-Prozesse veröffentlicht. Dabei zeigte sich, dass die Entwicklung biokatalytischer GTL-Prozesse das Potential besitzt die Erdöl-basierte petrochemische Industrie teilweise zu ersetzen. Ein biologisches System das beschrieben wurde sind methanotrophe Mikroorganismen, die enzymatisch CH₄ in CH₃OH umwandeln. Für die tatsächliche Realisierung dieses biologischen Systems sind weitere Entwicklungsschritte nötig. Neben der Vereinfachung der Produktion ist vor allem die Optimierung der Produktivität entscheidend für eine Anwendung der methanotrophen Mikroorganismen als industrielle Biokatalysatoren [Fei *et al.*, 2014; Lawton und Rosenzweig, 2016].

1.1 Stand des Wissens

1.1.1 Methanotrophe Bakterien

Ein methanotropher Mikroorganismus wurde, in Form von *Bacillus methanicus*, erstmals im Jahre 1906 durch den niederländischen Mikrobiologen Nicolaas Luis Söhngen beschrieben [Söhngen, 1906; Theisen, 2005]. Aufgrund der aufwändigen Isolierung und Kultivierung in Reinkultur erfolgte erst 65 Jahre später durch Whittenbury und Kollegen eine umfassende Charakterisierung von weiteren 100 methanotrophen Bakterien [Whittenbury, 1970a; Whittenbury, 1970b].

Methanotrophe Bakterien besitzen die Eigenschaft mit CH₄ als alleiniger C- und Energiequelle zu wachsen. Eine Einteilung erfolgte durch Hansen und Hansen anhand der 16S rRNA in drei Gruppen, Typ I, Typ II und Typ X [Hanson und Hanson, 1996]. Die Unterschiede der Gruppen sind in Tabelle 1-1 dargestellt.

Tabelle 1-1: Eigenschaften der unterschiedlichen Typen von methanotrophen Bakterien, (±= einige Stämme besitzen die Eigenschaft) [Hanson und Hanson, 1996; Jiang *et al.*, 2010]

Gruppe	Typ I	Typ II	Typ X
Stamm	γ-Proteobakterien	α-Proteobakterien	γ-Proteobakterien
Zellmorphologie	Kurze einzelne Stäbchen, vereinzelt Kokken oder Ellipsoid	Sichelförmige Stäbchen, birnenförmig vereinzelt und als Rosetten	Kokken, oft in Paaren
Wachstum bei 45 °C	-	-	+
N₂ Fixierung	-	+	+
Exosporenbildung	-	±	-
Zystenbildung	±	±	±
Ribulose-monophosphat-Weg Metabolismus	+	-	+
Serin Metabolismus	-	+	-
Membransystem	Vesikuläre Membranstapel	Membranen in Zellperipherie	Vesikuläre Membranstapel
Gattungen	<i>Methylobacter</i> , <i>Methylomonas</i>	<i>Methylosinus</i> , <i>Methylocystis</i>	<i>Methylococcus</i> , <i>Methylocalum</i>

Methylosinus trichosporium OB3b (*M. trichosporium* OB3b) und *Methylococcus capsulatus* Bath (*M. capsulatus* Bath) sind die am besten untersuchten methanotrophen Bakterien. Für beide Organismen erfolgte die Sequenzierung des gesamten Genoms, *M. trichosporium* OB3b-4,9 Mb [Stein *et al.*, 2010] und *M. capsulatus* Bath-3,3 Mb [Ward *et al.*, 2004]. Methanotrophe Bakterien können u.a. für die Produktion von *single cell protein* (SCP), Biopolymeren (PHB), Ectoin, Lipiden und Vitamin B12 eingesetzt werden [Strong *et al.*, 2015]. SCP steht für die Proteinbildung durch Mikroorganismen (z.B. *Methylococcus capsulatus* Bath), die in den 1970er Jahren genutzt wurde um eiweißreiches Tierfutter herzustellen. Im Ver-

gleich zu anderen Tierfuttermitteln, wie Soja oder Fischmehl, ist die Herstellung von SCP unter den heutigen Bedingungen zu kostenintensiv [Bothe, 2002; Strong *et al.*, 2015].

Methanotrophe Bakterien werden zudem im Bereich der Umweltsanierung eingesetzt. Vor allem halogenierte Schadstoffe, wie Trichlorethan können entweder durch eine *in situ*-Sanierung direkt vor Ort oder eine *ex situ*-Sanierung im Bioreaktor durch die Organismen abgebaut werden [Chu und Alvarez-Cohen, 1998; Lontoh und Semrau, 1998; Semprini *et al.*, 1990].

1.1.1.1 CH₄-Metabolismus

Die obligat aerobe Oxidation von CH₄ zu CH₃OH erfolgt in methanotrophen Bakterien als erster Schritt des Kohlenstoffwechsels. Dabei können zwei verschiedene Methan-Monooxygenasen (MMO) die CH₃OH-Bildung katalysieren, die partikuläre MMO (pMMO) und die lösliche MMO (sMMO). Die pMMO wird, mit Ausnahme von Organismen der Gattung *Methylocella* und *Methyloferula*, von allen Methanotrophen gebildet [Dedysz *et al.*, 2015; Semrau *et al.*, 2010]. Die sMMO wird nur von wenigen Methanotrophen (u.a. *M. trichosporium* OB3b und *M. capsulatus* Bath) unter Cu(II)-armen Wachstumsbedingungen produziert. Nach der Umwandlung von CH₃OH zu HCHO durch eine Methanol-Dehydrogenase (MDH), erfolgt, je nach Stamm, die Assimilation über den Serin- bzw. Ribulose-Monophosphat (RuMP)-Weg in Biomasse. Im oxidativen Stoffwechselweg wird unter Bildung von CO₂ Energie in Form von Reduktionsäquivalenten gewonnen (Abbildung 1-2) [Merkx *et al.*, 2001; Strong *et al.*, 2015]

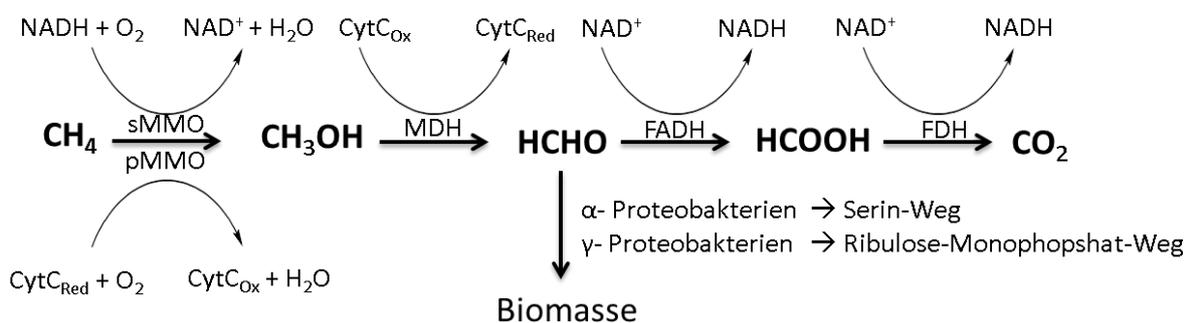


Abbildung 1-2: CH₄-Metabolismus von methanotrophen Bakterien mit Assimilation von HCHO und Energiegewinnung durch enzymatische Oxidation zum CO₂. Abbildung in Anlehnung an [Strong *et al.*, 2015]. sMMO- lösliche Methan-Monooxygenase; pMMO- partikuläre/membrangebundene MMO; CytC_{Red/Ox}- Cytochrom C reduziert bzw. oxidiert; MDH- Methanol-Dehydrogenase; FADH- Formaldehyd-Dehydrogenase; FDH- Formiat-Dehydrogenase.

1.1.1.2 *Methylosinus trichosporium* OB3b

Methylosinus trichosporium OB3b wurde erstmals von Whittenbury und Kollegen im Jahre 1970 isoliert, kultiviert und näher beschrieben [Whittenbury, 1970b]. Die natürlichen Habitate des Organismus befinden sich an der Grenze zwischen anaeroben und aeroben Bereichen, wie sie u.a. in Sumpfgeländen vorkommen. Die Abkürzung OB3b steht für *odd ball* Nr. 3b und ist auf seine kokkenförmige Morphologie zurückzuführen. Der Organismus gehört zu dem Stamm der α-Proteobakterien (Typ II, Tabelle 1-1, Seite 3) und ist gram negativ. Die optimale Wachstumstemperatur wird mit 30 °C angegeben [Rodrigues *et al.*, 2009; Whittenbury, 1970a; Whittenbury, 1970b]. *M. trichosporium* OB3b kann neben dem Wachstum mit CH₄, auch CH₃OH als alleinige C-Quelle nutzen. Dabei wurden im Gegensatz zum Wachstum mit

CH₄ Adaptationsphasen von mehreren Tagen beobachtet [Best und Higgins, 1981; Davis *et al.*, 1987]. CH₃OH ist für den Organismus ab einer Konzentrationen von 40 g*L⁻¹ (1,25 M) letal. Eine Wachstumsinhibition von *Methylosinus trichosporium* OB3b zeigte sich bereits ab 10 g*L⁻¹ CH₃OH (312 mM).

Methylosinus trichosporium OB3b nutzt zur Kohlenstoff-Assimilation den Serin Weg. HCHO wird zu HCOOH umgewandelt und mittels Tetrahydrofolsäure erfolgt ein C₁-Transfer auf Glycin. Das entstandene Serin wird über weitere Reaktionen zu 2-Phosphoglycerat umgewandelt und anschließend über den Citratzyklus oder den Ribulose-5-phosphat Weg weiter umgewandelt um Biomasse zu bilden [Anthony, 2011]. Glycin bzw. Acetyl-CoA sind Ausgangsmetaboliten für den Aufbau von Amino- bzw. Fettsäuren [Hanson und Hanson, 1996; Matsen *et al.*, 2013]. Pro HCHO wird ein Molekül CO₂ benötigt um Oxaloacetat zu bilden. Bei einer zu geringen CO₂ Konzentration verlangsamt sich das Wachstum, bis z.B. ausreichend CO₂ vom Organismus gebildet wird [Davis *et al.*, 1987; Park *et al.*, 1991]. Weiterhin besitzt *M. trichosporium* OB3b die Eigenschaft bei Mangel einer N-Quelle im Medium (Nitrat oder Ammonium) molekularen N₂ aus der Atmosphäre über eine Nitrogenase zu reduzieren und biologisch zugänglich zu machen [Chen und Yoch, 1987].

Treten Nährstoff-Limitierungen während des Wachstums von *M. trichosporium* OB3b auf, wird über den Etylmalonyl-CoA Weg (ausgehend vom Glyoxylat und Acetyl-CoA) Polyhydroxybuttersäure (PHB) als Speicherstoff gebildet [Strong, 2016]. In der Literatur werden maximale intrazelluläre PHB-Konzentrationen von 25 bis 30 % der Biotrockenmasse (BTM) beschrieben [Shah *et al.*, 1996]. Aufgrund der potentiellen Nutzung von PHB als Biopolymer wurden bereits Untersuchungen mit methanotrophen Bakterien als PHB-Produktionsorganismus durchgeführt. Listwnik und Kollegen beschreiben eine Anlage auf Grundlage von Laborversuchen, in der bis zu 500 t PHB pro Jahr durch *Methylocystis sp.* GB 25 DSM7674 produziert werden kann [Listewnik *et al.*, 2007]. Die Endkosten des Produkts würden pro Kilogramm PHB zwischen 11,5 und 14 € betragen. Im Vergleich zu anderen PHB-Produktionswegen (z.B. durch Rohstoffe wie Saccharose, 5 bis 13 €*kg⁻¹) ist das durch methanotrophe Bakterien gebildete PHB zu teuer. Die Herstellung von „traditionellen“ Polymeren z.B. Polypropylen (PP) ausgehend von fossiler Rohstoffe ist nochmals deutlich günstiger (<1 €*kg⁻¹). Diese Polymere sind im Vergleich zum PHB (meist) nicht biologisch abbaubar, können aber aufgrund der besseren Eigenschaften (Stabilität, Verformbarkeit) in unterschiedlichen Anwendungsgebieten eingesetzt werden [Asenjo und Suk, 1986; Listewnik *et al.*, 2007; Strong, 2016]. Neben der PHB-Bildung, wurde *M. trichosporium* OB3b auch zur Sanierung von Böden/Abwässern eingesetzt. Durch die Eigenschaften der sMMO (siehe Kapitel 1.1.2) können verschiedene Chemikalien, wie Trichlorethen, Dichlormethan, Chloroform, Vinylchlorid oder Dichlorethen, abgebaut werden [Lee *et al.*, 2006; Oldenhuis *et al.*, 1989].

Abhängig von dem Kupferionen zu Biomasse-Verhältnis bildet *Methylosinus trichosporium* OB3b entweder die membranständige pMMO, oder eine lösliche sMMO. Die pMMO Bildung ist durch das Vorhandensein intrazellulärer peripherer Membranstapel gekennzeichnet (Abbildung 1-3 A). Diese fehlen, wenn der Organismus statt der pMMO die sMMO bildet (Abbildung 1-3 B) [Phelps *et al.*, 1992; Scott, 1981; Yu *et al.*, 2009b]

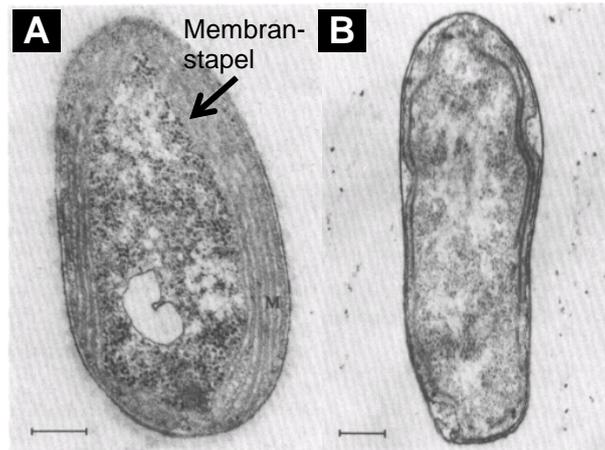


Abbildung 1-3: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von *Methylosinus trichosporium* OB3b. A: Kultivierung mit CH₄ mit Vorhandensein von pMMO Aktivität und peripheren Membranschichten, B: Kultivierung mit CH₄ mit sMMO-Aktivität und ohne interne Membranstapel. Maßstabsbalken entspricht 200 nm. Abbildung aus [Scott, 1981]

1.1.2 Lösliche Methan-Monooxygenase (sMMO)

1.1.2.1 Regulation der Methan-Monooxygenase-Bildung

Die Expression der MMO-Gene wird durch das Verhältnis der Kupferionen- und der Biomassenkonzentration (Cu(II)/Biomasse) reguliert [Cornish *et al.*, 1984]. Literaturangaben hinsichtlich der Cu(II)/Biomassekonzentration, die zu einer Bildung der pMMO führen, variieren zwischen 0,55 und 1,16 $\mu\text{mol Cu(II)} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$ [Jahng und Wood, 1996; Lloyd *et al.*, 1999; Murrell, 1994; Tsien *et al.*, 1989].

Die Expression der sMMO-Gene erfolgt über ein als Operon strukturiertes Gencluster. Bei niedrigen Cu(II)/Biomasse-Verhältnissen bindet Methanobactin, ein Cu(II)-bindendes Protein an das sMMO-Operon (*mmo*-Operon) und aktiviert die Expression der sMMO-Gene. Neben den drei sMMO-Proteinen (Hydroxylase- MMOH, regulatorisches Protein B- MMOB und Redutase- MMOR) wird auch ein viertes Protein, MMOD, gebildet. MMOD bindet an das pMMO-Operon (*pmo* Operon) und reprimiert die Transkription der pMMO-Gene und dadurch erhöht gleichzeitig die Methanobactin- und sMMO-Bildung. Bei höheren Cu(II)/Biomassekonzentrationen, bindet Methanobactin Kupferionen. Nach der Cu(II)-Bindung kann Methanobactin nicht mehr an das sMMO-Operon binden. Stattdessen erfolgt die Bindung an das pMMO-Operon und verstärkt deren Transkription. Das vorhandene MMOD bindet ebenfalls Cu(II) und kann infolge nicht mehr die *pmo*-Transkription reprimieren. Dadurch wird in der Summe die pMMO gebildet [Semrau *et al.*, 2013]. Auf die sMMO-Bildung haben zwei weitere Gene Einfluss, die 5' des *mmo*-Operons liegen. Das Protein MmoR wurde als möglicher Transkriptionsregulator des *mmo*-Operons (*enhancer binding proteins*, EBP) identifiziert. Das zweite Helferprotein ist MmoG, ein GroEL-homologes Protein, welches u.a. für die Faltung von MmoR oder den anderen strukturellen Proteinen verantwortlich sein könnte. Für die sMMO-Bildung sind beide Proteine essentiell, denn Mutationen innerhalb der Gensequenzen beider Helferproteine führten zu keiner Transkription der sMMO-Gene [Stafford *et al.*, 2003].

Die Sequenzen der sMMO sind in den methanotrophen Bakterien hoch konserviert. Sequenzidentitäten von 55 bis 96 % für die Gensequenzen und 47 bis 96 % bei den Aminosäuresequenzen wurden nachgewiesen [Murrell *et al.*, 2000b]. Die Sequenzidentitäten der

sMMO aus *M. trichosporium* OB3b und *M. capsulatus* Bath liegen bei 82,4 % für die α -Untereinheit der MMOH, bei 58,7 % für die β -Untereinheit der MMOH, bei 50,3 % für die γ -Untereinheit der MMOH, bei 65,7 % für MMOB und bei 41,8 % für MMOR. Weiterhin wurden konservierte Aminosäure-Sequenzen in vergleichbaren strukturellen Bereichen zur sMMO in anderen Monooxygenasen, wie der 2-,3-,4,-Toluol-Monooxygenase, der Phenolhydroxylase und einer Alken-Monooxygenase identifiziert [Coufal *et al.*, 2000].

1.1.2.2 Aufbau und Struktur der sMMO

Im Vergleich zur Cu(II)-abhängigen pMMO ist die sMMO kein membranständiges Enzym und besitzt als aktives Zentrum ein Nicht-Häm-Dieisen-Zentrum. Weitere Eigenschaften der beiden Methan-Monooxygenasen sind in Tabelle 1-2 aufgelistet.

Tabelle 1-2: Eigenschaften der beiden Methan-Monooxygenasen aus *M. trichosporium* OB3b

Eigenschaft	sMMO [EC 1.14.13.25]	pMMO [EC 1.14.18.3]
Struktur ¹⁾	3 Komponenten (i) Hydroxylase-MMOH-Heterohexamer ($\alpha\beta\gamma$) ₂ (ii) Regulatorisches Protein-MMOB (iii) Reduktase-MMOR	Heterononamer ($\alpha\beta\gamma$) ₃
Größe ²⁾	α -ca. 60 kDa β -ca. 45 kDa γ -ca. 20 kDa MMOB-ca. 15 kDa MMOR-ca. 38 kDa	α -PmoA-ca. 26 kDa β -PmoB-ca. 45 kDa γ -PmoC-ca. 23 kDa
Lokalisation ³⁾	Cytoplasma	Cytoplasmatische Membranstapel
Aktives Zentrum ⁴⁾	Nicht-Häm-Dieisen-Zentrum (carboxylat- und hydroxylatverbrückt)	Di-Cu(II)-Zentrum evtl. mit weiterer Eisen- oder Zinkionen-Bindestelle (nicht final geklärt)
Substrate ⁵⁾	Alkane (bis C 8), ungesättigte, verzweigte, zyklische, aromatische, halogenierte Kohlenwasserstoffe (KW), NH ₄ ⁺ , CO	Alkane (bis C 5), einige halogenierte KW, z.B. Trichlorethen
Natürliches Reduktionsmittel ⁶⁾	NADH	Cytochrom c
Kinetische Daten zum CH₄-Umsatz von Ganzen Zellen ⁷⁾	K_M 93 \pm 30 μ M v_{max} 726 \pm 100 nmol _{CH₄} *mg _{Protein} ⁻¹ 7)	K_M 62 \pm 21 μ M v_{max} 300 \pm 57 nmol _{CH₄} *mg _{Protein} ⁻¹ 8)

¹⁾ [Dalton, 2005][Ross und Rosenzweig, 2016]

²⁾ [Balasubramanian und Rosenzweig, 2007; Murrell *et al.*, 2000a]

³⁾ [Scott, 1981]

⁴⁾ [Merx *et al.*, 2001] [Sirajuddin und Rosenzweig, 2015]

⁵⁾ [Borodina *et al.*, 2007; Burrows *et al.*, 1984]

⁶⁾ [Fox *et al.*, 1990; Semrau *et al.*, 2010]

⁷⁾ [Lontoh und Semrau, 1998; Oldenhuis *et al.*, 1991]; Umgerechnet aus nmol_{CH₄}*mg_{BTM}⁻¹ mit Annahme 50 % der BTM = Protein

⁸⁾ [Lontoh und Semrau, 1998]

1.1.2.2.1 MMOH

Die Kristallstruktur und das aktive Zentrum der Hydroxylase der sMMO aus *Methylosinus trichosporium* OB3b sind in Abbildung 1-4 A dargestellt. Das Protein besteht aus je zwei α -, β - und γ -Untereinheiten mit jeweils einem aktiven Zentrum innerhalb der α -Untereinheit (Gesamt-molekulargewicht der MMOH ca. 250 kDa).

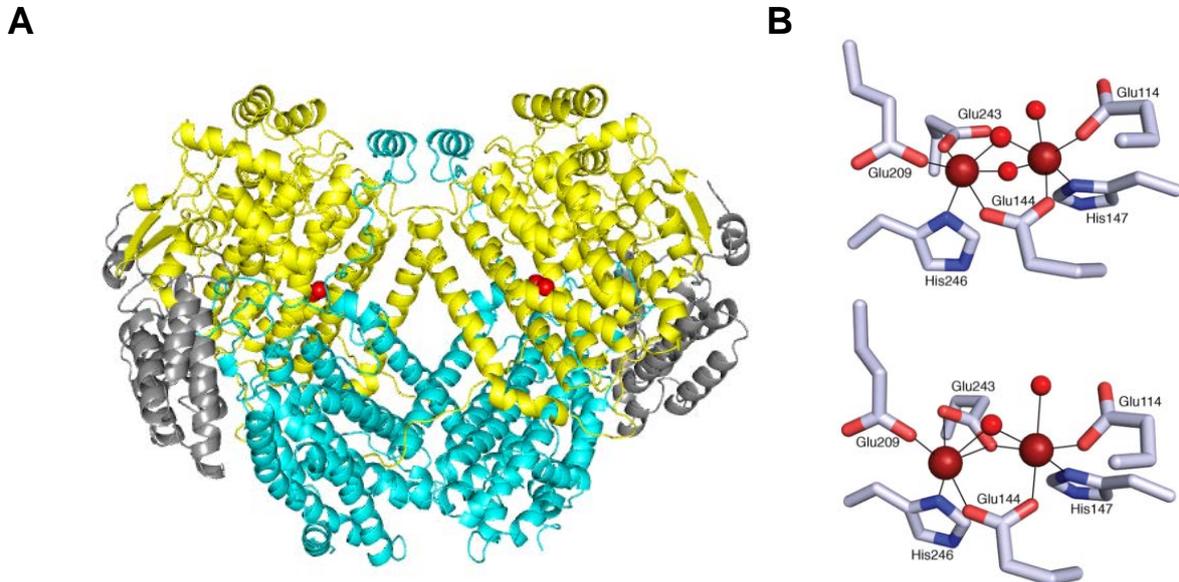


Abbildung 1-4: A: *Ribbon band* Darstellung der Kristallstruktur von MMOH aus *M. trichosporium* OB3b. α -Untereinheiten in gelb, β -Untereinheiten in cyan, γ -Untereinheiten in grau und je zwei Eisenionen im aktiven Zentrum als Kugeln in rot dargestellt (erstellt mit Programm PyMOL, PDB Datei 1MTY). B. Darstellung des Nicht-Häm-Dieisen-Zentrums im oxidierten (oben) und im reduzierten (unten) Zustand, rot- Lösungsmittelligand (H₂O), rotbraune Kugeln- Eisenionen. Abbildung aus [Ross und Rosenzweig, 2016].

Das aktive Zentrum ist ein Glutamat- und Histidin-verbrücktes Nicht-Häm-Dieisen-Zentrum, welches in einer bis- μ -hydroxo Struktur angeordnet ist (Abbildung 1-4 B). Das aktive Zentrum besitzt einen Durchmesser von etwa 12 Å und ist mit zwei sogenannten „Poren“, einer hydrophoben und einer hydrophilen Region, verbunden. Über diese Poren erfolgt der CH₄, O₂, Elektronen- und Protonen-Eintritt, sowie das Verlassen der Reaktionsprodukte in die Umgebung [Wang *et al.*, 2015]. An der Grenzfläche der Bindungsregion der beiden funktionellen MMOH-Untereinheiten ($\alpha\beta\gamma$) liegt die sogenannte „Canyon“-Region, an der die Bindung von MMOB oder MMOR an die MMOH erfolgt (siehe Abbildung 1-8 A, S.13). Eines der beiden Eisenionen ist stärker an das aktive Zentrum gebunden als das andere, da deren Koordinationsumgebung flexibler ist [Dalton, 2005; Merx *et al.*, 2001; Whittington und Lippard, 2001]. Die Gesamtreaktion der sMMO mit CH₄ als Substrat ist in Formel 1-1 dargestellt.



Der Aufbau des aktiven Zentrums der Hydroxylase und die präzise gesteuerte Interaktion bzw. Aktivierung von O₂ und CH₄ ermöglichen es dem Enzym die stabile C-H-Bindung (105 kcal mol⁻¹ [Blanksby und Ellison, 2003]) im CH₄-Molekül zu brechen. Die bisher beschriebenen Wechselzahlen (k_{cat}) der sMMO für den CH₄-Umsatz liegen zwischen 0,3 und 3,7 s⁻¹ [Fox *et al.*, 1990; Pilkington und Dalton, 1990]. Damit ist die sMMO, bezogen auf die katalytische Geschwindigkeit, ein vergleichsweise langsames Enzym. Im Vergleich dazu wird

z.B. für die Carboanhydrase, als eines der schnellsten bekannten Enzyme, eine Wechselzahl von 10^6 s^{-1} und für Lysozym eine Wechselzahl von $0,5 \text{ s}^{-1}$ angegeben [Earnhardt *et al.*, 1998; Stryer, 2002]. *M. trichosporium* OB3b bildet vermutlich große Mengen der sMMO bzw. MMOH um die vergleichsweise geringe Reaktionsgeschwindigkeit zu kompensieren. Der Anteil der Hydroxylase kann bis zu 12 % der löslichen Proteinmenge des Organismus ausmachen [Fox *et al.*, 1990; Merx *et al.*, 2001]. Die bisherige Gewinnung der Hydroxylase erfolgte homolog aus *M. trichosporium* OB3b Biomasse. Eine funktionale rekombinante Produktion der MMOH aus *M. trichosporium* OB3b und anderen methanotrophen Organismen ist bislang trotz intensiven Untersuchungen nicht erfolgreich beschrieben [Dalton, 2005].

1.1.2.2.2 MMOB

Das regulatorische Protein B (MMOB) hat ein Molekulargewicht von 14,9 kDa, besitzt keine prosthetische Gruppe oder Metallionen und kann bis zu 2 % des Anteils an löslichem Protein in der Zelle ausmachen. Im Gegensatz zu den anderen beiden sMMO-Komponenten besitzt MMOB keine eigenständige katalytische Funktion. MMOB beeinflusst durch die Bindung an der Hydroxylase die makroskopische Geschwindigkeit der Reaktion, die Regioselektivität und das Redoxpotential der MMOH [Merx *et al.*, 2001]. In Anwesenheit von MMOB wurde für einzelne Substrate der sMMO, wie z.B. Propen, eine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit um Faktor 150 beobachtet [Fox *et al.*, 1989]. Das regulatorische Protein B besteht aus einem hochstrukturierten Kern und den flankierenden Termini (Aminosäuren 1 bis 35 und 127 bis 138), die keine signifikante Faltung aufweisen [Chang *et al.*, 1999]. Die Struktur von MMOB ist in Abbildung 1-5 dargestellt.

Der Einfluss von MMOB auf die Reaktionsgeschwindigkeit und die Regioselektivität erfolgt nach Bindung an die Hydroxylase. Die Bindung von MMOB erfolgt mittels des MMOB-Kerns innerhalb der „Canyon“-Region der MMOH, wobei auch der N-Terminus an die Hydroxylase bindet (siehe Abbildung 1-8 A, S.13) [Wang *et al.*, 2014]. Die durch die MMOB-Bindung erfolgenden strukturellen Veränderungen der Hydroxylase die für die Katalyse essentiell sind, werden in Kapitel 1.1.2.3 (S.12) näher beschrieben.

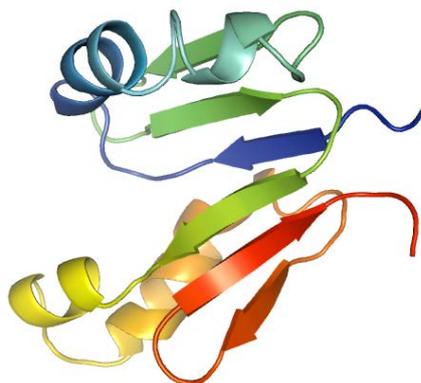


Abbildung 1-5: Ribbon band Darstellung der Kristallstruktur von MMOB aus *Methylosinus trichosporium* OB3b, rot-N-Terminus; blau-C-Terminus. (erstellt mit Programm PyMOL, PDB Datei 2MOB)

Sowohl N- als auch C-Terminus des regulatorischen Proteins B sind für die sMMO-Aktivität zwingend erforderlich. Nach Produktion verschiedener N-terminal verkürzter *M. capsulatus* Bath MMOB Varianten, wurde bei Fehlen der ersten sechs Aminosäuren am N-Terminus keine sMMO-Aktivität mehr nachgewiesen. Zudem konnte eine autokatalytische Spaltung an

Position 13 des N-Terminus beobachtet werden [Callaghan *et al.*, 2002]. Für MMOB aus *M. trichosporium* OB3b wurde eine vergleichbare autokatalytische Spaltung bisher nicht beschrieben. Statt Glycin hat MMOB in *M. trichosporium* OB3b Glutamin als Aminosäure an Position 13 des N-Terminus. Die höhere Stabilität von MMOB resultiert vermutlich aus diesem Unterschied [Dalton, 2005]. Die rekombinante Produktion von MMOB, sowohl aus *M. trichosporium* OB3b, als auch aus *M. capsulatus* Bath in *Escherichia coli* (*E. coli*), wurde bereits erfolgreich beschrieben [Chang *et al.*, 1999; West *et al.*, 1992].

1.1.2.2.3 MMOR

Die Reduktase (MMOR) aus *M. trichosporium* OB3b besitzt ein Molekulargewicht von 38,0 kDa. Die Enzymaktivität von MMOR ist von drei Cofaktoren abhängig, NADH, FAD und einem Eisen-Schwefelcluster (Struktur 2Fe-2S). Die vollständige Struktur des Proteins ist noch nicht aufgeklärt. Die Strukturen der FAD-Domäne und der Ferredoxin-Domäne von *M. capsulatus* Bath sind bereits bekannt. Anhand der Aminosäuresequenz von *M. trichosporium* OB3b und der aufgeklärten NMR Strukturen der beiden Domänen von *M. capsulatus* Bath erfolgte von Schöpfer eine Modellierung der potentiellen MMOR-Struktur für *M. trichosporium* OB3b. Dieses Modell ist in Abbildung 1-6 dargestellt.

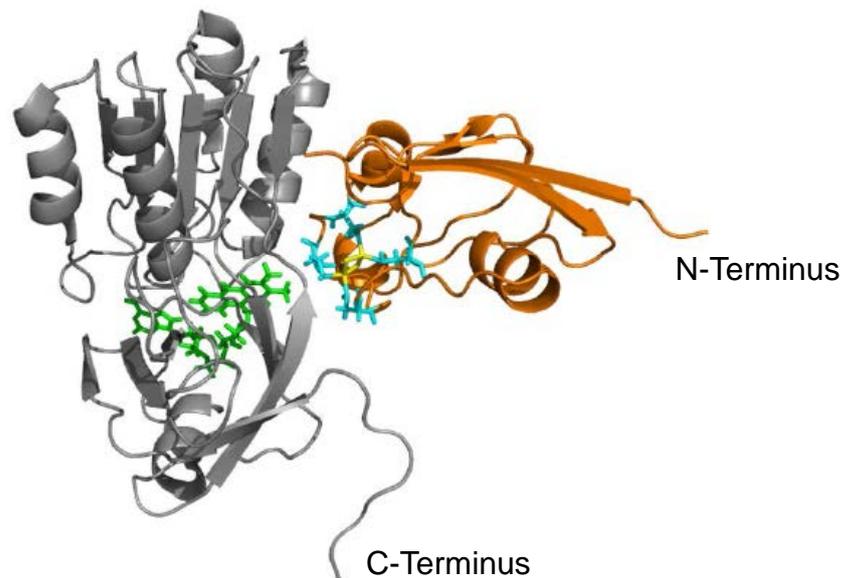


Abbildung 1-6: Darstellung der mutmaßlichen Modellstruktur (Swiss-model) der MMOR aus *Methylophilus trichosporium* OB3b. Basierend auf PDB Dateien von MMOR aus *M. capsulatus* Bath (1TVK; 1JQ4) und der MMOR-Aminosäuresequenz aus *M. trichosporium* OB3b. grau-FAD Domäne, 27,6 kDa; grün-nicht kovalent gebundener FAD Kofaktor; orange-Ferredoxin-Domäne, ca. 10,9 kDa; cyan-Cysteine 42, 47, 50 und 82 die Eisenionen im [2Fe-2S] Clusters (gelb, in reduzierter Form) binden. Abbildung aus [Schöpfer, 2014]

Die Fd-Domäne (in Abbildung 1-6 grau dargestellt) enthält neben dem nicht kovalent gebundenen FAD-Cofaktor eine NADH-Bindestelle [Chatwood *et al.*, 2004]. Die Eisenionen innerhalb des 2Fe-2S-Clusters der Ferredoxin-Domäne am N-Terminus werden durch vier Cysteine stabilisiert [Muller *et al.*, 2002]. Die Bindung von MMOR an die Hydroxylase erfolgt über die Ferredoxin-Domäne an der „Canyon“-Region von MMOH [Wang *et al.*, 2014]. Die erfolgreiche rekombinante Produktion von funktionalem MMOR in *E. coli* ist bisher nur für die MMOR aus *M. capsulatus* Bath beschrieben [West *et al.*, 1992]. Die Funktion von MMOR in der sMMO-Reaktion besteht in der Elektronenübertragung vom Substrat NADH, über den FAD-Cofaktor, das 2Fe-2S-Cluster auf das Nicht-Häm-Dieisen-Zentrum der Hydroxylase.

Der Weg der Elektronenübertragung ist in Abbildung 1-7 dargestellt. Zunächst wird freies NADH im NADH-bindenden Teil (Rossmann-Faltung) der FAD-Domäne gebunden (Zwischenstufe MC1). Die folgende Zwischenstufe wird als *Charge-Transfer*-Komplex zwischen NADH und FAD bezeichnet. Nach Übertragung eines Hydridions von NADH zum FAD bildet sich der 2. *Charge-Transfer*-Komplex. Die folgende Freisetzung von NAD^+ und die Elektronenübertragung auf $[\text{2Fe-2S}]_{\text{ox}}$ verlaufen simultan und es bildet sich ein Flavin-Semichinon und $[\text{2Fe-2S}]_{\text{red}}$. Über die Gleichgewichtsbildung der SQ-Stufe mit der Bildung eines Flavin Hydrochinons und $[\text{2Fe-2S}]_{\text{ox}}$ wird der Komplex stabilisiert. Anschließend kann die Elektronenübertragung auf das Nicht-Häm-Eisen-Zentrum erfolgen [Kopp *et al.*, 2001; Merx *et al.*, 2001]. Im Vergleich zum Substratumsatz durch die sMMO ist die Elektronenübertragung von NADH auf das aktive Zentrum der MMOH nicht geschwindigkeitsbestimmend [Wang *et al.*, 2014].

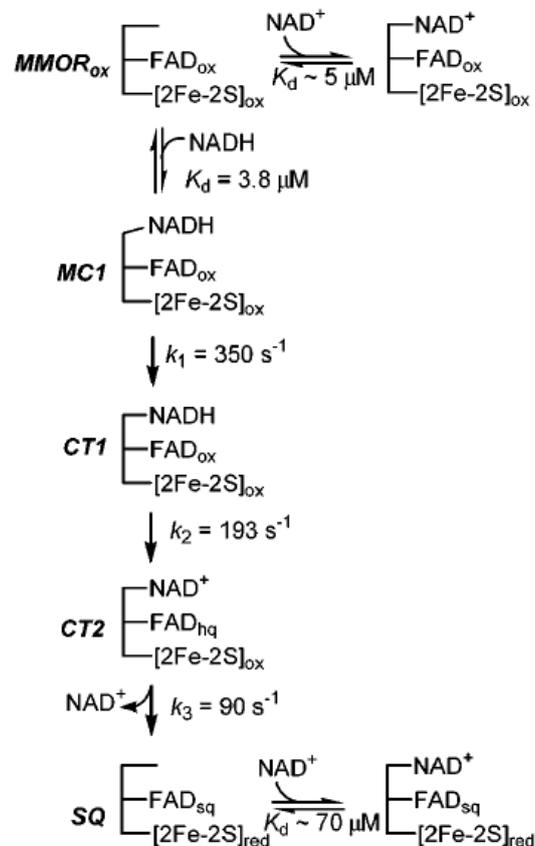


Abbildung 1-7: Schema der Elektronenübertragung von NADH auf das $[\text{2Fe-2S}]$ Cluster innerhalb der MMOR aus *M. capsulatus* Bath. MC1-Michaelis Komplex 1; CT1-Charge Transfer Komplex 1; CT2-Charge Transfer Komplex 2; SQ-Flavin-Semichinon; Abbildung aus [Kopp *et al.*, 2001]

Studien zur Aufarbeitung der sMMO aus *M. trichosporium* OB3b zeigten, dass im Verhältnis zu MMOH und MMOB die Reduktase einen deutlich geringeren Anteil des löslichen Proteins ausmacht (0,1 bis 0,3 % im Vergleich zu bis zu 12 % für MMOH) [Fox *et al.*, 1989; Merx *et al.*, 2001; Pilkington und Dalton, 1990]. Als eine Ursache wird die Reaktivität des isolierten Enzyms beschrieben. MMOR kann in Abwesenheit von MMOH Elektronen auf O_2 übertragen und somit reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxidative species*, ROS) wie z.B. H_2O_2 bilden. Diese Nebenreaktionen können toxisch für die Zelle sein. [Gassner und Lippard, 1999; Wang *et al.*, 2014].

Die eigenständige Aktivität von MMOR (Ferredoxin-NAD(P)-Oxidoreduktasen, EC 1.18.1.3) ermöglicht den Nachweis durch Elektronenübertragung auf verschiedene spektroskopisch detektierbare Substrate wie z.B. 2,6-Dichlorindophenol oder Kaliumhexacyanidoferrat(III) [Dalton, 2005; Fox *et al.*, 1989].

1.1.2.3 Interaktion und Reaktionszyklus

Die genauen Abläufe der sMMO-Reaktion wurden intensiv untersucht und sind weitgehend bekannt. Die Arbeitsgruppe um Wang und Lippard untersuchte die Komplexdynamik von MMOH, MMOR und MMOB aus *Methylococcus capsulatus* Bath [Wang *et al.*, 2014; Wang und Lippard, 2014]. Basierend auf verschiedenen experimentellen Ergebnissen wurde folgendes Modell postuliert.

MMOB und die Ferredoxin-Domäne der MMOR konkurrieren um die Bindung innerhalb der „Canyon“ Region der Hydroxylase. Die Bindung und der Elektronentransfer der MMOR auf MMOH kann durch MMOB-Bindung an MMOH inhibiert werden. Dadurch ist eine Regelung des Elektronentransfers möglich und die unnötige Elektronenübertragung und etwaige Bildung von reaktiven O₂-Spezies (ROS) wird unterbunden (Abbildung 1-8 A). Für die Bildung von CH₃OH sind vier Substrate (CH₄, O₂, Elektronen und Protonen) nötig, die auf unterschiedlichen Wegen zum aktiven Zentrum der MMOH transportiert werden. Die Affinität von MMOR gegenüber der oxidierten Hydroxylase (H_{ox}) ist höher als die von MMOB. Somit bindet MMOR zunächst an MMOH_{ox} in der „Canyon“-Region direkt über dem aktiven Zentrum bzw. der hydrophilen Pore. Das Nicht-Häm-Dieser-Zentrum der Hydroxylase und das 2Fe-2S-Cluster der Reduktase sind über ein Netzwerk an Wasserstoffbrückenbindungen (u.a. Asparagin 214 und Glutaminsäure 240) miteinander verbunden. Über die hydrophile Pore erfolgt neben der Bereitstellung der Elektronen durch die MMOR (1.1.2.2.3, S.10), auch der Zugang von Protonen (in Form von Wasser oder Hydronium-Ionen), die für die spätere Aktivierung des Sauerstoffes essentiell sind (Abbildung 1-8 B). Nach der Elektronenübertragung von NADH durch MMOR auf das aktive Zentrum der MMOH verdrängt MMOB die Reduktase von der Hydroxylase, da deren Affinität gegenüber der reduzierten Hydroxylase (MMOH_{red}) größer ist als von MMOR (Abbildung 1-8 A). Durch die Bindung von MMOB, ebenfalls in der „Canyon“-Region der MMOH über dem aktiven Zentrum, verändert sich die Struktur der MMOH. Eine dieser Konformationsänderungen ist das Verschieben der Seitenkette der Glutaminsäure 240, was den Zugang zur hydrophilen Pore schließt und gleichzeitig ein an diese Aminosäure gebundenes H₂O-Molekül bzw. Hydronium-Ion freisetzt. Dadurch wird zum einen das für die O₂-Aktivierung notwendige Proton freigesetzt und zum anderen ein weiterer störender Zugang von Elektronen oder Protonen über die hydrophile Pore verhindert. So kann die sMMO über die Bindung von MMOB den Elektronentransfer steuern und z.B. die Bildung von ROS verhindern. Eine weitere Konformationsänderung, die durch die Bindung von MMOB an die MMOH_{red} erfolgt, ist das „Umklappen“ der Seitenkette des Phenylalanins 188. Dadurch wird ein hydrophober Substratkanal (Pore) innerhalb der Hydroxylase geöffnet durch den die gasförmigen Substrate (CH₄, O₂) zum Nicht-Häm-Dieser-Zentrum gelangen können (Abbildung 1-8 B). Nach der CH₃OH-Bildung und Oxidation des Nicht-Häm-Dieser-Zentrums (MMOH_{ox}) wird das regulatorische Protein B aufgrund der gesunkenen Affinität von der Reduktase verdrängt. Dabei öffnet sich erneut die hydrophile Pore über dem aktiven Zentrum und die Produkte der Reaktion (CH₃OH, H₂O) verlassen über diese Pore das Enzym. Mit der erneuten Elektronenübertragung durch MMOR beginnt ein weiterer Reaktionszyklus. Interaktions- und Modellierungsstudien lassen vermuten, dass MMOB über den flexiblen N-terminalen Bereich mit der Hydroxylase über den gesamten Reaktionszyklus asso-

ziert bleibt (Abbildung 1-8 A) [Wang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015]. Ohne den N-terminalen Bereich von MMOB, respektive die Bindung an MMOH ist keine sMMO-Aktivität möglich. Dies wurde in Studien mit verkürzten MMOB Varianten gezeigt (Kapitel 1.1.2.2, S.9) [Callaghan *et al.*, 2002].

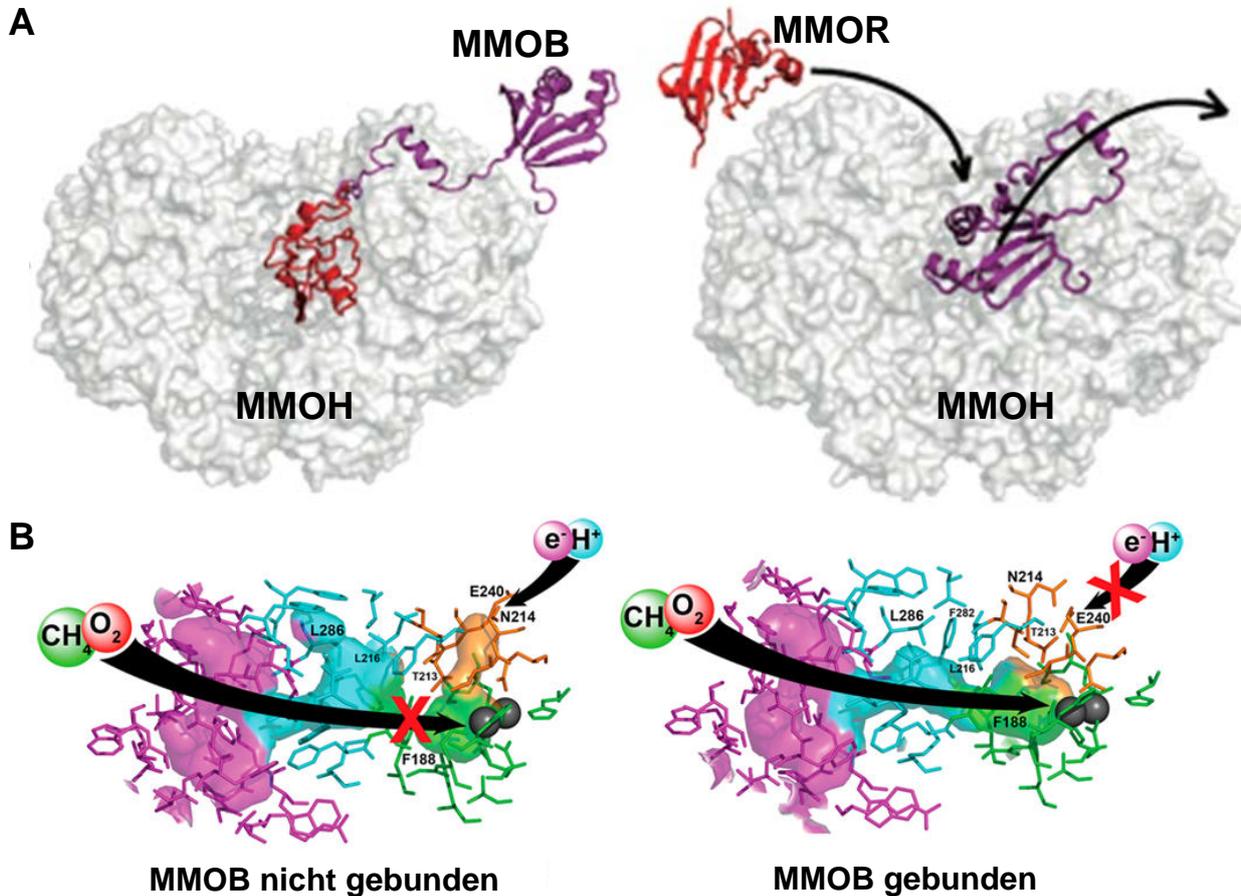


Abbildung 1-8: A-Schematische Darstellung der Bindung von MMOB (violett) und der Ferredoxin-Domäne von MMOR (rot) an die „Canyon“ Region der MMOH (grau) als *Ribbon band* Oberflächenstruktur. Der N-Terminus von MMOB ist auch nach Verdrängung von MMOB noch an die MMOH gebunden. Abbildung aus [Wang *et al.*, 2014]. B-Schematische Darstellung der hydrophoben „Pore“ innerhalb der Hydroxylase ohne MMOB Bindung, kein Substrattransfer aber Elektronen- und Protonentransfer möglich (links) und mit MMOB Bindung Substrattransfer aber kein Elektronen- und Protonentransfer möglich (rechts). Drei hydrophobe Hohlräume (violett, cyan und grün), hydrophile „Pore“ orange; Eisenionen graue Kugeln. Abbildung aus [Wang *et al.*, 2015]

Aufgrund der Einzigartigkeit der enzymatischen Umwandlung von CH₄ zu CH₃OH durch die sMMO und das Interesse am Mechanismus für die Produktion alternativer Treibstoffe oder den biomimetischen Einsatz in der chemischen Industrie, wurde die sMMO Reaktion intensiv untersucht. Der detaillierte Reaktionsmechanismus am Nicht-Häm-Eisen-Zentrum, sowie der biochemische Ablauf und die einzelnen Zwischenstufen der Reaktion wurden weitgehend aufgeklärt (siehe Abbildung 1-9) [Tinberg und Lippard, 2011].

Durch den Elektronentransfer von MMOR auf das aktive Zentrum der MMOH erfolgt die Reduktion der Fe(III)-Ionen zu Fe(II). Anschließend wird O₂ gebunden und es bildet sich das erste Intermediat P*. Es folgt die Reduktion des aktiven Zentrums und gleichzeitige Aktivierung des O₂. Diese Zwischenstufe wird als H_{peroxo} bezeichnet [Tinberg und Lippard, 2010;

Wang *et al.*, 2015]. Anschließend wird mittels vorhandener Protonen die Umwandlung zur Zwischenstufe Q katalysiert. Diese besitzt eine einzigartige *bis-μ-oxo*-Fe(IV) Diamantstruktur und ist aufgrund ihrer hohen Reaktivität notwendig, um die stabile C-H-Bindung im CH₄-Molekül zu brechen [Shu *et al.*, 1997]. Bei der Bildung des Intermediates Q wird O₂ homolytisch gespalten und in die Diamantstruktur eingebaut. Die Umwandlung von CH₄ zu CH₃OH erfolgt ausgehend von Intermediat Q. Dabei wird ein aktiviertes Sauerstoffion aus der Diamantstruktur in das finale CH₃OH-Molekül eingebaut. Das zweite Ion verbleibt im aktiven Zentrum. In weiteren Umwandlungen wird das aktive Zentrum zurück in den oxidierten Zustand versetzt (MMOH_{ox}). Dabei wird das zweite im aktiven Zentrum verbliebene Sauerstoffion mit H⁺-Protonen in ein H₂O-Molekül umgewandelt. Durch Elektronenübertragung der MMOR auf das Nicht-Häm-Eisen-Zentrum kann im Anschluss ein neuer Reaktionszyklus beginnen [Banerjee *et al.*, 2015; Tinberg und Lippard, 2011]. Ohne das Vorhandensein eines zu hydroxylierenden Substrates wird das Intermediat Q über eine Zwischenstufe (Q*) langsam in H₂O₂ umgewandelt und es entsteht H₂O.

Während die Bildung von Q essentiell für die Umwandlung von CH₄ (oder CH₃OH bzw. Ethan) zu sein scheint, kann bereits das Intermediat H_{peroxo} mit anderen Substraten reagieren. Dabei interagiert H_{peroxo} bevorzugt mit elektronenreicheren Substraten die schwächeren C-H Bindungen besitzen. Beispiele dafür sind z.B. Propen oder Diethylether, die über ein zwei-Elektron-Carbokation bzw. einen Carbanion basierten Mechanismus reagieren [Tinberg und Lippard, 2010]. Neben der Reduktion über die von der MMOR gelieferten Elektronen kann MMOH auch mittels H₂O₂ in die H_{peroxo} Zwischenstufe überführt werden. Dabei dient H₂O₂ sowohl als Elektronen-, als auch als Sauerstoff-Lieferant. Dieser sogenannte „Peroxid-Shunt“ wurde sowohl bei der sMMO aus *M. trichosporium* OB3b, als auch bei der sMMO aus *M. capsulatus* Bath beobachtet [Froland *et al.*, 1992; Jiang *et al.*, 1993].

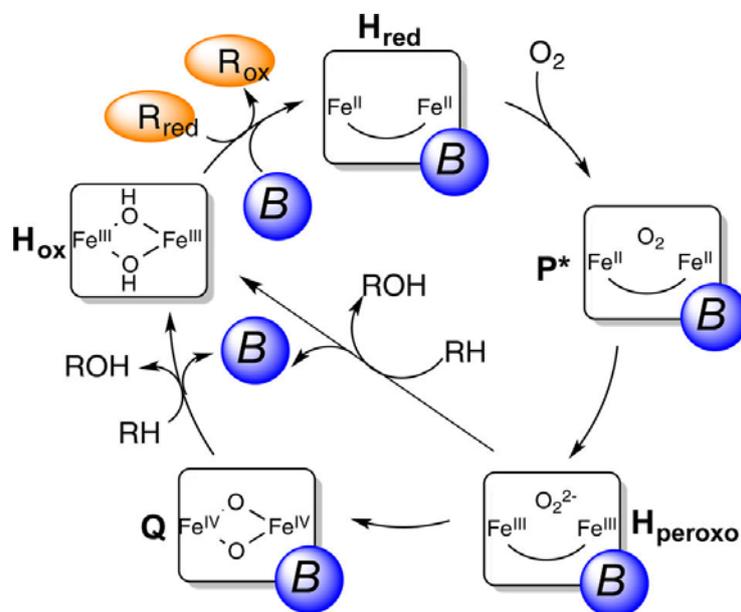


Abbildung 1-9: Darstellung des Katalysemechanismus der sMMO Reaktion. blau-MMOB; orange-MMOR; umrahmt–Nicht-Häm-Eisen-Zentrum der MMOH. Abbildung aus [Wang *et al.*, 2015]

Gassner und Lippard charakterisierten verschiedenen Nebenreaktionen der sMMO aus *M. capsulatus* Bath (natürliche Reaktion mit CH₄ in Abbildung 1-10 A). MMOR mit NADH-Zusatz kann Elektronen auch auf O₂ übertragen und dadurch H₂O₂ bilden (siehe Abbildung 1-10 B) [Gassner und Lippard, 1999]. Die H₂O₂-Bildung wurde auch bei der MMOR aus *M. trichosporium*

rium OB3b beobachtet [Zhang und Lipscomb, 2006]. In Gegenwart von MMOH und MMOB wird diese Oxidase-Aktivität verändert und H₂O gebildet. Die H₂O-Bildung mit MMOB in Abwesenheit von CH₄ (futile cycle I- sinnlos Zyklus I) bzw. ohne MMOB in Gegenwart von CH₄ (futile cycle II- sinnlos Zyklus II) erfolgte ebenfalls unter Verbrauch von NADH (siehe Abbildung 1-10 C). Die H₂O-Bildung stoppte, wenn CH₄ als natürliches Substrat der Reaktion zugeführt wurde. Eine H₂O₂-Bildung der Hydroxylase wurde zudem auch bei *single turnover*-Reaktionen in Abwesenheit von Kohlenwasserstoff-Substraten, ausgehend vom Intermediat Q beobachtet [Valentine *et al.*, 1999]. Die Hydroxylase besitzt die Eigenschaft H₂O₂ in H₂O umzuwandeln. Diese Peroxidase-Aktivität der Hydroxylase wird nach Reduktion durch MMOR unabhängig, von der Gegenwart von MMOB, ausgeübt [Gassner und Lippard, 1999]. Die H₂O₂-Bildung in der sMMO-Reaktion resultiert aus der Entkopplung des Elektronentransfers von der Zielproduktbildung. Sowohl für die sMMO aus *M. capsulatus* Bath, als auch für die sMMO aus *M. trichosporium* OB3b wurde eine solche Entkopplung, inklusive einer Elektronen-Transfereffizienz <1, beschrieben [Gassner und Lippard, 1999; Zhang und Lipscomb, 2006]. Diese Eigenschaft ist charakteristisch für Monoxygenasen und wurde auch bei anderen z. B. der Cytochrom P-450 beschrieben [Dubbels *et al.*, 2007; Kadkhodayan *et al.*, 1995; Schlezinger *et al.*, 2006].

Für die sMMO aus *M. capsulatus* Bath wurde in Aktivitätsmessungen mit CH₄ die höchste Elektronen-Transfereffizienz (ca. 1 mol CH₃OH*1 mol NADH⁻¹) bei einem stöchiometrischen Verhältnis der sMMO von 1 MMOH_{aktive Zentren}:1 MMOB:0,2 MMOR beobachtet. Mit weiterer Erhöhung der MMOR-Konzentration stieg die Rate der Substrat-Hydroxylierung an, jedoch verringerte sich die Elektronen-Effizienz. Eine vergleichbare Verringerung der Elektronen-Effizienz bei Erhöhung der MMOR-Konzentration wurde nicht beobachtet, wenn statt CH₄ Propan als Substrat der sMMO verwendet wurde. Dieses Verhalten wird mit den unterschiedlichen Reaktionsmechanismen der Substrate mit dem Nicht-Häm-Dieisen-Zentrum begründet. Propan kann mit der H_{peroxo}-Zwischenstufe reagieren, wohingegen für die Reaktion mit CH₄ die Bildung des Intermediates Q zwingend nötig ist (siehe Abbildung 1-9) [Gassner und Lippard, 1999].

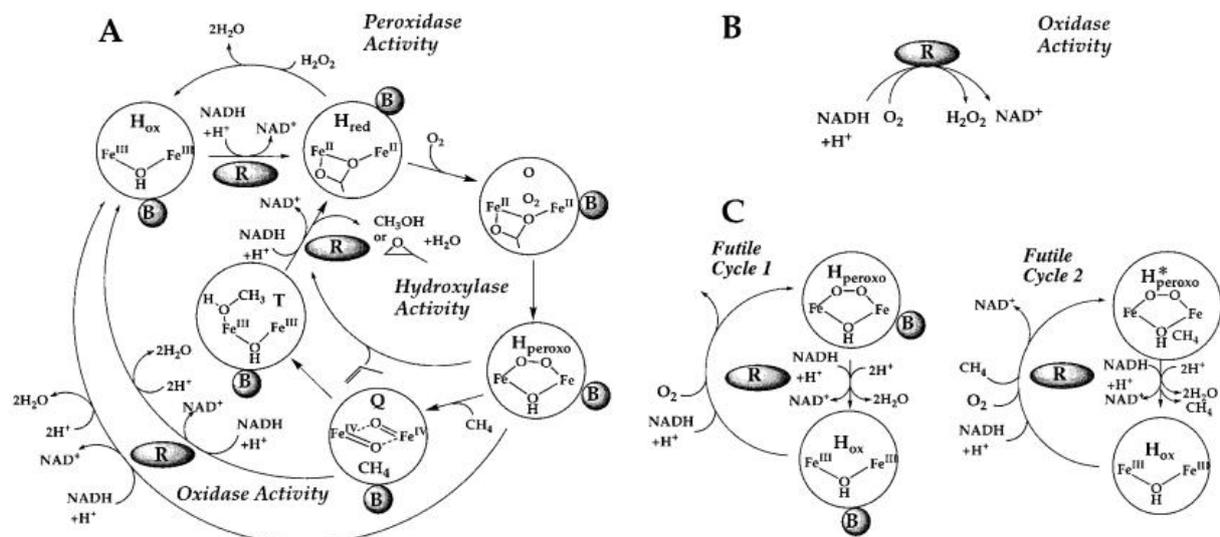


Abbildung 1-10: Schematische Darstellung der potentiellen Reaktionszyklen der sMMO; A-Reaktion der MMOH als Peroxidase und Hydroxylase; B-Reaktionen der MMOR alleine mit NADH und O₂; C-Reaktionen der MMOH und MMOR ± MMOB ohne Substratumsatz. Abbildung aus [Gassner und Lippard, 1999]

1.1.3 Cofaktor-Regeneration mittels Glucose 1-Dehydrogenase

Für die Anwendung von biokatalytischen Verfahren im industriellen Maßstab ist eine Cofaktor-Regeneration essentiell. Die Produktionskosten können durch die Regeneration des Cofaktors reduziert werden. Bei Einsatz von NAD^+ statt NADH ist eine Reduktion der Cofaktorkosten um Faktor 2,5 möglich (Sigma-Aldrich 1 g NADH = 184 €, NAD^+ = 70 €, Produktanfrage Mai 2017). Die Cofaktor-Regeneration ist auch für die Verlängerung der Reaktionszeit wichtig, um eine möglichst hohe Produktausbeute bzw. Konzentration zu erreichen. Übliche Cofaktoren die innerhalb der Reaktion regeneriert werden sind NAD^+/NADH , $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, ATP, Zuckernukleotide, Coenzym A oder S-Adenosyl Methionin. Die Regeneration des von der sMMO verbrauchten NADH kann über verschiedene Enzymreaktionen erfolgen. Dazu zählen die Reaktion der Glutamat-Dehydrogenase mit Glutamat, die Formiat-Dehydrogenase mit HCOOH und die Reaktion der Glucose-Dehydrogenase mit Glucose [Zhao und van der Donk, 2003]. Die Reaktion der Glucose 1-Dehydrogenase (EC. 1.1.1.47) ist in Abbildung 1-11 dargestellt.

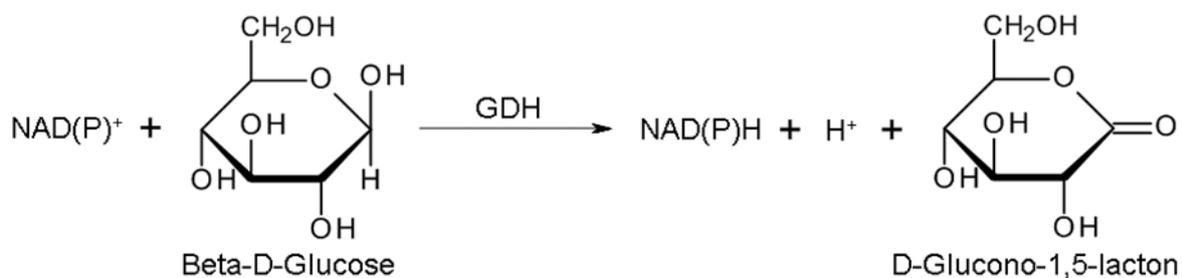


Abbildung 1-11: Darstellung der Reaktion der Glucose 1-Dehydrogenase (GDH, EC.1.1.1.47) zur NAD(P)H Regeneration.

Das Enzym kann sowohl NAD^+ , als auch NADP^+ akzeptieren. Es wurde erstmals von Hu und Cline in *Pseudomonas sp.* beschrieben [Hu und Cline, 1964]. Ein Vorteil der GDH ist deren kommerzielle Verfügbarkeit. Laut Hersteller sind die optimalen Messbedingungen $37\text{ }^\circ\text{C}$ und $\text{pH } 8,0$ [Sigma-Aldrich, 2017].

Für verschiedene Anwendungen in biotechnologischen Prozessen wurden GDH's eingesetzt. Einige Beispiele sind in Tabelle 1-3 aufgelistet.

Tabelle 1-3: Beispiele für NADH -Cofaktor-Regeneration mittels GDH bei verschiedenen Anwendungen

Ursprungsorganismus der Glucose-1-Dehydrogenase	Produkt	Referenz
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SB5	3-Hexanol	[Pongtharangkul <i>et al.</i> , 2015]
<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>	2-Keto-L-gulonsäure	[Twala <i>et al.</i> , 2012]
<i>Pseudomonas species</i>	2-Octanol	[Eckstein <i>et al.</i> , 2004]
<i>Bacillus subtilis</i>	L-Carnitine	[Vandecasteele, 1980]
<i>Bacillus cereus</i>	(R)-2,2,2-trifluoro-1-phenylethanol; Ethyl (R)-4-chloro-3-hydroxybutanoate	[Wong <i>et al.</i> , 1985]

1.1.4 Immobilisierung von Enzymen

Im industriellen Maßstab wird die Immobilisierung von Biokatalysatoren standardmäßig eingesetzt. Beispiele sind die Glucose-Isomerase zur Umwandlung von Glucose in Fruktose, die Penicillin G-Acylase zur Antibiotikaherstellung, die Aspartase zur Bildung von L-Aspartat und verschiedenen Lipasen zur enzymatischen Interesterifikation von Nahrungsölen oder Fetten [DiCosimo *et al.*, 2013]. Auch bei der Aufarbeitung von Abwasser und der Herstellung von Biochips kommen immobilisierte Enzyme oder Zellen zum Einsatz [Es *et al.*, 2015; Rusmini *et al.*, 2007].

Enzyme werden als immobilisiert bezeichnet, wenn sie durch chemische oder physikalische Methoden räumlich fixiert werden. Dies kann durch Adsorption, direkte Verknüpfung oder einen Einschluss in eine Matrix erfolgen. Die Nutzung von immobilisierten Enzymen hat verschiedene Vorteile. Dazu zählen die bessere Handhabung bzw. Separation der Katalysatoren vom Reaktionsansatz, eine in vielen Fällen erhöhte Stabilität des Enzyms, sowie die Reduktion der Proteinverunreinigung des Zielproduktes. Zudem ist die Wiederverwendbarkeit des Biokatalysators gegeben und dadurch können die Prozesskosten sinken [Sheldon, 2007]. Die verschiedenen Arten der Immobilisierung von Enzymen sind in Abbildung 1-12 dargestellt.

Nachteile der Immobilisierung sind die mitunter hohen Kosten für die Trägermaterialien bzw. deren Instabilität, die Reduktion des Zugangs von Substrat zum Enzym (Diffusionslimitierungen), mögliche strukturelle Veränderungen des Enzyms, sowie Aktivitätsverluste durch die Immobilisierung [Es *et al.*, 2015]. Abbildung 1-13 zeigt exemplarisch die spezifische und unspezifische (ungerichtete) Bindung eines Enzyms an Trägermaterial. Bei der unspezifischen/ungerichteten Immobilisierung ist eine Blockierung des aktiven Zentrums durch die Bindung an den Träger möglich. Dies hat eine teilweise Verringerung der Aktivität zur Folge. Bei der spezifischen/gerichteten Immobilisierung, z. B. über einen Peptid-*tag* am Protein, kann aufgrund der Kontrolle der Bindung zum Trägermaterial diese Reduktion der Enzymaktivität vermieden werden. Um dies zu gewährleisten ist eine rekombinante Produktion des Zielenzyms, mit der Möglichkeit die Aminosäuresequenz des Enzyms zu verändern, nötig. Dadurch kann zudem eine mehrfache Bindung des Enzyms an das Trägermaterial (*multi-point attachment*) erfolgen und die Stabilität der Immobilisierung gesteigert werden [Fernandez-Lafuente, 2009; Homaei *et al.*, 2013; Mateo *et al.*, 2002]. Für die Penicillin-G-Acylase konnte bei der Verknüpfung an Trägermaterial über *multipoint attachments* ein Erhalt der vollständigen Restaktivität von bis zu acht Stunden erreicht werden [Mateo *et al.*, 2002].

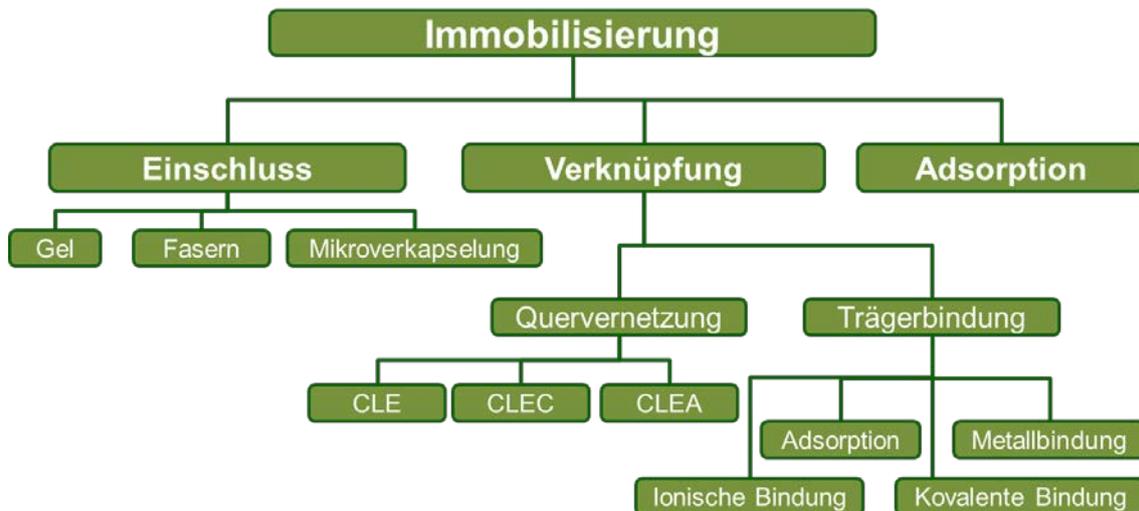


Abbildung 1-12: Übersicht verschiedener Immobilisierungsmethoden. CLE-Cross-Linked Enzymes; CLEC-Cross-Linked Enzyme Crystals; CLEA-Cross-Linked Enzyme Aggregates. Abbildung adaptiert nach [Cantone et al., 2013]

Um einen möglichen Einsatz immobilisierter Enzyme zu prüfen, muss neben den Gesamtkosten und den technischen Rahmenbedingungen der Vergleich des löslichen Enzyms und der chemischen Katalyse betrachtet werden. Dabei werden vor allem die erreichbaren Produktkonzentrationen, Ausbeuten und potentiellen Nebenprodukte bewertet. Während für einige Prozesse die Vorteile für den Einsatz von immobilisierten Biokatalysatoren gegeben sind, ist für andere Anwendungen die chemische Katalyse zu präferieren. Um eine geeignete Immobilisierungstechnik für den entsprechenden Prozess bzw. Biokatalysator zu finden, sind umfangreiche Recherchen, Vorbetrachtungen und experimentelle Untersuchungen nötig. Das folgende Zitat beschreibt diesen Prozess treffend: „But while enzyme immobilisation is slowly turning into a well understood science part of it still remains an art“ [Hanefeld et al., 2009].

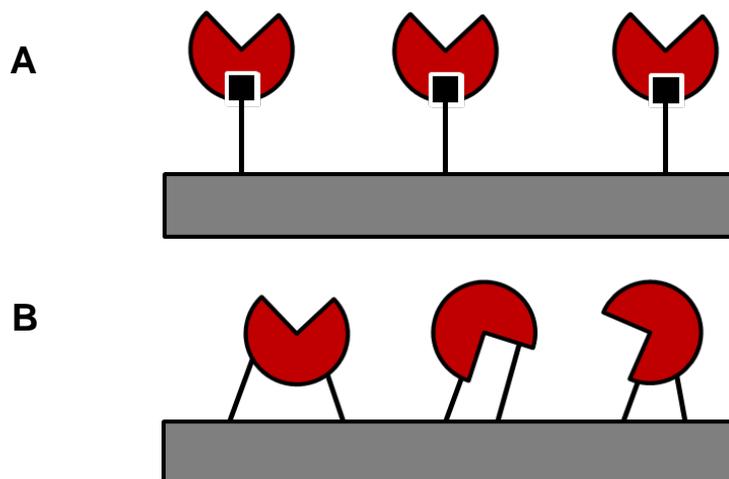


Abbildung 1-13: Schematische Darstellung der gerichteten (A) und ungerichteten (B) Immobilisierung von Enzymen. rot-Enzym mit aktivem Zentrum; grau-Trägermaterial, schwarze Linie-Verknüpfung des Trägers mit Enzym; schwarzes Viereck in A-spezifischer Kopplungspunkt

1.2 Motivation und Zielsetzung

Das Potential für die Nutzung von CH_4 als zukünftige Energie- und Stoffquelle ist enorm. Die Vorkommen von CH_4 in Form von Methanhydrat oder Schiefergas werden auf eine Gesamtmenge von 10.000 Gt (Gigatonnen, 1 Gt = 1,5 Billionen $\text{m}^3 \text{CH}_4$) geschätzt. Dabei variieren die Schätzungen zwischen 500 und 24.000 Gt [Kvenvolden, 2002]. Dieser Wert entspricht dem 100 bis 500-fachen der durch Kohle, Erdöl und Erdgas freigesetzten Menge an Kohlenstoff pro Jahr. Auch wenn aufgrund der Unzugänglichkeit einiger Methanhydrat-Lagerstätten am Meeresboden nur ein Teil des CH_4 wirtschaftlich nutzbar ist, könnte bei steigenden Rohstoffpreisen eine Nutzung als Energieträger möglich werden [Lehmköster, 2014]. Neben der direkten Nutzung von CH_4 als Brennstoff, hat eine Umwandlung in flüssige Chemikalien z.B. CH_3OH , verschiedene Vorteile. So könnte bei dem Einsatz flüssiger Treibstoffe auf bestehende Grundlagen zur Nutzung zurückgegriffen werden. Zudem wäre der Transport von flüssigen Chemikalien einfacher und preiswerter als der von gasförmigen.

Die chemische Umwandlung von CH_4 zu CH_3OH erfordert hohe Temperaturen (250 bis 900 °C) und Drücke (bis 110 bar), sowie mehrere Schritte [Dalton, 2005]. Dabei ist die chemische Direktoxidation wenig selektiv. Über Zwischenreaktionen wird aus CH_4 industriell Synthesegas ($\text{CO} + \text{H}_2$) erzeugt, welches anschließend zur CH_3OH -Synthese eingesetzt wird. Dieser Prozess ist ebenfalls sehr energieaufwändig. Eine biologische Umwandlung kann bei Umgebungsbedingungen durch Enzyme, wie z.B. die Methan-Monooxygenasen (MMO), erfolgen. Methan-Monooxygenasen werden von methanotrophen Bakterien gebildet, die CH_4 als alleinige C- und Energiequelle nutzen. Die lösliche MMO (sMMO) wird von einigen Methanotrophen, z.B. *Methylosinus trichosporium* OB3b (*M. trichosporium* OB3b), gebildet und kann neben CH_4 eine Vielzahl weiterer Substrate umsetzen (z.B. Alkane bis C 8, ungesättigte, verzweigte, zyklische, aromatische, halogenierte Kohlenwasserstoffe) [Borodina *et al.*, 2007]. Neben dem möglichen Potential bei der Gas-zu-flüssig Umwandlung, kann das Enzym bzw. *M. trichosporium* OB3b auch zur Sanierung von Trichlorethylen kontaminierten Böden eingesetzt werden [Tsien *et al.*, 1989]. Weitere Anwendungsbereiche der sMMO bzw. der methanotrophen Bakterien sind die Produktion von *single cell protein* (scp), die Bildung verschiedener Wertstoffchemikalien wie Propylenoxid oder Ectoin, sowie die Produktion von Biopolymeren z.B. PHB [Strong *et al.*, 2015].

Ogleich die methanotrophen Bakterien, sowie die sMMO (speziell *Methylosinus trichosporium* OB3b und *Methylococcus capsulatus* Bath) innerhalb der letzten 20 Jahre intensiv untersucht wurden, sind vergleichsweise wenige Studien zur Langzeitstabilität bzw. Umsatzsteigerung der sMMO veröffentlicht. Potentielle Nebenreaktionen und die Entkopplung des Elektronentransfers von der Zielproduktbildung, die für andere Monooxygenasen (z.B. Cytochrom P-450), bereits untersucht wurden, sind für die sMMO nur im Ansatz analysiert worden. Für einen industriellen Einsatz sind diese Untersuchungen von großer Bedeutung, da die Parameter die Produktivität des Enzyms und des Prozesses maßgeblich beeinflussen. Unter den aktuellen Reaktionsbedingungen mag eine technische Nutzung der Methanotrophen bzw. der sMMO z.B. zur Umwandlung von CH_4 zu CH_3OH noch wirtschaftlich unrentabel sein. Wenn jedoch verschiedene Parameter, wie die großtechnische Produktion von Biomasse bzw. des Enzym, die Reaktionsrate, die Produktivität, die Kosten für die Aufarbeitung, die Vermeidung der Nebenproduktbildung oder die Regeneration des Cofaktors verbessert bzw. ermöglicht werden, wären methanotrophe Bakterien und Methan-Monooxygenasen eine vielversprechende Option für verschiedene biotechnologische Anwendungen [Lawton und Rosenzweig, 2016].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die isolierte lösliche Methan-Monooxygenase aus *Methylosinus trichosporium* OB3b in *in vitro*-Reaktionen zur CH₃OH-Produktion einzusetzen. Dafür war es nötig eine ausreichende Menge an sMMO-haltiger Biomasse bereitzustellen. Die Verwendung von CH₄ als gasförmige C-Quelle in Fermentationen sollte aufgrund der technischen Anforderungen, wie z.B. Explosionsschutz, vermieden werden. Deshalb wurde auf Basis von Literaturdaten ([Yu *et al.*, 2009a; Yu *et al.*, 2009b]) eine Kultivierungsstrategie mit CH₃OH als C-Quelle entwickelt. Ziel der Kultivierungsversuche war die Maßstabsvergrößerung der Bildung sMMO-aktiver Biomasse vom 500 mL-Schüttelkolben- in den 100 L-Technikumsmaßstab. Ausgehend von der mit CH₃OH als C-Quelle gebildeten Biomasse und in Anlehnung an bereits existierende Protokolle für CH₄-gewachsene Biomasse [Fox *et al.*, 1989], sollte die Aufarbeitung der einzelnen sMMO-Komponenten durchgeführt werden. Für den Einsatz der sMMO in *in vitro*-Reaktionen zur CH₃OH-Bildung sollte eine biochemische Charakterisierung des Enzyms bezüglich des pH-Optimums, des Temperaturoptimums, der Temperaturstabilität, sowie des Einflusses der Ionenstärke erfolgen. Die sMMO-Aktivität und Stabilität bezüglich der CH₃OH-Bildung bei Langzeitmessungen (> 30 Minuten) wurde bisher nicht untersucht und sollte deshalb im Rahmen dieser Arbeit bearbeitet und gegebenenfalls verbessert werden. Als möglichen Faktor für die Erhöhung der Reaktionszeit sollte die Regeneration des Cofaktors NADH bei der sMMO-Reaktion untersucht werden. Neben der möglichen Verlängerung der Reaktionszeit würden durch den Einsatz eines geeigneten NADH-Regenerationssystems die Kosten des Prozesses reduziert. Auf Basis der biochemischen sMMO-Charakterisierung und den Untersuchungen zum Reaktionsverhalten des Enzyms bzw. des geeigneten Cofaktor-Regenerationssystems sollten Untersuchungen zum Einsatz der sMMO zur CH₃OH-Bildung im Reaktormaßstab erfolgen. Diese Analysen sollten in Kooperation mit dem Fraunhofer-Institut für Grenzflächen-und Bioverfahrenstechnik (IGB) in Stuttgart und deren eigens entwickelter massenspektrometrischer Messapparatur durchgeführt werden. Immobilisierungsversuche der sMMO an verschiedene Trägermaterialien und der Einsatz der entsprechenden Präparate zur CH₃OH-Bildung sollten Aufschluss über die Anwendbarkeit der immobilisierten sMMO liefern.

Durch diese Arbeit sollten Erkenntnisse zum technischen Einsatz der sMMO zur *in vitro*-CH₃OH-Bildung und deren Reaktionsverhalten gewonnen werden. Diese Ergebnisse könnten eine zukünftige technische Anwendung der sMMO ermöglichen bzw. begünstigen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Sämtliche verwendete Chemikalien sind in der Tabelle 2-1 zusammengefasst.

Tabelle 2-1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Enzyme

Bezeichnung	Lieferant	Best. Nr.	Reinheit
1-Naphthol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.06223.0050	k. A.
2-Mercaptoethanol	Serva electrophoresis, Heidelberg, Deutschland	28625.02	k. A.
Acrylamid/ Bisacrylamid (30 % Lösung)	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland	A3574	k. A.
Albumin aus Rinder Serum (BSA)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.12018.0025	≥ 98 %
Ammoniumperoxydisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	9592.3	≥ 98 %
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	3746.4	≥ 99 %
Antifoam SE-15	Sigma-Aldrich, Inc., Saint Louis, USA	A 8582	k.A.
Benzonase	Merck, Darmstadt, Deutschland	70746-3	> 90 %
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	P010.1	≥ 99 %
Bromphenolblau (Na-Salz)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	A512.1	k. A.
Calciumchloriddihydrat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	5239.1	≥ 99 %
Coomassie-Brillantblau G250	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	9598.2	k. A.
2,6-Dichlorphenolindophenol (DCPIP)	Fluka Analytical	36180-56-F	≥ 97,0 %
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	P7493	≥ 99 %
Di-Natriumhydrogenphosphatdihydrat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	4984.3	≥ 99 %
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe	6908.3	≥99 %
Dithioerythritol (DTE)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	8814.1	99 %
Echtblausalz	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	D9805-10G	≈ 95 %
EDTA (Dinatrium-Salz)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	8043.1	≥ 99 %
Eisen(II)-Sulfat-Heptahydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.03965.0500	≥ 99 %

Bezeichnung	Lieferant	Best. Nr.	Reinheit
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	3738.5	≥ 99 %
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	K928.2	≥ 99 %
Glucose Dehydrogenase (GDH) aus <i>Pseudomonas sp.</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	19359	≥ 200 U*mg ⁻¹
D(+)-Glucose Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe	6887.5	≥99,5 %,
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	3783.2	≥ 99 %
Glycin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	T873.2	≥ 99 %
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	P749.3	≥ 99 %
Kaliumformiat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	294454-500G	≥ 99 %
Kaliumiodid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	207969-100G	99 %
Katalase (aus Rinderleber)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	C9322	2.000-5.000 U*mg ⁻¹
Kobalt(II)-Chlorid-Hexahydrat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	T889.1	≥ 99 %
Magnesiumsulfat-heptahydrat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	P027.2	≥ 99 %
Mangansulfat-Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	4487.1	98 %
Methan N35	Air Liquide Alphagaz, Düsseldorf, Deutschland	200-812-7	≥ 99 %
Methanol (HPLC grade)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	7342.1	≥ 99 %
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	6066.4	≥99,5 %
3-(N-Morpholino) propan-sulfonsäure (MOPS)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	6979.4	≥ 99 %
NADH + H ⁺ (Dienatrium-Salz)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	AE12.1	≥ 98 %
Naphthalin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	184500-5G	≥ 99 %
Natriumacetat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	6773.3	≥ 99 %
Natriumazid	K305.1	11253405	≥ 99 %
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	3957.1	≥ 99 %
Natriumdodecylsulfat (SDS, Rotistock 20%)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	1057.1	k. A.
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.06329.0500	≥ 99 %
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	6771.1	≥ 99 %
Natriummolybdat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.06521.0100	≥ 99 %
Nickel(II)-Sulfat-Hexahydrat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	T111.1	≥ 99 %

Bezeichnung	Lieferant	Best. Nr.	Reinheit
Nitrobenzol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	252379-25ML	≥ 99 %
ortho-Phosphorsäure (85 %)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	6366.2	k. A.
Page Ruler™ Pres-stained Protein Ladder	Thermo Scientific, Massachusetts, USA	26616	k. A.
Pierce™ Unstained Protein MW Marker	Thermo Scientific, Massachusetts, USA	26610	k. A.
Q-Sepharose Fast Flow	GE Healthcare Europe, Freiburg, Deutschland	17051001	k. A.
Salzsäure (37 %)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	4625.2	k. A.
StreamLine Chelating	GE Healthcare Europe, Freiburg, Deutschland	17128001	k. A.
Superdex G-200 pg (als vorgepackte Säule geordert, 16/600 bzw. 26/600 mm)	GE Healthcare Europe, Freiburg, Deutschland	28989335 (16/600) 28989336 (26/600)	
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	2367.3	k. A.
Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin Hydrochlorid (TCEP)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	HN95.2	98 %
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	4855.2	99,9 %
Zinksulfat-Heptahydrat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	K301.1	≥ 99 %

Eine Übersicht über die für die Messungen der sMMO-Aktivität verwendeten Puffer ist in Tabelle 2-2 zusammengefasst.

Tabelle 2-2: Übersicht über die zur sMMO-Aktivitätsmessung verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung

Puffername	Abkürzung
MOPS-Puffer	25 mM 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
Tris MES Natriumacetat (TMA-Puffer bzw. Dreikomponentenpuffer)	50 mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan 25 mM 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure 25 mM Natriumacetat
Phosphatpuffer	25 mM NaH ₂ PO ₄

2.2 Geräte

Sämtliche verwendeten Geräte sind in Tabelle 2-3 zusammengefasst.

Tabelle 2-3: Übersicht über die verwendeten Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Autoklav	Varioklav Dampfsterilisator	H&P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland
Bioreaktor	Proreact 4P (10 L Bioreaktor)	Heinrich Frings GmbH & Co. KG (Standort Fraunhofer CPB Leuna)
	Proreact 15P (100 L Bioreaktor)	Heinrich Frings GmbH & Co. KG (Standort Fraunhofer CPB Leuna)
Bio Imaging System	Gene Genius	Syngene, Cambridge, UK
CD-Spektrometer	J-810	Jasco Analytical Instruments, Easton, USA
Chromatographieanlage	Äkta prime	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Chromatographiesäulen	XK 16/20, XK26/20, HiLoad 16/600 und 26/600 Superdex 200 pg (vorgepackte SEC Säule)	GE Healthcare, Biosciences, Uppsala, Schweden
Chromatographiesäule (für Gaschromatographie)	CP-PoraBOND U fused silica PLOT (25 m x 0,32 mm, df = 7 µm)	Varian, Inc., Palo alto, California
Dialyseschlauch	Spectra/Por® 7 Dialysis Membrane, Pre-heated RC tubing, 20 kDa	Spectrum Labs, Breda, Niederlande
Dispergiergerät	ULTRA-TURRAX®, T 18 D	IKA, Staufen, Deutschland
Spektrometer	Fluostar Galaxy	BMG Labtech, Offenburg, Deutschland
GC-Anlage	7890A GC System	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA
Hochdruckhomogenisator	Emulsiflex C5	Avestin Inc., Ottawa, Kanada
	Labratory Modell 2000	SPX Corporation, Charlotte, North Carolina (USA)
Externe Pumpe für MS-Analyse am IGB	Knauer P401 mit Drucksensor	Knauer GmbH, Berlin, Deutschland
Externe Pumpe für Probenauftrag bei Reinigungschromatographien	Ms regio	Ismatec SA (Wertheim, Switzerland)
Inkubator	KP196	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Küvetten	UV-Küvetten Mikro, Eimal-Küvetten Halbmikro Quarzküvette, 105.202-QS	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland Hellma Analytics, Mühlheim, Deutschland
Kyrostat	HAAKE Phoenix II	ProSense, Konstanz, Schweiz
Magnetrührer	Variomag Mono Magnetrührer Komet	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Methanol-Sonde	Alcosens	Heinrich Frings GmbH & Co. KG
pH-Meter	Five Easy	Mettler Toledo, Columbus, Schweiz
	inoLab pH Level 2	Wissenschaftlich-technische Werkstätten, Weilheim, Deutschland

Gerät	Typ	Hersteller
Photometer	Helios Zeta	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
	Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Reinstwasseranlage	TKA GenPure	TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH, Niederelbert, Germany
Roller-Mixer	SRT1	Bibby Scientific Ltd, Staffordshire, UK
Röhrenzentrifuge	Cepa 61 G	Carl Padberg GmbH, Lahr Schwarzwals, Deutschland
Schüttelinkubator	Innova 4230	New Brunswick Scientific, New Jersey, USA
	Multitron	Infors HT, Bottmingen, Schweiz
SDS-PAGE-Anlage und Zubehör	Hoefer™ Gel Casters for Mini Vertical Electrophoresis Systems, SE260 & SE250 Small Format Vertical Electrophoresis System	Hoefer, Inc., Holliston, USA
Sterilbank	LabGard ES Class II, Type A2 Biological Safety Cabinet	NuAire Group, Caerphilly, UK
Thermoblock mit Aufsätzen für 1,5 mL- und 2,0 mL-Reaktionsgefäße	Thermostat plus	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Ultraschallbad	Sonorex Super 10 P	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortexer	RS-VA10	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Vibrofix VF1	Janke & Kunkel IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland	Phoenix Instrument, Garbsen, Deutschland
Waage Wipptisch	440-35N	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
	APX-100	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
	Rocky 1000	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge	Avanti J-30i, Rotor JA-10, Rotor JA 30.50	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
	Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Mikro 220R, Rotor 2218-A, Rotor 1016	Hettich Lab Technology, Tuttlingen, Deutschland

Zusätzliche Materialien	Typ	Hersteller
Amicon Ultra centrifugal filter units 10; 30 und 50 kDa Molecular weight cut off (MWCO)	10 kDa (Z706345) 30 kDa (Z717185-8EA) 50 kDa(Z648000-8EA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Butyl-Hohlstopfen und Aluminiumkappen	für Rollrand- <i>headspace</i> -Fläschchen ND20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dialyseschlauch	Spectra/Por®, MWCO: 15kDa	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Filter	Express™ Plus, 0,22 µm	Spectrum® Laboratories, Inc., Los Angeles, USA
Hellma-Präzisionsküvette	105.202-QS	Merck Millipore, Billerica, USA
Mikrotiterplatte	Brandplates® REF781602	Hellma Analytics, Müllheim, Deutschland
pH-Teststreifen	90417 (pH 6,0-8,1) 90415 (pH 3,8-5,5) 90420 (8,0-9,7)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pipetten	1-10 µL 2-20 µL 10-100 µL 100-1.000 µL 500-5.000 µL	Pehanon® Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Pipetten Multi 8x	100 µL Research Plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pressure-Lok® (gasdichte Spritze)	Series A-2 Syringe, 250 µL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Rotilabo® Spritzenfilter Ca	0,2 µm, ø25 mm	Vici Precision Sampling, Inc., Louisiana, USA
Rotilabo® Spritzenfilter <i>Mini-Tip</i>	0,2 µm, ø15 mm, Nylon-Membran	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Spritzen mit und ohne Lock	20 ml	B. Braun Metsungen AG, Deutschland
Spritzenfilter Rotilabo®	0,2 µm, CA, steril	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
UV-Präzisionsküvette (CD-Spektroskopie)	Quarzglas, 282-QS	Hellma Analytics, Müllheim, Deutschland
Vivaspin 20 ml	MWCO: 10 kDa	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Vivaspin 500 µl	MWCO: 10 kDa	GE Healthcare, Uppsala, Schweden

2.3 Methoden

2.3.1 Kultivierung von *Methylosinus trichosporium* OB3b

Eine Übersicht der Zusammensetzung der verwendeten Medien ist in Tabelle 2-4 aufgelistet. Für deren Herstellung wurde Reinstwasser (TKA GenPure) verwendet. Der pH-Wert aller Vorratslösungen, mit Ausnahme der Spurenelemente-, der $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; der $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ und der NaHCO_3 -Lösungen, wurde mit 0,2 M H_2SO_4 auf 6,88 eingestellt. Alle Lösungen wurden mittels Autoklav bei 121 °C und 1 bar Überdrucks für 20 Minuten sterilisiert. Ausnahmen waren Lösungen von $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ und NaHCO_3 , die unter der Sterilwerkbank steril filtriert wurden. Die Zusammenstellung des Mediums erfolgte jeweils direkt vor der Kultivierung, aus bei 4 °C gelagerten sterilen Vorratslösungen. Diese waren für das modifizierte NMS-Medium: Spurenelementelösung 500-fach konzentriert, Hydrogencarbonatlösung 100-fach konzentriert, Magnesiumsulfatlösung 100-fach konzentriert, Eisen(II)sulfatlösung 100-fach konzentriert und Natriumnitrat-(oder Ammoniumsulfat beim Choi-Medium) mit Phosphat- sowie Calciumlösung 2-fach konzentriert. Das Auffüllen auf das definierte Finalvolumen erfolgte mit sterilisiertem ddH_2O .

Tabelle 2-4: Medienzusammensetzung zur Kultivierung von *Methylosinus trichosporium* OB3b

Komponente	NCIMB Reaktivierungsmedium	NMS [Best und Higgins, 1981; Cornish <i>et al.</i> , 1984]	Choi-Medium [Bourque <i>et al.</i> , 1995; Yu <i>et al.</i> , 2009a]	Modifiziertes NMS
NaNO_3 [mM]	-	10,0	-	10,0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [mM]	-	-	7,57	-
KNO_3 [mM]	10	-	-	-
KH_2PO_4 [mM]	1,5	3,9	9,6	9,6
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ [mM]	2,0	6,0	15	15
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ [mM]	4,4	0,15	1,83	1,65
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ [μM]	1,8	50	22,5	50
NaHCO_3 [mM]	-	-	-	6,0
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ [μM]	1,8	40,3	4,7	50
Fe-EDTA [μM]	10,4	-	-	-
Spurenelemente-Lösung				
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ [μM]	1,4	2,0	1,0	2,0
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ [μM]	-	0,98	0,49	0,98
H_3BO_3 [μM]	0,24	2,0	1,0	2,0
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ [μM]	1,1	0,4	0,2	0,4
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ [μM]	0,21	0,4	0,2	0,4
KI [μM]	-	1,0	0,5	1,0
EDTA [μM]	0,67	-	-	-
$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ [μM]	0,1	-	-	-
$\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ [μM]	0,04	-	-	-
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ [μM]	0,8	-	-	-

2.3.1.1 Kultivierung von *Methylosinus trichosporium* OB3b mit CH₄ als C-Quelle

Die Reaktivierung des Organismus erfolgte mittels des in Tabelle 2-4 beschriebenen NCIMB-Reaktivierungsmedium. Die Organismen (Bakterienstammnummer 11131) wurden als Lebendagarproben von der NCIMB geliefert. Nach Öffnen der Gefäße, die bei – 20 °C gelagert wurden, erfolgte die Zugabe von 0,5 mL Medium. Nach Transfer des Mediums in fünf verschiedene 25 mL Rollrandgefäße, in denen 5 mL Medium vorgelegt wurde, erfolgte der Verschluss der Gläser. 10 mL Gasatmosphäre wurden mittels Injektionsspritzen und Drei-Wege-Hahn entnommen und durch sterile Zugabe von 10 mL CH₄ (99,995%) ersetzt. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 30 °C und 110 rpm im Infors Schüttler. Das Wachstum wurde über die optische Dichte bei 600 nm verfolgt. Nach zweifacher Subkultivierung (identisch zur beschriebenen Vorgehensweise) erfolgte die Subkultivierung auf dem NMS-Medium nach Best /Cornish [Best und Higgins, 1981; Cornish *et al.*, 1984].

Zur Kultivierung wurden 100 bzw. 200 mL Headspace-Vials mit einem Flüssigvolumen von 10 bzw. 20 mL eingesetzt. Als Start OD₆₀₀ wurde für alle weiteren Kulturen, wenn nicht anders angegeben, 0,1 eingestellt. Hierfür wurde eine bestimmte Menge an Vorkultur entnommen und 20 Minuten bei 4 °C und 3.800 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit frischem NMS-Medium (gleiches Volumen wie zuvor entnommen) gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 500 bis 1.000 µL NMS-Medium aufgenommen und die neue(n) Kultur(en) damit angeimpft. Die Glasvials wurden mit Butylstopfen und Aluminiumkappen verschlossen. Über Injektionsspritzen wurden 20 % der Atmosphäre entnommen und durch CH₄ ersetzt. Anschließend wurden die Kulturen bei 30 °C und 150 rpm (Innova 4230 Schüttler) inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten erfolgte die Entnahme von Zellsuspension über Injektionsnadeln und die Analyse der optischen Dichte bei 600 nm. Zusätzlich erfolgte die Analyse der sMMO-Aktivität über den Ganzzell-Naphthalin-Assay, die Bestimmung des CH₄-Gehaltes und die SDS-PAGE-Analyse. Die Kultivierungen mit 0,8 µM Cu(II) und verschiedenen ATU Konzentrationen erfolgten analog im NMS-Medium nach Best bzw. Cornish [Best und Higgins, 1981; Cornish *et al.*, 1984].

2.3.1.1.1 Herstellung von 1/OD₆₀₀-Proben

Die Herstellung von 1/OD Proben zur SDS-PAGE-Analyse erfolgte über Zentrifugation (4 °C; zehn Minuten; 25.000 g) einer Menge an Zellsuspension, die bei einer optischen Dichte von 1,0 einem Volumen von einem mL entsprach (OD₆₀₀ = 0,5 → 2,0 mL; OD₆₀₀ 0,2 → 5 mL). Nach Entnahme des Überstandes wurde das Pellet in 100 µL SDS-PAGE-Probenpuffer resuspendiert und für fünf Minuten bei 95 °C inkubiert. Pro Bahn in einem Polyacrylamid-Gel wurden 10 µL der entsprechenden Probe aufgetragen.

2.3.1.1.2 Bestimmung der OD₆₀₀-BTM-Korrelation

Die Bestimmung der OD₆₀₀-BTM Korrelation erfolgte mit einer aufkonzentrierten *M. trichosporium* OB3b-Zellsuspension (Wachstum 48 Stunden bei 30 °C, 150 rpm in NMS-Medium nach Best bzw. Cornish bis OD₆₀₀ = 1,0, dann Vereinigung von 3x 20 mL und Zentrifugation bei 4°C, 3.800 g für 30 Minuten). Nach dem Resuspendieren in 10 mL frischem NMS-Medium wurden verschiedene Verdünnungsstufen mit NMS-Medium hergestellt und die OD₆₀₀ bestimmt. Anschließend wurde je 1 mL in ein zuvor getrocknetes und gewogenes 1,5 mL Gefäß gegeben. Die Suspension wurde zentrifugiert (zehn Minuten; 25.000 g; 4 °C), der Überstand entnommen und das Pellet in 0,9 % NaCl resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Überstand entnommen und das Gefäß mit Pellet für mindes-

tens 24 Stunden bei 105 °C getrocknet. Nach Kühlen im Exsikkator und mehrfachem Wiegen, bis sich ein konstanter Wert einstellte, wurde die Biomasse bestimmt und mit der zuvor gemessenen OD₆₀₀ korreliert.

2.3.1.2 Kultivierung von *Methylosinus trichosporium* OB3b mit CH₃OH als C-Quelle

Die Kultivierung erfolgte mit den in Tabelle 2-4 gelisteten Medien, mit Ausnahme des NCIMB-Reaktivierungsmediums. Als Gefäße wurden Injektionsflaschen (Gesamtvolumen 240 mL) oder Schüttelkolben mit Schikanen (Gesamtvolumen 590 ml) verwendet, die mit Wattestopfen verschlossen wurden. Es wurden 20 oder 50 mL Medium für die CH₃OH-Kulturen von *M. trichosporium* OB3b eingesetzt. Die Start OD₆₀₀ betrug 0,1. CH₃OH wurde in einer Konzentration von 50 mM (0,2 v/v%) zugegeben. Die restlichen Schritte, mit Ausnahme des Atmosphären austausches erfolgten identisch zur Kultivierung mit CH₄. Die Kulturen wurden bei 30 °C und 150 rpm (Innova 4230 Schüttler) inkubiert. In definierten Zeitabständen wurde das Wachstum über die optische Dichte bei 600 nm, die sMMO-Aktivität über den Ganzzell-Naphthalin-Assay und das Proteinbandenmuster mittels SDS-PAGE analysiert. Die Berechnung der spezifischen Wachstumsrate (μ in h⁻¹) erfolgte über Formel 2-1, mit μ = spezifische Wachstumsrate in h⁻¹; t_x = Zeitpunkt (h) x; t₀ = Startzeit (h); OD₆₀₀(t_x) = OD₆₀₀ zum Zeitpunkt x und OD₆₀₀(t₀) = OD₆₀₀ zum Startzeitpunkt.

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{OD_{600}(t_x)}{OD_{600}(t_0)}\right)}{t_x - t_0} \quad (\text{Formel 2-1})$$

2.3.1.3 Stammhaltung von *M. trichosporium* OB3b

Die Zellen wurden nach Wachstum auf 20 % CH₄ im verschlossenen 500 mL Schikanekolben (50 mL Flüssigphase) auf sMMO-Aktivität getestet und anschließend nach Gasaustausch und Einstellung der 20 %-igen CH₄-Atmosphäre bei 6 °C gelagert. Auch nach 12 Monaten Lagerung konnten die Zellen durch Überimpfung in frisches Medium, unter Erhalt der sMMO-Aktivität, reaktiviert werden.

2.3.1.4 Analyse der Zellen mittels Transelektronenmikroskopie

Die Zellen wurden nach der Kultivierung mit CH₄ bzw. CH₃OH zentrifugiert und das Pellet separiert. Die weitere Analyse erfolgte durch die Dr. Gerd Hause (Biozentrum, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abt. Elektronenmikroskopie)

2.3.1.5 Kultivierung von *M. trichosporium* OB3b im 6,8 L und 68 L-Maßstab mit CH₃OH als C-Quelle

Die Vorkulturen (6x75 mL) wurden auf modifiziertem NMS-Medium (Tabelle 2-4) zunächst mit CH₄ und dann mit CH₃OH wie in Kapitel 2.3.1.1 und 2.3.1.2 beschrieben kultiviert. Für alle Kulturen wurde eine N-Allylthioharnstoffkonzentration (ATU) von 5 µM eingestellt. Zur Kontrolle der Bildung der sMMO wurde die sMMO-Aktivität mittels Ganzzell-Naphthalin-Assay zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung analysiert. Nach Wachstum der Vorkulturen (Gesamtvolumen 400 bis 500 mL) wurden die Zellen zentrifugiert (45 Minuten bei 4 °C und 18.000 g) und in 500 mL frischem Medium resuspendiert. Diese Suspension diente der Inokulation des 6,8 L Fermenters. Die Sterilisation (20 Minuten bei 121 °C) der Reaktoren erfolgte vor der sterilen Zugabe von NaHCO₃; FeSO₄; ATU und der Spurenelementlösung (andere Komponenten zuvor zugegeben). Die CH₃OH-Konzentration wurde mittels einer

CH₃OH-Sonde (Alcosens von Heinrich Frings GmbH & Co. KG) analysiert und kontinuierlich zudosiert. Alle Fermentationsexperimente erfolgten bei folgenden Parametern:

Tabelle 2-5: Parameter der Fermentationsexperimente im 6,8 und 68 L-Maßstab

Parameter	Wert
Temperatur	30 °C
pH Wert	6,9 ± 0,1
O ₂ -Konzentration	30 %
Rührerdrehzahl	Angepasst um O ₂ -Konzentration bei 30 % zu halten
CH ₃ OH	0,1 v/v% = 0,8 g*L ⁻¹ = 25 mM
Begasungsrate	0,33 vvm

Die Echtzeit-pH-Kontrolle erfolgte mit 7,5 % H₂SO₄ bzw. 10 % NaOH. Als Antischaummittel wurde Sigma SE-15 mit einer Konzentration von 0,2 % v/v verwendet. Innerhalb der Fermentationen erfolgte die externe Zugabe verschiedener Medienkomponenten. Die genaue Menge der jeweiligen sterilen Lösungen, die zugegeben wurden sind in Tabelle 3-6, Tabelle 3-8 und Tabelle 7-1 zusammengefasst. Die Zugabe erfolgte mittels einer externen Schlauchquetsch-Pumpe. Die Fermentationen erfolgten in Kooperation mit dem Fraunhofer-Zentrum für Chemisch-Biotechnologische Prozesse (CBP) innerhalb der dortigen Reaktorkaskade in Fermentern mit Nennvolumina von 10 und 100 L.

2.3.1.6 Zellernte über Zentrifugation in Röhrenzentrifuge

Nach Ende der Kultivierung wurden die Zellen über Zentrifugation geerntet. Die erste Fermentation A (6,8 L-Maßstab, Nitratlimitierung) wurde über Zentrifugation bei 4 °C und 15.000 g für 30 Minuten geerntet. Die Biomasse der 68 L Fermentation C wurde über Zentrifugation (Röhrenzentrifuge Ceba 61 G) bei 17.000 g geerntet (Drei Passagen). Anschließend wurde die Biofeuchtmasse portioniert, abgewogen (100– 200 g), in fl. N₂ eingefroren und bei – 80 °C gelagert.

2.3.2 Reinigung der sMMO nach Kultivierung mit CH₃OH

2.3.2.1 Trennung der sMMO-Komponenten

Die Reinigung erfolgte auf Basis der für CH₄-Biomasse von *M. trichosporium* OB3b dokumentierten Reinigung von Fox und Kollegen [Fox *et al.*, 1989]. Der Ablauf der Reinigung für die einzelnen sMMO-Komponenten ist in Abbildung 3-17 dargestellt. Der generelle Ablauf bestehend aus AEC, SEC für MMOH bzw. 1.AEC, 2.AEC und SEC für MMOB bzw. MMOR war identisch zur Literaturangabe von Fox und Kollegen. Die eingesetzten Chromatographiematerialien, Säulenvolumina und die genauen Zusätze zum Reinigungspuffer (25 mM MOPS pH 6,5 bis 7,0) unterschieden sich von der genannten Literaturstelle und werden im Weiteren genannt.

Die Puffer für die Reinigung wurden mit Reinstwasser (TKA GenPure) hergestellt. Die geerntete und eingefrorene *M. trichosporium* OB3b-Biomasse (CH₃OH als C-Quelle) wurde in Zellaufschlusspuffer aufgetaut. Dieser bestand aus 25 mM MOPS pH 7,0, 1 mM TCEP, 1 mM PMSF und, sofern mit Eisenionen-Zusatz gereinigt wurde, 0,2 mM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂. Bei einer weiteren Reinigung erfolgte die Präparation ohne Eisenionen-Zusatz im Puffer. Für 300 g Biofeuchtmasse wurden 600 mL Puffer eingesetzt. Die Zellen wurden mittels Homogenisator (ULTRA-TURRAX®) resuspendiert und anschließend über eine dreimalige Passage bei

1.000 bar durch einen Hochdruckhomogenisator (APV 2000) aufgeschlossen. Anschließend erfolgte die Trennung der Zelltrümmer und der Membranfraktion von der löslichen Phase über eine 45-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 105.000 g. Die sMMO-Aktivität (Nitrobenzol-Assay) wurde anschließend im Überstand (Rohextrakt) untersucht.

Die folgenden Chromatographieschritte erfolgten mit einer Äkta Prime (GE Healthcare) Chromatographieanlage bei 4 bis 6 °C im Kühlraum. Alle eingesetzten Puffer bzw. Lösungen wurden filtriert und entgast (Ultraschallbad). Die Lagerung der Säulen erfolgte in 20 % Ethanol, welches vor Benutzung durch mehrere Säulenvolumina ddH₂O entfernt wurde. Während der Chromatographieschritte wurde das Absorptionssignal bei 280 nm, die Leitfähigkeit der Lösung und ggf. der Anteil an Elutionspuffer im Verlauf der Chromatographie gemessen. Die Proteinkonzentration (Bradford-Assay, siehe Kapitel 2.4.3.1) wurde, wenn nicht anders angegeben nach jedem Reinigungsschritt bestimmt.

Der erste Reinigungsschritt bestand aus einer Anionenaustauschchromatographie (AEC) mit Q-Sepharose in einer 5 cm x 12 cm Säule (XK 50/20, Volumen = 230 mL). Der Rohextrakt wurde über zwei bis drei Stunden mittels einer externen Pumpe (Ms reglo, Ismatec), ohne Aufzeichnung der Parameter, auf eine mit Bindepuffer äquilibrierte Säule gepumpt und mit zwei Säulenvolumina Bindepuffer nachgespült. Bindepuffer bestand aus 25 mM MOPS pH 7,0, 1 mM TCEP, 1 mM PMSF und, sofern mit Eisenionen-Zusatz gereinigt, wurde 0,2 mM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂. Anschließend wurden die sMMO-Komponenten mit Elutionspuffer über einen Gradient (0 bis 50 %) von 5 bis 6 Säulenvolumina von der Säule getrennt. Der Elutionspuffer bestand aus Bindepuffer mit Zusatz an 0,8 M NaCl. Die eingestellte Flussrate betrug 1,5– 2,0 mL*min⁻¹. Die einzelnen eluierten Fraktionen wurden aufgefangen, bei 6 °C gelagert und per SDS-PAGE analysiert (Lagerung max. 12 Stunden bei 6 °C je nach SDS-PAGE-Analysedauer). Dabei erfolgte zuvor eine Verdünnung der Proben für die SDS-PAGE mit SDS-Probenpuffer (1:2 oder 1:3). Anschließend wurden die Proben für fünf Minuten bei 95 °C inkubiert. Die einzelnen sMMO-tragenden Fraktionen wurden nach der SDS-PAGE-Analyse vereinigt, in flüssigen N₂ eingefroren und bei – 80 °C gelagert. Bei der direkten Weiterverarbeitung der Fraktionen erfolgte nur eine Lagerung für max. 12 Stunden bei 6 °C. Die MMOH-, MMOB- und MMOR-Fraktionen wurden anschließend separat weiter bearbeitet.

2.3.2.2 Reinigung der Hydroxylase (MMOH)

Die MMOH-Fraktion (Fraktionen 15 bis 26, 145 mL) wurde über Nacht auf Eis aufgetaut und anschließend mittels Ultrazentrifugationseinheiten (Amicon tube 50 kDa Ausschlussgröße) bei 4 °C und 3800 g auf 5 mL aufkonzentriert. Anschließend erfolgte eine Filtration der Probe mit einem 0,2 µm Filter. Die Probe wurde mittels Größenausschlusschromatographie (*Size exclusion chromatography*, SEC) weiter gereinigt. Die Säule (2,6 cm x 60 cm = 320 mL Volumen) bestand aus dem Material Superdex G-200 pg und wurde mit Puffer (25 mM MOPS pH 7,0) äquilibriert. Die Flussrate betrug 1 mL*min⁻¹. Die eluierten Fraktionen wurden parallel zur SDS-PAGE-Analyse für max. 12 Stunden bei 6 °C gelagert, die MMOH-tragenden Fraktionen vereinigt und erneut mittels Ultrazentrifugation (Amicon, 50 kDa) aufkonzentriert. Die MMOH-Fraktion wurde aliquotiert (50 µL á 45 bzw. 65 mg*mL⁻¹), in flüssigen N₂ eingefroren und bei – 80 °C gelagert. sMMO-Aktivitätsmessungen erfolgten sowohl direkt nach der Reinigung als auch mit aufgetauten MMOH-Fraktionen.

2.3.2.3 Reinigung des regulatorischen Proteins B (MMOB)

Die MMOB-Fraktion (Fraktionen 39 bis 44, 72 mL) nach der 1. AEC wurde über Nacht auf Eis aufgetaut und anschließend zweimal eine Stunden gegen 1 L 25 mM MOPS-Puffer pH

6,5; 1 mM PMSF und 0,1 M NaCl dialysiert (SpectraPore 1; 7 bis 8 kDa Ausschlussgröße). Wichtig für die Reinigung von MMOB war der Zusatz an 1 mM PMSF in allen Lösungen. Die Messung der Leitfähigkeit vor und nach der Dialyse erfolgte manuell mit einem Leitfähigkeitsmessgerät (GMH 3430, Greisinger GmbH). Nach der Dialyse erfolgte eine zweite AEC. Die MMOB-Fraktion wurde mittels 150 mL Superloop auf eine Q-Sepharose-Säule (XK 26/20, 2,6 cm x 12 cm = 64 mL Säulenvolumen) gepumpt, die mit Bindepuffer (25 mM MOPS pH 6,5; 1 mM PMSF und 0,1 M NaCl) äquilibriert wurde. Die Trennung der Proteine erfolgte nach Spülen (1 Säulenvolumen Bindepuffer) mittels eines Elutionspuffer (25 mM MOPS, pH 6,5; 1 mM PMSF und 0,8 mM NaCl)- Gradienten von 12,5 auf 37,5 % Elutionspuffer (= 0,3 M NaCl). Die Flussrate betrug $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Die eluierten Proteinfractionen wurden gesammelt und für zwei bis 12 Stunden parallel zur SDS-PAGE-Analyse bei $6 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die MMOB tragenden Fraktionen wurden vereinigt. Anschließend erfolgte eine Aufkonzentrierung mittels Ultrazentrifugationseinheiten (Amicon, 10 kDa) auf 3 mL. Die Probe wurde durch eine Filtration ($0,2 \text{ }\mu\text{m}$ Filter) von etwaigen ausgefallenen Bestandteilen gereinigt und mittels SEC weiter gereinigt. Die Säule (2,6 cm x 60 cm = 320 mL Volumen) bestand aus dem Material Superdex G-200 pg und wurde mit Puffer (25 mM MOPS pH 7,0) äquilibriert. Die Flussrate betrug $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Die eluierten Fraktionen wurden parallel zur SDS-PAGE-Analyse für max. 12 Stunden bei $6 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die MMOB tragenden Fraktionen wurden vereinigt und erneut mittels Ultrazentrifugation (Amicon, 10 kDa) aufkonzentriert. Die MMOB Fraktion wurde aliquotiert ($100 \text{ }\mu\text{L}$ á $5,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), mit flüssigem N_2 eingefroren und bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die sMMO-Aktivitätsmessungen erfolgten nach Auftauen der MMOB Fraktion im Nitrobenzol-Assay.

2.3.2.3.1 Untersuchungen zur autokatalytischen Spaltung von MMOB

Rekombinant in *E. coli* produziertes MMOB aus *M. trichosporium* OB3b ([Dillmann, 2014] [Kind, 2016]) wurde in $100 \text{ }\mu\text{L}$ Puffer (25 mM MOPS pH 7,0), bei einer Konzentration von $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ mit verschiedenen Zusätzen bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ und Raumtemperatur ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) für 48 Stunden inkubiert. Die Zusätze waren *M. trichosporium* OB3b Rohextrakt ($2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) und 1 mM PMSF. Nach 24 und 48 Stunden wurden aus den einzelnen Ansätzen Proben entnommen. Diese wurden anschließend mit SDS-Probenpuffer (1:2 Verdünnung) für fünf Minuten bei $95 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert und mittels SDS-PAGE analysiert.

2.3.2.4 Reinigung der Reduktase (MMOR)

Die MMOR-Fraktion (Fraktion $75\text{--}80 \text{ }^\circ\text{C}$, 72 mL) wurde nach der 1. AEC über Nacht auf Eis aufgetaut und anschließend 2 mal eine Stunde gegen 1 L 25 mM MOPS-Puffer pH 6,5, 1 mM TCEP und 0,2 M NaCl dialysiert (SpectraPore 1; 7 bis 8 kDa Ausschlussgröße). Wichtig für die Reinigung von MMOB war der Zusatz an 1 mM TCEP in allen Lösungen. Die MMOR-Aktivität innerhalb der Fraktionen nach jedem Reinigungsschritt wurde mittels DCPIP-Assay gemessen (siehe Kapitel 2.4.4.6).

Die Messung der Leitfähigkeit vor und nach der Dialyse erfolgte manuell mit einem Leitfähigkeitsmessgerät (GMH 3430, Greisinger GmbH). Nach der Dialyse erfolgte eine zweite Anionenaustauschchromatographie. Die MMOB-Fraktion wurde mittels 150 mL Superloop auf eine Q-Sepharose Säule (2,6 cm x 12 cm = 64 mL Säulenvolumen) gepumpt die mit Bindepuffer (25 mM MOPS pH 6,5; 1 mM TCEP und 0,2 M NaCl) äquilibriert wurde. Die Trennung der Proteine erfolgte nach Spülen (1 Säulenvolumen Bindepuffer) mittels eines Elutionspuffergradienten (25 mM MOPS, pH 6,5, 1 mM TCEP und 0,8 mM NaCl) von 25 auf 50 % Elutionspuffer. Die Flussrate betrug $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Die eluierten Proteinfractionen wurden gesam-

melt, parallel zur SDS-PAGE-Analyse für max. 12 Stunden bei 6 °C gelagert und die MMOR-tragenden Fraktionen vereinigt. Anschließend erfolgte eine Aufkonzentrierung mittels Ultrazentrifugationseinheiten (Amicon, 30 kDa) auf 3 mL. Die Probe wurde durch eine Filtration (0,2 µm Filter) von etwaigen ausgefallenen Bestandteilen gereinigt und mittels Größenausschlusschromatographie weiter gereinigt. Die SEC-Säule (2,6 cm x 60 cm = 320 mL Volumen) bestand aus dem Material Superdex G-200 pg und war mit Puffer (25 mM MOPS pH 7,0, 1 mM TCEP) äquilibriert. Die Flussrate betrug 1 mL*min⁻¹. Die eluierten Fraktionen wurden parallel zur SDS-PAGE-Analyse für max. 12 Stunden bei 6 °C gelagert. Die MMOR-tragenden Fraktionen wurden vereinigt und erneut mittels Ultrazentrifugation (Amicon, 30 kDa) aufkonzentriert. Die MMOR-Fraktion wurde aliquotiert (75 µL á 9,2 mg*mL⁻¹), mit flüssigem N₂ eingefroren und bei -80 °C gelagert. Die sMMO-Aktivitätsmessungen erfolgten nach Auftauen der MMOR-Fraktion im Nitrobenzol-Assay. Zusätzlich wurde das Spektrum der gereinigten MMOR-Fraktion von 250 bis 600 nm mittels UV/Vis-Spektrometer (UltroSpec 2100) aufgenommen.

2.3.3 Einsatz der sMMO im 10 und 250 mL-Reaktormaßstab

Die Untersuchungen erfolgten in Kooperation mit dem Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik (IGB) in Stuttgart. Das Echtzeit-Messsystem FoxySpec® wurde vom IGB entwickelt und wurde für die folgenden Versuche genutzt. Die Messungen erfolgten mit gereinigten sMMO-Proteinfractionen, deren Aktivität zuvor im Nitrobenzol-Assay getestet wurde. Katalase (640 U*mL⁻¹ Enzymaktivität im finalen Ansatz) und Glucose 1-Dehydrogenase (75 mU*mL⁻¹ Enzymaktivität im finalen Ansatz) wurden kommerziell erworben. Es wurde für alle Messungen der Dreikomponentenpuffer bestehend aus 50 mM Tris 25 mM MES 25 mM Natriumacetat pH 7,3 als Messpuffer verwendet. Die Kalibrierung des FoxySpec® Echtzeit-Messsystems erfolgte mit verschiedenen CH₃OH-Konzentrationen im Messpuffer. Die CH₄-Kalibrierung erfolgte vor jeder Messung als Zweipunkt Kalibrierung nach vollständiger Begasung der Lösung mit He bzw. nach vollständiger Sättigung mit CH₄.

2.3.3.1 10 mL-Maßstab

Als Reaktionsraum diente ein luftdicht verschließbares Glasgefäß mit dem Gesamtvolumen von 22 mL. Das eingesetzte Flüssigvolumen betrug 10 mL, das Volumen der Messstrecke zur MS-Analyse betrug 3 mL, so dass im Gefäß 7 mL verblieben. Die Gasphase hatte ein Volumen von 15 mL. Die Totzeit der pulsationsarmen HPLC-Flüssigkeitspumpe (Zeit bis Flüssigkeit durch die Messstrecke gedrückt wurde) betrug 0,5 bis eine Minute. Das Reaktionsgefäß wurde mittels Magnetrührer durchmischt und die Messtemperatur von 30 °C wurde durch ein temperierbares Wasserbad um das Glasgefäß gewährleistet.

Das verschlossene Gefäß hatte neben dem Flüssigkeitsein- bzw. Auslass. für die MS-Analyse, einen Gasein- bzw. Auslass für He und CH₄. Die einzelnen Messungen wurden nach folgendem Ablauf durchgeführt. Zunächst wurde ein definiertes Puffervolumen (ggf. mit 50 mM Glucose) vorgelegt und das Gefäß mit Teflon/Butyl Septen und Aluminiumkappen verschlossen. Anschließend erfolgte das Strippen der Lösung mit He (99,999 %) und darauf folgend die Begasung mit CH₄ (N45, 99,995 %). 3 mL der Atmosphäre wurden per Injektion entnommen und durch 3 mL 100 % O₂ ersetzt. Bei der Reaktion mit CH₃OH als Substrat wurde keine Begasung mit CH₄ durchgeführt. Stattdessen wurden 20 mL Atmosphäre entfernt und anschließend 20 mL 100 % O₂ zugegeben. In diesem Ansatz wurde eine CH₃OH-Konzentration in der Flüssigphase von 1,56 mM CH₃OH vorgelegt. Anschließend wurden die entsprechenden Enzymkomponenten zugegeben (je nach Messung sMMO ± Katalase ±

GDH). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mM NADH/NAD⁺ gestartet. Je nach Versuchsansatz erfolgte die Zugabe von verschiedenen Komponenten (NADH, FDM) während der Reaktion. Die Messung der HCHO- und NADH-Konzentration erfolgte vor und nach der Reaktion nach Öffnen des Reaktionsgefäßes (siehe Kapitel 2.4.5).

2.3.3.2 250 mL-Maßstab

Die Messung erfolgte in einem Reaktor (Büchi) mit einem Gesamtvolumen von 1500 mL. Die Flüssigphase betrug 250 mL und die Gasphase 1250 mL. Aufgrund der Messtrecke der MS-Analyse wurde während der Reaktion mit einem Flüssigvolumen von 247 mL gearbeitet. Die Durchmischung erfolgte mittels eines 6-Blatt-Scheibenrührers (200 rpm) und die Temperaturkontrolle, bei 30 °C, über einen temperierbaren Mantel. Nach Spülen des Reaktors mit H₂O wurde eine definierte Puffermenge mit 50 mM Glucose vorgelegt. Nach Begasung der Flüssigphase mit He erfolgte die Begasung mit einem Gasgemisch (30 % CH₄; 14,35 % O₂; 55,65 % N₂). Anschließend wurden dem geschlossenen System die Enzymkomponenten (12,25 mL gesamt; sMMO mit H:B:R = 1:1:0,1 µM; Katalase und GDH) zugesetzt und die Nullprobe entnommen. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe von 10 mL NAD⁺ auf eine Endkonzentration von 1 mM. Im Laufe der Reaktion wurden wiederholt Proben zur NADH-, pH-Wert und HCHO-Analyse entnommen. Nach 133 Minuten erfolgte die Zugabe von FDM, in Form von Rohextrakt (5 mL mit 5,9 mg*mL⁻¹) auf eine Endkonzentration von 0,12 mg*mL⁻¹.

2.3.4 Untersuchungen zur Immobilisierung der sMMO

2.3.4.1 Ungerichtete Immobilisierung der MMOH

2.3.4.1.1 Bindung von MMOH an ReliZyme™

Die Untersuchungen erfolgten mit dem Material ReliZyme™ EP403/S (Resindion, Binasco). Das experimentelle Vorgehen basierte auf dem Protokoll von Mateo und Kollegen [Mateo *et al.*, 2002]. Die Hydroxylase wurde für die Untersuchungen mittels Ultrazentrifugation (Amicon tube, 50 kDa, dreimal Waschen und Zentrifugation zehn Minuten 3.800 g bei 4 °C) umgepuffert, auf 25 mM NaH₂PO₄ pH 7,5 (Phosphatpuffer). Die Proteinkonzentration wurde im Anschluss über Absorption bei 280 nm bestimmt. Das Material wurde abgewogen und mittels Glasfritte mit ddH₂O gespült. Anschließend wurde das Material mit MMOH für vier bis sechs Stunden bei 25 °C in 1 M NaH₂PO₄ pH 7,5 (Inkubationspuffer) auf einem Rollermixer inkubiert. Nach Abtrennung des Materials erfolgte das dreimalige Waschen mit Inkubationspuffer und die Analyse der Proteinkonzentration im Überstand (A₂₈₀). Ein zweiter Inkubationsschritt für 14 bis 16 Stunden bei 25 °C und in 0,1 M NaH₂PO₄ pH 8,5 mit 3 M Glycin folgte mit dem gewaschenen Material zur Blockierung der freien Epoxidgruppen. Nach erneutem Abtrennen und Waschen mit 25 mM MOPS pH 7,5 + 50 mM NaCl (Messpuffer), mit Kontrolle auf Protein im Überstand, erfolgte der Einsatz des Materials im Nitrobenzol-bzw. CH₄-Assay zur Bestimmung der sMMO-Aktivität.

2.3.4.1.2 Untersuchung der Adsorption von Substraten und Produkten an ReliZyme™

Das Adsorptionsverhalten von MMOB bzw. MMOR (je 3 bis 5 µM) sowie Nitrobenzol (1 mM) und *p*-Nitrophenol (50 µM) an Glycin-geblocktes, MMOH-unbeladenes Material wurde untersucht. Die Messungen erfolgten nach Inkubation der Komponenten für 15 bis 60 Minuten bei 25 °C und 900 rpm (Eppendorf Thermomixer) mit je 20 mg Material. Die Analyse, nach Zentrifugation bei 25.000 g für zwei Minuten, erfolgte für MMOR und MMOB über die Bestimmung der Absorption bei 280 nm und für Nitrobenzol bzw. *p*-Nitrophenol über HPLC-Analyse bzw. die Messung der Absorption bei 420 nm.

2.3.4.2 Gerichtete Immobilisierung von SUMO-MMOB

2.3.4.2.1 Bindung von SUMO-MMOB an *Streamline Chelating*

Die Untersuchungen erfolgten mit *Streamline Chelating* (GE Healthcare) als Immobilisierungsmaterial. Als Immobilisierungsanker wurde His₆-SUMO-MMOB (im Weiteren als SUMO-MMOB bezeichnet) verwendet. Zunächst erfolgten das Abwiegen von 1 g Material und die Beladung mit Ni(II) durch Inkubation mit 0,1 M NiSO₄ bei 25 °C für 0,5 Stunden (Verwendung 0,5 mL NiSO₄). Nach Abtrennung des Materials mittels Glasfritte (Porengröße G4, 10 bis 16 µm) und zwei- bis dreimaligem Waschen, mit jeweils ddH₂O und 25 mM MOPS 50 mM NaCl pH 7,5 (Messpuffer), erfolgte entweder die direkte Verwendung oder die Lagerung in 20 % Ethanol. Für die vollständige Beladung des gewaschenen Materials mit SUMO-MMOB wurde eine Proteinmenge von 72 µg_{SUMO-MMOB} * mg_{Streamline}⁻¹ eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 25 °C für vier Stunden. Die Kontrolle der Bindung erfolgte über die Messung der Proteinkonzentration bei 280 nm im Überstand, im Vergleich zu einer Probe MMOB ohne Trägermaterial. Wenn keine weitere Bindung an das Material beobachtet wurde erfolgte eine Abtrennung des Materials über eine Glasfritte (Porengröße G4, 10 bis 16 µm) mit einer Wasserstrahlpumpe und Waschen des Materials mit Messpuffer. Nach Kontrolle der Proteinkonzentration im Überstand wurde das Material im Nitrobenzol-Assay und im CH₄-Assay eingesetzt

2.3.4.2.2 Adsorption von Substraten und Produkten an *Streamline Chelating*

Die Adsorption von SUMO-MMOB, MMOH, MMOR, MMOB, Nitrobenzol und *p*-Nitrophenol an Ni(II) beladenes Trägermaterial wurde untersucht. 2 bis 5 µM der Proteine, 1 mM Nitrobenzol und 50 µM *p*-Nitrophenol wurden mit jeweils 20 mg Material für 15 bis 60 Minuten bei 25 °C und 900 rpm (Eppendorf Thermomixer) inkubiert. Nach Zentrifugation der Probe (zwei Minuten, 25 °C, 25.000 g) erfolgte die Analyse der Adsorption der Proteine über die Bestimmung der Proteinkonzentration bei 280 nm, die Bestimmung von Nitrobenzol mittels HPLC-Analyse und die Messung von *p*-Nitrophenol bei 420 nm im Überstand.

2.4 Analyse

2.4.1 Reinheitsbestimmung mittels SDS-PAGE

Eine einfache Methode zum Nachweis von Proteinen ist die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Dabei ist es in der Regel möglich, Proteine anhand ihres Molekulargewichts, genau genommen ihres hydrodynamischen Volumens, aufzutrennen. Die Methode wurde in Anlehnung an die Arbeit von Lämmli durchgeführt [Laemmli, 1970]. Alle verwendeten Reagenzien und Puffer sind in Tabelle 2-6 und Tabelle 2-7 aufgeführt.

Zu analysierende Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert. Pro Bahn wurden 10 µL Probe aufgetragen. Die Detektion der aufgetrennten Proteine erfolgte über Färbung mit Coomassie Brilliant Blue [De St. Groth *et al.*, 1963]. Zur Abschätzung des Molekulargewichts aufgetrennter Proteine wurde der Marker „Prestained Protein Ladder“ (PPL) von ThermoFisher (#26616; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) verwendet.

Die Elektrophorese erfolgte zweistufig. Für ein Gel: Schritt 1-300 V, 100 mA, sechs Minuten; Schritt 2: 300 V, 30 mA, 40 Minuten. Für zwei Gele: Schritt 1-300 V, 100 mA, sechs Minuten; Schritt 2: 300 V, 60 mA, 40 Minuten.

Tabelle 2-6: Reagenzien für SDS-PAGE nach Lämmli [Laemmli, 1970].

Reagens /Puffer	Zusammensetzung	Anmerkungen
Trenngelpuffer	181,8 g Tris 20 mL 20 % (w/v) SDS-Lösung 1 mL 10 % (w/v) NaN_3 -Lösung pH 8,8	Tris in 800 mL dH_2O aufgelöst, restliche Gemische zugegeben, pH 6,8 mit 4 M HCl eingestellt, mit dH_2O im Maßkolben auf 1 L aufgefüllt.
Sammelgelpuffer	60,6 g Tris 20 mL 20 % (w/v) SDS-Lösung 1 mL 10 % (w/v) NaN_3 -Lösung pH 6,8	Tris in 700 mL dH_2O aufgelöst, restliche Gemische zugegeben, pH 8,8 mit 4 M HCl eingestellt, mit dH_2O im Maßkolben auf 1 L aufgefüllt.
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30 %, w/v) Mix 29:1	290,9 g/L Acrylamid 9,1 g/L Bisacrylamid	AppliChem GmbH (Darmstadt)
APS-Lösung (gesättigt)	$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	
Kathodenpuffer (10x konzentriert)	30,28 g Tris 144 g Glycerin 50 mL 20 % (w/v) SDS-Lösung 1 mL 10 % (w/v) NaN_3 -Lösung	Tris in 800 mL dH_2O aufgelöst, restliche Gemische zugegeben, mit dH_2O im Maßkolben auf 1 L aufgefüllt. Vor Verwendung 1:10 verdünnt mit dH_2O .
SDS-Probenpuffer	27,2 g Tris 30 mL HCl (3 M) 250 mL 20 % (w/v) SDS-Lösung 500 mg Bromphenolblau 500 g Glycerin pH 6,8	Tris in 800 mL dH_2O aufgelöst, restliche Gemische und Glycerin zugegeben, pH 6,8 mit 4 M HCl eingestellt, mit dH_2O im Maßkolben auf 1 L aufgefüllt. Vor Verwendung Zugabe von 10 μL β -Mercaptoethanol pro 1 mL Probenpuffer.

Tabelle 2-7: Zusammensetzung der Trenngele und Sammelgele nach Laemmli, 1 mm stark [Laemmli, 1970]. TA-Totalacrylamid

Reagens /Puffer	2 Trenngele 12,5 % TA-Gehalt	2 Trenngele 16,0 % TA-Gehalt	2 Sammelgele 4,5 % TA-Gehalt
Gelpuffer	2,5 mL	2,5 mL	1,25 mL
Acrylamid/Bisacrylamid	4,2 mL	5,3 mL	0,75 mL
deionisiertes Wasser	3,3 mL	2,2 mL	3,0 mL
TEMED	10 μ L	10 μ L	10 μ L
gesättigtes APS	20 μ L	20 μ L	8 μ L

2.4.2 Färbung von SDS-PA-Gelen mittels Coomassie

2.4.2.1 Hintergrund und Nachweisprinzip

Die Färbung von Proteinen mittels Coomassie Brilliant Blue basiert auf einer Arbeit von Sankt Groth und Kollegen [De St. Groth *et al.*, 1963]. Das Färbemittel bindet während des Färbens aufgrund ionischer und hydrophober Wechselwirkungen an verschiedene Reste der Aminosäurekette. Anschließend erfolgt das Auswaschen ungebundenen Färbemittels. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist in Tabelle 2-8 gegeben.

Tabelle 2-8: Zusammensetzung der Lösungen für Färbung mit Coomassie.

Lösung	Zusammensetzung
Färbelösung	1 g/L Coomassie Brilliant Blue G-250 20 % (v/v) 2-Propanol 10 % (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung	20 % (v/v) 2-Propanol 10 % (v/v) Essigsäure

2.4.2.2 Coomassie-Färbung

Im direkten Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung der Proben wurde das PA-Gel entweder für mind. eine Stunde in Färbelösung oder mit Färbelösung für zwei mal 30 Sekunden in der Mikrowelle inkubiert. Danach erfolgte die Entfärbung des Gels bis zum gewünschten Kontrast. Die Entfärbelösung wurde alle 30 Minuten gewechselt. Beide Schritte wurden auf einem Wipptisch durchgeführt.

2.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

2.4.3.1 Bradford-Test

Dieser Nachweis wurde auf Grundlage der Arbeiten von Bradford durchgeführt [Bradford, 1976]. Der Farbstoff Coomassie-Brilliantblau bindet aufgrund ionischer und hydrophober Wechselwirkungen an verschiedene Reste der Aminosäurekette. Dabei verschiebt sich sein Absorptionsmaximum zu 595 nm.

Für das Farbreagens wurden 100 mg Coomassie-Brillantblau G-250 in 50 mL 95 %-igem Ethanol gelöst, 100 mL 85 %-ige Phosphorsäure zugesetzt und mit dH₂O auf 600 mL aufgefüllt. Anschließend wurde die Lösung filtriert, 100 mL Glycerin dazugegeben und mit dH₂O

auf 1 L aufgefüllt. Nach 24 Stunden Lagerung bei 20 °C konnte das Reagens verwendet werden.

Für den Test wurden 25 µL Proteinlösung mit 975 mL Farbreagens versetzt, gut gemischt, zwei Minuten bei 20 °C inkubiert und bei 595 nm die Extinktion gegen einen Blindwert ermittelt. Als Kalibrierprotein wurde BSA (0,0 bis 0,4 mg* mL⁻¹) eingesetzt.

2.4.3.2 Absorption bei 280 nm

Basierend auf den Extinktionskoeffizienten der einzelnen sMMO-Komponenten erfolgte die Bestimmung der Konzentration der gereinigten Proteine über die Absorption bei 280 nm. Die Extinktionskoeffizienten wurden anhand der Aminosäuresequenz mit dem Programm „EXPASy-„ProtParam“ [Artimo *et al.*, 2012] berechnet (Tabelle 2-9). Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach Messung der Absorption bei 280 nm in Quarzküvetten in einem Volumen von 0,6 bis 0,8 mL mittels Spektrometer. Die verwendete Formel war:

$$c = \frac{E_{280} * F}{\epsilon * d} \quad (\text{Formel 2-2})$$

Mit c-Proteinkonzentration [M]; E₂₈₀-Absorption bei 280 nm; F-Verdünnungsfaktor; ε-Extinktionskoeffizient [M⁻¹*cm⁻¹]; d-Schichtdicke der Küvette = 1 cm.

Tabelle 2-9: Mittels ProtParam berechnete Extinktionskoeffizienten und Molekulargewichte für die einzelnen sMMO-Komponenten

Komponente	Extinktionskoeffizient [M ⁻¹ *cm ⁻¹]	Molekulargewicht [kDa]
MMOH	272625	124,3
MMOB	15470	14,9
SUMO-MMOB	16960	28,1
MMOR	23420	38,0

2.4.4 Analyse der sMMO-Aktivität

2.4.4.1 Ganzzell-Naphthalin-Assay

Die Analyse erfolgte auf Basis des Testes von Brusseau und Kollegen [Brusseau *et al.*, 1990]. Durch Verdünnung mit NMS-Medium wurde die OD₆₀₀ der zu untersuchenden Zellsuspension auf 0,2 eingestellt. Eine finale Kaliumformiat-Konzentration von 20 µM wurde eingestellt. Dies diente der Regeneration des NADH. 10 mg Naphthalin wurden zum Ansatz gegeben und dieser für 30 Minuten bei 1.000 rpm (Eppendorf Thermomixer) und 30 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für zehn Minuten bei 4 °C und 15.000 g. 135 µL des Überstandes wurden jeweils in einen well einer 96-well Platte mit 15 µL 4,21 mM Echtsalzblau und 50 µL 100 % Essigsäure (diente der Stabilisation des Farbkomplexes) gegeben. Nach einer fünfminütigen Inkubationszeit bei 30 °C erfolgte die Vermessung der Absorption bei 525 nm. Die Quantifizierung erfolgte mit einer identisch abgelaufenen 1-Naphthol-Kalibriergerade zwischen 0 und 75 µM, die parallel zu jeder Messung durchgeführt wurde. Das von der sMMO durch Hydroxylierung des Naphthalins gebildete 1-Naphthol reagierte mit dem Echtsalzblau zu einem Diazofarbstoff (siehe Abbildung 2-1). Die gebildete 1-Naphthol-Konzentration pro Zeit und Biomassekonzentration ergab die sMMO-Ganzzell-Aktivität.

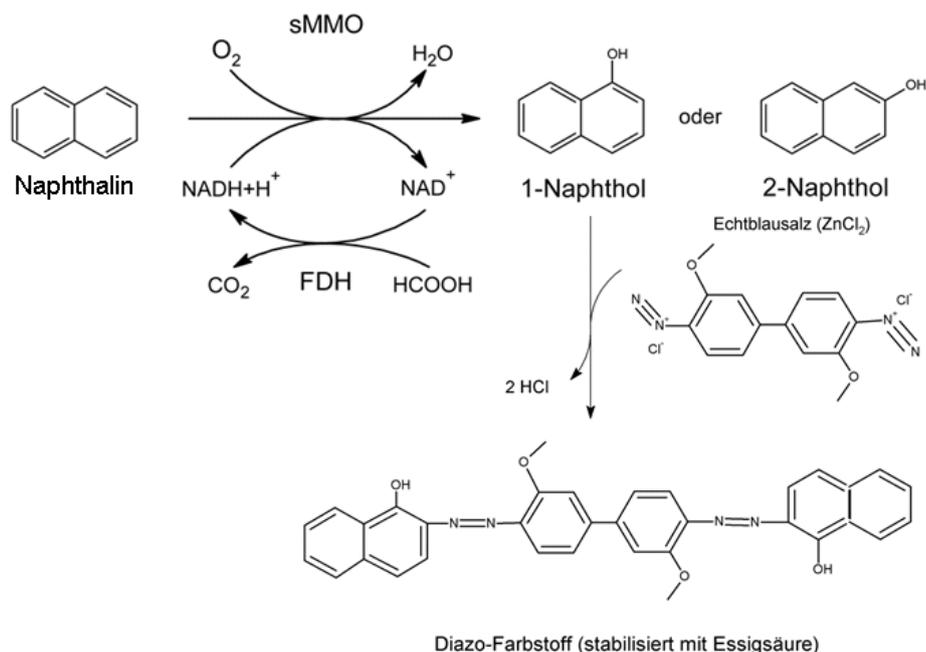


Abbildung 2-1: Reaktionsschema des Ganzzell-Naphthalin-Assays zur Bestimmung der sMMO Ganzzell-Aktivität. Das gebildete 1-Naphthol reagiert in der Folgereaktion mit Echtsalzblau zu einem spektroskopisch nachweisbaren Diazofarbstoff (A_{525}). FDH- Formiat-Dehydrogenase [Dillmann, 2014; Marston *et al.*, 2002; Schöpfer, 2014]

2.4.4.2 Nitrobenzol-Assay

Die Bestimmung der sMMO-Aktivität im Nitrobenzol-Assay erfolgte in Anlehnung an die Arbeit von Froland und Kollegen [Froland *et al.*, 1992]. Nitrobenzol wird von der sMMO zu *p*-Nitrophenol bzw. *m*-Nitrophenol hydroxyliert. Je nach Vorhandensein von MMOB variiert das Produktverhältnis. Bei einem optimalen $\text{MMOH}_{\text{aktive Zentren}} : \text{MMOB-Verhältnis}$ (1:1 μM) liegt es bei *para*: *meta* = 9:1. *p*-Nitrophenol besitzt ein Absorptionsmaximum bei 404 nm. Aufgrund der Überlagerung des Signals mit dem NADH Maximum bei 340 nm, erfolgte die Analyse der *p*-Nitrophenolbildung bei 420 nm. Die Absorption von *m*-Nitrophenol in diesem Wellenlängenbereich war vernachlässigbar. Das Reaktionsschema der sMMO Reaktion mit Nitrobenzol als Substrat ist in Abbildung 2-2 dargestellt.

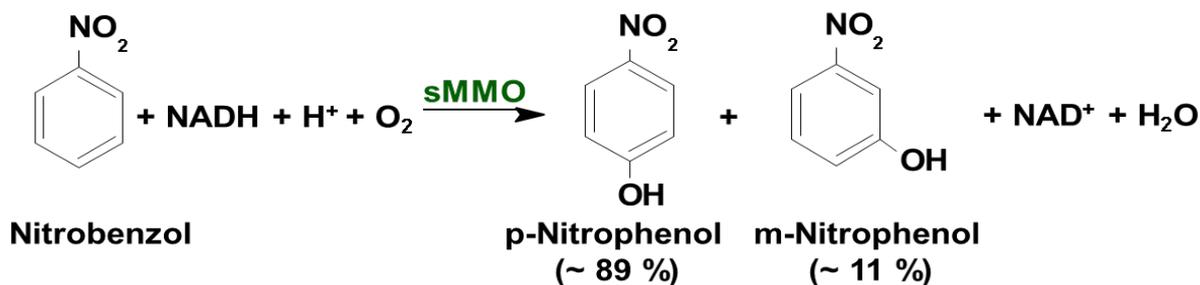


Abbildung 2-2: Reaktion der sMMO mit Nitrobenzol zu *p*- bzw. *m*-Nitrophenol im Produktverhältnis 9:1 nach [Froland *et al.*, 1992]

2.4.4.2.1 Rohextrakt-Aktivität von Zellen mit CH₄ oder CH₃OH als C-Quelle

Die Zellen wurden nach der Kultivierung (beschrieben in Kapitel 2.3.1.1 und 2.3.1.2) über Zentrifugation (17700 g bei 4 °C für 45 Minuten) geerntet. Ein Teil der Biofeuchtmasse (BFM) wurde in flüssigen N₂ eingefroren und für zwei Wochen bei – 80 °C gelagert. Die folgende Bearbeitung war für eingefrorene und frische BFM identisch. Nach Auftauen bzw. Zellernte wurde die BFM in Aufschlusspuffer (25 mM MOPS pH 7,0, 5 mM Na-Thioglycolat, 1 mM PMSF, 2 mM MgCl₂ und 31.2 U*mL⁻¹ Benzonase) resuspendiert. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss im Hochdruckhomogenisator (HDH) durch dreimalige Passage bei 1.000 bar. Nach erneuter Zentrifugation (45 Minuten bei 4 °C und 105.000 g) wurde der Überstand (Rohextrakt) abgenommen. Die Proteinkonzentration (Bradford) und die sMMO-Aktivität des Rohextraktes wurden gemessen. Die eingesetzte Rohextraktkonzentration betrug bei Aktivitätsmessungen 1 bis 2 mg*L⁻¹ Protein im 0,5 mL Messansatz mit 1,5 mM Nitrobenzol. Als Messpuffer wurde 25 mM MOPS pH 7,0 verwendet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von NADH auf eine Endkonzentration von 1 mM (25 mM Stock im Messpuffer) bei 30 °C gestartet und die *p*-Nitrophenolbildung bei 420 nm mittels UV/Vis-Spektrometer (Ultrospec 2100) verfolgt. Die Berechnung der sMMO-Aktivität erfolgte aus dem Anstieg der Progresskurve bezogen auf die eingesetzte Proteinmenge in $\mu\text{mol}_{p\text{-Nitrophenol}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{Protein}}^{-1} = \text{mU} \cdot \text{mg}_{\text{Protein}}^{-1}$.

2.4.4.2.2 Analyse mit gereinigten Proteinen

Die Analyse der sMMO-Aktivität mit gereinigter sMMO erfolgte entweder mit frisch gereinigten Proteinen oder mit Proteinen nach Auftauen und Zentrifugation (4 °C, zehn Minuten; 25.000 g). Zuvor erfolgte immer eine Bestimmung der Proteinkonzentration. Für gereinigte MMOH, rek. MMOB, MMOB und SUMO-MMOB erfolgte die Bestimmung mittels Extinktionskoeffizient (Tabelle 2-9), für Rohextrakte sowie MMOR-Fraktionen über die Messung nach Bradford. Messpuffer für die Aktivitätsmessungen war entweder 50 mM Tris, 25 mM MES, 25 mM Natriumacetat pH 7,5; 25 mM MOPS pH 7,0 oder 25 mM MOPS + 50 mM NaCl pH 7,5. Die Messungen erfolgten entweder im 0,5 mL-Maßstab in der Küvette im UV/Vis-Spektrometer (Ultrospec 2100) oder im 0,2 mL-Maßstab im Spektrometer (Fluostar Galaxy). Wenn nicht anders dokumentiert wurden die sMMO Komponenten (MMOH, MMOB, MMOR) im Verhältnis 1:1:1 μM zugegeben und eine Nitrobenzolkonzentration von 1 oder 5 mM eingestellt (Stock 15 mM in Messpuffer). Die Messungen mit Rohextrakt erfolgten mit einer Proteinkonzentration von 1 bis 2 mg*mL⁻¹. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von NADH auf eine Konzentration von 1 mM (Stock 25 mM in Messpuffer). Der Anstieg des Absorptionssignals bei 420 nm wurde dokumentiert ($\Delta E \cdot \text{min}^{-1}$). Aus dem Anstieg wurde mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten für *p*-Nitrophenol die spezifische Startaktivität in $\mu\text{mol}_{p\text{-Nitrophenol}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{Aktive Zentren}}^{-1}$ berechnet (1 U = 1 $\mu\text{mol}_{p\text{-Nitrophenol}} \cdot \text{min}^{-1}$, die verwendeten Extinktionskoeffizienten sind in Tabelle 7-3, S.185 im Anhang aufgelistet). Die spezifische Aktivität bezog sich auf die Menge der eingesetzten aktiven Zentren innerhalb der MMOH bzw. des eingesetzten Proteins. Die Messungen erfolgten, wenn nicht anders gekennzeichnet, bei einer Temperatur von 30 °C.

2.4.4.2.3 Eisen-Rekonstitution der Hydroxylase

Die Eisen-Rekonstitution erfolgte in Anlehnung an Protokolle aus der Literatur [Merkx und Lippard, 2002; Sazinsky *et al.*, 2004]. Der Eisen-Rekonstitutionspuffer bestand aus 25 mM MOPS pH 7,0 mit 120 mM NaCl, 2 mM DTT (oder DTE), 5 v/v% Glycerin, 0,5 mM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ und wurde für jede Messreihe frisch hergestellt. 47,5 μM MMOH_{aktive Zentren} wurden im Rekonstitutionspuffer bei 25 °C inkubiert und nach verschiedenen Zeitpunkten MMOH zur Aktivitätsmessung mittels Nitrobenzol-Assay entnommen. Für alle weiteren Mes-

sungen wurde eine feste Inkubationszeit von 30 Minuten gewählt. Im Anschluss an diese Inkubationszeit wurde die MMOH im sMMO-Aktivitätsassay eingesetzt.

2.4.4.2.4 Einfluss des pH Wertes

Die Messungen zum Einfluss des pH-Wertes erfolgten im 0,2 mL-Maßstab im Spektrometer (Fluostar Galaxy) mit dem Dreikomponentenpuffer (50 mM Tris, 25 mM MES 25 mM Natriumacetat) bei verschiedenen pH-Werten. Der pH-Wert des Messpuffers wurde vor der Messung mit NaOH bzw. HCl eingestellt und als Kontrolle beim gesamten Messsystem (Puffer+ Enzym- bzw. Substratlösung) nachgemessen. Die Extinktionskoeffizienten für *p*-Nitrophenol bei 420 nm und dem jeweiligen pH-Wert wurden zuvor in der (96 well-Platte bestimmt (Tabelle 7-3, S.185 im Anhang)

2.4.4.2.5 Einfluss der Salzkonzentration

Die Messungen erfolgten im Spektrometer im 0,2 mL-Maßstab. Als Messpuffer wurden der Dreikomponentenpuffer (50 mM Tris 25 mM MES 25 mM Natriumacetat, pH 7,5), sowie 25 mM MOPS pH 7,5 mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen (0 bis 150 mM) eingesetzt. Die Berechnung der Ionenstärke aus der Leitfähigkeit erfolgte mit dem Ansatz von Marion und Bakcock sowie Sposito für $I \leq 0.3$ M nach Formel 2-3 [Marion und Babcock, 1976; Sposito, 2008].

$$I [M] = \frac{0,991}{\sqrt{6,67 \cdot 10^4}} \sigma \left[\frac{\mu S}{cm} \right] \quad (\text{Formel 2-3})$$

2.4.4.2.6 Einfluss der Temperatur

Die Messungen erfolgten im Rahmen der Masterarbeit von Anne Kind [Kind, 2016] mit der MMOH und MMOR, gereinigt wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben. Rekombinant produziertes MMOB wurde für die Messungen verwendet [Kind, 2016]. Die Kontrolle der Temperatur (10 bis 60 °C) in der Messzelle erfolgte mittels eines Kryostats (HAAKE Phoenix II). Die Messungen erfolgten im 0,5 mL-Maßstab.

Die Messung der Temperaturstabilität erfolgte bei 30 °; 37 °C und 40 °C. Die Kontrolle der Temperatur erfolgte über einen Kryostaten (HAAKE Phoenix II) und einen Inkubator für die Messlösungen bzw. Proteine. (Eppendorf ThermoStat plus). Die sMMO Komponenten wurden bei der jeweiligen Temperatur inkubiert (10:5:5 µM H:B:R) und aus diesem Ansatz wurde nach definierten Zeitpunkten die sMMO-Aktivität bestimmt.

2.4.4.2.7 Vergleich des homolog produzierten Protein B mit dem rekombinant in *E. coli* produziertem Protein B

Die Messungen erfolgten im 0,2 mL-Maßstab im Spektrometer. Als Messpuffer wurde der Dreikomponentenpuffer (50 mM Tris 25 mM MES 25 mM Natriumacetat, pH 7,3) eingesetzt. Die Messungen erfolgten mit dem in Kapitel 2.3.2.3 gereinigten homologen MMOB und mit rekombinant in *E. coli* gebildeten MMOB zw. SUMO-MMOB. Reinigung beschrieben in den Arbeiten von Dillmann und Kind [Kind, 2016] [Dillmann, 2014].

2.4.4.2.8 sMMO-Aktivität bei unterschiedlichen SUMO-MMOB-Konzentrationen

Die Analyse der sMMO-Aktivität mit MMOB und SUMO-MMOB bei verschiedenen Konzentrationen erfolgte im Nitrobenzol- und im CH₄-Assay analog zur Vorgehensweise in den Kapiteln 2.4.4.2.2 und 2.4.4.3. Es wurden SUMO-MMOB/MMOB zu MMOH-Verhältnisse von 1:1; 1:8; 1:15; 1:30 für Nitrobenzol und 1:1 sowie 1:15 für CH₄ gesetzt. Die MMOH- bzw. MMOR-

Konzentration betrug jeweils 1 μM . Die Analyse der CH_3OH -Konzentration erfolgte mittels Gaschromatographie mit angeschlossener Kopfraumanalyse (GC-HSS, Kapitel 2.4.7.2).

2.4.4.2.9 Umsatz im Nitrobenzol-Assay

Die Messungen erfolgten im 0,2 mL-Maßstab im Spektrometer. Als Messpuffer wurde 50 mM Tris 25 mM MES 25 mM Natriumacetat, pH 7,5 eingesetzt. Die Messungen erfolgten bei unterschiedlichen Startkonzentrationen an Nitrobenzol (0,25; 0,5; 1,0; 1,5 und 5 mM). Bei Messungen mit Zusatz an sMMO \pm NADH wurde nach einer Messzeit von zwei bis drei Minuten (Kapitel 2.4.4.2) sMMO (1 μM) \pm NADH (1 mM) zum Reaktionsansatz zugegeben und die Absorption bei 420 nm weiter beobachtet.

2.4.4.2.10 Untersuchung der sMMO-Aktivität im Nitrobenzol-Assay nach Trennung der sMMO von der Reaktionslösung

Nach Stagnieren des 420 nm Signals nach zwei bis drei Minuten im Nitrobenzol-Assays mit 2 μM sMMO im Ansatz (2,5 mL) wurde die Reaktionsbrühe auf eine mit Messpuffer (Tris-MES-Acetate, pH 7,5) gespülte PD-10 Säule (Sephadex G-25; 8,3 mL; GE Healthcare) gegeben. Das Protein wurde mit 3,5 mL Puffer eluiert und aufgefangen (2,0 bis 2,5 mL). Der Beginn der Protein-elution wurde mit qualitativem Bradford-Nachweis verfolgt. Die Proteinkonzentration (Bradford Bestimmung) wurde vor und nach der PD-10-Säulen chromatographie gemessen. Anschließend wurde ein erneuter Nitrobenzol-Assay (0,5 mL) mit dem Eluat durchgeführt. Die Verdünnungen wurden für die Aktivitätsberechnung berücksichtigt.

2.4.4.2.11 HCHO-Stabilität der sMMO

Die Messungen erfolgten im 0,2 mL-Maßstab im Spektrometer. Als Messpuffer wurde 50 mM Tris 25 mM MES 25 mM Natriumacetat, pH 7,5 sowie 25 mM MOPS 50 mM NaCl pH 7,5 eingesetzt. Die Messungen erfolgten bei unterschiedlichen HCHO-Konzentrationen, die direkt zum Messansatz gegeben wurden.

Weiterhin wurde die Stabilität gegenüber HCHO untersucht, indem 10 μM sMMO mit verschiedenen HCHO-Konzentrationen bei 30 °C inkubiert wurden und nach definierten Zeitpunkten die sMMO-Aktivität im Nitrobenzol-Assay gemessen wurde.

2.4.4.2.12 Einfluss von H_2O_2 auf die Aktivität und Stabilität der sMMO

Die Untersuchungen zum Einfluss der H_2O_2 Konzentration auf die sMMO-Aktivität erfolgten im 0,2 mL-Maßstab im Spektrometer. Die Messungen erfolgten bei verschiedenen H_2O_2 und Nitrobenzolkonzentrationen

Die Untersuchungen bezüglich der Stabilität erfolgten mit 10 μM sMMO (HBR Verhältnis 1:1:1 μM) in Gegenwart von 0 bis 1.000 μM H_2O_2 im Messpuffer (Dreikomponentenpuffer pH 7,5). Die Proben mit der sMMO und H_2O_2 wurden bei 30 °C inkubiert und nach verschiedenen Zeitpunkten wurde direkt aus dem Ansatz die sMMO-Aktivität im Nitrobenzol-Assay bestimmt.

2.4.4.2.13 HPLC-Analyse

Der Reaktionsansatz (0,5 mL) mit der sMMO (Verhältnis 1:1:1 μM) wurde im Messpuffer (25 mM MOPS+ 50 mM NaCl pH 7,5) mit 1 mM Nitrobenzol bei einer Temperatur von 30 °C durch Zugabe von 1 mM NADH gestartet. Die Reaktion wurde nach fünf bis zehn Minuten durch Zugabe von 5 % Trichloressigsäure (TCA, aus 50 % Stock) gestoppt und für zehn Minuten bei 25 °C mit 25.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in HPLC-Vials mit Inlets (150 μL) gefüllt. Die HPLC-Analyse erfolgte mittels einer Anlage der Firma Thermo separation products (Spectra System SN4000; Spectra System UV1000; Spectra System P2000; Spectra System AS3000) bei einer Laufzeit von 15 Minuten, isokratisch mit

35 % Acetonitril, 65 % ddH₂O und 0,1 % Acetat bei einem Probenvolumen von 50 µL. Es wurde eine 15 cm C18 Säule (YMC-Pack ODS-A 15cmx 4,6 mm; particle size 5 µM; pore size 12 nm) mit einer Flussrate von 1 mL*min⁻¹ eingesetzt. Die Analyse erfolgte mit einem UV/Vis-Detektor bei einer Wellenlänge von 254 nm mit dem Programm ChromQuest. Zur Quantifizierung wurde eine Kalibrierung mit *m*- bzw. *p*-Nitrophenol (0 bis 50 µM) unter den gleichen Bedingungen durchgeführt.

2.4.4.2.14 sMMO-Aktivität mit immobilisierter MMOH an ReliZyme™

Die Aktivitätsbestimmungen im Nitrobenzol-Assay erfolgten, wie zuvor beschrieben, mit folgenden Änderungen. Es wurden jeweils 20 mg Immobilisat (0,1 mg_{MMOH}*mg_{Träger}⁻¹ = 1,6 µM MMOH_{aktive Zentren} gesamt) mit jeweils 1,6 µM MMOR und MMOB sowie Nitrobenzol (1 mM) in 0,5 mL Messpuffer gegeben. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 1 mM NADH gestartet und die Lösung bei 30 °C im Eppendorf Thermoblock bei 900 rpm für 10 bis 15 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 8 °C und 25.000 g für zwei Minuten und die Analyse des Überstandes mittels Spektrometer bei 420 nm sowie HPLC-Analyse.

2.4.4.2.15 sMMO-Aktivität mit immobilisiertem SUMO-MMOB an *Streamline Chelating*

Die Aktivitätsmessungen erfolgten mit 20 mg *Streamline Chelating*-Material beladen mit SUMO-MMOB (Komplettbeladung mit 0,072 mg_{SUMO-MMOB}*mg_{Streamline}⁻¹, = 50 µM). Die Messungen und die Analyse erfolgten identisch zu den Messungen mit ReliZyme™.

2.4.4.3 CH₄-Assay

2.4.4.3.1 Analyse mit gereinigten Proteinen

Die Analyse erfolgte mit dem Dreikomponentenpuffer (50 mM Tris 25 mM MES 25 mM Natriumacetat) pH 7,5. Die verwendeten Glasreaktionsgefäße hatten ein Gesamtvolumen von 9 mL. Es wurde ein Gesamtflüssigvolumen von 1 mL verwendet. Die eingesetzte sMMO-Konzentration (MMOH_{aktive Zentren}:MMOB:MMOR = 1:1:1) betrug 3 µM. In verschiedenen Ansätzen wurden Katalase (640 U*mL⁻¹) und Glucose 1-Dehydrogenase (75 mU*mL⁻¹) mit 50 mM Glucose zugegeben. Alle Enzymkomponenten wurden im Puffer vorgelegt und das Glasgefäß anschließend luftdicht mittels PTFE/Silikon Septum und Aluminium Bördelecke verschlossen. Es wurden 1,6 mL der Gasatmosphäre aus dem Vial entnommen und 1,6 mL CH₄ (99,995 %) zugegeben. Es folgte eine Inkubation bei 30 °C und 150 rpm im Schüttler für fünf Minuten. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 mM NADH/NAD⁺ (100 µL aus 10 mM Stock in Messpuffer) gestartet. Die Inkubationstemperatur betrug 30 °C, mit einer Schüttelfrequenz von 150 rpm. Nach drei bzw. zehn Minuten wurde das Gefäß geöffnet und die Reaktion durch Zugabe von 28 µL 18 M Essigsäure (0,5 M Endkonzentration) abgestoppt. Die Probe wurde für zehn Minuten bei 25 °C und 25.000 g zentrifugiert und anschließend mittels GC-HSS-Analyse und HCHO-Analyse vermessen. Für jede Probe wurde eine Vergleichsprobe vor der Reaktion (Nullprobe) und eine Probe ohne Enzyme analysiert.

2.4.4.3.2 Immobilisierte MMOH an ReliZyme™

Die Analyse der sMMO-Aktivität im CH₄-Assay erfolgte mit 100 mg Immobilisat (0,1 mg_{MMOH}*mg_{Träger}⁻¹ = 8,0 µM MMOH gesamt). MMOR und MMOB wurden ebenfalls in einer Konzentration von 8 µM zum Gesamtvolumen von 1 mL zugegeben. Nach Zugabe der Proteine und des Messpuffers wurde das Gefäß (Gesamtvolumen 9 mL) luftdicht mittels PTFE/Silikon Septum und Aluminium Bördelecke verschlossen. Es wurden 1,6 mL Gasatmosphäre aus dem Vial entnommen und mit 1,6 mL CH₄ (99,995 %) ersetzt. Die Probe wurde für fünf Minuten bei 30 °C und 150 rpm (Innova Schüttler) inkubiert. Der Reaktionsstart erfolgte durch

Zugabe von NADH auf 1 mM. Nach 15 Minuten Reaktion bei 30 °C und 150 rpm (Innova Schüttler) wurde das Gefäß geöffnet und die Reaktion durch Zugabe von 28 µL 18 M Essigsäure (0,5 M Endkonzentration) abgestoppt. Nach Zentrifugation des Immobilisats (zwei Minuten, 8 °C, 25.000 g) wurde die Flüssigphase separiert. Die Analyse der Flüssigphase erfolgte mittels GC-HSS Messung (Kapitel 2.4.7.2). Parallel zur Analyse des Immobilisats erfolgte die identische Analyse mit der gleichen Menge an freier MMOH.

2.4.4.3.3 Immobilisiertes SUMO-MMOB an *Streamline Chelating*

Die Analyse erfolgte mit 100 mg *Streamline Chelating* mit Komplettbeladung an SUMO-MMOB ($0,072 \text{ mg}_{\text{SUMO-MMOB}} \cdot \text{mg}_{\text{Streamline}}^{-1} = 250 \text{ µM}$ gesamt). Die zugegebenen MMOB und MMOH-Konzentrationen betragen je 8 µM. Die Messungen und Analysen erfolgte identisch zu den Messungen mit ReliZyme™. Es wurden zudem Proben mit Material ohne SUMO-MMOB Beladung, ohne Material und mit freiem Enzym angesetzt und analysiert.

2.4.4.4 CH₃OH-Assay

Die Analyse erfolgte in Dreikomponentenpuffer (50 mM Tris 25 mM MES 25 mM Natriumacetat) pH 7,5. 1 µM sMMO mit H:B:R = 1:1:1 wurden eingesetzt. Die Reaktion erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 0,5 mL bei 30 °C. Es wurde 1.000 µM CH₃OH als Substrat vorgelegt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mM NADH (25 mM Stock) gestartet und nach fünf Minuten durch Zugabe von Essigsäure (28 µL) auf 0,5 M abgestoppt. Nach Zentrifugation für zehn Minuten bei 25.000 g erfolgte die Analyse der HCHO-Konzentration mittels eines Test Kits (LCK325) der Firma Hach (Düsseldorf), siehe Kapitel 2.4.5.

2.4.4.5 Einsatz von Katalase und Glucose 1-Dehydrogenase innerhalb der sMMO-Aktivitätsmessung

Katalase (80 bis 640 U*ml⁻¹) wurde als Zusatz innerhalb der sMMO-Aktivitätsmessungen mit Nitrobenzol und CH₄ als Substrat getestet. Ebenso erfolgte der Zusatz an Glucose 1-Dehydrogenase (GDH, 75 mU*mL⁻¹) für die sMMO-Aktivitätsmessungen mit Nitrobenzol und CH₄. Wurde die GDH eingesetzt, so erfolgte der Zusatz an 1 mM NAD⁺ und 50 mM Glucose statt 1 mM NADH. Des Weiteren erfolgten auch kombinierte sMMO-Aktivitätsmessungen mit Katalase und GDH.

2.4.4.6 MMOR-Aktivität im DCPIP-Assay

Die Analyse der MMOR-Aktivität erfolgte spektroskopisch mittels 2,6-Dichlorphenolindophenol bei einer Wellenlänge von 600 nm (UltraSpec 2100), in Anlehnung an die Arbeit von Fox und Kollegen [Fox *et al.*, 1990]. In einem Reaktionsvolumen von 0,5 mL wurde eine Konzentration von 100 µM DCPIP (1 mM Stock) mit Messpuffer (25 mM MOPS, pH 7,0) hergestellt. Die eingestellte MMOR-Konzentration variierte je nach Reinheit von 0,125 bis 50 µg*mL⁻¹. Nach Zugabe von MMOR erfolgte der Reaktionsstart über die Zugabe von NADH (finale Konzentration 1 mM aus 25 mM Stocklösung in Messpuffer frisch hergestellt). Aus dem beobachteten Absorptionsabfall bei 600 nm über die Reaktionszeit wurde die spezifische MMOR-Aktivität (µmol DCPIP*min⁻¹*mg⁻¹) berechnet, dabei wurde ein Extinktionskoeffizient von 13.000 M⁻¹*cm⁻¹ verwendet [Fox *et al.*, 1990]. MMOR überträgt die Elektronen vom NADH auf DCPIP welches von der oxidierten (blau) in die reduzierten (farblos) Form wechselt. Auch ohne MMOR-Zusatz reagiert DCPIP mit NADH und verändert seine Farbe/den Oxidationszustand. Diese Blindreaktion wurde für jede MMOR-Konzentration durchgeführt und das erhaltene Signal (Anfangsanstieg) von dem Signal mit MMOR-Zusatz abgezogen.

2.4.5 Analyse der HCHO-Konzentration mittels Hach Test Kit nach Nash

Die Analyse erfolgte in Anlehnung an die HCHO-Bestimmung nach Nash mit dem kommerziell verfügbaren Test Kit der Firma Hach [Nash, 1953]. 70 μL der Probe wurden mit 70 μL Lösung A (Acetyl-Aceton) und 70 μL Lösung B (Ammoniumacetat) für zehn Minuten bei 40 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben 45 Minuten bei 22 °C inkubiert und dann bei einer Wellenlänge von 415 nm (HCHO-Analyse der Reaktorversuche aus Kapitel 3.6) bzw. 420 nm (Analyse der HCHO-Konzentration in Kapitel 3.4.4 in einer 96 well Platte vermessen. Die Quantifizierung erfolgte über den Vergleich der Absorption mit einer zuvor erstellten HCHO-Kalibriergerade bei identischen Bedingungen.

2.4.6 Analyse der H₂O₂-Konzentration mittels YSI 2700 Biochemistry Analyzer

Die H₂O₂ Konzentration wurde mittels YSI 2700 Biochemistry Analyzer (Yellow Springs Instruments) bestimmt. Dabei wurde vom Gerät eine Probe (25 μL) aufgesaugt und daraus die H₂O₂-Konzentration über die gemessene Stromstärke nach der folgenden Reaktion an einer Platinelektrode bestimmt ($\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}^+ + \text{O}_2 + 2\text{e}^-$). Die Kalibrierung erfolgte mit einer 290 μM H₂O₂-Lösung.

2.4.6.1 H₂O₂-Bildung

Die Untersuchungen zur H₂O₂-Bildung erfolgten innerhalb des sMMO-Aktivitätsassays mit Nitrobenzol. Dabei wurde in drei Versuchen nur MMOR; MMOH+MMOR und MMOH+MMOR+MMOB in einer Konzentration von 1 μM (HBR-Verhältnis = 1:1:1) eingesetzt. Die Messung der H₂O₂-Konzentration erfolgte zu definierten Zeitpunkten der Reaktion.

2.4.6.2 H₂O₂-Abbau

Die Untersuchungen zum H₂O₂-Abbau durch die sMMO erfolgten in Ansätzen mit 10 μM sMMO (MMOH:MMOB:MMOR-Verhältnis= 1:1:1) im Dreikomponentenpuffer (50 mM Tris 25 mM MES 25 mM Natriumacetat) bei pH 7,5. Verschiedene Startkonzentrationen von H₂O₂ wurden eingestellt und Ansätze bei 30 °C inkubiert. Die H₂O₂-Konzentration wurde nach definierten Zeitpunkten bestimmt. Nach 60 bzw. 90 Minuten Inkubation erfolgte die Bestimmung der sMMO-Aktivität im Nitrobenzol-Assay.

2.4.7 Gaschromatographische Analysen

2.4.7.1 CH₄-Konzentration in der Gasphase

Je 200 μL der Gasphase der zu untersuchenden Proben wurden mittels gasdichter Spritze entnommen und direkt in das GC-*Inlet* injiziert. Nach der manuellen Injektion wurde die GC-Analyse gestartet. Folgende Parameter waren eingestellt. GC-System Agilent 7890 mit GC-Säule Agilent CP7381 PoraBOND U (25 mx 320 μm x 7 μm). *Inlet*-Temperatur 250 °C; Druck 19,232 psi; Flussrate 17,2036 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ *Septum purge*; *Split*-Verhältnis 1:100 und *Split flow* von 120 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Die Ofentemperatur am Start betrug 100 °C und das Temperaturprofil entsprach einer Minute bei 100 °C; 20 °C $\cdot\text{min}^{-1}$ auf 130 °C; eine Minuten bei 130 °C; 50 °C $\cdot\text{min}^{-1}$ auf 200 °C und nach Abkühlung zwei Minuten bei 100 °C; mit einer Gesamtlaufzeit der GC Messung von sieben Minuten. Der Flammenionisationsdetektor (FID) wurde mit

folgenden Einstellungen betrieben: Temperatur 250 °C; Druck 7 psi; Gasströme Luft 400 ml*min⁻¹; H₂ 20 ml*min⁻¹ und N₂ 25 ml*min⁻¹.

Die erhaltenen Chromatogramme wurden mit dem Auswerteprogramm ChemStation bearbeitet. Dabei erfolgten die Berechnung der Fläche der einzelnen Peaks und die anschließende Quantifizierung mit einer zuvor aufgenommenen CH₄-Messung für 100 % CH₄ unter den identischen Bedingungen (Ein-Punkt-Kalibrierung). Die Retentionszeit von CH₄ betrug 1,7 Minuten.

2.4.7.2 CH₃OH-Konzentration mittels GC-Headspace-Analyse

Die Probe wurde über eine Glaskapillare (5 µL) aufgesaugt und in ein Headspace Glasgefäß (22 mL) gegeben und mittels PTFE/Silikon Septum und Aluminium Bördelkappe verschlossen. Anschließend erfolgte die Analyse mittels GC-Headspace Sampling (GC-HSS). Dabei wurden folgende Parameter eingestellt: GC-System Agilent 7890 mit GC-Säule Agilent CP7381 PoraBOND U (25 mx 320 µm x 7µm). Inlettemperatur 250 °C; Druck 19,232 psi; Flussrate 17,2036 mL*min⁻¹; 1 ml*min⁻¹ *Septum purge*; *Split*-Verhältnis 1:10 und *Split flow* von 40 ml*min⁻¹. Die Ofentemperatur am Start war 120 °C und das Temperaturprofil betrug eine Minuten bei 120 °C; 20 °C*min⁻¹ auf 200 °C und zwei Minuten bei 200 °C, mit einer Gesamtlaufzeit der GC Messung von sieben Minuten. Der FID (Flammenionisation Detektor) wurde mit folgenden Einstellungen betrieben: Temperatur 300 °C; Gasströme Luft 400 ml*min⁻¹; H₂ 20 ml*min⁻¹ und N₂ 25 ml*min⁻¹.

Für den Agilent Headspace Sampler 7697 wurden folgende Einstellungen verwendet: Ofen 65 °C; Loop 70 °C und Transferstrecke 100 °C. Fülldruck 15 psi; Probenvolumen 1,5 mL; Äquilibrierzeit im Ofen 15 Minuten; Injektionszeit 0,5 Minuten, GC Zykluszeit zehn Minuten. Die erhaltenen Chromatogramme wurden mit dem Auswerteprogramm ChemStation bearbeitet. Dabei erfolgten die Berechnung der Fläche der einzelnen Peaks und die anschließende Quantifizierung mit einer zuvor aufgenommenen CH₃OH-Kalibriergerade unter den identischen Bedingungen. Die Retentionszeit von CH₃OH unter diesen Bedingungen war 1,14 Minuten.

2.4.8 Nachweis der Nitrat-Konzentration

Die Nitrat-Konzentration im Medium wurde nach Trennung des Überstandes von der Biomasse (Zentrifugation zehn Minuten, 4 °C, 25.000 g) über die Messung der Absorption bei 220 nm (Thermo Scientific, Genesys 10) gemessen und mit einer Nitratkalibriergerade im NMS-Medium quantifiziert.

2.4.9 Analyse der Metallkonzentrationen mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS)

2.4.9.1 Metallgehalt der Medien und der gereinigten Proteine

Die ICP-MS-Messungen zum Fe- und Cu-Gehalt der Medien bzw. des Wassers, das zur Medienherstellung verwendet wurden erfolgten durch Dr. Martin Herzberg (Institut für Biologie/Mikrobiologie, MLU). Die gereinigte MMOH-Fraktion wurde nach Eisen-Rekonstitution mittels Chromatographie an einer PD-10 Säule (2,5 mL Probenvolumen, 8,3 mL Säulenbettvolumen, Elution mit 3,5 mL 25 mM MOPS-Puffer pH 7,0 nach Herstellervorschrift GE) vom Puffer und den überschüssigen Eisenionen getrennt. Das eluierte Protein wurde mittels Ultrafiltrationseinheiten aufkonzentriert und anschließend die Proteinkonzentrationen der

Proben mittels Absorption bei 280 nm bestimmt. Neben dieser MMOH-Probe wurden auch Proben ohne Eisen-Rekonstitution und ohne Ultrafiltration analysiert.

2.4.9.2 Metallgehalt der Zellen und der Fermentationsüberstände

Für die Untersuchungen der Metallgehalte in den Zellen bzw. im Medium während der Fermentation wurden die Proben, die während der Fermentationen genommen wurden, verwendet. Die Proben wurden zentrifugiert (3.800 g, 30 Minuten, 4 °C) und der Überstand abgenommen, dieser wurde als Flüssigphase bezeichnet. Das Zellpellet der Zentrifugation wurde zweimal mit 25 mM Phosphatpuffer + 10 mM EDTA, pH 6,9 gewaschen und für 30 Minuten bei 4°C und 3.800 g zentrifugiert. Die OD₆₀₀ wurde vor der zweiten Zentrifugation bestimmt. Diese Proben wurden als Feststoffproben bezeichnet. Anschließend erfolgte die Untersuchung der Flüssig- und Feststoffproben über ICP-MS Analyse durch Dr. Martin Herzberg (Institut für Biologie/Mikrobiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg).

2.4.10 Analyse mittels Massenspektrometrie

Die Proteinbanden aus der SDS-PAGE wurden mittels Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 mL-Gefäß überführt. Die anschließenden massenspektrometrischen Analysen, tryptischer Verdau und LC-Massenspektrometrie, wurden von Dr. Angelika Schierhorn (Institut für Biochemie und Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Untersuchungen zur Kultivierung von *Methylosinus trichosporium* OB3b

Für die Bereitstellung größerer Mengen an sMMO war es nötig eine adäquate Kultivierungsstrategie zu entwickeln, die vom Schüttelkolben- in den Reaktormaßstab übertragen werden konnte. Da eine vollständige rekombinante Produktion der sMMO bisher nicht erfolgreich gezeigt wurde, erfolgte die Produktion der sMMO homolog mit dem methanotrophen Bakterium *Methylosinus trichosporium* OB3b. Die Fermentation mit CH₄ als C- und Energiequelle sollte aufgrund der technischen Anforderungen (z.B. Explosionsschutz) umgangen werden. In der Literatur wurde bereits ein Nachweis der sMMO-Bildung bei der Verwendung von CH₃OH als C-Quelle beschrieben [Yu *et al.*, 2009a]. Auf Basis dieser Ergebnisse sollten nach der Etablierung der Kultivierung mit CH₄, Kultivierungsexperimente mit CH₃OH als C-Quelle erfolgen. Der Erhalt der sMMO-Aktivität war, neben dem Wachstum, das vorrangige Ziel der Versuche im Schüttelkolbenmaßstab. Da die Cu(II)-Konzentration entscheidend für die Bildung der sMMO ist, erfolgten Kultivierungsversuche mit dem Cu(II)-Komplexbildner N-Allylthioharnstoff (ATU). Dieser wurde bereits erfolgreich für Fermentationen von *M. trichosporium* OB3b eingesetzt [Yu *et al.*, 2009b]. Anhand der Ergebnisse der Voruntersuchungen sollte in Kooperation mit dem Fraunhofer-Zentrum für Chemisch-Biotechnologische Prozesse (CBP) eine Fermentation von *M. trichosporium* OB3b mit CH₃OH als C-Quelle im 100 L Reaktor mit Nachweis der sMMO-Aktivität erfolgen.

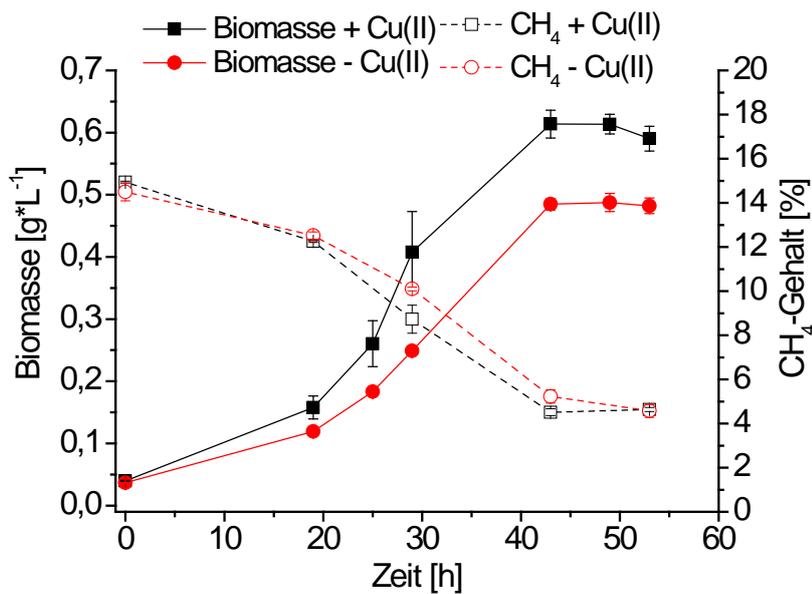
3.1.1 Kultivierung von *Methylosinus trichosporium* OB3b mit CH₄ als C-Quelle

3.1.1.1 Einfluss der Kupferionenkonzentration

Die Kultivierung mit CH₄ als C-Quelle erfolgte in gasdichten Kultivierungsflaschen (Gesamtvolumen 120, 240 oder 590 mL) unter 15 bis 20 % CH₄-Atmosphäre in NMS-Medium (nach [Best und Higgins, 1981; Cornish *et al.*, 1984], Tabelle 2-4, S.27, 2.3.1.1, S.28). Das Wachstum wurde durch die Analyse der OD₆₀₀ (2.3.1.1.2, S.28) und der Analyse des CH₄-Gehaltes im Gasraum der Kulturflasche verfolgt (2.4.7.1, S.45). Durch zusätzliche Zugabe von Cu(II) wurde die MMO-Produktion moduliert. Zur Untersuchung der MMO-Produktion erfolgte zum einen die Analyse mittels SDS-PAGE (2.4.1, S.35) und zum anderen die Bestimmung der Ganzzell-Enzymaktivität mittels Naphthalin-Assay (2.4.4.1, S.38). Die Korrelation von optischer Dichte bei 600 nm und der Biomasse von *Methylosinus trichosporium* OB3b (Kapitel 2.3.1.1.2, S.28) ist im Anhang in Abbildung 7-1 (S. 175) dargestellt. Die Wachstumskurven der Organismen mit und ohne Zusatz an 0,8 µM Cu(II), sowie der jeweilige CH₄-Gehalt in den Kultivierungsflaschen sind in Abbildung 3-1 A dargestellt. Die Analyse der Proteinverteilung während der Kultivierung mittels SDS-PAGE ist in Abbildung 3-1 B dargestellt.

Die Kulturen mit Cu(II)-Zusatz wiesen eine höhere spezifischen Wachstumsrate von $\mu = 0,073 \text{ h}^{-1}$ (im Zeitraum von 0 bis 43 h, berechnet mit Formel 2-1, S.29) auf, als die Kulturen ohne Cu(II)-Zusatz mit $\mu = 0,063 \text{ h}^{-1}$ (im Zeitraum von 0 bis 43 h). Dies entsprach der bereits bekannten Tendenz der Literaturwerte für das Wachstum von *M. trichosporium* OB3b mit CH₄ als C-Quelle (Cu(II)-Zusatz $\mu = \text{max. } 0,12 \text{ h}^{-1}$ bzw. ohne zusätzliches Cu(II) im Medium $\mu = \text{max. } 0,08 \text{ h}^{-1}$) [Bowman und Sayler, 1994; Koh *et al.*, 1993; Park *et al.*, 1991; Park *et al.*, 1992].

A



B

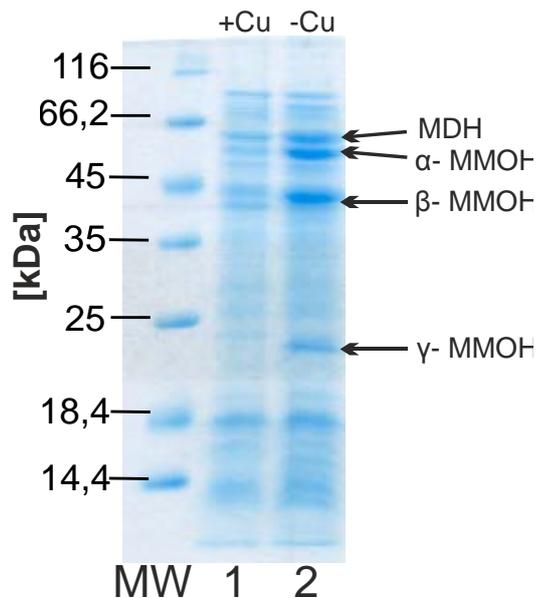


Abbildung 3-1: A-Biomassekonzentration und CH₄-Verbrauch von *Methylosinus trichosporium* OB3b mit und ohne 0,8 μM Cu(II) Zusatz während der Kultivierung. Dargestellt sind Mittelwerte aus n= zwei parallelen Kolben. Kultivierungsparameter 30 °C; Gesamtvolumen 240 mL; 24 mL NMS-Medium nach [Best und Higgins, 1981; Cornish *et al.*, 1984] ± 0,8 μM Cu(II); 150 rpm. B- 12,5 % SDS-PA-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der 1/OD₆₀₀-Proben mit (+) und ohne (-) 0,8 μM Cu(II) Zusatz nach 53 Stunden Kultivierung (MW PageRuler™). MDH-60 kDa, α-MMOH 60 kDa, β-MMOH 45 kDa, γ-MMOH 20 kDa. Die sMMO-Aktivität war, mittels Ganzzell-Naphthalin-Assay, nur bei den Kulturen ohne Cu(II)-Zusatz nachzuweisen.

Nach 43 Stunden wurde mit bzw. ohne Cu(II)-Zusatz keine weitere Steigerung der optischen Dichte gemessen. CH₄ war zu diesem Zeitpunkt nicht limitierend (5 % Restkonzentration). Unter Berücksichtigung der eingesetzten Gasvolumina (20 % CH₄ + 80 % Atmosphäre) war der limitierende Faktor für das Wachstum O₂. Um dies zu testen wurde in einem folgenden Experiment nach der Stagnation des Wachstums die Flasche geöffnet und die Ausgangs-

mosphäre (20 % CH₄+ 80 % Atmosphäre) erneut eingestellt. Nach erneuter Inkubation der Kultur konnte eine weitere Zunahme der Biomassenkonzentration gemessen werden (siehe Abbildung 7-2, S.175). Damit bestätigte sich die Vermutung, dass O₂ das limitierende Substrat in den Schüttelkolbenversuchen war. Für eine höhere Biomassenkonzentration erfolgte deshalb ein sequentieller Gasaustausch bei den Kulturen. Die SDS-PAGE-Analyse der Proben (Abbildung 3-1 B) zeigte ohne Zusatz von Cu(II) Proteinbanden, die den drei Untereinheiten der Hydroxylase (α = 60 kDa; β = 45 kDa; γ = 20 kDa) bzw. der Methanoldehydrogenase (MDH) zugeordnet werden konnten. In Gegenwart von 0,8 μ M Cu(II) waren die Proteinbanden der MMOH-Untereinheiten nicht zu erkennen bzw. deutlich schwächer ausgeprägt. Über den Ganzzell-Naphthalin-Assay konnte ausschließlich in den Kulturen ohne Cu(II)-Zusatz sMMO-Aktivität ($500 \mu\text{mol}_{1\text{-Naphthol}} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) gemessen werden.

Die Bildung der sMMO bzw. der pMMO kann auch mikroskopisch durch das Vorhandensein von Membranstapeln in den Zellen aufgezeigt werden (1.1.2.1, S.4, Abbildung 1-3, S.6). Der Organismus produziert vermutlich aufgrund der geringen Reaktionsgeschwindigkeit der pMMO große Mengen dieses membranständigen Enzyms. Um diese Menge an Enzym aufzunehmen, bildet *M. trichosporium* OB3b interne Membranstapel. Infolge der Umstellung auf sMMO-Bildung ist eine Bildung der internen Membranstapel unnötig und ineffizient, da der Zellinnenraum für das lösliche Enzym benötigt wird. Um die unterschiedlichen Zellmorphologien nachzuweisen erfolgten Aufnahmen der Kulturen aus Abbildung 3-1 mit einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM). Exemplarisch sind Einzelzellen dieser Kultivierungen in Abbildung 3-2 dargestellt. In den eigenen Messungen wurde, analog zu den Literaturdaten, die Bildung der internen Membranstapel nur in Kulturen mit Cu(II)-Zusatz beobachtet.

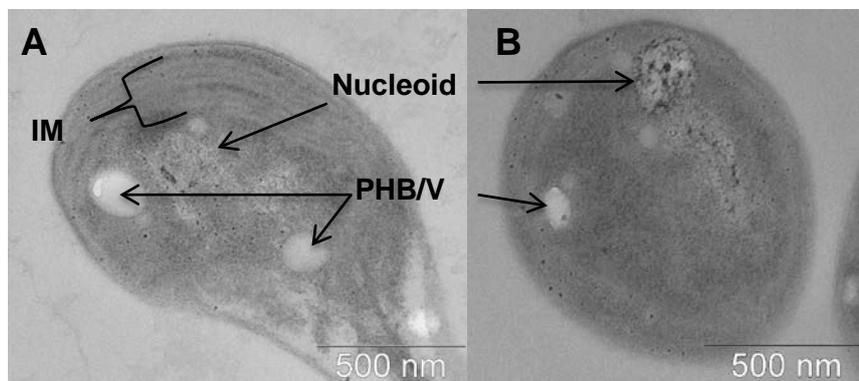


Abbildung 3-2: TEM-Aufnahmen nach der Kultivierung von *M. trichosporium* OB3b mit CH₄ als C-Quelle A mit 0,8 μ M Cu(II) Zusatz; B: ohne Cu(II)-Zusatz. Ausbildung der pMMO tragenden Membranstapel (IM) in A zu erkennen. Ohne Cu(II) Zusatz bei B fehlen dieser interne Membranstapel (IM), PHB/V- Speicherstoff z.B. Polyhydroxybutyrat oder Vakuole (V); Maßstabsbalken rechts unten entspricht 500 nm. Bedingungen der Kultivierung: 30°C; 150 rpm; je 24 mL NMS-Medium nach Best bzw. Cornish; 20 % CH₄.

3.1.1.2 Einfluss von N-Allylthioharnstoff als Cu(II)-Komplexbildner

Als Vorbereitung auf die Kultivierung mit CH₃OH im Reaktormaßstab (100 L) wurde der Einfluss des Cu(II)-Komplexbildners N-Allylthioharnstoff (ATU) auf den Organismus und die sMMO-Aktivität untersucht. Durch Zusatz an ATU sollte die sMMO-Bildung im Reaktormaßstab auch bei potentiellen Cu(II)-Kontaminationen z.B. durch Medien- bzw. Anlagenkomponenten garantiert werden. In der Literatur wurde ATU bereits zur sMMO-Bildung mit CH₄ bzw. CH₃OH in Gegenwart von Cu(II) im Medium eingesetzt [Yu *et al.*, 2009b]. Um die optimale ATU-Konzentration bei den eigenen Reaktionsbedingungen zu bestimmen, erfolgten

Untersuchungen mit verschiedenen ATU-Konzentrationen im NMS-Medium mit CH_4 . Die entsprechenden Wachstumskurven, CH_4 -Gehalte, berechneten spezifischen Wachstumsraten und sMMO-Aktivitäten sind in Abbildung 3-3 dargestellt.

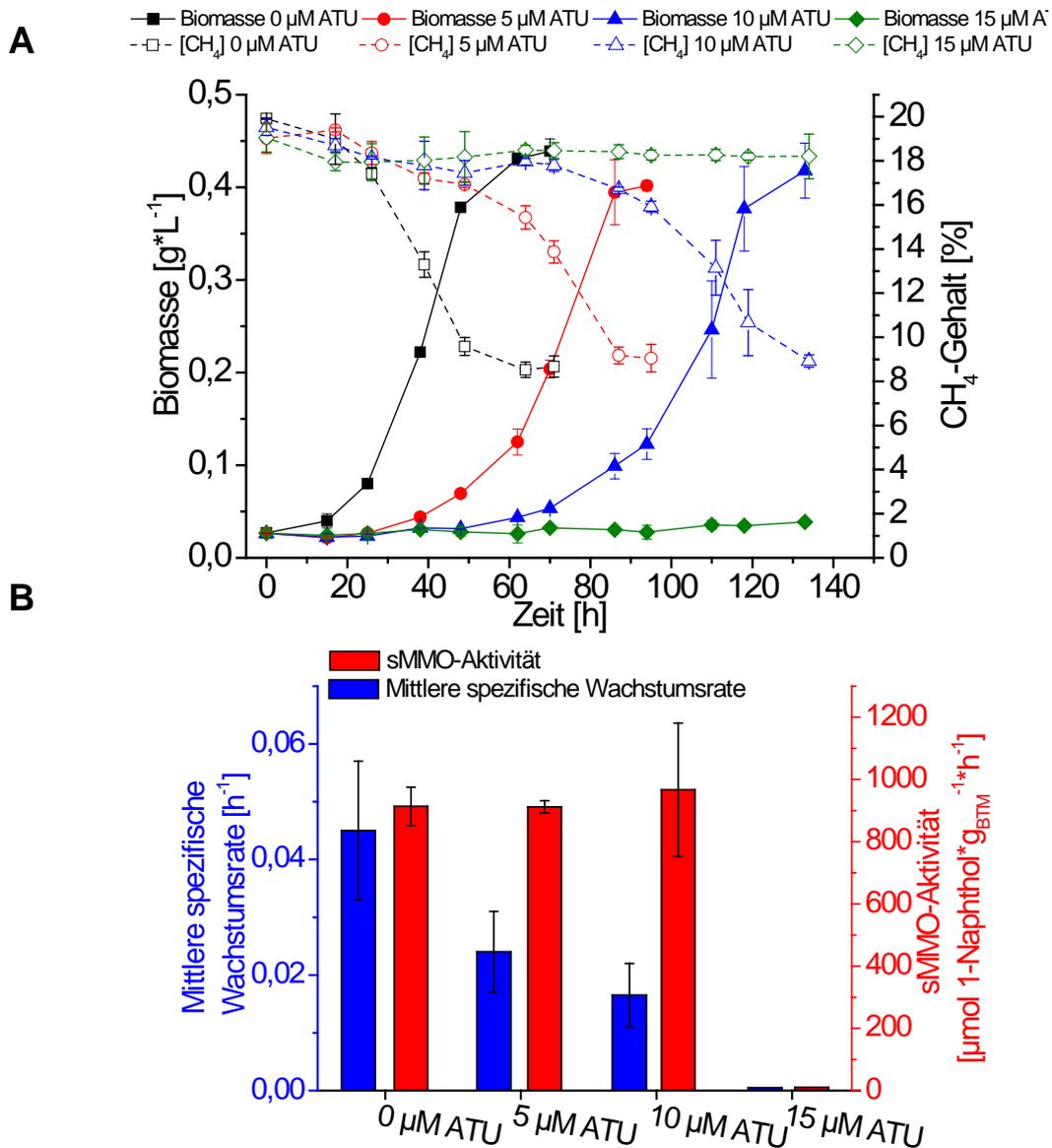


Abbildung 3-3: A: Biomasse- und CH_4 -Konzentration in der Kultivierung von *M. trichosporium* OB3b auf NMS-Medium mit verschiedenen N-Allylthioharnstoff (ATU)-Konzentrationen. Kultivierungsparameter 30 °C; 24 mL NMS-Medium nach [Best und Higgins, 1981; Cornish *et al.*, 1984]; 150 rpm B: Mittlere spezifische Wachstumsrate ($\bar{\mu}$) und spezifische sMMO-Aktivität ermittelt im Ganzzell-Naphthalin-Assay. Die dargestellten Werte entsprechen dem Mittelwert aus $n =$ zwei parallelen Kulturen/ Kolben.

Eine Inhibition des Wachstums von *M. trichosporium* OB3b durch ATU wurde in den eigenen Experimenten gezeigt. Je höher die eingesetzte ATU-Konzentration, umso länger war die initiale Phase des Wachstums. Ohne ATU wuchsen die Zellen sofort. Mit 5 bzw. 10 μM ATU wurde das Wachstum erst nach 30 bzw. 60 Stunden beobachtet. Bei Zusatz von 15 μM ATU konnte auch nach 140 Stunden kein Wachstum gemessen werden. Das Absinken des CH_4 -Gehaltes der Atmosphäre korrelierte jeweils mit dem Wachstum, Abbildung 3-3 A. Die gemessene sMMO-Aktivität am Ende Kultivierung, nachdem kein weiteres Wachstum mehr gemessen wurde, war für alle gewachsenen Kulturen, unabhängig von der ATU-

Konzentration, vergleichbar, Abbildung 3-3 B. Um in den geplanten Reaktorversuchen mögliche Cu(II)-Kontaminationen und damit verbunden die Unterdrückung der sMMO-Bildung zu vermeiden, wurde eine ATU-Konzentration von 5 μM für die Fermentationsexperimente festgelegt. Das Hauptziel der Fermentation war die Bildung von sMMO-haltiger Biomasse. Etwaige Verzögerungen des Wachstums wurden deshalb gegenüber einer stabilen sMMO-Bildung, die durch die Chelatierung von Cu-Verunreinigungen mittels ATU gewährleistet werden konnte, in Kauf genommen. Neben der Kupfer-Konzentration hat auch die Eisenkonzentration einen entscheidenden Einfluss auf die sMMO-Bildung. Für eine stabile sMMO Bildung und Aktivität wird eine Eisenkonzentration von $\geq 30 \mu\text{M}$ empfohlen [Park *et al.*, 1991]. Um die genauen Kupfer- und Eisenkonzentrationen in den für die Medienherstellung verwendeten Laborwässern und den hergestellten Medien zu untersuchen, erfolgten verschiedene Messungen mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) (2.4.9.1, S.46). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst.

Tabelle 3-1: Mittels ICP-MS ermittelte Kupfer- und Eisenkonzentrationen im für die Kultivierungen genutzten Laborwasser bzw. im eingesetzten NMS Medium.

Name	Kupferkonzentration [μM]	Eisenkonzentration [μM]
dH ₂ O Biozentrum Halle	0,729	0,019
ddH ₂ O TKA GenPure-Anlage	0,014	0,011
NMS-Medium [Cornish <i>et al.</i> , 1984]	0,150	23,260
NMS-Medium + 0,8 μM Cu(II)	0,860	26,010
VE H ₂ O CPB Leuna	0,038	0,019

Für die gesamte Medienherstellung wurde ausschließlich das ddH₂O aus der TKA GenPure Reinstwasser Anlage im Biozentrum Halle verwendet. Somit konnten die Cu(II)-Kontaminationen durch das Laborwasser auf 14 nM reduziert werden. Im fertigen NMS-Medium nach Best bzw. Cornish wurde eine Cu(II)-Konzentration von 150 nM gemessen [Best und Higgins, 1981; Cornish *et al.*, 1984]. Das zusätzliche Cu(II) stammte aus Cu-Verunreinigungen der eingesetzten Chemikalien. Mit diesem Medium wurden, bis auf wenige Ausnahmen, alle Kultivierungen mit CH₄ als C-Quelle durchgeführt. Eisen ist ein weiteres wichtiges Metall, da das aktive Zentrum der sMMO zwei Eisenatome enthält. Im NMS-Medium nach Best bzw. Cornish sind theoretisch 40 μM Eisenionen vorhanden, 23 μM bzw. 26 μM konnten mittels ICP-MS nachgewiesen werden. Das eingesetzte FeSO₄ kann mittels Luftsauerstoff zu Fe₂(SO₄)₃ oxidiert werden. Fe(III)-Ionen bilden mit Phosphat-Ionen in Wasser das schwerlösliche, gelbliche FePO₄x nH₂O (mehrere Hydratisierungsformen). Eine derartige Reaktion war vermutlich die Ursache für die Reduktion der gemessenen Fe-Konzentration im NMS-Medium. Für weitere Messungen erfolgte die Zugabe von Eisen zum Medium direkt vor dem jeweiligen Experiment um das beobachtete Ausfallen des gelblichen Niederschlages (vermutlich Eisenphosphat) zu vermeiden. In weiteren ICP-MS Untersuchungen mit einem andern Medium (Choi-Medium mit 50 μM Eisenzusatz, Tabelle 2-4, S.27) konnte die eingesetzte Eisenkonzentration nachgewiesen werden (48 bis 55 μM detektiert). Für die Fermentationsexperimente (Kapitel 3.2, S.68) wurde das VE-H₂O vom Fraunhofer-Zentrum für Chemisch-Biotechnologische Prozesse (CBP) in Leuna verwendet. Darin wurde eine 2,5-fach höhere Cu(II)-Konzentration gemessen, als im ddH₂O der Millipore Anlage des Biozentrums Halle. Test Kultivierungen auf dem NMS-Medium hergestellt mit dem CBP VE-

H₂O mit und ohne ATU Zusatz zeigten keine Unterschiede bezüglich des Wachstums und der sMMO-Aktivität von *M. trichosporium* OB3b (Daten nicht gezeigt).

Nach der erfolgreichen Reaktivierung der *M. trichosporium* OB3b Kulturen und Untersuchungen zur sMMO-Bildung im Schüttelkolbenmaßstab mit CH₄ als C-Quelle erfolgten Untersuchungen zur Kultivierung mit CH₃OH, die als Grundlage für die Fermentationsversuche dienen sollten.

3.1.2 Kultivierung mit CH₃OH als C-Quelle

Bei der Kultivierung von *Methylosinus trichosporium* OB3b mit CH₄ als C-Quelle im technischen Maßstab (>10 L) müssen unterschiedliche Aspekte beachtet werden. Dazu zählen die geringe Löslichkeit von CH₄ in wässrigen Lösungen (bei 30 °C 1,26 mM [Duan und Mao, 2006]), die Bildung von explosiven Gasgemischen mit Luft und die adäquate Kontrolle der CH₄-Konzentration in der wässrigen Phase. Diese Anforderungen sind u.a. kostenintensiv (Explosionsschutz) und bei Fermentationsanlagen nicht standardmäßig vorhanden. Um die Kultivierung von *M. trichosporium* OB3b mit Produktion der sMMO im technischen Maßstab unter einfacheren Bedingungen zu ermöglichen, wurde eine Kultivierungsstrategie mit CH₃OH als C-Quelle entwickelt.

Das Wachstum von *M. trichosporium* OB3b mit CH₃OH und Erhalt der sMMO-Aktivität wurde bereits beschrieben (Kapitel 1.1.1.2, S.4) [Best und Higgins, 1981; Davis *et al.*, 1987; Yu *et al.*, 2009a]. Dabei wurden, je nach Kultivierungsart bzw. Zielprodukt, unterschiedliche Medien verwendet. Das Medium nach Choi wurde u.a. zur PHB-Produktion und in *Fed-Batch*-Fermentation von *M. trichosporium* OB3b mit CH₃OH als C-Quelle eingesetzt [Bourque *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 2009a]. In den *Fed-Batch*-Fermentationen und der vorangegangenen Stammhaltung auf CH₃OH wurde in der Literatur ein Verlust der sMMO-Aktivität dokumentiert. Keine Probleme beim Nachweis der sMMO-Aktivität und dem Wachstum mit CH₃OH wurden für das NMS-Medium nach Best bzw. Cornish beschrieben [Best und Higgins, 1981; Cornish *et al.*, 1984]. Das Wachstum der Zellen mit CH₃OH erfolgte dabei nach einer aufwändigen 10-tägigen Adaptationsphase mit gasförmigem CH₃OH. Diese Übergangsphase wird mit der Umstellung des C-Quellen Metabolismus der Organismen begründet. Das Wachstum der Organismen wurde bei einer maximalen CH₃OH-Konzentration von 1.000 mM beobachtet. Eine Verringerung der spezifischen Wachstumsrate wurde bereits ab CH₃OH-Konzentrationen von 30 bis 90 mM beschrieben [Adegbola, 2008; Yu *et al.*, 2009a]. Das toxische CH₃OH muss in die Zellen aufgenommen werden und wird anschließend zu HCHO und HCOOH weiter verstoffwechselt. Die Assimilation von Biomasse erfolgt ausgehend vom HCHO (Kapitel 1.1.1.1, S.4). Bei hohen CH₃OH-Konzentrationen kann die verstärkte Bildung von HCOOH zu einer Azidose der Zellen führen. Weiterhin kann eine hohe CH₃OH-Konzentrationen durch Interaktion mit der Zellmembran toxisch auf den Organismus wirken. Die 10-tägige Adaptationsphase von *M. trichosporium* OB3b mit CH₃OH als C-Quelle wurde bei Verwendung des Mediums nach Choi nicht beschrieben [Bourque *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 2009a].

Die verwendeten Medien nach Choi und Best bzw. Cornish wurden aufgrund ihrer Eigenschaften bezüglich des Wachstums mit CH₃OH und dem Erhalt der sMMO-Aktivität ausgewählt und für weiterführende Experimente verwendet. Eine Zusammenfassung der Medien und ausgewählte Inhaltstoffe dieser, sind in Tabelle 3-2 aufgelistet.

Das Ziel der Kultivierung von *Methylosinus trichosporium* OB3b mit CH₃OH war es eine Kultivierungsstrategie auf einem geeigneten Medium zu entwickeln, mit dem sowohl stabiles Wachstum mit CH₃OH, als auch eine hohe und stabile sMMO-Aktivität erreicht werden soll-

ten. Aufbauend auf den Versuchen im Schüttelkolbenmaßstab sollten in Kooperation mit dem Fraunhofer-Zentrum für Chemisch-Biotechnologische Prozesse (CBP) in Leuna Fermentationen zur Produktion von sMMO-aktiver *M. trichosporium* OB3b Biomasse durchgeführt werden. Dabei konnte eine bestehende Methanol-Strecke mit angeschlossenen Reaktoranlagen im Technikumsmaßstab (bis 100 L) genutzt werden.

Tabelle 3-2: Ausgewählte Komponenten der in der Literatur beschriebenen Medien zur Kultivierung von *Methylosinus trichosporium* OB3b mit CH₃OH

Name	Choi-Medium	NMS-Medium
Referenz	[Bourque <i>et al.</i> , 1995; Yu <i>et al.</i> , 2009a]	[Best und Higgins, 1981; Cornish <i>et al.</i> , 1984]
Komponente		
Wachstum mit CH ₃ OH [63-250 mM]	Direkt möglich	Nach Adaptationsphase (>10 d)
sMMO-Aktivität	Gering bis keine	Hoch
Fe(II) [µM]	4,7	40,3
PO ₄ ³⁻ [mM]	24,5	9,1
N-Quelle [mM]	7,6 (NH ₄ ⁺)	10,0 (NO ₃ ⁻)
Mg ²⁺ [mM]	1,83	0,15
HCO ₃ ⁻ [mM]	-	6

Ausgehend von den beiden in Tabelle 3-2 beschriebenen Medien wurden verschiedene Inhaltsstoffe identifiziert, die aufgrund ihrer Eigenschaften einen Einfluss auf das Wachstum mit CH₃OH und die sMMO Bildung bzw. Aktivität haben könnten. Diese Komponenten sind Hydrogencarbonat, Eisen, Magnesium, Phosphat und die jeweilige N-Quelle (Ammonium oder Nitrat). Deren Einfluss wurde im Weiteren genauer untersucht.

3.1.2.1 Medienoptimierung zum Nachweis des direkten Wachstums mit CH₃OH mit sMMO-Aktivität

Im Folgenden werden die Einflüsse der genannten Medienkomponenten, auf Basis von Literaturdaten, detaillierter beschrieben.

Der Zusatz an Hydrogencarbonat beschleunigte die initiale Wachstumsphase von *M. trichosporium* OB3b mit CH₃OH und auch mit CH₄ als C-Quelle [Davis *et al.*, 1987; Park *et al.*, 1991]. Hydrogencarbonat wird vom Organismus genutzt um den Serin-Zyklus mit Kohlenstoff Äquivalenten aufzufüllen.

Eisen ist essentiell für die sMMO-Aktivität, da es Bestandteil des aktiven Zentrum der MMOH ist. Aufgrund der großen Menge an sMMO innerhalb der Zelle (10 % des löslichen Proteins) ist eine hohe Konzentration an Eisenionen nötig, um eine ausreichende Versorgung des Enzyms mit Eisen zu gewährleisten. 10 µM ist die minimale Eisenkonzentration, die für das Wachstum von *Methylosinus trichosporium* OB3b mit CH₄, sowie dem Nachweis der sMMO-Aktivität beschrieben wurde [Bowman und Sayler, 1994]. Eisenionen sind neben der sMMO auch Bestandteil von anderen Enzymen z.B. Cytochrom C oder in Eisen-Schwefel-Clustern. Magnesium ist ebenfalls Cofaktor für viele Enzyme (Phosphatasen, Kinasen, Peptidasen). Darüber hinaus ist Magnesium als Mg²⁺ im Komplex mit Nukleotiden sowie in Reaktionen der Protein- und Nukleinsäuresynthese integriert [Saris *et al.*, 2000]. Für die Kultivierung von *Methylosinus trichosporium* OB3b mit CH₄ als C-Quelle wird eine minimale Konzentration von 0,05 mM Magnesium angegeben [Bowman und Sayler, 1994].

Phosphat wird in der Zelle als Bestandteil von Phospholipiden und als Rückgrat der DNA/RNA verwendet. Weiterhin werden Aminosäuren durch Übertragung von Phosphat modifiziert und dadurch die Eigenschaften von Proteinen beeinflusst. Für die Übertragung von Phosphat durch Kinasen wird u.a. Adenosintriphosphat (ATP) verwendet. Für die Kultivierung von *Methylosinus trichosporium* OB3b mit CH₄ wurde bei 40 mM Phosphat eine Reduktion des Wachstums beobachtet und mit der Inhibition der MDH durch Phosphat begründet [Park *et al.*, 1991]. Ein Konzentrationsbereich von 2– 25 mM Phosphat im Schüttelkolbenmaßstab wurde angegeben, in dem das Wachstum und die sMMO-Aktivität konstant waren [Bowman und Saylor, 1994].

Neben Nitrat wurde auch Ammonium als N-Quelle (Tabelle 3-2.) für die Kultivierung von *M. trichosporium* OB3b eingesetzt. Für Nitrat als N-Quelle wurden bei der Kultivierung von *Methylococcus capsulatus* Bath bis zu 25 % geringere Biomassen-Ausbeuten beschrieben. Dies ist durch einen zusätzlichen Verbrauch an Reduktionsäquivalenten bedingt, der im Vergleich zur Assimilation von Ammonium bei Nitrat benötigt wird. [Leak und Dalton, 1986]. Ein Unterschied in der spezifischen Wachstumsrate von *Methylosinus trichosporium* OB3b beim Vergleich der N-Quellen Ammonium und Nitrat wurde nicht beschrieben [Chu und Alvarez-Cohen, 1998; Whittenbury, 1970b]. Ein negativer Aspekt des Wachstums mit Ammonium als N-Quelle ist die Ansäuerung des Mediums infolge der H⁺-Abgabe während der Aufnahme von NH₄⁺ [Roos und Luckner, 1984]. Für Nitrat ist ein solcher Einfluss auf den pH-Wert des Mediums nicht bekannt. In eigenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass bei der Kultivierung von *Methylosinus trichosporium* OB3b mit Ammonium geringere sMMO-Aktivitäten gemessen wurden als mit Nitrat als N-Quelle [Dillmann, 2014]. Die sMMO kann Ammonium ebenfalls als Substrat akzeptieren und produziert Hydroxylamin, welches die sMMO-Ganzzell-Aktivität reversibel inhibieren kann. Die maskierende Wirkung von Ammonium beim Nachweis der sMMO-Aktivität im Ganzzell-Naphthalin-Assay ist in Abbildung 7-3, S.176 im Anhang dargestellt. Grundlegende Vergleiche mit verschiedenen Variationen der eingesetzten Komponenten auf das Wachstum und die sMMO-Aktivität mit CH₄ und CH₃OH sind in der Arbeit von Dillmann beschrieben [Dillmann, 2014].

Aufbauend auf dieser Arbeit wurden die beschriebenen Medien nach Best bzw. Cornish und nach Choi (Tabelle 3-3) in Kultivierungsversuchen mit *M. trichosporium* OB3b mit CH₄ oder CH₃OH auf das Wachstum der Zellen und den Nachweis der sMMO-Aktivität untersucht, siehe Tabelle 3-4, S.58). Ein vergleichbares Wachstum bei beiden Medien mit CH₄ wurde dabei detektiert ($\mu = 0,04 \text{ h}^{-1}$). Die sMMO-Ganzzell-Aktivität war bei dem NMS-Medium nach Best bzw. Cornish mit $1900 \mu\text{mol}_{1\text{-Naphthol}} \cdot \text{h}^{-1} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$ um Faktor acht größer als die sMMO-Aktivität in den Kulturen die auf Choi-Medium wuchsen ($250 \mu\text{mol}_{1\text{-Naphthol}} \cdot \text{h}^{-1} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$). Ein Wachstum der Zellen mit CH₃OH als C-Quelle wurde nur bei den Kulturen auf Choi-Medium gemessen. Diese Kulturen zeigten keine sMMO-Aktivität im Ganzzell-Naphthalin-Assay. Auch in den 1/OD Proben, die mittels SDS-PAGE analysiert wurden, konnte das charakteristische Bandenmuster der MMOH nur bei den Kulturen detektiert werden, die im Ganzzell-Naphthalin-Assay sMMO-Aktivität zeigten (Abbildung 3-5, Lane 1,2 und 5, S.58). In den Choi-Medium Kulturen, die eine geringere sMMO-Aktivität hatten, waren die sMMO-Proteinbanden weniger intensiv, als bei den Kulturen im NMS-Medium (Abbildung 3-5, Lane 1 und 2, S.58). Mit Hilfe dieser Ergebnisse erfolgte über rationale Kombination die Entwicklung eines Mediums, welches das adaptionsfreie Wachstum von *M. trichosporium* OB3b auf CH₃OH mit der gleichzeitigen Produktion der sMMO gewährleisten sollte.

Tabelle 3-3: Zusammensetzung der Medien, die für die Kultivierungsexperimente von *Methylosinus trichosporium* OB3b mit CH₃OH mit Nachweis der sMMO-Aktivität verwendet wurden. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Komponenten sind hervorheben.

Komponente	NMS [Best und Higgins, 1981; Cornish <i>et al.</i> , 1984]	Choi-Medium [Bourque <i>et al.</i> , 1995; Yu <i>et al.</i> , 2009a]	Modifiziertes NMS [Vorliegende Arbeit]
NaNO₃ [mM]	10,0	-	10,0
(NH ₄) ₂ SO ₄ [mM]	-	7,57	-
KH₂PO₄ [mM]	3,9	9,6	9,6
Na₂HPO₄x 7H₂O [mM]	6,0	15	15
MgSO₄x 7H₂O [mM]	0,15	1,83	1,65
CaCl ₂ x 2H ₂ O [µM]	50	22,5	50
NaHCO₃ [mM]	-	-	6,0
FeSO₄x 7H₂O [µM]	40,3	4,7	50
Spurenelemente Lösung			
ZnSO ₄ x 7H ₂ O [µM]	2,0	1,0	2,0
MnSO ₄ x H ₂ O [µM]	0,98	0,49	0,98
H ₃ BO ₃ [µM]	2,0	1,0	2,0
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O [µM]	0,04	0,02	0,04
CoCl ₂ x 6H ₂ O [µM]	0,4	0,2	0,4
KI [mM]	1,0	0,5	1,0

Die zuvor beschriebenen Medienkomponenten, Hydrogencarbonat, Eisen, Magnesium, Phosphat und die N-Quelle, wurden angepasst, siehe Tabelle 3-3.

Als N-Quelle wurde Nitrat verwendet um den maskierenden Effekt von Ammonium auf die sMMO-Aktivität zu vermeiden. Die im Choi-Medium verwendeten Phosphat- und Magnesium-Konzentrationen hatten vermutlich einen positiven Einfluss auf das Wachstum von *Methylosinus trichosporium* OB3b mit CH₃OH. Im NMS-Medium nach Best bzw. Cornish bei geringeren Konzentrationen wurde kein Wachstum mit CH₃OH gemessen. Entsprechend wurde im hier erstmals beschriebenen modifiziertem Medium die Phosphat-Konzentration analog zum Choi-Medium übernommen. Die frei gewählte Magnesium-Konzentration im NMS-Medium entsprach 88 % der Konzentration im Choi-Medium. Die Eisenkonzentration hatte vermutlich einen essentiellen Einfluss auf die Bildung und Aktivität der sMMO. Bei einer im Vergleich zum NMS-Medium nach Best bzw. Cornish, achtfach geringen Konzentration im Choi-Medium, wurde eine um Faktor 8 bis 9-fach geringere sMMO Ganzzell-Aktivität gemessen. Um die ausreichende Versorgung der sMMO mit Eisenionen zu gewährleisten wurde die Eisenkonzentration im modifizierten NMS-Medium auf 50 µM festgelegt. Hydrogencarbonat hatte einen positiven Effekt auf die initiale Wachstumsphase von *M. trichosporium* OB3b Kulturen mit CH₃OH im NMS-Medium nach Best [Davis *et al.*, 1987]. Entsprechend der Literaturangabe wurde für das entwickelte modifizierte Medium eine Hydrogencarbonat-Konzentration von 6 mM festgelegt. Weiterhin wurden die Konzentrationen von Calcium und der Spurenelemente-Lösung vom NMS-Medium nach Best bzw. Cornish übernommen. Das so entwickelte modifizierte NMS-Medium (Tabelle 3-3) wurde anschließend für die Kultivierung von *M. trichosporium* OB3b mit CH₄ und CH₃OH im Schüttelkolbenmaßstab eingesetzt. Die Wachstumskurven sind in Abbildung 3-4 dargestellt und die Kultivierung in Tabelle 3-4 zusammengefasst.

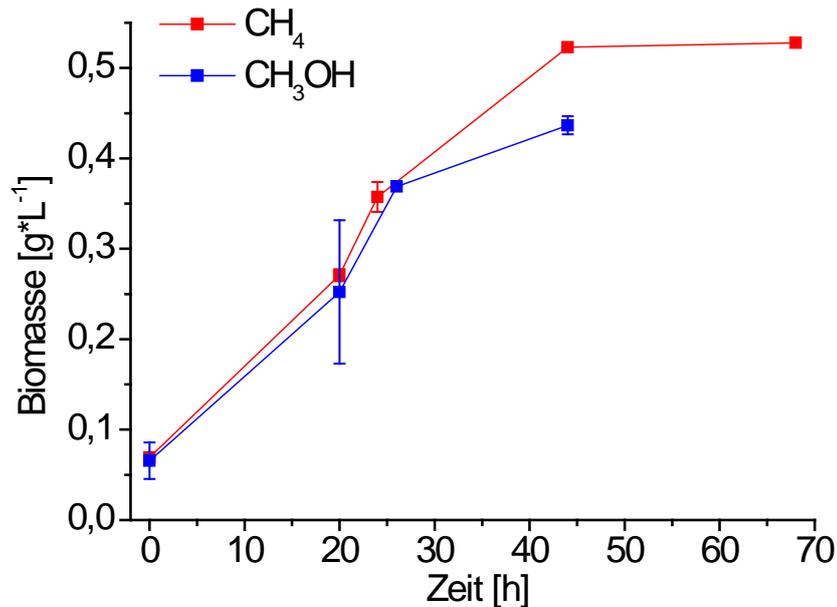


Abbildung 3-4: Wachstumskurven von *Methylosinus trichosporium* OB3b mit dem in Tabelle 3-3 beschriebenen modifiziertem NMS-Medium mit CH₄ und CH₃OH als C-Quelle. Bedingungen: 30 °C; 150 rpm; je 20 mL modifiziertes NMS-Medium; 20 % CH₄; 50 mM CH₃OH. Dargestellt sind die Mittelwerte von n= zwei Schüttelkolben.

Mit dem modifizierten NMS-Medium war es möglich, sowohl mit CH₄, als auch mit CH₃OH Wachstum und sMMO-Aktivität nachzuweisen. Die spezifische Wachstumsrate ($\mu = 0,045$) mit CH₄ war vergleichbar mit der Wachstumsrate der Zellen auf dem NMS-Medium nach Best bzw. Cornish und dem Choi-Medium. Die sMMO-Aktivität der Zellen lag mit $1600 \mu\text{mol}_{1\text{-Naphthol}} \cdot \text{h}^{-1} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$ im Bereich der Ganzzellaktivität mit dem NMS-Medium nach Best bzw. Cornish (Tabelle 3-4). Die Intensität der potentiellen sMMO-Proteinbanden in der SDS-PAGE war für beide verwendeten NMS-Medien mit CH₄ vergleichbar (Abbildung 3-5 Lane 1 und 3, S.58). Im Gegensatz zum NMS-Medium nach Best bzw. Cornish konnte mit dem modifizierten NMS-Medium ein sofortiges Wachstum auf CH₃OH, ohne eine Adaptationsphase, nachgewiesen werden ($\mu = 0,043 \text{ h}^{-1}$). Ein Nachweis der sMMO-Aktivität im Ganzzell-Naphthalin-Assay und das Vorhandensein der MMOH-Banden in der SDS-PAGE mit CH₃OH als C-Quelle, konnte nur bei Verwendung des modifizierten NMS-Mediums beobachtet werden (Abbildung 3-5 Lane 4, S.58). Die gemessene achtfach geringere Aktivität im Vergleich zu den Kulturen die mit CH₄ als C-Quelle wuchsen, korrelierte mit einer geringeren Bandenintensität der MMOH-Banden in der SDS-PAGE-Analyse.

CH₃OH wird von der sMMO auch als Substrat akzeptiert. Analog zu der beobachteten Verringerung der sMMO Ganzzell-Aktivität durch Ammonium (Abbildung 7-3 im Anhang, S.176) könnte die geringere sMMO-Aktivität durch eine Maskierung des Naphthalin-Umsatzes durch CH₃OH verursacht worden sein. Der Einfluss von CH₃OH auf die sMMO-Aktivität und der Vergleich der sMMO-Aktivität von Kulturen die CH₄ bzw. CH₃OH als C-Quelle nutzten wird im Kapitel 3.1.2.3, S.59 näher erläutert. Bei Vorhandensein von Ammonium als N-Quelle im Choi-Medium wurde auf Höhe von ca. 30 kDa eine weitere Bande detektiert, die möglicherweise der Ammonium-Monooxygenase (AMO) entsprechen könnte (ein direkter Nachweis mittels MS Analyse erfolgte nicht).

Die rationale Medienoptimierung für die Kultivierung von *M. trichosporium* OB3b auf Basis der bereits dokumentierten Medien (NMS-Medium nach Best bzw. Cornish und Choi-Medium) ergab ein hier erstmals beschriebenes modifiziertes NMS-Medium. Mit diesem Me-

dium gelang erstmals das Wachstum mit CH_3OH als C-Quelle ohne Adaptationsphase in Kombination mit dem stabilen Nachweis der sMMO-Aktivität.

Tabelle 3-4: Eigene Daten zum Wachstum und sMMO Ganzzell-Aktivität von *Methylophilus trichosporium* OB3b auf den verschiedenen Medien mit CH_4 und CH_3OH als C-Quelle. Bedingungen: 30°C; 150 rpm; jeweils 20 mL Medium, 20 % CH_4 ; 50 mM CH_3OH . +/++ steht für Wachstum bzw. geringe/hohe sMMO-Aktivität vorhanden; - entspricht keinem Wachstum bzw. keiner detektierbaren sMMO-Aktivität.

C-Quelle Medium	CH_4		CH_3OH	
	Wachstum	sMMO-Aktivität (μmol 1-Naphthol $^{**}\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}\text{h}^{-1}$)	Wachstum	sMMO-Aktivität (μmol 1-Naphthol $^{**}\text{g}_{\text{BTM}}^{-1}\text{h}^{-1}$)
NMS-Medium nach Best & Higgins	+	++ (1900)	-	-
Choi-Medium	+	+	+	-
Modifiziertes NMS	+	++ (1600)	+	+

Aufbauend auf den Schüttelkolbenversuchen erfolgten weitere Untersuchungen zur Morphologie der Zellen und zur sMMO-Aktivität im Rohextrakt nach Kultivierung mit CH_3OH als C-Quelle.

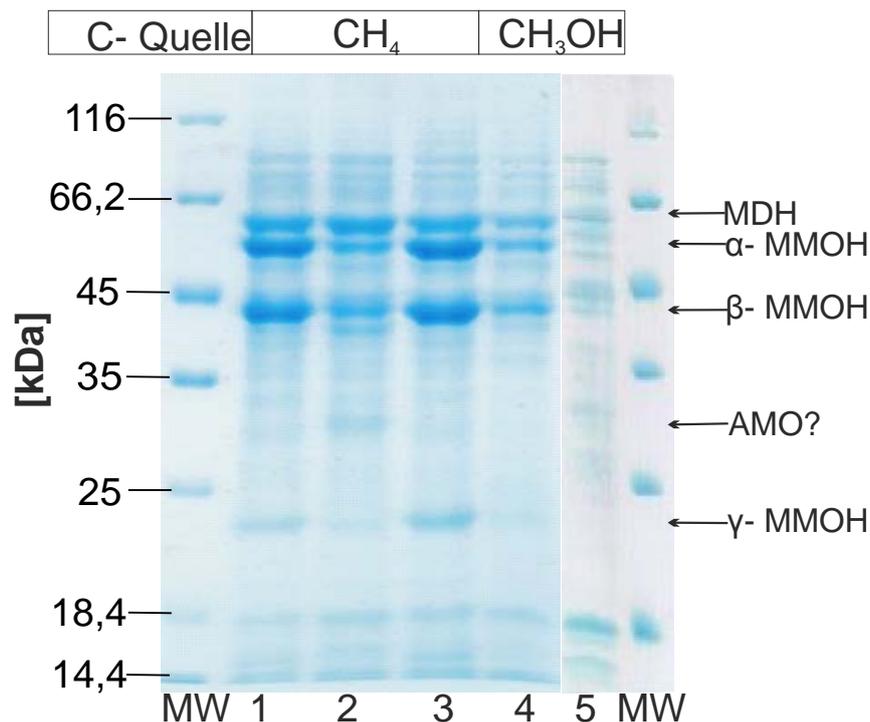


Abbildung 3-5: 12,5 % SDS-PA-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der $1/\text{OD}_{600}$ -Proben nach 68 Stunden für CH_4 bzw. 44 Stunden für CH_3OH als Substrat auf verschiedenen Medien. 1-NMS-Medium nach Best (1981) und Cornish (1984) mit CH_4 als Substrat; 2-Choi-Medium nach Bourque (1995) mit CH_4 als Substrat; 3-Modifiziertes NMS-Medium aus dieser Arbeit mit CH_4 als Substrat; 4-Modifiziertes NMS Medium aus dieser Arbeit mit CH_3OH als Substrat; 5-Choi-Medium nach Bourque (1995) mit CH_3OH als Substrat. MDH-60 kDa, α -MMOH 60 kDa, β -MMOH 45 kDa, AMO-Ammonium Monooxygenase 30 kDa, γ -MMOH 20 kDa. (MW PageRuler™). Diese Abbildung zeigt verschiedene Abschnitte von PA-Gelen, zur besseren Übersicht wurden verschiedenen Bahnen entfernt.

3.1.2.2 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von *Methylosinus trichosporium* OB3b mit und ohne Cu(II)-Zusatz mit CH₃OH als C-Quelle

Zur Analyse der internen Membranstrukturen der Zellen bei Wachstum mit CH₃OH als C-Quelle mit und ohne Zusatz an 0,8 µM Cu(II) erfolgten TEM-Aufnahmen. Die erhaltenen Bilder zeigten bei Zusatz an Cu(II) (Abbildung 3-6 A) das Vorhandensein peripherer Membranbündel, wie sie bei pMMO-bildenden Methanotrophen charakteristisch sind (siehe Abbildung 1-3, S.6). Ohne Zusatz an Cu(II) wurden diese Membranstrukturen beim Wachstum mit CH₃OH als C-Quelle nicht gebildet, siehe Abbildung 3-6 B. Das Fehlen der Membranstapel war ein Indiz für die sMMO-Bildung und wurde durch den Nachweis der Ganzzell-sMMO-Aktivität in diesen Kulturen bestätigt.

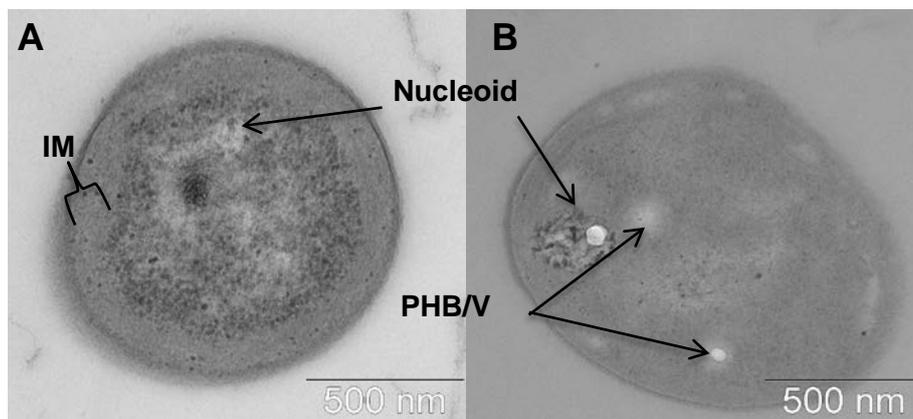


Abbildung 3-6: TEM-Aufnahmen *Methylosinus trichosporium* OB3b mit CH₃OH als C-Quelle. A mit 0,8 µM Cu(II)-Zusatz; B: ohne Cu(II)-Zusatz. Ausbildung von Membranstapeln in A am äußeren Rand der Zelle zu erkennen. Ohne Cu(II)-Zusatz in B fehlen diese internen/peripheren Membranstapel (IM), PHB/V- Speicherstoff z.B. Polyhydroxybutyrat oder Vakuole (V); Maßstabsbalken am rechten unteren Rand entspricht 500 nm. Kultivierungsbedingungen: 30°C; 150 rpm; je 20 mL mod. NMS-Medium; 50 mM CH₃OH.

Die Bildung der internen Membranstapel bzw. die Regulation der sMMO-Bildung erfolgt somit unabhängig von der C-Quelle und nur in Abhängigkeit der Cu(II)-Konzentration bzw. des Cu(II)/Biomasse Verhältnisses (Kapitel 1.1.2.1, S.6). Diese Beobachtung war wichtig für die im weiteren Verlauf dieser Arbeit geplanten Fermentationen. Die erhaltenen TEM-Aufnahmen mit dem Vorhandensein der Membranstapel in Anwesenheit von einer Kupferkonzentration von 0,8 µM entsprachen den bereits veröffentlichten Daten bzw. Bildern aus der Literatur [Best und Higgins, 1981].

3.1.2.3 Einfluss von CH₃OH auf die sMMO-Aktivität im Ganzzell-Naphthalin-Assay

Trotz der offensichtlichen Produktion der sMMO mit CH₃OH als C-Quelle (Kapitel 3.1.2.1, S.54) wurde eine Verringerung der sMMO-Aktivität im Ganzzell-Naphthalin-Assay bei *M. trichosporium* OB3b Kulturen beobachtet (Tabelle 3-4, S.58). Neben der geringeren Bildung einer oder aller sMMO-Komponenten, die in der SDS-PAGE-Analyse (Abbildung 3-5, S.58) beobachtet wurde, könnten weitere Ursachen zu einer Reduktion der sMMO-Aktivität geführt haben. Die wahrscheinlichste Ursache war ein Aktivitätsverlust durch eine Inhibition der sMMO-Aktivität mit CH₃OH. Es ist bekannt, dass CH₃OH von der sMMO ebenfalls als Substrat akzeptiert werden kann [Colby *et al.*, 1977; Tinberg und Lippard, 2010]. Da sich im mo-

difizierten NMS-Medium CH_3OH befand, bestand die Möglichkeit der Konkurrenz zwischen dem Substrat Naphthalin im Ganzzell-Naphthalin-Assay und CH_3OH . Um diesen Einfluss zu untersuchen erfolgten Messungen mit unterschiedlichen Zusätzen von CH_3OH im Ganzzell-Naphthalin-Assay mit Kulturen, die mit CH_4 als C-Quelle kultiviert wurden. (Kapitel 2.4.4.1, S.38). Das Ergebnis dieser Messungen ist in Abbildung 3-7 dargestellt.

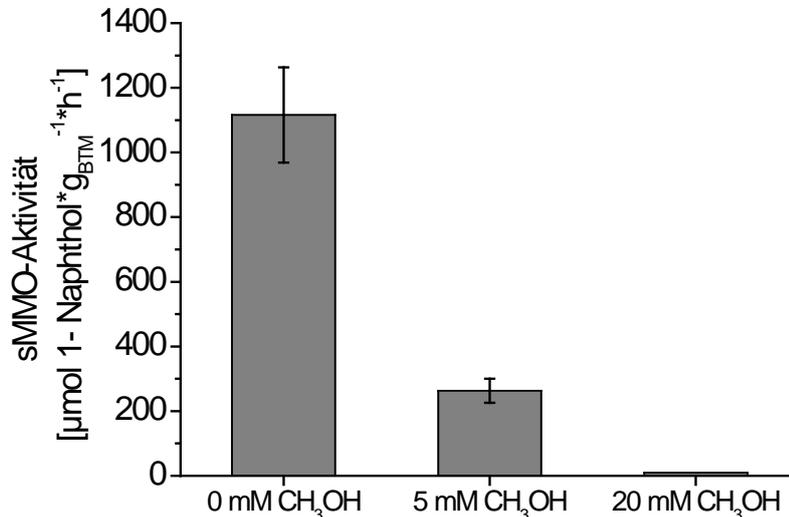


Abbildung 3-7: sMMO-Aktivität von *Methylosinus trichosporium* OB3b kultiviert mit CH_4 als C-Quelle gemessen im Ganzzell-Naphthalin-Assay mit Zusatz an 0; 5 und 20 mM CH_3OH . Kultivierungsbedingungen: 30°C; 150 rpm; 20 mL mod. NMS-Medium; 20 % CH_4 ; n= zwei Messungen

In Gegenwart von 5 mM CH_3OH im Ganzzell-Naphthalin-Assay wurde eine Reduktion der sMMO-Aktivität gegenüber Naphthalin als Substrat von 76 % gemessen. Bei einer eingesetzten CH_3OH -Konzentration von 20 mM, die um Faktor 2,5 geringer war als die Startkonzentration von CH_3OH in den Kultivierungsansätzen (50 mM), war keine sMMO-Aktivität gegenüber Naphthalin mehr messbar. Die Gegenwart von CH_3OH führte, wie vermutet, zu einer Maskierung der sMMO-Aktivität. Das Enzym nutzte statt des Substrates Naphthalin im Reaktionsansatz CH_3OH . Dadurch wurde als Folge der geringeren Bildung des detektierten Produktes 1-Naphthol (siehe Abbildung 2-1, S.39), eine scheinbar geringere sMMO-Aktivität gemessen. Um die Maskierung durch das restliche CH_3OH innerhalb des Ganzzell-Naphthalin-Assays zu reduzieren, erfolgten Versuche bei denen die Zellen vor dem Aktivitätstest mit CH_3OH -freiem Medium gewaschen wurden. Dabei konnte eine Steigerung der sMMO-Aktivität im Ganzzell-Naphthalin-Assay um Faktor 4,5 (auf $910 \mu\text{mol}_{1\text{-Naphthol}} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$) gemessen werden. Diese Aktivität entsprach 43 bzw. 57 % der sMMO-Aktivität von *M. trichosporium* OB3b Kulturen, die CH_4 als C-Quelle nutzten. Der restliche Unterschied der Aktivität im Vergleich zu *M. trichosporium* OB3b Kulturen, die mit CH_4 als C-Quelle kultiviert wurden könnte durch restliches CH_3OH in den Zellen verursacht worden sein. Weiterhin könnte auch eine geringere Bildung der sMMO in den Organismen die mit CH_3OH als C-Quelle kultiviert wurden für den Aktivitätsunterschied verantwortlich sein. Um dies zu untersuchen erfolgten Aktivitätsmessungen nach dem Zellaufschluss von *M. trichosporium* OB3b mit der Rohextrakt Fraktion

3.1.2.4 sMMO-Aktivität im Rohextrakt nach Kultivierung mit CH_4 oder CH_3OH als C-Quelle

Der Vergleich der sMMO-Aktivität von *M. trichosporium* OB3b Kulturen, die mit CH_4 oder CH_3OH als C-Quelle kultiviert wurden, erfolgte nach mechanischem Zellaufschluss mittels

Hochdruckhomogenisator (HDH) und Abtrennung der Zelltrümmer durch Zentrifugation. Die Messung der sMMO-Aktivität erfolgte mit den Rohextrakt Fraktionen im Nitrobenzol-Assay (Kapitel 2.4.4.2, S.39). Dieser Test wurde aufgrund seiner Vorteile (kontinuierlich durchführbar, höhere Löslichkeit des Substrates und einfachere Handhabung) gegenüber dem bisher verwendeten Naphthalin-Assay eingesetzt.

Die Messung der sMMO-Aktivität erfolgte zum einen direkt nach dem Zellaufschluss der geernteten Biomasse. Zum anderen wurde ein Teil der geernteten Biomasse in flüssigen N₂ eingefroren, für 14 Tage bei – 80 °C gelagert und nach Auftauen bzw. Zellaufschluss dessen sMMO-Aktivität im Rohextrakt bestimmt. Dies diente der Untersuchung der Lagerbarkeit der Biomasse von *M. trichosporium* OB3b. Die Stabilität der sMMO-Aktivität über die Lagerung hat einen Einfluss auf eine mögliche Aufarbeitung des Enzyms nach der Kultivierung. Die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen im Nitrobenzol-Assay sind in Abbildung 3-8 und die dazugehörige SDS-PAGE-Analyse der Zell- und Rohextrakt-Fractionen ist in Abbildung 3-9 dargestellt

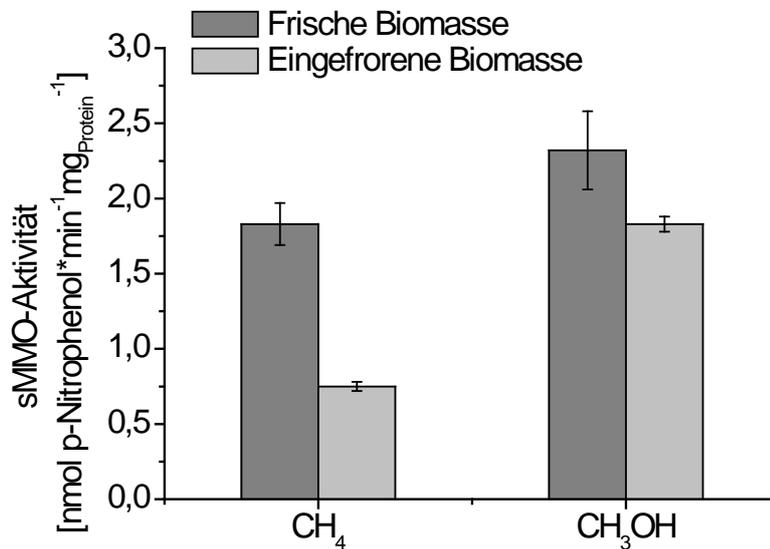


Abbildung 3-8: sMMO-Aktivität der Rohextrakte von *Methylosinus trichosporium* OB3b nach Zellaufschluss mittels Hochdruckhomogenisator (HDH), gemessen im Nitrobenzol-Assay. Bedingungen: 0,5 mL 25 mM MOPS-Puffer pH 7,0; 1,5 mM Nitrobenzol; 1 mM NADH; 30 °C; 1 – 2 mg * mL⁻¹ Protein pro Ansatz; Messung der Absorption bei 420 nm. Die Biomasse wurde mit 20 % CH₄ oder 50 mM CH₃OH als C-Quelle in mod. NMS-Medium kultiviert (30 °C, 150 rpm). Die Messung der Aktivität erfolgte direkt nach der Kultivierung (50 bis 60 h) und nach Einfrieren in flüssigen N₂, 14-tägiger Lagerung bei – 80 °C und Auftauen der jeweiligen Biomasse auf Eis über mehrere h. Mittelwerte aus n= vier Messungen.

Die gemessene sMMO-Enzymaktivität der Kulturen im Ganzzell-Naphthalin-Assay vor dem Zellaufschluss betrug $2100 \pm 260 \mu\text{mol}_{1\text{-Naphthol}} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$ für die Kulturen mit CH₄ und $910 \pm 90 \mu\text{mol}_{1\text{-Naphthol}} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$ für die Kulturen mit CH₃OH als C-Quelle. Die Messung der Aktivität der Zellen mit CH₃OH als C-Quelle erfolgte nach einmaligem Waschen der Zellen mit CH₃OH-freiem mod. NMS-Medium. Die Ursache für diese Differenz könnte restliches CH₃OH in den Zellen gewesen sein, das die sMMO-Aktivität in Bezug auf Naphthalin reduzierte (siehe Kapitel 3.1.2.3, S.59). Für diese Maskierung spricht die vergleichbare Intensität der charakteristischen MMOH-Banden in der SDS-PAGE-Analyse bei allen Zell- bzw. Rohextrakt-Fractionen, die in Abbildung 3-9 dargestellt ist. Weiterhin wurde nach Zellaufschluss im Rohextrakt der frischen CH₃OH-Biomasse eine um 27 % höhere sMMO-Aktivität gemessen, als im Rohex-

trakt der CH₄-Biomasse. Die im Ganzzell-Naphthalin-Assay reduzierte sMMO-Aktivität der CH₃OH-Biomasse war somit nicht auf die geringere Menge an gebildeter sMMO zurückzuführen, sondern auf den maskierenden Effekt von CH₃OH.

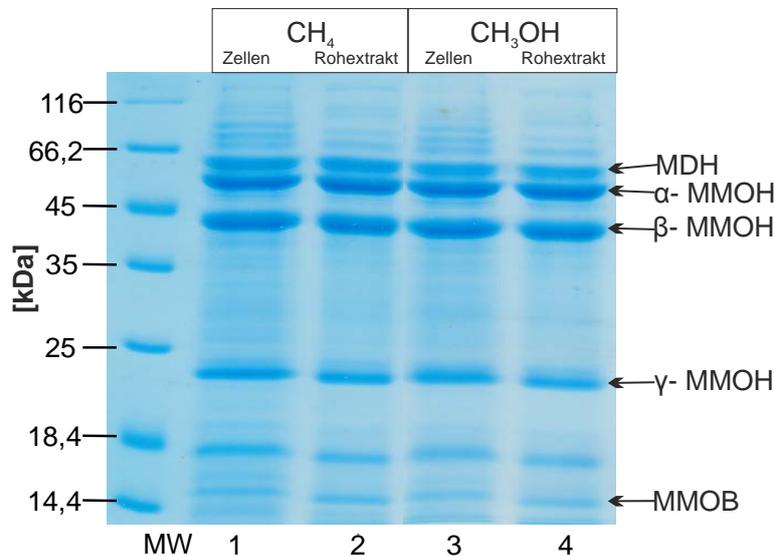


Abbildung 3-9: 12,5 % SDS-PA-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der 1/OD₆₀₀-Proben und der Rohextrakt Proben nach Zellaufschluss von *Methylosinus trichosporium* OB3b nach Kultivierung mit CH₄ bzw. CH₃OH. 1- 1/OD₆₀₀ Probe für C-Quelle CH₄; 2- 10 µg Rohextrakt Protein nach Bradford für C-Quelle CH₄ nach Zellaufschluss und Zentrifugation; 3- 1/OD₆₀₀ Probe für C-Quelle CH₃OH; 4- 10 µg Protein nach Bradford vom Rohextrakt für C-Quelle CH₃OH nach Zellaufschluss und Zentrifugation. MDH-60 kDa, α-MMOH 60 kDa, β-MMOH 45 kDa, γ-MMOH 20 kDa. (MW PageRuler™)

Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass bei einer Kultivierung von *M. trichosporium* OB3b mit CH₃OH statt CH₄ als C-Quelle eine höhere sMMO-Aktivität im Rohextrakt möglich ist. Nach Einfrieren, 14 tägiger Lagerung bei – 80 °C, anschließendem Auftauen, Zellaufschluss und Zentrifugation der Biomasse wurde sowohl für CH₄, als auch für CH₃OH als C-Quelle eine Reduktion der sMMO-Aktivität im Rohextrakt gemessen. Dabei sank die Aktivität bei den CH₄-gewachsenen Zellen stärker ab (um 60 %), als bei den CH₃OH-gewachsenen Zellen (um 22 %). In der Literatur wurde ein quantitativer Vergleich der sMMO-Aktivität nach der Lagerung der Biomasse noch nicht beschrieben. Unter Berücksichtigung der sMMO-Restaktivität von 78 % nach Lagerung wäre es möglich die produzierte Biomasse bei – 80 °C zu lagern und anschließend die sMMO sukzessive daraus aufzuarbeiten. In weiteren Experimenten nach längerer Lagerung von sMMO-aktiver Biomasse zeigte sich eine Stabilität der Enzymaktivität von 24 Monaten (Daten nicht gezeigt). Nach der Lagerung der Rohextrakt-Fractionen bei 4 °C bzw. -80 °C für sieben Tage war, unabhängig von der C-Quelle, keine Rest-sMMO-Aktivität mehr messbar. Ein Abbau der MMOH konnte ausgeschlossen werden, da die MMOH-Banden in der SDS-PAGE-Analyse vor bzw. nach der Lagerung in gleicher Intensität vorhanden waren (Daten nicht gezeigt). Die Instabilität der sMMO-Aktivität in Rohextrakt-Fractionen wurde bereits mehrfach beschrieben und u.a. mit dem Verlust von Eisenionen aus dem aktiven Zentrum der MMOH oder der proteolytischen Spaltung von MMOB begründet [Grosse *et al.*, 1999; Nakajima *et al.*, 1992; Pilkington und Dalton, 1990].

Eine Produktion der sMMO mit *Methylosinus trichosporium* OB3b mit CH₃OH als C-Quelle hätte gegenüber der der Nutzung von CH₄ in Bezug auf die gebildete Bildung, Aktivität und

Stabilität der sMMO keine Nachteile. Für die Aktivität im Rohextrakt und die Stabilität des Enzyms während der Lagerung wäre, ausgehend von den hier beschriebenen Versuchen im Schüttelkolben-Maßstab, eine Nutzung von CH₃OH als C-Quelle von Vorteil. Auf Basis dieser Ergebnisse zur Kultivierung von *M. trichosporium* OB3b im Schüttelkolbenmaßstab wurde eine Fermentation mit CH₃OH als C-Quelle im Reaktormaßstab entwickelt. Dadurch sollte eine ausreichende Menge sMMO-aktiver Biomasse zur Aufarbeitung des Enzyms produziert werden.

3.1.3 Zusammenfassung und Diskussion der Kultivierungsexperimente mit CH₄ und CH₃OH als C-Quelle

Untersuchungen zum Wachstumsverhalten von *Methylosinus trichosporium* OB3b mit CH₄ als C-Quelle wurden in der Literatur bereits beschrieben. Die in dieser Arbeit bestimmten Ergebnisse bezüglich Wachstumsverhalten, Bildung der sMMO unter Cu(II)-armen Medienbedingungen und Ganzzell-sMMO-Aktivität entsprachen den bereits bekannten Literaturdaten [Bowman und Saylor, 1994; Koh *et al.*, 1993; Park *et al.*, 1991; Park *et al.*, 1992]. Eine Etablierung der Kultivierung von *M. trichosporium* OB3b mit CH₄ als C-Quelle und mit dem spektroskopischen sowie elektrophoretischen Nachweis der sMMO bzw. deren Aktivität wurde erfolgreich erreicht. Analog zu Literaturdaten (Abbildung 1-3, S.8), wurde der Nachweis der putativ pMMO-tragenden internen Membranstapeln mit Cu(II), bzw. deren bei Fehlen ohne Cu(II)-Zusatz, im Medium in eigenen Messungen nachgewiesen (siehe Abbildung 3-2, S.50). Aufbauend auf diesen Ergebnissen und den entsprechenden Methoden und Analysen zur Kultivierung mit Nachweis der Enzymaktivität, erfolgten Untersuchungen zur Produktion der sMMO im technischen Maßstab.

Um im Reaktormaßstab eine ungewollte pMMO-Bildung, z.B. durch Cu(II)-Verunreinigungen, zu vermeiden, erfolgten Untersuchungen mit dem Cu(II)-Komplexbildner N-Allylthioharnstoff (ATU). Dieser wurde in der Literatur aufgrund seiner Bindungseigenschaften von Cu(II) als pMMO-Inhibitor beschrieben. 10 µM ATU verringerten reversibel die CH₄-Oxidation durch die pMMO bei ganzen Zellen um 70 % [Hubley *et al.*, 1975]. In den Arbeiten von Yu und Kollegen wurde diese Inhibition ebenfalls eingesetzt um die Bildung der sMMO zu gewährleisten. Dabei wurde die maximale sMMO-Aktivität im Ganzzellassay bei einer ATU-Konzentration von 15 µM gemessen. Ohne ATU-Zusatz verloren die Organismen die sMMO-Aktivität, was mit einer Cu(II)-Konzentration von ca. 0,7 µM im Medium begründet wurde. Dieser Cu(II)-Eintrag wurde auf etwaige Verunreinigungen der Medienkomponenten zurückgeführt [Yu *et al.*, 2009a; Yu *et al.*, 2009b]. Innerhalb einer Chemostat-Kultivierung wurde das Wachstum der Zellen von *M. trichosporium* OB3b durch die Erhöhung der ATU-Konzentration von 15 auf 25 µM reduziert. Dadurch erfolgte die Auswaschung der Zellen aus dem kontinuierlichem Bioreaktor führte. Als Ursache für die Reduktion des Wachstums wurde die Bindung von essentiellen Metallen neben Cu(II), durch ATU angegeben. Die gebundenen Metallionen können von den Zellen in der Folge nicht mehr aufgenommen werden und die resultierenden Limitationen führten zu der aufgetretenen Reduktion des Wachstums [Yu *et al.*, 2009b].

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum Einfluss von ATU auf das Wachstum und die sMMO-Aktivität von *M. trichosporium* OB3b erfolgten nicht im Chemostat, sondern im Schüttelkolbenmaßstab. Zudem war die gemessene Cu(II)-Konzentration im Medium mit 0,15 µM um Faktor fünf niedriger als in den zuvor genannten Veröffentlichungen. Eine Inhibition durch ATU-Zusatz wurde analog zur Literatur auch in den eigenen Messungen beobachtet. Die Inhibition erfolgte dabei in Form einer Verlängerung der initialen Wachs-

tumsphase. Mit Erhöhung der Start-ATU-Konzentration verlängerte sich die initiale Wachstumsphase (Kapitel 3.1.1.2, S.50). Ursache für diesen Einfluss könnte, die bereits in der Veröffentlichung von Yu und Kollegen genannte, Komplexierung von weiteren Metallen neben Cu(II) gewesen sein [Yu *et al.*, 2009b]. Für einen strukturell ähnlichen Chelator, Thioharnstoff, wurde die Komplexierung von Ni(II), Al(III) und Fe(III) beschrieben [Foye und Chao, 1984]. Eine genaue Analyse von ATU bezüglich der Komplexbildung mit anderen Metallen wurde bisher nicht veröffentlicht. Neben der sMMO bzw. pMMO nutzen viele andere Enzyme Metalle als Cofaktoren (z.B. die Formiat-Dehydrogenase). Eine Reduktion der Metallionen-Konzentration im Medium durch einen Chelator, in entsprechender Konzentration, hätte eine Inhibition essentieller Enzymreaktionen bzw. des Zellwachstums zur Folge [Jollie und Lipscomb, 1991]. Dies ist eine mögliche Ursache für die längeren initialen Wachstumsphasen bzw. das fehlende Wachstum bei den untersuchten ATU-Konzentrationen. Das Wachstum der Zellen wurde nicht komplett inhibiert, sondern die initiale Wachstumsphasen verzögert. Eine mögliche Zersetzung von ATU über den Kultivierungszeitraum könnte dafür verantwortlich sein. Hierzu liegen keine weiteren Informationen zur Stabilität von ATU vor. Weiterhin wäre eine zeitversetzte Aufnahme der Metalle, durch vom Organismus gebildete Chelatoren eine Ursache für das gezeigte Wachstumsverhalten. Die Chelatoren werden von den Bakterien gebildet und könnten aufgrund der Affinität zu den Metallionen selbige binden und so erneut für den Organismus zugänglich machen. Ein Beispiel für einen von *Methylosinus trichosporium* OB3b gebildeten Chelator wäre Methanobactin (Kapitel 1.1.2.1, S.6) [Choi *et al.*, 2006; Kalidass *et al.*, 2015]. Die untersuchten ATU-Konzentrationen hatten, sofern die Zellen wuchsen, keinen Einfluss auf die finale sMMO-Aktivität. Für die Fermentationsexperimente wurde aufgrund des gezeigten Wachstums und der stabilen sMMO-Aktivität eine ATU-Konzentration von 5 μM gewählt. In der Literatur wurde eine Konzentration von 15 μM verwendet [Yu *et al.*, 2009a; Yu *et al.*, 2009b]. Die geringere Konzentration an ATU die in den eigenen Experimenten benötigt wurde ist mit der 5-fach geringere Cu(II)-Konzentration im verwendeten Laborwasser bzw. Wachstumsmedium zu erklären. Für weitere Experimente mit Verwendung anderer Bedingungen (verwendete Chemikalien und der Cu(II)-Konzentration im Laborwasser) muss die ATU-Konzentration angepasst werden.

Die großtechnische Fermentation von *Methylosinus trichosporium* OB3b mit CH_4 als C-Quelle erfordert verschiedenen (sicherheits)technische Anforderungen (z.B. Explosionsschutz, zusätzliche Gasanschlüsse, Kontrolle der Konzentration in der Flüssigphase). Um diese zu vermeiden bzw. zu reduzieren sollten Fermentationen von *M. trichosporium* OB3b mit CH_3OH als C-Quelle geplant werden. Da ein Wachstum des Organismus mit CH_3OH bereits gezeigt wurde, erfolgten zunächst Untersuchungen zum Wachstum und dem gleichzeitigen Nachweis der sMMO-Bildung [Best und Higgins, 1981]. Nach Untersuchung des Wachstums und der sMMO-Aktivität auf den zwei am häufigsten eingesetzten Medien (NMS-Medium nach Best bzw. Cornish; [Best und Higgins, 1981; Cornish *et al.*, 1984] und das Choi-Medium nach Bourque; [Bourque *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 2009a], erfolgte eine rationale Medienoptimierung. Dabei wurde durch Kombination verschiedener essentieller Medienbestandteile für das Wachstum und die Bildung der sMMO ein neues modifiziertes NMS-Medium (mod. NMS-Medium) entwickelt.

Für das Wachstum mit CH_3OH als C-Quelle und die Bildung der sMMO waren vor allem die Phosphat-, die Magnesium-, die Eisen-, und die Hydrogencarbonat-Konzentration entscheidend. Hydrogencarbonat diente als Unterstützung des Wachstums am Beginn der Kultivierung, da CO_2 im Serin-Zyklus als C-Quelle zur Bildung des Zwischenproduktes Oxallessigsäure benötigt wird. In Schüttelkolbenversuchen von Davis und Kollegen konnte durch Zu-

satz von 6 mM NaHCO₃ ein stabiles Wachstum mit CH₃OH gezeigt werden. Ohne den Hydrogencarbonat-Zusatz betrug die Quote der gewachsenen Kulturen nur 20 % [Davis *et al.*, 1987]. Eigene Versuche erfolgten deshalb stets mit 6 mM Hydrogencarbonat im Medium.

Aufgrund des hohen Anteils der sMMO am löslichen Protein in der Zelle (ca. 10 bis 12 %), spielt die Eisenkonzentration im Medium eine wichtige Rolle für die sMMO-Bildung. Im aktiven Zentrum der sMMO und auch bei anderen Enzymen des Organismus (z.B. Nitrogenase) werden Eisenionen benötigt. Eisen lag im Choi-Medium in zehnfach geringerer Konzentration vor als im modifizierten NMS-Medium. Beim Wachstum von *M. trichosporium* OB3b im Bioreaktor wurde eine Halbierung der sMMO-Aktivität nach Reduktion der Eisenkonzentration von 40 auf 18 µM beschrieben und eine minimale Eisenkonzentration von 40 µM empfohlen [Park *et al.*, 1991]. In Schüttelkolben Experimenten zeigten Bowman und Sayler, dass sich bei Eisenkonzentrationen <10 µM im Medium die sMMO-Aktivität leicht und das Wachstum stark reduzierte [Bowman und Sayler, 1994]. Um hohe sMMO-Aktivitäten und ausreichendes Wachstum der Zellen zu gewährleisten wurde im mod. NMS-Medium eine Eisenkonzentration von 50 µM verwendet. Innerhalb der eigenen Resultate wurde bei Verwendung des Choi-Mediums mit CH₄ als C-Quelle ein normales Wachstum gemessen, aber eine 8 bis 9-fach geringere sMMO-Aktivität (Tabelle 3-4, S.58). Die sMMO-Aktivität könnte durch die geringe Eisenkonzentration im Choi-Medium (4,7 µM) begründet werden. Die Eisenkonzentration im NMS-Medium nach Best bzw. Cornish und im modifizierten NMS Medium lagen mit 40 bzw. 50 µM über der angegebenen Minimalkonzentration von 10 µM. Für beide Medien wurden bei vorhandenem Wachstum vergleichbare sMMO-Aktivitäten im Ganzzell-Naphthalin-Assay nachgewiesen, die im Bereich der Literaturdaten lagen.

Die Magnesium-Konzentration im Medium war sowohl für das Wachstum, als auch für die sMMO-Aktivität bei der Kultivierung von *M. trichosporium* OB3b von Bedeutung. Ohne Magnesium-Zusatz wurden von Bowman und Sayler Reduktionen des Wachstums mit CH₄ als C-Quelle und der sMMO-Aktivität detektiert. Es wurde eine minimale Magnesium-Konzentration von 50 µM empfohlen [Bowman und Sayler, 1994]. In eigenen Experimenten mit CH₄ als C-Quelle konnten keine Unterschiede beim Wachstum und der sMMO-Aktivität zwischen einer eingesetzten Magnesium-Konzentration von 0,15 und 1,65 mM detektiert werden [Dillmann, 2014]. Für die Kultivierung von *M. trichosporium* OB3b mit CH₃OH als C-Quelle zeigte sich, dass eine Magnesium-Konzentration von ≥1,65 mM, wichtig für ein stabiles Wachstum der Kulturen war [Best und Higgins, 1981; Bourque *et al.*, 1995]. Detailliertere Untersuchungen wären nötig um dies genauer zu beschreiben, waren aber nicht Bestandteil dieser Arbeit. Mit der Magnesium-Konzentration von 1,65 mM im mod. NMS-Medium, erfolgten die weiteren Untersuchungen zur Produktion der sMMO mit CH₃OH als C-Quelle.

Die Phosphat-Konzentration hatte bei der Kultivierung von *M. trichosporium* OB3b im Schüttelkolbenmaßstab mit CH₄ zwischen 10 und 25 mM keinen Einfluss auf das Wachstum oder die sMMO-Aktivität [Dillmann, 2014]. Park und Kollegen zeigten eine beginnende Inhibition des Wachstums im Schüttelkolbenmaßstab ab einer Phosphat-Konzentration > 40 mM. Die sMMO-Aktivität verringerte sich in diesen Experimenten bis zu einer Phosphat-Konzentration von 80 mM nicht [Park *et al.*, 1991]. Bowman und Sayler zeigten vergleichbare sMMO-Aktivitäten und spezifische Wachstumsraten von *M. trichosporium* OB3b zwischen 2 und 25 mM Phosphat bei Nutzung von CH₄ als C-Quelle. Bei Erhöhung oder Erniedrigung der Phosphat-Konzentration wurde sowohl eine Reduktion der spezifischen Wachstumsrate, als auch der sMMO-Aktivität gemessen [Bowman und Sayler, 1994]. Die Ursache für die Inhibition des Wachstums bei höheren Phosphat-Konzentrationen war die Inhibition der Methanol-Dehydrogenase (MDH). Dadurch wurde die für das Wachstum essentielle Assimilation des

Reaktionsproduktes der MDH (Formaldehyd) verhindert. [Mehta *et al.*, 1989]. Ein direktes Wachstum von *M. trichosporium* OB3b mit CH₃OH als C-Quelle wurde in der Literatur nur bei Phosphatkonzentrationen wie z.B. 25 mM (Choi-Medium) beschrieben. Bei der Verwendung des NMS-Mediums nach Best bzw. Cornish mit 10 mM Phosphat, wurde entweder kein oder ein verzögertes Wachstum gezeigt (zehntägige Adaptionsphase) [Best und Higgins, 1981; Yu *et al.*, 2009a]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Wachstum von *M. trichosporium* OB3b mit CH₃OH als C-Quelle bei Phosphatkonzentration von 25 mM ohne Adaptionsphase gezeigt (Tabelle 3-4, S.58). Als Medienkomponente wird Phosphat u.a. als pH-puffernde Substanz genutzt. In der Zelle wird Phosphat für verschiedene Prozesse benötigt, z.B. als Bestandteil von Phospholipiden und als Rückgrat der DNA sowie RNA. Bei der ATP-Synthese und als Bestandteil des Signalmoleküls AMP spielt Phosphat ebenfalls eine wichtige Rolle. Weiterhin wird Phosphat für die Phosphorylierung von Proteinen genutzt um die Eigenschaften des Proteins zu verändern [Berg *et al.*, 2002]. Der genaue physiologische Hintergrund des Einflusses der Phosphat-Konzentration auf das Wachstum von *Methylosinus trichosporium* OB3b mit CH₃OH ist aktuell nicht bekannt. Weitere Untersuchungen hierzu erfolgten im Rahmen dieser Arbeit nicht, da das vorrangige Ziel die Bereitstellung ausreichender Mengen an sMMO-aktiver Biomasse war.

Anhand der durchgeführten Untersuchungen bzw. der Literaturrecherche zum Einfluss der Phosphat-, Magnesium-, Eisen-, und der Hydrogencarbonat-Konzentration auf das Wachstum und die sMMO-Aktivität von *Methylosinus trichosporium* OB3b mit CH₃OH wurde ein Medium entwickelt. Mit diesem erstmals in dieser Arbeit beschriebenen mod. NMS-Medium war es möglich *M. trichosporium* OB3b mit CH₃OH als C-Quelle und Nachweis der sMMO-Aktivität zu kultivieren. Dabei erfolgte das Wachstum mit 50 mM CH₃OH direkt und ohne die zuvor beschriebene langwierige Adaptionsphase von bis zu zehn Tagen [Best und Higgins, 1981]. Der sMMO Nachweis erfolgte über Messung der sMMO-Aktivität im Ganzzell-Naphthalin Assay und über charakteristische Proteinbanden in der SDS-PAGE.

Die sMMO ist in der Lage neben CH₄ auch CH₃OH als Substrat zu nutzen [Colby *et al.*, 1977] (Kapitel 1.1.1.2, S.4). Dadurch ergab sich beim Ganzzell-Naphthalin-Assay eine Maskierung der tatsächlichen sMMO-Aktivität durch den sMMO-Umsatz von CH₃OH statt Naphthalin (siehe Abbildung 3-7, S.60). In der Literatur ist dieser Effekt bisher nur die Verwendung von Ammonium als N-Quelle beschrieben [King und Schnell, 1994]. Die 30 %ige Reduktion der sMMO-Aktivität im Ganzzell-Naphthalin-Assay durch Ammonium-Zusatz wurde auch in eigenen Messungen gezeigt (siehe Anhang Abbildung 7-3, S.176 aus [Dillmann, 2014]). Um das Problem der CH₃OH-Maskierung zu minimieren wurden die Zellen vor dem Einsatz im sMMO-Assay mit CH₃OH freiem NMS-Medium gewaschen. Dadurch konnte eine Steigerung der tatsächlichen sMMO-Aktivität um Faktor fünf gemessen werden. In den Chemostat-Kultivierungen, die von Yu und Kollegen beschrieben wurden, konnte eine sMMO-Aktivität auch in Gegenwart von CH₃OH nachgewiesen werden. Die Ursache hierfür war, dass das zugegebene CH₃OH sofort durch die Zellen verstoffwechselt wurde und im Medium kein CH₃OH mehr nachgewiesen werden konnte. Dagegen wurde in *Batch* bzw. *Fed-Batch*-Kultivierungen mit CH₃OH als C-Quelle (75 bis 125 mM) keine bzw. nur eine geringe sMMO-Aktivität nachgewiesen [Adegbola, 2008; Yu *et al.*, 2009a; Yu *et al.*, 2009b]. Eine Regeneration der sMMO-Aktivität durch eine anschließende Kultivierung mit CH₄ als C-Quelle, wie sie in den genannten Arbeiten vorgeschlagen wurde, wäre anhand der hier gezeigten Resultate obsolet. Das Waschen der Zellen war ausreichend um den Nachweis der tatsächlichen sMMO-Aktivität zu ermöglichen. Trotz des Waschens der Zellen ergab sich in den eigenen Messungen eine zweifach geringere Ganzzell-sMMO-Aktivität mit CH₃OH als C-Quelle im

Vergleich zu Zellen mit CH₄. Um die mögliche Maskierung durch CH₃OH in den Zellen komplett auszuschließen und die Bildung der sMMO in Abhängigkeit der C-Quelle zu untersuchen erfolgten Aktivitätsmessungen mit Rohextrakt-Fraktionen nach dem Zellaufschluss. Dabei wurde aufgrund der einfacheren und kontinuierlichen Durchführbarkeit ein Nitrobenzol-Assay statt des Naphthalin-Assays für die Analyse der sMMO-Aktivität verwendet.

Die Vergleichsmessungen mit Rohextrakten, der mit CH₄ bzw. CH₃OH als C-Quelle gewachsenen Zellen, zeigten eine 27 % höhere sMMO-Aktivität im Nitrobenzol-Assay für Zellen die mit CH₃OH als C-Quelle kultiviert wurden. Die Intensitäten der MMOH-Proteinbanden in der SDS-PAGE-Analyse der ganzen Zellen, sowie der Rohextrakte waren für beide C-Quellen vergleichbar (Abbildung 3-9, S.62). Die zuvor gemessene sMMO-Aktivität der ganzen Zellen betrug, vermutlich aufgrund des maskierenden Effekts von CH₃OH gegenüber Naphthalin, für die Zellen mit CH₃OH nur 50 % der Aktivität der CH₄-Zellen. Untersuchungen zur Vergleichbarkeit der sMMO-Aktivität im Rohextrakt nach dem Wachstum mit CH₃OH oder CH₄ als C-Quelle sind bisher nicht veröffentlicht. Aufgrund der eigenen Daten aus dem direkten Vergleich der sMMO-Aktivitäten mit den beiden C-Quellen konnte belegt werden, dass eine vergleichbare bis bessere sMMO-Produktion bzw. Aktivität mit CH₃OH als C-Quelle erreicht werden konnte. Dies widerspricht der Vermutung von Adegbola, dass CH₄ zu einer Stimulation der sMMO Bildung führt [Adegbola, 2008]. Gleichzeitig kann der instabile Nachweis der sMMO-Aktivität, der in einigen Veröffentlichungen erwähnt wurde, durch den maskierenden Effekt von CH₃OH auf die sMMO-Aktivität im Ganzzell-Naphthalin-Assay erklärt werden [Yu *et al.*, 2009a]. Eine großtechnische Produktion der sMMO durch Fermentation von *M. trichosporium* OB3b kann, anhand der hier beschriebenen Ergebnisse, auch mit CH₃OH als C-Quelle erfolgen.

Experimente bezüglich der Lagerbarkeit der Biomasse erfolgten, da eine sofortige Aufarbeitung der gesamten Biomasse aus einer größeren Fermentation (100 L) nicht praktikabel wäre. Zur Untersuchung der Stabilität der sMMO-Aktivität in den Rohextrakt-Fraktionen erfolgten Messungen nach Einfrieren in fl. N₂, 14-tägiger Lagerung bei - 80 °C, dem Auftauen der Biomasse und dem anschließenden Zellaufschluss. Eine Reduktion der sMMO-Aktivität innerhalb der eingefrorenen Biomasse wurde sowohl bei CH₄ als auch bei CH₃OH als C-Quelle beobachtet (Abbildung 3-8, S.61). Die Reduktion der sMMO-Aktivität innerhalb des Rohextraktes der CH₃OH-gewachsenen Biomasse war mit 22 % geringer, als für das Rohextrakt der CH₄-gewachsenen Biomasse mit 60 %. Eine Ursache für diese Differenz kann, auf Basis der vorliegenden Daten, nicht angegeben werden. In weiteren eigenen Experimenten zeigte sich, dass die sMMO-Aktivität im Rohextrakt nach Lagerung der ganzen Zellen über bis zu 24 Monate stabil war. Fox und Kollegen geben eine Stabilität der sMMO-Aktivität in ganzen Zellen von *M. trichosporium* OB3b nach Wachstum mit CH₄ und Lagerung bei - 80 °C von bis zu 12 Monaten an [Fox *et al.*, 1990]. Aufgrund der eigenen Resultate und der Literaturangabe ist eine unbedenkliche Nutzung der sMMO nach Lagerung der Biomasse bei - 80 °C möglich. Die Stabilität der sMMO-Aktivität im Rohextraktes war nicht gegeben (0 % Restaktivität nach sieben Tagen Lagerung bei 4 bzw. - 80 °C). Dies wurde auch in verschiedenen Veröffentlichungen beschrieben (z.B. 1 % Restaktivität nach 20 Stunden bei 4 °C im *Methylocystis* sp. M Rohextrakt [Nakajima *et al.*, 1992; Stirling und Dalton, 1979]). Dementsprechend muss die sofortige Aufarbeitung des Enzyms nach Zellaufschluss und Zentrifugation erfolgen. Alternativ müsste die mögliche Ursache der Inaktivierung identifiziert und beseitigt werden.

Mit der Grundlage der in diesem Kapitel beschriebenen Ergebnisse zur Kultivierung von *M. trichosporium* OB3b mit CH₄ oder CH₃OH als C-Quelle im Schüttelkolbenmaßstab kann eine

Fermentation im technischen Maßstab zur Produktion von ausreichender Mengen an sMMO-aktiver Biomasse erfolgen. Wichtige Punkte dabei waren: Die Kontrolle der sMMO-Bildung durch die Cu(II)-Konzentration im Medium, die Wahl der ATU-Konzentration zur Vermeidung des Stoppens der sMMO-Bildung und die Entwicklung eines modifizierten NMS-Mediums mit dem ein stabiles Wachstum und eine sMMO-Aktivität mit CH₃OH als C-Quelle möglich waren. Abschließend konnte eine vergleichbare sMMO-Bildung und Aktivität in Kulturen mit CH₃OH bzw. CH₄ als C-Quelle im Rohextrakt nachgewiesen werden.

3.2 Fermentation von *Methylosinus trichosporium* OB3b im 6,8 L und 68 L-Maßstab mit CH₃OH als C-Quelle

Die sMMO ist, wie in Kapitel 1.1.2, S.6 beschrieben, ein vielseitiges Enzym, das für verschiedene biotechnologische Prozesse eingesetzt werden kann. Um die *in vitro*-Analysen der sMMO zur CH₃OH-Bildung durchzuführen, war es nötig ausreichende Mengen des Enzyms bereitzustellen. Basierend auf den Kultivierungsergebnissen im Schüttelkolbenmaßstab aus Kapitel 3.1.2, S.53 mit CH₃OH als C-Quelle wurde ein Fermentationsprotokoll für *M. trichosporium* OB3b entwickelt. Die geplanten Fermentationen wurden in Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer-Zentrum für Chemisch-Biotechnologische Prozesse (CBP) in Leuna durchgeführt (siehe Kapitel 2.3.1.5, S.29). Im Folgenden werden die drei durchgeführten Fermentationen beschrieben und die entsprechenden Ergebnisse dargestellt. Parameter bzw. Einstellungen die für alle drei Fermentationen galten sind in Tabelle 3-5 zusammengefasst. Die drei Fermentationen erfolgten mit einer sequentiellen *Feeding*-Strategie verschiedener Medienkomponenten z.B. Eisen, Magnesium, Calcium und der eingesetzten Spurenelemente. Die Grundlage für diese Strategie lieferten die Arbeiten von Yu und Kollegen, in denen eine auf die CO₂-Konzentration im Abgas angepasste *Feeding*-Strategie entwickelt und eingesetzt wurde [Yu *et al.*, 2009a; Yu *et al.*, 2009b]. Die *Feeding*-Strategie in der ersten Fermentation orientierte sich an den Literaturdaten. Auf Basis von eigenen Messungen der Metallionen sollte diese Strategie für die weiteren Fermentationen angepasst und optimiert werden.

Tabelle 3-5: Zusammenfassung der generellen Einstellungen bzw. Kennwerte der drei Fermentation von *M. trichosporium* OB3b mit CH₃OH als C-Quelle

Parameter	Wert
Temperatur [°C]	30
CH ₃ OH-Startkonzentration [mM]	25
pH-Wert	6,9 ± 0,1
pH-Kontrolle	7,5 % H ₂ SO ₄ , 10,0 % NaOH
Antischaummittel	Sigma SE-15
O ₂ Konzentration	30 %
Rührerdrehzahl	Angepasst um O ₂ Konzentration bei 30 % zu halten
Begasungsrate	0,33 vvm
Inokulum im 6,8 L-Maßstab	500 mL Kultur, OD ₆₀₀ 2 bis 3 gewachsen mit 50 mM CH ₃ OH auf mod. NMS-Medium+ 5 µM ATU
Fermentationsmedium	Modifiziertes NMS-Medium mit 5 µM ATU-Zusatz
sMMO-Analyse	Ganzzell-Naphthalin-Assay, SDS-PAGE
Abgasanalyse	CO ₂ -Konzentration
Metallanalyse	ICP-MS Analyse der Biofeuchtmasse und des Überstandes
<i>Feeding</i>	Kontinuierliches CH ₃ OH-Feeding, Sequentielle Zugabe verschiedener Medienkomponenten

3.2.1 Fermentation im 6,8 L-Maßstab

3.2.1.1 Fermentation mit Nitratlimitierung (Fermentation A)

Zunächst erfolgte eine Fermentation im 6,8 L-Maßstab ohne sequentielles *Feeding* der N-Quelle (Nitrat). Auf Basis der Arbeiten von Yu und Kollegen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (abhängig von der Biomassenkonzentration) verschiedene Medienkomponenten zugesetzt (Tabelle 3-6) [Yu *et al.*, 2009a; Yu *et al.*, 2009b]. Die Wachstumskurve und die sMMO-Aktivität in der entsprechenden Fermentation, im folgenden Fermentation A genannt, ist in Abbildung 3-10 dargestellt.

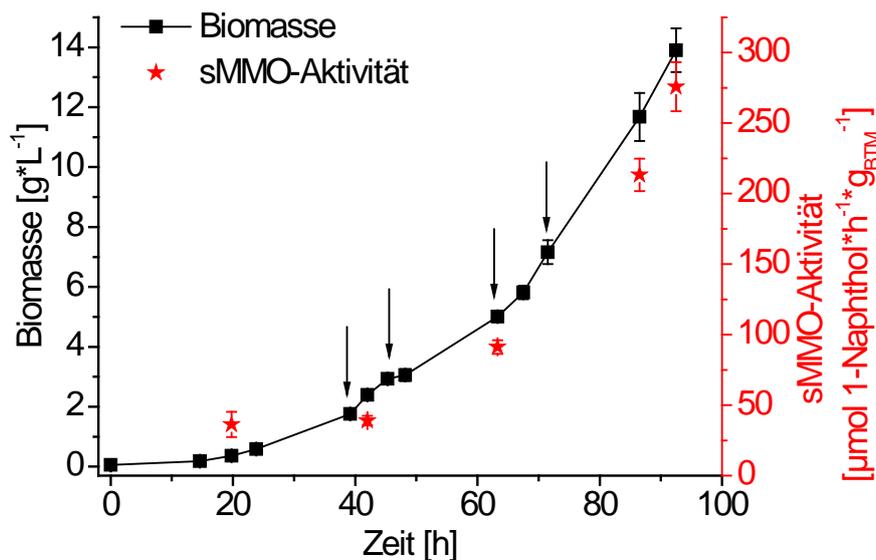


Abbildung 3-10: Biomassekonzentration (schwarz) und sMMO-Aktivität (rot) bei Fermentation A von *M. trichosporium* OB3b mit CH₃OH als C-Quelle, mod. NMS-Medium (Tabelle 3-3, S.56) mit Zusatz an 5 µM ATU bei 30 °C und pH 6,9 im 6,8 L-Maßstab. Die schwarzen Pfeile symbolisieren Zugaben an Medienkomponenten genaue Auflistung siehe Tabelle 3-6.

Tabelle 3-6: Zur 6,8 L Fermentation A aus Abbildung 3-10 zugegebene Medienkomponenten. Die Zugabe erfolgte in Abhängigkeit der Biomassekonzentration zu den angegebenen Zeitpunkten.

Zeitpunkt [h]	Zugegebene Lösung	Finale Konzentration [6,8 L]	Biomassenkonzentration [$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]
39,2	14 mL 5 mM Fe(II) 4 mL Spurenelementelösung	Fe(II)-10,3 μM	1,76 \pm 0,10
45,3	340 mL 16,5 mM Mg^{2+} /0,5 mM Ca^{2+} 14 mL 5 mM Fe(II)	Mg^{2+} -825 μM Ca^{2+} -25 μM Fe(II)-10,3 μM	2,93 \pm 0,05
63,3	300 mL 100 mM NaNO_3 7 mL 10 mM Fe(II) 17 mL 330 mM Mg^{2+} 4 mL Spurenelementelösung	NaNO_3 -4,4 mM Fe(II)-10,3 μM Mg^{2+} -825 μM	5,00 \pm 0,17
71,5	7 mL 10 mM Fe(II) 17 mL 330 mM Mg^{2+} 4 mL Spurenelementelösung	Fe(II)-10,3 μM Mg^{2+} -825 μM	7,16 \pm 0,40

Die maximale spezifische Wachstumsrate wurde zwischen 14 und 24 Stunden beobachtet und betrug $0,13 \text{ h}^{-1}$. Über die gesamte Kultivierung wurde mittels einer exponentiellen Anpassung eine Wachstumsrate von $0,03 \text{ h}^{-1}$ bestimmt. Die geringere Wachstumsrate von $0,08 \text{ h}^{-1}$ am Beginn der Kultivierungsphase wurde auch bei Kulturen im Schüttelkolbenmaßstab beobachtet ([Dillmann, 2014]). Zusätzlich könnte das geringere Wachstum durch den Transport des Inokulums und der Übertragung aus dem Schüttelkolbenmaßstab in den Reaktormaßstab bedingt worden sein. Die Fermentation sollte unter optimalen Wachstumsbedingungen durchgeführt werden. Vorversuche und Literaturdaten zur CH_3OH -Verträglichkeit von *M. trichosporium* OB3b zeigten in einem Konzentrationsbereich bis 125 mM ein entsprechendes Wachstum [Adegbola, 2008]. Die konstante CH_3OH -Konzentration über die Fermentation sollte 25 mM betragen, um die genannte Grenze nicht zu überschreiten. Aus technischen Gründen (Überdruck in der CH_3OH -Leitung) lag die Startkonzentration in Fermentation A bei 45 mM CH_3OH . Nach Reduktion der Konzentration durch den Verbrauch durch die Mikroorganismen (30 Stunden), entsprach die CH_3OH -Konzentration dem Sollwert von 25 mM bis zum Ende der Fermentation. Der Verlauf der CH_3OH -Konzentration ist in Abbildung 3-11 dargestellt. Nach 45 Stunden verringerte sich die spezifische Wachstumsrate auf ca. $0,02\text{-}0,06 \text{ h}^{-1}$. Ursache war vermutlich eine Limitierung von Nitrat als N-Quelle. Nach 40 Stunden Kultivierungszeit war die eingesetzte Nitrat-Konzentration verbraucht (Abbildung 3-11, Kalibriergerade Nitrat in Abbildung 7-4, S.176). Im weiteren Verlauf der Fermentation wurde eine Adaptationsphase der Zellen an die neuen Umgebungsbedingungen von ca. vier Stunden gemessen. Als sensitives kontinuierliches Maß für das Zellwachstum unter aeroben Bedingungen wurde dabei das CO_2 -Signal im Abgas verfolgt. Nach 42 Stunden sank das CO_2 -Signal im Abgas von 0,7 auf 0,3 %, was auf reduziertes Zellwachstum hindeutete. Dieses Verhalten ging mit der Nitratlimitierung einher. Diese war ebenfalls im pH-Wert Verlauf zu erkennen. Bei Nutzung von Nitrat als N-Quelle wird im Zuge der Aufnahme in die Zelle pro Nitrat ein OH^- -Ion ins Medium abgegeben [Moir und Wood, 2001]. Dies sorgt für eine Erhöhung des pH-Wertes und wurde in der eigenen Fermentation A durch Zugabe von 7,5 % H_2SO_4 geregelt. Je stärker das Wachstum der Zellen umso enger die Zeitpunkte der Säure-

zugabe. Nach Verbrauch des Nitrats und infolge der Umstellung des Stoffwechsels auf die Aufnahme von N_2 war diese Neutralisation nicht mehr nötig (siehe Abbildung 3-11).

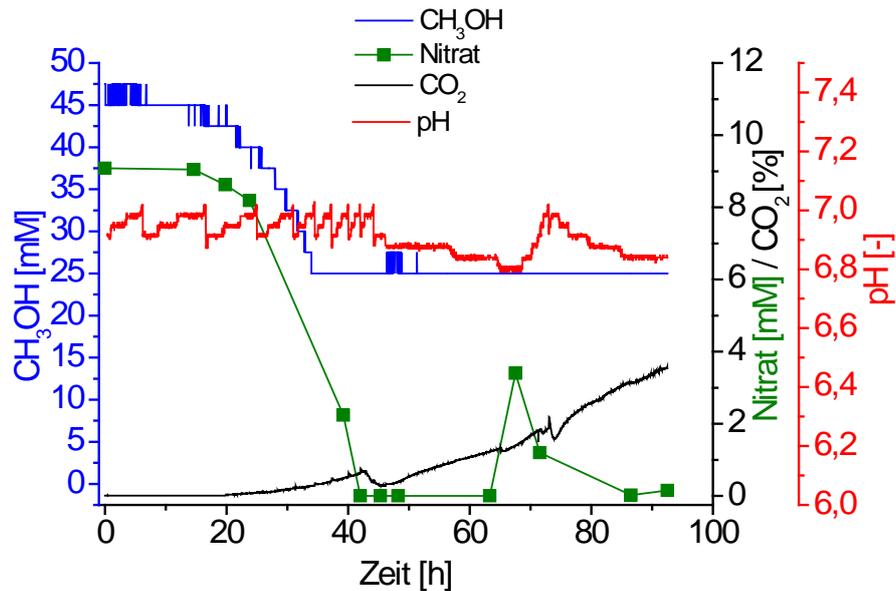


Abbildung 3-11: CH₃OH-Konzentration (blau), Nitrat Konzentration (grün), pH Wert (rot) und die CO₂ Konzentration in der Abgasluft (schwarz) bei Fermentation A von *M. trichosporium* OB3b mit CH₃OH als C-Quelle, mod. NMS-Medium (Tabelle 3-3, S.56) mit Zusatz an 5 μ M ATU bei 30 °C und pH 6,9 im 6,8 L-Maßstab.

Für *M. trichosporium* OB3b ist bekannt, dass der Organismus bei einer Limitierung von Stickstoff im Medium atmosphärischen N_2 als N-Quelle nutzen kann [Park *et al.*, 1991]. Dabei erfolgt die N_2 -Fixierung über eine Nitrogenase (EC.1.18.6.1) [Yoch *et al.*, 1988]. Diese benötigt u.a. als Molybdän Cofaktor. In den ICP-MS-Messungen der Metallgehalte im Medium bzw. in den Zellen konnte für Molybdän ab ca. 40 Stunden eine gesteigerte Konzentration in den Zellen, bzw. eine Reduktion der Konzentration im Medium beobachtet werden (siehe Abbildung 3-13, S.73). Des Weiteren wurde in der SDS-PAGE-Analyse, nach mehr als 40 Stunden Fermentationszeit, eine zusätzliche Proteinbande bei ca. 35 kDa detektiert (Abbildung 3-12, S.72). Diese Bande könnte eine Untereinheit der Nitrogenase repräsentieren (Komponente II für ATP-Hydrolyse, Dimer mit 35 kDa pro Untereinheit [Zehr *et al.*, 2003]). Diese Beobachtungen zeigten, in Kombination mit dem weiteren Zellwachstum, eine Umstellung des *M. trichosporium* OB3b Stoffwechsels auf atmosphärischen N_2 . Im Vergleich zum Wachstum mit Nitrat verringerte sich die spezifische Wachstumsrate nach der Umstellung auf N_2 -Assimilation von $0,09 \text{ h}^{-1}$ auf $0,035 \text{ h}^{-1}$. Ein vergleichbare Reduktion wurde auch in der Literatur beschrieben [Park *et al.*, 1991]. Um zu untersuchen ob sich eine erneute Zugabe von Nitrat positiv auf das Wachstum auswirkte, wurde nach 63,3 Stunden die Nitrat-Konzentration im Reaktor auf 4,4 mM erhöht. Eine Veränderung des Wachstums infolge der Nitratzugabe und des anschließenden Verbrauches von Nitrat wurde im Anschluss nicht beobachtet. Nach 73 Stunden sank die CO₂-Konzentration im Abgas von 1,9 auf 1,6 %, was auf eine erneute Anpassung des Stoffwechsels auf die verstärkte N_2 -Fixierung deuten könnte. Im gleichen Zeitraum konnte eine Reduktion des pH Wertes gemessen werden, wie bereits nach 40 Stunden während der Nitratlimitierung zu beobachten war. Die CO₂-Konzentration stieg bei der erneuten Nitratlimitierung bereits nach einer Stunde wieder an. Im Gegensatz dazu dauerte die Umstellung bei 40 Stunden etwa vier Stunden. Die schnellere Anpassung an die erneute Limitierung der N-Quelle könnte z.B. durch die ggf. bereits vor-

handenen Enzyme zur N_2 -Fixierung begründet werden. Da der Proteinumsatz dieser Enzyme nicht bekannt ist kann diesbezüglich keine genaue Aussage getroffen werden. Die spezifische Wachstumsrate über den gesamten Prozess betrug $0,06 \text{ h}^{-1}$ und eine finale Biomassenkonzentration von $13,9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ wurde nach 92,5 Stunden Fermentation gemessen.

Die sMMO-Aktivität konnte sowohl im Ganzzell-Naphthalin-Assay, als auch über das Vorhandensein der MMOH-Proteinbanden mittels SDS-PAGE zu gewählten Zeitpunkten im Fermentationsverlauf nachgewiesen werden (Abbildung 3-10, S.69 und Abbildung 3-12, S.72). Es wurde eine Steigerung der sMMO-Aktivität um Faktor 7,5 von 20 Stunden bis zum Ende der Fermentation nach 92,5 Stunden gemessen (36 auf $275 \mu\text{mol}_{1\text{-Naphthol}} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$). Diese Steigerung könnte durch das geringere $\text{Cu(II)}/\text{Biomassen-Verhältnis}$ und die damit höhere sMMO-Bildung bedingt worden sein. In der SDS-PAGE konnte hingegen keine Steigerung der Bandenintensität der MMOH-Proteinbanden beobachtet werden. Die Banden der anderen sMMO Komponenten MMOB und MMOR wurden in der SDS-PAGE nicht identifiziert. Die beobachtete Steigerung der sMMO-Aktivität könnte auch durch eine verstärkte Produktion dieser beiden Komponenten verursacht worden sein. Weiterhin könnte die gesteigerte sMMO-Aktivität auch auf ein geringeres Verhältnis der CH_3OH -Konzentration und der Biomasse in den zur Aktivitätsmessung eingesetzten Proben zurückgeführt werden. Bei höheren Biomassenkonzentrationen im Fermenter wurde die Probe für den Messansatz immer stärker verdünnt (Standardbedingungen $0,094 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BTM im Messansatz). Daraus resultierte eine geringere Menge an CH_3OH im jeweiligen Messansatz. Je geringer die CH_3OH -Konzentration im Ansatz, umso geringer war vermutlich der maskierende Effekt von CH_3OH auf die sMMO-Aktivität. Dieser maskierende Effekt könnte, wie in Kapitel 3.1.2.3, S.59 beschrieben, durch einen Waschschriff der Zellen vor dem Aktivitätstest verringert werden. Ein Waschschriff erfolgte in Fermentation A nicht. Außerdem könnten höhere Biomassenkonzentrationen in den Proben zu einem gesteigerten CH_3OH -Verbrauch vor dem jeweiligen Aktivitätstest geführt haben. Die somit reduzierte CH_3OH -Konzentration wäre ebenfalls eine mögliche Erklärung für die gesteigerte sMMO-Aktivität im Verlauf der Fermentation A.

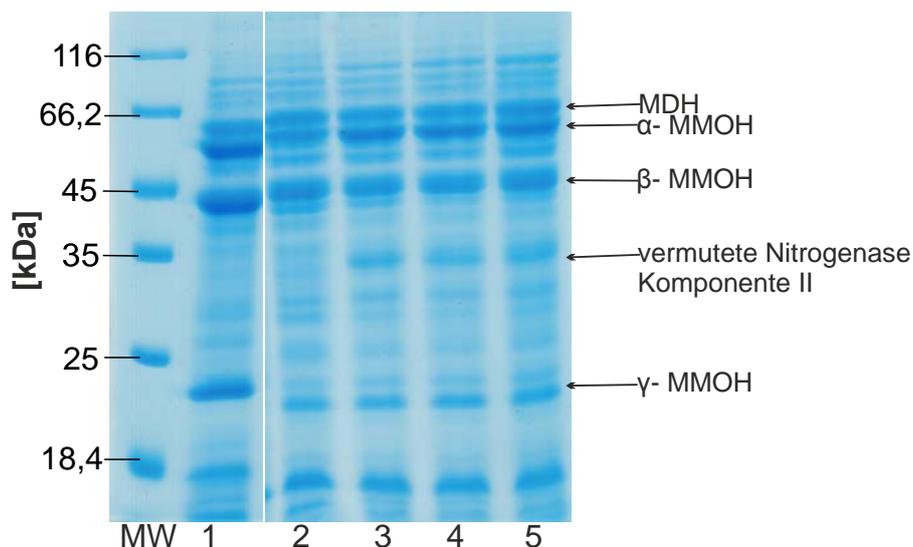


Abbildung 3-12: 12,5 %iges-SDS-PA-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben aus der Fermentation A von *Methylosinus trichosporium* OB3b im 6,8 L Reaktor. MW-Marker (PageRuler™), Es wurden 1/OD Proben aufgetragen; 1- Vorkultur CH_4 ; 2- 42 h; 3- 63 h; 4- 86,5 h; 5- 92,5 Stunden Fermentationszeit. MDH-60 kDa, α -MMOH 60 kDa, β -MMOH 45 kDa, vermutliche Nitrogenase Komponente II 35 kDa, γ -MMOH 20 kDa. Diese Abbildung zeigt verschiedene Abschnitte aus einem PA-Gel, zur besseren Übersicht wurden verschiedenen Bahnen entfernt.

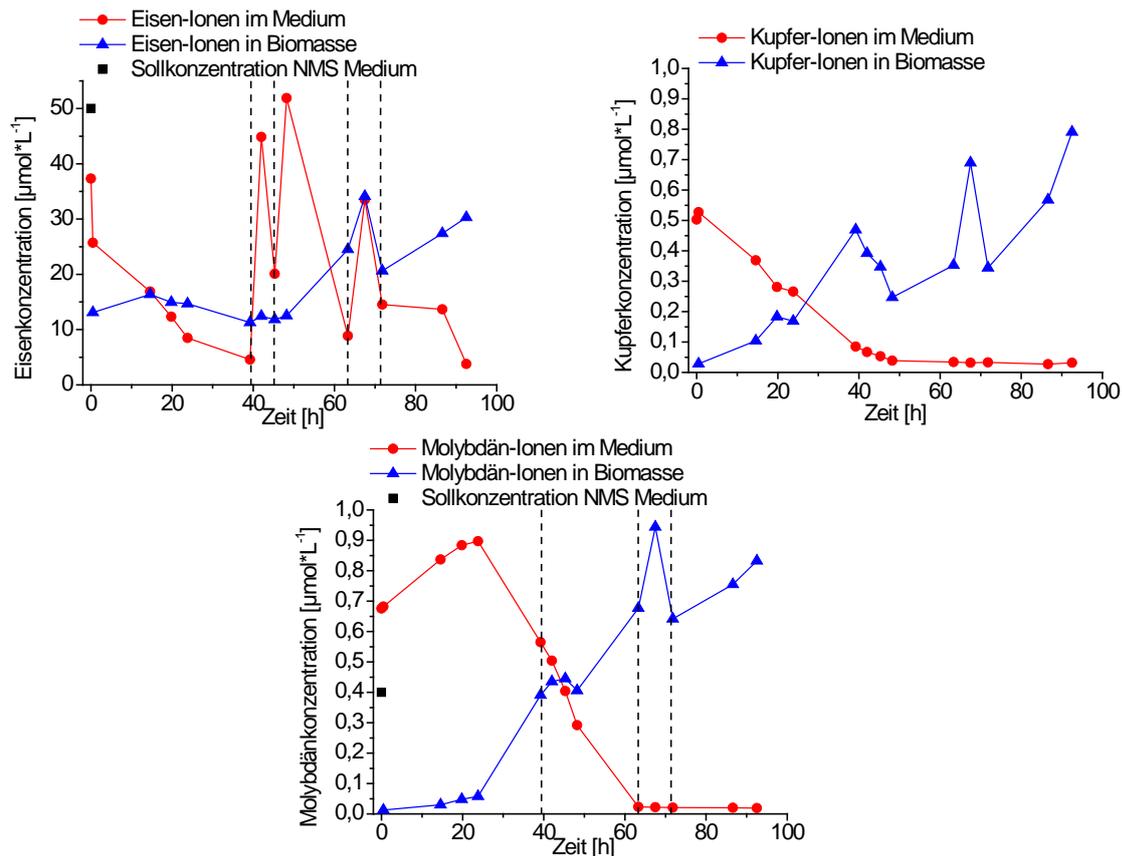


Abbildung 3-13: Konzentration von Eisen-, Kupfer- und Molybdän-Ionen im Medium (rot) und innerhalb der Biomasse (blau) bei Fermentation A von *M. trichosporium* OB3b mit CH_3OH als C-Quelle, mod. NMS Medium (Tabelle 3-3, S.56) mit Zusatz an $5 \mu\text{M}$ ATU bei 30°C und pH 6,9 im 6,8 L-Maßstab. Angegeben sind die berechneten Konzentrationen in $\mu\text{mol Metallion}\cdot\text{L}^{-1}$ aus den Messungen mittels ICP-MS. Die Konzentration der Metalle in der Biomasse wurde in $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ angegeben und somit auf das Fermentationsvolumen mit der entsprechenden Biomassenkonzentration zum jeweiligen Zeitpunkt bezogen. Berechnung anhand Formel 7-1 im Anhang, S.177. Die gestrichelten Linien entsprechen dem Zeitpunkt der Zugabe der jeweiligen Komponente (Tabelle 3-6, S.70). Die Originaldaten der Eisenionenkonzentration wurden mit Faktor zehn multipliziert, da offensichtlich ein Verdünnungsfehler vorlag.

Die Analyse der Metallionen mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) erfolgte, um die Konzentrationen der untersuchten Metallionen sowohl im Medium, als auch in der Biomasse zu messen. Anhand dieser Daten sollten etwaige Limitierungen identifiziert und für die Optimierung der weiteren Fermentationen berücksichtigt werden. Dadurch sollte auf Basis der Daten der ICP-MS-Messungen eine verbesserte *Feeding*-Strategie für die weiteren Fermentationen von *M. trichosporium* OB3b erfolgen. Weiterhin sollte durch die Metallanalyse mögliche Veränderungen der Wachstumsbedingungen bzw. des Stoffwechsels des Organismus identifiziert werden. Beispielhaft hierfür war die erwähnte Umstellung des N-Stoffwechsels mit der beobachteten Molybdänionen-Aufnahme in die Zellen (Abbildung 3-13). Neben dieser Beobachtung zeigte sich, dass die Eisenkonzentration innerhalb der Zellen im Laufe der Fermentation um Faktor zwei anstieg und sich im Medium auch nach mehrfacher Eisen-Zugabe weiter auf ein Zehntel der Sollkonzentration reduzierte. Der Organismus benötigt Eisenionen vor allem für die sMMO (Kapitel 1.1.2.2, S.7, bis zu 12 % des gesamten löslichen Proteinanteils), bzw. für das aktive Zentrum der Hydroxylase und das Eisen-Schwefel-Cluster der Reduktase. Die beobachtete Steigerung der sMMO-Aktivität (Abbildung 3-10, S.69) könnte auf eine bessere Versorgung der Zellen mit Eisen

zurückzuführen werden. Für weitere Fermentationen sollte deshalb die eingesetzte *Feeding*-Strategie bezüglich des Eisens beibehalten werden. Weiterhin wurde eine Aufnahme von Cu(II) aus dem Medium in die Zellen beobachtet. Aktiv wurde kein Cu(II) zugegeben, um die pMMO-Bildung zu unterdrücken. Durch die Zugabe verschiedener anderer Komponenten die mit Spuren an Cu(II) verunreinigt waren, könnte zusätzliches Cu(II) zugeführt worden sein. Allerdings wurde der Konzentrationsbereich für Cu(II) der zum „Umschalten“ von sMMO- auf pMMO-Bildung angegeben wird (ca. $1,0 \mu\text{mol Cu}^* \text{ g BTM}^{-1}$ [Murrell, 1994; Semrau *et al.*, 2013]), niemals überschritten. Zusätzlich wurde in allen Fermentationen $5 \mu\text{M}$ ATU als Cu(II)-bindende Komponente eingesetzt um eine pMMO-Bildung durch etwaige Cu(II)-Verunreinigungen gänzlich auszuschließen.

Im Rahmen der ICP-MS-Messungen wurden auch die Konzentrationen von Magnesium-, Calcium- und Zinkionen bestimmt (siehe Anhang Abbildung 7-5, S.177). Für diese Metalle wurde gegen Ende der Fermentation ($> 60 \text{ h}$) eine verstärkte Aufnahme in die Biomasse gemessen. Eine Limitierung dieser Metallionen wurde während des gesamten Fermentationszeitraumes nicht gemessen. Auf Basis der Literaturdaten von Yu und Kollegen wurden in dieser Fermentation einmalig Calcium- und mehrfach Magnesiumionen zugegeben [Yu *et al.*, 2009a; Yu *et al.*, 2009b]. Da für beide Metalle keine Limitierung im Medium beobachtet wurde erfolgte in den folgenden Fermentationen keine weitere Zugabe der beiden Komponenten. Nach Ende der Fermentation erfolgte das Abtrennen der sMMO-aktiven Biomasse über Zentrifugation (Kapitel 2.3.1.6, S.30). Es wurden insgesamt 530 g BFM geerntet, in 100 g Teile portioniert, in fl. N_2 eingefroren und bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die Kennzahlen zur Fermentation A sind in Tabelle 3-7 zusammengefasst.

Tabelle 3-7: Zusammenfassung der Ergebnisse der Fermentation A von *M. trichosporium* OB3b mit CH_3OH als C-Quelle, mod. NMS Medium (Tabelle 3-3, S.56) mit Zusatz an $5 \mu\text{M}$ ATU bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ und pH 6,9 im 6,8 L-Maßstab

Parameter	Wert
Kultivierungszeit [h]	92,5
Finales Volumen [L]	6,8
Finale Biomassenkonzentration [g^*L^{-1}]	13,9
Verbrauchtes CH_3OH	$252 \text{ g} = 315 \text{ mL}$
Ertragskoeffizient $Y_{\text{BTM}/\text{CH}_3\text{OH}}$ [$\text{g}_{\text{BTM}}^* \text{g}_{\text{CH}_3\text{OH}}^{-1}$]	0,37
Durchschnittliche spezifische Wachstumsrate $\bar{\mu}$ [h^{-1}]	0,03
Maximale spezifische Wachstumsrate μ_{max} [h^{-1}]	0,13 [14-24 h]
Geerntete Biofeuchtmasse [g]	530
Finale sMMO-Aktivität [$\mu\text{mol}_{1\text{-Naphthol}}^* \text{h}^{-1} \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$]	275
Verbrauchte 7,5 % H_2SO_4 [mL]	35
Verbrauchte 10,0 % NaOH [mL]	5
Verbrauchtes Antischaummittel (Sigma SE-15) [mL]	88

Die Daten von Fermentation A zeigten, dass das Wachstum von *M. trichosporium* OB3b mit Nachweis der sMMO-Aktivität auch während der Limitierung von Nitrat als N-Quelle möglich war. Für die nächste Fermentation sollte neben der getesteten *Feeding*-Strategie für Spurenelemente und Eisenionen auch Nitrat über den gesamten Zeitraum zugegeben werden. Das Ziel war es Ziel eine Verzögerung der Wachstumsrate durch eine Stoffwechselumstellung zu vermeiden und eine höhere Biomasseendkonzentrationen zu erzielen.

3.2.1.2 Fermentation mit Nitrat-Feed (Fermentation B)

Auf Grundlage der Daten von Fermentation A aus Kapitel 3.2.1.1, S.69 erfolgte eine zweite Fermentation im 6,8 L-Maßstab mit mehrfacher Zugabe von Nitrat (siehe Kapitel 2.3.1.5, S.29). Dadurch sollte die Verringerung der spezifischen Wachstumsrate, infolge der Umstellung des Metabolismus auf N_2 -Fixierung, vermieden werden. Die Strategie für die Nitratzugabe orientierte sich an Literaturangaben für Fermentationen im Bioreaktor. Im Bereich von 5 bis 20 mM Nitrat wurde kein Einfluss der Nitratkonzentration auf die finale Biomassenkonzentration gemessen [Park *et al.*, 1991]. Im Schüttelkolbenmaßstab mit *M. trichosporium* OB3b wurden im Bereich von 2 bis 100 mM Nitrat kein Einfluss auf die sMMO Ganzzell-Aktivität und die Wachstumsrate gemessen [Bowman und Sayler, 1994]. Basierend auf diesen Daten wurde eine obere Grenze von 20 mM Nitrat für Fermentation B festgelegt. Neben der sequentiellen Zugabe von Nitrat erfolgte Fermentation B mit einer veränderten *Feeding*-Strategie, bezüglich der anderen Medienkomponenten. Auf Basis der Ergebnisse aus Fermentation A (siehe Abbildung 7-5, S.177 im Anhang) wurde auf die Zugabe von Magnesium- oder Calciumionen in Fermentation B verzichtet. Die zugegebenen Medienkomponenten, mit den entsprechenden Konzentrationen sind in Tabelle 3-8 angegeben. Die anderen Bedingungen bzw. Einstellungen waren analog zu Fermentation A (siehe Tabelle 3-5, S.70). Die Konzentration der Biomasse, die Ganzzell-sMMO-Aktivität und die Nitrat-Konzentration über die Kultivierungsdauer sind in Abbildung 3-14 dargestellt.

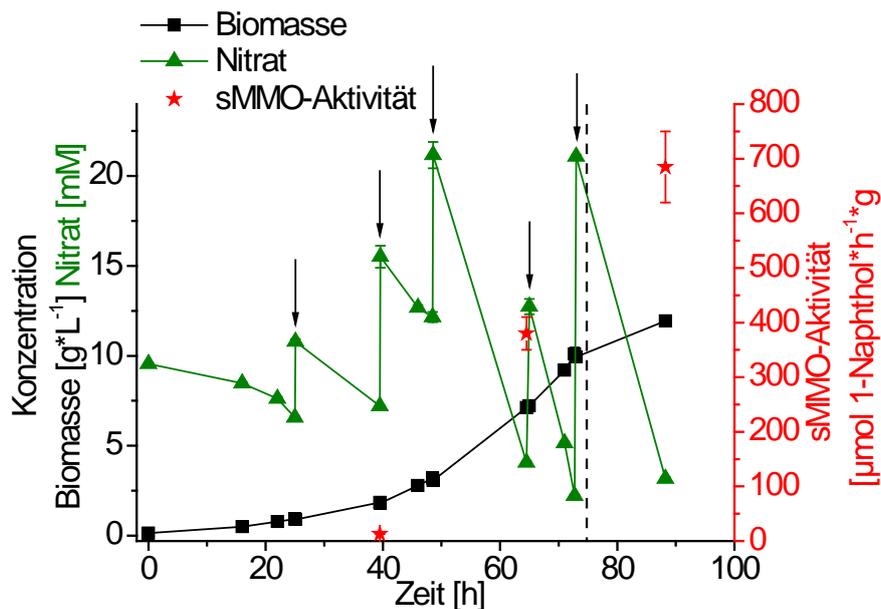


Abbildung 3-14: Biomassekonzentration (schwarz), Nitrat-Konzentration (grün) und sMMO-Aktivität (rot) bei Fermentation B von *M. trichosporium* OB3b mit CH_3OH als C-Quelle, mod. NMS Medium (Tabelle 3-3, S.56) mit Zusatz an $5 \mu M$ ATU bei $30 \text{ }^\circ C$ und pH 6,9 im 6,8 L-Maßstab. Die Pfeile symbolisieren Zugaben an Medienkomponenten, genaue Auflistung siehe Tabelle 3-8. Die gestrichelte Linie symbolisiert den Zeitpunkt an dem durch zu starke Schaumbildung der Abgasfilter des Reaktors verstopfte.

Die eingestellte Nitrat-Konzentration (Kalibriergerade im Anhang Abbildung 7-4, S.176) wurde entsprechend des vorgegebenen Bereiches reguliert und bewegte sich im Bereich zwischen 2,2 und 21,2 mM (Abbildung 3-14). Die Konzentration der Biomasse war bis 40 Stunden vergleichbar zu Fermentation A (jeweils ca. $1,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Die maximale spezifische Wachstumsrate in Fermentation B wurde zwischen 0 und 25 Stunden erreicht und betrug $0,075 \text{ h}^{-1}$.

Die Wachstumsrate über den Prozess bis 73 Stunden betrug $0,045 \text{ h}^{-1}$ (Berechnung mittels exponentieller Anpassung). Die geringere spezifische Wachstumsrate am Beginn der Kultivierung, im Vergleich zu Fermentation A ($0,13 \text{ h}^{-1}$), war vermutlich auf die zweifach höhere CH_3OH -Konzentration am Start der Fermentation zurückzuführen (Abbildung 3-15). Die technische Betreuung der Anlage wurde im Rahmen der Kooperation vom CBP übernommen. Im Laufe der Fermentation B führten, neben der erhöhten CH_3OH -Konzentration am Beginn, zwei weitere technische Probleme zu Unregelmäßigkeiten in der CH_3OH -Versorgung. Durch den, bereits in Fermentation A beobachteten, Überdruck in der Methanolstrecke wurde am Beginn eine CH_3OH -Konzentration von 92,5 statt 25 mM im Fermenter eingestellt. Aufgrund der Inaktivierung der CH_3OH -Versorgung kam es zwischen 33,8 bis 37,4 Stunden zu einer Limitierung von CH_3OH . Nach Aktivierung der CH_3OH -Versorgung wurde erneut eine zu große Menge an CH_3OH in den Fermenter gepumpt. Die so eingestellte CH_3OH -Konzentration von 58 mM lag erneut über der eigentlichen Konzentration von 25 mM. Die vierstündige Limitierung der C-Quelle CH_3OH reduzierte das Wachstum der Organismen. Dies konnte an der Reduktion der CO_2 -Konzentration im Abgas beobachtet werden (Abbildung 3-15). Die CO_2 -Konzentration ist bei aeroben Zellen ein Maß für das Wachstum der Organismen. Nach der erneuten CH_3OH -Zufuhr nach 37,4 Stunden wuchsen die Zellen weiter. Daraus resultierte ein erneuter Anstieg der CO_2 -Konzentration im Abgas. Von 42 bis 72 Stunden erfolgte ein störungsfreier Fermentationsprozess mit Nachweis der sMMO-Aktivität und einer durchschnittlichen spezifischen Wachstumsrate von $0,05 \text{ h}^{-1}$. Nach 72 Stunden kam es zu einer starken Schaumbildung im Reaktor. Trotz Zugabe von hohen Volumina Antischaummittel konnte diese massive Schaumbildung nicht gestoppt werden. Infolgedessen verstopfte der Schaum den Abgasfilter und die Messung des CO_2 -Gehaltes war nicht mehr möglich. Da die Wachstumsrate in der Folge auf $0,01 \text{ h}^{-1}$ sank wurde der Prozess nach 88 Stunden beendet.

Tabelle 3-8: Zugegebene Medienkomponenten mit entsprechenden Konzentrationsangaben und der Biomassenkonzentration zum jeweiligen Zeitpunkt der Fermentation B von *M. trichosporium* OB3b mit CH_3OH als C-Quelle, mod. NMS Medium (Tabelle 3-3, S.56) mit Zusatz an 5 μM ATU bei 30 °C und pH 6,9 im 6,8 L-Maßstab aus Abbildung 3-14.

Zeitpunkt [h]	Zugegebene Lösung	Finale Konzentration [6,8 L]	Biomassenkonzentration [$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]
25,0	33 mL 1 mM NaNO_3 14 mL 5 mM Fe(II)	NaNO_3 -5,1 mM Fe(II)-10,7 μM	$0,92 \pm 0,04$
39,5	64 mL 1 mM NaNO_3	NaNO_3 -9,8 mM	$1,841 \pm 0,08$
48,5	63 mL 1 mM NaNO_3 14 mL 10 mM Fe(II) 4 mL Spurenelementelösung	NaNO_3 -9,7 mM Fe(II)-10,7 μM	$3,20 \pm 0,10$
64,5	66 mL 1 mM NaNO_3	NaNO_3 -9,7 mM	$7,12 \pm 0,16$
72,8	131 mL 1 mM NaNO_3 14 mL 10 mM Fe(II)	NaNO_3 -20,1 mM Fe(II)-10,7 μM	$10,08 \pm 0,37$

Schaum entsteht in einem Kultivierungsprozess wenn die durch die Begasung eingeleiteten Gasblasen auf dem Weg durch die Flüssigkeit mit sogenannten grenzflächenaktiven Substanzen zusammentreffen. Diese lagern sich an die Gasblase an. Bei Erreichen der Flüssigkeitsoberfläche sammeln sich die grenzflächenaktiven Substanzen samt Gasblase und bilden Schaum. Für biotechnologische Prozesse ist die Schaumbildung, aufgrund der Belegung des Reaktorraumes und der ungünstigen Bedingungen im Schaum, nachteilig. Ein grenzflächenaktives Molekül, welches von *Methylosinus trichosporium* OB3b gebildet werden kann

ist Polyhydroxybuttersäure (PHB). Die PHB-Bildung durch den Organismus konnte auch in eigenen Versuchen gezeigt werden, siehe die TEM-Aufnahmen in Abbildung 3-2, S.50 und Abbildung 3-6, S.59. Die massive Schaumbildung nach 72 Stunden könnte durch eine verstärkte Zelllyse infolge einer nicht identifizierten Limitierung z.B. eines Spurenelementes verursacht worden sein. Dadurch würde PHB als grenzflächenaktive Substanz freigesetzt und die Folge wäre eine erhöhte Schaumbildung. Die reduzierte spezifische Wachstumsrate nach 72 Stunden Kultivierungsdauer war mit der starken Schaumbildung und der daraus resultierenden Ausschwemmung von Biomasse zu erklären.

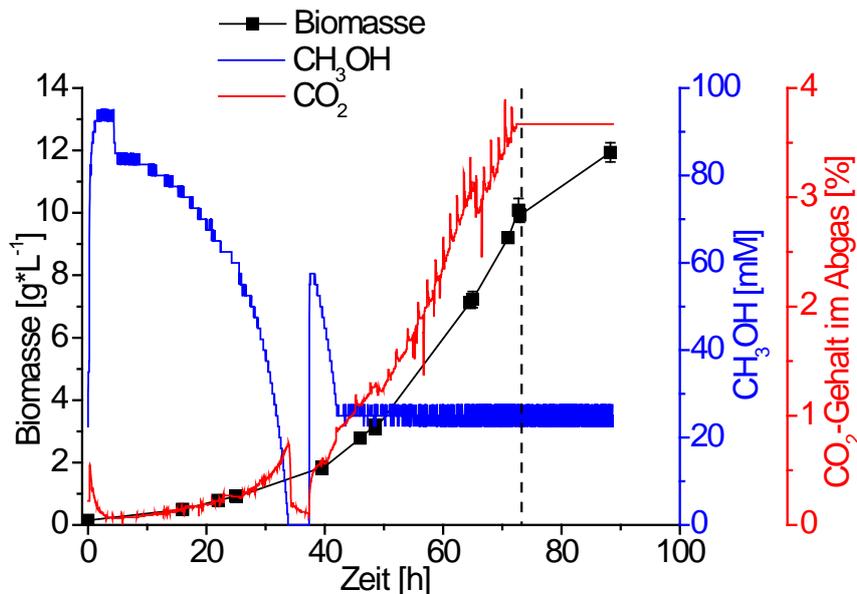


Abbildung 3-15: Biomassenkonzentration (schwarz), CH₃OH-Konzentration (blau) und CO₂-Gehalt (rot) in der Abgasluft bei Fermentation B von *M. trichosporium* OB3b mit CH₃OH als C-Quelle, mod. NMS Medium (Tabelle 3-3, S.56) mit Zusatz an 5 μM ATU bei 30 °C und pH 6,9 im 6,8 L-Maßstab.

Wie bereits in Fermentation A gezeigt, wurden die sMMO und deren Aktivität mittels SDS-PAGE und Ganzzell-Naphthalin-Assay über den Fermentationszeitraum zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert. In der SDS-PAGE-Analyse konnten die Proteinbanden der MMOH in vergleichbarer Intensität über den Kultivierungszeitraum beobachtet werden (siehe Anhang Abbildung 7-7, S.179). In den Aktivitätsmessungen wurde der Effekt des Waschens der Zellen mit CH₃OH-freiem mod. NMS-Medium vor dem Einsatz im Ganzzell-Naphthalin-Assay untersucht (vergleiche Kapitel 3.1.2.3, S.59). Dabei konnte eine Erhöhung der gemessenen sMMO-Aktivität um bis zu Faktor 40 nach einmaligem Waschen der Zellen analysiert werden (Tabelle 3-9). Dies bestätigte, dass CH₃OH im Medium bzw. in den Zellen die Messung der Ganzzellaktivität maskierte, da Naphthalin und CH₃OH bezüglich der sMMO-Reaktion in Konkurrenz zueinander standen. Die Reduktion der sMMO-Aktivität in der letzten Messung nach Waschen der Zellen könnte auf Stress der Zellen durch die massive Schaumbildung im Reaktor zurückgeführt werden.

Wie bereits zuvor bei Fermentation A beschrieben, wurden auch für Fermentation B die Konzentrationen verschiedener Metallionen im Medium und in den Zellen mittels ICP-MS untersucht. Die Aussagekraft der Ergebnisse dieser Messungen war im Vergleich zu Fermentation A gering. Eine klare Tendenz für die Konzentrationen von Eisenionen sowie Kupferionen war nicht erkennbar (siehe Anhang Abbildung 7-6, S.178). Für die Konzentrationen von Molybdän war im Gegensatz zu den Daten aus Fermentation A keine Aufnahme der Metallionen

aus dem Medium in die Zellen zu erkennen (siehe Anhang Abbildung 7-6, S.178). Aufgrund des Nitrat-Feedings wurde in Fermentation B keine Limitierung von Nitrat beobachtet. Eine Umstellung des N-Stoffwechsels auf die N₂-Aufnahme wurde anhand der hier vorliegenden Daten nicht beobachtet. Unter anderem wurde die putative Bande der Nitrogenase-Komponente II auf Höhe von 35 kDa in der SDS-PAGE-Analyse der Proben von Fermentation B im Gegensatz zu Fermentation A nicht beobachtet (Anhang Abbildung 7-7, S.179). Eine Limitation der Magnesium- und Calciumionen wurde auch ohne zusätzliche Zugabe dieser Komponenten, im Verlauf von Fermentation B nicht beobachtet (siehe Anhang Abbildung 7-6, S.178). Die auf Basis der Daten von Fermentation A getroffene Einschätzung Magnesium- und Calciumionen nicht zu zugeben, da keine Limitierung vermutet wurde, war somit richtig. Aussagen bezüglich der anderen Metallionen z.B. Zn(II) konnten auf Basis der vorliegenden ICP-MS-Daten von Fermentation B nicht getroffen werden.

Tabelle 3-9: sMMO-Aktivität der Zellen aus Fermentation B von *M. trichosporium* OB3b mit CH₃OH als C-Quelle, mod. NMS Medium (Tabelle 3-3, S.56) mit Zusatz an 5 µM ATU bei 30 °C und pH 6,9 im 6,8 L-Maßstab mit und ohne Waschen der Zellen mit CH₃OH-freiem Medium vor der Aktivitätsmessung. Waschen: Zentrifugation der Zellen; Abnahme Überstand; Resuspendieren mit CH₃OH-freiem Medium; OD₆₀₀-Messung; Einsatz im Aktivitäts-Assay. n= drei bis vier Messungen.

Zeit [h]	sMMO-Aktivität [$\mu\text{mol}_{1\text{-Naphthol}} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$]	
	Zellen unbehandelt	Zellen 1x gewaschen
39,5	13,0 ± 0,4	530 ± 65
64,5	380 ± 30	1575 ± 140
88,3	685 ± 65	1075 ± 25

Tabelle 3-10: Zusammenfassung Fermentation B von *M. trichosporium* OB3b mit CH₃OH als C-Quelle, mod. NMS Medium (Tabelle 3-3, S.56) mit Zusatz an 5 µM ATU bei 30 °C und pH 6,9 im 6,8 L-Maßstab.

Parameter	Wert
Kultivierungszeit [h]	88,3
Finales Volumen [L]	6,8
Finale Biomassenkonzentration [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]	11,9
Verbrauchtes CH ₃ OH	324 g = 407 mL
Ertragskoeffizient $Y_{\text{BTM}/\text{CH}_3\text{OH}}$ [$\text{g}_{\text{BTM}} \cdot \text{g}_{\text{CH}_3\text{OH}}^{-1}$]	0,25
Durchschnittliche spezifische Wachstumsrate $\bar{\mu}$ [h^{-1}]	0,045
Maximale spezifische Wachstumsrate μ_{max} [h^{-1}]	0,075 [0-25 h]
Geerntete Biofeuchtmasse	Inokulation 68 L Fermentation
Finale sMMO-Aktivität [$\mu\text{mol}_{1\text{-Naphthol}} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$]	1075
Verbrauchte 7,5 % H ₂ SO ₄ [mL]	245
Verbrauchte 10,0 % NaOH [mL]	0
Zugegebene Nitratlösung [mL]	356 (52,3 mM)
Verbrauchtes Nitrat	55,5 mM [$2,5 \text{ g}_{\text{BTM}} \cdot \text{g}_{\text{Nitrat}}^{-1}$]
Verbrauchtes Antischaummittel (Sigma SE-15) [mL]	365

Die Zusammenfassung der Ergebnisse von Fermentation B ist in Tabelle 3-10 dargestellt. Die verbrauchte CH₃OH-Menge war in Fermentation B höher als bei Fermentation A, aber die mittlere und auch die maximale spezifische Wachstumsrate waren geringer (Tabelle 3-7, S.74). Die Ursache für das geringere Wachstum waren vermutlich die Probleme mit der CH₃OH-Versorgung am Beginn bzw. die massive Schaumbildung am Ende (>72 Stunden)

von Fermentation B. In Summe wurde in Fermentation B eine geringere Endkonzentration der Biomasse gemessen. Nach 88,3 Stunden wurde die Fermentation B beendet. Die Zellsuspension diente als Inokulum für eine Fermentation im 68 L-Maßstab. Durch diese Maßstabsvergrößerung sollte eine ausreichende Menge an sMMO-aktiver Biomasse von *M. trichosporium* OB3b produziert werden.

3.2.2 Fermentation im 68 L-Maßstab (Fermentation C)

Zur Produktion einer ausreichenden Menge an sMMO für die *in vitro*-Analysen erfolgte eine Fermentation im 68 L-Maßstab. Dabei diente die Zellsuspension der zuvor beschriebenen Fermentation B als Inokulum. Die Grundeinstellungen waren analog zu den beiden vorigen Fermentationen (Tabelle 3-5, S.69). Wie bei Fermentation B erfolgte eine Zugabe von Nitrat, im Bereich 3 bis 25 mM, um eine N-Limitation zu vermeiden. Aufgrund verschiedener technischer und prozessbedingter Probleme waren die Ergebnisse von Fermentation C nicht mit den anderen beiden Fermentationen im 6,8 L-Maßstab vergleichbar. Neben einer erhöhten CH₃OH-Konzentration (38 mM) am Beginn der Kultivierung kam es ab 15 Stunden zu einer Erhöhung der Temperatur im Reaktor. Dies resultierte aus der manuellen Abschaltung der Temperaturregulation. Nach 25 Stunden wurde diese reaktiviert. Zu diesem Zeitpunkt hatte sich die Temperatur bereits auf 41 °C erhöht und das Wachstum der Organismen stagnierte. Weiterhin wurde auch in Fermentation C eine massive Schaumbildung beobachtet. Diese führte nach 65 Stunden zum Verstopfen des Abgasfilters und zum Ablösen der Schläuche zur Säureregulation des pH-Wertes (in der Nacht). Infolgedessen stieg der pH-Wert auf 7,17 und der CO₂-Gehalt konnte nicht weiter analysiert werden. Die Ergebnisse von Fermentation C sind im Anhang in Abbildung 7-8, S.179, Abbildung 7-9, S.180, Tabelle 7-1, S.180, und Tabelle 7-2, S.181 dargestellt. Die starke Schaumbildung konnte nicht durch die Zugabe des zuvor verwendeten Antischaummittels reduziert werden. Nach 65 Stunden reduzierten sich das Wachstum der Zellen, sowie die sMMO-Aktivität. Um die Schaumbildung zu reduzieren, die sMMO-Aktivität nicht weiter zu verringern und die Ernte der Zellen vorzubereiten, wurde der Reaktor für 20 Stunden bei 8 °C gekühlt. Die sMMO wurde während des gesamten Prozesses über Analyse der Proben mittels SDS-PAGE und Messung der Aktivität im Ganzzell-Naphthalin-Assay untersucht (Anhang Abbildung 7-7, S.179 und Abbildung 7-8, S.179). Die sMMO-Aktivität und das Vorhandensein der MMOH-Proteinbanden wurden in allen Proben der Fermentation nachgewiesen. Vermutlich infolge der aufgetretenen Probleme in Bezug auf die Schaumbildung reduzierte sich die gemessenen sMMO-Aktivität am Ende der Fermentation von $750 \mu\text{mol}_{1\text{-Naphthol}} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$ (73 Stunden) auf $650 \mu\text{mol}_{1\text{-Naphthol}} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$ (100 Stunden). Nach der 20-stündigen Abkühlphase der Zellen, verringerte sich die gemessene sMMO-Aktivität von 650 auf $550 \mu\text{mol}_{1\text{-Naphthol}} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$. Die Reduktion der sMMO-Aktivität war mit dem Abkühlen des Reaktors und der dadurch bedingten Reduktion des Zellstoffwechsels zu erklären.

Trotz der angesprochenen technischen Probleme in der Fermentation C konnte das Hauptziel der Fermentationsexperimente, die Produktion von sMMO-aktiver Biomasse von *M. trichosporium* OB3b, vollständig erreicht werden. Nach der Kühlphase des Reaktors erfolgte die Ernte der Biomasse. Es wurde eine Gesamtausbeute von 3,94 kg Biomasse gemessen, portioniert, in fl. N₂ eingefroren und bei – 80 °C gelagert. Diese sMMO-aktive Biomasse wurde anschließend zur Aufarbeitung der sMMO, der biochemischen Charakterisierung und dem Einsatz in *in vitro*-Analysen zur CH₃OH-Bildung eingesetzt.

3.2.3 Zusammenfassung und Diskussion der Fermentationen von *Methylosinus trichosporium* OB3b mit CH₃OH als C-Quelle

Der Vergleich der beiden Fermentationen A und B im 6,8 L-Maßstab bezüglich der Biomassenkonzentration ist in Abbildung 3-16 dargestellt. In den ersten 40 Stunden wurde für beide Fermentationen (Nitrat-Limitierung-Fermentation A, Nitrat-Feeding-Fermentation B) ein vergleichbares Wachstumsverhalten beobachtet. Die höhere maximale Wachstumsrate bei Fermentation A ($0,13 \text{ h}^{-1}$) im Vergleich zu Fermentation B ($0,075 \text{ h}^{-1}$) auf die doppelte CH₃OH-Konzentration (100 statt 50 mM) am Beginn von Fermentation B zurückzuführen. Adegbola und Kollegen zeigten in Schüttelkolbenversuchen mit *M. trichosporium* OB3b eine Reduktion der Wachstumsrate bei Erhöhung der CH₃OH-Konzentration ($0,45 \text{ h}^{-1}$ bei 15 mM bzw. $0,35 \text{ h}^{-1}$ bei 62 mM CH₃OH) [Adegbola, 2008]. Nach 40 Stunden reduzierte sich das Wachstum der Zellen in Fermentation A. Die Ursache hierfür war die Limitierung von Nitrat als N-Quelle. Und die Umstellung der Zellen auf die N₂-Aufnahme aus der Atmosphäre. Über den gesamten Fermentationszeitraum wurde eine durchschnittliche Wachstumsrate von $0,03 \text{ h}^{-1}$ bestimmt. In Fermentation B lag nach 40 Stunden, aufgrund der Nitratzugabe, keine N-Limitierung vor. Über den gesamten Kultivierungszeitraum, mit Ausnahme des letzten Probenahme, wurde eine durchschnittliche Wachstumsrate von $0,045 \text{ h}^{-1}$ bestimmt. Nach 72 Stunden verringerte sich das Wachstum der Zellen in Fermentation B und eine starke Schaumbildung wurde im Reaktor beobachtet. Die Schaumbildung wurde vermutlich durch eine verstärkte Zelllyse infolge einer Limitierung einer essentiellen Medienkomponente ausgelöst. Am Ende der beiden Fermentationen wurden nach 86,5 bzw. 88,3 Stunden Kultivierungszeit vergleichbare Biomassenkonzentration von $11,7$ bzw. $11,9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ gemessen.

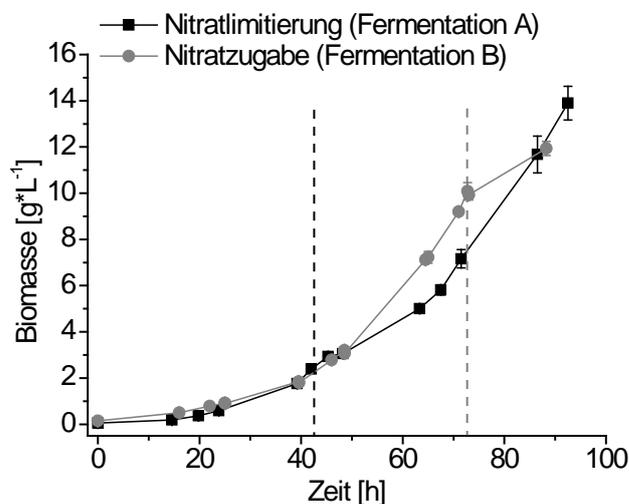


Abbildung 3-16: Vergleich der Biomassekonzentration im Verlauf der beiden Fermentationen A (schwarz) und B (grau) von *M. trichosporium* OB3b mit CH₃OH als C-Quelle mit mod. NMS Medium (Tabelle 3-3, S.56) und Zusatz an 5 µM ATU bei 30 °C, pH 6,9 im 6,8 L-Maßstab. Schwarz gestrichelte Linie entspricht dem Zeitpunkt der beginnenden Nitratlimitierung in Fermentation A, grau gestrichelte Linie entspricht dem Zeitpunkt der exzessiven Schaumbildung und dem Verstopfen des Abgasfilters während Fermentation B.

Bei Vergleich der Fermentationen im 6,8 L-Maßstab wurde ohne sequentielle Nitratzugabe (Fermentation A) eine höhere Biomassekonzentration bestimmt. In Fermentation B wurde im Vergleich zu Fermentation A, ohne Waschen der Zellen, eine höhere sMMO-Aktivität im Ganzzell-Naphthalin-Assay gemessen. Die Nitratlimitierung hatte, auf Basis dieser Daten,

einen negativen Einfluss auf die sMMO-Aktivität. Die geringere spezifische Wachstumsrate und Biomassenkonzentration in Fermentation B sind durch die massive Schaumbildung am Ende der Fermentation zu erklären.

In Tabelle 3-11 sind die Ergebnisse der drei durchgeführten Fermentationen aufgeführt. Aufgrund der in Kapitel 3.2.2, S.79 beschriebenen Probleme erfolgte keine weiterführende Auswertung von Fermentation C.

Tabelle 3-11: Zusammenfassung der Fermentationen A, B und C von *M. trichosporium* OB3b mit CH₃OH als C-Quelle, mod. NMS Medium mit Zusatz an 5 µM ATU bei 30 °C und pH 6,9 im 6,8 L bzw. 68 L-Maßstab.

Maßstab Parameter	6,8 L (A)	6,8 L (B)	68 L (C)
Nitratzufuhr	1 malig	sequentiell	sequentiell
Kultivierungszeit [h]	92,5	88,25	99,8 h (20 h bei 8 °C)
Finale Biomassenkonzentration [g*L ⁻¹]	13,9	11,9	11,7
Verbrauchtes CH ₃ OH [g]	252	324	4735
Ertragskoeffizient $Y_{\text{BTM}/\text{CH}_3\text{OH}}$ [g _{BTM} *g _{CH₃OH} ⁻¹]	0,37	0,25	0,17
Durchschn. spez. Wachstumsrate $\bar{\mu}$ [h ⁻¹]	0,03	0,045	n.b.
Max. spez. Wachstumsrate μ_{max} [h ⁻¹]	0,13 [15-24 h]	0,075 [0-25 h]	0,06 0-25 h]
Geerntete Biofeuchtmasse [g]	530	n.b.	3.940
sMMO-Aktivität [_{1-Naphthol} *h ⁻¹ *g _{BTM} ⁻¹]	275 ¹⁾	685 ¹⁾ 1.075 ²⁾	650 ²⁾
Verbrauchte 7,5 % H ₂ SO ₄ [mL]	35	245	n.b.
Verbrauchte 10,0 % NaOH [mL]	5	0	n.b..
Zugegebenes Nitrat [mM]	4,4	52,3	41,3
Verbrauchtes Nitrat [mM]	13,5	55,5 [2,5 g _{BTM} *g _{Nitrat} ⁻¹]	48,9 [2,5 g _{BTM} *g _{Nitrat} ⁻¹]
Verbrauchtes Antischaummittel (Sigma SE-15) [mL]	88 (0,2 %)	365 (0,2 %)	3.000 (0, 2 %) 2.000 (1,5 %)

n.b.-nicht bestimmt

¹⁾ Zellen nicht gewaschen vor Aktivitätsmessung

²⁾ Zellen 1x gewaschen vor Aktivitätsmessung

In einer *Fed-Batch* Fermentation von *Methylosinus trichosporium* OB3b mit Choi-Medium (Tabelle 3-3, S.56) und CH₃OH als C-Quelle wurde eine finale Biomassenkonzentration von 29 g*L⁻¹ nach 119 Stunden beschrieben (nach 95 Stunden Biomassekonzentration ca. 19 g*L⁻¹) [Yu *et al.*, 2009a]. Dabei erfolgte kein Nachweis der sMMO-Aktivität und die konstante CH₃OH-Konzentration betrug 62 mM. In einer Chemostat-Fermentation mit voriger CH₄-*Batch* und CH₄-Chemostat-Phase mit NMS-Medium nach Best bzw. Cornish (Tabelle 3-3, S.56) wurde die sMMO-Aktivität nachgewiesen [Yu *et al.*, 2009a]. Adegbola beschreibt ebenfalls *Fed-Batch* Fermentationen mit CH₃OH als C-Quelle (62 mM), in denen eine Biomassenkonzentration von 7,5 bzw. 19,7 g*L⁻¹ nach 90 bzw. 140 Stunden erreicht wurde. Die gemessene sMMO-Aktivität nach 90 Stunden betrug dabei 500 µmol_{1-Naphthol}*h⁻¹*g_{BTM}⁻¹ [Adegbola, 2008]. Das Medium in dieser Fermentation war das nach Best bzw. Cornish (Tabelle 3-3, S.56), mit Ammonium anstatt Nitrat als N-Quelle. Für eine zweite Fermentation wurde von Adegbola, auf Basis der verbrauchten Medienkomponenten ein neues Medium entwickelt und eine sequentielle Zugabe verschiedener Medienkomponenten durchgeführt.

In dieser Fermentation wurde eine finale Biomassekonzentration von $62 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ nach 140 Stunden erreicht (11 bis $13 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ nach 90 Stunden). Die Zellen dieser zweiten Fermentation zeigten eine geringe sMMO-Aktivität von $9 \mu\text{mol}_{1\text{-Naphthol}} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1}$ [Adegbola, 2008].

Die in den eigenen Fermentationen erhaltenen finalen Biomassekonzentrationen waren geringer als die, die von Yu und Kollegen zum gleichen Kultivierungszeitpunkt angegeben wurden (12 bis $13 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ gegenüber $19 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ nach ca. 90 bis 95 Stunden) [Yu *et al.*, 2009a]. Dies könnte auf die Reduktion des Wachstums durch die Umstellung des N-Stoffwechsels in Fermentation A, bzw. die Limitation einer Medienkomponente, die Reduktion des Wachstums und die damit verbundene Schaumbildung in Fermentation B, zurückzuführen sein. Im Gegensatz zu den Literaturdaten konnte jedoch in den eigenen Fermentationen die sMMO-Aktivität in allen Proben nachgewiesen werden. Die im Ganzzell-Naphthalin-Assay gemessene sMMO-Aktivität war höher als in den von Adegbola beschriebenen Fermentationen. Ebenso konnte im Vergleich zu dieser Literaturangabe in den eigenen Fermentationen eine höhere Biomassekonzentration nach 95 Stunden erreicht werden (12 bis $13 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ gegen $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ nach ca. 90 bis 95 Stunden) [Adegbola, 2008].

Yu und Kollegen zeigten, dass eine frühzeitige Zugabe verschiedener Medienkomponenten wie Eisenionen und Spurenelemente zu einer Erhöhung der finalen Biomassekonzentration führten (von $19 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ nach 160 Stunden auf $29 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ nach 120 Stunden) [Yu *et al.*, 2009a]. Basierend auf diesen Angaben erfolgten die eigenen Fermentationen mit Zugabe verschiedener Medienkomponenten. Aufbauend auf den eigenen Resultaten wären weitere Optimierungen bezüglich der *Feeding*-Strategie der Medienkomponenten nötig, um eine weitere Erhöhung der Biomassekonzentration, bei Erhaltung der sMMO-Aktivität zu erreichen. Dadurch wäre u.a. die Vermeidung der Limitierung, die in Fermentation B zur Reduktion des Wachstums und der Schaumbildung führte, möglich. Der Ertragskoeffizient für CH_3OH lag mit $0,37$ bzw. $0,25 \text{ g}_{\text{BTM}} \cdot \text{g}_{\text{CH}_3\text{OH}}^{-1}$ ebenfalls im Bereich der bekannten Literaturdaten. ($0,3 \text{ g}_{\text{BTM}} \cdot \text{g}_{\text{CH}_3\text{OH}}^{-1}$ in Fermentationsexperimenten [Adegbola, 2008]; $0,4 \text{ g}_{\text{BTM}} \cdot \text{g}_{\text{CH}_3\text{OH}}^{-1}$ in Schüttelkolbenexperimenten [Best und Higgins, 1981]). Ein Vorteil der durchgeführten Fermentationen, im Vergleich zur Literatur, war die Kontrolle der CH_3OH -Konzentration bei einer geringen Konzentration von 25 mM . Dadurch konnte der wachstumsinhibierende Effekt von CH_3OH , der bereits ab 30 mM gezeigt wurde, verringert werden [Adegbola, 2008; Yu *et al.*, 2009a]. Im Vergleich zur Literatur wurden gleiche bzw. höhere spezifische Wachstumsraten bei einer gleichzeitig hohen sMMO-Aktivität erreicht (Fermentation B).

Die massive Schaumbildung nach 60 Stunden wurde nur für die beiden Fermentationen mit Nitratzufuhr (B und C) beobachtet. Die Ursache für die Schaumbildung in den Fermentationen B und C könnte ein verstärktes Lysieren von Zellen infolge einer Limitierung gewesen sein. Als Folge würden neben dem Protein im Zellinneren auch andere Komponenten, wie z.B. PHB freigesetzt, die eine stärkere Schaumbildung begünstigen würden.

Welche Medienkomponente für die Limitierung in Fermentation B und C verantwortlich war wurde nicht untersucht. Die PHB-Bildung wurde für *M. trichosporium* OB3b sowohl beim Wachstum mit CH_4 , als auch mit CH_3OH als C-Quelle, besonders in der logarithmischen Wachstumsphase, beschrieben [Song *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2008]. In den eigenen TEM-Aufnahmen wurden in den Zellen Strukturen identifiziert, die laut Literaturdaten für PHB-Ansammlungen in der Zelle stehen könnten (siehe Abbildung 1-3, S.6, Abbildung 3-2, S.50 sowie Abbildung 3-6, S.59). Schaumbildung während einer Fermentation von *Methylosinus trichosporium* OB3b mit CH_3OH wurde auch bei Adegbola nach 120 Stunden Kultivierung beschrieben [Adegbola, 2008]. Als potentielle Ursache wurden eine Reduktion der Phosphatkonzentration ($< 2 \text{ mM}$) im Medium und eine daraus resultierende verstärkte Ammoni-

umzugabe in den Reaktor angegeben. In einer Fermentationen von *M. trichosporium* OB3b mit CH₄ als C-Quelle wurde von Park und Kollegen ebenfalls eine massive Schaumbildung beschrieben [Park *et al.*, 1991]. Die Schaumbildung begann nachdem innerhalb der Fermentation, durch verstärktes Wachstum der Zellen, die O₂-Konzentration in der Lösung auf Null sank. Infolgedessen reduzierte sich das Wachstum der Zellen und die Zahl an lysierten Zellen stieg. Durch die verstärkte Zelllyse wurden vermutlich, wie in den eigenen Messungen, grenzflächenaktive Substanzen, die eine Schaumbildung fördern z.B. Polyhydroxybuttersäure (PHB) freigesetzt. Schaum entsteht, je nach Anteil an grenzflächenaktiven Bestandteilen, bei der Bewegung einer Gasblase durch eine Flüssigkeit und dem anschließenden Erreichen der Oberfläche. Innerhalb der Flüssigphase orientieren sich die grenzflächenaktiven Substanzen mit ihrem hydrophilen Anteil Richtung Wasser und mit ihrem hydrophoben Anteil Richtung Gasblaseninneres. An der Phasengrenzfläche Flüssig/ Gasatmosphäre erfolgt eine Anreicherung der grenzflächenaktiven Substanzen. Es bildet sich auf der Gasblase eine weitere Adsorptionsschicht, innerhalb der zwei Schichten grenzflächenaktiver Substanzen einen Flüssigkeitsfilm begrenzen. Eine solche Blase wird auch als Lamellenblase bezeichnet. Die Zusammenlagerung vieler Lamellenblasen bezeichnet man als Schaum. Da im Schaum oft ungünstige Reaktionsbedingungen vorliegen ist die Schaumbildung nachteilig für einen biotechnologischen Prozess. Zudem nimmt der Schaum einen Teil des Reaktorvolumens ein und kann so ebenfalls die Prozessbedingungen verschlechtern. Weiterhin kann Schaum in die Abgasleitung eindringen und den Abgasfilter verschmutzen oder verstopfen [Chmiel, 2001]. Ein solches Verstopfen, infolge von Schaumbildung, wurde auch während der hier durchgeführten Fermentationen mit Nitrat-Feeding (Kapitel 3.2.1.2, S.75 und 3.2.2, S.79) beobachtet.

In Fermentation A wurde trotz einer Limitierung der N-Quelle und einer nachweisbaren Reduktion der spezifische Wachstumsrate (>40 Stunden) keine verstärkte Schaumbildung beobachtet bzw. konnte durch Einsatz des verwendeten Antischaummittels Sigma SE-15 kontrolliert werden. Die Ursache hierfür könnte möglicherweise der geringere Gehalt an PHB in den Zellen gewesen sein. *M. trichosporium* OB3b bildet verstärkt PHB in der logarithmischen Wachstumsphase. Entweder war diese Phase zum Zeitpunkt der Nitratlimitierung (40 Stunden) noch nicht erreicht, oder die Menge an bis dato gebildetem PHB war zu gering für eine Verstärkung der Schaumbildung nach Auftreten Zelllyse [Song *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2008]. Die genauen Ursachen für die verstärkte Schaumbildung in den Fermentationen B und C bzw. die im Vergleich dazu geringere Schaumbildung während Fermentation A konnten auf Basis der hier vorgelegenen Daten nicht getroffen werden. Im Vergleich zur Fermentation mit Nitratlimitierung wurde bei Nitratzusatz die vierfache Menge an Antischaummittel verbraucht. Der Einfluss des eingesetzten Antischaummittels Sigma SE-15 auf das Wachstum und die sMMO-Aktivität wurde sowohl in der Literatur, als auch in eigenen Experimenten untersucht. Dabei wurden keine negativen Auswirkungen auf das Wachstum und die sMMO-Aktivität bei einer Konzentration des Antischaummittels von 0,2 % v/v beobachtet. In den dokumentierten Reaktorexperimenten der Literatur mit dem Antischaummittels Sigma SE-15 konnte die Schaumbildung, mit Ausnahme einer Fermentation, reduziert werden [Adegbola, 2008]. Für die Reduktion der massiven Schaumbildung die in Fermentationen B und C auftraten, war das verwendete Antischaummittel Sigma SE-15 nicht geeignet. Für weiterführende Fermentationsexperimente sollte ein anderes Antischaummittel gewählt werden, das auch eine hier beobachtete Schaumbildung ohne Beeinflussung des Wachstums und der sMMO-Aktivität reduzieren kann. Zur weiteren Untersuchung der hier beschriebenen Ergebnisse sollte neben der Wahl des eingesetzten Antischaummittels auch die Feeding-Strategie der

einzelnen Medienkomponenten optimiert werden. Damit würde ggf. die Limitierung einer Medienkomponente mit der daraus resultierenden Schaumbildung unterbunden. Mit einer verbesserten *Feeding*-Strategie könnten auch Biomassekonzentrationen ähnlich der Literatur von bis zu $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ erreicht werden [Adegbola, 2008]. Eine zusätzliche Optimierung des Prozessablaufes (CH_3OH -Zugabe, Temperaturregulation, pH-Kontrolle) zur Vermeidung der hier aufgetretenen Fehlerquellen sollte ebenfalls bei künftigen Fermentationen erfolgen. Die aus Fermentation C im 68 L-Maßstab geerntete sMMO-aktive Biomasse (3,94 kg) wurde zur Aufarbeitung der sMMO und deren Anwendung in *in vitro*-Analysen zur CH_3OH -Bildung eingesetzt.

3.3 Reinigung der sMMO aus *M. trichosporium* OB3b

Auf Grundlage der in Kapitel 3.2.2, S.79 produzierten sMMO-aktiven *M. trichosporium* OB3b Biomasse erfolgte die Aufarbeitung der einzelnen sMMO-Komponenten. Die Reinigung der sMMO basierte auf etablierten Protokollen für Biomasse, die mit CH_4 als C-Quelle produziert wurde [Fox *et al.*, 1989; Fox *et al.*, 1990]. Eine Aufarbeitung der sMMO aus CH_3OH -gewachsener Biomasse ist bisher in der Literatur nicht beschreiben. Der generellen Ablauf der Reinigung bestehend aus dem Zellaufschluss, der Zentrifugation der Zelltrümmer, der Separation der sMMO-Komponenten über eine Anionenaustauschchromatographie (AEC) und der Reinigung der einzelnen sMMO-Komponenten (MMOH, MMOB, MMOR) mittels AEC und/ oder Größenausschlusschromatographie (SEC), erfolgte dabei analog zu den Literaturdaten von Fox und Kollegen. Das publizierte Reinigungsprotokoll wurde im Wesentlichen reproduziert. Die Trennung der sMMO Komponenten erfolgte auf Basis der unterschiedlichen Eigenschaften der Proteine (Molekulargewicht, isoelektrischer Punkt, siehe Tabelle 3-12). Eine Übersicht des durchgeführten Reinigungsprotokolls für die sMMO ist in Abbildung 3-17 dargestellt. Im Gegensatz zur Literatur wurden in dieser Arbeit für die Reinigung andere Chromatographie-Materialien (Q-Sepharose FF statt FF DEAE Sepharose CL6B; Superdex 200 pg statt Sephadex G-50 oder Ultrogel AcA 54) und Säulengrößen eingesetzt. Auf einen Präzipitationsschritt mit Ammoniumsulfat bei der Reinigung von MMOB wurde aufgrund von zu hohen Verlusten des Zielproteins verzichtet. Weiterhin wurde im Gegensatz zur Literatur 1 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) statt Dithiothreitol (DTE) oder 2-Mercaptoethanol als Reduktionsmittel eingesetzt. Dadurch sollten reduzierte Bedingungen während des Zellaufschlusses und für die gesamte Reinigung von MMOR gewährleistet werden. TCEP interagiert nicht mit Eisenionen, ist resistent gegenüber Sauerstoff-Oxidation und besitzt eine höhere Stabilität [Getz *et al.*, 1999]. Da Eisenionen, analog zur Literatur, als Zusatz in den Reinigungspuffern verwendet wurden, war TCEP als Reduktionsmittel besser geeignet als z.B. DTE. Die praktische Vorgehensweise der Reinigung ist in Kapitel 2.3.2, S.30 beschrieben.

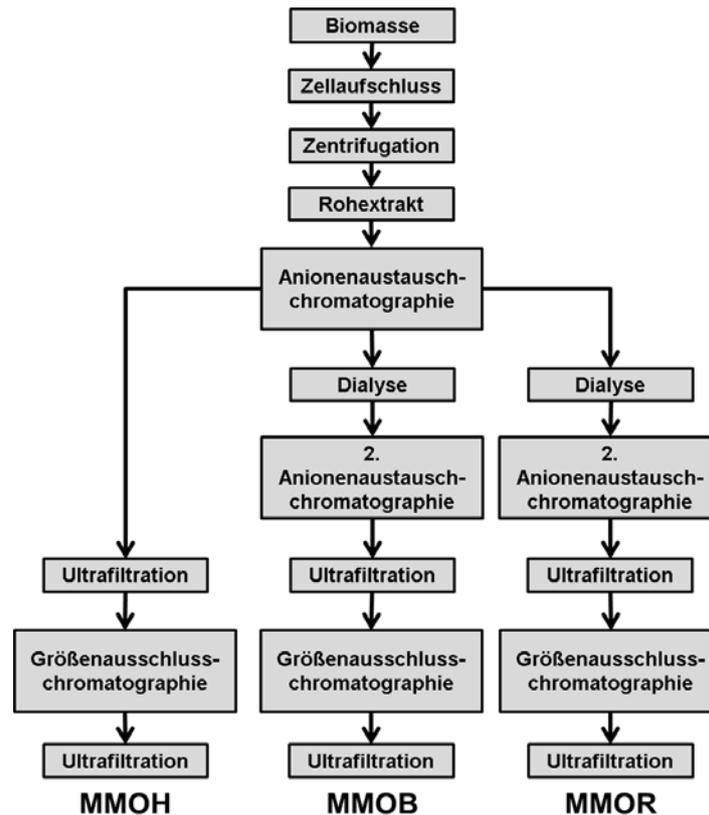


Abbildung 3-17: Fließschema zur Aufarbeitung von MMOH, MMOB und MMOR der sMMO von *M. trichosporium* OB3b. Ablauf der Reinigung angelehnt an Literatur [Fox *et al.*, 1989; Fox *et al.*, 1990].

3.3.1 Separation der sMMO-Komponenten

Der genaue Ablauf der Trennung der sMMO-Komponenten ist in Kapitel 2.3.2.1, S.30 beschrieben. Zur Reinigung wurde die in Kapitel 3.2.2, S.79 produzierte Biomasse (Fermentation C) verwendet. Der mechanische Zellaufschluss erfolgte mittels Hochdruckhomogenisator (HDH) über drei Passagen bei 1000 bar. Es konnte so ein Zellaufschluss von 98 % erreicht werden (bezogen auf die Proteinkonzentration im Überstand, siehe Abbildung 7-11, S.182). Im Folgenden wird eine, von mehreren identisch durchgeführten Reinigungen der sMMO-Komponenten beschrieben. Dabei wurden 293 g Biofeuchtmasse (gelagert bei -80 °C), nach Resuspendieren und Zellaufschluss zentrifugiert. Der Überstand (=Rohextrakt) wurde auf eine Anionenaustauschchromatographiesäule (Q-Sepharose FF, 5x12 cm; 230 mL) aufgetragen. Die Elution der sMMO-Komponenten erfolgte analog zur Literatur über einen 0 bis 0,4 M NaCl-Gradienten [Fox *et al.*, 1989]. Das Chromatogramm der 1. Anionenaustauschchromatographie (1. AEC) und die dazugehörige SDS-PAGE-Analyse sind in Abbildung 3-18 und Abbildung 3-19 dargestellt. Die sMMO-Aktivität im Rohextrakt wurde mittels Nitrobenzol-Assays analysiert und betrug $1,0 \pm 0,1 \text{ mU} \cdot \text{mg}_{\text{Protein}}^{-1}$. Nach der Elution und SDS-PAGE-Analyse der einzelnen Fraktionen wurden die entsprechenden sMMO-tragenden Fraktionen (Tabelle 3-12, S.87) vereinigt und entweder direkt weiter bearbeitet oder zur Lagerung in fl. N_2 eingefroren und bei -80 °C gelagert.

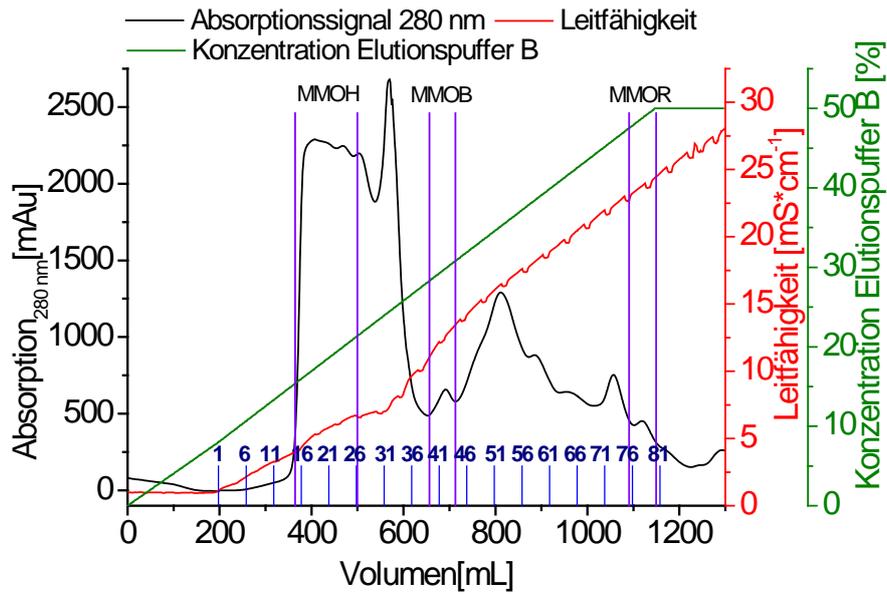


Abbildung 3-18: Chromatogramm der 1. AEC zur Reinigung der sMMO mit Absorption bei 280 nm (mAu, schwarz), Leitfähigkeit (mS*cm⁻¹, rot), Konzentration des Elutionspuffers (%), Grenzen der eluierten sMMO-Komponenten, siehe Tabelle 3-12 (violett) und Fraktionierung der aufgefangenen Proben (blau). Elutionspuffer, 25 mM MOPS pH 7,0, 1 mM TCEP; 1 mM PMS, 0,2 mM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ und einem Gradient von 0 bis 0,4 M NaCl.

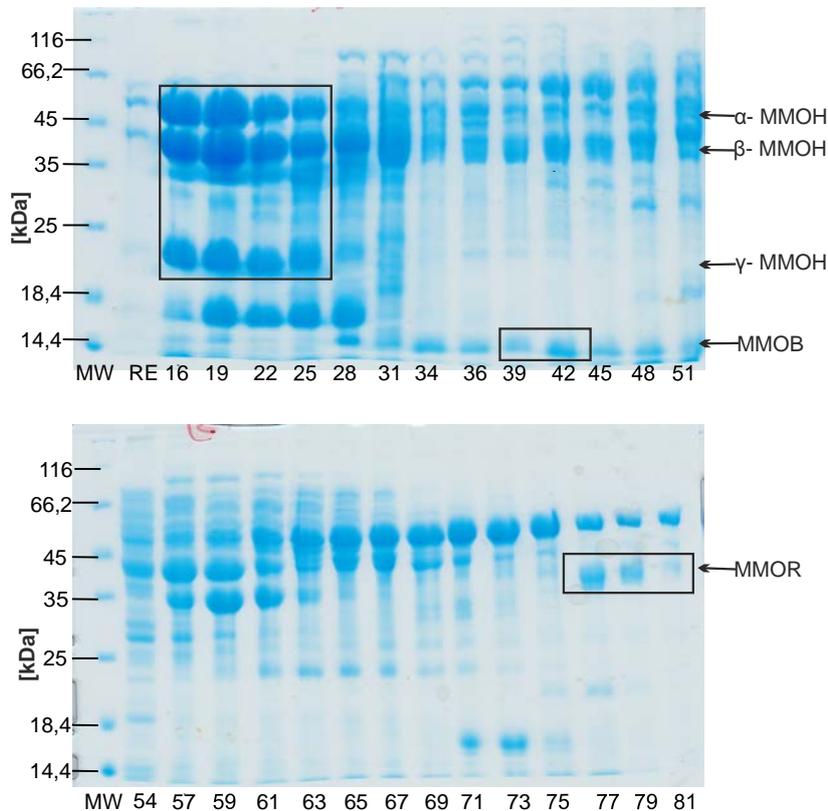


Abbildung 3-19: 12,5 %iges-SDS-PA-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben aus dem Reinigungsverlauf der 1. AEC. MW-Marker (PageRuler™), RE-Rohextrakt (10 µg), Elutionsfraktionen 16 bis 81 aus Abbildung 3-18, jeweils 10 µL einer 1:3 Verdünnung mit SDS-Probenpuffer aufgetragen. Schwarze Rahmen entsprechen den jeweils vereinigten Fraktionen.

Die Elution der sMMO Komponenten in der 1. AEC erfolgte analog der Beschreibung aus der Literatur [Fox *et al.*, 1989]. Die NaCl-Konzentrationen (berechnet aus dem Anteil an Elutionspuffer) bzw. die Leitfähigkeiten bei denen die sMMO Komponenten eluierten sind in Tabelle 3-12 zusammengefasst.

Sowohl im Durchlauf, als auch in der Waschfraktion konnte nach SDS-PAGE-Analyse das MMOH-Bandenmuster nachgewiesen werden (siehe Anhang Abbildung 7-12, S.182). Dies könnte durch die schwache Bindung des Proteins an das Material, aufgrund des geringen Unterschieds zwischen dem Puffer pH-Wert (7,0) und dem pI-Wert von MMOH (6,6), verursacht worden sein. Der nicht gebundene Anteil könnte auch nicht funktionalem Enzym entsprechen. Dafür sprach, dass in diesen beiden Fraktionen keine sMMO-Aktivität nachgewiesen wurde. Dementsprechend erfolgte keine weitere Bearbeitung dieser Fraktionen. Trotz des geringeren pI-Wertes eluierte MMOB vor MMOR. Dies entsprach den Beobachtungen aus der Literatur. Eine Ursache für dieses Verhalten wurde nicht untersucht. Die Chromatographiepuffer der Reinigungsschritte die Eisenionen enthielten, verfärbten sich nach mehreren Stunden (fünf bis acht bzw. über Nacht) bräunlich und es bildete sich ein ebenso gefärbter Bodensatz. Die Ursache war vermutlich die Präzipitation von Eisenionen nach einer Oxidationsreaktion mit O₂. In der Literatur wurden Eisenionen als Zusatz für die gesamte Reinigung der MMOH verwendet. Dadurch konnte eine Steigerung der sMMO-Aktivität gemessen werden [Fox *et al.*, 1989]. Da die Präzipitation von Eisen bei den folgenden Reinigungsschritten, z.B. bei der SEC zu Beschädigungen der Chromatographiesäulen führen könnte, wurde für die weitere Reinigung der MMOH auf einen Eisenionen-Zusatz verzichtet. Ein Vergleich der Reinigung der MMOH mit und ohne Eisenionen-Zusatz ist in Tabelle 3-13, S.89 und Tabelle 3-14, S.89 aufgelistet.

Tabelle 3-12: Auflistung der Molekulargewichte und isoelektrischen Punkte (pI) der sMMO Komponenten sowie der Zusammenfassung der Elution der sMMO während der 1. AEC. Die Berechnung der Molekulargewichte und der isoelektrischen Punkte erfolgte anhand der Aminosäuresequenz mit dem Echtzeit-Programm „ExPASy-„ProtParam“ [Artimo *et al.*, 2012]

sMMO Komponente	Molekulargewicht [kDa]	pI	Vereinigte Fraktionen	Leitfähigkeit [mS*cm ⁻¹]	Berechnete NaCl Konzentration [M] ¹⁾
MMOH	248,6 (α ₂ β ₂ γ ₂)	6,6	15-26	3,7-6,5	0,04-0,08
MMOB	14,9	4,6	39-44	11,0-15,0	0,14-0,19
MMOR	38,0	5,8	75-80	22,5-25,5	0,29-0,32

¹⁾ Berechnung über 50 % B= 0,4 M NaCl= 31,5 mS*cm⁻¹

3.3.2 Reinigung MMOH

Die weitere Aufreinigung der MMOH erfolgte, in Anlehnung an die Literatur, über eine Größenausschlusschromatographie (SEC), siehe Kapitel 2.3.2.2, S.31 [Fox *et al.*, 1989]. Das Chromatogramm sowie die Analyse der einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE sind in Abbildung 3-20 und Abbildung 3-21 dargestellt.

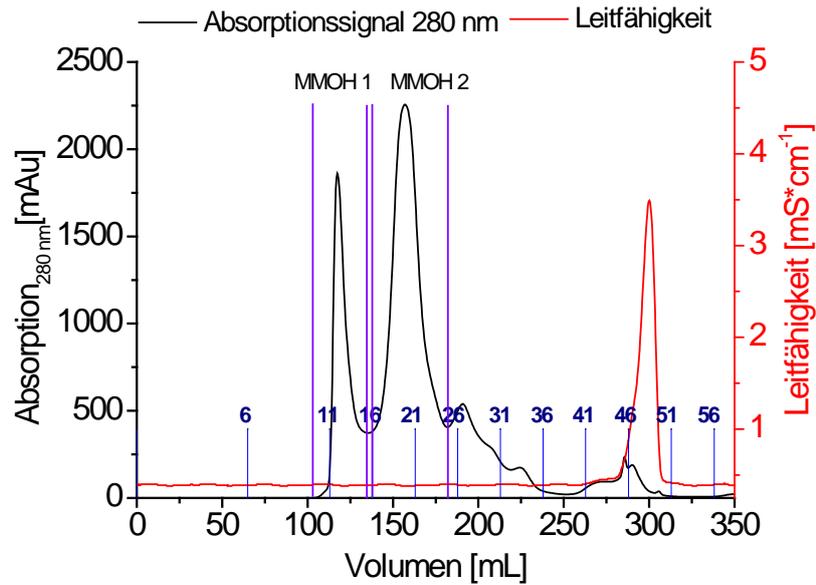


Abbildung 3-20: Chromatogramm der SEC zur Reinigung der MMOH ohne Zusatz an Eisenionen (siehe Tabelle 3-14) mit Absorption bei 280 nm (mAu, schwarz), Leitfähigkeit ($\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$, rot), Grenzen der vereinigten MMOH-Fractionen 1 (Fractionen 11 bis 15) und 2 (Fractionen 17 bis 24) (violett) und Fractionierung der aufgefangenen Proben (blau). Puffer, 25 mM MOPS pH 7,0.

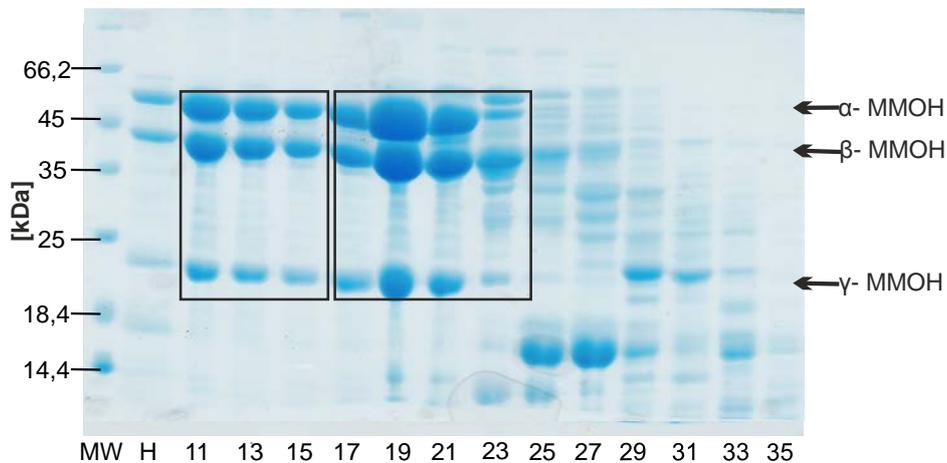


Abbildung 3-21: SDS-PAGE der SEC aus Abbildung 3-19 zur Reinigung der MMOH. 12,5 %iges-SDS-PA-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben aus dem Reinigungsverlauf der SEC. MW-Marker (PageRuler™), H-konzentrierte MMOH-Fraktion nach der 1. AEC (10 μg), 13 bis 35 Elutionsfractionen aus Abbildung 3-20, jeweils 10 μL einer 1:3 Verdünnung mit SDS-Probenpuffer aufgetragen. Schwarze Rahmen entsprechen den jeweils vereinigten Fractionen.

Die Hydroxylase wurde entsprechend der Elution, siehe Abbildung 3-20, in zwei unterschiedlichen Fractionen aufkonzentriert und analysiert. Dabei wurde in der Fraction MMOH 1 im Vergleich zur Fraction MMOH eine 75 % geringere sMMO-Aktivität im Nitrobenzol-Assay gemessen. Für die weitere Analyse wurde deshalb ausschließlich die MMOH Fraction 2 verwendet. Neben der Abtrennung von Proteinverunreinigungen diente die SEC auch der Abtrennung der Salzionen bzw. der Umpufferung der MMOH auf den Lagerungspuffer (25 mM MOPS, pH 7,0). Nach Aufkonzentrierung der MMOH-Fraction auf 1 bis 2 mL wurde die MMOH-Charge aliquotiert (\hat{a} 50 μL mit einer Proteinkonzentration von 40 bis 50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), in fl. N_2 eingefroren und bei -80°C gelagert.

Neben der Reinigung einer MMOH-Fraktion, die zuvor nicht mit Eisenionen-Zusatz behandelt wurde, erfolgte eine Reinigung der Hydroxylase, die während des Zellaufschlusses und der 1. AEC mit einem Fe(II)-Zusatz von 0,2 mM behandelt wurde. Die sMMO-Aktivitäten beider MMOH-Fraktionen sollten miteinander verglichen werden (siehe Kapitel 3.4.1.1, S.100). Beide Reinigungen sind in Tabelle 3-13 und Tabelle 3-14 zusammengefasst.

Tabelle 3-13: Reinigungstabelle von MMOH aus CH₃OH-gewachsenen *Methylosinus trichosporium* OB3b Zellen, eingesetzt 293 g BFM mit 0,2 mM Eisenionen-Zusatz im Aufschlusspuffer, Bindepuffer und Elutionspuffer der 1. AEC ¹⁾ Bestimmung mit Bradford Assay; ²⁾ Ausbeute bezogen auf die Proteinmenge

Reinigungsschritt	Gesamtprotein [mg] ¹⁾	Volumen [mL]	Ausbeute [%] ²⁾
Rohextrakt	13170	710	100
Q-Sepharose FF (AEC)	1641	9,5	12,5
Superdex 200 pg (SEC)	425	6,5	3,2

Tabelle 3-14: Reinigungstabelle von MMOH aus CH₃OH-gewachsenen *Methylosinus trichosporium* OB3b Zellen ohne Eisenionen-Zusatz im Aufschlusspuffer, Bindepuffer und Elutionspuffer der 1. AEC, eingesetzt 62,3 g BFM. ¹⁾ Bestimmung mit Bradford Assay; ²⁾ Ausbeute bezogen auf die Proteinmenge

Reinigungsschritt	Gesamtprotein [mg] ¹⁾	Volumen [mL]	Ausbeute [%] ²⁾
Rohextrakt	2900	290	100
Q-Sepharose FF (AEC)	372	6,0	12,8
Superdex 200 pg (SEC)	170,1	3,5	5,9

Bei Vergleich der beiden dargestellten Reinigungen war die MMOH-Ausbeute (unabhängig von der sMMO-Aktivität) bei der Reinigung ohne Zusatz an Eisenionen um 2,7 % höher. Die Ursache hierfür war die Überladung der SEC-Säule mit Protein im letzten Reinigungsschritt (4,4x Proteinmenge im Vergleich zur anderen SEC, siehe Anhang Abbildung 7-13, S.183 und Abbildung 7-14, S.183). Aufgrund dieser Überladung der Chromatographiesäule eluierte das Zielprotein MMOH in der SEC auch mit anderen Proteinen. Einige MMOH-haltige Fraktionen wurden in der Folge aufgrund von Verunreinigungen verworfen. Dies wurde in der SEC (Abbildung 3-20) nicht beobachtet und das MMOH-Signal in der SEC konnte als ein bzw. zwei scharfe Peaks identifiziert werden. Der Vergleich der sMMO-Aktivität beider MMOH-Fraktionen ist in Kapitel 3.4.1.1, S.100 beschrieben. Um die Ausbeute auch bei künftigen Reinigungen zu erhöhen, sollte bei Verwendung gleicher Proteinmengen eine größere SEC-Säule genutzt oder eine mehrfache Beladung der bereits vorhandenen SEC-Säule erfolgen. Mit der hier eingesetzten Reinigungsstrategie wurden, im größten Reinigungsansatz, aus einer Biofeuchtmassmenge von 293 g 425 mg aktives MMOH gereinigt. (1,8 mg * g_{BFM}). Die mit dieser Fraktion im Nitrobenzol-Assay gemessene sMMO-Aktivität lag im Bereich von 100 bis 150 $\mu\text{mol}_{p\text{-Nitrophenol}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{Aktive Zentren}}^{-1}$.

3.3.3 Reinigung MMOB

Die MMOB-Fraktionen 39 bis 44 (Tabelle 3-12, S.87) nach der 1. AEC wurden vereinigt und anschließend weiter aufgearbeitet (Kapitel 2.3.2.3, S.31). Wichtig für die Reinigung von MMOB war der Zusatz von PMSF in allen Reinigungslösungen. Auf diesen Aspekt wird in Kapitel 3.3.3.1, S.92 näher eingegangen. Nach Vereinigung der Fraktionen erfolgte eine Dialyse um die Salzkonzentration für den 2. AEC Schritt zu reduzieren. Als Maß für die Salzkonzentration wurde die Leitfähigkeit in der Probe vor und nach der Dialyse gemessen. Nach

zweimaliger einstündiger Dialyse wurde eine Reduktion der Leitfähigkeit von $17,4 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ in der Ausgangsprobe auf $14,0 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ bestimmt (Dialysepuffer Leitfähigkeit $12,1 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$). Diese Leitfähigkeit bzw. die korrespondierende Ionenkonzentration in der Probe war ausreichend, um eine erneute Bindung des Proteins an das Chromatographiematerial zu gewährleisten. Anschließend erfolgte der zweite Reinigungsschritt durch eine erneute AEC bei einem pH-Wert von 6,5 (Q-Sepharose FF; (2,6 cm x 12 cm, 64 mL). Das Chromatogramm und die SDS-PAGE-Analyse der Proteine in den Elutionsfraktionen sind in Abbildung 3-22 und Abbildung 3-23 dargestellt.

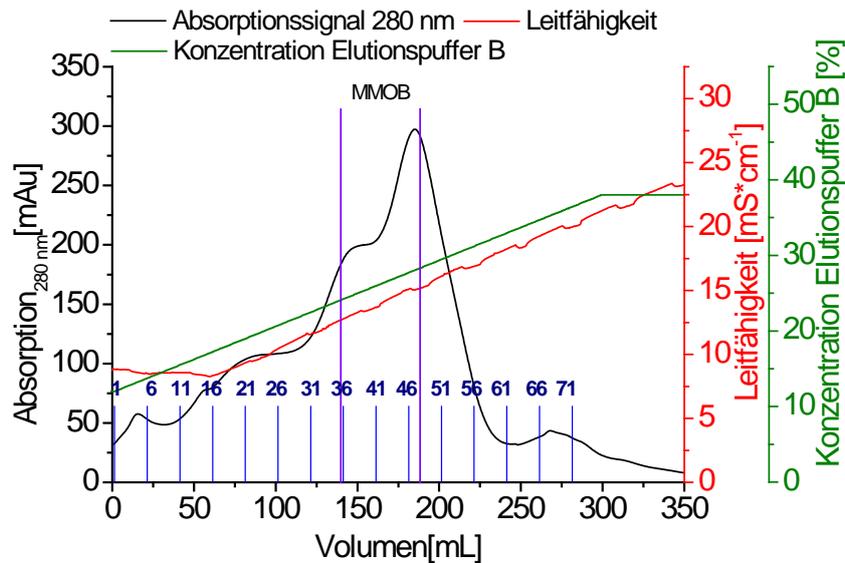


Abbildung 3-22: Chromatogramm der 2. AEC zur Reinigung von MMOB mit Absorption bei 280 nm (mAu, blau), Leitfähigkeit ($\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$, rot), Konzentration des Elutionspuffers(%, grün), Fraktionierung der aufgefangenen Proben (blau) und Grenzen der vereinigten MMOB-Fractionen (Faktionen 34 bis 46) (violett) Puffer: 25 mM MOPS pH 6,5; 1 mM PMSF mit einem NaCl Gradienten von 0,1 bis 0,3 mM.

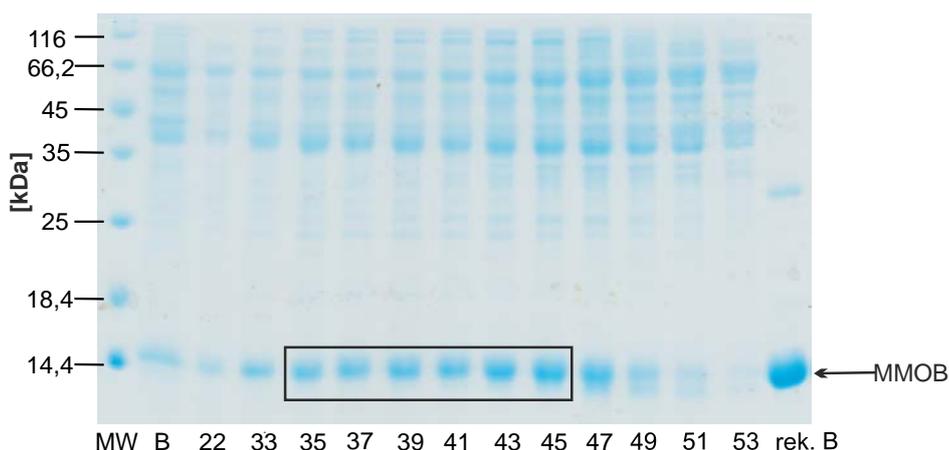


Abbildung 3-23: SDS-PAGE der 2. AEC zur Reinigung von MMOB. 16,0 %iges-SDS-PA-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben aus dem Reinigungsverlauf der SEC. MW-Marker (PageRuler™), B- konzentrierte MMOB Fraktion nach der 1. AEC (10 μg), 22 bis 53 Elutionsfraktionen, jeweils 10 μL einer 1:1 Verdünnung mit SDS-Probenpuffer aufgetragen, rek. B- rekombinant produziertes MMOB aus [Dillmann, 2014; Kind, 2016]. Die Proben entsprechen den Daten aus Abbildung 3-22. Schwarzer Rahmen entspricht der vereinigten MMOB-Fraktion.

Die Reduktion des pH-Wertes von 7,0 auf 6,5 im Vergleich zur 1.AEC erfolgte basierend auf Literaturdaten [Fox *et al.*, 1989]. Das Zielprotein MMOB eluierte über einen breiten Bereich von 135 bis 180 mL, bei einer zur 1. AEC vergleichbaren Leitfähigkeit (12 bis 15 $\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) bzw. Salzkonzentration (0,14 bis 0,17 M NaCl). Der Einfluss der Reduktion des pH-Wertes auf die Bindungseigenschaften des Proteins war gering und sollte bei künftigen Reinigungen nicht mehr bzw. in veränderter Form (z.B. pH 6,0) durchgeführt werden. Die Proteinfractionen mit MMOB (Fraktion 34 bis 46) wurden vereinigt und aufkonzentriert. Um weitere Verunreinigungen abzutrennen bzw. die Probe in den Lagerpuffer zu überführen, erfolgte eine abschließende SEC. Das Chromatogramm und die Analyse der Proteinfractionen mittels SDS-PAGE sind in Abbildung 3-24 und Abbildung 3-25 dargestellt.

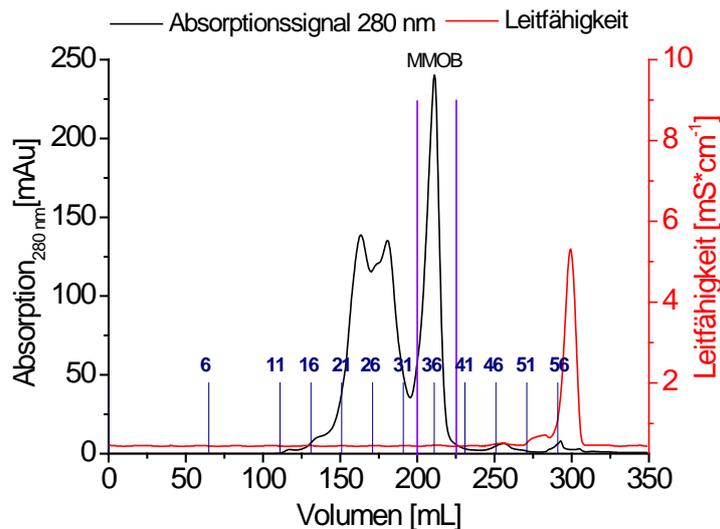


Abbildung 3-24: Chromatogramm der SEC zur Reinigung von MMOB mit Absorption bei 280 nm (mAu, schwarz), Leitfähigkeit ($\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$, rot), Fraktionierung der aufgefangenen Proben (blau) und Grenzen der vereinigten MMOB-Fractionen (Fraktionen 35 bis 48) (violett) Puffer: 25 mM MOPS pH 7,0; 1 mM PMSF.

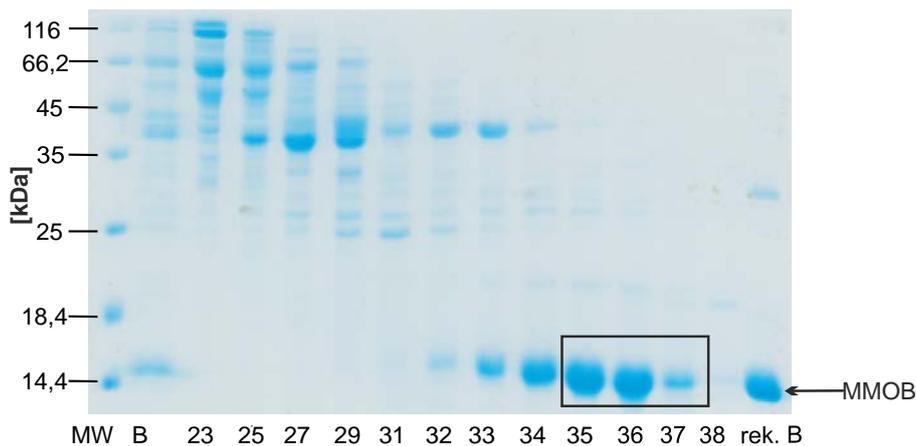


Abbildung 3-25: SDS-PAGE der SEC zur Reinigung der MMOB. 16,0 %iges-SDS-PA-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben aus dem Reinigungsverlauf der SEC. MW-Marker (PageRuler™), B-konzentrierte MMOB Fraktion nach der 2. AEC (10 μg), 23 bis 38 Elutionsfraktionen, jeweils 10 μL einer 1:2 Verdünnung mit SDS-Probenpuffer aufgetragen, rek. B-rekombinant produziertes MMOB (5 μg) aus [Dillmann, 2014; Kind, 2016]. Die Proben entsprechen den Daten aus Abbildung 3-24. Schwarzer Rahmen entspricht der vereinigten MMOB-Fraktion.

MMOB eluierte von der Säule im Bereich zwischen 205 und 218 mL. Es wurden die Fraktionen 35 bis 37 vereinigt und aufkonzentriert. Die Zusammenfassung der Reinigung des regulatorischen Proteins B ist in Tabelle 3-15 aufgelistet. Die mit dieser Fraktion im Nitrobenzol-Assay gemessene sMMO-Aktivität lag bei 130 bis 150 $\mu\text{mol}_{p\text{-Nitrophenol}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{Aktive Zentren}}^{-1}$. Die im Vergleich zur Literatur geringe Ausbeute von 10,9 mg aus 293 g Biofeuchtmasse ([Fox *et al.*, 1989] 110 mg aus 200 g Biofeuchtmasse) ist u.a. mit Verlusten des Zielproteins im Laufe der Reinigung zu erklären. So wurden z.B. Fraktionen die neben MMOB auch weitere Proteinverunreinigungen enthielten verworfen. Eine Optimierung der Reinigung zur Erhöhung der MMOB-Ausbeute wäre für weitere Versuche erforderlich. Dies erfolgte im Rahmen dieser Arbeit nicht, da durch die rekombinante Produktion von MMOB in *E. coli* und die anschließende Reinigung sehr gute Ausbeuten erzielt wurden. Dadurch war eine ausreichende Bereitstellung von MMOB für die folgenden Versuche gewährleistet [Dillmann, 2014; Kind, 2016].

Tabelle 3-15: Reinigungstabelle von MMOB aus CH₃OH-gewachsenen *Methylosinus trichosporium* OB3b Zellen, eingesetzt 293 g BFM ¹⁾ Bestimmung mit Bradford Assay; ²⁾ Ausbeute bezogen auf die Proteinmenge.

Reinigungsschritt	Gesamtprotein [mg] ¹⁾	Volumen [mL]	Ausbeute [%] ²⁾
Rohextrakt	13170	710	100
Q-Sepharose FF (AEC)	228	80	1,7
2. Q-Sepharose FF (2. AEC)	56,6	4,0	0,43
Superdex 200 pg (SEC)	10,9	2,0	0,08

3.3.3.1 Untersuchungen zur Spaltung von MMOB

Für MMOB aus *Methylococcus capsulatus* Bath wurde eine autokatalytische Spaltung zu MMOB' postuliert. Die MMOB'-Bildung entspricht der Abspaltung der ersten 12 N-terminalen Aminosäuren des Proteins B. Infolge dieser Abspaltung konnte keine sMMO-Aktivität nach Zugabe von MMOH und MMOR gemessen werden [Callaghan *et al.*, 2002]. Für MMOB aus *M. trichosporium* OB3b ist ein solches Verhalten bisher nicht bekannt.

Bei eigenen Reinigungsversuchen von MMOB wurde eine Doppelbandenbildung des Zielproteins beobachtet (siehe Abbildung 7-15, S.184 im Anhang). Nach Analyse der beiden Proteinbanden mittels ESI-MS (Kapitel 2.4.10, S.47) zeigte sich, dass es sich bei beiden Proteinen um MMOB handelte. Bei der in Abbildung 7-15 unteren Bande waren die ersten 15 Aminosäuren des N-Terminus nicht nachzuweisen. Eine Spaltung von MMOB zu MMOB' könnte somit vorgelegen haben. Um diesen Sachverhalt weiter zu untersuchen, erfolgten Stabilitätsexperimente mit dem rekombinant produziertem MMOB in Verbindung mit *M. trichosporium* OB3b Rohextrakt mit verschiedenen Zusätzen z.B. PMSF (Halbwertszeit bei pH 7,0, 25 °C, $t_{1/2}$ = 110 Minuten) (Ablauf siehe Kapitel 2.3.2.3.1, S.32) [Dillmann, 2014; Kind, 2016]. Der Zusatz von PMSF wurde untersucht, weil bei der Reinigung von MMOB aus anderen Methanotrophen (*Methylocystis* sp. M, *Methylococcus capsulatus* Bath) ein positiver Effekt auf die Stabilität nach Zusatz von Serin-Proteaseinhibitoren (Pefabloc SC, PMSF) beobachtet wurde [Pilkington und Dalton, 1990; Shinohara *et al.*, 1998]. Die Ergebnisse der Stabilitätsmessungen sind in der SDS-PAGE-Analyse in Abbildung 3-26 dargestellt.

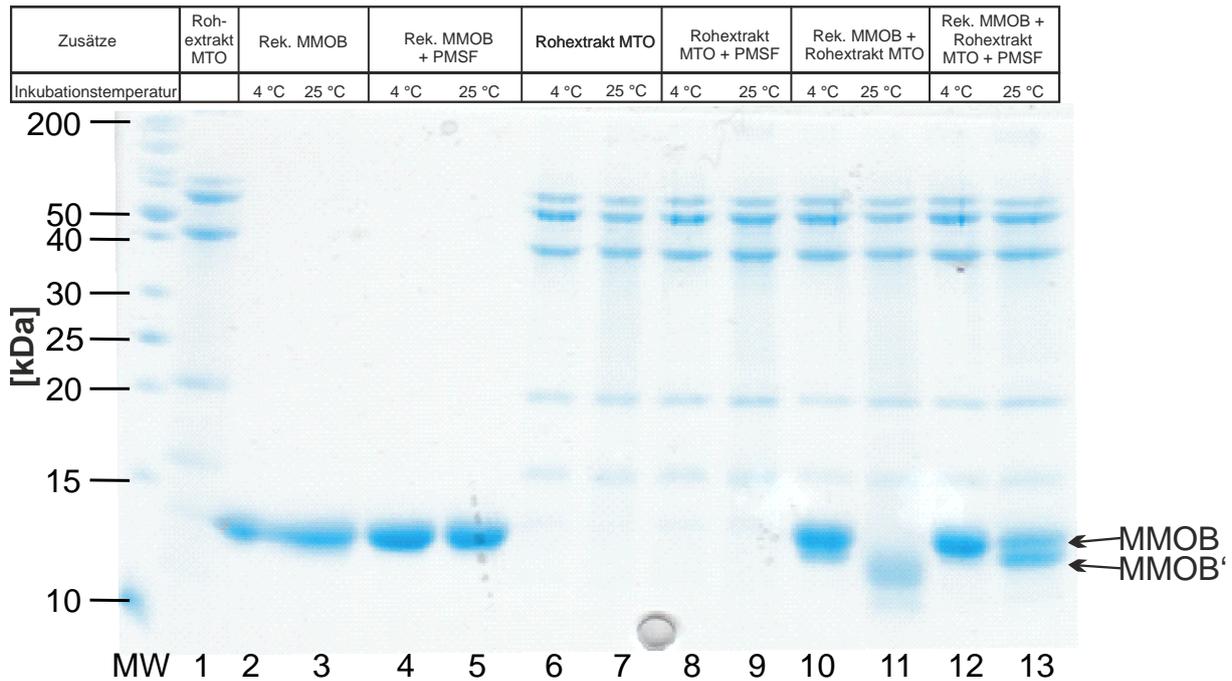


Abbildung 3-26: 16,0 %iges-SDS-PA-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben aus dem Stabilitätstest von MMOB nach 24 Stunden bei verschiedenen Bedingungen. MW-Marker (PageRuler™. Ansätze 50 μL , Puffer 25 mM MOPS; pH 7,0; Rek. MMOB wenn vorhanden $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, Rohextrakt wenn vorhanden $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, PMSF wenn vorhanden 1 mM. Probe als 1:2 Verdünnung mit SDS-Probenpuffer aufgetragen

Für den Zusatz an PMSF zum rekombinant produzierten Protein B ([Dillmann, 2014; Kind, 2016]) bzw. zum Rohextrakt von *M. trichosporium* OB3b konnten keine Unterschiede nach 24 Stunden, bei 4 bzw. 25 °C, im Vergleich zum Ansatz ohne PMSF beobachtet werden. Die Stabilität von rek. MMOB war bei 4 °C auch noch nach 48 Stunden, mit bzw. ohne Zusatz an PMSF, gegeben (Daten nicht gezeigt). Bei der Inkubation von rek. MMOB mit *M. trichosporium* OB3b Rohextrakt (Bahn 10 bzw. 11) ohne PMSF-Zusatz war bei 4 °C bereits eine leichte Proteinbande unterhalb der MMOB-Bande zu erkennen. Bei 25 °C war die MMOB-Bande verschwunden. Unter der eigentlichen MMOB-Bande waren eine oder mehrere Proteinbanden stark verschmiert zu erkennen. Das Verschmieren der Banden könnte durch die Alterung bzw. einen Abbau des Proteins hervorgerufen worden sein. Bei Zusatz an PMSF (Bahnen 12 bzw. 13) trat bei 4 °C unter den identischen Bedingungen keine Doppelbandenbildung auf. Bei 25 °C war die MMOB-Bande über der MMOB'-Bande nach 24 Stunden noch präsent. Die Doppelbandenbildung in Bahn 13 trotz PMSF-Zusatz könnte durch die geringe Halbwertszeit von PMSF (bei den gegebenen Bedingungen <zwei Stunden) erklärt werden. Bei 4 °C ist PMSF stabiler was, sich in der noch zu erkennenden MMOB-Bande für den Ansatz aus Bahn 12 nach 48 Stunden zeigte (Daten nicht gezeigt).

Mit den Ergebnissen der hier gezeigten Stabilitätsmessungen konnte erstmals eine MMOB'-Bildung bei *M. trichosporium* OB3b gezeigt werden. Durch Zusatz von PMSF als Proteaseinhibitor konnte diese Spaltung verhindert werden. Für die Reinigung von MMOB aus *M. trichosporium* OB3b wurde deshalb in den verwendeten Reinigungslösungen eine PMSF-Konzentration von 1 mM gewählt.

3.3.4 Reinigung MMOR

Die MMOR-Fractionen aus Kapitel 3.3.1, (Tabelle 3-12, S.87) nach der 1. AEC wurden wie in Kapitel 2.3.2.4, S.32 beschrieben weiter bearbeitet. Wichtig für die Reinigung von MMOR war der Zusatz eines Reduktionsmittels, hier eingesetzt TCEP, in allen Reinigungslösungen um eine Oxidation des Proteins (z.B. am Fe-S-Cluster) zu verhindern. Zunächst erfolgte eine zweimalige Dialyse von einer Stunde um die Salzkonzentration in der Probe für die 2. AEC zu reduzieren. Dabei wurde die Leitfähigkeit von $33,7 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ in der Ausgangsprobe (Dialysepuffer Leitfähigkeit $22,5 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$) auf $25,9 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ abgesenkt. Die 2.AEC erfolgte basierend auf Literaturangaben bei einem pH-Wertes von 6,5 [Fox *et al.*, 1989]. Das Chromatogramm der 2.AEC von MMOR sowie das Ergebnis der Analyse der einzelnen Fractionen mittels SDS-PAGE sind in Abbildung 3-27 und in Abbildung 3-28 dargestellt.

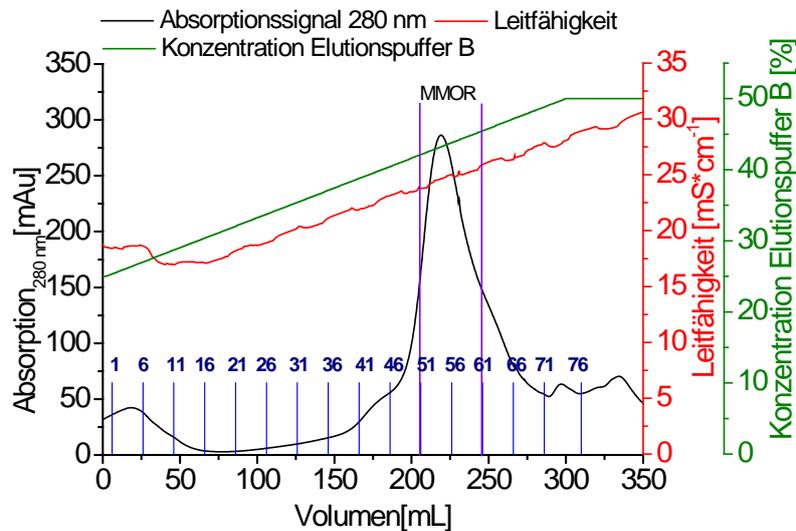


Abbildung 3-27: Chromatogramm der 2. AEC der Reinigung von MMOR mit Absorption bei 280 nm (mAu, blau), Leitfähigkeit ($\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$, rot), Konzentration des Elutionspuffers (%), grün), Fraktionierung der aufgefundenen Proben (blau) und der vereinigten MMOR-Fractionen (Fractionen 51 bis 61, violett) Puffer: 25 mM MOPS pH 6,5; 1 mM TCEP mit NaCl Gradienten 0,2 bis 0,4 mM.

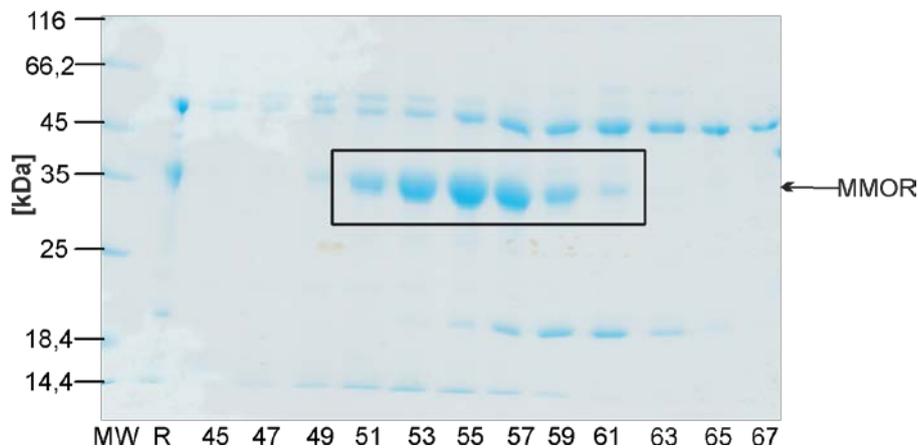


Abbildung 3-28: SDS-PAGE der 2. AEC zur Reinigung von MMOR. 12,5 %iges-SDS-PA-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben aus dem Reinigungsverlauf der SEC. MW-Marker (PageRuler™), R-konzentrierte MMOR Fraktion nach der 1. AEC (10 μg), 45 bis 67 Elutionsfraktionen, je 10 μL einer 1:2 Verdünnung mit SDS-Probenpuffer aufgetragen. Die Proben entsprechen den Daten aus Abbildung 3-27. Schwarzer Rahmen entspricht vereinigter MMOR-Fraktion.

Die Reduktase eluierte über einen Bereich von 205 bis 240 mL bei einer Leitfähigkeit von 23,5 bis 26,0 $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ ($\text{NaCl} = 0,27$ bis $0,30$ M). Die Reduktion des pH-Wertes von 7,0 auf 6,5 im Vergleich zur 1. AEC veränderte die Bindungseigenschaften von MMOR nicht bzw. nur unwesentlich und sollte bei weiteren Reinigungen stärker variiert oder nicht weiter berücksichtigt werden. Da noch proteinogene Verunreinigungen in den MMOR-Fractionen erkennbar waren, erfolgte nach Vereinigung und Konzentrierung der MMOR-Fractionen (51 bis 61) eine abschließende SEC. Das entsprechende Chromatogramm ist in Abbildung 3-29 und die dazugehörige SDS-PAGE-Analyse der Fractionen in Abbildung 3-30 dargestellt.

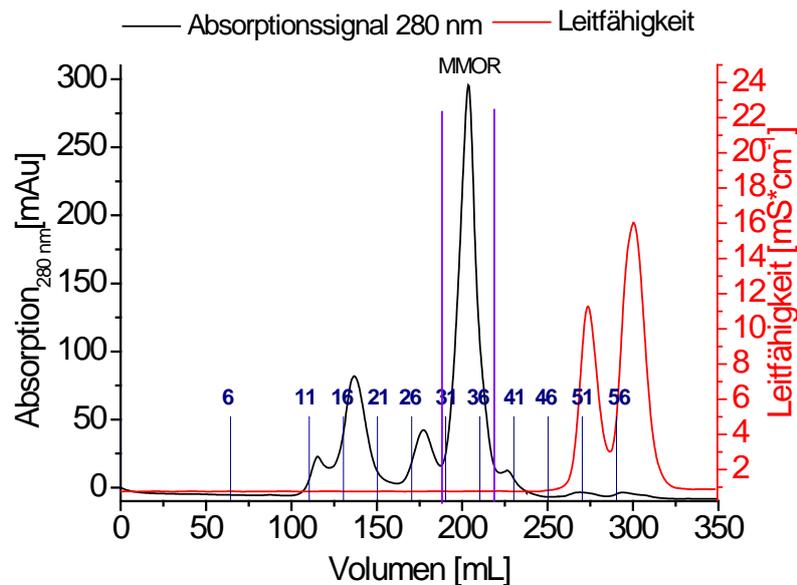


Abbildung 3-29: Chromatogramm der SEC zur Reinigung der MMOR mit Absorption bei 280 nm (mAu, blau), Leitfähigkeit ($\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$, rot), Fraktionierung der aufgefangenen Proben (blau) und Grenzen der vereinigten MMOR-Fractionen (Fractionen 31 bis 37, violett) Puffer: 25 mM MOPS pH 7,0; 1 mM TCEP.

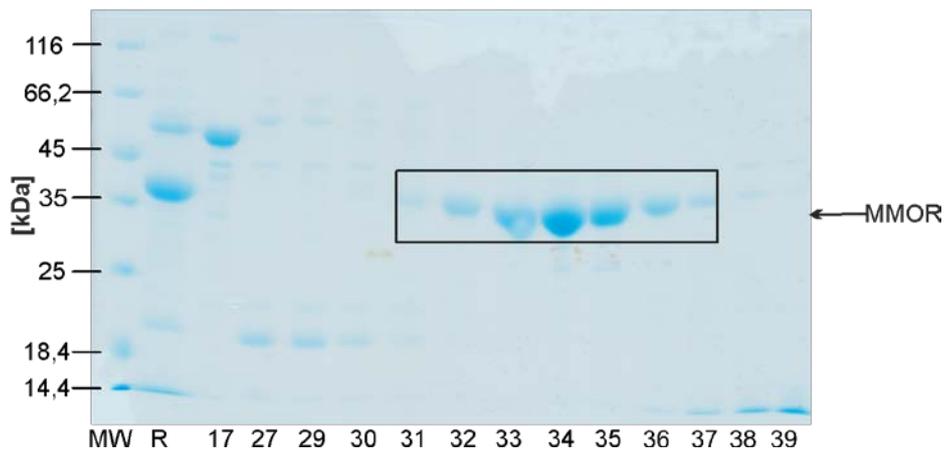


Abbildung 3-30: SDS-PAGE der SEC zur Reinigung der MMOR. 12,5 %iges-SDS-PA-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben aus dem Reinigungsverlauf der SEC. MW-Marker (PageRuler™), R-konzentrierte MMOR Fraction nach der 2. AEC (10 μg), 17 bis 39 Elutionsfractionen jeweils 10 μL einer 1:2 Verdünnung mit SDS-Probenpuffer aufgetragen. Die Proben entsprechen den Daten aus Abbildung 3-29. Schwarzer Rahmen entspricht vereinigter MMOR-Fraktion.

Die Reduktase eluierte im Bereich von 190 bis 215 mL. Die MMOR-haltigen Fraktionen 31 bis 37 wurden vereinigt, aufkonzentriert, aliquotiert, in fl. N₂ eingefroren und bei - 80 °C gelagert. Die Aktivität der MMOR-Fraktionen während der Reinigung wurden mittels DCPIP-Assay gemessen (Kapitel 2.4.4.6, S.44). Neben dieser Aktivitätsmessung erfolgte auch die Messung der sMMO-Aktivität im Nitrobenzol-Assay mit der gereinigten MMOR-Fraktion. Die sMMO-Aktivität betrug standardmäßig 100 bis 150 $\mu\text{mol}_{p\text{-Nitrophenol}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{Aktive Zentren}}^{-1}$. Die Zusammenfassung der Reinigung der Reduktase ist in Tabelle 3-16 aufgelistet.

Tabelle 3-16: Reinigungstabelle von MMOR aus CH₃OH-gewachsenen *Methylosinus trichosporium* OB3b Zellen, eingesetzt 293 g BFM ¹⁾ Bestimmung mit Bradford Assay; ²⁾ Ausbeute bezogen auf Gesamtaktivität, gemessen im DCPIP-Assay (n=4), in Klammern Ausbeute bezogen auf Aktivität nach 1. AEC.

Reinigungsschritt	Gesamtprotein [mg] ¹⁾	Volumen [mL]	Gesamt Aktivität [U]	Spezifische Aktivität [U*mg ⁻¹]	Ausbeute [%] ²⁾	Reinigungsfaktor
Rohextrakt	13.170	710	25.000	1,9	100	1
Q-Sepharose FF (AEC)	108,0	63,0	7130	66,0	28,5 (100)	35
2. Q-Sepharose FF (2. AEC)	33,6	4,0	2.967	88,3	11,9 (41)	46
Superdex 200 pg (SEC)	13,9	1,5	2.402	172,8	9,6 (33)	91

Aus 293 g BFM konnten mit der beschriebenen Reinigungsstrategie, über zweimalige AEC, Dialyse, Aufkonzentrierung und abschließende SEC, 13,9 mg aktive MMOR erhalten werden (0,05 mg*g_{BFM}). Die spektroskopische Analyse der MMOR-Fraktion erfolgte im Bereich von 250 bis 600 nm. Das Spektrum der MMOR-Fraktion ist im Anhang in Abbildung 7-16, S.184 dargestellt. Aufgrund des FAD-Cofaktors liegen Absorptionsmaxima bei ca. 340 und 458 nm. Ein weiteres Absorptionsmaximum liegt aufgrund der aromatischen Ringsysteme der Aminosäureseitenketten im Bereich von 270 bis 280 nm. Durch den Vergleich dieser Maxima miteinander, mit Bezug auf bereits publizierte Literaturdaten, kann eine Aussage über die Reinheit der MMOR-Fraktion aus *M. trichosporium* OB3b getroffen werden. Dieser Vergleich ist in Tabelle 3-17 aufgelistet. Die Absorptionsverhältnisse der eigenen gereinigten MMOR-Fraktion stimmten mit den Literaturdaten überein. Die Aktivität der MMOR im DCPIP-Assay lag um Faktor 1,35 höher als der einzige publizierte Literaturwert (172,8 U*mg⁻¹ zu 127 U*mg⁻¹ bei [Fox et al., 1990]).

Tabelle 3-17: Vergleich der von Fox und Kollegen angegebenen Absorptionsfaktoren mit der hier gereinigten MMOR-Fraktion aus *Methylosinus trichosporium* OB3b [Fox et al., 1990].

Referenz	Absorption $A_{270} \cdot A_{458}^{-1}$	Absorption $A_{458} \cdot A_{340}^{-1}$
Fox et al., 1990	2,8	1,3
Eigene Arbeit	2,9	1,2

3.3.5 Zusammenfassung und Diskussion der Reinigung der sMMO-Komponenten

Die einzelnen sMMO-Komponenten MMOH, MMOB und MMOR wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmals aus CH₃OH-gewachsener Biomasse aufgereinigt. Die Analyse der Reinheit erfolgte u.a. mittels SDS-PAGE. Das Gel, mit den bis zur Bandenreinheit gereinigten sMMO-Komponenten, ist in Abbildung 3-31 dargestellt.

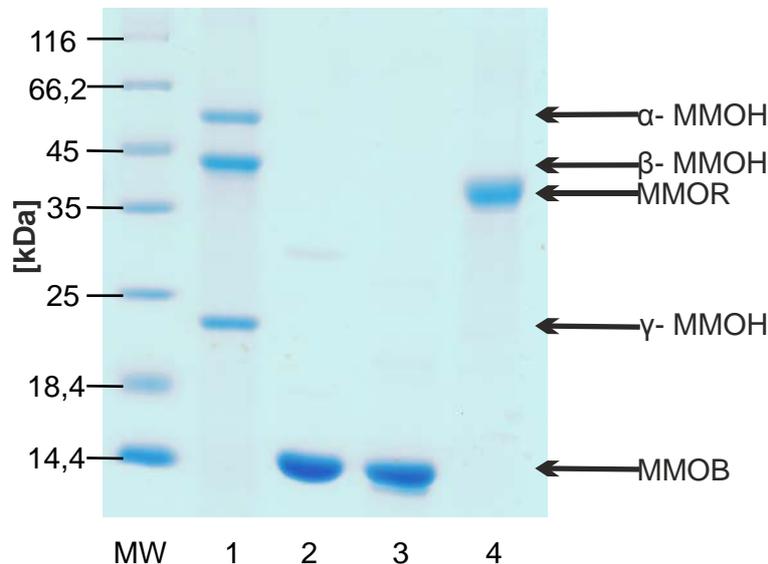


Abbildung 3-31: 16,0 %iges-SDS-PA-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben aus der Reinigung der sMMO Komponenten aus CH₃OH-gewachsener Biomasse. MW-Marker (PageRuler™); 1- 5 µg MMOH, 2- 5 µg rekombinant produziertes MMOB (nach [Dillmann, 2014; Kind, 2016]); 3- 5 µg MMOB; 4- 5 µg MMOR. α-MMOH 60 kDa, β-MMOH 45 kDa, MMOR 37,9 kDa, γ-MMOH 20 kDa MMOB 14,9 kDa.

Des Weiteren erfolgte die Analyse der Proteine mittels ESI-MS, wie in Kapitel 2.4.10, S.47 beschrieben. Die gereinigten Proteine wurden mittels ESI-MS Analyse eindeutig als sMMO-Komponenten von *Methylosinus trichosporium* OB3b identifiziert (Daten nicht gezeigt). Im Nitrobenzol-Assay wurde die sMMO-Aktivität ($100 \text{ bis } 150 \mu\text{mol}_{p\text{-Nitrophenol}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{Aktive Zentren}}^{-1}$) beim Einsatz der gereinigten sMMO Komponenten durch *p*-Nitrophenol-Bildung nachgewiesen (Kapitel 3.4.1, S.100). Die Elution der sMMO-Komponenten bzw. die Bindungseigenschaften an die verwendeten Säulenmaterialien entsprachen den bereits bekannten Werten für die sMMO-Komponenten aus CH₄-gewachsener Biomasse [Fox *et al.*, 1989] (Tabelle 3-12, S.87). Der Vergleich der Ausbeuten für die einzelnen sMMO-Komponenten mit bereits bekannten Literaturwerten ist in Tabelle 3-18 zusammengefasst.

Die Reinigungsausbeute für die Hydroxylase lag im Bereich der bisher für andere Methanotrophe beschriebenen Werte und unterhalb des Wertes der für *M. trichosporium* OB3b für CH₄-gewachsene Biomasse bestimmt wurde. Alle Literaturdaten zur Reinigung der sMMO beziehen sich auf die Aufarbeitung aus CH₄-gewachsener Biomasse. In Schüttelkolbenversuchen wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die sMMO-Aktivität im Rohextrakt bei der Nutzung von CH₄ bzw. CH₃OH als C-Quelle vergleichbar war. Ebenso konnte in diesen Versuchen eine vergleichbare Bandenintensität der MMOH in der SDS-PAGE-Analyse gezeigt werden (Abbildung 3-8, S.61 und Abbildung 3-9, S.62). In der Fermentation mit CH₃OH als C-Quelle wurde im Vergleich zu der CH₄-Vorkultur eine geringere Bandenintensität der

MMOH beobachtet (Abbildung 7-7, S.179). Eine geringere Bildung der sMMO in der Fermentation mit CH₃OH als C-Quelle wäre deshalb eine mögliche Ursache für die geringeren Ausbeuten. Da im Rahmen dieser Arbeit keine Fermentation von *M. trichosporium* OB3b mit CH₄ als C-Quelle durchgeführt wurde kann diese Hypothese nicht final geklärt werden.

Tabelle 3-18: Vergleich der eigenen Ausbeuten der Reinigung der sMMO-Komponenten mit Literaturdaten. Die Menge an gereinigtem Protein wurde auf die Gesamtproteinmenge des Rohextraktes bezogen. Alle Literaturdaten beziehen sich auf die Reinigung der sMMO aus CH₄-gewachsener Biomasse. Für die eigenen Daten wurde die sMMO aus *M. trichosporium* OB3b Biomasse mit CH₃OH als C-Quelle aufgearbeitet.

Referenz	Organismus	Ausbeute	Ausbeute	Ausbeute
		MMOH	MMOB	MMOR
		[mg _{MMOH} * g _{Gesamtprotein} ⁻¹]	[mg _{MMOB} * g _{Gesamtprotein} ⁻¹]	[mg _{MMOR} * g _{Gesamtprotein} ⁻¹]
Eigene Arbeit	<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b	32,3 bzw. 58,6	0,8	1,1
[Fox et al., 1989]	<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b	74,9	9,9	1,9
[Shaofeng et al., 2007]	<i>Methylosinus trichosporium</i> IMV 3011	42,7	n.b.	n.b.
[Pilkington und Dalton, 1990]	<i>Methylococcus capsulatus</i> Bath	163,5	3,0	3,4
[Grosse et al., 1999]	<i>Methylocystis</i> sp. strain WI 14	20,5	n.b.	1,5

n.b. nicht bestimmt

In der in Kapitel 3.3.2, S.87 beschriebenen Reinigung, bei der eine Überladung der SEC-Säule beobachtet wurde, ergab sich eine schlechtere Ausbeute an MMOH. Dies ist mit der unscharfen Elution des Zielproteins und dem Verwerfen MMOH-haltiger, aber durch andere Proteine verunreinigter Fraktionen, zu erklären (siehe Anhang Abbildung 7-13, S.183 und Abbildung 7-14, S.183). Für weitere Reinigungen in vergleichbarem Maßstab sollte die Proteinmenge für den SEC-Schritt reduziert oder eine größere SEC-Säule verwendet werden.

Die geringe Ausbeute bei der Reinigung von MMOB war für den weiteren Verlauf der Arbeit nicht relevant, da ausreichende Mengen an MMOB über eine rekombinante Herstellung in *E. coli* produziert und anschließend gereinigt werden konnten. Dementsprechend wurde die Reinigung von MMOB aus *M. trichosporium* OB3b nicht weiter optimiert. Die Spaltung von MMOB, zum um 12 Aminosäuren am N-Terminus verkürzten MMOB', wurde bisher nicht für *M. trichosporium* OB3b beschrieben. Diese Spaltung konnte unerwartet in dieser Arbeit erstmals nachgewiesen werden. Für MMOB aus *Methylococcus capsulatus* Bath wurde die MMOB' Bildung bereits untersucht. Pilkington und Dalton zeigten für die Reinigung von MMOB aus *Methylococcus capsulatus* Bath, dass zwingend ein Proteaseinhibitor z.B. PMSF zugesetzt werden musste, um die sMMO-Aktivität zu erhalten [Pilkington und Dalton, 1990]. Callaghan und Kollegen postulierten jedoch eine autokatalytische Proteolyse des MMOB zum MMOB'. Bei der Aminosäuresequenz von MMOB aus *M. capsulatus* Bath war die 13. Aminosäure, Glycin, gleichbedeutend mit der MMOB'-Spaltungsstelle [Callaghan et al., 2002]. Nach Austausch des Glycins zum Glutamin (= Sequenz von MMOB aus *M. trichosporium* OB3b) konnte eine erhöhte MMOB-Stabilität nachgewiesen werden. Eigene Stabilitäts-

messungen mit dem rekombinant in *E. coli* produziertem MMOB aus *M. trichosporium* OB3b zeigten keine autokatalytische Spaltung zu MMOB' (Abbildung 3-26, S.93) [Dillmann, 2014]. Auf Basis dieser Daten war eine autokatalytische Proteolyse von MMOB unwahrscheinlich und die Spaltung vermutlich auf eine fremd katalysierte proteolytische Trennung zurückzuführen. Um die Spaltung zu vermeiden wurde, wie in der Literatur bereits beschrieben, ein Proteaseinhibitor in Form von PMSF zur Erhöhung der Stabilität eingesetzt [Pilkington und Dalton, 1990; Shinohara *et al.*, 1998]. Mit Zusatz an PMSF konnte eine Stabilität von MMOB aus *M. trichosporium* OB3b (rekombinant in *E. coli* gebildet) in Gegenwart von *M. trichosporium* OB3b Rohextrakt für 24 Stunden bei 4 °C gezeigt werden. Ohne PMSF Zusatz war nach 24 Stunden ein kompletter Abbau von MMOB zu beobachten (Abbildung 3-26, S.93). Der Abbau von MMOB zu MMOB' in Gegenwart von *M. trichosporium* OB3b Rohextrakt wurde wahrscheinlich durch eine proteolytische Spaltung einer im Rohextrakt befindlichen Protease verursacht. PMSF ist ein Proteaseinhibitor und inhibiert irreversibel Serinproteasen bzw. reversibel Cysteinproteasen (wie Papain) [James, 1978]. Das auch nach Zusatz von PMSF eine MMOB'-Bildung auftrat war vermutlich auf die geringe Halbwertszeit von PMSF unter den gegebenen Bedingungen (pH 7,0, 25 °C, $t_{1/2}$ = 110 Minuten) zurückzuführen. Durch PMSF-Zugabe, 1 mM in allen Reinigungslösungen, wurde die MMOB'-Bildung in der Reinigung verhindert. Ein vergleichbarer positiver Effekt auf die Stabilität von gereinigtem MMOB aus *Methylocystis* sp. M konnte durch Zusatz von Pefabloc SC (Serinproteaseinhibitor der Firma Roche) und Antipain erzielt werden [Shinohara *et al.*, 1998]. Die Sequenzen von MMOB aus *Methylocystis* sp. M und *M. trichosporium* OB3b sind insgesamt zu 96 % und am N-Terminus, der für die Spaltung von MMOB' entscheidend, ist zu 100 % identisch. Dies könnte auf eine vergleichbare Spaltung der Proteine hinweisen. Die generelle Ursache für die MMOB zu MMOB'-Spaltung in den methanotrophen Bakterien wird mit einer *in vivo*-Regulation begründet. Ohne funktionales MMOB zeigt sich nur eine geringe sMMO-Aktivität, wodurch keine zusätzliche Energie in Form von NADH verbraucht wird. Da die sMMO bis zu 12 % des gesamten löslichen Proteins der Zelle ausmachen kann, ist eine effiziente Regulation der sMMO-Aktivität nötig, um die Ressourcen des Organismus optimal zu nutzen [Brandstetter *et al.*, 1999].

Aus 293 g BFM konnten 14 mg bandenreine aktive MMOR gereinigt werden. Die analysierten Eigenschaften der gereinigten MMOR-Fraktion entsprachen den Literaturwerten (Tabelle 3-17, S.96). Eine 1,35 fach höhere MMOR-Aktivität im DCPIP-Assay im Vergleich zur Literatur wurde gemessen [Fox *et al.*, 1989]. Die Ausbeute der Reinigung von MMOR war im Vergleich zur Literatur geringer. Dies war ebenfalls auf die erwähnten Ursachen (Verwerfen von Zielprotein in verunreinigten Fraktionen, geringere Bildung der MMOR in der Fermentation mit CH₃OH als C-Quelle) zurückzuführen. Im Vergleich zu MMOB wurde die rekombinante Produktion von MMOR aus *Methylosinus trichosporium* OB3b bisher nicht beschrieben. Da die Konzentration von MMOR in der Zelle im Vergleich aller sMMO-Komponenten am geringsten war, ist die Bereitstellung von ausreichenden Mengen an MMOR ein limitierender Faktor für die Anwendung der sMMO. Eine Verbesserung der Reinigung von MMOR aus *M. trichosporium* OB3b oder die erfolgreiche rekombinante Produktion von MMOR wären somit für industrielle Anwendungen der sMMO entscheidende Kriterien

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals die Reinigung aller sMMO-Komponenten aus CH₃OH-gewachsener Biomasse gezeigt werden. Alle drei Komponenten wurden bis zur Bandenreinheit aufgearbeitet und deren sMMO-Aktivität nachgewiesen. Um die Eigenschaften der hier gereinigten sMMO optimal für die geplanten *in vitro*-Messungen zur CH₃OH-Bildung einzusetzen, erfolgte eine biochemische Charakterisierung des Enzyms.

3.4 Biochemische Charakterisierung der sMMO

Zur Analyse verschiedener Reaktionsbedingungen für den *in vitro*-Einsatz der sMMO zur CH_3OH Bildung erfolgten, mit den in Kapitel 3.3, S.84 gereinigten sMMO-Komponenten, unterschiedliche Aktivitätsmessungen. Einzelne Kennwerte z.B. bezüglich des pH- und Temperaturoptimums des Enzyms sind bereits veröffentlicht worden. Eine detaillierte Analyse dieser, sowie anderer Parameter (z.B. Einfluss Ionenstärke) wurde bisher nicht veröffentlicht. Weiterhin diente die biochemische Charakterisierung auch der Qualitätskontrolle der gereinigten sMMO. Bisher wurde nur sMMO beschrieben, die aus CH_4 -gewachsener Biomasse aufgearbeitet wurde. Mögliche Unterschiede der aus CH_3OH -gewachsener Biomasse gereinigten sMMO mit der bereits bekannten sMMO aus CH_4 -gewachsener Biomasse könnten durch den Vergleich der enzymatischen Bedingungen identifiziert werden. Die hier durchgeführte biochemische Charakterisierung erfolgte zur Bestimmung des pH-, Temperatur- und Ionenstärke-Optimums der sMMO. Die sMMO-Aktivitätsmessungen erfolgten, wenn nicht anders angegeben, mit rekombinant in *E. coli* produziertem MMOB (rek. MMOB), da im Vergleich zu homolog produziertem MMOB größere Mengen verfügbar waren. Ein Unterschied der sMMO-Aktivität von MMOB im Vergleich zu rek. MMOB wurde nicht gemessen (siehe Kapitel 3.4.3, S.108).

Die Aktivität der sMMO wurde jeweils auf das detektierte Produkt im Aktivitätsassay bezogen, da mitunter mehrere Produkte gebildet wurden. Die gemessenen Produkte waren *p*-Nitrophenol im Nitrobenzol-Assay, CH_3OH im CH_4 -Assay und HCHO im CH_3OH -Assay. Die gemessene Aktivität wurde, wenn nicht anders vermerkt, in $\text{mU} \cdot \text{mg}_{\text{Aktive Zentren}}^{-1}$ angegeben. Im Gegensatz zum für Enzyme üblichen Gebrauch, entspricht in dieser Arbeit 1 U nicht einem μmol Substratumsatz pro Minute, sondern 1 U (1 mU) = 1 μmol (1 nmol) Produktbildung pro Minute. Dieser Ansatz wurde ebenfalls für die Angabe der sMMO-Aktivität in der Literatur verwendet [Fox *et al.*, 1989].

3.4.1 Untersuchungen zur sMMO-Aktivität unter Reaktionsbedingungen

3.4.1.1 Eisenionen-Rekonstitution und Eisenbeladung des aktiven Zentrums der MMOH

Die sMMO ist ein Eisen-abhängiges Enzym. Protokolle aus der Literatur zeigen, dass der Eisenionen-Zusatz, in Form von $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$, bei der Aufarbeitung von MMOH eine Steigerung der sMMO-Aktivität um Faktor 23 ermöglichte [Fox *et al.*, 1989]. Aufgrund der Präzipitationsneigung von Eisensalzen sollte untersucht werden, ob auch ohne Zusatz von Eisensalzen eine chromatographische Reinigung der Hydroxylasekomponente, unter Erhalt der sMMO-Aktivität möglich war. Für die MMOH-Chargen ohne Zusatz von Eisenionen während der Reinigung wurden geringere Aktivitäten im Vergleich zu den MMOH-Chargen mit Eisenionen-Zusatz gemessen (siehe Tabelle 3-19). Um die Aktivität der MMOH-Chargen die ohne Eisenionen-Zusatz aufgearbeitet wurden zu erhöhen, erfolgte analog zu bekannten Protokollen aus der Literatur eine Rekonstitution mit Eisenionen [Merx und Lippard, 2002]. Die gereinigte Hydroxylase wurde mit Eisen-Rekonstitutionspuffer (25 mM MOPS pH 7,0 mit 120 mM NaCl, 2 mM DTT (oder DTE), 5 v/v% Glycerin, 0,5 mM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$) auf eine Konzentration von 47,5 μM verdünnt und bei 25 °C inkubiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde MMOH entnommen und im Nitrobenzol-Assay die sMMO-Aktivität bestimmt. Nach 30 Minuten Rekonstitution konnte eine Steigerung der sMMO-Aktivität um Faktor drei ge-

messen werden. Die sMMO-Aktivität blieb auch nach 250 Minuten Inkubation im Rekonstitutionspuffer stabil (siehe Anhang in Abbildung 7-17, S.185). Um die MMOH-Chargen mit und ohne Eisenionen-Zusatz bei der Reinigung bzw. mit und ohne Eisen-Rekonstitution zu vergleichen, erfolgten weitere Messungen unter optimierten Bedingungen für die sMMO-Aktivität (pH-Wert, Puffer), siehe Tabelle 3-19.

Tabelle 3-19: Spezifische sMMO-Aktivitäten von MMOH-Chargen, die mit und ohne Eisenionen-Zusatz gereinigt wurden. Die Werte entsprechen Mittelwerten aus n= zwei Messungen. Die Messungen erfolgten im Nitrobenzol-Assay bei folgenden Bedingungen 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat-Puffer pH 7,5; 30 °C; Nitrobenzol 5 mM; sMMO Stöchiometrie H:rek.B:R = 1:1:1.

Name	Eisenionen-Zusatz bei Reinigung	Eisenrekonstitution	Spezifische sMMO-Aktivität [nmol _{p-Nitrophenol} *min ⁻¹ *mg _{Aktive Zentren} ⁻¹]
MMOH	-	-	23,3 ± 3,5
MMOH	-	+	128,2 ± 8,7
MMOH	+	-	149,8 ± 2,8
MMOH	+	+	141,6 ± 13,3

Der Zusatz an Eisenionen während der MMOH-Aufarbeitung und die Eisenrekonstitution der MMOH-Charge, die ohne Eisenionen-Zusatz gereinigt wurde, ergaben vergleichbare sMMO-Aktivitäten. Eine weitere Steigerung der sMMO-Aktivität durch zusätzliche Eisenrekonstitution der MMOH-Charge, die mit Eisenionen-Zusatz aufgearbeitet wurde, war nicht gegeben. Dies zeigte, dass auf Basis der sMMO-Aktivitäten beide Vorgehensweisen zur Sättigung des aktiven Zentrums der Hydroxylase mit Eisenionen ausreichen. Ein Zusatz an Eisenionen, unabhängig von der Methodik, war zwingend notwendig um die sMMO-Aktivität zu steigern. Dies kann entweder durch Zusatz von Eisen während der Aufarbeitung oder durch eine Rekonstitution der MMOH mit Eisen nach der Reinigung ohne Eisenzusatz erfolgen. Um zu untersuchen ob die Unterschiede in den Aktivitätsmessungen in direktem Zusammenhang zur Eisenionen-Beladung der MMOH standen, erfolgte die Messung des Eisen-Gehaltes der MMOH mittels ICP-MS (Kapitel 2.4.9.1, S.46). Dabei wurden Fraktionen vor und nach der Eisenrekonstitution untersucht. Das Ergebnis ist in Tabelle 3-20 dargestellt. Durch die Eisenrekonstitution konnte der Eisen-Gehalt der MMOH um Faktor 1,85 gesteigert werden. Die Zunahme der Eisenionen-Beladung korrelierte dabei mit der Steigerung der sMMO-Aktivität (Daten nicht gezeigt). Nach Ultrafiltration der Eisen-rekonstituierten MMOH wurde eine Reduktion der MMOH-Beladung gemessen. Die Entsalzung mittels SEC nach der Eisenrekonstitution war notwendig, um das überschüssige Eisen im Rekonstitutionspuffer für die Analyse vom Protein zu trennen. Die native Beladung der MMOH sind $2.0 \text{ mol}_{\text{Fe}} \cdot \text{mol}_{\text{Protein}}^{-1}$. In der Literatur ist beschrieben, dass es infolge des Reinigungsprozesses zu einer Reduktion des Eisen-Gehaltes der MMOH bzw. der sMMO-Aktivität kommen kann [Fox *et al.*, 1989]. Ein vergleichbares Resultat wurde in der vorliegenden Arbeit beobachtet. Der Eisen-Gehalt der MMOH betrug nach der Reinigung ohne Eisenionen-Zusatz etwa 50 % ($1,0 \text{ mol}_{\text{Fe}} \cdot \text{mol}_{\text{Protein}}^{-1}$) des nativen Wertes. Nach Eisenrekonstitution konnte der Gehalt auf 75 % ($1,5 \text{ mol}_{\text{Fe}} \cdot \text{mol}_{\text{Protein}}^{-1}$) gesteigert werden, was zu einer Verdreifachung der sMMO-Aktivität führte (siehe Anhang Abbildung 7-17, S.185). Dass keine Komplettbeladung ($2,0 \text{ mol}_{\text{Fe}} \cdot \text{mol}_{\text{Protein}}^{-1}$) der MMOH nach Eisenrekonstitution erreicht wurde, war auf die Entsalzung der Proben und den damit verbundenen Verlust an Eisen aus dem aktiven Zentrum zurückzuführen. Die Gehalte an Eisen im aktiven Zentrum der MMOH lagen im Bereich der bereits veröffentlichten Litera-

turdaten für die sMMO verschiedener methanotropher Bakterien (Tabelle 3-20). Die Eisenionen-Beladung der Hydroxylase ist ein essentieller Parameter für die sMMO-Aktivität. Um eine ausreichende Sättigung mit Eisenionen zu gewährleisten, kann entweder Eisen während der Reinigung der Hydroxylase zugegeben oder nach der Reinigung eine Rekonstitution der Hydroxylase mit Eisen erfolgen. Die Erhöhung der Eisenionen-Beladung der Hydroxylase nach Eisenrekonstitution konnte in der vorliegenden Arbeit mittels ICP-MS-Messungen nachgewiesen werden.

Tabelle 3-20: Eisen-Gehalt von MMOH-Proben vor und nach der Eisenrekonstitution und Vergleich mit Literaturdaten. Bedingungen: MMOH mit bzw. ohne Eisenrekonstitution (2,5 mL) auf Sephadex G-25 gegeben, Elution mit 3,5 mL 25 mM MOPS pH 7,0. Angegeben sind Mittelwerte aus n= vier Messungen für die eigenen Daten.

Probe	Eisen pro MMOH [mol _{Fe} [*] mol _{MMOH} ⁻¹]	Methode
MMOH nach Reinigung	0,79 ± 0,02	ICP-MS
MMOH nach Reinigung und Entsalzung mittels Sephadex G-25	0,80 ± 0,02	ICP-MS
MMOH nach Reinigung, Entsalzung mittels Sephadex G-25 und zweifacher Ultrafiltration	0,88 ± 0,04	ICP-MS
MMOH nach Eisenrekonstitution und Entsalzung mittels Sephadex G-25	1,46 ± 0,06	ICP-MS
MMOH nach Eisenrekonstitution, Entsalzung mittels Sephadex G-25 und zweifacher Ultrafiltration	1,02 ± 0,03	ICP-MS
MMOH aus <i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b [Smith et al., 2002]	1,37 ± 0,02	Keine Angabe
MMOH aus <i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b [Fox et al., 1989]	2,15	Spektroskopisch mit 2,4,6, Tripyridyl-s-triazine
MMOH aus <i>Methylosinus trichosporium</i> IMV 2011 [Shaofeng et al., 2007]	1,50	Atomabsorptionsspektrometrie
MMOH aus <i>Methylococcus capsulatus</i> Bath [Woodland und Dalton, 1984]	1,15 ± 0,35	Nassveraschung mit konzentrierten Säuren

3.4.1.2 pH Einfluss

Ein wichtiger biochemischer Parameter in Bezug auf die Enzymaktivität ist der pH-Wert. Der optimale pH-Wert für die sMMO-Aktivität wurde in der Literatur mit 7,5 angegeben [Fox et al., 1989]. Eine Analyse der Aktivität bei verschiedenen anderen pH-Werten wurde bisher nicht beschrieben. Für mögliche *in vitro*-Anwendungen z.B. Kombinationen mit anderen Enzymen mit unterschiedlichen pH-Optima ist die Kenntnis der pH-Stabilität der sMMO wichtig. Deshalb erfolgten in der vorliegenden Arbeit erstmals genauere Untersuchungen zur sMMO-Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert. Die Messungen zum Einfluss des pH-Wertes auf die sMMO-Aktivität erfolgten im Nitrobenzol-Assay mit Eisen-rekonstituierter MMOH. Die Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert ist in Abbildung 3-32 dargestellt. Beispiele für Progresskurven zur Bestimmung der sMMO-Aktivität im Nitrobenzol-Assay sind im Anhang in Abbildung 7-19, S.186 gezeigt.

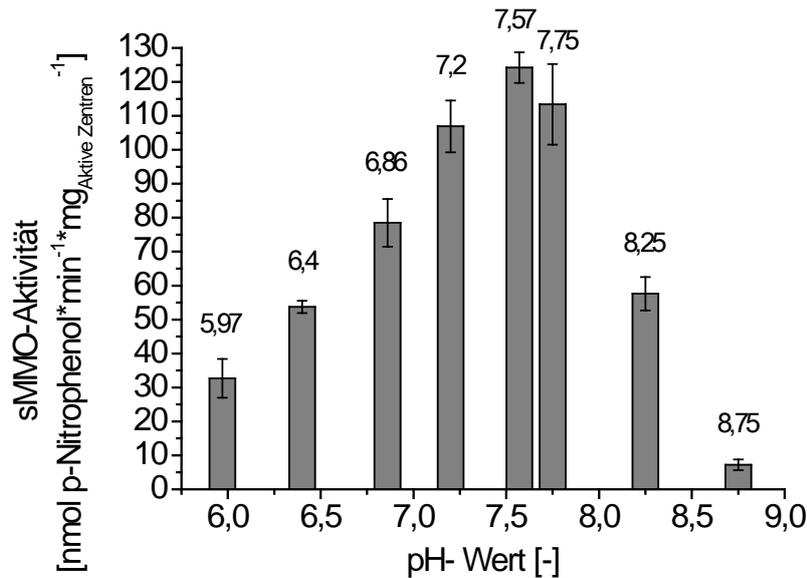


Abbildung 3-32: Spezifische sMMO-Aktivität in Abhängigkeit des pH-Wertes im Nitrobenzyl-Assay. Angegeben sind Mittelwerte aus $n=$ drei Messungen. Folgende Bedingungen wurden eingestellt: $\text{MMOH}_{\text{aktive Zentren}}$: rek. MMOB : $\text{MMOR} = 2:1:1 \mu\text{M}$; 5 mM Nitrobenzol; 1 mM NADH; 30 °C; Messpuffer 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat. Über den Säulen, Angabe der pH-Werte der nachgemessenen Lösungen. Extinktionskoeffizienten von *p*-Nitrophenol wurden für jeden pH-Wert bestimmt siehe Anhang Tabelle 7-3, S.185.

Das erhaltene pH-Optimum für den Umsatz von Nitrobenzol zu *p*-Nitrophenol lag bei pH 7,57. Dies entsprach dem bekannten Literaturwert für das pH-Optimum der sMMO-Aktivität [Fox *et al.*, 1989]. Ein Unterschied der sMMO in Bezug auf das pH-Optimum aus der CH_3OH -gewachsenen Biomasse im Vergleich zur in der Literatur verwendeten CH_4 -gewachsenen Biomasse wurde nicht beobachtet. Der für die Messungen zum pH-Optimum verwendete Dreikomponentenpuffer (50 mM Tris; 25 mM MES; 25 mM Natriumacetat) diente der Pufferung über den untersuchten pH-Bereich.

3.4.1.3 Einfluss der Salzkonzentration

Bei Verwendung des Dreikomponentenpuffers wurden, im Vergleich zum zuvor verwendeten 25 mM MOPS-Puffer, unterschiedliche sMMO-Aktivitäten bei gleichen Bedingungen gemessen. Die Ursache war die unterschiedliche Salzkonzentration der Puffer und deren Einfluss auf die sMMO-Aktivität. In der Literatur werden keine Untersuchungen zum Einfluss der Salzkonzentration bzw. des Puffers auf die sMMO-Aktivität aufgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten deshalb erstmals Untersuchungen zum Einfluss der Ionenstärke auf die sMMO-Aktivität. Die Messungen erfolgten mit Eisen-rekonstituierter MMOH. Die Ergebnisse der Messungen mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen sind in Abbildung 3-33 und Tabelle 3-21 dargestellt.

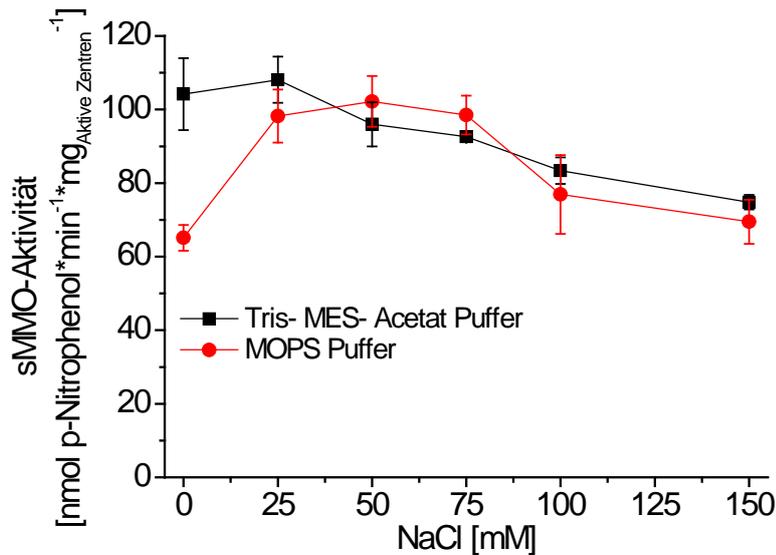


Abbildung 3-33: Spezifische sMMO-Aktivität in Abhängigkeit der Salzkonzentration (NaCl) in Tris-MES-Acetat-Puffer (TMA) und MOPS-Puffer. Angegeben sind Mittelwerte aus $n=$ drei Messungen. Folgende Bedingungen wurden eingestellt: $\text{MMOH}_{\text{aktive Zentren}}$: rek. MMOB : $\text{MMOR} = 2:1:1 \mu\text{M}$; 5 mM Nitrobenzol; 1 mM NADH; 30 °C; Messpuffer 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat pH 7,3; 25 mM MOPS-Puffer pH 7,3.

Tabelle 3-21: Spezifische sMMO-Aktivität in Abhängigkeit der Salzkonzentration (NaCl) in Tris-MES-Acetat-Puffer (TMA) und MOPS-Puffer. Angegeben sind Mittelwerte aus $n=$ drei Messungen. Angegeben sind die Daten aus Abbildung 3-21. Die Leitfähigkeiten in Abhängigkeit der NaCl-Konzentration sind ebenfalls aufgelistet. Die Berechnung der Ionenstärke aus der Leitfähigkeit erfolgte mit Formel 2-3, S.41.

Puffer	NaCl [mM]	Leitfähigkeit [$\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$]	Ionenstärke [mM]	sMMO-Aktivität [$\text{mU} \cdot \text{mg}_{\text{aktive Zentren}}^{-1}$]
50-25-25 mM TMA	0	5,0	73,2	104,2 ± 9,8
50-25-25 mM TMA	25	7,8	114,7	108,1 ± 5,8
50-25-25 mM TMA	50	10,5	154,8	96,0 ± 6,0
50-25-25 mM TMA	75	13,2	195,0	92,6 ± 0,8
50-25-25 mM TMA	100	16,0	236,8	83,4 ± 3,6
50-25-25 mM TMA	150	21,5	319,0	74,8 ± 2,0
25 mM MOPS	0	1,4	19,5	65,1 ± 3,5
25 mM MOPS	25	4,5	65,8	98,2 ± 7,2
25 mM MOPS	50	7,5	110,2	102,2 ± 6,9
25 mM MOPS	75	10,2	150,3	98,5 ± 5,3
25 mM MOPS	100	12,9	190,5	76,9 ± 10,7
25 mM MOPS	150	18,0	266,7	69,5 ± 6,0

Die sMMO-Aktivität zeigte in beiden Puffersystemen eine Abhängigkeit von der NaCl-Konzentration. Basierend auf Formel 2-3, S.41, wurde die gemessene Leitfähigkeit in die entsprechende Ionenstärke umgerechnet. Es zeigte sich eine optimale Ionenstärke im Bereich 70 bis 110 mM (Leitfähigkeit 5 bis 8 $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$). Dieses Ergebnis ermöglicht es bei notwendigen Wechseln von Puffern die optimalen Bedingungen für die sMMO-Aktivität einzustellen.

3.4.1.4 Einfluss der Temperatur

Das Temperaturoptimum der sMMO-Aktivität wurde in der Literatur bisher, basierend auf der optimale Wachstumstemperatur von *M. trichosporium* OB3b, mit 30 °C angegeben [Fox *et al.*, 1989]. Um die genaue Temperaturabhängigkeit der sMMO-Aktivität zu analysieren, erfolgten Messungen mit Eisen-rekonstituierter MMOH. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 3-34 dargestellt. Beispiele für Progresskurven zur Bestimmung der sMMO-Aktivität im Nitrobenzol-Assay sind im Anhang in Abbildung 7-19, S.186 gezeigt.

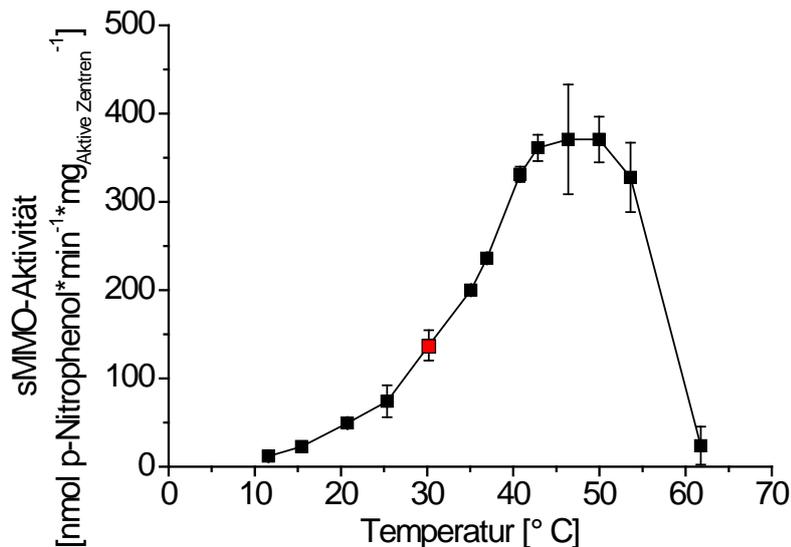


Abbildung 3-34: Spezifische sMMO-Aktivität in Abhängigkeit der Temperatur im Nitrobenzol-Assay. Rot-Standardtemperatur 30 °C. Angegeben sind Mittelwerte aus n= zwei Messungen. Folgende Bedingungen wurden eingestellt: MMOH_{aktive Zentren}: rek. MMOB: MMOR = 2:1:1 µM; 5 mM Nitrobenzol; 1 mM NADH; Messpuffer 25 mM MOPS + 50 mM NaCl pH 7,5. Messzeit 0,5-1,0 Minute. Daten aus [Kind, 2016]

Zur Berechnung der sMMO-Aktivität wurden jeweils die Anfangsanstiege der Progresskurven (0,5 bis 1,0 Minute) verwendet. Das Optimum lag, im Gegensatz zu den Literaturangaben von 30 °C, im Bereich von 46 bis 50 °C. Die Aktivität sank über 50 °C langsam und bei 61,8 °C rapide ab. Weiterhin wurde beobachtet, dass bei den Ansätzen ab 40 °C im Reaktionsverlauf eine Trübung der Reaktionslösung beobachtet wurde. Dies war auf Aggregation der Proteine und die daraus resultierende thermische Inaktivierung zurückzuführen. Die Aggregation war vermutlich auch der Grund für die größeren Fehlerbalken über 40 °C. Neben der direkten Messung der Aktivität bei verschiedenen Temperaturen erfolgte auch die Messung der Stabilität der sMMO bei verschiedenen Temperaturen über eine Inkubationszeit von bis zu 300 Minuten. Bei 30 °C war die sMMO-Aktivität nach 300 Minuten unverändert. Im Gegensatz dazu wurde bei Inkubationstemperaturen von 37 und 40 °C eine Reduktion der Aktivität nach 300 Minuten von 20 bzw. 60 % gemessen (siehe Abbildung 7-18, S.186). Für Langzeitmessungen (>30 Minuten), wie sie im Weiteren experimentellen Verlauf geplant waren, wurde auf Basis der beschriebenen Resultate, eine Temperatur von 30 °C gewählt. Bei dieser Temperatur wurde keine Inaktivierung des Enzyms durch zu Aggregationen der einzelnen Proteine beobachtet.

3.4.1.5 Kinetische Untersuchungen der sMMO-Reaktion mit Nitrobenzol

Um die sMMO, die erstmals aus CH₃OH gewachsener Biomasse aufgereinigt wurde, mit der sMMO aus CH₄-gewachsener Biomasse zu vergleichen, erfolgten Messungen mit verschiedenen Substratkonzentrationen im Nitrobenzol-Assay. Der sMMO-Assay mit dem artifiziellen Substrat Nitrobenzol bietet, z.B. gegenüber dem in der Literatur ebenfalls eingesetzten Propylen-Assay den Vorteil der kontinuierlichen spektroskopischen Messung der Produktbildung. Die Messungen erfolgten mit Eisen-rekonstituierter MMOH. Die erhaltene Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Nitrobenzol-Konzentration ist in Abbildung 3-35 links dargestellt. Diese Daten wurden an die Michaelis-Menten Kinetik (Formel 3-1, mit v = Reaktionsgeschwindigkeit; v_{\max} = maximale Reaktionsgeschwindigkeit; S = Substratkonzentration und K_m = Michaeliskostante) angepasst und doppelt reziprok aufgetragen (Lineweaver-Burk Diagramm Abbildung 3-35 rechts).

$$V = \frac{v_{\max} \times S}{K_m + S} \quad (\text{Formel 3-1})$$

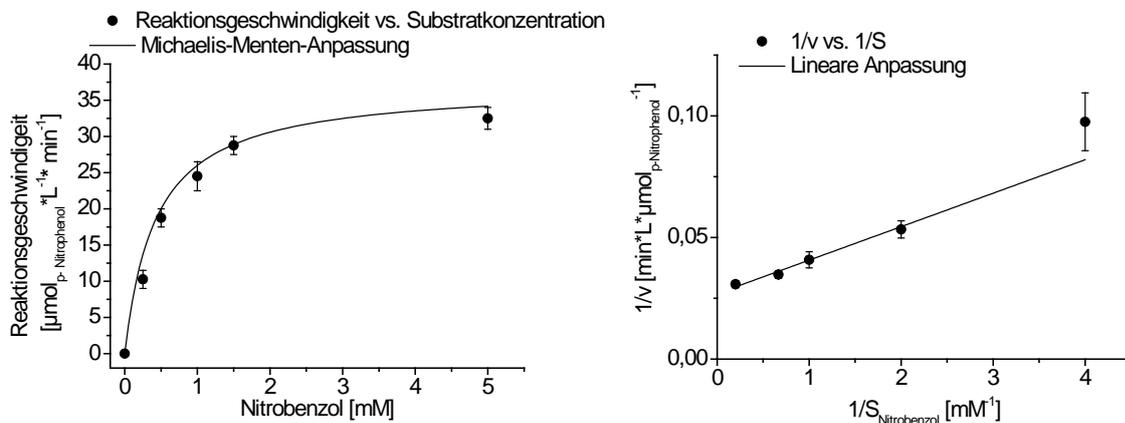


Abbildung 3-35: Links: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der sMMO aus *M. trichosporium* OB3b von der Substratkonzentration im Nitrobenzol-Assay. Rechts: Doppelt reziproke Darstellung der Werte aus der linken Abbildung (Lineweaver-Burk-Darstellung). v_{\max} = 1/Schnittpunkt Y-Achse; K_M = Anstieg * v_{\max} bzw. $(-1) \cdot 1/\text{Schnittpunkt mit x-Achse}$ (Anstieg $0,01376 \pm 0,00178$; Schnittpunkt mit der y-Achse $0,02692 \pm 0,00145$). Angegeben sind Mittelwerte aus $n =$ zwei Messungen. Folgende Bedingungen wurden eingestellt: MMOH_{aktive} Zentren: rek. MMOB: MMOR = 1:1:1 μM ; 1 mM NADH; 30 °C; Messpuffer 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat pH 7,5. Die Progresskurven der Messungen sind ebenfalls in Kapitel 3.5.1.1, S:116 dargestellt.

Die sMMO verhielt sich im untersuchten Substratbereich entsprechend der Michaelis-Menten Kinetik. Aus der doppelt reziproken Auftragung der Daten im Lineweaver-Burk-Diagramm (Abbildung 3-35 rechts), erfolgte die Bestimmung des apparenten K_M -Wertes und von v_{\max} . Die kinetischen Parameter sind in Tabelle 3-22 dargestellt.

Tabelle 3-22: K_M und v_{\max} berechnet aus Abbildung 3-35 (v_{\max} = 1/Schnittpunkt Y-Achse; K_M = Anstieg * v_{\max} bzw. $(-1) \cdot 1/\text{Schnittpunkt mit x-Achse}$). Vergleich mit Literaturdaten entnommen aus der Arbeit von [Liu *et al.*, 2005] (gemessen mit H:B:R 1:1:1, 23 °C; 0,2 mM NADH; 25 mM MOPS-Puffer pH 7,6)

	Eigene Daten	[Liu <i>et al.</i> , 2005]
K_M [mM]	$0,51 \pm 0,06$	0,46
v_{\max} [$\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$]	$37,1 \pm 2,0$	50,3

Die erhaltenen Werte für K_M und v_{max} lagen in einer Größenordnung mit Literaturdaten für die sMMO aus *M. trichosporium* OB3b (siehe Tabelle 3-22). Dadurch wurde erneut die Vergleichbarkeit der sMMO aus CH_3OH - und CH_4 -gewachsener Biomasse gezeigt. Die Unterschiede der Konstanten könnten auf die unterschiedlichen Messparameter der eigenen bzw. der Literaturangaben zurückzuführen sein [Liu *et al.*, 2005]. Aufgrund des K_M -Wertes der sMMO für Nitrobenzol von 0,51 mM und der vergleichsweise geringen Löslichkeit des Substrates in wässrigen Lösungen (15,4 mM bei 20 °C, Herstellerangabe Sigma-Aldrich), war eine Messung der Enzymaktivität in Sättigung (20-fach $K_M \sim 95\% v_{max}$) nicht möglich. Analog zu verschiedenen Literaturangaben wurde die Enzymaktivität mit Nitrobenzol als artifizielles Substrat der sMMO bei 1,0 mM gemessen, um die erhaltenen Aktivitäten vergleichen zu können [Liu *et al.*, 2005; [Brazeau und Lipscomb, 2003; Wallar und Lipscomb, 2001]. Weitere Messungen wurden bei 5,0 mM Nitrobenzol durchgeführt (ca. 10-fach K_M -Wert = $\sim 91\% v_{max}$), um eine annähernde Sättigung mit Substrat zu erreichen.

3.4.2 Untersuchungen zur Stöchiometrie der sMMO-Komponenten im Nitrobenzol-Assay

Erste Experimente zeigten analog zu Literaturdaten, dass die sMMO-Aktivität durch das stöchiometrische Verhältnis der einzelnen Enzym-Komponenten (MMOH, MMOB, MMOR) beeinflusst wurde. Um das optimale stöchiometrische Verhältnis der sMMO-Komponenten bezüglich der sMMO-Aktivität zu bestimmen, wurden Untersuchungen mit unterschiedlichen sMMO-Stöchiometrien durchgeführt. In einem Hydroxylase-Heterohexamer $[(\alpha\beta\gamma)_2]$ befinden sich jeweils zwei aktive Zentren (eines pro α -Untereinheit). Die sMMO-Aktivität und auch die Stöchiometrie der Hydroxylase wurden immer auf die Zahl der eingesetzten aktiven Zentren bezogen. Die Messungen erfolgten mit Eisen-rekonstituierter MMOH. Das Ergebnis ist in Abbildung 3-36 dargestellt.

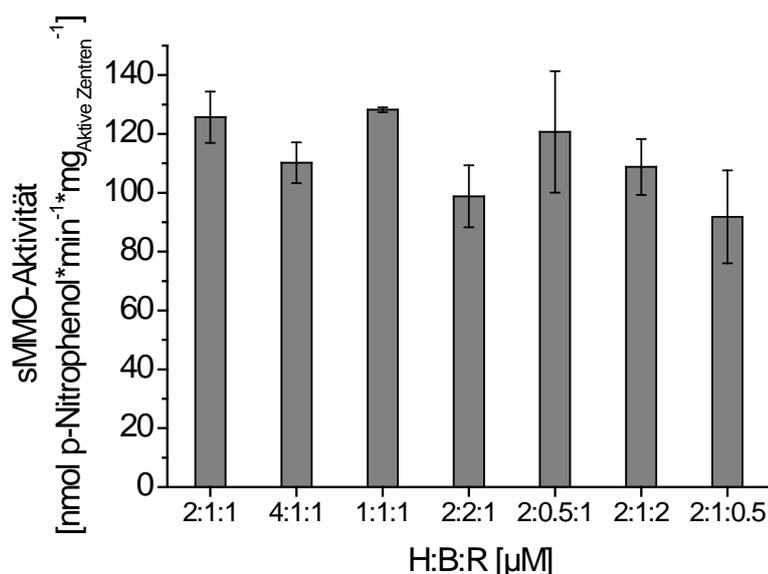


Abbildung 3-36: Spezifische sMMO-Aktivität im Nitrobenzol-Assay bei verschiedenen stöchiometrischen Verhältnissen von MMOH (aktive Zentren): rek. MMOB: MMOR. Angegeben sind Mittelwerte aus $n =$ drei Messungen. Folgende Bedingungen wurden eingestellt: 5 mM Nitrobenzol; 1 mM NADH; 30 °C; Messpuffer 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat pH 7,5

Die höchste spezifische sMMO-Aktivität wurde, wie in der Literatur beschreiben, für das Verhältnis $H_{az}(\text{aktive Zentren}):B:R= 1:1:1 \mu\text{M}$ erhalten [Wallar und Lipscomb, 2001; Zhang und Lipscomb, 2006]. Bei weiterer Erhöhung der MMOH-Konzentration sank die spezifische sMMO-Aktivität. Dies wurde ebenfalls bei der Variation der rek. MMOB bzw. MMOR-Konzentration beobachtet. Dabei zeigte sich eine stärkere Reduktion der sMMO-Aktivität bei Verringerung der MMOR-Konzentration (Verhältnisse 2:2:1 bzw. 2:1:0,5). Dies deutete auf einen starken Einfluss der gewählten MMOR-Konzentration auf die sMMO-Aktivität hin. Für die weiteren Versuche wurde das $H_{az}:B:R$ Verhältnis von 1:1:1 μM gewählt.

3.4.3 Vergleich der sMMO-Aktivität von homolog produzierten MMOB mit rekombinant in *E. coli* produziertem MMOB_{rek}

Neben der in Kapitel 3.3.3, S.89 beschriebenen Reinigung von MMOB aus *M. trichosporium* OB3b, konnte MMOB für die Aktivitätsmessungen im Rahmen dieser Arbeit auch durch rekombinante Produktion in *E. coli* bereitgestellt werden. Der genaue Ablauf der Produktion und Reinigung ist in den Arbeiten von Dillmann und Kind beschrieben [Dillmann, 2014; Kind, 2016]. Im Rahmen der rekombinanten Produktion von MMOB wurde ein N-terminaler tag an die MMOB-Sequenz von *M. trichosporium* OB3b angebracht. Dabei handelte es sich um das eukaryotische Protein SUMO (*small ubiquitin-like modifier*). Dieser tag beinhaltete eine 6-fache His-Sequenz (N-Terminus), die zur Reinigung des Zielproteins mittels Metallaffinitätschromatographie genutzt wurde. Neben diesem Aspekt bietet die Nutzung des SUMO-tags den Vorteil, dass bei der Aufarbeitung des Proteins die überhangsfreie Spaltung des tags vom Zielproteins durch eine hochspezifische Protease (Ulp 1) durchgeführt werden kann [Butt *et al.*, 2005; Marblestone *et al.*, 2006]. Neben dem Vergleich der sMMO-Aktivität von MMOB aus *M. trichosporium* OB3b und rek. MMOB aus *E. coli*, erfolgten auch Untersuchungen zur sMMO-Aktivität mit dem SUMO-MMOB-Fusionsprotein. Für eine industrielle Anwendung der sMMO wäre die Nutzung des SUMO-Proteins aufgrund des His-tags als potentieller Immobilisierungsanker von Interesse. Untersuchungen dazu wurden durchgeführt und sind in Kapitel 3.7.2, S.155 beschreiben.

Die Messungen zum Vergleich von MMOB und rek MMOB erfolgten mit einer MMOH-Fraktion die mit Eisenionen-Zusatz gereinigt wurde. Das Ergebnis ist in Abbildung 3-37 dargestellt (ausgewählte Progresskurven dieser Messungen sind im Anhang in Abbildung 7-19, S.186 gezeigt). Die sMMO-Aktivitäten für MMOB aus *M. trichosporium* OB3b und MMOB (*M. trichosporium* OB3b) rekombinant in *E. coli* produziert waren vergleichbar. Auch bei Messungen mit 1 mM Nitrobenzol wurden vergleichbare sMMO-Aktivitäten bestimmt (ca. $120 \text{ mU} \cdot \text{mg}_{\text{aktiveZentren}}^{-1}$). Aufgrund der einfacheren und effizienteren Produktion und Aufarbeitung des rekombinant in *E. coli* produzierten MMOB wurden alle weiteren Messungen mit rek. MMOB durchgeführt. Für eine mögliche technische Anwendung der sMMO würde sich ebenfalls die Nutzung von rek. MMOB aufgrund der besseren Verfügbarkeit anbieten. Ohne MMOB-Zusatz wurde eine 20-fach geringere sMMO-Aktivität gemessen. Dies ist vergleichbar mit der dokumentieren Reduktion der sMMO-Aktivität in Abwesenheit vom MMOB bei Fox und Kollegen [Fox *et al.*, 1989]. Durch das Fehlen von MMOB erfolgt keine Bindung des Proteins an MMOH. Weiterhin kommt es zu keinen Konformationsänderungen in der Hydroxylase und zu einer Reduktion der Elektronenübertragung der Reduktase auf das aktive Zentrum der Hydroxylase. Dadurch wird die gesamte Reaktion verlangsamt (vergleiche Kapitel 1.1.2.3, S.12).

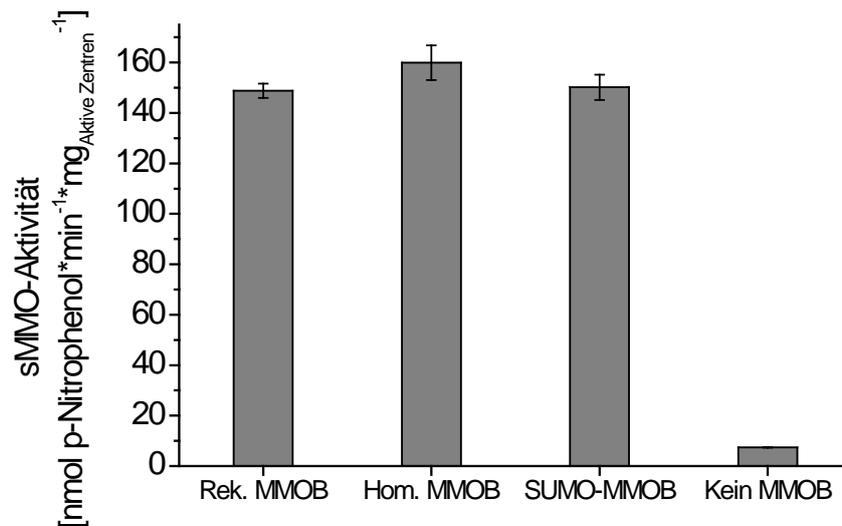


Abbildung 3-37: Vergleich der sMMO-Aktivität mit rek. MMOB; hom. MMOB; SUMO-MMOB und ohne MMOB. Angegeben sind Mittelwerte aus n= zwei Messungen. Folgende Bedingungen wurden eingestellt: MMOH_{aktive Zentren}: MMOB: MMOR = 1:1:1 μ M; 5 mM Nitrobenzol; 1 mM NADH; 30 °C; Messpuffer 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat pH 7,5.

Überraschenderweise konnte auch mit dem SUMO-MMOB-Fusionsprotein eine mit dem Einsatz von MMOB vergleichbare sMMO-Aktivität gemessen werden. Dies war nicht zu erwarten, da der SUMO-tag am N-Terminus von MMOB angebracht, welcher essentiell für die Bindung an MMOH und somit für die sMMO-Aktivität ist (siehe Kapitel 1.1.2.2.2 und Abbildung 1-8, S.13). Anscheinend hatte der SUMO-tag am N-Terminus des MMOB-Proteins keinen entscheidenden Einfluss auf die Bindung von MMOB an die Hydroxylase und somit die sMMO-Aktivität. Die bereits beschriebenen inhibierende Wirkung von höheren MMOB-Konzentrationen auf die sMMO-Aktivität wurde auch für SUMO-MMOB untersucht (siehe Anhang Tabelle 7-4, S.187). Wie bereits in der Literatur beschrieben reduzierte sich die sMMO-Aktivität mit steigendem Verhältnis von MMOB bzw. SUMO-MMOB: MMOH [Wallar und Lipscomb, 2001]. Die Reduktion der Aktivität wird mit der konkurrierenden Bindung von MMOB und MMOR um die Bindung an der Hydroxylase begründet (siehe Kapitel 1.1.2.2.2 und Abbildung 1-8, S.13). Bei Verwendung von SUMO-MMOB konnte eine geringere Reduktion (ca. 10 %) der sMMO-Aktivität im Vergleich zu MMOB beobachtet werden. Die Ursache hierfür konnte die schlechtere Bindung vom SUMO-MMOB an MMOH gewesen sein. Dadurch wäre eine MMOR-Bindung auch bei hohen SUMO-MMOB-Konzentrationen und damit eine vergleichsweise höhere sMMO-Aktivität möglich gewesen. Für eine mögliche Immobilisierung der sMMO wurde der SUMO-tag mit dem 6-fachen His-tag an MMOB als Verknüpfung zu einem Träger eingesetzt (siehe Kapitel 3.7.2, S.155).

3.4.4 Umsatz von CH₄

In den bisherigen Kapiteln wurde die sMMO-Reaktion von artifiziellen Substraten wie Nitrobenzol oder Naphthalin untersucht. Ziel dieser Experimente war die biochemische Analyse von Reaktionsparametern, wie Temperatur und pH-Wert, im Hinblick auf geplante *in vitro*-Experimente mit dem natürlichen Substrat CH₄. Die Experimente mit CH₄ als sMMO-Substrat erfolgten in gasdichten Reaktionsgefäßen mit Eisen-rekonstituierter MMOH (Kapitel 2.4.4.3, S.43). Neben CH₄ kann die sMMO auch mit CH₃OH als Substrat reagieren. (siehe Abbildung

3-38). Deshalb erfolgte neben der gaschromatographischen Analyse der CH_3OH -Konzentration, auch eine Bestimmung der Formaldehydkonzentration. Die Kalibriergeraden zur CH_3OH und HCHO -Bestimmung sind im Anhang dargestellt (Abbildung 7-20 und Abbildung 7-21, S.187)

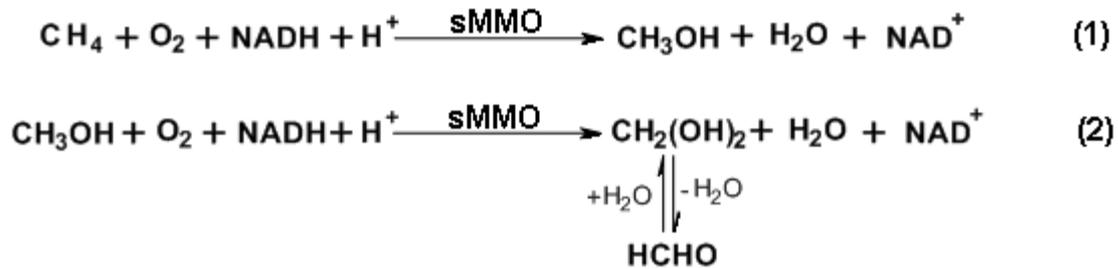


Abbildung 3-38: Gleichungen der sMMO-Reaktion mit CH_4 (1) und CH_3OH (2) als Substrat. In Wasser bildet sich aus HCHO das ebenfalls gezeigte Aldehydhydrat (Methandiol).

Ausgewählte Chromatogramme nach Analyse der sMMO-Reaktionsproben mit CH_4 als Substrat sind in Abbildung 3-39 dargestellt. Eine Steigerung der CH_3OH -Signale und damit der gebildeten CH_3OH -Konzentration in den Reaktionsansätzen wurde bei den gewählten Messzeitpunkten, drei und zehn Minuten beobachtet. Neben der CH_3OH -Bildung wurde auch die Bildung von HCHO in den Reaktionsansätzen gemessen (Kapitel 2.4.5, S.45). Die gebildeten Produktkonzentrationen der sMMO-Reaktion mit CH_4 als Substrat sind in Abbildung 3-40 dargestellt.

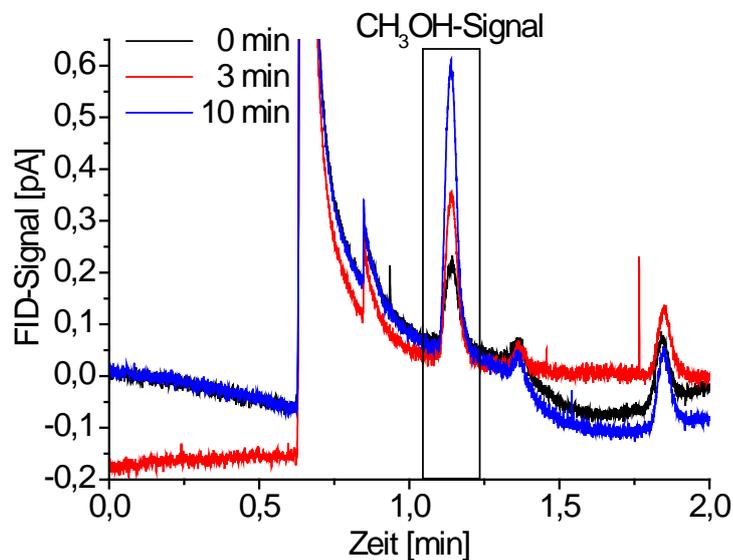


Abbildung 3-39: Chromatogramme der CH_3OH -Analyse mittels GC-Headspace nach 0 Minuten (Schwarz); drei Minuten (Rot) und zehn Minuten (Blau) Reaktion der sMMO mit CH_4 in gasdichten Reaktionsgefäßen. FID-Signal entspricht dem gemessenen Strom im Flammenionisationsdetektor (FID) in piko Ampere. Folgende Bedingungen wurden eingestellt: $\text{MMOH}_{\text{aktive Zentren}}$: rek.MMOB: MMOR = 3:3:3 μM in 1 mL Flüssigvolumen; 20 % CH_4 (63,5 μmol) in 8 mL Gasvolumen; 1 mM NADH; 30 °C; Messpuffer 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat pH 7,5. Reaktionsstopp durch Säure-Zugabe auf pH 3 bis 4.

Neben CH_3OH wurde in allen Reaktionsansätzen HCHO als Produkt der unerwünschten Reaktion der sMMO mit CH_3OH detektiert. Die gebildete HCHO -Konzentration betrug dabei nach drei Minuten 40 % und nach zehn Minuten 28 % der gesamten Produktkonzentration

($\text{CH}_3\text{OH}+\text{HCHO}$). Sowohl die CH_3OH -, als auch die HCHO -Bildung waren nach zehn Minuten Reaktionszeit im Vergleich zur Bildung nach drei Minuten nicht mehr linear. Die spezifischen sMMO-Aktivität nach drei bzw. zehn Minuten betragen 247 ± 53 bzw. $167 \pm 35 \mu\text{mol}_{\text{CH}_3\text{OH}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{Aktive Zentren}}^{-1}$. Die Reduktion der Produktbildung könnte durch die Limitierung von NADH verursacht worden sein, da nach zehn Minuten bereits 90 % der eingesetzten NADH-Menge ($1.000 \mu\text{M}$) zu den Produkten CH_3OH bzw. HCHO umgewandelt wurden. Für die sMMO bzw. andere Monooxygenasen wurde bereits eine Entkopplung des NADH-Verbrauches durch Bildung von Nebenprodukten beschrieben [Denisov *et al.*, 2007; Gassner und Lippard, 1999]. Aufgrund dieser Nebenproduktbildung war die wahrscheinliche Ursache für die Reduktion der Produktbildung, die Limitierung von NADH im Ansatz.

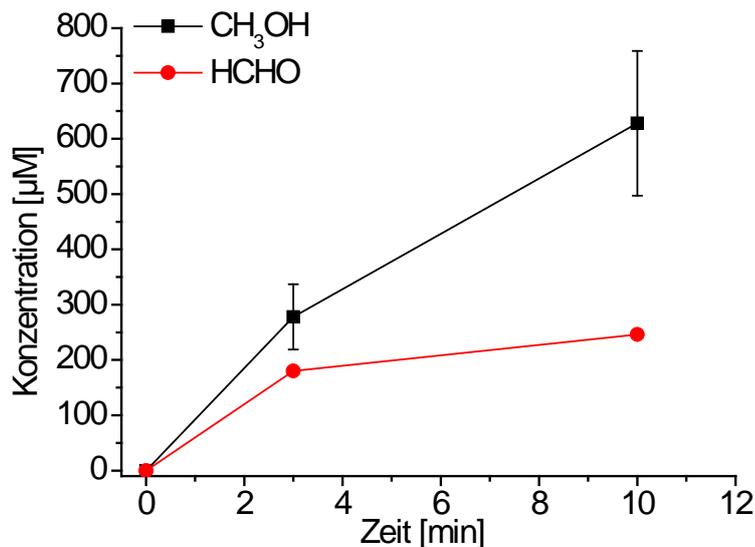


Abbildung 3-40: CH_3OH -, HCHO -Konzentration und sMMO-Aktivität beim Umsatz von CH_4 durch die sMMO. Angegeben sind Mittelwerte aus $n=$ zwei Messungen. Es wurden folgende Bedingungen verwendet: $\text{MMOH}_{\text{aktive Zentren}}$: rek.MMOB: MMOR = 3:3:3 μM in 1 mL Flüssigvolumen; 1,6 mL CH_4 (63,5 μmol); 1,35 mL $\mu\text{mol O}_2$ (53,9 μmol) in 8 mL Gasvolumen; 1 mM NADH; 30 °C; Messpuffer 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat pH 7,5. Reaktionsstopp nach drei bzw. zehn Minuten durch Säure-Zugabe auf pH 3 bis 4. Messung CH_3OH über GC-HSS und HCHO spektroskopisch mittels Nash Methode.

Das für die Untersuchungen in den Kapiteln 3.4.1, S.100 bis 3.4.4, S.109 verwendete Puffersystem bestand aus einem drei-Komponentenpuffer mit 50 mM Tris. Bei der Verwendung von Tris in Kombination mit HCHO muss folgendes beachtet werden. Primäre Aminogruppen, wie im Tris vorhanden, reagieren mit HCHO . Dies wird u. a. für das Abstoppen von Protein Quervernetzung mittels HCHO genutzt (siehe Abbildung 7-22, S.188). Für den hier eingesetzten Puffer wurden zur Kontrolle verschiedene Testmessungen durchgeführt, in denen der Einfluss des Puffers (mit und ohne Tris-Zusatz) auf die gemessene HCHO -Konzentration untersucht wurde. Dabei wurden in TMA-Puffer, MOPS-Puffer und ddH_2O identische HCHO -Konzentrationen nachgewiesen (siehe Anhang Abbildung 7-23, S.188). Eine Reaktion von HCHO mit Tris im Reaktionspuffer fand somit nicht bzw. ohne Einfluss auf die messbare HCHO -Konzentration statt. Daras folgte, dass eine Verwendung des TMA-Puffers für die getesteten Bedingungen möglich war.

Neben der sMMO-Reaktion mit CH_4 als Substrat, wurde auch die Reaktion mit CH_3OH als alleiniges Substrat in einem Reaktionsansatz getestet. Dabei wurden aus 1 mM CH_3OH innerhalb von fünf Minuten Reaktion 0,23 mM HCHO gebildet. Dies entsprach einem Umsatz

von 23 % bezogen auf CH_3OH bzw. die eingesetzte NADH-Konzentration (1 mM) und einer spezifischen Aktivität von $365 \pm 7 \mu\text{mol}_{\text{CH}_3\text{OH}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{Aktive Zentren}}^{-1}$. Weitere Untersuchungen zur direkten HCHO-Bildung der sMMO mit CH_3OH erfolgten im Rahmen dieser Arbeit nicht. Im Vergleich zu den durchgeführten Nitrobenzol-Messungen wurde für CH_4 als Substrat der sMMO ein höherer Umsatz bzw. eine bessere Elektronenkopplung (3 bis 13 % vs. 90 %, bezogen auf NADH) gemessen. Dies könnte durch die höhere Affinität der sMMO zum natürlichen Substrat im Vergleich zu Nitrobenzol als artifiziellem Substrat erklärt werden. Weiterführende Untersuchungen zum Umsatz der sMMO wurden im folgenden Kapitel 3.5 durchgeführt und ausgewertet.

3.4.5 Zusammenfassung und Diskussion der Charakterisierung der sMMO

Fox und Kollegen beschreiben eine Abhängigkeit der sMMO-Aktivität von unterschiedlichen Eisenionen-Beladungen des aktiven Zentrums [Fox *et al.*, 1989]. Ein Verlust von Eisenionen im aktiven Zentrum der MMOH nach der Reinigung wurde ebenso beobachtet, wie die Steigerung der sMMO-Aktivität um Faktor 23, nach der MMOH-Reinigung mit Zusatz an Eisenionen in Form von 0,2 mM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$. Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit dem identischen Eisen-Zusatz eine Steigerung der sMMO-Aktivität nach der Reinigung der MMOH-Komponente gemessen werden (Faktor 5,5, Tabelle 3-19, S.101). Die Erhöhung der sMMO-Aktivität auf einen vergleichbaren Wert, ohne Eisenionen-Zusatz bei der MMOH-Reinigung, war ebenfalls über eine Eisenionen-Rekonstitution des Proteins möglich. Die Rekonstitution basierte auf einem bereits veröffentlichten Protokoll für *Methylococcus capsulatus* Bath mit Inkubation des Proteins mit 0,5 mM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ im Eisenrekonstitutionspuffer und 2 mM DTT ([Merkx und Lippard, 2002]). Die Steigerung der sMMO-Aktivität um Faktor drei durch eine vergleichbare Rekonstitution der Eisenionen wurde auch von Pilkington und Dalton für die MMOH aus *Methylococcus capsulatus* Bath beschrieben [Pilkington und Dalton, 1990]. Weiterhin konnten in einer Studie von Atta, sowohl die inaktive Apo-MMOH (*M. capsulatus* Bath) präpariert, als auch anschließend durch Rekonstitution der Eisenionen 85 bis 90 % der erwarteten Aktivität regeneriert werden [Atta *et al.*, 1993]. Ebenfalls für *Methylococcus capsulatus* Bath erfolgte die Rekonstitution der Eisenionen nach 15 Minuten Inkubation mit 0,5 mM Fe-EDTA und 10 mM DTT durch Green und Dalton [Green und Dalton, 1988]. Für die vollständige Regeneration der sMMO-Aktivität durch die Eisenionen-Rekonstitution waren im Rahmen der Messungen mit Apo-MMOH aus *M. capsulatus* Bath in der Literatur 120 bis 150 Minuten nötig [Merkx und Lippard, 2002; Sazinsky *et al.*, 2004]. Für die hier gezeigten Ergebnisse mit MMOH aus *M. trichosporium* OB3b wurde eine Aktivitätssteigerung bereits nach der direkten Zugabe der Eisenionen-Rekonstitutionslösung gemessen. Eine maximale sMMO-Aktivität wurde nach 30 bis 50 Minuten detektiert (siehe Anhang Abbildung 7-18, S.186). Im Unterschied zu den beschriebenen Literaturdaten wurde jedoch keine Apo-MMOH verwendet sondern, analog zu der Arbeit von Green und Dalton, MMOH-Fractionen die noch einen Resteisengehalt aufwiesen (eigene Daten, $0,8 \text{ mol}_{\text{Fe}} \cdot \text{mol}_{\text{MMOH}}^{-1}$ siehe Tabelle 3-20, S.102) [Green und Dalton, 1988]. Nach der hier erstmals für *Methylosinus trichosporium* OB3b beschriebenen erfolgreichen Eisenionen-Rekonstitution der MMOH, wurde eine Eisenionen-Beladung des aktiven Zentrums von $1,5 \text{ mol}_{\text{Fe}} \cdot \text{mol}_{\text{MMOH}}^{-1}$ (75 % der nativen Beladung) gemessen. Dieser Wert lag innerhalb des in Literaturdaten angegebenen Bereiches für verschiedene MMOH-Chargen (Tabelle 3-20, S.102).

Um die optimalen Reaktionsbedingungen für *in vitro*-Messungen zur CH₃OH-Bildung mit der aufgearbeiteten sMMO zu bestimmen wurden verschiedenen Parameter wie Temperatur, pH-Wert und Ionenstärke untersucht. Dies diente weiterhin dem Vergleich der aus CH₃OH-gewachsener Biomasse aufgearbeiteten sMMO mit Literaturdaten für sMMO die aus CH₄-gewachsener Biomasse gereinigt wurde. Das erhaltene pH-Optimum der sMMO-Aktivität (pH 7,57) entsprach den bisher veröffentlichten Literaturdaten [Fox *et al.*, 1989]. Die Messung des Temperaturoptimums erfolgt klassisch über die Messung der Produktbildung des Enzyms bei verschiedenen Inkubationszeiten mit unterschiedlichen Temperaturen. Die daraus erhaltene Stabilität des Enzyms bei einer Temperatur wird in Abhängigkeit zur Produktbildung bzw. Reaktionsgeschwindigkeit aufgetragen [Segel, 1993]. Daraus kann das Temperaturoptimum des Enzyms bestimmt werden. Da bei der Messung der sMMO im Nitrobenzol-Assay nur eine Produktbildung bis maximal drei Minuten detektiert wurde, konnte diese Herangehensweise nicht angewandt werden. Die Ursachen für den geringen Umsatz werden im folgenden Kapitel untersucht. Die Untersuchung des Temperaturoptimums erfolgte stattdessen über die Ermittlung des Anfangsanstieges der Produktbildung im Nitrobenzol-Assay, in den ersten 30 Sekunden der Messung. Aus dem Anstieg wurde die Aktivität berechnet und in Abhängigkeit der Temperatur aufgetragen. Für das Temperaturoptimum der sMMO-Reaktion mit Nitrobenzol wurde in eigenen Messungen ein Wert von 46 bis 50 °C bestimmt. Dabei wurde eine Trübung der Lösung bei Temperaturen > 40 °C aufgrund von Proteinaggregation beobachtet [Kind, 2016]. Neben dem Optimum wurde auch die Temperaturstabilität der sMMO untersucht (mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie). Dabei zeigte sich, dass die MMOR bei etwa 37 °C und die MMOH bei etwa 39 °C begannen zu denaturieren bzw. sich zu entfalten [Kind, 2016]. Dies war die Ursache für die Proteinaggregation bei ≥ 40 °C. Bei Messung der sMMO-Aktivität nach Lagerung des Enzyms bei 40 °C über fünf Stunden wurde eine Reduktion der Aktivität von 60 % gemessen. Bei der Inkubation der sMMO bei 30 °C über fünf Stunden wurde dagegen keine Reduktion der Enzymaktivität detektiert (Abbildung 7-18, S.186 aus [Kind, 2016]). Für die sMMO aus *M. trichosporium* OB3b wird in verschiedenen Aktivitätsassays eine Reaktionstemperatur von 25 bis 30 °C verwendet [Fox *et al.*, 1989; Wallar und Lipscomb, 2001]. Eine genaue Analyse der Temperaturabhängigkeit und der Temperaturstabilität der sMMO-Aktivität aus *Methylosinus trichosporium* OB3b wurden bisher nicht veröffentlicht. Aufgrund der nachgewiesenen Enzymstabilität bei 30 °C über mehrere Stunden, die für Langzeitmessungen der sMMO entscheidend ist, wurden alle weiteren Untersuchungen bei 30 °C durchgeführt. Dabei sollte vor allem die Stabilität des Enzyms gewährleistet werden um eine partielle Inaktivierung oder Proteinaggregation der sMMO zu vermeiden.

Eine Analyse der Abhängigkeit der sMMO-Aktivität von der Ionenstärke bzw. Salzkonzentration wurde bisher nicht veröffentlicht und erfolgte deshalb in dieser Arbeit. Eine geringe bzw. zu hohe Ionenstärke kann die Proteinstruktur und die Enzymaktivität, z.B. durch Schwächung der ionischen Wechselwirkungen der Untereinheiten destabilisieren und zu einer Inaktivierung führen. Eine Vielzahl von Enzymen akzeptieren eine moderate Ionenstärke von 50 bis 200 mM [Bisswanger, 2014]. Für die sMMO ist die Interaktion der drei Komponenten für die sMMO-Aktivität essentiell (Kapitel 1.1.2.3, S.12). Die Bindung von MMOB und MMOR an MMOH wird durch Wechselwirkungen auf der Proteinoberfläche beeinflusst. Eine Veränderung der Salzkonzentration hat auch eine veränderte Hydrathülle/ Proteinoberfläche zur Folge. Daraus resultieren unterschiedliche Bindungseigenschaften, die die Aktivität beeinflussen können. Die Bindung von MMOB an MMOH in Gegenwart verschiedenen Salzkonzentrationen (0 bis 500 mM NaCl und KI) wurde bereits untersucht [Zhang *et al.*, 2006]. Bei

500 mM NaCl oder KI wurde eine komplette Dissoziation von MMOB und MMOH beobachtet. Die Bindung von MMOB an MMOH wird durch ionische Wechselwirkungen bzw. Wasserstoffbrückenbindungen erreicht. Diese werden bei veränderten Salzkonzentrationen verringert und führen zu einer schlechteren oder keiner Bindung von MMOB an MMOH. Nichtionische Detergenzien wie Triton X-100 hatten keinen Einfluss auf diese Bindung [Zhang *et al.*, 2006]. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Einfluss der Ionenstärke auf die sMMO-Aktivität untersucht. Dabei wurde eine optimale sMMO-Aktivität bei einer Ionenstärke von 70 bis 110 mM gemessen. Diese wurde für alle weiteren Untersuchungen beibehalten.

Die kinetische Untersuchung der sMMO im Nitrobenzol-Assay ergab apparente Werte für v_{\max} und K_M , die im Bereich der in der Literatur publizierten Werten lagen (Tabelle 3-22, S.106) [Liu *et al.*, 2005]. Damit konnte gezeigt werden, dass die kinetischen Eigenschaften der sMMO, die aus CH₃OH-gewachsener Biomasse aufgearbeitet wurde, mit den Eigenschaften der sMMO, die aus CH₄-gewachsener Biomasse gereinigt wurde, vergleichbar waren. Diese Vergleichbarkeit zeigte sich auch in den zuvor bestimmten Werten für das pH- bzw. Temperaturoptimum. Die gemessenen sMMO-Aktivitäten mit Nitrobenzol als Substrat entsprachen, je nach Messbedingungen, zwischen 110 bis 140 $\text{mU} \cdot \text{mg}_{\text{Aktive Zentren}}^{-1}$. Diese Aktivität lag in einer Größenordnung mit bereits veröffentlichten Daten (144 $\text{mU} \cdot \text{mg}_{\text{Aktive Zentren}}^{-1}$ bei pH 7,6 und 25 °C [Brazeau und Lipscomb, 2003]; 63 $\text{mU} \cdot \text{mg}_{\text{Aktive Zentren}}^{-1}$ bei 25 °C Reaktionstemperatur in 50 mM MOPS pH 7,6 [Wallar und Lipscomb, 2001]; 230 $\text{mU} \cdot \text{mg}_{\text{Aktive Zentren}}^{-1}$ bei pH 7,6 und 25 °C [Zhang und Lipscomb, 2006]). Die sMMO-Stöchiometrie der sMMO-Komponenten (Verhältnis von MMOH_{aktive Zentren}: MMOB: MMOR), die in den genannten drei Literaturangaben verwendet wurde war 1:1:1. Dies entsprach auch dem in dieser Arbeit bestimmten Verhältnis der sMMO-Komponenten für die höchste sMMO-Aktivität. In der Literatur wird beschrieben, dass eine höhere MMOB-Konzentration, aufgrund der Blockierung der MMOR-Bindungsstelle an MMOH, die sMMO-Aktivität verringert. Damit wird der Elektronentransport unterbunden und es ist keine Hydroxylierung des Substrates durch die MMOH möglich (Kapitel 1.1.2.3, S.12) [Wang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015]. Dies wurde durch eigenen Daten bestätigt, siehe Anhang Tabelle 7-5, S.187 [Wallar und Lipscomb, 2001].

In der vorliegenden Arbeit wurde, wie in Kapitel 3.4.3, S.89 beschrieben, das rekombinant in *E. coli* produzierte regulatorische Protein B eingesetzt. Zur Gewinnung in *E. coli* wurde ein His₆-SUMO-*tag* genutzt. Für sMMO-Aktivitätsmessungen im Nitrobenzol-Assay wurde das Fusionsprotein ebenfalls eingesetzt. Überraschenderweise konnte dabei kein negativer Einfluss auf die sMMO-Aktivität gemessen werden. Obgleich der vergleichbaren Größe des His₆-SUMO-*tags* von 13,4 kDa und der Fusion mit MMOB an deren N-Terminus hatte der His₆-SUMO-*tag* keinen Einfluss auf die sMMO-Aktivität. Die Messung der sMMO-Aktivität mit einem N-terminalem *tag* an Protein B wurde bisher nur für *Methylococcus capsulatus* Bath mit Fusion eines GST-*tags* am N-Terminus gezeigt. Dabei wurde eine 35 % geringere sMMO-Aktivität mit GST-MMOB im Vergleich zum *tag*-freien MMOB gemessen [Lloyd *et al.*, 1997]. Die Reduktion der sMMO-Aktivität im Vergleich zu den Daten mit dem His₆-SUMO-*tag* könnte aufgrund der Größe des GST-*tags* (27 kDa) bedingt worden sein. Bei Verwendung des SUMO-MMOB im sMMO-Aktivitätstest und Vergleich mit MMOB, rekombinant in *E. coli* bzw. homolog in *M. trichosporium* OB3b gebildet, konnten vergleichbare sMMO-Aktivitäten gemessen werden. Die Verwendung von rekombinant (*E. coli*) produziertem MMOB wurde sowohl für *M. capsulatus* Bath, als auch für *M. trichosporium* OB3b bereits beschrieben [Chang *et al.*, 1999; West *et al.*, 1992]. Aufgrund der gleichen Aktivität, der einfacheren Produktion und der höheren Ausbeute bei der Reinigung (rek. MMOB 1,7 mg MMOB* g_{BFM} [Kind, 2016]; hom. MMOB 0,04 mg MMOB* g_{BFM}) wurde für alle folgenden Experimenten, rekombi-

nant produziertes MMOB (rek. MMOB) verwendet. Die Nutzung des His₆-SUMO-MMOB als möglicher Anker für eine Immobilisierung der sMMO wäre aufgrund der nachgewiesenen sMMO-Aktivität möglich und wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht (siehe 3.7.2, S.155). Nach der biochemischen Charakterisierung der sMMO mit dem artifiziellen Substrat Nitrobenzol erfolgten erste Untersuchungen mit CH₄ als Substrat in einem diskontinuierlichen Test. Auf Basis dieser Untersuchungen sollten weitere Experimente in einem größeren Maßstab geplant werden. Die Untersuchungen zur Charakterisierung der sMMO-Parameter erfolgten nicht von Beginn an im CH₄-Assay, da dieser diskontinuierlich durchgeführt wurde und für eine Vielzahl an Messungen aufgrund der hohen Analysezeit bzw. des Proteinverbrauches unvorteilhaft war. Wie bereits in der Literatur für die sMMO beschrieben, wurden im CH₄-Assay, sowohl CH₃OH, als auch HCHO als Produkte detektiert. Das auch CH₃OH ein Substrat der sMMO ist, aus dem HCHO gebildet wird, wurde bereits für *M. capsulatus* Bath beschrieben [Colby *et al.*, 1977; Tinberg und Lippard, 2010]. Dies konnte auch in dieser Arbeit in einer Messung mit CH₃OH als alleinigem sMMO-Substrat gezeigt werden.

Bei dem Vergleich von CH₄ und CH₃OH als Substrate der sMMO müssen verschiedenen Aspekte berücksichtigt werden. CH₄ wurde als Gas zugegeben (CH₄-Löslichkeit in wässrigen Lösungen bei 20 °C 1,54 mM [Wilhelm *et al.*, 1977]; bei 30 °C 1,26 mM [Duan und Mao, 2006]). Dagegen lag CH₃OH bei diesen Bedingungen als Flüssigkeit vor und kann mit wässrigen Lösungen vollständig vermischt werden. Für CH₃OH liegt im Vergleich zu CH₄ somit keine Limitierung des Massentransfers vor. Die Affinität der sMMO zu CH₄ als Substrat ist im Gegensatz zu CH₃OH aber höher. Für die sMMO aus *M. trichosporium* OB3b wird ein K_M-Wert von 25 µM für CH₄ angegeben [Fox *et al.*, 1990]. Für die sMMO aus *M. capsulatus* Bath wurde ein K_M Wert von 813 bzw. 950 µM für CH₃OH gemessen (K_M Wert CH₄=3 bis 160 µM) [Colby *et al.*, 1977; Green und Dalton, 1985; Pilkington und Dalton, 1990]. Aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeit der beiden Substrate müssen die K_M-Werte im Zusammenhang mit der jeweiligen Löslichkeit und dem Zugang des Substrates betrachtet werden. In den, im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten, zeigte sich, dass die HCHO-Bildung im CH₄-Assay bis zu 40 % der detektierten Produktmenge ausmachte. Bei Messungen der Enzymaktivität für die beiden Substrate CH₄ und CH₃OH mit Rohextrakten aus *Methylococcus capsulatus* Bath wurde für CH₃OH als Substrat eine dreifach höhere spezifische sMMO-Aktivität gemessen (246 mU*mg_{Protein}⁻¹ für CH₃OH und 84 mU*mg_{Protein}⁻¹ für CH₄; [Colby *et al.*, 1977]). Die Aktivität für CH₃OH entsprach dabei 90 % der sMMO und 10 % der Methanol-Dehydrogenase (MDH), die ebenfalls im Rohextrakt vorhanden war [Colby *et al.*, 1977]. In eigenen Versuche wurde bei Analyse des gereinigten Enzyms für CH₃OH als Substrat eine 1,5-fach höhere sMMO-Aktivität bestimmt (CH₃OH-365 mU*mg_{Aktive Zentren}⁻¹; CH₄-247 mU*mg_{Aktive Zentren}⁻¹). Dies zeigte, dass bei weiteren Versuchen mit CH₄ als Substrat eine zusätzliche Bestimmung der HCHO-Konzentration erfolgen muss, um dem Gesamtumsatz der Reaktion zu bestimmen.

Die HCHO-Bildung in den Reaktionsansätzen mit CH₄ als Substrat war unerwünscht, da das eigentliche Zielprodukt CH₃OH war. Eine Reaktion von HCHO mit der Pufferkomponente Tris konnte in zusätzlichen Untersuchungen nicht nachgewiesen werden. Deshalb war es nach Bestimmung der HCHO-Konzentration möglich diesen Wert in dem Gesamtumsatz der sMMO-Reaktion zu berücksichtigen. Als Folge der HCHO-Bildung konnten keine negativen Auswirkungen auf die sMMO gemessen werden. Eine Verhinderung der HCHO-Bildung durch die sMMO konnte in dem verwendeten Messansatz nicht gewährleistet werden. Dies könnte z.B. durch eine sofortige Abtrennung von CH₃OH aus dem Reaktionsansatz erfolgen.

Im Vergleich zu dem Umsatz im CH₄-Assay (90 % bezogen auf NADH) waren die bisher erreichten Umsätze im Nitrobenzol-Assay (3 bis 13 % bezogen auf NADH) deutlich geringer. Zudem wurde im CH₄-Assay eine Produktbildung über einen Zeitraum von bis zu zehn Minuten beobachtet. Im Nitrobenzol-Assay wurde eine Stagnation der Zielproduktbildung bereits nach zwei bis drei Minuten beobachtet. Eine Ursache für diese zeitlich begrenzte Aktivität der sMMO wurde bisher nicht identifiziert. Als mögliche Einflussfaktoren kamen die Entkopplung des Elektronentransfers und die daraus resultierende Nebenproduktbildung in Frage. Dies wurde in der Literatur bereits bei der sMMO bzw. anderen Monooxygenasen beobachtet. [Denisov *et al.*, 2007; Zhang und Lipscomb, 2006]. Im folgenden Kapitel wurden verschiedenen Untersuchungen bezüglich einer Umsatzsteigerung durchgeführt. Weiterhin erfolgten Messungen zur NADH-Regeneration, da dies z.B. bei den Messungen mit CH₄ als Substrat der umsatzlimitierende Faktor war.

3.5 Untersuchung zur Umsatzsteigerung der sMMO

Das Ziel dieser Untersuchungen war es mit Nitrobenzol als Modellsubstrat eine Steigerung des Umsatzes zu erreichen, die in Kombination mit der NADH-Regeneration auf das natürliche Substrat CH₄ angewandt werden sollte (siehe Kapitel 2.4.4.2, S.39). Bisher wurden in der Literatur keine Messungen der sMMO-Aktivität über einen Zeitraum von mehr als 30 Minuten veröffentlicht. Der Fokus der meisten Untersuchungen lag in der Analyse des Reaktionszyklus der sMMO und des Zusammenspiels der einzelnen sMMO-Komponenten und nicht auf einem möglichen technischen Einsatz des Enzyms (Kapitel 1.1.2.3, S.12). Wichtige Faktoren für den Einsatz des Enzyms sind deren Langzeitstabilität bei den gewählten Reaktionsbedingungen und die Zielproduktbildung über diesen Zeitraum. Dabei sollte neben einer hohen Stabilität ein entsprechend hoher Umsatz der Reaktion gegeben sein. Nur wenige Angaben zum Umsatz der sMMO in Reaktionsansätzen sind bisher veröffentlicht. In sMMO-Aktivitätsmessungen im Rohextrakt von *Methylococcus capsulatus* Bath wurde nach 12 Minuten Reaktionszeit ein Umsatz von 1,0 bis 1,5 % für verschiedene Substrate (CH₄, Ethan, Propen) beschrieben [Colby *et al.*, 1977]. Die erhaltenen Umsätze waren vergleichbar mit den eigenen Ergebnissen aus Kapitel 3.4.4, S.109. Bereits bekannte Aspekte der sMMO-Reaktion (z.B. Entkopplung des Elektronentransfers von der Produktbildung), sowie die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Merkmale zur sMMO wurden für die weiteren Betrachtungen berücksichtigt. Für identifizierte Limitationen der sMMO-Reaktion sollten geeignete Lösungen hinsichtlich eines Langzeiteinsatzes der sMMO zur CH₃OH-Bildung aus CH₄ aufgezeigt werden.

3.5.1 Umsatz im Nitrobenzol-Assay

3.5.1.1 Umsatz bei verschiedenen Nitrobenzolkonzentrationen

Bereits in Kapitel 3.4, S.100 wurde ein geringer Umsatz von 0,5 bis 1 % für Nitrobenzol im sMMO-Aktivitätsassay gemessen. 5 mM Nitrobenzol (10-fach K_M, siehe Tabelle 3-22, S.106) wurden eingesetzt um die Reaktionsgeschwindigkeit für die jeweiligen Experimente der Charakterisierung zu steigern. Aufbauend auf diesen Ergebnissen erfolgten Untersuchungen zum Umsatz und der sMMO-Aktivität in Abhängigkeit verschiedener Nitrobenzolkonzentrationen. Dabei wurden auch die weiteren Substrate O₂ und NADH für die Berechnung des Umsatzes berücksichtigt. Einzelne Messungen sind in Abbildung 3-41 dargestellt und das Ergebnis ist in Tabelle 3-23, 118 zusammengefasst.

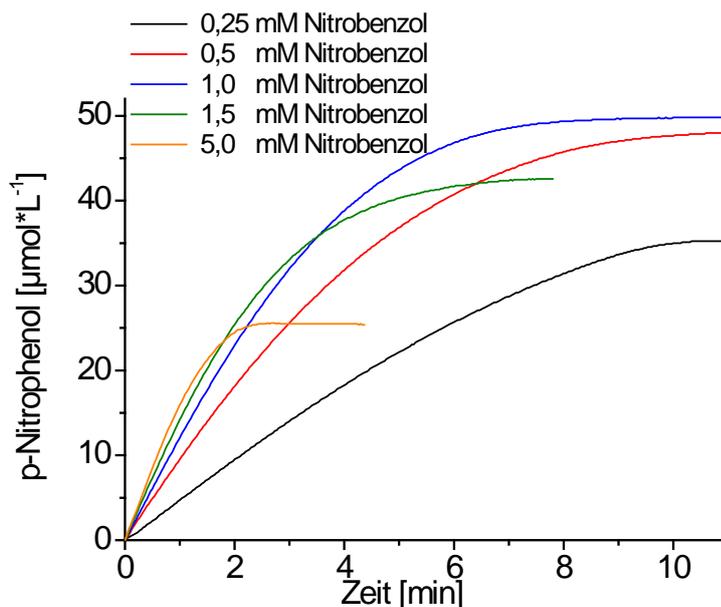


Abbildung 3-41: Progresskurven der *p*-Nitrophenolbildung durch die sMMO im Nitrobenzol-Assay bei Verwendung von unterschiedlichen Nitrobenzol-Startkonzentrationen. Folgende Bedingungen wurden eingestellt: MMOH_{aktive Zentren}: rek. MMOB: MMOR = 1:1:1 µM; 1 mM NADH; 30 °C; Messpuffer 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat pH 7,5.

Das Substrat mit der geringsten Startkonzentration im Ansatz war stets O₂. Eine Limitierung der Reaktion wurde jedoch in keiner Messung und zu keinem Zeitpunkt beobachtet. Dies konnte auch in sMMO-Aktivitätsmessungen mit Analyse der O₂-Konzentration in der Lösung gezeigt werden. Eine Limitierung von O₂ zum Zeitpunkt der reduzierten *p*-Nitrophenolbildung (zwei bis drei Minuten bei 5 mM Nitrobenzol) wurde dabei nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die höchsten Produktkonzentrationen von *p*-Nitrophenol und entsprechend die höchsten Umsätze, bezogen auf O₂ bzw. NADH, wurden bei Nitrobenzolkonzentrationen von 0,5 und 1 mM gemessen. Bei 0,25 mM Nitrobenzol bzw. 5 mM verringerte sich die *p*-Nitrophenolkonzentration bzw. der Umsatz um 25 % bzw. 48 %. Bezogen auf Nitrobenzol wurde bei 0,25 mM mit 14,0 % der höchste Umsatz und bei 5 mM mit 0,5 % der geringste Umsatz gemessen. Unabhängig von der Nitrobenzolkonzentration stagnierte die *p*-Nitrophenol-Bildung innerhalb aller Messungen (siehe Progresskurven in Abbildung 3-41). Je geringer die Nitrobenzolkonzentration, umso länger die Zeitspanne der *p*-Nitrophenol-Produktion (0,25 mM NB Stoppen nach zehn Minuten und bei 5 mM NB Stoppen nach zwei Minuten Reaktionszeit). Eine potentielle Ursache für dieses Verhalten der sMMO könnte die Entkopplung des Elektronentransfers von der Zielproduktbildung gewesen sein. Dies wurde bereits für verschiedene andere Monooxygenasen (u.a. Cytochrom P-450 [Denisov *et al.*, 2007]) gezeigt. Bei höheren Aktivitäten, wie sie bei höheren Nitrobenzolkonzentrationen beobachtet wurden, könnte infolge der höheren Aktivität eine gesteigerte Entkopplung des Elektronentransfers von der *p*-Nitrophenolbildung vorgelegen haben. Dies würde die geringere Produktendkonzentration bei höheren Nitrobenzolkonzentrationen erklären. Die Stagnation der *p*-Nitrophenolbildung könnte auch durch eine Inaktivierung des Enzyms verursacht worden sein. Dies wurde im folgenden Kapitel untersucht.

Tabelle 3-23: Spezifische sMMO-Aktivität, gebildetes *p*-Nitrophenol und Umsatz bei verschiedenen Nitrobenzolkonzentrationen. Angegeben sind Mittelwerte aus $n=$ zwei Messungen. Es wurden folgende Bedingungen verwendet: MMOH_{aktive Zentren}: rek. MMOB: MMOR = 1:1:1 μ M; 1 mM NADH; 30 °C; Messpuffer 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat pH 7,5; Messvolumen 0,5 mL, Messzeit zehn Minuten, für die Aktivitätsberechnung wurden die ersten 30 bis 60 Sekunden verwendet. Für die Umsatzberechnung wurde eine gelöste Sauerstoffkonzentration von 235 μ M verwendet, eine Rücklösung von Sauerstoff in dem angegebenen Reaktionszeitraum wurde nicht berücksichtigt. Diese Daten wurden bereits in Abbildung 3-35 und Tabelle 3-22, S.106 dargestellt.

Nitrobenzol [mM]	Spezifische sMMO-Aktivität [mU*mg _{Aktive Zentren} ⁻¹]	Gebildetes <i>p</i> -Nitrophenol [μ M]	Umsatz Nitrobenzol [%]	Umsatz O ₂ [%]	Umsatz NADH [%]
0,25	41,0 \pm 5,0	34,9 \pm 1,0	14,0 \pm 0,4	14,9 \pm 0,4	3,5 \pm 0,1
0,5	72,0 \pm 5,0	42,8 \pm 6,2	8,6 \pm 1,2	18,2 \pm 2,6	4,3 \pm 0,6
1	98,0 \pm 8,0	45,6 \pm 5,4	4,6 \pm 0,5	19,4 \pm 2,3	4,6 \pm 0,5
1,5	115,0 \pm 5,0	37,1 \pm 5,0	2,5 \pm 0,3	15,8 \pm 2,1	3,7 \pm 0,5
5	130,0 \pm 6,0	23,8 \pm 2,2	0,5 \pm 0,1	10,1 \pm 0,9	2,4 \pm 0,2

3.5.1.2 Untersuchung der sMMO-Inaktivierung im Nitrobenzol-Assay

Eine potentielle Ursache für die Stagnation der *p*-Nitrophenolbildung, wie sie in Abbildung 3-41 beobachtet wurde, könnte die Inaktivierung der sMMO gewesen sein. Um dies zu untersuchen, wurden dem Reaktionsansätzen, nach der stagnierenden *p*-Nitrophenolbildung, entweder NADH mit sMMO oder nur sMMO zugesetzt. Nach Zugabe von sMMO und sMMO inklusive NADH wurde, entgegen der Erwartung, keine weitere *p*-Nitrophenolbildung detektiert (siehe Anhang Abbildung 7-24, S.189). Diese Experimente erfolgten auch mit nachträglicher Zugabe aller sMMO-Komponenten (MMOH, MMOB, MMOR), sowie nach Zugabe von Nitrobenzol. In allen Messungen konnte ebenfalls keine weitere *p*-Nitrophenolbildung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Bei einer Inaktivierung der sMMO im Reaktionsansatz sollte nach Zugabe von frischem Enzym eine weitere Produktbildung messbar sein. Da dies jedoch nicht gezeigt werden konnte, war die Stagnation der Zielproduktbildung vermutlich durch eine andere Ursache bedingt.

Die Bildung anderer Reaktionsprodukte könnte ein Grund für die stagnierende Zielproduktbildung gewesen sein. Mögliche Reaktionsprodukte, die einen negativen Einfluss auf die sMMO-Aktivität hätten, sind z.B. NAD⁺ oder H₂O₂. In der Literatur sind keine Daten bezüglich der Dauer der Produktbildung durch die sMMO angegeben. In verschiedenen Aktivitätsmessungen mit der sMMO werden Messzeiten von fünf bzw. 12 Minuten für CH₄ (*M. capsulatus* Bath) [Colby *et al.*, 1977; Gassner und Lippard, 1999] und 15 Minuten für Propen (*Methylocystis sp.* Strain WI 14) [Grosse *et al.*, 1999] genannt. Eine genaue Angabe über die Umsätze bzw. die Dauer der Produktbildung erfolgte jedoch in keiner der genannten Veröffentlichungen. Oftmals wurden in der Literatur nur Endpunktbestimmungen des Zielproduktes durchgeführt, so dass keine Daten zu einem Verlauf der Produktbildung gemacht werden konnten. Um eine etwaige Nebenproduktbildung durch die sMMO zu untersuchen, wurden Aktivitätsmessungen nach Abtrennung der Reaktionsbrühe vom Enzym durchgeführt.

3.5.1.2.1 sMMO-Aktivität nach Trennung der sMMO von der Reaktionsbrühe

Der im Folgenden beschriebene Versuch hatte zwei Ziele. Zum einen sollte die potentielle Inaktivierung der sMMO nach einmaliger Reaktion untersucht werden. Zum anderen sollte der Einfluss von potentiellen Produkten der sMMO-Reaktion in der Reaktionsbrühe auf die Aktivität des Enzyms analysiert werden. Nach der Messung der sMMO-Aktivität im Nitrobenzol-Assay, (Startaktivität der sMMO $90 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$) wurde die Reaktionsbrühe mittels einer SEC-Säule von der sMMO getrennt. (siehe Kapitel 2.4.4.2.10, S.42). Das Enzym wurde anschließend in einem neuen Reaktionsansatz erneut auf seine sMMO-Aktivität im Nitrobenzol-Assay untersucht. Nach Abtrennung der sMMO wurde eine sMMO-Aktivität gemessen, die 64 % der Startaktivität entsprach ($22 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$ gemessen, $35 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$ erwartet, wenn Verdünnungsfaktor von 2,6 berücksichtigt, siehe Anhang Abbildung 7-25, S.189). Das Ergebnis zeigte, dass trotz Stagnation der *p*-Nitrophenolbildung im Nitrobenzol-Assay, sMMO-Aktivität vorhanden war. Mögliche Ursache für das Stagnieren der *p*-Nitrophenolbildung könnten Limitierungen der Substrate gewesen sein. In verschiedenen Experimenten konnte jedoch keine Limitierung eines Substrates (Nitrobenzol, NADH oder Sauerstoff) gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Weiterhin könnte in der Reaktion ein Reaktionsprodukt gebildet worden sein, dass toxisch auf die sMMO wirkte. Potentielle noch nicht berücksichtigte Produkte bzw. Nebenprodukte der Reaktion waren NAD^+ oder H_2O_2 . Die Bildung von H_2O_2 durch die sMMO wurde in verschiedenen Veröffentlichung bereits gezeigt [Astier *et al.*, 2003; Zhang und Lipscomb, 2006]. Die Bildung dieser Reaktionsprodukte und deren Einfluss auf die sMMO-Aktivität wurden im Weiteren näher untersucht.

3.5.2 Untersuchungen zu Produkten und Nebenprodukten der sMMO-Reaktion

Mögliche Neben- bzw. Reaktionsprodukte der sMMO die einen Einfluss auf die sMMO-Aktivität haben, waren z.B. NAD^+ und H_2O_2 . Der Einfluss von beiden Produkten auf die sMMO-Aktivität wurde in einzelnen Veröffentlichungen angedeutet. Eine genaue Analyse des Einflusses auf die sMMO-Aktivität und etwaige Verbesserungen wurden jedoch nicht untersucht und sollten im Rahmen dieser Arbeit erfolgen.

3.5.2.1 NADH-Regeneration durch die Glucose 1-Dehydrogenase

Unabhängig vom Substrat ist NAD^+ ein Produkt der sMMO-Reaktion. Experimentelle Arbeiten zeigten, dass NAD^+ inhibierend auf die sMMO-Reaktion wirkt [Green und Dalton, 1986; Kopp *et al.*, 2001], ($K_i = 2,2$ bis $9,7 \text{ mM}$ für *M. capsulatus* Bath). Für eine potentielle Anwendung der sMMO muss dieser Aspekt berücksichtigt werden. Des Weiteren wäre bei Totalumsätzen NADH als Elektronendonator ein limitierendes Substrat und müsste dem Reaktionssystem in ausreichender Menge zugeführt werden. Dabei muss der Preis der einzelnen Komponenten berücksichtigt werden. NADH kostet im Vergleich zu NAD^+ etwa das 2,5-fache (Sigma-Aldrich 1g NADH= 184 €, NAD^+ = 70 €, Produkthanfrage März 2018). Aus diesen Gründen wurde eine Cofaktor-Regeneration von NADH untersucht. Dabei wurde das Enzym Glucose 1-Dehydrogenase aus *Pseudomonas sp.* (GDH, EC 1.1.1.47) mit dem Substrat Glucose eingesetzt (Kapitel 1.1.3, S.16 und 2.4.4.5, S.44). Der Vorteil dieses Enzyms, neben seiner kommerziellen Verfügbarkeit, war dass die einzelnen Substrate bzw. Produkte der Reaktion (Glucose und D-Glucono-1,5-lacton) keinen Einfluss auf die sMMO-Aktivität hatten (Daten nicht gezeigt). Der Vergleich zweier Progresskurven mit und ohne Cofaktor-Regeneration für den Umsatz von Nitrobenzol als Substrat ist in Abbildung 3-42 dargestellt.

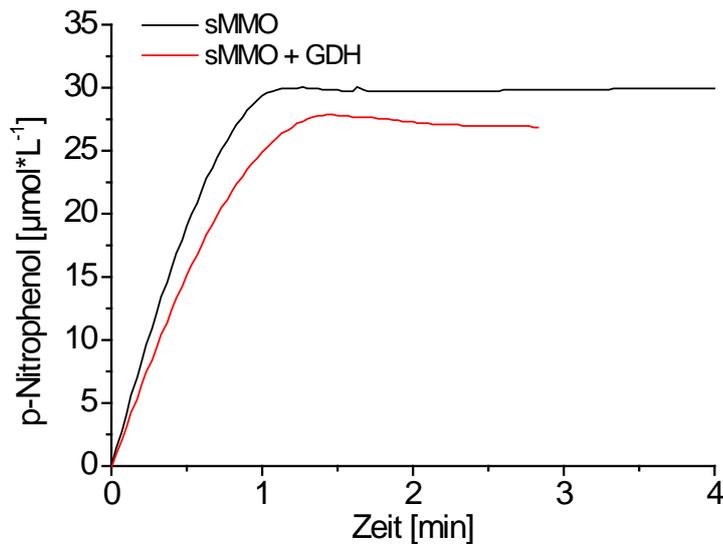


Abbildung 3-42: Progresskurven der *p*-Nitrophenolbildung im Nitrobenzol-Assay mit und ohne Cofaktor-Regeneration durch die GDH. Es wurden folgende Bedingungen verwendet: MMOH_{aktive Zentren}: rek. MMOB: MMOR = 2:2:2 µM (38 mU·mL⁻¹); GDH 1,0 µg·mL⁻¹ = 75 mU·mL⁻¹; 5 mM Nitrobenzol; ohne GDH 1 mM NADH bzw. mit GDH 1 mM NAD⁺; 30 °C; Messpuffer 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat pH 7,5.

Die Daten aus Abbildung 3-42 zeigen, dass die Cofaktor-Regeneration mittels GDH im sMMO-Aktivitätstest erfolgreich eingesetzt werden konnte. Die gemessene sMMO-Aktivität im Nitrobenzol-Assay mit Cofaktor-Regeneration durch die GDH betrug 83 % der Aktivität ohne Cofaktor-Regeneration ($90 \pm 9 \text{ mU} \cdot \text{mg}_{\text{Aktive Zentren}}^{-1}$). Im Vergleich zum Umsatz bezogen auf Nitrobenzol wurde eine Reduktion um 13 % mit NADH-Regeneration gemessen. Die geringere Aktivität am Beginn der Reaktion war vermutlich auf die Startphase der Reaktion zurückzuführen. Zunächst bildete die GDH NAD, welches erst danach von der sMMO als Substrat genutzt werden konnte. Weiterhin könnte auch der inhibierende Effekt des NAD⁺ für die geringere sMMO-Aktivität bzw. den Umsatz verantwortlich sein. Obgleich die Regeneration von NADH durch die eingesetzte GDH erfolgreich war, konnte durch Reduktion der NAD⁺-Konzentration durch die GDH keine Steigerung des Umsatzes im Nitrobenzol-Assay gezeigt werden. Die Stagnation der *p*-Nitrophenolbildung wurde in vergleichbare Maße mit bzw. ohne Cofaktor-Regeneration beobachtet. Damit konnte gezeigt werden, dass NAD⁺ nicht die Ursache für die Stagnation der Zielproduktbildung war. Dementsprechend wurde der Einfluss von H₂O₂, als weiteres potentiell Produkt der Reaktion, auf die sMMO-Aktivität untersucht.

3.5.2.2 H₂O₂ als Nebenprodukt der sMMO

Die Bildung von H₂O₂ als Nebenprodukt in der sMMO-Reaktion wurde bereits in verschiedenen Veröffentlichungen gezeigt [Gassner und Lippard, 1999; Zhang und Lipscomb, 2006]. In Kapitel 1.1.2.3, S.12 ist beschrieben, dass sowohl durch Reaktion von MMOR mit NADH alleine, als auch durch die Hydroxylase, ausgehend vom Intermediat Q, H₂O₂ als Nebenprodukt gebildet werden kann. MMOH besitzt zudem eine Peroxidase-Aktivität und kann H₂O₂ als O₂- und Elektronendonator für die Hydroxylierung von Substraten nutzen [Froland *et al.*, 1992; Gassner und Lippard, 1999]. Neben der Bildung von H₂O₂ durch die sMMO wurde im folgenden Kapitel auch der Einfluss der H₂O₂-Konzentration auf die sMMO-Aktivität im Nitrobenzol-Assay untersucht, da hierzu bisher keine aussagekräftigen Daten publiziert wurden.

3.5.2.2.1 H₂O₂-Bildung

Um die H₂O₂-Bildung innerhalb des Nitrobenzol-Assays zu untersuchen wurden verschiedenen Kombinationen der sMMO-Komponenten analysiert. Dabei erfolgte die diskontinuierliche Messung der H₂O₂-Konzentration im Reaktionsansatz nach verschiedenen Zeitpunkten. Die Messung erfolgte elektrochemisch mittels YSI 2700 Biochemistry Analyzer. Die gebildete H₂O₂-Menge wurde durch Reaktion an einer Platinelektrode umgesetzt und deren Konzentration anhand der Messung der Stromstärke, die proportional zur gebildeten H₂O₂-Menge war, analysiert (siehe Kapitel 2.4.6, S.45). Das Ergebnis der Messungen ist in Abbildung 3-43 dargestellt.

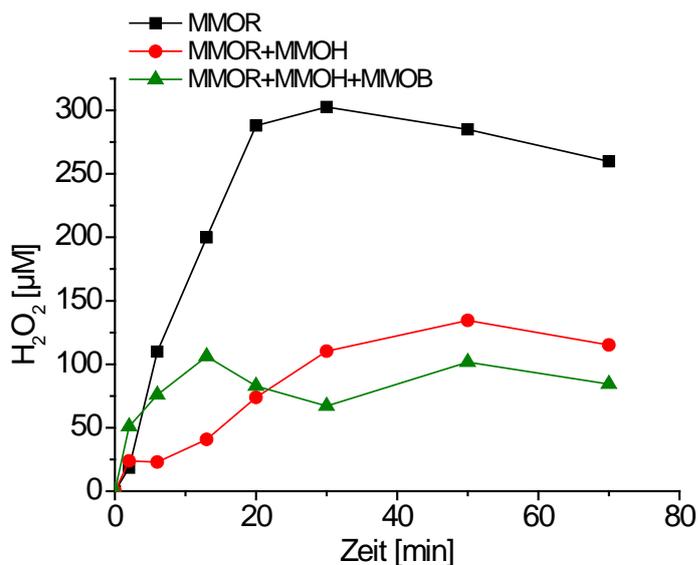


Abbildung 3-43: Zeitabhängige H₂O₂-Bildung der MMOR (schwarz), MMOR+ MMOH (rot) und der kompletten sMMO (grün) im Nitrobenzol-Assay. Messungen: n= eine Messung. Folgende Bedingungen wurden eingestellt: MMOH_{aktive Zentren}: rek. MMOB: MMOR = 1:1:1 µM; 1 mM Nitrobenzol; 1 mM NADH; 30 °C; Messpuffer 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat pH 7,5

Im Ansatz mit der kompletten sMMO wurde nach Beendigung des Experimentes (70 Minuten) eine *p*-Nitrophenolkonzentration von 45 µM bestimmt. Dies war vergleichbar mit den bisher erreichten maximalen *p*-Nitrophenolkonzentrationen (Kapitel 3.5.1.1, S.116). In den anderen beiden Ansätzen wurde wie erwartet keine *p*-Nitrophenolbildung detektiert. MMOR alleine bildete maximal 303 µM H₂O₂ nach 30 Minuten. In identischen Ansätzen mit Zusatz an MMOH bzw. MMOH und MMOB wurden 110 µM bzw. 67 µM H₂O₂ nach 30 Minuten gemessen. Dieses Experiment zeigt, dass H₂O₂ während der sMMO-Reaktion im Nitrobenzol-Assay gebildet wurde. Die Ursache für die Stagnation der H₂O₂-Bildung bei ca. 300 µM könnte die Sauerstoffkonzentration im Ansatz (gelöst 235 µM) und deren Limitierung bei der Diffusion in die Lösung gewesen sein. NADH war in Bezug auf die Stagnation der H₂O₂-Bildung nicht limitierend (1 mM). Mit MMOH wurde, vermutlich aufgrund der Peroxidase-Aktivität, eine geringere H₂O₂-Konzentration gemessen. Die gebildete H₂O₂-Konzentration im Ansatz mit der gesamten sMMO war mehr als doppelt so groß, wie die Konzentration des Zielproduktes *p*-Nitrophenol. Die H₂O₂-Bildung war vermutlich eine Folge der Entkopplung des Elektronentransfers von der Zielproduktbildung. Aufgrund dieser Ergebnisse könnte die H₂O₂-Bildung einen negativen Einfluss auf die sMMO-Aktivität bzw. Stabilität gehabt haben. Dieser Effekt sollte in weiteren Messungen genauer untersucht werden.

3.5.2.2.2 H₂O₂ Einfluss auf die sMMO-Aktivität und Stabilität

Auf Basis der Ergebnisse des vorigen Kapitels, wurde der Einfluss der H₂O₂-Konzentration auf die sMMO-Aktivität im Nitrobenzol-Assay untersucht. Weiterhin erfolgten Stabilitätsmessungen mit Inkubation der sMMO bei unterschiedlichen H₂O₂-Konzentrationen. Dabei war die maximal gebildete H₂O₂-Konzentration aus Abbildung 3-43 der Richtwert für die eingesetzten H₂O₂-Mengen. Die gemessene sMMO-Aktivität in Gegenwart verschiedener H₂O₂-Konzentrationen ist in Abbildung 3-44 dargestellt. Mit Erhöhung der eingesetzten H₂O₂-Konzentration sank die gemessene spezifische sMMO-Aktivität bei allen getesteten Nitrobenzolkonzentrationen sukzessive. Eine Inhibition der sMMO-Aktivität durch Zusatz von H₂O₂ lag somit vor. Um den Inhibitortyp genauer zu bestimmen, wurden die Daten aus Abbildung 3-44 A, entsprechend des Lineweaver-Burk-Plots doppelt reziprok aufgetragen und die jeweilige lineare Anpassung der Daten berechnet, siehe Abbildung 3-44 B. Da H₂O₂ als Substrat der MMOH beschrieben wurde war eine kompetitive Hemmung wahrscheinlich. Kennzeichnend für diese Hemmungsart wäre ein gemeinsamer Schnittpunkt der Geraden auf der y-Achse im Lineweaver-Burk-Plot. Dies war für die erhobenen eigenen Daten nicht der Fall. Einer anderen typischen enzymatischen Hemmungsart (unkompetitiv bzw. nichtkompetitiv) konnten die in Abbildung 3-45 B gezeigten Daten ebenfalls nicht zugeordnet werden. Die Hemmung der sMMO durch H₂O₂ entsprach keinem eindeutigen Hemmungstypus, sondern war eine Mischform aus den verschiedenen Hemmungstypen (kompetitiv, nichtkompetitiv und unkompetitiv). Dass die Hemmung der sMMO durch H₂O₂ zu komplex für die beschriebenen Hemmungstypen ist, kann mit der Interaktion von H₂O₂ mit der sMMO erklärt werden. Entgegen einem einfachen kompetitiven Inhibitor wird H₂O₂ nicht nur von der MMOH umgesetzt (Peroxidase-Aktivität), sondern in der Reaktion auch von der Hydroxylase bzw. der Reduktase gebildet (siehe Abbildung 3-43). Für eine genaue Betrachtung der Inhibition der sMMO durch H₂O₂ müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden und ggf. ein eigenes Modell für diese Inhibition entwickelt werden. Dies war nicht Bestandteil dieser Arbeit. Deshalb wurden weitere Untersuchungen zum Hemmungstyp der sMMO durch H₂O₂ nicht durchgeführt. Zur Abschätzung des Einflusses von H₂O₂ auf die sMMO-Aktivität wurde für die durchgeführten einzelnen Messungen die mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) des Inhibitors bestimmt. Damit sollte erstmals ein Richtwert für die Quantifizierung der Inhibition durch H₂O₂ berechnet werden. Die aus Abbildung 3-44 A erhaltenen Daten wurden zur Bestimmung des IC₅₀-Wertes an Formel 3-2 angepasst. Die Formel entspricht der allosterischen Hill-Kinetik (A₁ bzw. A₂ Minimum bzw. Maximum der Enzymaktivität; p-Hill-Koeffizient; log_{x0}- Zentrum der Anpassung), die für die Berechnung einer Dosis-Wirkungskurve verwendet wird. Der IC₅₀-Wert ist keine Konstante sondern abhängig von der jeweils eingesetzten Enzym bzw. Substratkonzentration.

$$y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(\text{LOG}x_0 - x)p}} \quad (\text{Formel 3-2})$$

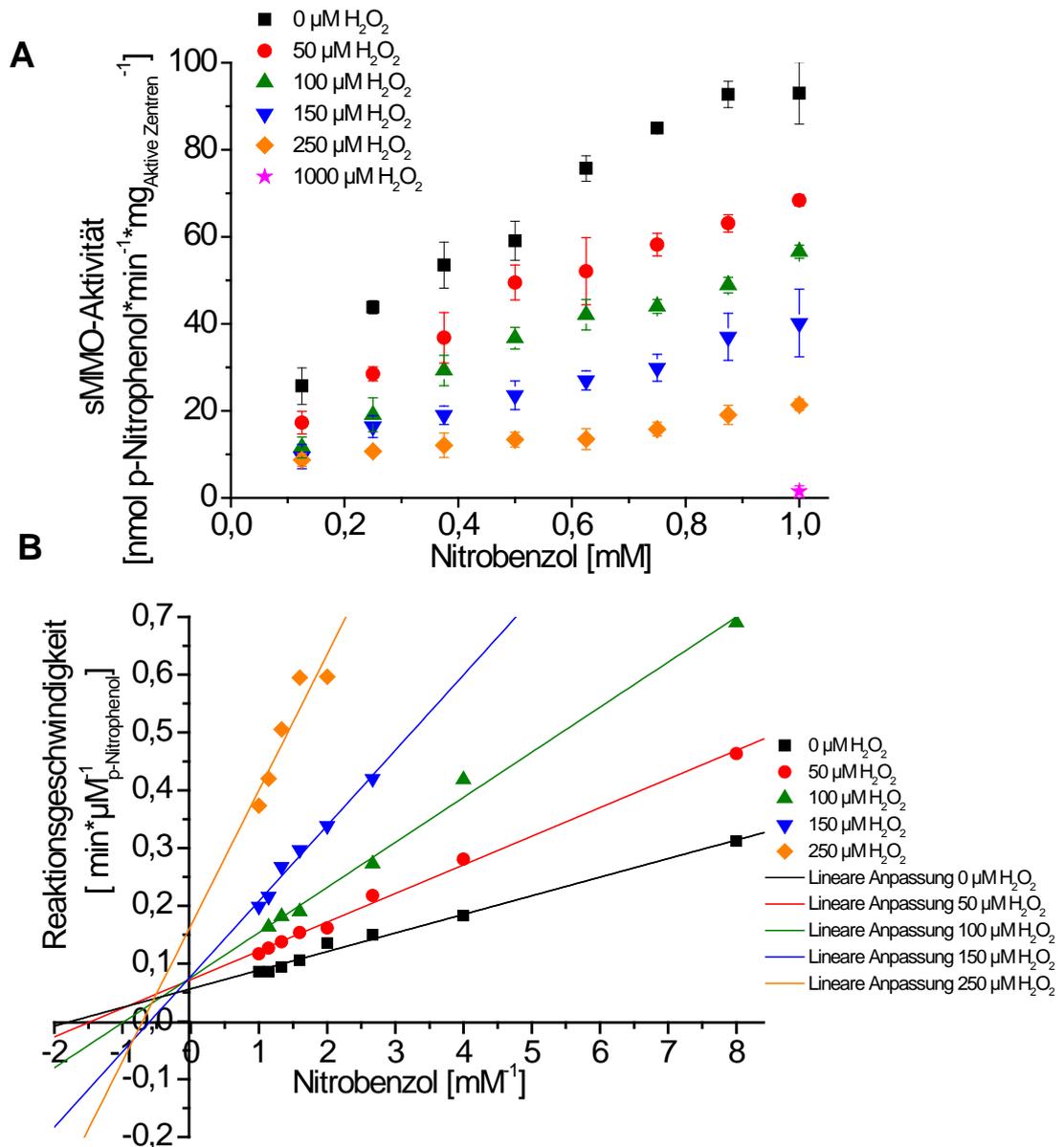


Abbildung 3-44: Abhängigkeit der spezifischen sMMO-Aktivität von der Nitrobenzolkonzentration bei verschiedenen H₂O₂-Konzentrationen (0 μM- schwarz; 50 μM- rot; 100 μM-grün; 150 μM-blau; 250 μM- orange; 1.000 μM- violett). A-Auftragung der spezifischen Aktivität vs. der eingesetzten Nitrobenzolkonzentration. B-Lineweaver-Burk-Plot (1/v vs. 1/S) der Daten aus Abbildung A und lineare Anpassung dieser. Angegeben sind Mittelwerte aus n= drei Messungen. Folgende Bedingungen wurden eingestellt: MMOH_{aktive Zentren}: rek. MMOB: MMOR = 1:1:1 μM; 1 mM NADH; 30 °C; Messpuffer 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat pH 7,5.

Drei der Datensätze, mitsamt den Anpassungen, sind in Abbildung 3-45 dargestellt. Die anderen Datensätze und Anpassungen sind im Anhang in Abbildung 7-26, S.190 dargestellt. Aus den angepassten Kurven ergab sich ein IC₅₀-Wert im Bereich von 107 bis 145 μM H₂O₂ (siehe Anhang Tabelle 7-6, S.190). Dieser Wert zeigte, dass bei den gewählten Bedingungen, bereits bei Konzentrationen ab 100 μM H₂O₂ eine Reduktion der sMMO-Aktivität um 50 % zu beobachten war. Eine solche Konzentration wurde auch innerhalb der Messung der H₂O₂-Bildung der sMMO im Nitrobenzol-Assay beobachtet (Abbildung 3-43, S.121). Die wahrscheinlichste Ursache für die Stagnation der Zielproduktbildung im Nitrobenzol-Assay war somit die H₂O₂-Bildung der sMMO und die dadurch resultierende Inhibition des Enzyms.

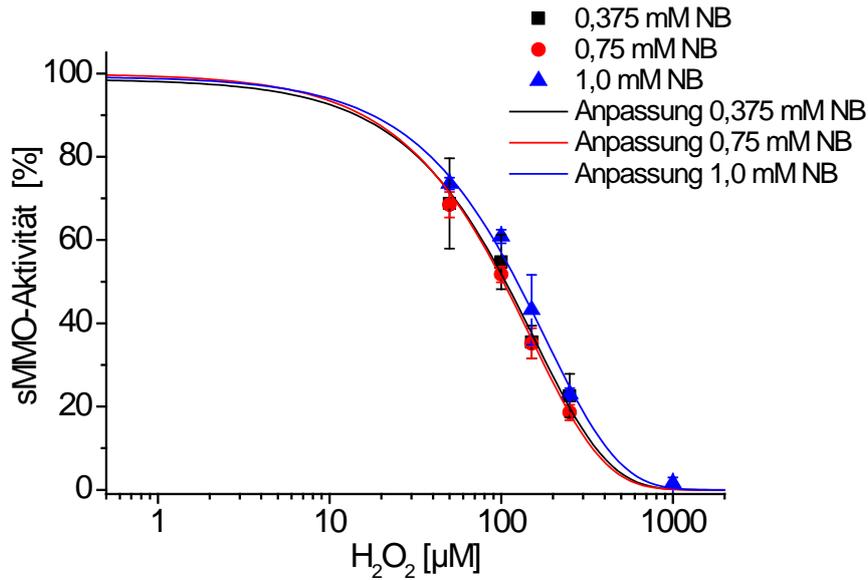


Abbildung 3-45: Dosis-Wirkungs-Diagramm der sMMO-Aktivität in Abhängigkeit der zugesetzten H₂O₂-Konzentration bei verschiedenen Nitrobenzolkonzentrationen. Halblogarithmische Darstellung der Daten aus Abbildung 3-44 mit Interpolation der Daten über Formel 3-2

H₂O₂ kann als Oxidationsmittel mit Proteinen reagieren und diese ggf. inaktivieren. Deshalb erfolgten weitere Untersuchungen zum Einfluss der H₂O₂-Konzentration auf die Stabilität der sMMO. Das Enzym wurde mit verschiedenen H₂O₂-Konzentrationen über einen definierten Zeitraum inkubiert und anschließend die sMMO-Aktivität des Enzyms im Nitrobenzol-Assay bestimmt. Das Ergebnis dieses Experimentes ist in Abbildung 3-46 dargestellt.

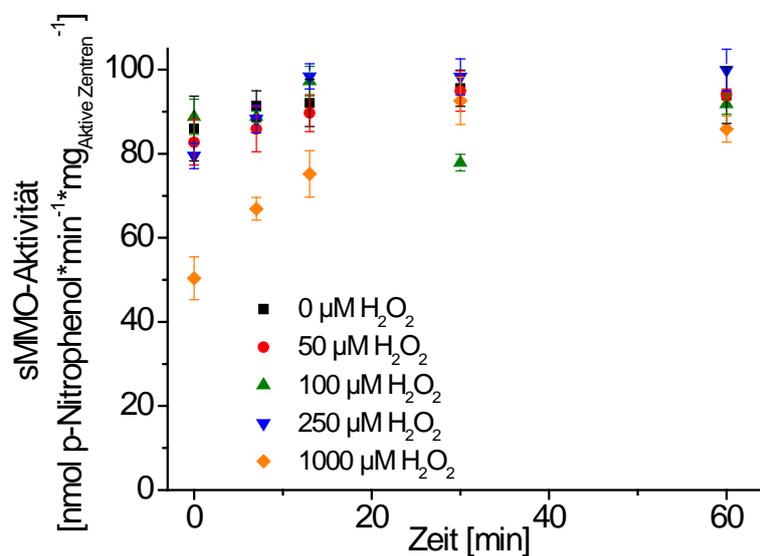


Abbildung 3-46: Spezifische Aktivität der sMMO gemessen im Nitrobenzol-Assay nach Inkubation mit unterschiedlichen H₂O₂-Konzentrationen. Angegeben sind Mittelwerte aus n= drei Messungen. Folgende Bedingungen wurden eingestellt: Inkubation bei angegebener H₂O₂-Konzentration mit 10 μM sMMO (10:10:10) in 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat pH 7,5 bei 30 °C. Aktivitätsassay: MMOH_{aktive Zentren}: rek. MMOB: MMOR = 1:1:1 μM; 1 mM Nitrobenzol; 1 mM NADH; 30 °C; Messpuffer 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat pH 7,5.

Die sMMO-Aktivität bei Inkubation mit 0; 50; 100; und 250 μM H₂O₂ veränderte sich über die Inkubationsdauer von 0 bis 60 Minuten nur geringfügig. Innerhalb der ersten 15 Minuten

stieg die spezifische Enzymaktivität bei den genannten H_2O_2 -Konzentrationen von 80 bis 85 auf 90 bis 100 $\text{mU} \cdot \text{mg}_{\text{Aktive Zentren}}^{-1} \cdot \text{an}$. Nach 30 bzw. 60 Minuten Inkubation wurden für alle H_2O_2 -Konzentrationen (0 bis $1.000 \mu\text{M}$) eine vergleichbare sMMO-Aktivitäten (90 bis $100 \text{mU} \cdot \text{mg}_{\text{Aktive Zentren}}^{-1}$) gemessen. Der größte Einfluss auf die sMMO-Aktivität wurde in den ersten 15 Minuten bei der Inkubation mit $1.000 \mu\text{M}$ H_2O_2 detektiert. Die gemessene Aktivität direkt nach Inkubationsstart, bei einer Totzeit von 30 bis 60 Sekunden, lag bei 58 % der Aktivität ohne H_2O_2 -Zusatz. Nach sieben bzw. 13 Minuten stieg die gemessene Aktivität auf 78 bzw. 87 % an. Ein signifikanter Einfluss der H_2O_2 -Konzentration auf die sMMO-Aktivität konnte nur bei $1.000 \mu\text{M}$ H_2O_2 in den ersten 15 Minuten Inkubationszeit detektiert werden. Das Ergebnis zeigte eine Verringerung des inhibitorischen Einflusses von H_2O_2 über die Inkubationszeit. Die Ursache hierfür war die Reduktion der H_2O_2 -Konzentration durch die Peroxidase-Aktivität der MMOH. Infolge der Reduktion von H_2O_2 in den Ansätzen mit geringer H_2O_2 -Konzentration (50 bis $250 \mu\text{M}$) wurde kein Effekt auf die sMMO-Aktivität beobachtet. Im Ansatz mit $1.000 \mu\text{M}$ H_2O_2 war trotz der Reduktion der H_2O_2 -Konzentration nach null bis zehn Minuten Inkubation eine Konzentration von H_2O_2 im Ansatz, die für eine nachweisbare Reduktion der sMMO-Aktivität ausreichte. Um die genaue Reduktion der H_2O_2 -Konzentration im Ansatz mit der sMMO zu bestimmen, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Dabei wurde die sMMO mit verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen inkubiert und die tatsächliche H_2O_2 -Konzentration zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen (siehe Kapitel 2.4.6, S.45). Nach 60 bzw. 90 Minuten wurde die sMMO-Aktivität der inkubierten Proben im Nitrobenzol-Assay bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3-47 dargestellt.

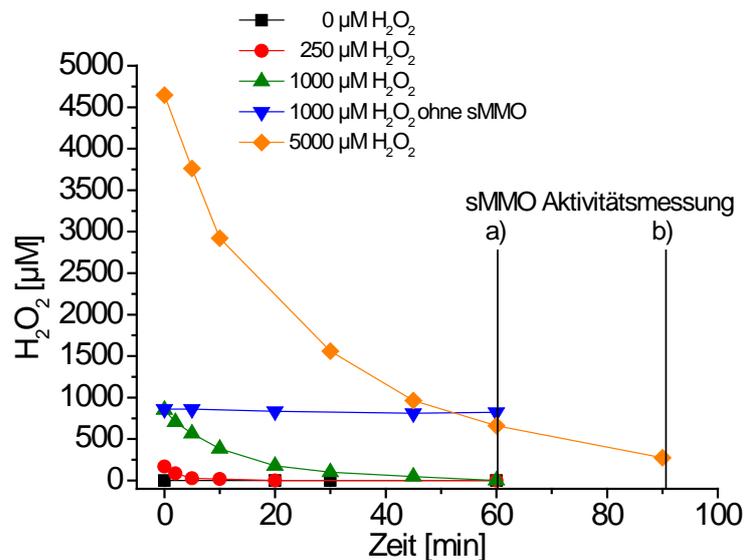


Abbildung 3-47: H_2O_2 -Konzentration bei Inkubation mit sMMO. Angegeben sind Messwerte mit $n =$ eine Messungen. Folgende Bedingungen wurden eingestellt: Inkubation bei angegebener H_2O_2 -Konzentration mit $10 \mu\text{M}$ sMMO (10:10:10) in 50mM Tris- 25mM MES- 25mM Natriumacetat pH 7,5 bei 30°C . Aktivitätsassay nach 60 bzw. 90 Minuten mit: $\text{MMOH}_{\text{aktive Zentren}}$: rek. MMOB : $\text{MMOR} = 1:1:1$; 1mM Nitrobenzol; 1mM NADH; 30°C ; Messpuffer 50mM Tris- 25mM MES- 25mM Natriumacetat pH 7,5. a) nach 60 Minuten Messung der Aktivität für Proben 0; 250; $1.000 \mu\text{M}$ H_2O_2 , b) nach 90 Minuten Messung der sMMO-Aktivität mit dem $5.000 \mu\text{M}$ H_2O_2 Ansatz.

Nach 60 Minuten konnte kein Aktivitätsunterschied zwischen der mit H_2O_2 inkubierten sMMO und der ohne H_2O_2 inkubierten sMMO gemessen werden (91 bis $94 \text{mU} \cdot \text{mg}_{\text{Aktive Zentren}}^{-1}$). Zu diesem Zeitpunkt war kein H_2O_2 in den Ansätzen ($250 \mu\text{M}$ und $1.000 \mu\text{M}$ H_2O_2) mehr vorhanden. Bei Messung der sMMO-Aktivität nach 90 Minuten im Ansatz mit $5.000 \mu\text{M}$ H_2O_2 wurde

eine um 35 % geringere sMMO-Aktivität ($64 \text{ mU} \cdot \text{mg}_{\text{Aktive Zentren}}^{-1}$) gemessen. Die Ursache dafür war die Inhibition der sMMO aufgrund der Restkonzentration an H_2O_2 im Ansatz ($260 \mu\text{M}$). Die Reduktion der H_2O_2 -Konzentration aus Abbildung 3-47 deutete auf eine enzymatische Abbaureaktion erster Ordnung hin. Weitere Experimente diesbezüglich erfolgten nicht.

Die Experimente zur Bildung von H_2O_2 durch die sMMO zeigten, dass H_2O_2 besonders durch die MMOR bis zu einer Konzentration von $300 \mu\text{M}$ gebildet wurde. Diese Größenordnung entsprach bereits veröffentlichten Literaturdaten, bei denen $193 \mu\text{M}$ H_2O_2 durch die MMOR gebildet wurden [Zhang und Lipscomb, 2006]. Mit Zusatz an MMOH bzw. MMOB und MMOH wurden in eigenen Versuchen Konzentrationen bis $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 gemessen. Dies könnte durch die Peroxidase-Aktivität der Hydroxylase verursacht worden sein. In der Literatur wird MMOH als eine effiziente Peroxidase beschrieben [Zhang und Lipscomb, 2006]. Dabei reagiert H_2O_2 mit der MMOH zu H_2O . Dies konnte auch in den Messungen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, bei denen in 90 Minuten 5 mM H_2O_2 durch $10 \mu\text{M}$ sMMO um 90 % reduziert wurden. Die Bildung von H_2O_2 durch die Oxidase-Aktivität der MMOR und die Peroxidase-Aktivität der MMOH hatten einen negativen Einfluss auf die Zielproduktbildung im Nitrobenzol-Assay. Infolge der Entkopplung der *p*-Nitrophenolbildung vom NADH-Verbrauch wurde durch die MMOR im Messansatz H_2O_2 gebildet. H_2O_2 stand in der Folge in Konkurrenz mit dem eigentlichen Substrat Nitrobenzol, was vermutlich die in Kapitel 3.5.1.1, S.116 beschriebene Stagnation der Zielproduktbildung verursachte. Obgleich sowohl die Bildung von H_2O_2 , als auch die Peroxidase-Aktivität der sMMO beschreiben waren, wurde ein nachweislich inhibierender Einfluss von H_2O_2 auf die sMMO-Aktivität bisher nicht beschrieben. Eine Reduktion der sMMO-Aktivität von 50 % wurde bei einer H_2O_2 -Konzentration von 107 bis $145 \mu\text{M}$ H_2O_2 gemessen (IC_{50} -Wert). Um die unvorteilhafte H_2O_2 -Bildung durch die sMMO zu reduzieren, sollte Katalase der Reaktion zugesetzt werden. Damit sollte das gebildete H_2O_2 reduziert werden, um so eine Inhibition der sMMO-Zielproduktbildung im Nitrobenzol-Assay zu vermeiden.

3.5.2.3 Stabilität der sMMO gegenüber HCHO

Ein Produkt der sMMO-Reaktion im CH_4 -Assay ist HCHO. Es entsteht durch die Reaktion von CH_3OH mit der sMMO. Dies wurde bereits in der Literatur und in eigenen Messungen nachgewiesen (Kapitel 3.4.4, S.109) [Colby *et al.*, 1977]. HCHO kann Proteine quervernetzen [Ouimet *et al.*, 2016]. Eine mögliche Inaktivierung der sMMO könnte die Folge der Quervernetzung sein. Um dies zu untersuchen, erfolgten verschiedenen Messungen bezüglich des Einflusses von HCHO auf die sMMO-Aktivität im Nitrobenzol-Assay (Kapitel 2.4.4.2.11, S.42 und Kapitel 2.4.5, S.45). Dabei wurde eine definierte HCHO-Konzentration direkt dem Reaktionsansatz zugesetzt und anschließend die sMMO-Aktivität bestimmt. Die eingesetzten HCHO-Konzentrationen entsprachen den Konzentrationen die im CH_4 -Assay in Kapitel 3.4.4 S.109 gemessen wurden. Ein Einfluss der HCHO-Konzentration auf die sMMO-Aktivität wurde dabei nicht beobachtet (siehe Anhang Tabelle 7-7, S.190). Messungen um etwaige HCHO-Reaktionen mit Tris im Messpuffer auszuschließen wurden bereits erwähnt (siehe Kapitel 3.4.4, S.109, sowie Anhang Abbildung 7-22, S.188 und Abbildung 7-23, S.188). Es wurden weitere Stabilitätsmessungen mit HCHO durchgeführt, bei denen die sMMO über einen bestimmten Zeitraum mit einer definierten HCHO-Konzentration inkubiert wurde. Nach der Inkubationszeit erfolgte jeweils die Messung der sMMO-Aktivität im Nitrobenzol-Assay. Auch nach 270 Minuten Inkubation wurden vergleichbare sMMO-Aktivitäten ohne bzw. mit $960 \mu\text{M}$ HCHO gemessen (siehe Anhang Abbildung 7-27, S.191). Ein Einfluss der HCHO-

Konzentration auf die sMMO-Aktivität bis 0,96 mM HCHO konnte demnach nicht nachgewiesen werden. Dies gilt auch für die im CH₄-Assay gemessenen HCHO-Konzentrationen im Bereich von 180 bis 250 µM. Bezüglich einer Stabilität der gereinigten sMMO gegenüber HCHO sind in der Literatur bisher keine Daten veröffentlicht.

3.5.3 Einsatz von Katalase im sMMO-Aktivitätsassay

Bei vielen Monooxygenasen (z.B. Cytochrom P-450) wurde die Entkopplung des Elektronentransfers von der Zielproduktbildung beobachtet. Ein Produkt dieser Entkopplung war u.a. H₂O₂. In den bisherigen Experimenten zur Untersuchung der sMMO im Nitrobenzol-Assay wurde sowohl die Entkopplung des Elektronentransfers von der *p*-Nitrophenolbildung, als auch die Bildung von H₂O₂ im Reaktionsansatz beobachtet (siehe Kapitel 3.5.2.2, S.120). Die Bildung von H₂O₂ war vermutlich die Ursache für die Stagnation der *p*-Nitrophenolbildung der sMMO nach wenigen Minuten (siehe Kapitel 3.5.2.2.2, S.122). Um die Reaktivität der sMMO bzw. die erreichten Umsätze zu erhöhen, sollte das toxische Nebenprodukt mittels Katalase aus dem Reaktionsansatz entfernt werden. Vergleichbare Versuche mit dem Zusatz an Katalase wurden für die lösliche Butan-Monooxygenase (sBMO) aus *Pseudomonas butanovora* bereits beschrieben [Dubbels *et al.*, 2007]. Dadurch konnte eine Steigerung des Umsatzes der sBMO-Reaktion erreicht werden. Die Aktivität der Katalase bei den gewählten Messbedingungen wurde überprüft und lag im Bereich der Herstellerangabe bei 3.200 U*mg⁻¹ (2.000 bis 5.000 U*mg⁻¹). Progresskurven der *p*-Nitrophenolbildung durch die sMMO im Nitrobenzol-Assay mit Zusatz an Katalase sind in Abbildung 3-48 dargestellt. Es konnten eine Steigerung der *p*-Nitrophenolbildung um >100 % nach Zusatz an 160 U*mL⁻¹ Katalase gemessen werden. Zusätzlich konnte die Zeitspanne der Zielproduktbildung von einer auf zwei Minuten verdoppelt werden. Allerdings wurde auch nach Zusatz an Katalase das Stagnieren der *p*-Nitrophenolbildung beobachtet. Auch bei weiteren Erhöhungen der Katalase-Aktivität wurde das Stagnieren der *p*-Nitrophenolbildung beobachtet.

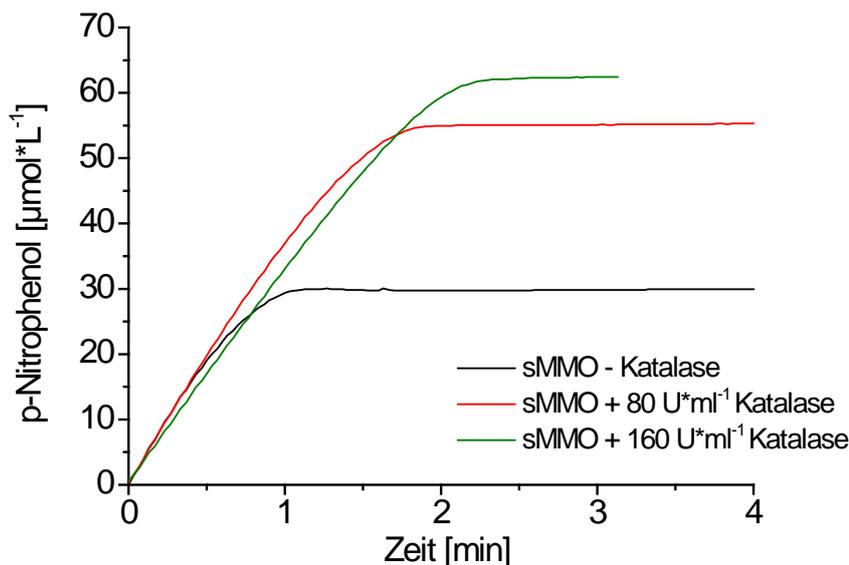


Abbildung 3-48: Progresskurven der *p*-Nitrophenolbildung im Nitrobenzolassay durch die sMMO mit und ohne Zusatz an Katalase. Folgende Bedingungen wurden eingestellt: MMOH_{aktive} Zentrum: rek. MMOB: MMOR = 2:2:2 µM; Katalase 80 bis 160 U*mL⁻¹ (25 bis 50 µg*mL⁻¹); 5 mM Nitrobenzol; 1 mM NADH; Temperatur 30 °C; Messpuffer 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat pH 7,5.

Im Vergleich zum artifiziellen Substrat Nitrobenzol wurde für das natürliche Substrat CH₄ eine geringere Entkopplung des Elektronentransfers beobachtet (siehe Kapitel 3.4.4, S.109). Im diskontinuierlichen Test wurde nach zehn Minuten eine Kopplung des NADH-Verbrauches an die Produktbildung von 88 % gemessen. Um zu testen ob auch für CH₄ eine Steigerung des Umsatzes bzw. der Kopplungseffizienz möglich war, wurde Katalase auch dem Reaktionsansatz des CH₄-Assay zugesetzt. Hierfür wurden statt 160 U*mL⁻¹ 640 U*mL⁻¹ Katalase eingesetzt, da diese Erhöhung im Nitrobenzol-Assay zu einer weiteren Steigerung (12 %) der *p*-Nitrophenolbildung führte. Die gemessenen Aktivitäten und Umsätze während der sMMO-Reaktion mit Nitrobenzol oder CH₄ als Substrat sind in Tabelle 3-24 zusammengefasst (CH₃OH und HCHO-Konzentrationen im Anhang in Tabelle 7-8, S.191). Auch im CH₄-Assay konnte eine Steigerung der Produktkonzentrationen nach Zusatz an Katalase gemessen werden. Nach zehn Minuten wurde insgesamt eine Erhöhung um 16 % detektiert. Eine weitere Erhöhung, wie sie mit Nitrobenzol als Substrat gemessen wurde, war in diesem Ansatz nicht möglich, da das limitierende Substrat NADH aufgebraucht war (Tabelle 3-24). Die sMMO-Aktivität wurde durch Zusatz an Katalase im Nitrobenzol-Assay nicht beeinflusst, im CH₄-Assay konnte eine Steigerung der Aktivität um 45 % gemessen werden. Die Ursache hierfür waren die unterschiedlichen Messmethoden bzw. die unterschiedliche Berechnung der sMMO-Aktivität. Für den Nitrobenzol-Assay erfolgte die kontinuierliche Messung im spektroskopischen Test und bei CH₄ als Substrat wurde diskontinuierlich die Produktkonzentration nach dem Abstoppen der Reaktion gemessen. Die Aktivität für die CH₃OH-Bildung beruht auf der Endkonzentration der Messung. Diese war für den Zusatz an Katalase höher und dementsprechend auch die berechnete sMMO-Aktivität. Eine Aussage über den genauen zeitlichen Verlauf der CH₃OH-Bildung und somit der sMMO-Aktivität, nach Zusatz an Katalase kann nicht getätigt werden. Um diesen näher zu analysieren wurde im Verlauf dieser Arbeit eine kontinuierliche Messung der CH₃OH-Konzentration eingesetzt. Die Ergebnisse dazu sind in Kapitel 3.6, S.136 aufgelistet.

Tabelle 3-24: Spezifische sMMO-Aktivitäten und Umsätze in Nitrobenzol bzw. CH₄-Aktivitätsmessungen mit und ohne Zusatz an Katalase. Angegeben sind die Daten aus Abbildung 3-48. Aktivitätsmessung Nitrobenzol: Startanstieg der Absorption bei 420 nm von 0 bis einer Minute; CH₄: Endpunktbestimmung nach zehn Minuten Reaktion. Umsatzberechnung: NADH 100 % = 0,5 µmol (NB); 1 µmol(CH₄); O₂ 100 % = 0,12 µmol (NB); 53,9 µmol(CH₄); Nitrobenzol 100 % = 25 µmol; CH₄ 100 % = 63,5 µmol. Gebildet wurden 15,5 nmol ohne bzw. 31 nmol *p*-Nitrophenol mit Katalase (CH₃OH und HCHO-Konzentrationen aus Tabelle 7-8, S.191).

Substrat	Nitrobenzol			
	Aktivität [mU*mg Aktive Zentren ⁻¹]	Umsatz Nitrobenzol [%]	Umsatz O ₂ [%]	Umsatz NADH [%]
Messung				
sMMO	108 ± 7	0,62	7,7	3,1
sMMO + Katalase	112 ± 8	1,24	15,5	6,2

Substrat	CH ₄			
	Aktivität [mU*mg Aktive Zentren ⁻¹]	Umsatz CH ₃ OH [%]	Umsatz O ₂ [%]	Umsatz NADH [%]
Messung				
sMMO	171 ± 35	1,38	1,62	88
sMMO + Katalase	248 ± 16	1,63	1,92	103

Der Zusatz von Katalase erhöhte den Umsatz in der sMMO-Reaktion sowohl mit dem artifiziellem Substrat Nitrobenzol, als auch mit dem natürlichen sMMO-Substrat CH₄. Für die weiteren Experimente sollte der Einsatz von Katalase im sMMO-Assay mit der NADH-Regeneration durch die GDH (in Kapitel 3.5.2.1, S.119) kombiniert werden. Damit sollte die Limitierung der Produktbildung durch die NADH-Konzentration, wie sie in Tabelle 3-24 für den Zusatz an Katalase im CH₄-Assay beobachtet wurde, vermieden werden.

3.5.4 sMMO Reaktion mit Katalase Zusatz und NADH-Regeneration durch GDH

Der erfolgreiche Einsatz der GDH zur Cofaktor-Regeneration im sMMO-Aktivitätstest mit Nitrobenzol als Substrat wurde bereits in Kapitel 3.5.2.1, S.119 beschrieben. Es konnten vergleichbare Produktkonzentrationen mit der integrierten NADH-Regeneration gezeigt werden. Im folgenden Kapitel sollte neben der Cofaktor-Regeneration auch der umsatzsteigernde Effekt der Katalase bei der sMMO-Reaktion eingesetzt werden. Die Versuche dazu erfolgten sowohl mit dem artifiziellem Substrat Nitrobenzol, als auch mit dem natürlichen Substrat CH₄ (2.4.4.5, S.44). Die Ergebnisse dieser Experimente sind mit den bisherigen Daten zum Einsatz von Katalase im sMMO-Assay in Tabelle 3-25 zusammengefasst.

Tabelle 3-25: Gebildete Produkt-, eingesetzte Substratmengen sowie daraus berechnete Umsätze bei sMMO-Reaktionen mit Zusätzen an Katalase bzw. GDH bei Verwendung von Nitrobenzol bzw. CH₄ als Substrat. Integriert sind auch die Daten aus Tabelle 3-24. Angegeben sind Mittelwerte aus n= zwei Messungen. Folgende Bedingungen wurden eingestellt: MMOH_{aktive Zentren}: rek.MMOB: MMOR Nitrobenzol= 2:2:2 µM; CH₄= 3:3:3 µM ; GDH 75 mU*mL⁻¹; Katalase 160 U*mL⁻¹ bei Nitrobenzol; 640 U*mL⁻¹ bei CH₄; Flüssigvolumen 0,5 mL bei Nitrobenzol; 1 mL Flüssigvolumen und 8 mL Gasvolumen bei CH₄ in gasdichten Vials mit 20 % CH₄; 1 mM NADH; bzw. bei Cofaktor-Regeneration mit GDH 1 mM NAD⁺ + 50 mM Glucose; Temperatur 30 °C; Messpuffer 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat pH 7,5.

Substrat	Nitrobenzol						
	Produkt p-Nitrophenol [nmol]	Substrat Nitrobenzol [nmol]	Umsatz Nitrobenzol [%]	Substrat O ₂ [nmol]	Umsatz O ₂ [%]	Substrat NADH [nmol]	Umsatz NADH [%]
sMMO	15,5	2500	0,62	120	13,5	500	3,1
sMMO+ Katalase	31,0	2500	1,24	120	27,0	500	6,2
sMMO + Katalase + GDH	27,5	2500	1,10	120	24,0	500	5,5

Substrat	CH ₄						
	Produkt CH ₃ OH +HCHO [µmol]	Substrat CH ₄ [µmol]	Umsatz CH ₄ [%]	Substrat O ₂ [µmol]	Umsatz O ₂ [%]	Substrat NADH [µmol]	Umsatz NADH [%]
sMMO	0,88	63,5	1,38	53,9	1,62	1,0	88
sMMO+ Katalase	1,03	63,5	1,63	53,9	1,91	1,0	103
sMMO+ Katalase + GDH	1,15	63,5	1,81	53,9	2,13	1,0	115 (2,3) ¹⁾

1) NADH-Umsatz 115 % bezogen auf NAD⁺-Menge (1 µmol); 2,3 % = Umsatz bezogen auf Glucose (50 µmol)

Nach Zusatz an Katalase und GDH zur Cofaktor-Regeneration im sMMO-Reaktionsansatz sanken die sMMO-Aktivität, der Nitrobenzol- und der NADH-Umsatz von 112 auf 104 $\text{mU} \cdot \text{mg}_{\text{Aktive Zentren}}^{-1}$, 1,24 auf 1,10 % und 6,2 auf 5,5 %. Im CH_4 -Assay steigerte sich die sMMO-Aktivität mit Katalase und Cofaktor-Regeneration (228 auf 248 $\text{mU} \cdot \text{mg}_{\text{Aktive Zentren}}^{-1}$), ebenso wie der CH_4 -Umsatz (1,63 auf 1,83 % nach zehn Minuten). Der Umsatz bezogen auf NAD^+ lag bei 115 % bzw. bezogen auf Glucose bei 2,3 %. Das bedeutete, dass infolge der NADH-Regeneration die komplette NAD^+ -Menge mehr als einmal von der GDH umgewandelt und von der sMMO zur Zielproduktbildung genutzt wurde. Die Kombination aus sMMO, Katalase und GDH wurde erfolgreich sowohl im Nitrobenzol-, als auch im CH_4 -Assay getestet. Das mögliche Reaktionsschema der einzelnen Reaktionen, die von den drei Enzymen in einem Reaktionsansatz katalysiert werden ist in Abbildung 3-49 dargestellt. Dabei hat der Einsatz der Katalase, infolge der Reduktion des toxischen Nebenproduktes H_2O_2 , den positiven Effekt, dass durch diese Reaktion O_2 freigesetzt wird, welches zur Zielproduktbildung durch die sMMO genutzt werden kann. Die Daten aus Tabelle 3-25 zeigen, dass die Substrate der sMMO-Reaktion einen großen Einfluss auf den Umsatz der Reaktion bzw. die Kopplung des Elektronentransfers an die Zielproduktbildung haben. Die Kopplung des Elektronentransfers an die Zielproduktbildung lag für das natürliche Substrat bereits ohne Zusatz an Katalase bei einem Wert von 88 %.

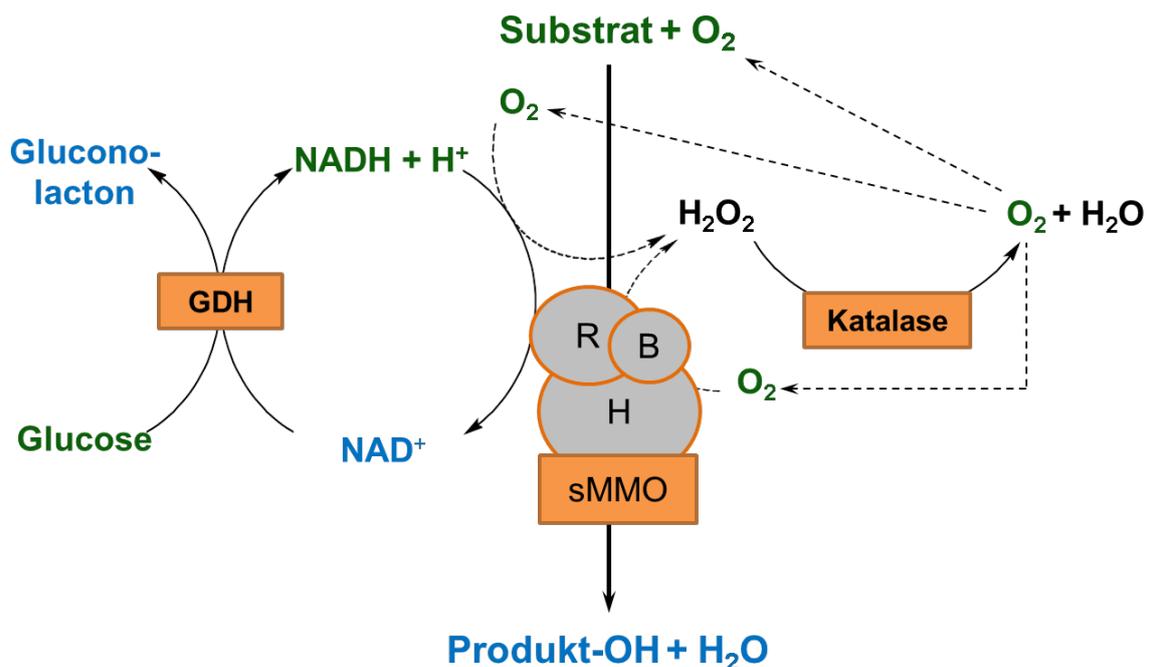


Abbildung 3-49: Reaktionsschema der potentiellen sMMO-Reaktionen mit Cofaktor-Regeneration durch die Glucose 1-Dehydrogenase (GDH) und Zusatz an Katalase zur H_2O_2 -Reduktion. (Darstellung der Endprodukte der Reaktionen in blau und der Substrate in grün)

Die Bildung des toxischen Nebenproduktes H_2O_2 fand im CH_4 -Assay nicht bzw. nur in geringem Maße statt. Eine H_2O_2 -Bildung war dennoch wahrscheinlich, da infolge des Katalase-Zusatzes eine Erhöhung des NADH-Umsatzes auf 100 % gemessen wurde. Die Steigerung des Umsatzes im CH_4 -Assay nach der untersuchten Reaktionszeit von zehn Minuten war infolge des Zusatzes an Katalase gering. Neben dem Einfluss der Katalase auf kürzere sMMO-Reaktionen (< zehn Minuten) sollte im Rahmen dieser Arbeit auch der Einfluss der Katalase auf Langzeitreaktionen (> 1 h) der sMMO untersucht werden. Dies wird in Kapitel 3.6, S.136 beschrieben.

Im Gegensatz zum Verhalten der sMMO mit CH₄ als Substrat wurde beim Zusatz von Katalase zum Nitrobenzol-Assay eine Verdopplung der Produktbildung gemessen. Dies war vermutlich auf dem stärkeren Einfluss der H₂O₂-Bildung beim artifiziellen Substrat Nitrobenzol zurückzuführen. Dadurch konnte bei Zusatz an Katalase eine geringere Entkopplung des NADH-Verbrauches von der *p*-Nitrophenolbildung erreicht werden. Die Stagnation der Produktbildung im Nitrobenzol-Assay nach ein bis zwei Minuten war aufgrund des inhibierenden Einflusses von H₂O₂ auf die sMMO Reaktion zu erklären (siehe 3.5.2.2.2, S.122). Mit Katalase-Zusatz konnte die Reaktionszeit auf zwei bis drei Minuten verlängert werden. Eine Stagnation wurde auch in den Ansätzen mit Katalase beobachtet. Eine genaue Ursache hierfür wurde nicht bestimmt. Die beschriebene Substratabhängigkeit des Umsatzes bzw. der Koppelungseffizienz der sMMO können durch den Reaktionszyklus des Enzyms erklärt werden, da der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der sMMO-Reaktion die Aktivierung des Substrates bzw. das Freisetzen des Produktes ist [Tinberg und Lippard, 2010]. Die unterschiedlichen Größe und Bindungsstärke der jeweiligen CH-Bindung bei den Substraten Nitrobenzol bzw. CH₄ führen somit wahrscheinlich zu den beobachteten unterschiedlichen Reaktionsverhalten bei der sMMO-Reaktion.

3.5.5 Zusammenfassung und Diskussion der Untersuchungen zur Umsatzsteigerung der sMMO

Im Nitrobenzol-Assay wurde bei Messung der sMMO-Aktivität eine Stagnation der *p*-Nitrophenolbildung in Abhängigkeit der Nitrobenzolkonzentration beobachtet. Diese begann bei 5 mM Nitrobenzol nach zwei Minuten Reaktionszeit. Als Ursache für dieses Verhalten konnten die Produktinhibition durch *p*-Nitrophenol, *m*-Nitrophenol oder die Limitierung durch Substrate wie NADH, O₂, Nitrobenzol ausgeschlossen werden. Ebenso konnte eine Inaktivierung der sMMO nach wiederholtem Nachweis der Enzymaktivität als Fehlerursache eliminiert werden (Kapitel 3.5.1.2.1, S.119). Eine weitere Ursache für das Stoppen der Zielproduktbildung war die Produktion von potentiellen nicht genannten Reaktionsprodukten durch die sMMO. Dies könnte auch die Ursache für die schnellere Stagnation bei höheren Nitrobenzolkonzentrationen gewesen sein. Aufgrund der höheren sMMO-Aktivität (Tabelle 3-23, S.118) bei höheren Substratkonzentrationen könnte auch die Nebenproduktbildung verstärkt worden sein. Neben der potentiellen Nebenproduktbildung könnte auch die Bildung von NAD⁺ für den negativen Einfluss auf die Zielproduktbildung verantwortlich gewesen sein. Dass NAD⁺ inhibierend auf die sMMO-Reaktion wirkt wurde bereits in verschiedenen Veröffentlichungen gezeigt. Für *M. capsulatus* Bath wurde im Propen Assay für NAD⁺ eine Inhibitionskonstante (K_i-Werte) von 2,2 bis 9,7 mM bestimmt [Green und Dalton, 1986]. Weiterhin wurde für die oxidierte MMOR aus *M. capsulatus* Bath eine Bindungskonstante (K_D-Wert) für NAD⁺ von 5 μM gemessen. Im Vergleich dazu lag der gemessene K_D-Wert für NADH mit 3,8 μM nur unwesentlich niedriger [Kopp *et al.*, 2001]. Eine Inhibition der Elektronenübertragung durch Bindung von NAD⁺ an MMOR_{OX} wurde in der Veröffentlichung postuliert. Auch in eigenen Experimenten konnte die inhibierende Wirkung von NAD⁺ auf die sMMO-Aktivität gezeigt werden (Reduktion der Aktivität um 55 % nach zehn Minuten Inkubation mit 1 mM NAD⁺). Für die sMMO sind in der Literatur nur Resultate bei denen sMMO-haltiges Rohextrakt in Kombination mit einer Cofaktor-Regeneration verwendet wurde veröffentlicht. Bei der sMMO aus *Methylosinus* sp. CRL 31 wurde die Cofaktor-Regeneration durch eine sekundäre Alkoholdehydrogenase aus *Pseudomonas* sp. ATCC 21439 mit 2-Propanol als Cosubstrat realisiert [Hou *et al.*, 1982]. In Aktivitätsmessungen im Propen-Assay wurden dabei im Vergleich

zur Reaktion mit NADH 5 bis 10 % geringere Propylenoxid-Bildungsraten gemessen. Eine Alkoholdehydrogenase aus *Pichia sp.* mit 2-Butanol als Cosubstrat wurde ebenfalls zur Cofaktor-Regeneration der sMMO aus *Methylobacterium sp.* CRL-26 verwendet [Patel *et al.*, 1982]. Bei Messungen mit Rohextrakt konnten, verglichen mit der Reaktion mit NADH, 2,4-fach höhere sMMO-Aktivitäten gemessen werden.

In Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals eine Cofaktor-Regeneration im Reaktionsansatz mit der gereinigten sMMO aus *M. trichosporium* OB3b durchgeführt. Zur NADH-Regeneration wurde im sMMO-Assay das Enzym Glucose 1-Dehydrogenase (GDH) eingesetzt (siehe Kapitel 1.1.3, S.16). Die Vorteile dieses Enzyms waren, die kommerziellen Verfügbarkeit, die ausreichende Funktionalität bei den optimalen sMMO-Bedingungen und kein negativer Einfluss der Substrate bzw. Produkte auf die sMMO-Reaktion. Neben der Reduktion der NAD⁺-Konzentration hatte der Einsatz der GDH den Vorteil, dass für einen späteren Prozess in größerem Maßstab durch Austausch von NADH zu NAD⁺ die Kosten für dieses Substrat um etwa Faktor 2,5 reduziert werden könnten. Weiterhin ist Cofaktor-Regeneration von Vorteil, um Reaktionen über einen längeren Zeitraum durchzuführen, wie sie im weiteren Verlauf der Arbeit geplant waren. Die GDH konnte erfolgreich zur Cofaktor-Regeneration im Nitrobenzol-Assay eingesetzt werden. Dabei wurde eine Reduktion der Aktivität und des Umsatzes von 17 bzw. 13 % gemessen. Die Reduktion der Aktivität bzw. des Umsatzes kann mit der Startphase der Reaktion begründet werden. Vor der Produktbildung der sMMO muss zunächst NAD⁺ in NADH umgewandelt werden. Insgesamt zeigten diese Daten, dass das System bestehend aus sMMO und GDH für weitere Messungen z.B. über einen längeren Zeitraum zur CH₃OH-Produktion eingesetzt werden kann. Die Stagnation der Zielproduktbildung im Nitrobenzol-Assay wurde jedoch auch bei Verwendung der GDH beobachtet. Die Ursache dafür war demzufolge nicht die NAD⁺-Bildung im Reaktionsansatz (siehe Abbildung 3-42, S.120).

Dass während der sMMO-Reaktion verschiedene Nebenreaktionen ablaufen können ist bereits bekannt. Keine Quellen beschreiben, dass die Nebenreaktionen der sMMO in einem Zusammenhang mit der Stagnation der Produktbildung stehen könnten. Als Nebenprodukt der sMMO-Reaktion kann neben H₂O auch H₂O₂ gebildet werden (siehe Abbildung 1-10, S.15) [Gassner und Lippard, 1999]. Die H₂O₂-Bildung wurde u.a. in sMMO-Reaktionen mit CH₄ als Substrat gezeigt [Zhang und Lipscomb, 2006]. Dabei wurde eine H₂O₂-Bildung durch 2 µM MMOR aus *M. trichosporium* OB3b ohne Zusatz an MMOH oder MMOB von bis zu 193 µM gemessen. In Gegenwart von MMOH bzw. MMOB (je 10 µM) reduzierte sich die H₂O₂-Konzentration auf 15 bis 24 µM [Zhang und Lipscomb, 2006]. In eigenen Experimenten wurde im Nitrobenzol-Assay ebenfalls eine H₂O₂-Bildung der sMMO bzw. der MMOR nachgewiesen (siehe Kapitel 3.5.2.2.1, S.121). Die höchste H₂O₂-Konzentration, von 300 µM, wurde ebenfalls im Ansatz nur mit MMOR (1 µM) gemessen. In Gegenwart der beiden anderen sMMO-Komponenten (je 1 µM) reduzierte sich die maximal gemessene H₂O₂-Konzentration auf 100 bis 150 µM. Die Unterschiede in der H₂O₂-Bildung zwischen den eigenen Daten und der Literatur sind auf die unterschiedlichen Messbedingungen zurückzuführen. In Literaturansätzen wurde mit einem Zusatz von 10 µM MMOB bzw. MMOH: 2 µM MMOR gearbeitet und in eigenen Experimenten, aufgrund des bereits beschriebenen optimalen Aktivität, mit einem Verhältnis von 1:1:1 µM (siehe Kapitel 3.4.2, S.107). Die unterschiedliche Konzentration von MMOH hat aufgrund der in der Literatur bereits gezeigten Peroxidase-Aktivität einen Einfluss auf die H₂O₂-Konzentration [Gassner und Lippard, 1999]. In eigenen Messungen wurden geringere MMOH-Konzentrationen eingesetzt und deshalb vermutlich höhere H₂O₂-Konzentrationen gemessen. Ein zusätzlicher Aspekt ist das verwen-

dete Substrat, da für die natürliche Reaktion der sMMO mit CH_4 eine höhere Elektronenkopplungseffizienz beobachtet wurde als für das artifizielle Substrat Nitrobenzol (88% für CH_4 zu 13 bis 25 % für Nitrobenzol). Um die Auswirkungen der H_2O_2 -Bildung der sMMO zu untersuchen, erfolgten Aktivitätsmessungen in Gegenwart von H_2O_2 . Die im Nitrobenzol-Assay erhobenen Daten mit H_2O_2 als potentiellm Inhibitor zeigten in der reziproken Auftragung einen gemischten Inhibitortyp (siehe Abbildung 3-44, S.123). Das bedeutet, dass H_2O_2 vermutlich sowohl als kompetitiv, nichtkompetitiv und als umkompetitiver Inhibitor wirken kann. Für eine genauere Betrachtung müsste für die Inhibition durch H_2O_2 ein spezielles Modell entwickelt werden. Dabei müsste neben der Inhibition auch die Bildung von H_2O_2 während der Reaktion berücksichtigt werden. Diese Auswertung bedürfte eines komplexen Gleichungssystems dessen Erstellen nicht Bestandteil der vorgelegten Arbeit war. Für die jeweilige H_2O_2 -Konzentration wurde jedoch die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50} -Wert) ermittelt. Diese lag im Bereich von 107 bis 145 μM H_2O_2 (siehe Anhang Tabelle 7-6, S.190). Damit konnte gezeigt werden, dass H_2O_2 in dem untersuchten Konzentrationsbereich einen signifikant inhibierenden Einfluss auf die sMMO-Aktivität hatte.

H_2O_2 kann für die sMMO in Abwesenheit von MMOR und NADH als Elektronendonator fungieren. Dieser sogenannte „Peroxid Shunt“, wurde bereits bei *M. trichosporium* OB3b und *M. capsulatus* Bath untersucht. [Froland *et al.*, 1992; Jiang *et al.*, 1993]. Die Peroxidase-Aktivität der sMMO konnte auch in eigenen Untersuchungen nachgewiesen werden. Dabei konnte eine Reduktion der Ausgangskonzentration von 5 mM H_2O_2 um 90 % durch 10 μM sMMO in 90 Minuten gezeigt werden (siehe Abbildung 3-47, S.125). Nach vollständigem Verbrauch der eingesetzten H_2O_2 -Menge konnte eine sMMO-Aktivität bestimmt werden, die vergleichbar mit der Ausgangsaktivität der sMMO ohne H_2O_2 -Zusatz war. Die Reaktion des Enzyms mit H_2O_2 hatte demzufolge keinen Einfluss auf die Stabilität der sMMO bzw. deren Aktivität, wenn H_2O_2 komplett verbraucht war. Um die Inhibition durch H_2O_2 zu verringern bzw. die Umsätze im Nitrobenzol-Assay zu steigern, wurde kommerziell erworbene Katalase dem sMMO-Reaktionsansatz zugegeben. Mit Zusatz an Katalase wurde im Nitrobenzol-Assay eine Steigerung des Umsatzes um 100 % und eine Verlängerung der Reaktionszeit von einer auf zwei Minuten gemessen (Abbildung 3-48, S.127). Im Gegensatz dazu wurde bei Verwendung der Katalase im diskontinuierlichen CH_4 -Assay nach zehn Minuten eine Steigerung des Umsatzes von 18 % gemessen (siehe Tabelle 3-24, S.128). Eine weitere Steigerung war nicht möglich, da NADH vollständig in Zielprodukt umgewandelt wurde. Das unterschiedliche Reaktionsverhalten der sMMO für beide genannten Substrate kann mit der Kopplung des Elektronentransfers bzw. dem Reaktionszyklus erklärt werden. Die Kopplung des Elektronentransfers für das natürliche Substrat der sMMO CH_4 ist sehr hoch. Dadurch wird bei der Reaktion kein NADH für die H_2O_2 -Bildung eingesetzt. Dadurch war die Steigerung der Kopplungseffizienz bzw. des Umsatzes im diskontinuierlichen CH_4 -Assay nach zehn Minuten im Vergleich zum Nitrobenzol-Assay geringer. Bei der sMMO ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion die Hydroxylierung des Produktes und deren Freisetzung [Tinberg und Lippard, 2010]. Für das artifizielle Substrat Nitrobenzol wird, im Vergleich zum natürlichen Substrat CH_4 , für diesen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt eine längere Zeit benötigt. Dies ist die wahrscheinliche Ursache für die im Nitrobenzol-Assay gemessene geringere Kopplungseffizienz des Elektronentransfers von NADH auf das Zielprodukt (13 bis 25 %). Eine Folge dessen ist die H_2O_2 -Bildung der MMOR bzw. der MMOH. Das gebildete H_2O_2 inhibiert vermutlich die sMMO-Aktivität bezüglich Nitrobenzol und daraus resultiert die mehrfach beschriebene Stagnation der *p*-Nitrophenolbildung. Der Zusatz von Katalase hatte aufgrund des sMMO-Mechanismus bei unterschiedlichen Substraten im Nitrobenzol-Assay

einen größeren Einfluss auf den Umsatz (Verdoppelung). Die hohe Entkopplung und die daraus resultierende H_2O_2 -Bildung konnten durch den Zusatz von Katalase verringert werden. Eine vergleichbare Substratabhängigkeit der Kopplung des Elektronentransfers wurde auch bei der sMMO aus *M. capsulatus* Bath für CH_4 und Propen beschrieben [Gassner und Lippard, 1999]. Trotz des Katalase-Zusatzes im Nitrobenzol-Assay, der zu einer Verlängerung der Reaktionszeit führte, wurde stets eine Stagnation der *p*-Nitrophenolbildung beobachtet. Anscheinend war die Zugabe der Katalase nicht ausreichend um die H_2O_2 -Inhibition der sMMO vollständig zu unterbinden. Auch bei weiterer Erhöhung der Katalase-Aktivität im Ansatz wurde die Stagnation beobachtet. Neben der Entkopplung des Elektronentransfers bzw. der inhibierenden Wirkung von H_2O_2 , könnte auch eine andere Ursache für die Verringerung der Zielproduktbildung verantwortlich sein. Möglich wäre die Bildung eines anderen Nebenproduktes, welches im Rahmen dieser Arbeit nicht identifiziert wurde. Dies sollte bei weiterführenden Arbeiten zu diesem Themenkomplex in Betracht gezogen werden.

Die Entkopplung des Elektronentransfers von der Zielproduktbildung wurde auch bei einigen anderen Monooxygenasen beobachtet z.B. Cytochrom P-450 CAM. [Kadkhodayan *et al.*, 1995]; Cytochrom P-450 3A4 [Denisov *et al.*, 2007]; 2-Hydroxybiphenyl-3-Monooxygenase (HbpA) [Meyer *et al.*, 2002] und der löslichen Butan-Monooxygenase (sBMO) [Dubbels *et al.*, 2007]. Eine Erhöhung des Umsatzes durch Zusatz an Katalase wurde jedoch bisher nur für die sBMO aus *Pseudomonas butanovora* dokumentiert. Dieses Enzym ist ähnlich der sMMO (Sequenzidentität bis zu 63 %, sowie vergleichbare Struktur) und kann ebenfalls aus CH_4 CH_3OH bilden ($K_M \text{CH}_4 = 1100 \mu\text{M}$; $k_{\text{cat}} = 1,3 \text{ s}^{-1}$ [Cooley *et al.*, 2009; Sluis *et al.*, 2002]). In Aktivitätsmessungen mit Ethen als Substrat wurde die H_2O_2 -Bildung nachgewiesen. Nach Zusatz an $4.000 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ Katalase konnte der Umsatz (bezogen auf NADH) von 32 % auf 82 % nach 11 Minuten erhöht werden. Ohne Katalase wurde zudem eine 40 bis 50 % geringere Elektronen-Kopplungseffizienz gemessen. Weiterhin wurde für die BMOH, analog zur MMOH, eine Peroxidase-Aktivität gezeigt. Die beschriebenen Ergebnisse waren vergleichbar zu den eigenen Daten, bezüglich des Einflusses der Katalase auf die sMMO im Nitrobenzol- bzw. CH_4 -Assay. Die Unterschiede in den exakten Umsatzsteigerungen lagen an der Variation der Reaktionsbedingungen. (CH_4 vs. Ethen; sMMO $H_{\text{aktive Zentren}}:\text{B}:\text{R} = 3:3:3 \mu\text{M}$ bzw. sBMO $H_{\text{aktive Zentren}}:\text{B}:\text{R} = 4:4:2 \mu\text{M}$; $640 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ vs. $4.000 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$; NADH 1 mM vs. 0,46 mM). Katalase als Reaktionszusatz zur gereinigten sMMO aus *M. capsulatus* Bath wurde auch von Astier und Kollegen eingesetzt [Astier *et al.*, 2003]. Dabei wurde die Bereitstellung der Elektronen über eine modifizierte Goldelektrode und nicht über NADH und die MMOR gewährleistet. Der Katalase-Zusatz erfolgte um das durch die MMOH gebildete H_2O_2 aus dem Reaktionsansatz zu entfernen. Durch Zugabe von MMOB konnte in diesen Messungen eine H_2O_2 -Bildung verhindert werden. MMOB diente in diesem Reaktionsaufbau als Regulator der H_2O_2 Bildung. Ohne vollständiges MMOB wurde keine Zielproduktbildung beobachtet. Die Bildung von CH_3OH als Reaktionsprodukt wurde nur im Ansatz mit MMOH, MMOB, der Elektronenzufuhr über die Elektrode und in Gegenwart von Katalase beobachtet. Als Ursache für die H_2O_2 -Bildung wurde eine „Über-Reduzierung“ oder „Über-Oxidation“ (Überschuss an O_2) der MMOH postuliert. [Astier *et al.*, 2003]. Die H_2O_2 -Bildung wurde von Astier und Kollegen in deren Reaktionsaufbau als toxisch bezüglich der sMMO-Aktivität bezeichnet. Dies konnte mit Hilfe der eigenen Daten widerlegt werden, da die H_2O_2 -Bildung tatsächlich zu einer Inhibition der sMMO-Aktivität führte.

Um den Umsatz weiter zu erhöhen wurde neben Katalase auch die NADH-Regeneration mittels GDH im Nitrobenzol- bzw. CH_4 -Assay eingesetzt. Dabei wurde im Nitrobenzol-Assay eine Reduktion des Umsatzes im Vergleich zum Ansatz mit sMMO und Katalase ohne GDH

von 1,24 auf 1,10 % (bezogen auf Nitrobenzol) gemessen. Im Gegensatz dazu konnte im CH₄-Assay eine Steigerung des Umsatzes um 11% gemessen werden (siehe Tabelle 3-25, S.129). Diese substratabhängigen Unterschiede bezüglich der Umsätze waren vermutlich auf die zuvor beschriebene Substratabhängigkeit der Elektronenkopplung, die Hydroxylierung und die Produktfreisetzung der sMMO zurückzuführen.

Während der sMMO-Messungen mit CH₄ als Substrat wurde neben dem Zielprodukt CH₃OH auch HCHO in einer Größenordnung von 200 bis 250 µM detektiert. Die HCHO-Bildung als Produkt der sMMO-Reaktion mit CH₃OH wurde bereits beschrieben [Colby *et al.*, 1977] (Abbildung 3-38, S.110). Da HCHO mit Proteinen reagieren und diese quervernetzen bzw. inaktivieren kann, wurde der Einfluss der HCHO-Konzentration, entsprechend der im CH₄-Assay gemessenen Konzentrationen, auf die sMMO-Aktivität untersucht. Etwaige HCHO-Interaktionen mit Puffersubstanzen (z.B. Tris) konnten in Voruntersuchungen ausgeschlossen werden (Abbildung 7-22, S.188 und Abbildung 7-23, S.188). Die HCHO-Konzentration hatte bis 960 µM keinen Einfluss auf die sMMO-Aktivität (Kapitel 3.5.2.3, S.126). Für die sMMO aus *Methylosinus trichosporium* OB3b wurden in der Literatur bisher keine Untersuchungen zum Einfluss von HCHO auf die Aktivität bzw. Stabilität des Enzyms diskutiert.

Nur in wenigen der bisher veröffentlichten Literaturstellen zur sMMO wurden die Umsätze des Enzyms für verschiedene Substrate dokumentiert. Bei der Messung der sMMO-Aktivität im Rohextrakt von *Methylococcus capsulatus* Bath wurde ein Umsatz von 1,5 % für CH₄ nach 12 Minuten Reaktion gemessen (eingesetzt CH₄ 134 µM, gebildet CH₃OH 2 µM) [Colby *et al.*, 1977]. Für andere Substrate (Ethan, Propan, Propen) wurden in dieser Veröffentlichung ebenfalls Umsätze von 1,0 bis 1,5 % nach 12 Minuten Reaktion gemessen. Vergleichbare Umsätze mit gereinigter sMMO aus *Methylosinus trichosporium* OB3b mit CH₄ als Substrat wurden im Rahmen dieser Arbeit beschrieben (Kapitel 3.4.4, S.109, Umsatz 1,4 bis 1,8 %). Die Mehrzahl der Veröffentlichungen nutzte Enzymassays mit einer Reaktionszeit unter 20 Minuten. Eine lange Reaktionszeit mit Maximierung der Umsätze wurde bisher nicht veröffentlicht und sollte im weiteren Verlauf dieser Arbeit untersucht werden. Die Stabilität des Enzyms für einen längeren Zeitraum, mit gleichzeitig hohen Umsätzen ist essentiell für eine mögliche technische Anwendung. In den eigenen Untersuchungen sollte das bisher entwickelte System, bestehend aus sMMO, Katalase zur Reduzierung der H₂O₂-Konzentration und GDH zur NADH-Regeneration, eingesetzt werden. In den bisherigen Messungen mit CH₄ als Substrat wurde ein diskontinuierlicher Testansatz verwendet. Die diskontinuierliche Messung hatte verschiedene Nachteile, wie der erhöhte Aufwand zur Ermittlung einer Produktbildungskurve über die Zeit. Zudem sind die Messungen mit einem größeren Verbrauch an Zielenzym verbunden und für Langzeitmessungen ungeeignet. In einem kontinuierlichen Enzymtest mit CH₄ als Substrat könnten die beschriebenen negativen Aspekte minimiert werden und Langzeitmessungen wären einfacher durchzuführen. Zudem wäre es möglich potentielle Limitierungen im Reaktionsansatz zu identifizieren und zu optimieren. Durch die Kooperation mit dem Fraunhofer IGB in Stuttgart konnte, das in Abbildung 3-49, S.130 beschriebene Reaktionsschema, bestehend aus sMMO, Katalase, und GDH im Rahmen kontinuierlicher Reaktormessungen mit CH₄ als Substrat getestet werden.

3.6 Untersuchung der sMMO-Aktivität im Enzymreaktortest mit CH₄ als Substrat

Die Basis der Untersuchungen zum *in vitro*-Einsatz der sMMO im kontinuierlichen Enzymreaktortest waren die Ergebnisse aus Kapitel 3.5. Diese Daten zeigten für den Zusatz von Katalase im sMMO-Aktivitätstest, vor allem mit Nitrobenzol als Substrat, eine Umsatzsteigerung. Für CH₄ als Substrat der sMMO-Reaktion war die Umsatzsteigerung nach Zusatz an Katalase zwar geringer, aber in diesen diskontinuierlichen Ansätzen wurde nur ein Messzeitraum von maximal zehn Minuten betrachtet. Eine Analyse der CH₃OH-Bildung über zehn Minuten hinaus erfolgte im diskontinuierlichen Ansatz zunächst nicht. Dies wurde mit Hilfe des hier beschriebenen Enzymreaktorsystems durchgeführt. Das in Abbildung 3-49, S.130 beschriebene Reaktionsschema bezüglich der potentiellen Reaktionen des Enzymsystems bestehend aus sMMO, Katalase und GDH, sollte im Enzymreaktor zur CH₃OH-Bildung getestet werden. Das Ziel dieser Untersuchungen war es, mit den genannten Enzymen eine möglichst lange und gleichzeitig hohe Bildung des Zielproduktes CH₃OH durch die sMMO zu gewährleisten.

In Kooperation mit dem Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik in Stuttgart (IGB), wurde ein dort entwickeltes Mess- und Analysesystem (FoxySpec®) eingesetzt [Stier, 2017]. Mit diesem Messsystem konnten kontinuierlich die CH₄- und CH₃OH-Konzentrationen in der Flüssigphase analysiert werden. Weiterhin konnten durch gezielte Begasung des Reaktionsraums die gewünschten Konzentrationen von CH₄ und O₂ eingestellt werden. Eine schematische Abbildung des für die folgenden Experimente genutzten Messaufbaus ist in Abbildung 3-50 dargestellt. Die Begasung des gesamten Reaktionsraums erfolgte zunächst mit Helium als Inertgas, um den Gasraum von allen sonstigen Gasen zu befreien. Gleichzeitig wurden dadurch auch die in der Flüssigphase gelösten Gase entfernt. Anschließend konnten durch gezielte Zugabe die gewünschten Konzentrationen von CH₄ bzw. O₂ eingestellt werden. Während der Begasung wurde zum Druckausgleich des Reaktionsraumes eine Kanüle als Verbindung zur Umgebung in den Reaktionsraum eingebracht. Während der Reaktion wurde diese entfernt und die Messungen erfolgten in einem abgeschlossenen Gasraum. Die Analyse der Flüssigphase erfolgte über ein Massenspektrometer mit Membraneinlass. Aus dem Reaktionsraum wurde während der Reaktion kontinuierlich Flüssigkeit mittels einer pulsationsarmen HPLC-Pumpe zur Membran der Analyseapparatur und zurück in den Reaktorraum geführt. Durch den Volumenstrom durch die Schläuche (Totvolumen 3 mL) ergab sich eine Totzeit der Messmethode von einer Minute. Deshalb wurde in einigen Messungen ein Sprung im Messsignal in der ersten Minute beobachtet. Durch ein Vakuum (0,14 bis 0,19 mbar) auf der Permeatseite der Membran wurde ein Dampfstrom aus der Flüssigphase abgezogen. Ein Hochvakuum ($5 \cdot 10^{-7}$ bis $5 \cdot 10^{-6}$ mbar) war über ein Handventil mit dem Vorvakuum verbunden. Über das Vorvakuum und das nachfolgende Hochvakuum wurde ein geringer Teil des Dampfstromes aus der Flüssigphase zur Analyse in das angeschlossene Quadrupol-Massenspektrometer geleitet werden. Dort erfolgte die Detektion der Analyten aus der Flüssigphase. Ein Vorteil dieser Analysemethode war der große Messbereich, von 10 ppb bis 100 %. Der Reaktorraum wurde mittels eines Wasserbades temperiert. Für die hier beschriebenen Messungen wurde eine Temperatur von 30 °C eingestellt (siehe Kapitel 2.3.3, S.33).

Die Auswertung der Versuche basierte auf Kalibrierungen die unter Reaktionsbedingungen mit CH₄ als Reingas bzw. CH₃OH als Zusatz zum Messpuffer durchgeführt wurden. Für jede

Komponente wurden auf Basis der Voranalysen des IGB, eine bzw. mehrere charakteristische Massensignale (z.B. für CH_4 Masse 13 und für CH_3OH Masse 31) ausgewählt und die entsprechenden Ionenströme zur Kalibrierung verwendet. Um Schwankungen während der Messung auszugleichen wurden die Ionenströme auf den Ionenstrom des Massensignals von Wasser (Masse 18) normiert. Neben der Analyse der CH_4 - und CH_3OH -Konzentration wurden diskontinuierlich vor bzw. nach der Messung die HCHO- und die NADH-Konzentrationen mittels Hach-Lange Test bzw. über die Absorption bei 340 nm bestimmt. Die Kalibriergeraden für die Analyse der CH_4 , CH_3OH , NADH und HCHO-Konzentrationen in den Versuchen sind im Anhang aufgeführt (Abbildung 7-28, S.192, Abbildung 7-29, S.192, Abbildung 7-37, S.197, Abbildung 7-38, S.197).

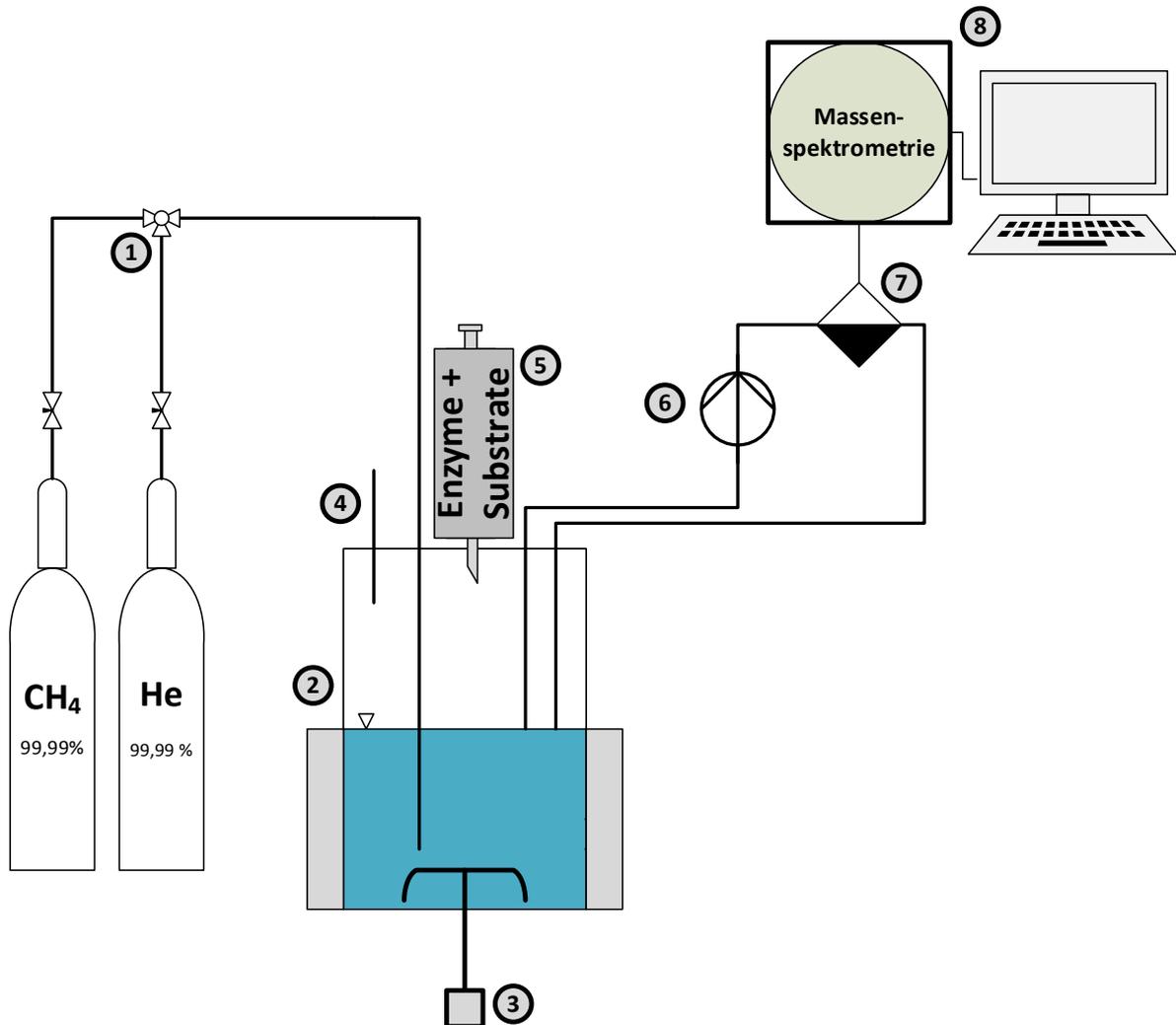


Abbildung 3-50: Schematischer Versuchsaufbau der Reaktorversuche mit sMMO, Katalase und GDH. Zufuhr von CH_4 und He über Druckflaschen (1), Temperaturkontrolle des Reaktors über ein Wasserbad (2), Rühren der Flüssigphase über Magnetrührer (3), Entfernbare Ausgangsöffnung für Belüftung (4); Manuelle Zugabe der Enzyme und flüssigen Substrate über Injektion (5); Transport der Flüssigkeit mittels Pumpe (6) zu einem Membraneinlass hinter derer ein Unterdruck für den Übergang eines Teils der Flüssigphase in die Gasphase sorgt ($10 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$) (7) welches anschließend per Massenspektrometrie Einheit analysiert wird (8).

Beispielhaft für eine *in vitro*-Messung der CH_3OH Bildung der sMMO im 10 mL-Maßstab sind die Rohdaten in Abbildung 3-51 dargestellt. Nach Entfernen der Atmosphäre durch Begasen mit He wurde das Reaktionsgefäß mit CH_4 begast. Dadurch wurde eine Sättigung der Flüssigphase mit CH_4 erreicht. Nach Austausch von 3 mL CH_4 -Atmosphäre mit O_2 (100 %) er-

folgte die Zugabe der Enzyme, in diesem Fall 1 μM sMMO. Nachdem die Massensignale ein konstantes Signal erreicht hatten, erfolgte der Reaktionsstart durch Zugabe von NADH auf eine Konzentration von 1 mM. Die Massensignale für CH_4 und CH_3OH wurden aufgezeichnet und mit der zuvor erfolgten Kalibrierung ausgewertet. Im Laufe der Messung reduzierte sich das Signal für die Masse $m=18$, H_2O . Diese Veränderung war technisch bedingt und wurde auch bei der Kalibrierung für diese Anlage beobachtet. Auch das Signal der Masse $m=31$, sank bis zum Reaktionsstart. Um diesen technischen Fehler zu korrigieren, wurde, wie bei den Kalibriermessungen, das entsprechende Signal mit dem Wassersignal ($m=18$) verrechnet. Das experimentelle Vorgehen mit der Begasung mit He, der Begasung mit CH_4 , der Zugabe von O_2 und der entsprechenden Enzyme, sowie der Reaktionsstart mit NADH bzw. später NAD^+ wurde für alle weiteren Messungen ebenso durchgeführt. Abweichungen bzw. zusätzliche Zugaben werden entsprechend gekennzeichnet. Ein Vorteil der hier genutzten MS-Analysemethode, war die hohe Datendichte mit der die Reaktionen ausgewertet werden konnten. Alle 15 Sekunden (je nach Anzahl der untersuchten Massensignale, hier 14) wurde ein Wert pro Massensignal gemessen. Dies war eine enorme Verbesserung im Vergleich zur diskontinuierlichen Messung der sMMO-Reaktion mit CH_4 als Substrat (siehe Kapitel 3.4.4, S.109). Die anderen Rohdaten zu den nachfolgend beschriebenen Reaktionen sind im Anhang dargestellt (ab S.194, Abbildung 7-31, Abbildung 7-32, Abbildung 7-33, Abbildung 7-34, Abbildung 7-35 und Abbildung 7-36). Die genauen Angaben zur Umsatzberechnung der folgenden Experimente sind im Anhang in Tabelle 7-10, S.197 aufgelistet.

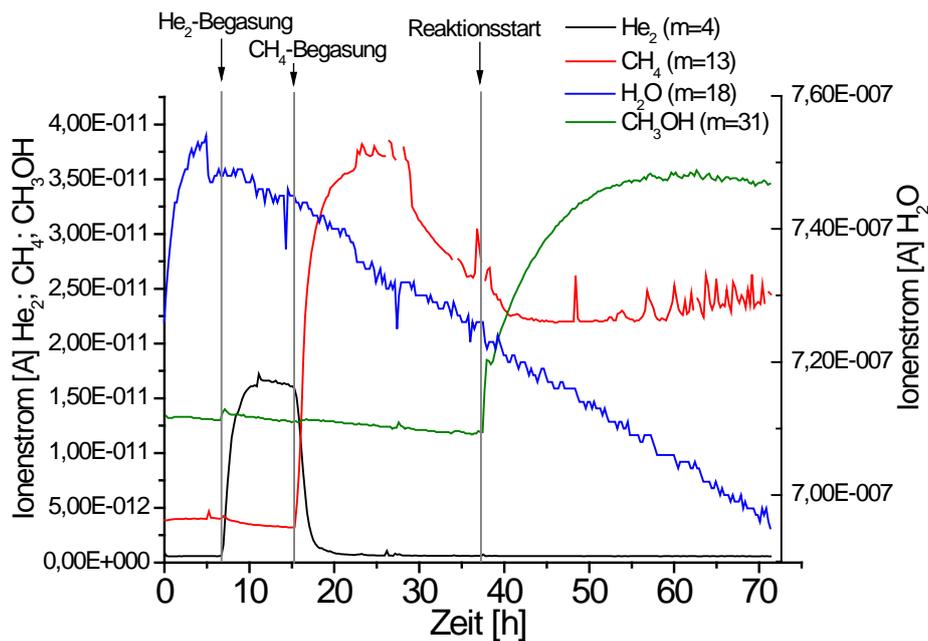


Abbildung 3-51: Gemessene Ionenströme in Abhängigkeit der Zeit für verschiedene Massensignale vor und während der sMMO-Reaktion mit CH_4 und NADH als Substrate im 10 mL-Maßstab. Analyse über FoxySPEC® Massenspektrometer. Dargestellt sind die aufgezeichneten Massenströme für He (schwarz, $m=4$); CH_4 (rot, $m=13$); H_2O (blau, $m=18$) und CH_3OH (grün, $m=31$). Die Einzelnen Reaktionsphasen waren: 8 bis 15 Minuten-He-Begasung; 15 bis 28 Minuten- CH_4 -Begasung; 28 min-Zugabe O_2 (3 mL); 33 Minuten Zugabe-Proteine; 37 Minuten-Reaktionsstart durch NADH-Zugabe; 71 Minuten-Reaktionsende. Folgende Bedingungen wurden eingestellt: $\text{MMOH}_{\text{aktive Zentren}}:\text{rek.MMOB}:\text{MMOR} = 1:1:1 \mu\text{M}$; NADH 10 μmol (1 mM); Temperatur 30 °C; Messpuffer 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat, pH 7,3. Flüssigvolumen 10 mL; Gasvolumen 15 mL; 488 μmolCH_4 (12 mL+ gelöster Anteil); 123 $\mu\text{mol O}_2$ (3 mL).

3.6.1 Echtzeit-Analyse der CH₄- und CH₃OH-Konzentrationen in der Flüssigphase während der sMMO-Reaktion mit NADH

Mit dem beschriebenen Messsystem erfolgte zunächst die Analyse der CH₄- und CH₃OH-Konzentration in der Flüssigphase während der sMMO-Reaktion mit CH₄, O₂ und NADH als Substrate. Das Ergebnis dieser Messung ist in Abbildung 3-52 dargestellt.

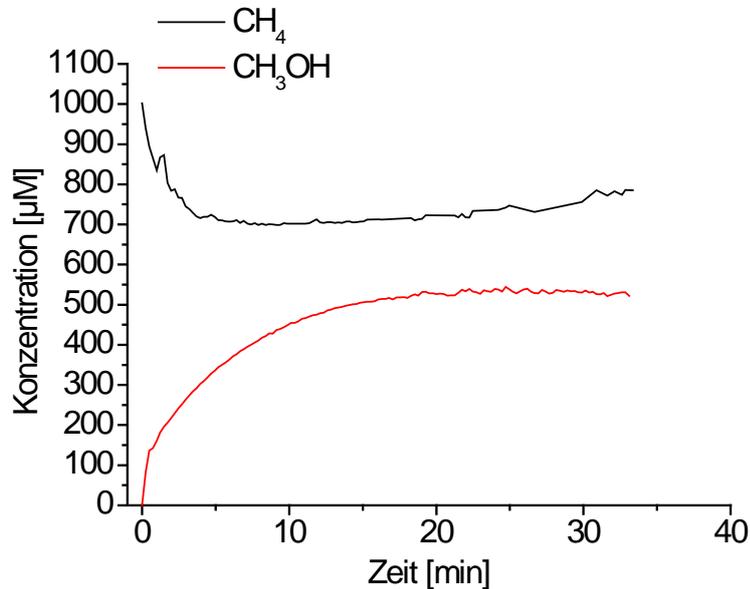


Abbildung 3-52: Zeitabhängige Bildung von CH₃OH im sMMO-Aktivitätstest mit CH₄ als Substrat. CH₄ (schwarz)- und CH₃OH (rot)- Konzentrationen in der Flüssigphase während der sMMO-Reaktion mit NADH. Folgende Bedingungen wurden eingestellt: MMOH_{aktive Zentren}:rek.MMOB: MMOR = 1:1:1 µM; 10 µmol NADH (1 mM); 488 µmol CH₄ (12 mL+ gelöster Anteil); 123 µmol O₂ (3 mL); Temperatur 30 °C; Messpuffer 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat, pH 7,3. Flüssigvolumen 10 mL; Gasvolumen 15 mL

Nach Reaktionsstart durch NADH-Zugabe wurden in der Flüssigphase eine Zunahme der CH₃OH-Konzentration und eine Abnahme der CH₄-Konzentration gemessen. Die Ursache für den Sprung des CH₃OH-Messsignals nach 30 Sekunden war die Totzeit der Messmethode, die durch den Transport der Flüssigphase zur MS-Analyse entstand. Die CH₄-Konzentration sank von 1.000 µM am Beginn auf 700 µM nach fünf Minuten. Im weiteren Reaktionsverlauf wurde ein Anstieg der CH₄-Konzentration auf 750 bis 790 µM nach 30 Minuten gemessen. Die Startkonzentration von CH₄ in der Flüssigphase war geringer als die maximal beschriebene Löslichkeit (1.260 µM [Duan und Mao, 2006]). Die Ursache hierfür war vermutlich die Entnahme von 3 mL Gasvolumen und die nachfolgende Zugabe von O₂ zum Messansatz. Das Stagnieren der CH₄-Konzentration nach fünf Minuten Reaktion, trotz weiterer CH₃OH-Bildung, war durch das Lösen von CH₄ aus dem Gasraum in die Flüssigphase zu erklären. In 20 Minuten Reaktionszeit wurde durch die sMMO eine CH₃OH-Konzentration von 540 µM gebildet. Danach wurde keine weitere CH₃OH-Bildung detektiert. In der HCHO-Analyse der Flüssigphase nach Beendigung der Reaktion (durch Abstoppen über Säure-Zugabe, Zentrifugation und Abtrennung des Überstandes) wurde eine HCHO-Konzentration von 33 µM gemessen. Die Gesamtmenge an Reaktionsprodukten (CH₃OH+HCHO) entsprach einem Umsatz von 57 %, bezogen auf die eingesetzte NADH-Menge. Verbraucht wurden während der Reaktion 700 µM NADH, was einer Elektronenkopplungseffizienz von 81 % entsprach. Die Umsätze für die anderen eingesetzten Substrate (CH₄ und O₂) sind in Tabelle 3-26 zusam-

mengefasst. Im Vergleich zur 10-minütigen Untersuchung der sMMO-Reaktion mit CH₄ im diskontinuierlichen Test (Tabelle 3-25, S.129) wurde eine Bildung von CH₃OH durch die sMMO über 20 Minuten beobachtet werden. Die höhere Produktmenge nach zehn Minuten (0,88 µmol vs. 0,45 µmol) im diskontinuierlichen Test war auf die dreifach höhere sMMO-Konzentration zurückzuführen. Ein Einsatz vergleichbarer Enzymkonzentrationen war aufgrund der begrenzten Menge an Enzym in den hier gezeigten Reaktorexperimenten nicht möglich. In vorigen Testmessungen mit dem vergleichbaren Messaufbau wurde bei einer dreifachen Konzentration an sMMO der Komplettumsatz von CH₄ zu CH₃OH bereits nach zehn Minuten gemessen. Das entsprach einer NADH-Kopplungseffizienz von 100 %. (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 3-26: Gebildete Produkt-, eingesetzte Substratmengen sowie daraus berechnete Umsätze bei sMMO-Reaktionen mit CH₄ als Substrat mit 1 bzw. 5 mM NADH im 10 mL-Reaktormaßstab Folgende Bedingungen wurden eingestellt: MMOH_{aktive Zentren}: rek.MMOB: MMOR 1:1:1 µM; Flüssigvolumen 10,0 mL und 15 mL Gasvolumen in gasdichten Vials mit 20 % 488 µmol CH₄ (12 mL+ Gelöstanteil); 123 µmol O₂ (3 mL+ Gelöstanteil) 10 bzw. 50 µmol NADH (1 bzw. 5 mM); Temperatur 30 °C; Messpuffer 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat, pH 7,3

Messung	Produkt CH ₃ OH +HCHO [µmol]	Substrat CH ₄ [µmol]	Umsatz CH ₄ [%]	Substrat O ₂ [µmol]	Umsatz O ₂ [%]	Substrat NADH [µmol]	Verbrauch NADH [µmol]	Umsatz NADH [%]
1 mM NADH	5,7	488	1,2	123	4,6	10	7	57
5 mM NADH	7,0	488	1,4	123	5,7	50	9	14

Die Echtzeit-Messung der sMMO-Aktivität im CH₄-Assay konnte erfolgreich gezeigt werden. Da NADH ein limitierender Faktor für die Zielproduktbildung war, wurde im folgenden Experimente die Startkonzentration von NADH um Faktor 5 auf 5 mM erhöht. Dadurch sollte eine Steigerung der CH₃OH-Bildung bzw. eine Verlängerung der Reaktionszeit erreicht werden. Die CH₃OH-Bildung in diesem Versuch ist im Vergleich zu der Bildung bei 1 mM NADH in Abbildung 3-53 dargestellt. Die Erhöhung der Startkonzentration von NADH um Faktor 5 führte nur zu einer Steigerung der CH₃OH-Konzentration um Faktor 1,3. Eine Verlängerung der Reaktionszeit wurde nicht beobachtet. Die CH₃OH-Bildungskurve hatte für beide NADH-Konzentrationen einen vergleichbaren Verlauf. Die Umsätze waren, entsprechend der höheren CH₃OH-Bildung, ebenfalls um Faktor 1,3 höher (Tabelle 3-26). Die Ausnahme bildete der Umsatz bezogen auf NADH, der aufgrund der höheren NADH-Startkonzentration, bei einem Wert von 14 % lag. Damit konnte durch die hier gezeigte kontinuierliche Messung der CH₃OH-Bildung der sMMO eine Entkopplung der Zielproduktbildung von dem NADH-Verbrauch gemessen werden. Dies wurde ebenfalls im sMMO-Assay mit Nitrobenzol als Substrat gezeigt (Kapitel 3.5.2.2.2, S.122). Eine verstärkte Entkopplung des NADH-Verbrauches wurde mit CH₄ als Substrat im Gegensatz zu Messungen mit Nitrobenzol erst bei einer NADH-Konzentration von 5 statt 1 mM beobachtet. Dadurch konnte erneut die die Abhängigkeit des Umsatzes und der Reaktionsgeschwindigkeit vom eingesetzten Substrat aufgezeigt werden.

Analog zu den diskontinuierlichen Versuchen mit CH₄ sollten die NADH-Regeneration über die GDH und der Zusatz von Katalase zum Testansatz erfolgen. Dadurch sollte eine Steigerung der Produktbildung und eine Verlängerung der Reaktionszeit, wie sie im Nitrobenzol-Assay gezeigt wurde (siehe Kapitel 3.5.4, S.129), erreicht werden.

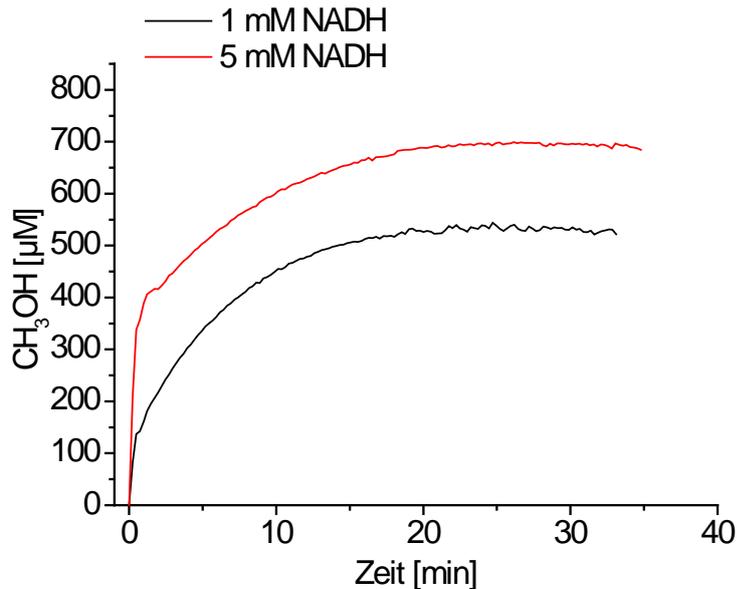


Abbildung 3-53: Zeitabhängige Bildung von CH₃OH im sMMO-Aktivitätstest in der Flüssigphase mit CH₄ als Substrat und 1 mM (schwarz) bzw. 5 mM (rot) NADH. Folgende Bedingungen wurden eingestellt: MMOH_{aktive Zentren}:rek.MMOB: MMOR = 1:1:1 µM; 10 bzw. 50 µmol NADH (1 bzw. 5 mM); 488 µmol CH₄ (12 mL+ gelöster Anteil); 123 µmol O₂ (3 mL); Temperatur 30 °C; Puffer 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat, pH 7,3. Flüssigvol. 10 mL; Gasvol. 15 mL

3.6.2 Einfluss von Cofaktor-Regeneration und Zusatz von Katalase

Das Ziel dieser Untersuchungen war es zu überprüfen, ob bei Verwendung der untersuchten Methode zur Cofaktor-Regeneration und des Zusatzes von Katalase eine Erhöhung der CH₃OH-Bildung und Verlängerung der Reaktionszeit im sMMO-Test mit CH₄ als Substrat erreicht werden. Aufbauend auf den Ergebnissen im Nitrobenzol-Assay (siehe Kapitel 3.5.2.1, S.119 und 3.5.4, S.129) erfolgte zunächst der Zusatz an GDH, sowie Glucose und NAD⁺ mit der sMMO (Kapitel 2.3.3.1, S.33). In einer weiteren Messung erfolgte die Analyse der CH₃OH-Bildung in Kombination der Cofaktor-Regeneration durch die GDH und des Zusatzes von Katalase direkt zum Reaktionsstart. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 3-54 dargestellt.

Bei dem Einsatz der sMMO in Kombination mit der Cofaktor-Regeneration durch die GDH wurde eine maximale CH₃OH-Konzentration von 205 µM nach zehn Minuten gemessen. Die CH₃OH-Endkonzentration war um den Faktor 2,6 geringer zur CH₃OH-Bildung mit 1 mM NADH. Die Ursachen für die geringere Produktbildung waren vermutlich die Entkopplung des Elektronentransfers der sMMO von der CH₃OH-Bildung und die Verzögerung der sMMO-Reaktion durch die NADH-Bildung der GDH am Reaktionsstart. Bevor die sMMO-Reaktion erfolgen kann, muss NADH durch die GDH gebildet werden. In dieser Zeit kann keine Zielproduktbildung erfolgen. Dies führte, wie bereits bei Messungen mit Nitrobenzol als Substrat erwähnt, zu einer Reduktion der sMMO-Aktivität (siehe Kapitel 3.5.2.1, S.119). Die Entkopplung des NADH-Verbrauches von der Zielproduktbildung war im Vergleich zur Messung mit NADH höher, da bereits nach zehn Minuten, mit NADH nach 20 Minuten, eine Stagnation der CH₃OH-Bildung beobachtet wurde. NADH wurde durch die GDH konstant regeneriert. Nach 40 Minuten konnte eine vollständige Umwandlung des eingesetzten 1 mM NAD⁺ in NADH gezeigt werden. Katalase wurde nach 28 Minuten dem Reaktionsansatz zugesetzt. Ein Effekt dieses Katalase-Zusatzes auf die CH₃OH-Bildung wurde nicht beobachtet.

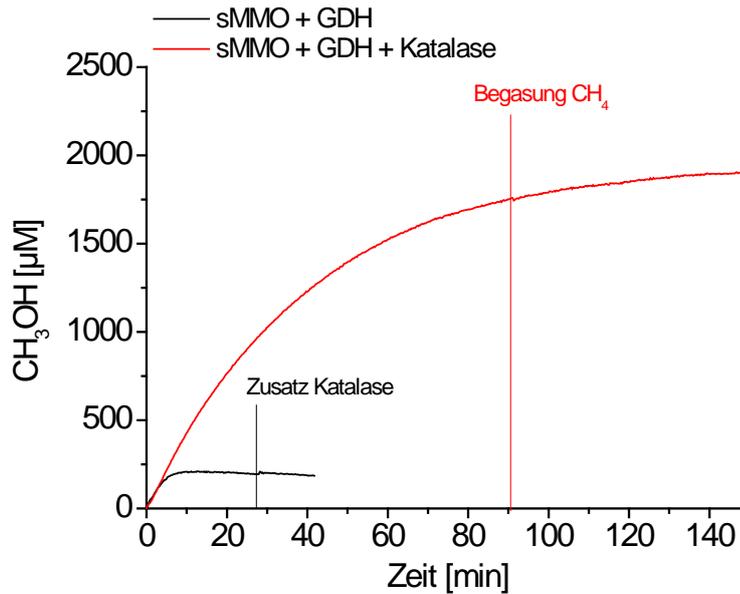


Abbildung 3-54: Zeitabhängige Bildung von CH_3OH im sMMO-Aktivitätstest mit Cofaktor-Regeneration durch GDH und Zusatz von Katalase nach 28 Minuten (schwarz) und direkt zum Reaktionsstart (rot). Folgende Bedingungen wurden eingestellt: $\text{MMOH}_{\text{aktive Zentren}}:\text{rek.MMOB}:\text{MMOR} = 1:1:1 \mu\text{M}$; $\text{GDH } 75 \text{ mU}\cdot\text{mL}^{-1}$; $\text{Katalase } 640 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$; $\text{NAD}^+ 10 \mu\text{mol}$ (1 mM); $\text{Glucose } 500 \mu\text{mol}$ (50 mM); $488 \mu\text{mol CH}_4$ (12 mL+ gelöster Anteil); $123 \mu\text{mol O}_2$ (3 mL); Temperatur $30 \text{ }^\circ\text{C}$; Messpuffer 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat, pH 7,3. Flüssigvolumen 10 mL; Gasvolumen 15 mL. Der Zusatz an Katalase entsprach einer Aktivität von $640 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$. Die Begasung mit CH_4 entsprach einem Volumenstrom von ca. 1 bis $2 \text{ l}\cdot\text{h}^{-1}$. Die Begasung erfolgte in den Kopfraum mit Zusatz des Auslassrohres.

Bei Kombination der Cofaktor-Regeneration mit dem Zusatz an Katalase am Beginn der Reaktion konnte eine deutliche Erhöhung der CH_3OH -Bildung bzw. Verlängerung der Reaktionszeit gemessen werden. Die sMMO-Reaktion zur Bildung von CH_3OH verlief über einen Zeitraum von 90 Minuten. Dabei wurden $1.750 \mu\text{M CH}_3\text{OH}$ gebildet, was im Vergleich zur Messung ohne Katalase eine Steigerung von 750 % entsprach (siehe Tabelle 3-27). Bei der folgenden Begasung mit CH_4 , zur Vermeidung einer etwaigen Limitation wurde eine weitere CH_3OH -Zunahme von $150 \mu\text{M}$ gemessen. In den beiden Reaktionen mit bzw. ohne Katalase-Zusatz war die CH_3OH -Bildung in den ersten drei Minuten vergleichbar (siehe Abbildung 3-54). Dies zeigte, dass die Bildung von H_2O_2 als Nebenprodukt der sMMO-Reaktion nach diesem Zeitpunkt einen signifikanten Einfluss auf die Zielproduktbildung hatte. Der Zusatz von Katalase zur sMMO-Reaktion mit CH_4 als Substrat ergab einen Umsatz von 3,6 % bezogen auf CH_4 und 14,2 % bezogen auf die eingesetzte O_2 -Menge (siehe Tabelle 3-27). Vergleicht man die CH_3OH -Bildungen nach zehn Minuten, so entsprechen diese in etwa den Daten des diskontinuierlichen CH_4 -Assays (siehe Kapitel 3.5.4, S.129). Während der Effekt des GDH- und Katalase-Zusatzes auf die Zielproduktbildung im diskontinuierlichen CH_4 -Assay noch gering war, zeigte sich bei der sMMO-Reaktionen über einen längeren Zeitraum (>10 Minuten) eine deutliche Steigerung der CH_3OH -Bildung und Verlängerung der Reaktionszeit des Enzyms.

Aus den Ergebnissen in Kapitel 3.4.4, S.109 war bekannt, dass die sMMO während der Reaktion mit CH_4 signifikante Mengen an HCHO aus CH_3OH bildet. Das Zielprodukt in den sMMO-Reaktionen mit CH_4 war CH_3OH . Deshalb sollte ein weiteres Enzym eingesetzt werden um aus HCHO CH_3OH zu bilden. Dafür wurde die Formaldehyd-Dismutase (FDM) in

dem Ansatz der sMMO mit GDH und Katalase nach 160 Minuten zugesetzt (Daten nicht gezeigt, Endkonzentration FDM 0,43 μM). Die FDM katalysiert die Bildung von CH_3OH und HCOOH aus zwei Molekülen HCHO . Nach FDM Zugabe konnte eine weitere Steigerung der CH_3OH -Konzentration um 180 μM gemessen werden. Der Zusatz an FDM wäre wichtig für Analysen, bei denen eine HCHO -Bildung durch die sMMO nicht toleriert werden kann.

Der pH-Wert in der sMMO-Reaktion mit Zusatz von GDH und Katalase sank im Laufe der Messung von 7,3 auf pH 6,9. Die Ansäuerung könnte durch die Bildung von HCOOH (2. Produkt der FDM Reaktion) oder durch die Hydrolyse des Produkt der GDH (Glucono-1,5-lacton) zu erklären sein. Die sMMO-Aktivität bei dem pH-Wert von 6,9 lag bei 63 % der Aktivität des Optimums (siehe Kapitel 3.4.1.2, S.10241). Die Reduktion des pH-Wertes war somit nicht die Ursache für das Stagnieren der CH_3OH -Bildung, sondern ggf. die Bildung von inhibierenden Nebenprodukten z.B. H_2O_2 . Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollte eine Vergrößerung des Reaktormaßstabes von 10 auf 250 mL erfolgen. Als Vorberatung auf diese Versuche wurden zunächst andere Bedingungen im 10 mL-Maßstab untersucht.

Tabelle 3-27: Gebildete Produkt-, eingesetzte Substratmengen sowie daraus berechnete Umsätze bei sMMO-Reaktionen mit CH_4 als Substrat und Cofaktor Regeneration durch die GDH mit und ohne Katalase Zusatz am Reaktionsstart im 10 mL-Reaktormaßstab Folgende Bedingungen wurden eingestellt: $\text{MMOH}_{\text{aktive Zentren}}:\text{rek.MMOB}:\text{MMOR}$ 1:1:1 μM ; GDH 75 $\text{mU}\cdot\text{mL}^{-1}$; Katalase 640 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$; Flüssigvolumen 10 mL und 15 mL Gasvolumen in gasdichten Vials mit 20 % 488 μmol CH_4 (12 mL+ Gelöstanteil); 123 μmol O_2 (3 mL+ Gelöstanteil) 10 μmol NAD^+ (1 mM); Temperatur 30 °C; Messpuffer 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat, pH 7,3

Messung	Produkt CH_3OH + HCHO [μmol]	Substrat CH_4 [μmol]	Umsatz CH_4 [%]	Substrat O_2 [μmol]	Umsatz O_2 [%]	Substrat NAD^+ [μmol]	Umsatz NAD^+ [%] ¹⁾
sMMO+ GDH	2,1	488	0,5	123	1,8	10	21,0 (0,5)
sMMO+ GDH+ Katalase	17,5	488	3,6	123	14,2	10	175 (3,5)

¹⁾In Klammern Angabe des Umsatzes bezogen auf die eingesetzte Menge an Glucose (500 μmol), welches zur Regeneration von NADH durch die GDH genutzt wurde

3.6.3 Anpassung der MMOR-Konzentration

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass eine CH_3OH -Bildung der sMMO über einen Zeitraum von 90 Minuten stattfinden kann, wenn Katalase und GDH am Beginn der Reaktion zugesetzt werden. Das limitierende Protein für eine Maßstabsvergrößerung in den 250-mL-Maßstab war im Rahmen dieser Messungen MMOR (siehe geringe Ausbeute bei der Reinigung in Kapitel 3.3.4, S.94). Um Experimente im 250 mL-Maßstab durchführen zu können, musste die MMOR-Konzentration reduziert werden. Die Menge an gereinigtem Protein, bei der in der Literatur dokumentierten Aufarbeitung der sMMO aus *M. capsulatus* Bath und *M. trichosporium* OB3b, deutete auf ein *in vivo*-Verhältnis von $\text{MMOH}_{\text{aktive Zentren}}:\text{MMOB}:\text{MMOR}$ von 1:1:0,1 μM hin [Fox *et al.*, 1989; Pilkington und Dalton, 1990]. In eigenen Messungen der sMMO-Aktivität im Nitrobenzol-Assay mit zweifach verringerter MMOR-Konzentration zeigte sich eine 25 %-ige Reduktion der Aktivität (siehe Kapitel 3.4.2, S. 107). Aufgrund dieser Messungen wurde bei der Reduktion der MMOR-Konzentration im Aktivitätsassay mit CH_4 als Substrat eine geringere Produktbildung erwartet. Da eine Messung im 250 mL-Maßstab durchgeführt werden sollte, wurde aufgrund der begrenzten Menge an MMOR und der genannten Literaturdaten eine MMOR-Konzentration von 0,1 μM eingesetzt. Zunächst wurde

diese Konzentration im 10 mL-Maßstab mit NADH sowie GDH und Katalase-Zusatz getestet (Kapitel 2.3.3.1, S.33). Das Ergebnis dieser Messungen ist in Abbildung 3-55 dargestellt.

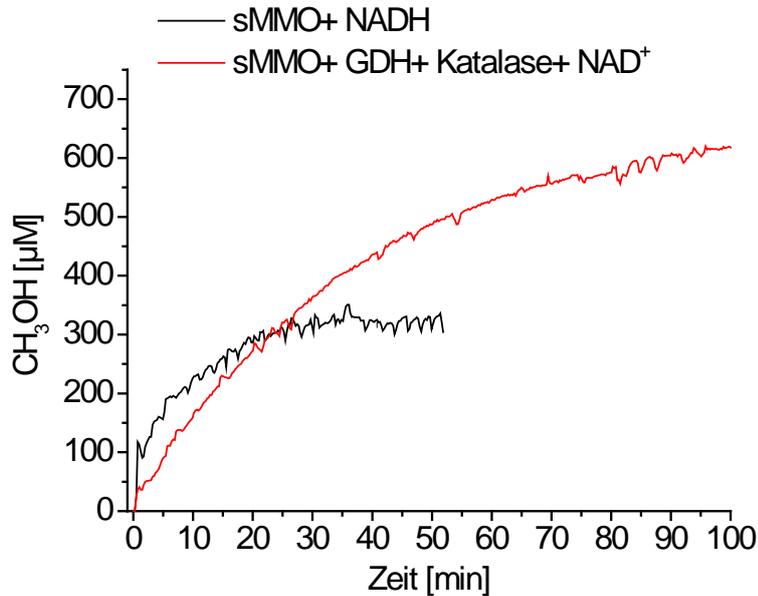


Abbildung 3-55: Zeitabhängige Bildung von CH₃OH im sMMO-Aktivitätstest mit 10-fach geringerer MMOR-Konzentration im 10 mL-Maßstab. sMMO mit NADH (schwarz) und sMMO mit Cofaktor-Regeneration durch GDH kombiniert mit Zusatz von Katalase (rot). Folgende Bedingungen wurden eingestellt: MMOH_{aktive Zentren}:rek.MMOB: MMOR = 1:1:0,1 µM ; GDH 75 mU*mL⁻¹; Katalase 640 U*mL⁻¹; NADH oder NAD⁺ 10 µmol (1 mM); Glucose 500 µmol (50 mM); 488 µmol CH₄ (12 mL+ gelöster Anteil); 123 µmol O₂ (3 mL); Temperatur 30 °C; Messpuffer 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat, pH 7,3. Flüssigvolumen 10 mL; Gasvolumen 15 mL.

Der Zusatz an Katalase bzw. GDH steigerte auch bei den Reaktionen mit verringerter MMOR-Konzentration die Produktbildung (Faktor zwei). Ohne Katalase und mit NADH wurden nach 52 Minuten 320 µM CH₃OH gebildet. Im Gegensatz dazu wurden mit Zusatz an Katalase und Cofaktor-Regeneration durch die GDH, bei einer Reaktionszeit von 100 Minuten, 620 µM CH₃OH gebildet. Die Umsätze für beide Reaktionen waren entsprechend um Faktor zwei höher für die sMMO-Reaktion mit GDH und Katalase (siehe Tabelle 3-28). Im Vergleich zu den Messungen mit äquimolarer MMOR-Konzentration wurde eine Verringerung der finalen CH₃OH Konzentration von 1.750 auf 620 µM im Ansatz mit GDH und Katalase gemessen. Obwohl die Enzymkonzentration, in Form der Reduktase, auf 10 % reduziert wurde, konnte eine CH₃OH-Endkonzentration von 35 % im Vergleich zu 100 % MMOR gemessen werden. Ohne Cofaktor-Regeneration und Katalase-Zusatz reduzierte sich die gebildete CH₃OH Konzentration bei Verringerung der MMOR-Konzentration von 1,0 auf 0,1 µM von 540 µM auf 320 µM. In vorigen Untersuchungen im Nitrobenzol-Assay (Daten nicht gezeigt) konnte bei Reduktion der MMOR-Konzentration um Faktor vier; 20 und 40 eine vergleichbare *p*-Nitrophenol Endkonzentration bei den unterschiedlichen MMOR-Konzentrationen detektiert werden. Die gemessenen Startaktivitäten verringerten sich mit der MMOR-Konzentration ($H_{\text{Aktive Zentren}}:R$ 1:1=91; 4:1=66; 20:1=30; 40:1=21 mU*mg_{Aktive Zentren}⁻¹). Mit Verringerung der MMOR-Konzentration verlängerte sich die Reaktionszeit von fünf Minuten ($H_{\text{Aktive Zentren}}:R = 1:1$) auf maximal 20 Minuten ($H_{\text{Aktive Zentren}}:R = 40:1$). Dass der Umsatz bzw. die Reaktionsgeschwindigkeit der sMMO-Reaktion abhängig von den eingesetzten Substraten ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit, sowie in Literaturangaben mehrfach gezeigt (siehe Kapitel 3.4.4, S.109 und 3.5.1.1, S.116 [Tinberg und Lippard, 2010]. Auch bei der

Verwendung von Propen bzw. CH₄ in der sMMO-Reaktion wurde eine Substratabhängigkeit des sMMO-Reaktionsverhaltens beobachtet. [Gassner und Lippard, 1999]. Die Kopplung des Elektronentransfers an die Zielproduktbildung variierte ebenfalls bei verschiedenen Substraten. Die Verringerung der MMOR-Konzentration im CH₄-Assay hatte einen direkten Einfluss auf die finale Zielproduktkonzentration. Trotz der geringeren CH₃OH-Bildung infolge der Verringerung der MMOR-Konzentration wurde, aufgrund der begrenzten Menge an MMOR, die getestete sMMO-Stöchiometrie von H_{Aktive Zentren}:B:R = 1:1:0,1 für die Messungen im 250 mL-Maßstab verwendet. Dabei sollten vorrangig mögliche Unterschiede und Limitierungen der sMMO-Reaktion nach der Maßstabsvergrößerung untersucht werden. Die Messungen erfolgten mit Cofaktor-Regeneration durch die GDH sowie Zusatz an Katalase in einem 1,5 L-Reaktor mit einer Flüssigkeitsmenge von 250 mL.

Tabelle 3-28: Gebildete Produkt-, eingesetzte Substratmengen sowie daraus berechnete Umsätze bei sMMO-Reaktionen mit CH₄ als Substrat und 10-fach geringerer MMOR-Konzentration im 10 mL-Reaktormaßstab Folgende Bedingungen wurden eingestellt: MMOH_{Aktive Zentren}:rek.MMOB: MMOR 1:1:0,1 µM; GDH 75 mU*mL⁻¹; Katalase 640 U*mL⁻¹; Flüssigvolumen 10 mL und 15 mL Gasvolumen in gasdichten Vials mit 20 % 488 µmol CH₄(12 mL+ Gelöstanteil); 123 µmol O₂ (3 mL+ Gelöstanteil) 10 µmol NADH bzw. NAD⁺ (1 mM);Temperatur 30 °C; Messpuffer 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat, pH 7,3

Messung	Produkt CH ₃ OH +HCHO [µmol]	Substrat CH ₄ [µmol]	Umsatz CH ₄ [%]	Substrat O ₂ [µmol]	Umsatz O ₂ [%]	Substrat NADH/NAD ⁺ [µmol]	Umsatz NADH/NAD ⁺ [%] ¹⁾
sMMO+ NADH	3,2	488	0,7	123	2,6	10	32
sMMO+ GDH+ Katalase	6,2	488	1,3	123	5,0	10	62 (1,2)

¹⁾In Klammern Angabe des Umsatzes bezogen auf die eingesetzte Menge an Glucose (500 µmol), welches zur Regeneration von NADH durch die GDH genutzt wurde

3.6.4 Maßstabsvergrößerung in den 250 mL-Maßstab

Aufbauend auf den Messungen im 10 mL-Maßstab, erfolgte die Messung der CH₃OH-Bildung in einem 1,5 L Reaktor über die am Beginn des Kapitels 3.6, S.136 beschriebene Analysemethode mittels Massenspektrometer mit Membraneinlasssystem.

Der druckfeste und gasdichte Reaktor der Firma Büchi hatte ein Gesamtvolumen von 1,5 L und wurde mit einem Flüssigvolumen von 250 mL betrieben. Im Gegensatz zum 10 mL-Maßstab erfolgte die Durchmischung der Flüssigphase über einen motorgetriebenen sechsblättrigen Scheibenrührer. Die Begasung mit He vor der Messung war identisch zum 10 mL-Maßstab. Die Zufuhr von CH₄ bzw. O₂ erfolgte über ein Gasgemisch mit 30 % CH₄; 14,35 % O₂ und 55,65 % N₂, nach dem Strippen der Flüssigkeit mit He und vor der Zugabe der Substrate bzw. Enzyme. Die Messung der CH₄- bzw. CH₃OH-Konzentration erfolgte analog zu der Messung im 10 mL-Maßstab. Parallel dazu erfolgte die diskontinuierliche Messung der NADH- und HCHO-Konzentrationen zu gewählten Zeitpunkten nach Probennahme aus dem Reaktor (Kapitel 2.3.3.2, S.34 Kalibrierung siehe Anhang Abbildung 7-37, S.197 und Abbildung 7-38, S.197).

Das Ziel der Messung war die Analyse des Reaktionsverhaltens der sMMO mit CH₄ als Substrat nach der Maßstabsvergrößerung von 10 auf 250 mL. Mögliche Limitierungen oder kritische Parameter sollten detektiert werden, um diese bei künftigen Messungen, z.B. bei einem potentiellen großtechnischen Einsatz dieses Systems, optimieren zu können. Die gemessene

nen Daten sind in Abbildung 3-56 dargestellt. Die Rohdaten zu dieser Messung sind im Anhang in Abbildung 7-36, S.196 zusammengefasst.

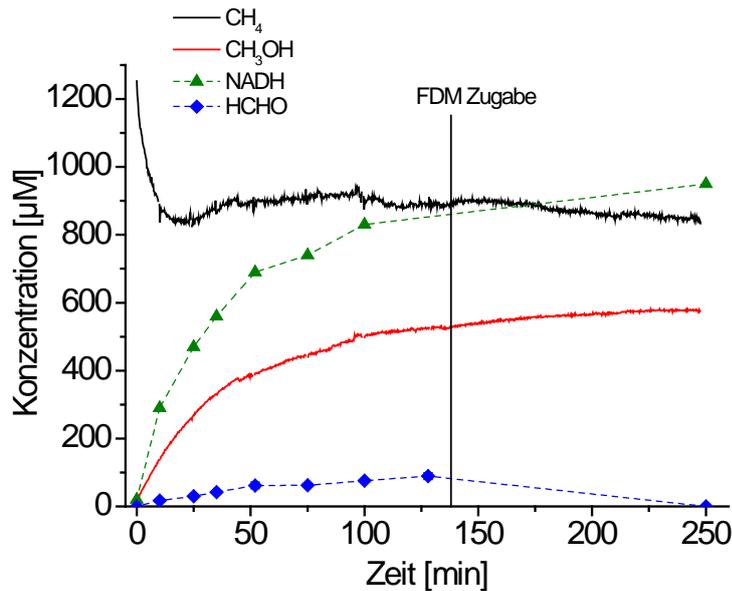


Abbildung 3-56: Zeitabhängige Konzentrationen von CH₄ (schwarz); CH₃OH (rot); NADH (grün) und HCHO (blau) im sMMO-Aktivitätstest mit Zusatz an GDH und Katalase im 250 mL-Maßstab. Folgende Bedingungen wurden eingestellt: MMOH_{aktive Zentren}: rek.MMOB: MMOR = 1:1:0,1 µM; GDH 75 mU·mL⁻¹; Katalase 640 U·mL⁻¹; 250 µmol NAD⁺ (1 mM); 12500 µmol Glucose 50 mM; 15167 µmol CH₄ (375 mL+ gelöster Anteil); 7267µmol O₂(180 mL+ gelöster Anteil);Temperatur 30 °C; Messpuffer 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat, pH 7,3. Flüssigvolumen 250 mL; Gasvolumen 1250 mL; Begasung 30 % CH₄; 14,35 % O₂ und 55,65 % N₂. Durchgezogene Linie bei 130 Minuten kennzeichnet Formaldehyde-Dismutase (FDM)-Zugabe, 5 mL á 5,9 mg·mL⁻¹ (getrocknetes Rohextrakt, finale FDM Konzentration 0,12 mg·mL⁻¹)

Die finale CH₃OH-Konzentration im 250 mL-Maßstab (530 µM) war um 90 µM geringer als im 10 mL-Maßstab (620 µM). Aufgrund der anderen Art der Begasung mit CH₄ bzw. O₂ und des veränderten Verhältnisses von Gas- zu Flüssigphase waren im 10 bzw. 250 mL-Maßstab unterschiedliche Faktoren für die Erhöhung der CH₄- bzw. O₂-Gesamtstoffmenge gegeben (Gas: Flüssig =1:5 im Gegensatz zu 1:2,5 im 10 mL-Maßstab). Die CH₄-Stoffmenge im 250 mL Ansatz wurde um Faktor 31 und nicht wie die Flüssigkeitsmenge um Faktor 25 erhöht. Die Stoffmenge an Sauerstoff wurde um Faktor 59 erhöht. Diese Unterschiede im Reaktoraufbau bzw. in den Ausgangsbedingungen könnten die Ursachen für die unterschiedlichen finalen CH₃OH-Konzentrationen gewesen sein. Aufgrund der variierenden Substratkonzentrationen wurden unterschiedliche Umsätze für CH₄ bzw. O₂ beim Vergleich des 10 mL und des 250 mL Versuches gemessen (siehe Tabelle 3-29). Für NAD⁺ bzw. Glucose wurden in beiden untersuchten Maßstäben vergleichbare Umsätze gemessen (siehe Tabelle 3-29). Der Faktor um den die NAD⁺-Konzentration erhöht wurde, entsprach dem Faktor der Erhöhung des Volumens (25).

Die HCHO-Bildung wurde während der Messung aufgezeichnet. Nach 120 Minuten Reaktionszeit wurden ca. 90 µM HCHO gebildet. Erneut wurde, wie bereits in Kapitel 3.6.2, S.141 angegeben, der Zusatz von FDM zur Steigerung der CH₃OH-Konzentration untersucht. Nach der FDM-Zugabe (Rohextrakt auf finale Konzentration im Reaktor von 0,12 mg·mL⁻¹) war nach 250 Minuten kein HCHO mehr messbar. Parallel zum HCHO-Abbau stieg die CH₃OH-Konzentration weiter an. Die Zunahme von CH₃OH (49 µM nach Zugabe der FDM bis Reak-

tionsstopp) entsprach der äquimolaren Menge an CH_3OH die aus der in etwa vorhandenen HCHO -Menge gebildet werden konnte ($90 \mu\text{M HCHO} \rightarrow 45 \mu\text{M CH}_3\text{OH} + 45 \mu\text{M HCOOH}$). Wie zuvor beobachtet, wurde NADH durch die GDH schneller gebildet, als es durch die sMMO verbraucht werden konnte. So war nach 100 bzw. 250 Minuten die eingesetzte NAD^+ Konzentration nahezu vollständig in NADH umgewandelt (830 bzw. $950 \mu\text{M NADH}$). Durch die hohen NADH -Konzentrationen könnte die Nebenproduktbildung der sMMO bzw. die Entkopplung des Elektronentransfers von der Zielproduktbildung begünstigt worden sein. Für weitere Untersuchungen wäre eine Verringerung der GDH -Aktivität bzw. eine Erhöhung der sMMO -Konzentration im Reaktionsansatz zu untersuchen. Der pH Wert sank wie bereits in Kapitel 3.6.2, S.141 beschreiben, bei der Reaktion von sMMO , GDH und Katalase über einen Zeitraum von über 100 Minuten, von 7,3 auf $\text{pH } 7,0$ nach 130 bzw. 250 Minuten Reaktionszeit. Mögliche Ursache hierfür könnte die Hydrolyse des GDH -Produktes Glucono-1,5-lacton gewesen sein. Die Reduktion des pH -Wertes hatte nur einen geringeren Einfluss auf die sMMO -Aktivität, da bei $\text{pH } 7,0$ im Nitrobenzol-Assay auch bei $\text{pH } 6,9$ eine Restaktivität von 66 %, im Vergleich zum pH -Optimum bei 7,6, gemessen wurde (siehe Kapitel 3.4.1.2, S.102).

Die Messung der CH_3OH -Bildung nach Maßstabsvergrößerung von 10 auf 250 mL zeigte trotz der variierenden Ausgangsbedingungen (CH_4 bzw. O_2 -Menge), eine vergleichbare Zielproduktbildung. Deutlich wurde dies beim Vergleich der Umsätze bezogen auf die identisch eingesetzten NAD^+ /Glucose-Konzentrationen. Für beide Maßstäbe wurde ein Umsatz von 1,2 % gemessen (siehe Tabelle 3-29). Der Einsatz der sMMO mit CH_4 als Substrat, in Kombination mit Cofaktor-Regenerierung durch die GDH und Zusatz von Katalase zur Reduzierung der H_2O_2 -Bildung, konnte erfolgreich zur CH_3OH -Bildung vom 10 in den 250 mL-Maßstab übertragen werden. Auf Grundlage dieser Ergebnisse können weitere Untersuchungen z.B. mit einer Erhöhung der verwendeten Enzymmenge (MMOR) durchgeführt werden. Ein paralleler Einsatz der FDM im Ansatz wäre durchzuführen, da in den Messungen neben CH_3OH auch HCHO als Produkt der sMMO -Reaktion gemessen wurde. Um das Reaktionsverhalten der sMMO mit CH_3OH als alleiniges Substrat zu untersuchen, erfolgte eine Messung im 10 mL-Maßstab.

Tabelle 3-29: Gebildete Produkt-, eingesetzte Substratmengen sowie daraus berechnete Umsätze bei sMMO -Reaktionen mit CH_4 als Substrat im 250 mL-Reaktormaßstab. Folgende Bedingungen wurden eingestellt: $\text{MMOH}_{\text{aktive Zentren}}$: rek.MMOR: $\text{MMOR } 1:1:0,1 \mu\text{M}$; $\text{GDH } 75 \text{ mU}\cdot\text{mL}^{-1}$; Katalase $640 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$; Flüssigvolumen 250 mL und 1250 mL Gasvolumen in druckfestem Reaktor. $15167 \mu\text{mol CH}_4$ (375 mL+ Gelöstanteil); $7267 \mu\text{mol O}_2$ (180 mL+ Gelöstanteil) $250 \mu\text{mol NAD}^+$ (1 mM); $12500 \mu\text{mol Glucose}$ (50 mM). Zum Vergleich wurden die Werte für den Versuch aus Kapitel 3.6.3 aus Tabelle 3-28 mit aufgeführt.

Messung	Produkt CH_3OH + HCHO [μmol]	Substrat CH_4 [μmol]	Umsatz CH_4 [%]	Substrat O_2 [μmol]	Umsatz O_2 [%]	Substrat NAD^+ [μmol]	Umsatz NAD^+ [%] ¹⁾
250 mL	154	15167	1,0	7267	2,1	250	62 (1,2)
10 mL	6,2	488	1,3	123	5,0	10	62 (1,2)

¹⁾In Klammern Angabe des Umsatzes bezogen auf die eingesetzte Menge an Glucose (12500 bzw. $500 \mu\text{mol}$), welches zur Regeneration von NADH durch die GDH genutzt wurde

3.6.5 Untersuchungen der sMMO-Reaktion mit CH₃OH als Substrat

Ziel dieses Versuches war es zu testen, ob und wie sich die Reaktion der sMMO mit CH₃OH als Substrat von der Reaktion mit CH₄ als Substrat unterscheiden. Dabei wurde das in Kapitel 3.6.1, S.139 beschriebene System der Detektion der CH₃OH-Konzentration verwendet. Die Reaktion der sMMO wurde mit den Substraten CH₃OH und NADH in der Flüssigphase, sowie O₂ in der Gasphase durchgeführt (Kapitel 2.3.3.1, S.33). Das Ergebnis ist in Abbildung 3-57 dargestellt.

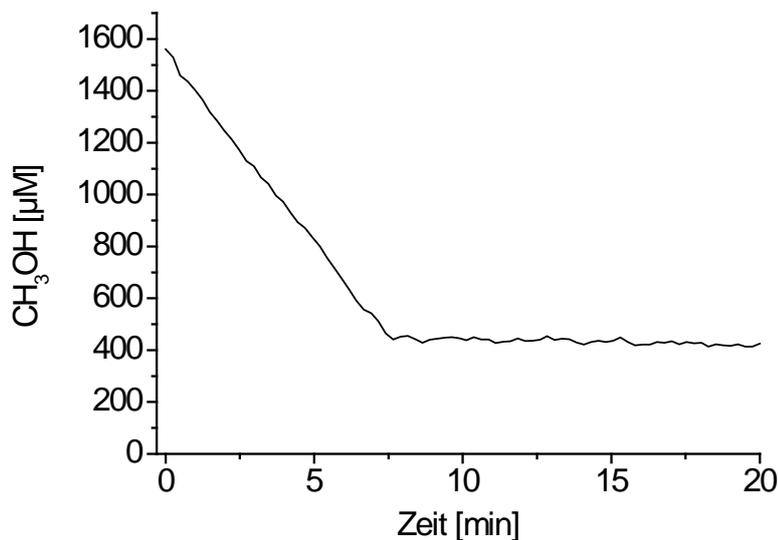


Abbildung 3-57: Zeitabhängige CH₃OH-Konzentration bei Reaktion der sMMO mit CH₃OH als Substrat. Folgende Bedingungen wurden eingestellt: MMOH_{aktive Zentren}: rek.MMOB: MMOR = 3:3:3 µM; 10 µmol NADH (1 mM); 15,6 µmol CH₃OH (1560 µM = 50 mg·mL⁻¹); 821 µmol O₂ (20 mL+ Gelöstanteil); 10 µmol NADH (1 mM); Temperatur 30 °C; Messpuffer 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat, pH 7,3

Nach Reaktionsstart durch Zugabe von NADH verringerte sich die eingesetzte CH₃OH-Konzentration (1560 µM) linear innerhalb der ersten sieben Minuten um 1100 µM. NADH war in diesem Ansatz mit einer Konzentration von 1 mM das limitierende Substrat. Dieses Ergebnis zeigte, dass ein vollständiger Umsatz von NADH durch die sMMO erreicht wurde. Dabei wurde eine komplette Kopplung des NADH-Verbrauches an den CH₃OH-Umsatz beobachtet. Die Abweichung der verbrauchten CH₃OH-Menge kann zwei Ursachen haben. Zum einen könnte, aufgrund von manuellen Abweichungen, eine höhere NADH-Menge als die eigentlich beabsichtigten 10 µmol zum Ansatz gegeben worden sein. Zum anderen könnte die am Beginn eingestellte CH₃OH-Konzentration von theoretisch 1560 µM höher als gewünscht gewesen sein. Aufgrund von technischen Problemen konnte in diesem Ansatz kein Nachweis der gebildeten HCHO-Konzentration erfolgen.

Die Daten aus dieser Messung zum CH₃OH-Umsatz sind mit den Daten aus dem diskontinuierlichen sMMO-Assay (Kapitel 3.4.4, S.109) mit CH₃OH als Substrat vergleichbar. Dabei wurden 230 µM CH₃OH nach fünf Minuten von 1 µM sMMO umgesetzt. In dem hier gezeigten Experiment wurden nach ebenfalls fünf Minuten Reaktion in etwa die dreifache CH₃OH-Konzentration (725 µM) von der dreifachen Menge an sMMO (3 µM) gebildet. Das Ergebnis dieses Versuches zeigte einmal mehr, dass die sMMO-Reaktion stark substratabhängig ist. In diesem Experiment mit CH₃OH als Substrat konnte eine vollständige Kopplung des NADH-Verbrauches an den CH₃OH-Umsatz beobachtet werden. Für Nitrobenzol wurde im

Gegensatz dazu eine Entkopplung des Elektronentransfers von der Produktbildung und eine H₂O₂-Produktion gemessen (siehe Kapitel 3.5.2.2.1, S.121). Für die Reaktionen der sMMO mit CH₄ als Substrat wurde eine höhere Kopplungseffizienz gemessen als für Nitrobenzol (siehe Kapitel 3.5.4, S.129). 100 % Kopplung wurden auch mit Zusatz von Katalase nicht erreicht. Dies könnte mit der geringeren Löslichkeit von CH₄ im Gegensatz zu CH₃OH begründet werden. CH₃OH ist in wässrigen Lösungen komplett mischbar, wohingegen CH₄ eine Löslichkeit bei 30 °C von 1,26 mM besitzt [Duan und Mao, 2006]. Mögliche CH₄-Limitierungen beim Massentransfer aus der Gas- in die Flüssigphase könnten potentielle Nebenreaktionen der sMMO begünstigen. Für weitere Messungen der sMMO mit CH₃OH als Substrat sollten höhere NADH-Mengen bzw. die Cofaktor-Regeneration durch die GDH getestet werden.

3.6.6 Zusammenfassung und Diskussion der *in vitro*-Messungen im Enzymreaktor mit CH₄ als Substrat

Die Ergebnisse aus Kapitel 3.6.1, S.139 und 3.6.2, S.141 zeigen erstmals die kontinuierliche Aufzeichnung der CH₃OH-Bildung durch die sMMO aus *M. trichosporium* OB3b mit CH₄ als Substrat. Die Analytik erfolgte mit Hilfe eines Massenspektrometers mit Membraneinlass, bei dem die Massensignale ausgewählter Reaktanden (He⁴; CH₄¹³; H₂O¹⁸; CH₃OH³¹), direkt aus der Flüssigphase gemessen wurden [Stier, 2017]. Dadurch gelang es die Reaktion der sMMO mit CH₄ als Substrat über einen Zeitraum von bis zu 130 Minuten nachzuverfolgen. Der positive Einfluss des Zusatzes von Katalase auf die CH₃OH-Bildung zeigte sich und eine finale CH₃OH-Konzentration von 1.750 µM wurde gemessen. Zudem konnte die erfolgreiche Vergrößerung des Reaktionsmaßstabes von 10 auf 250 mL Flüssigvolumen mit vergleichbarer CH₃OH-Bildung gezeigt werden. Die in den einzelnen Messungen errechneten Umsätze sind in Tabelle 3-30 zusammengefasst. Die Berechnung der Aktivität erfolgte anhand des linearen Anstieges der CH₃OH-Konzentration innerhalb der ersten fünf Minuten der jeweiligen Reaktion. Die höchste sMMO-Aktivität gegenüber CH₄ als Substrat wurde beim Test mit 5 mM NADH gemessen (1180 ± 370 mU*mg_{Aktive Zentren}⁻¹). Durch die Totzeit der Flüssigkeitspumpe zur MS-Analyse (Kapitel 3.6.1, S.139), kam es in den Messungen nach 0,5 bis zwei Minuten zu einem Sprung des Messsignals. Aufgrund dieser technischen Beeinträchtigung war die Bestimmung des linearen Anstieges gestört und bei einigen Messungen wurden hohe Abweichungen (> 10 % des Messwertes) berechnet. Die erhaltenen sMMO-Aktivitäten im CH₄-Assay (172 bis 1180 mU*mg_{Aktive Zentren}⁻¹) lagen im Bereich der Aktivitätswerte der Literatur. Für *Methylosinus trichosporium* OB3b werden sMMO-Aktivitäten von 235 ± 22 mU*mg_{Aktive Zentren}⁻¹ [Smith *et al.*, 2002], 480 mU*mg_{Aktive Zentren}⁻¹ [Wallar und Lipscomb, 2001] und 504 mU*mg_{Aktive Zentren}⁻¹ [Brazeau und Lipscomb, 2003] angegeben. Die sMMO-Aktivität bei *M. capsulatus* Bath wurde mit 390 mU*mg_{Aktive Zentren}⁻¹ [Gassner und Lippard, 1999] gemessen. Die Messung der sMMO-Aktivität in der Literatur erfolgte diskontinuierlich z.B. über eine Endpunktbestimmung der O₂-Konzentration. Im Gegensatz dazu wurden die Aktivitäten der eigenen Messungen direkt über die kontinuierliche gemessene CH₃OH-Konzentration bestimmt. Die Unterschiede bei den Aktivitäten einzelner Messungen sind durch die unterschiedliche Messmethode bzw. den Versuchsaufbau zu erklären. Die geringere sMMO-Aktivität innerhalb der Ansätze mit GDH ist durch die anfängliche NADH-Bildung in diesen Experimenten zu erklären. Dies wurde auch im Nitrobenzol-Assay beobachtet (Kapitel 3.5.2.1, S.119).

Tabelle 3-30: Zusammenfassung der Produktmengen, substratbezogenen Umsätze und der Aktivitäten in den sMMO-Reaktionen mit CH₄ und CH₃OH als Substrat im 10 bzw. 250 mL Reaktormaßstab.

Eingesetzte Enzymkomponenten	Finale Produktmenge [µmol CH ₃ OH+HCHO] (Reaktionszeit)	Umsatz CH ₄ ¹⁾ [%]	Umsatz O ₂ ¹⁾ [%]	Umsatz NADH/NAD ⁺ ¹⁾ [%]	sMMO-Aktivität [mU*mg _{Aktive Zentren} ⁻¹]
1 µM sMMO+ 1 mM NADH	5,4 (20 Minuten)	1,2	4,6	57	670 ± 130
1 µM sMMO+ 5 mM NADH	7,0 (20 Minuten)	1,4	5,7	14	1.180 ± 370
1 µM sMMO+ GDH. ²⁾ + Katalase	17,5 (90 Minuten)	3,6	14,2	175 (3,5) ³⁾	335 ± 45
1 µM sMMO+ GDH ²⁾	2,1 (10 Minuten)	0,5	1,8	21 (0,5) ³⁾	333 ± 62
1 µM MMOH+ 1µM MMOB+ 0.1 µM MMOR+ 1 mM NADH	3,2 (25 Minuten)	0,7	2,6	32	348 ± 70
1 µM MMOH+ 1µM MMOB+ 0.1 µM MMOR+ GDH ²⁾ + Katalase 10 mL-Maßstab	6,2 (100 Minuten))	1,3	5,8	62 (1,2) ³⁾	191 ± 81
1 µM MMOH+ 1µM MMOB+ 0,1 µM MMOR+ GDH ²⁾ + Katalase 250 mL-Maßstab	154 (130 Minuten)	1,0	2,1	62 (1,2) ³⁾	172 ± 42
3 µM sMMO 1 mM NADH + 1560 µM CH ₃ OH	4,5 (Δ= 11) (7 Minuten)	-	-	100	407 ± 15

¹⁾ CH₃OH und HCHO als Produkte berücksichtigt: CH₄ eingesetzt 488 µmol(10 mL)/15167 µmol (250 mL); O₂ 123 µmol (10 mL)/7267 µmol (250 mL); NADH/NAD⁺ 10 bzw. 50 µmol NADH/NAD⁺; Glucose 500 µmol (10 mL)/12500 µmol (250 mL)

²⁾GDH =Cofaktor-Regeneration mittels GDH + 1 mM NAD⁺ + 50 mM D-Glucose

³⁾ Umsatz bezogen auf D-Glucose 500 µmol (10 mL)/12500 µmol (250 mL)

⁴⁾ Startaktivität berechnet anhand des linearen Anstieges bzw. Abfalls der CH₃OH-Konzentration (0 bis 5 Minuten in der Reaktion)

Die Verringerung der MMOR-Konzentration führte in der Summe zu einer geringeren CH₃OH-Bildung. Die MMOR-Reduktion von 1 auf 0,1 µM war nötig, um eine Maßstabsvergrößerung von 10 auf 250 mL durchführen zu können. Bei Vergleich der Messungen im 10 bzw. 250 mL-Maßstab wurde eine korrespondierende CH₃OH-Bildung gemessen. Eine Verbesserung der Kopplungseffizienz infolge der MMOR-Reduktion wurde, im Gegensatz zur Literatur (sMMO aus *M. capsulatus* Bath [Gassner und Lippard, 1999]), nicht beobachtet. Für weitere Untersuchungen sollte deshalb ein äquimolares MMOH_{aktive Zentren}:MMOR-Verhältnis im 250 mL-Maßstab eingesetzt werden. Um dies zu gewährleisten ist eine ausreichende Bereitstellung mit gereinigter Reduktase nötig.

Diese Arbeit ist die erste Studie, bei der es gelang die natürliche sMMO-Reaktion über einen kontinuierlichen Test zu verfolgen. Die erhaltenen Daten zeigen, dass mit Hilfe der Enzymkaskade aus sMMO, GDH und Katalase die Produktausbeuten um Faktor drei gesteigert werden konnten und dass die sMMO-Reaktion über einen Zeitraum von bis zu 130 Minuten nachweisbar war. Weiterhin konnte das Verhältnis der Produkte CH₃OH und HCHO (20:1 im

250 mL-Maßstab) genau bestimmt werden. Zudem wurde gezeigt, dass die sMMO CH_3OH als alleiniges Substrat vollständig umsetzen kann. Die hier eingesetzte Analytik für die CH_3OH -Bestimmung mittels Massenspektrometer wurde bisher nur für Untersuchungen der FDM-Aktivität eingesetzt [Stier, 2017].

Mit Produktkonzentrationen von 500 bis 1.750 μM CH_3OH lassen sich die eigenen Daten in die heutige Literatur zur CH_3OH -Bildung aus CH_4 über Methan-Monooxygenasen wie folgt einordnen. Eine CH_3OH -Bildung über die partikuläre Methan-Monooxygenase (pMMO) aus *M. capsulatus* Bath wird von Blanchette und Kollegen beschrieben [Blanchette *et al.*, 2016]. Dabei wurde die pMMO-haltige Membranfraktion nach Zellaufschluss, zur Reaktion von CH_4 zu CH_3OH eingesetzt. Die Aktivitäten der pMMO lagen zwischen 80 bis 130 $\text{mU}\cdot\text{mg}^{-1}$. Bei einmaliger Verwendung der Membranfraktionen im Test mit CH_4 als Substrat wurde nach vier Minuten Reaktion eine CH_3OH -Menge von 60 bis 75 nmol gebildet. Dies entsprach einer CH_3OH -Menge, bezogen auf die eingesetzte Enzymkonzentration und die Reaktionszeit, von $0,125 \mu\text{mol}_{\text{CH}_3\text{OH}}\cdot\text{mg}_{\text{pMMO}}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Im Vergleich zu diesen Messungen wurde innerhalb der eigenen Reaktorexperimente mit der sMMO aus *M. trichosporium* OB3b eine maximale CH_3OH -Bildungsrate von $0,215 \mu\text{mol}_{\text{CH}_3\text{OH}}\cdot\text{mg}_{\text{Aktive Zentren}}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ mit NADH (Tabelle 3-26, S.140) und $0,155 \mu\text{mol}_{\text{CH}_3\text{OH}}\cdot\text{mg}_{\text{Aktive Zentren}}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ mit Katalase und Cofaktor-Regeneration (Tabelle 3-27, S.143) berechnet. Die Literaturdaten und die Werte der eigenen Messungen liegen, trotz der Unterschiede bei den verwendeten Enzym und dem Messaufbau beieinander. Der Vorteil der eigenen Experimente war, dass die sMMO über einen langen Zeitraum, von bis zu 130 Minuten aktiv war und somit, im Vergleich zur Literatur, um den Faktor 25 höhere CH_3OH -Konzentrationen erreicht wurden. Dies zeigte sich auch bei Vergleich der Messung im 250 mL-Maßstab. Die pMMO-Membranfraktion wurde in ein Polyethylenglycol-Hydrogel eingeschlossen und dann in einem Durchflussreaktor zur CH_3OH -Bildung eingesetzt. Die maximale CH_3OH -Menge entsprach $5,4 \text{ nmol}_{\text{CH}_3\text{OH}}\cdot\text{mg}_{\text{pMMO}}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ [Blanchette *et al.*, 2016]. Dagegen konnte nach 130 Minuten im 250 mL-Maßstab eine sechsfach höhere CH_3OH -Bildungsrate von $33,2 \text{ nmol}_{\text{CH}_3\text{OH}}\cdot\text{mg}_{\text{Aktive Zentren}}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ gemessen werden.

Für eine potentielle technische Nutzung der sMMO zur CH_3OH -Bildung wären weitere Untersuchungen nötig, da z.B. die finale CH_3OH -Konzentration gering war. Zielsetzung der Entwicklung technischer Biokatalysatoren ist die Erhöhung des Gesamtumsatzes (*total turnover number*, TTN). Für die sMMO konnte durch Einsatz der Enzymkaskade die TTN von 540 auf maximal 1750 erhöht werden. Für einen industriellen Einsatz ist ein höherer Wert nötig. Für die Synthese von L-Phenylalanin durch die L-Phenylalanin-Dehydrogenase wurde eine TTN von bis zu 600.000 bestimmt [U. Kragl *et al.*, 1996]. Bisher ist eine robuste biokatalytische Produktion von CH_3OH aus CH_4 noch nicht etabliert. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ansätze eröffnen einen ersten Schritt für die Anwendbarkeit der sMMO. Die Kombination der einfachen Bereitstellung größerer Enzymmengen (Kapitel 3.2, S.68 und 3.3, S.84) und die Anwendung im Enzymreaktor unter kontrollierten Bedingungen mit Echtzeitanalytik, schaffen eine Basis für weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet. Um die Wiederverwendbarkeit der sMMO zu untersuchen und zu verbessern, wurden nachfolgend erste Versuche zur Immobilisierung der sMMO durchgeführt.

3.7 Untersuchungen zur Immobilisierung der sMMO

Im Rahmen dieser Arbeit sollten erstmals Experimente zur Immobilisierung (Kapitel 1.1.4, S.17) der sMMO mit Nachweis der Aktivität durchgeführt werden. Als erste Methode der Immobilisierung sollte die Bindung des Enzyms an ein Trägermaterial untersucht werden. Berücksichtigt man den Reaktionsablauf und dessen Dynamik (siehe Kapitel 1.1.2.3, S.12), sollte für den Erhalt der Aktivität eine der sMMO-Komponente fest an einen Träger gebunden werden. Als Verbindung zum Träger wurde zunächst die Hydroxylase untersucht, da diese Komponente das katalytische Zentrum der sMMO beinhaltet und die Reduktase sowie das regulatorische Protein B im Reaktionsverlauf an die Hydroxylase binden. Es wurde zunächst eine ungerichtete Immobilisierung untersucht, da die MMOH bisher nicht erfolgreich rekombinant hergestellt werden konnte. Somit war für dieses Protein nicht die Möglichkeit einer Verknüpfung über einen Protein-tag an das Trägermaterial gegeben. Bisher sind keine Daten zur Immobilisierung der sMMO publiziert. Aus diesem Grund sind die nachfolgend beschriebenen Ergebnisse als erste Machbarkeitsstudie zu betrachten. Die Eigenschaften der für die Immobilisierung verwendeten Trägermaterialien sind im Anhang in Tabelle 7-11, S.198 zusammengefasst.

3.7.1 Ungerichtete Immobilisierung der MMOH

Für die ungerichtete Immobilisierung können verschiedene Methoden eingesetzt werden. Die Bindung des Enzyms an den Träger kann z.B. über Amino-, Thiol- oder über Carboxylgruppen erfolgen. Um sich für eine dieser Möglichkeiten zu entscheiden, wurde die Oberfläche der MMOH analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Anordnung der Aminogruppen der Lysin-Seitenketten am besten für die Immobilisierung geeignet war. Im Vergleich zu den Carboxylgruppen waren die Lysine weniger um das aktive Zentrum angeordnet. Da während der sMMO-Reaktion sowohl MMOR als auch MMOB im Bereich des aktiven Zentrums an die MMOH binden, sollte eine Verknüpfung an dieser Position vermieden werden. Die Kristallstruktur mit Kennzeichnung der potentiellen Seitenketten-Bindungsstellen ist in Abbildung 3-58 A dargestellt. Das verwendete Trägermaterial bestand aus Polymethacrylat mit Epoxid-Gruppen auf der Oberfläche (ReliZyme™). Die Immobilisierung der Hydroxylase erfolgte über die ungerichtete Bindung des Proteins mit Thiol- bzw. Aminogruppen der Cystein- und Lysin Seitenketten an die Epoxid-Gruppen des Trägers. Für die untersuchte Bindung mittels Thiol- und Aminogruppen wurden einige Bindungsstellen in der Nähe des aktiven Zentrums bzw. im Bereich des Areal der Bindung von MMOR und MMOB detektiert. Deshalb wurde als Ergebnis der Immobilisierung eine Verteilung von aktiven und inaktiven MMOH-Molekülen erwartet (siehe Kapitel 1.1.4, S.17; Abbildung 1-13, S.18 und Abbildung 3-58 B). Infolge einer nicht optimalen Bindung des Enzyms an den Träger könnte das aktive Zentrum für MMOB bzw. MMOR unzugänglich sein. Eine Inaktivierung könnte auch durch eine irreversible Zerstörung des Proteins während des Immobilisierungsprozesses verursacht werden. Die Immobilisierung erfolgte wie in Kapitel 2.3.4.1, S.34 beschrieben. Die Versuche waren angelehnt an die Arbeit von Mateo und Kollegen. Sie nutzten einen anderen Träger (Sepabeads mit Epoxid-Gruppen funktionalisiert) und konnten nach der Immobilisierung die Aktivität des dort verwendeten Enzyms Penicillin-G-Acylase nachweisen [Mateo *et al.*, 2002].

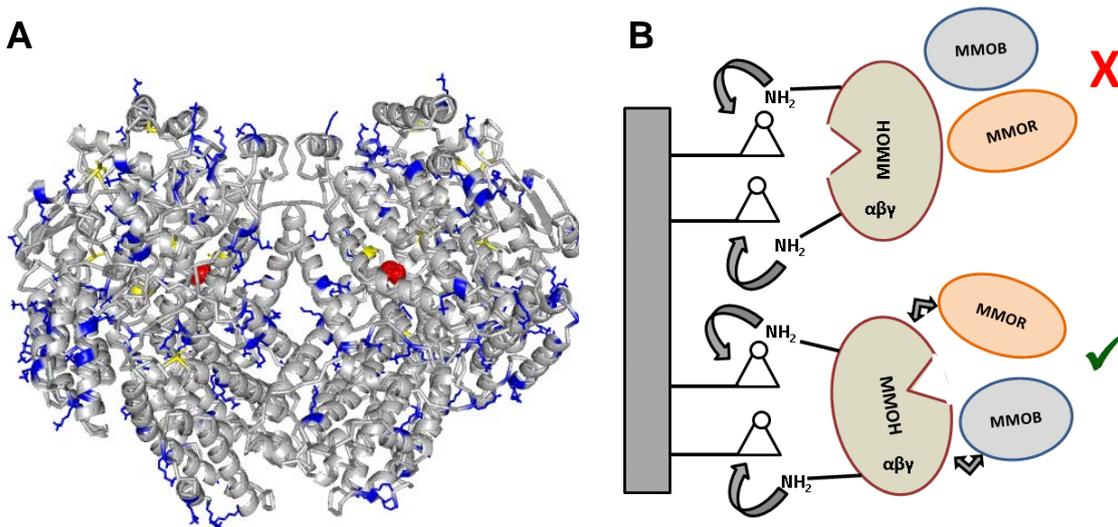


Abbildung 3-58: A-Kristallstruktur der MMOH aus *Methylosinus trichosporium* Ob3B (Ribbon-Darstellung) mit Lysin (blau) und Cystein (gelb) in sticks-Darstellung auf der Oberfläche gekennzeichnet; Eisen-Atome im aktiven Zentrum als sphere-Darstellung (rot), erstellt mit Programm PyMOL, PDB Datei 1MTY. B-Schematische Darstellung der ungerichteten Bindung der MMOH ($\alpha\beta\gamma$) an das Trägermaterial (ReliZyme™). Oben Verdeckung des aktiven Zentrums → keine bzw. verringerte Aktivität; unten aktives Zentrum frei → Aktivität möglich (Abbildung in Anlehnung an [Mateo et al., 2000])

Die sMMO-Aktivität des immobilisierten Enzyms wurde zunächst im Nitrobenzol-Assay analysiert. Das Ergebnis der MMOH-Bindung ist in Tabelle 3-31 zusammengefasst. Die eingesetzte MMOH-Menge konnte zu 93 % an das eingesetzte Trägermaterial gebunden werden. Im Überstand und in den Waschfraktionen wurde ein Proteinanteil von insgesamt 7 % ohne sMMO-Aktivität nachgewiesen. Eine Bindung von MMOB bzw. MMOR (jeweils 3 μM eingesetzt) an das Trägermaterial war nicht gegeben. Bei Verwendung der immobilisierten MMOH (3 μM an 20 mg Träger) im Nitrobenzol-Assay wurden spezifische sMMO-Aktivitäten von $0,35 \pm 0,06$ bzw. $0,41 \pm 0,01 \text{ mU} \cdot \text{mg}_{\text{Aktive Zentren}}^{-1}$ gemessen. Die Messungen im Nitrobenzol-Assay erfolgten spektroskopisch (A_{420}) und per HPLC-Analyse der Produktüberstände (Kapitel 2.4.4.2.13., S.42). Die gemessene sMMO-Aktivität entsprach einer Restaktivität von 0,3 % im Vergleich zum freien Enzym (bezogen auf die an den Träger gebundene Enzymmenge, 3 μM). Nach dem wiederholten Einsatz der immobilisierten MMOH-Fraktion wurden noch 25 % der sMMO-Restaktivität ($0,1 \text{ mU} \cdot \text{mg}_{\text{Aktive Zentren}}^{-1}$) gemessen.

Tabelle 3-31: Proteinkonzentration und sMMO-Aktivität bei Bindung der MMOH an 20 mg ReliZyme™. Proteinkonzentration gemessen über A_{280} (100 % = 3 μM bzw. $0,375 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MMOH) und sMMO-Aktivität im Nitrobenzol-Assay

Name	Protein [%]	Spezifische sMMO-Aktivität [$\text{mU} \cdot \text{mg}_{\text{Aktive Zentren}}^{-1}$]
Blank	$100,0 \pm 12,0$	137
Überstand NaH_2PO_4	$2,3 \pm 1,4$	Keine sMMO-Aktivität nach Zusatz von MMOB und MMOR nachweisbar
Waschfraktionen Phosphat Puffer	$1,4 \pm 1,5$	
Überstand Glycin Puffer	$2,2 \pm 1,1$	
Waschfraktionen Glycin Puffer	$0,3 \pm 0,0$	

Die gemessenen Aktivitäten waren im Vergleich zu den Werten des freien Enzyms sehr gering. Dies könnte durch eine Interaktion der Substrate bzw. Produkte mit dem Trägermaterial

verursacht worden sein. Dazu wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt. An 20 mg Trägermaterial adsorbierte nach 25 Minuten Inkubation bei 30 °C 66 % der eingesetzten *p*-Nitrophenolkonzentration (33 µM von anfangs 50 µM) und 64 % der Nitrobenzolkonzentration (0,64 mM von anfangs 1 mM NB). Diese vornehmlich hydrophobe Wechselwirkung zwischen Träger und Substrat bzw. Produkt sollte durch Zusatz eines Detergenz verringert werden. Nach Zusatz von Triton X-100 zum Ansatz konnte die Adsorption um Faktor zwei verringert werden. Aber durch das Detergenz reduzierte sich im Testansatz mit freiem Enzym die sMMO-Aktivität um 50 %. Eine weitere Verwendung von Triton X-100 fand deshalb nicht statt. Eine genaue Aussage über die Immobilisierung der MMOH an das Trägermaterial konnte auf Basis der genannten Daten nicht erfolgen, da der eingesetzte Aktivitätstest mit Nitrobenzol als Substrat und *p*-Nitrophenol als Produkt aufgrund der Wechselwirkung mit dem Trägermaterial ungeeignet war. Um die Aktivität der immobilisierten MMOH genauer zu testen, erfolgte die Messung der CH₃OH-Bildung im diskontinuierlichen CH₄-Assay. Das Trägermaterial mit der gebundenen MMOH wurde in Messpuffer (25 mM MOPS 50 mM NaCl, pH 7,5) resuspendiert und MMOR bzw. MMOB äquimolar zugegeben. Nach Zugabe der Proteine und des Immobilisats wurde das gasdichte Vial verschlossen und 20 % der Atmosphäre durch CH₄ ausgetauscht. Die Reaktion wurde durch Zugabe von NADH gestartet und nach Öffnen des Vials und Säure-Zugabe abgestoppt. Die CH₃OH-Konzentration im Überstand wurde mittels GC-HSS gemessen und daraus die entsprechenden Aktivitäten bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-32 zusammengefasst.

Tabelle 3-32: Gemessenen CH₃OH-Konzentrationen und daraus resultierende sMMO-Aktivitäten nach Immobilisierung von MMOH an ReliZyme™ und Test im CH₄-Assay. Dargestellt sind Daten aus n= zwei Messungen. Folgende Bedingungen wurden eingestellt: Trägermaterial 100 mg; gebundenes Protein 1,0 mg MMOH * mg Trägermaterial⁻¹ = 8 µM MMOH pro 100 mg Material. MMOB 8 µM; MMOR 8 µM; 1 mM NADH; 1,6 mL CH₄ (63,5 µmol); 1,35 mL O₂ (53,9 µmol); Messpuffer 25 mM MOPS 50 mM NaCl, pH 7,5; Temperatur 30 °C; Messzeit 15 Minuten; 1 mL Flüssigvolumen; 8 mL Gasraum. Nach Reaktion Reaktionsstopp mittels Säure-Zugabe auf pH 3 bis 4, Zentrifugation und Analyse des Überstands mittels GC-HSS.

Name	CH ₃ OH [µM]	Spezifische sMMO-Aktivität [nmol CH ₃ OH*min*mg _{Aktive Zentren} ⁻¹]
MMOH an ReliZyme™ + MMOB + MMOR	72,2 ± 0,6	4,8 ± 0,1
ReliZyme™ + MMOB + MMOR	0	0
MMOB und MMOR	0	0
MMOH+ MMOB+ MMOR als freies Enzym	728 ± 51	48,5 ± 3,4

Die gemessene CH₃OH-Konzentration bzw. sMMO-Aktivität, die mit immobilisierter MMOH gemessen wurde, entsprach 10,2 % der sMMO-Aktivität des freien Enzyms unter identischen Bedingungen. Die Aktivität lag um Faktor zehn höher als im Nitrobenzol-Assay mit immobilisierter MMOH. Die Ursache für diese Steigerung war vermutlich die zuvor beschriebene Wechselwirkung des Trägermaterials mit Nitrobenzol und *p*-Nitrophenol. Ohne MMOH bzw. mit Trägermaterial ohne gebundene MMOH wurde, wie erwartet, keine CH₃OH-Bildung gemessen. Die Verringerung der Aktivität des Immobilisats, im Vergleich zum freien Enzym, war mit der Inaktivierung bzw. nicht optimalen Bindung der MMOH an den Träger zu erklären. Zudem war die Diffusion des Substrates CH₄ in die Poren des Trägermaterials ein weiterer limitierender Faktor, der die CH₃OH-Bildung im Vergleich zum freien Enzym verringern könnte. Die Aktivität der immobilisierten sMMO sollte ohne die Inaktivierung durch eine ungezielte Bindung des Enzyms an den Träger zu untersucht werden. Dazu wurde im Folgenden die gerichtete Immobilisierung einer sMMO-Komponente untersucht.

3.7.2 Gerichtete Immobilisierung von SUMO-MMOB

Um die teilweise Inaktivierung des Zielenzym infolge der ungerichteten Immobilisierung zu vermeiden, wurde die gerichtete Immobilisierung der sMMO untersucht. In Aktivitätsmessungen im Nitrobenzol-Assay zeigte sich, dass die sMMO-Aktivität bei Verwendung von SUMO-MMOB vergleichbar mit der Aktivität unter Einsatz von MMOB war (siehe Abbildung 3-37, S.109). SUMO-MMOB besitzt einen 6-fachen His-tag am N-Terminus. Dieser wird zur Reinigung des rekombinant produzierten MMOB verwendet [Dillmann, 2014; Kind, 2016]. Über diesen His-tag kann eine Bindung des Proteins an ein Trägermaterial erfolgen. Da MMOB während der gesamten sMMO-Reaktion an die Hydroxylase bindet (siehe Abbildung 1-8, S.13), könnte SUMO-MMOB während der sMMO-Reaktion als Bindestelle für die anderen sMMO-Komponenten dienen. MMOR bzw. MMOH sollten nach der Fixierung von SUMO-MMOB als lösliche Proteine der Reaktion zugesetzt werden. Als Trägermaterial wurde das bereits in der Reinigung verwendete *Streamline Chelating*-Material eingesetzt (siehe Kapitel 2.3.4.2, S.35). Ein Schema der Immobilisierung von SUMO-MMOB ist in Abbildung 3-59 dargestellt.

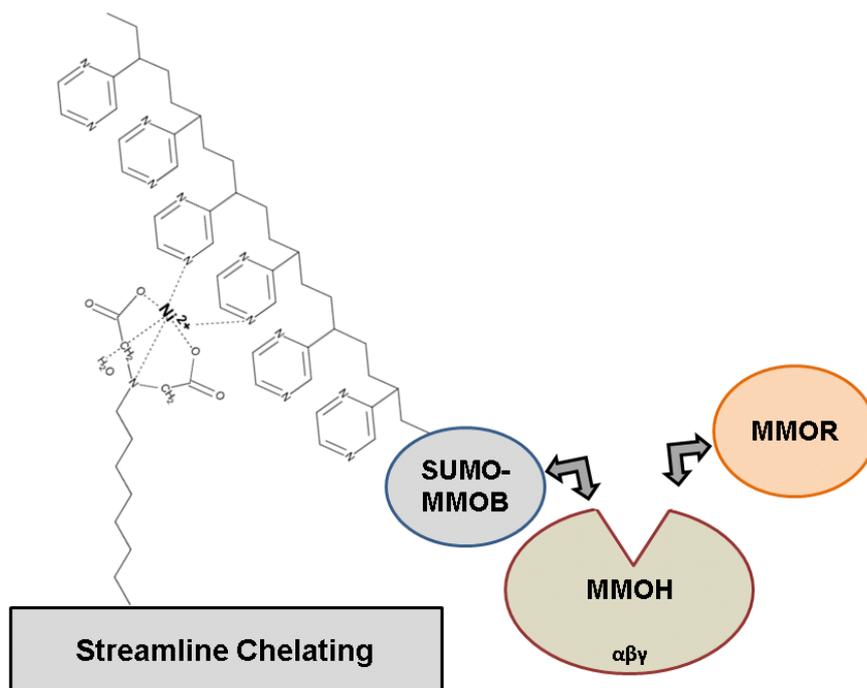


Abbildung 3-59: Schematische Darstellung der Wechselwirkung des His₆-SUMO-MMOB Proteins mit dem Trägermaterial *Streamline Chelating* (beladen mit Ni(II)), sowie mit den sMMO-Komponenten MMOH (αβγ).

Zunächst erfolgten Messungen zur Untersuchung der unspezifischen Bindung der sMMO-Komponenten (MMOH; MMOB; MMOR; SUMO-MMOB) an das Trägermaterial, das Ergebnis ist in Tabelle 3-33 aufgelistet. MMOB (15 %) und MMOR (0 %) haben nur zu einem geringen Teil bzw. nicht an das beladene Trägermaterial gebunden. Wie aus den Reinigungsexperimenten zu erwarten war, wurde SUMO-MMOB vollständig am Trägermaterial gebunden [Dillmann, 2014]. Unerwarteter Weise wurde für MMOH eine Interaktion mit dem beladenen Trägermaterial beobachtet. Nur 30 % der MMOH-Proteinmenge wurde nach Inkubation mit dem Material im Überstand gemessen. Eine Erklärung für die Interaktion von MMOH mit dem beladenen Ni(II)-Material war nicht bekannt.

Tabelle 3-33: Anteil an gebundenen Protein(A₂₈₀ in %) bei Ni(II) beladenem und unbeladenem *Streamline Chelating*-Trägermaterial. Die Proteinmenge ohne Material in Puffer wurde bei 280 nm vermessen und für jede Komponente als 100 % Wert gesetzt.

Name	Mit Ni(II) beladenes Material				Unbeladenes Material
	SUMO-MMOB [5 µM 1,4 mg*mL ⁻¹]	MMOR [3 µM 1,2 mg*mL ⁻¹]	MMOH [2 µM 0,3 mg*mL ⁻¹]	MMOB [5 µM 1,4 mg*mL ⁻¹]	MMOH [2 µM 0,3 mg*mL ⁻¹]
Blank [%]	100	100	100	100	100
Überstand [%]	8,7 ± 5,3	86,9 ± 0,1	23,1 ± 1,3	73,3 ± 0,1	94,4 ± 4,3
Waschfraktion [%]	0	14,7 ± 0,6	2,6 ± 0,4	12,7 ± 2,8	9,9 ± 1,2
Gebundener Anteil	91 %	0 %	70 %	15 %	0 %

In ersten Aktivitätsmessungen mit dem beladenen *Streamline Chelating*-Material wurde im Nitrobenzol-Assay eine sMMO-Aktivität von $0,13 \pm 0,01 \text{ mU} \cdot \text{mg}_{\text{Aktive Zentren}}^{-1}$ gemessen. Die Ursache für diese geringe Aktivität, im Vergleich zu dem löslichen Enzym (Faktor 100 höher), war die Interaktion der Hydroxylase mit dem beladenen *Streamline Chelating*-Material. Bei einer Bindung von MMOH und SUMO-MMOB an unterschiedlichen Orten des Trägers ist eine Produktbildung nicht möglich. Um diese Wechselwirkung von MMOH mit dem Material zu vermeiden und die sMMO-Aktivität zu erhöhen, erfolgten weitere Versuche bei denen eine Komplettbeladung des Materials mit SUMO-MMOB erfolgte. Das Trägermaterial wurde mit SUMO-MMOB inkubiert, bis keine Reduktion der Proteinkonzentration im Überstand mehr nachgewiesen wurde. Die Menge an SUMO-MMOB die zur vollständigen Beladung nötig war entsprach $72 \mu\text{g}_{\text{SUMO-MMOB}} \cdot \text{mg}_{\text{Trägermaterial}}^{-1}$. Mit vollständig mit SUMO-MMOB beladenem Material (20 mg) konnte im Nitrobenzol-Assay eine 25-fach höhere sMMO-Aktivität ($3,3 \pm 0,1 \text{ mU} \cdot \text{mg}_{\text{Aktive Zentren}}^{-1}$) gemessen werden. Bei der zweiten Verwendung des Trägermaterials mit SUMO-MMOB-Komplettbeladung wurden 33% der zuvor gemessenen Aktivität nachgewiesen ($1,1 \pm 0,3 \text{ mU} \cdot \text{mg}_{\text{Aktive Zentren}}^{-1}$ gemessen). Eine Adsorption von Nitrobenzol bzw. *p*-Nitrophenol an das Trägermaterial mit bzw. ohne SUMO-MMOB wurde nicht beobachtet. Die gemessene Aktivität war im Vergleich zu den Daten die mit löslichem Enzym erhoben wurden ($100 \text{ bis } 150 \text{ mU} \cdot \text{mg}_{\text{Aktive Zentren}}^{-1}$) gering. Eine Ursache könnten Diffusionslimitierungen des Substrates gewesen sein. Auf Grundlage der Tests mit dem artifiziellen Substrat Nitrobenzol erfolgten Messungen mit CH₄ als natürlichem Substrat der sMMO. Die Messungen mit CH₄ als Substrat erfolgten mit der gleichen Vorgehensweise wie die Experimente für die ungerichtete Immobilisierung (Kapitel 2.4.4.2.15, S.44). Für diese Messungen wurde *Streamline Chelating*-Material vollständig mit SUMO-MMOB beladen und anschließend in Messpuffer in einem gasdicht verschließbaren Glasvial resuspendiert. Nach Zugabe von MMOH und MMOR wurde das Gefäß verschlossen, 20 % der Atmosphäre mit CH₄ ausgetauscht und die Die sMMO-Reaktion durch NADH-Zugabe (1 mM) gestartet. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle 3-34 zusammengefasst.

Im CH₄-Assay wurde eine CH₃OH-Bildung sowohl für Messungen mit Material ohne SUMO-MMOB, als auch ohne Material mit freiem MMOH und MMOR detektiert. Das MMOR und MMOH ohne Zusatz von MMOB die sMMO-Reaktion katalysieren können, wurde bereits beschrieben [Fox *et al.*, 1989]. In Anwesenheit von MMOB wird die Reaktion abhängig vom Substrat bis zu Faktor 100 beschleunigt. In eigenen Experimenten wurde ohne MMOB im Nitrobenzol-Assay eine 20-fach geringere Aktivität gemessen (siehe Abbildung 3-37, S. 109). In den Immobilisierungsversuchen wurden im Ansatz mit unbeladenem Trägermaterial bzw. ohne Material Aktivitäten von 23,2 bzw. 31,1% der Aktivität des freien Enzyms gemessen.

Die sMMO-Aktivität und CH₃OH-Konzentration mit Komplettbeladung des Trägermaterials waren um 22 % höher als die Aktivität und Konzentration bei der Messung mit freier sMMO ohne Trägermaterial. Die Bindung von SUMO-MMOB an den Träger könnte eine verbesserte Stabilität des sich bildenden sMMO-Komplexes zur Folge haben. Dies könnte die Ursache für die höhere Produktbildung im Vergleich zum freien Enzym gewesen sein.

Tabelle 3-34: Gemessenen CH₃OH-Konzentrationen und berechnete sMMO-Aktivitäten nach Immobilisierung von SUMO-MMOB an *Streamline Chelating*-Material und Test im CH₄-Assay. Dargestellt sind Daten aus n= zwei Messungen. Folgende Bedingungen wurden eingestellt: 100 mg Trägermaterial; 72 µg_{SUMO-MMOB}*mg_{Trägermaterial}⁻¹ (= 250 µM MMOB pro 100 mg Trägermaterial); 8 µM MMOH; 8 µM MMOR; 1 mM NADH; 1,6 mL CH₄ (63,5 µmol); 1,35 mL O₂ (53,9 µmol); Messpuffer 25 mM MOPS 50 mM NaCl, pH 7,5; Temperatur 30 °C; Messzeit 15 Minuten; 1 mL Flüssigvolumen; 8 mL Gasraum. Nach Reaktion Reaktionsstopp mittels Säure-Zugabe auf pH 3 bis 4, Zentrifugation und Analyse des Überstands mittels GC-HSS.

Name	CH ₃ OH [µM]	Spezifische sMMO-Aktivität [nmol CH ₃ OH*min*mg _{Aktive Zentren} ⁻¹]
Material Komplettbeladung mit SUMO-MMOB+ MMOH+ MMOR	654 ± 30	43,6 ± 2,0
Material + MMOH+ MMOR	125 ± 11	8,3 ± 0,7
MMOH+ MMOR	166 ± 10	11,1 ± 0,7
MMOH+ MMOR+ SUMO-MMOB als freies Enzym ¹⁾	536 ± 111	35,7 ± 7,4

¹⁾ 8 µM SUMO-MMOB verwendet

MMOB bzw. SUMO-MMOB wirken bei höheren Konzentrationen inhibierend auf die Zielproduktbildung (siehe Kapitel 1.1.2.3, S.12). Infolge der Konkurrenz von MMOB mit MMOR um die Bindestelle an der Hydroxylase wird der Elektronentransfer auf das aktive Zentrum bei hohen MMOB-Konzentrationen behindert bzw. gestoppt. Im Ansatz mit der Komplettbeladung des Trägermaterials wurde eine 30-fach höhere SUMO-MMOB-Konzentration als im Ansatz mit freiem Enzym eingesetzt. Eine Inhibition durch die höhere SUMO-MMOB-Konzentration wurde in diesen Messungen nicht beobachtet. Die Ursache dafür war die feste Bindung von SUMO-MMOB an das Material. Dadurch war die Konkurrenz mit MMOR um die MMOH-Bindestelle eingeschränkt. In Messungen mit erhöhten SUMO-MMOB: MMOH-Konzentrationen im Nitrobenzol-Assay wurde bereits eine geringere Reduktion der sMMO-Aktivität im Vergleich zu MMOB beobachtet (Anhang Tabelle 7-4, S.187). Um den Einfluss von höheren SUMO-MMOB: MMOH-Verhältnissen auch mit dem natürlichen Substrat CH₄ zu untersuchen, erfolgten weitere Experimente. Das Ergebnis ist in Tabelle 3-35 zusammengefasst.

Wie bereits für das artifizielle Substrat Nitrobenzol beobachtet (Anhang Tabelle 7-4, S.187), verringerte sich die sMMO-Aktivität bei Erhöhung der MMOB/SUMO-MMOB-Konzentration. Weiterhin konnte analog zu den Messungen im Nitrobenzol-Assay, eine geringere Reduktion der sMMO-Restaktivität für 15-fachen Überschuss an SUMO-MMOB (70 % CH₄; 47 % Nitrobenzol) im Vergleich zur 15-fachen MMOB-Konzentration (38 % CH₄; 36 % Nitrobenzol) gemessen werden. In der Literatur wurde im CH₄-Test der sMMO bei einer Erhöhung des MMOB: MMOH-Verhältnisses nur eine geringe Reduktion der sMMO-Aktivität gemessen (90 % Restaktivität, 430 mU * min⁻¹*mg_{Aktive Zentren}⁻¹, bei 16 fachem MMOB-Überschuss) [Wallar und Lipscomb, 2001]. Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit, mit Nitrobenzol bei gleichem MMOB: MMOH-Verhältnis, eine Verringerung der Aktivität auf 42 % bestimmt. Als Ursache für die unterschiedlichen Werte bei beiden Substraten wird, in der der Veröffentli-

chung von Waller und Lipscomb die Messung bzw. das Messprinzip der Produkte angegeben. *p*-Nitrophenol wurde direkt gemessen, wohingegen die CH₃OH-Bildung über den O₂-Verbrauch berechnet wurde. Da Entkopplungen des O₂-Verbrauchs und der CH₃OH-Bildung, z.B. bei höheren MMOB-Konzentrationen nicht korrelieren, wurde dies in der Veröffentlichung als potentielle Fehlerquelle genannt. Bei den eigenen Messungen erfolgte sowohl die *p*-Nitrophenol, als auch die CH₃OH-Messung direkt und die genannte Fehlerquelle konnte vermieden werden.

Tabelle 3-35: Spezifische Aktivität der sMMO bei verschiedenen MMOB/SUMO-MMOB zu MMOH Verhältnissen. Daten entsprechen Mittelwerten aus n= zwei Messungen. Folgende Bedingungen wurden eingestellt: MMOH_{aktive Zentren}:MMOR = 1:1 µM; 1 mM NADH; 1,6 mL CH₄ (63,5 µmol); 1,35 mL O₂ (53,9 µmol); Messpuffer 25 mM MOPS 50 mM NaCl, pH 7,5; Temperatur 30 °C; Messzeit zehn Minuten; 1 mL Flüssigvolumen; 8 mL Gasraum. Nach Reaktion Reaktionsstopp mittels Säure-Zugabe (0,5 M Essigsäure) auf pH 3 bis 4, Zentrifugation und Analyse des Überstands mittels GC-HSS.

Verhältnis MMOB/SUMO-MMOB zu MMOH [µM]	Enzymaktivität [nmol CH ₃ OH * min ⁻¹ *mg _{Aktive Zentren} ⁻¹]	
	MMOB	SUMO-MMOB
1	270,0 ± 33,1	235,9 ± 1,3
15	102,8 ± 8,5	165,8 ± 26,7

Bei vorigen Messungen im Nitrobenzol-Assay (Kapitel 3.4.3, S.108) ohne SUMO-MMOB wurde eine Restaktivität von 5 % gemessen. Eine Produktbildung der sMMO ohne MMOB wird auch in der Literatur beschrieben. Mit CH₄ und Furan als Substrat wurden Restaktivitäten von 7,5 % bei CH₄ und 7,1 % bei Furan detektiert [Brazeau und Lipscomb, 2003]. Die geringere Reduktion der Aktivität bei Verwendung einer höheren Konzentration an SUMO-MMOB im Gegensatz zu MMOB, könnte mit der Bindung der Proteine an die Hydroxylase erklärt werden. Trotz der zusätzlichen Aminosäuresequenz am N-Terminus von MMOB war es mit SUMO-MMOB möglich an die Hydroxylase zu binden und die sMMO-Reaktion zu beschleunigen. Der N-Terminus bzw. die ersten 13 Aminosäuren von MMOB sind für diese Bindung essentiell, da ohne sie keine effektive Bindung an MMOH erfolgen kann. Beim Überschuss von MMOB im Verhältnis zu MMOH wird die Bindung von MMOR an MMOH gehemmt. Dieser nachteilige Effekt könnte bei den Messungen mit SUMO-MMOB, aufgrund der zusätzlichen Aminosäuren, geringer als für MMOB gewesen sein. Dies könnte auch bei den Versuchen zur Immobilisierung von SUMO-MMOB und dem Einsatz im Test mit CH₄ als Substrat zu der höheren CH₃OH-Bildung des Immobilisats im Vergleich zum freien Enzym mit SUMO-MMOB geführt haben. Um genauere Aussagen über den Vergleich von immobilisiertem und freiem Enzym zu treffen, müsste entweder die kontinuierliche CH₃OH-Messung oder eine deutliche Erhöhung der Datendichte der Messungen im diskontinuierlichen Ansatz erfolgen. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Die Ergebnisse der gerichteten Immobilisierung von SUMO-MMOB zeigten, dass das Protein für eine Immobilisierung und anschließende Aktivitätsmessungen geeignet war. Allerdings musste eine Komplettbeladung des Trägermaterials mit SUMO-MMOB erfolgen, um die störende Bindung von MMOH an das Material zu vermeiden. Mit dem vollständig beladenen Material gelang es sMMO-Aktivität, sowohl im Nitrobenzol-Assay, als auch mit dem natürlichen Substrat CH₄ nachzuweisen. Im Vergleich zur unspezifischen Bindung der Hydroxylase wurde eine neunfach höhere CH₃OH-Bildung mit immobilisiertem SUMO-MMOB gemessen. Für eine mehrfache Anwendung des Enzyms ist diese Methode der Immobilisierung jedoch

nicht geeignet, da MMOH und MMOR immer frisch zu dem Immobilisat zugesetzt werden müssen. Für weitere Untersuchungen zur Immobilisierung der sMMO können die hier erhobenen Daten als Grundlagen dienen, um z.B. andere Immobilisierungsmethoden zu testen.

3.7.3 Zusammenfassung und Diskussion der Immobilisierungsversuche

Das Ziel der hier beschriebenen Immobilisierungsversuche der sMMO war es, eine geeignete Technik für den potentiellen Einsatz des Enzyms zu analysieren. Zunächst sollte der Aktivitätsnachweis einer immobilisierten sMMO erfolgen, da in der Literatur bisher keine Immobilisierung der sMMO mit Messung der Aktivität beschrieben wurde. Einzig Quervernetzungsversuche der sMMO aus *Methylococcus capsulatus* Bath wurden untersucht [Kopp *et al.*, 2003]. Dabei wurde die Hydroxylase mit der Reduktase verknüpft, um Informationen zu den Interaktionspunkten der beiden Komponenten zu erhalten. Die partikuläre Methan-Monooxygenase (pMMO) wurde als Membranfraktion aus dem Rohextrakt in Hydrogele, PEGDA (Polyethylenglykol-Diacrylat) eingeschlossen. Diese pMMO-Hydrogele wurden auf ihre Aktivität mit CH₄ als Substrat untersucht [Blanchette *et al.*, 2016]. Da dies die einzige zugängliche und bezüglich der Zielsetzung vergleichbare Arbeit war, wurden diese Daten mit den eigenen Ergebnissen, sofern möglich gegenübergestellt, siehe Tabelle 3-36.

Tabelle 3-36: Zusammenfassung der Immobilisierung und Vergleich mit Literaturdaten für pMMO. Messwerte für freies Enzym aus Kapitel 3.6, S.136; Daten für immobilisiertes Enzym aus Kapitel 3.7, S.152.

Name	Eigene Ergebnisse	[Blanchette <i>et al.</i> , 2016]
Aktivität [mU*mg ⁻¹]	5 (MMOH-immobilisiert) 44 (SUMO-MMOB immobilisiert)	65 bis 128 (pMMO immobilisiert)
Gebildetes CH₃OH [nmol _{CH₃OH} *mg _{Enzym} ⁻¹]	72 (1 Zyklus, MMOH-immobilisiert) 654 (1 Zyklus, SUMO-MMOB immobilisiert)	400 (1 Zyklus, pMMO immobilisiert) 4.000 (20 Zyklen; pMMO immobilisiert)

Für die sMMO wurde eine maximale CH₃OH-Menge, pro eingesetzte Enzymmenge, von 654 nmol_{CH₃OH}*mg_{Enzym}⁻¹ bei Einsatz der immobilisierten SUMO-MMOB-Fraktion gemessen. Für die pMMO konnte in einem Reaktionszyklus eine maximale CH₃OH-Konzentration von 400 nmol_{CH₃OH}*mg_{Enzym}⁻¹ bestimmt werden. Ein Vorteil des Einschlusses der pMMO-Membranfraktion in das Hydrogel war, dass das gesamte Enzym immobilisiert wurde. So konnte das Immobilisat von der Reaktionslösung abgetrennt und erneut eingesetzt werden. Nach 20-fachem Einsatz des Immobilisats mit der pMMO wurde eine CH₃OH-Menge von 4.000 nmol_{CH₃OH}*mg_{Enzym}⁻¹ gemessen. Dabei betrug die Restaktivität der pMMO-Charge 56 % (45 mU*mg⁻¹) [Blanchette *et al.*, 2016]. Ein Vergleich der Aktivität bei mehrfachem Einsatz der immobilisierten sMMO war nicht möglich, da diese Experimente mit CH₄ als Substrat nicht durchgeführt wurden. Ein Problem der hier durchgeführten Immobilisierungsexperimente der sMMO war, dass nur eine Komponente (MMOH oder SUMO-MMOB) an einen Träger gebunden wurde. Die anderen beiden Komponenten wurden dem Aktivitätstest zugegeben. Bei einer Wiederverwendung würden die zugesetzten löslichen Proteine vermutlich ganz oder teilweise vom Trägermaterial abgewaschen. Um dieses Problem zu lösen, könnte eine alternative Immobilisierungsmethode, z.B. eine Einkapselung der gesamten sMMO untersucht werden. Dabei würden alle Komponenten des Enzymkomplexes in eine Matrix eingeschlossen, in der eine Interaktion untereinander, die für die sMMO-Aktivität essentiell ist,

noch möglich wäre. Mit der Cyclohexanon-Monooxygenase (EC: 1.14.13.22, Monomer) aus *Acinetobacter sp.* NCIMB 9871 wurden verschiedene Immobilisierungsversuche durchgeführt [Abril *et al.*, 1989]. Dabei wurde eine Cofaktor-Regeneration des NADPH über die Glucose 6-Phosphatdehydrogenase aus *Leuconostoc mesenteroides* integriert. Die gemeinsame Immobilisierung der Monooxygenase und der Dehydrogenase erfolgte über den Einschluss in Polyacrylamide-N-acryloxysuccinimide (PAN). Mit den immobilisierten Enzymen (Immobilisierungsausbeute 30 %) konnte für verschiedenen Substrate ein Umsatz von bis zu 89 % nachgewiesen werden. Die Restaktivitäten der eingesetzten Enzyme waren 77 % für die Cyclohexanon-Monooxygenase und 80 % für die Glucose 6-Phosphatdehydrogenase [Abril *et al.*, 1989]. Ähnlich diesem Beispiel könnte auch mit dem sMMO-System verfahren werden. Dabei wäre die Integration der Glucose 1-Dehydrogenase und der Katalase in der Matrix möglich. So könnten die Cofaktor-Regeneration und die H₂O₂-Reduzierung in Kombination mit der sMMO-Reaktion, bezüglich der in den Kapiteln 3.5.3 bis 3.5.4, S.127 beschriebenen positiven Effekte, genutzt werden.

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit gelang es erstmals einzelne sMMO-Komponenten an verschiedene Trägermaterialien zu binden und anschließend mit diesen eine sMMO-Aktivität nachzuweisen. Die MMOH-Komponente wurde über eine ungerichtete Bindung an das Trägermaterial ReliZyme™ für Aktivitätsmessungen mit CH₄ eingesetzt. Aufgrund der unspezifischen Bindung und teilweisen Inaktivierung wurde eine CH₃OH-Bildung von 10 % im Vergleich zum freien Enzym gemessen. Ein Nachteil der Immobilisierung von nur einer sMMO-Komponente war, die notwendige Zugabe der anderen Komponenten für jede weitere Messung. Neben der ungerichteten wurde auch eine Methode zur gerichteten Immobilisierung untersucht. Dabei konnte der sechsfache-His-tag am SUMO-MMOB, der für die Aufarbeitung vorgesehen war, als Verknüpfung zu dem Trägermaterial *Streamline Chelating* erfolgreich eingesetzt werden. Mit dieser Immobilisierungsmethode wurde im CH₄-Assay die höchste finale CH₃OH-Konzentration von 654 µM erreicht.

4 Zusammenfassung

Die vorgelegte Dissertation beschäftigt sich mit dem Einsatz der löslichen Methan-Monooxygenase (sMMO) aus *Methylosinus trichosporium* OB3b (*M. trichosporium* OB3b), zur *in vitro* Produktion von CH₃OH.

Um ausreichende Mengen an Enzym bereitzustellen wurde, auf Basis von bereits veröffentlichten Studien, eine Kultivierungsstrategie für den Organismus mit CH₃OH als C-Quelle konzipiert. Das dabei neu entwickelte Nitrat-Mineralsalz (NMS)-Medium wurde zum Wachstum von *Methylosinus trichosporium* OB3b mit CH₃OH als C-Quelle, bei gleichzeitigem Nachweis der sMMO-Aktivität eingesetzt. Im Vergleich zur Kultivierung im Schüttelkolbenmaßstab (500 mL) mit dem natürlichen Substrat CH₄, wurde mit CH₃OH als C-Quelle eine um 27 % höhere sMMO-Aktivität nach Zellaufschluss gemessen. Die Kultivierungsstrategie wurde aus dem Schüttelkolben- bis in den Technikumsmaßstab überführt. In einer Fermentation im 100 L Reaktor wurden nach 120 Stunden Kultivierung 3,9 kg sMMO-aktive Biofeuchtmasse geerntet, die zur Aufreinigung der sMMO verwendet wurden. Durch den hier erstmal angewendeten Einsatz von CH₃OH als C-Quelle zur großtechnischen Produktion von sMMO-aktiver Biomasse, ist es möglich die technisch aufwändigeren Fermentationen mit CH₄ zu vermeiden.

Die Aufarbeitung der sMMO erfolgte in Anlehnung an bereits bestehende Protokolle zur Reinigung des Enzyms aus Biomasse, die mit CH₄ als C-Quelle kultiviert wurde. Die Ausbeuten der einzelnen Komponenten waren, im Vergleich zur Literatur, für die Reinigung aus CH₄-gewachsener Biomasse geringer (Hydrxylase (MMOH) Faktor drei; regulatorisches Protein B (MMOB) Faktor 15; Reduktase (MMOR) Faktor 2,5). Die Ursache hierfür war bei der Hydroxylase, dass während der Reinigung infolge der Überladung von Chromatographiesäulen, Protein verworfen wurde. Dies sollte bei künftigen Reinigungen verbessert werden, um die Ausbeute weiter steigern zu können. Für MMOB konnte zudem die für diesen Organismus noch nicht beschriebene proteolytische Spaltung zu MMOB' mittels ESI-MS Nachweis gezeigt und durch 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid-Zusatz unterbunden werden. Bei Vergleich der sMMO-Aktivität von homolog bzw. heterolog in *E. coli* produziertem MMOB wurden gleiche Aktivitäten ermittelt, weshalb für die weitere Analyse das effizienter zu produzierende rekombinante MMOB (rek. MMOB) verwendet wurde (rek MMOB-5,4 % Ausbeute; homolog MMOB-0,08 % Ausbeute).

Die biochemische Charakterisierung der sMMO ergab ein pH-Optimum von 7,57; ein Temperaturoptimum bezogen auf die Startaktivität von 46,4 °C, eine optimale Einsatztemperatur für Langzeitmessungen (300 Minuten) von 30 °C und eine optimale Ionenstärke von 70 bis 110 mM. Das für die Startaktivität optimale Verhältnis der sMMO-Komponenten entsprachen den bekannten Literaturdaten und betrug $\text{MMOH}_{\text{aktive Zentren}}:\text{MMOB}:\text{MMOR} = 1:1:1 \mu\text{M}$

Der negative Einfluss der gebildeten Nebenprodukte (NAD⁺ und H₂O₂) der sMMO-Reaktion, konnte durch Einsatz der Glucose 1-Dehydrogenase (GDH, 75 mU*mL⁻¹) zur Cofaktor-Regeneration und der Katalase (640 U*mL⁻¹) zum H₂O₂-Abbau verringert werden. Bei Verwendung von GDH und Katalase mit der sMMO und CH₄ als Substrat im diskontinuierlichen Ansatz wurde eine Umsatzsteigerung von 30 % nach zehn Minuten gemessen. Untersuchungen zum Einfluss von H₂O₂ auf die sMMO-Aktivität zeigten, dass H₂O₂ vor allem durch die MMOR gebildet wurde und dann anstatt des eigentlichen Substrates von der MMOH zu H₂O und O₂ umgesetzt wurde, was zu einer Stagnation der Zielproduktbildung führte. Der positive Einfluss der Katalase und der Cofaktor-Regeneration auf die sMMO wurden erstmals in einem kontinuierlichen Test über einen längeren Zeitraum untersucht. In Kooperation

mit dem Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik (IGB) in Stuttgart wurde zur Echtzeit-Analyse der CH_3OH und CH_4 -Konzentration in der Flüssigphase ein Massenspektrometer mit Membraneinlass verwendet (FoxySpec®). In Experimenten im 10 mL-Maßstab wurde mit Zusatz an GDH und Katalase eine finale CH_3OH -Konzentration von $1.750 \mu\text{M}$ nach 90 Minuten durch die sMMO gebildet. Gegenüber dem Test mit sMMO und NADH konnte eine Steigerung des Umsatzes bezogen auf CH_4 von 200 % erreicht werden. Nach der Maßstabvergrößerung des Ansatzes von 10 auf 250 mL Flüssigvolumen konnte in einem druckfesten Reaktor, eine zum 10 mL-Ansatz, vergleichbare CH_3OH -Bildung gemessen werden. Durch den Einsatz von Katalase und GDH konnte vor allem die Reaktionszeit bzw. die Produktkonzentration im kontinuierlichen CH_4 -Assay gesteigert werden. Dies wurde in dieser Form noch nicht dokumentiert und ist ein wichtiger Ansatzpunkt für eine mögliche technische Anwendung der sMMO bei der CH_4 -Umwandlung.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten erstmals Untersuchungen zur Immobilisierung der sMMO. Dabei wurden zum einen MMOH und zum anderen das Fusionsprotein SUMO-MMOB (*small ubiquitin-like modifier*) als Interaktionspunkte zum Trägermaterial untersucht. Die ungerichtete Immobilisierung von MMOH über Lysine und Cysteine an ReliZyme™ ergab im sMMO-Aktivitätstest eine finale CH_3OH -Konzentration von $72 \mu\text{M}$. Dies entsprach 10 % der CH_3OH -Konzentration, die bei der identischen Proteinmenge an nicht immobilisiertem Enzym gemessen wurde. Als zweite Methode wurde die gerichtete Immobilisierung von SUMO-MMOB mittels His-tag an *Streamline Chelating* untersucht. Im CH_4 -Aktivitätstest wurde bei Komplettbeladung des Trägermaterials mit SUMO-MMOB eine maximale CH_3OH -Konzentration von $654 \mu\text{M}$ gemessen. Ein Nachteil der untersuchten Immobilisierungsmethoden war, dass für einen mehrfachen Einsatz des Enzyms nicht an den Träger gebundenen sMMO-Komponenten für jeden Reaktionsansatz neu zugesetzt werden müssen.

Methylosinus trichosporium OB3b, sowie die lösliche Methan-Monooxygenase besitzen aufgrund ihrer enzymatischen Eigenschaften (Wachstum mit CH_4 , CH_3OH sowie ein breites Substratspektrum) ein großes Potential für mögliche biotechnische Anwendungen. Die vorliegende Arbeit soll mit den neuen Erkenntnissen zum *in vitro*-Einsatz des Enzyms zur CH_3OH -Bildung, sowie zur Bereitstellung und Charakterisierung der sMMO dazu beitragen, eine zukünftige ökonomische Nutzung der sMMO zu ermöglichen.

5 Ausblick

Das vorrangige Ziel dieser Arbeit, der Einsatz der isolierten sMMO zur CH_3OH -Bildung wurde erfolgreich umgesetzt. Einige Aspekte die z.T. erst im Laufe der Arbeit beobachtet wurden, konnten im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht mehr untersucht werden. Dazu zählt u.a. die Kultivierungszeit der Fermentation von *M. trichosporium* OB3b im Bioreaktor. Eine längere Fermentationszeit als 120 Stunden, zur Produktion von sMMO-aktiver Biomasse wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Zur Steigerung der Biomassenausbeute sollte die Verlängerung der Fermentationszeit deshalb geprüft werden. Eine Vermeidung der exzessiven Schaumbildung sollte bei weiteren Fermentationen von *M. trichosporium* OB3b durch die Auswahl eines besser wirkenden Antischaummittels ebenfalls analysiert werden. Alternativ könnte auch eine Fermentation mit Nitrat-Limitierung über einen längeren Zeitraum zur Produktion von sMMO-aktiver Biomasse durchgeführt werden. Um eine optimale Ausbeute zu erzielen, sollte auf die spezifische Wachstumsrate und die sMMO-Aktivität der Zellen im späteren Verlauf der Fermentation (> 100 h) geachtet werden.

Um den Verlust an Zielprotein zu minimieren, sollten bei der Reinigung der sMMO aus *M. trichosporium* OB3B entweder größere Säulenvolumina z.B. bei der SEC der MMOH, oder mehrere Chromatographieläufe für die gleiche Menge an aufgeschlossener Biomasse eingesetzt werden. Da speziell die Ausbeuten der Reinigung der Reduktase gering waren, sollte die entsprechende Reinigungsstrategie ebenfalls optimiert werden. Um größere Mengen an MMOR für die *in vitro*-Ansätze bereitzustellen, sollte die rekombinante Produktion von MMOR aus *M. trichosporium* OB3B bearbeitet werden. Dies wurde bereits erfolgreich mit dem regulatorischen Protein B von *M. trichosporium* OB3b in *E. coli* und der MMOR aus *M. capsulatus* Bath ebenfalls in *E. coli* durchgeführt.

Im Zusammenhang mit der Cofaktor-Regeneration von NADH durch die Glucose 1-Dehydrogenase (GDH) sollten weitere Untersuchungen im sMMO-Assay durchgeführt werden, um eine bessere Abstimmung der NADH-Bildung bzw. des NADH-Verbrauches zu erreichen. Dabei sollten vor allem die jeweils eingesetzten Enzymmengen bzw. Aktivitäten der beiden Enzyme bezüglich der Produktbildung optimiert werden. Neben der hier erfolgreich eingesetzten GDH könnten weitere Enzyme zu Cofaktor-Regeneration untersucht werden, um die Kopplung des Elektronentransfers mit der Zielproduktbildung, je nach eingesetztem Substrat, zu erhöhen

Durch den Zusatz von Katalase zum sMMO-Reaktionsansatz konnte der Umsatz bzw. die Reaktionszeit der sMMO mit CH_4 als Substrat um Faktor drei gesteigert werden. Eine komplette Vermeidung der Nebenproduktbildung (H_2O_2) wurde nicht erreicht, da auch in den Ansätzen mit Katalase eine Stagnation der Zielproduktbildung beobachtet wurde. Die genaue Ursache hierfür konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden und sollte daher in weiterführenden Analysen erforscht werden. Die in dieser Arbeit verwendete Katalase besaß eine spezifische Aktivität von 2.000 bis 5.000 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$. Untersuchungen zur Verwendung einer noch aktiveren Katalase (kommerziell verfügbar $\geq 10.000 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$) könnten ebenfalls in künftigen Untersuchungen durchgeführt werden.

Aufbauend auf den Ergebnissen zum Einsatz der sMMO im Reaktormaßstab könnte im verwendeten druckfesten Reaktor die CH_3OH -Bildung der sMMO bei einem Überdruck (max. 10 bar möglich) untersucht werden. Möglicherweise hätten die Erhöhung des Druckes und die damit verbundene Steigerung der Löslichkeit von CH_4 in der Flüssigphase einen positiven Einfluss auf die Zielproduktbildung. Eine Charakterisierung der sMMO bei Überdruck wurde bisher nicht dokumentiert und könnte einen Mehrwert für die Verwendung gasförmiger Sub-

strate in biokatalytischen Prozessen haben. Um die sMMO-Reaktion von CH_3OH zu HCHO zu nutzen und als alleinige Endprodukte der Gesamtreaktion CH_3OH und HCOOH zu bilden, sollte ein direkter Einsatz von der Formaldehyd-Dismutase am Beginn der Enzymkaskade durchgeführt werden.

Aufbauend auf den hier getätigten Immobilisierungsversuchen der sMMO, sollten weitere Versuche mit der gesamten Enzymkaskade (sMMO, GDH, Katalase) durchgeführt werden. Dabei wäre statt der kovalenten bzw. ionischen Bindung einer sMMO-Komponente, ein Einschluss des gesamten Systems von Vorteil. Dazu müssten im Vorfeld der Messungen etwaige Diffusionsprobleme, z.B. für CH_4 als Substrat, untersucht werden. Mögliche zu untersuchende Matrizen wären polymere Membranen (Polyacrylamid, Polylysin), Lipidmembranen oder organischen Polysaccharide (Alginat, Carrageenan). Die Interaktionen von MMOH, MMOB und MMOR wären durch den Einschluss des gesamten Enzyms, inklusive der Hilfsenzyme zur NADH-Regeneration und dem H_2O_2 -Abbau, möglich. Dadurch würden die Abtrennung der Enzyme und deren Wiederverwendung vereinfacht.

6 Literatur

- Abril, O., Ryerson, C. C., Walsh, C. und Whitesides, G. M. (1989). "Enzymatic Baeyer-Villiger type oxidations of ketones catalyzed by cyclohexanone oxygenase." *Bioorganic Chemistry*, **17**, 41-52.
- Adegbola, O. (2008). "High cell density methanol cultivation of *Methylosinus trichosporium* OB3b," Master thesis Queen's University Kingston, Ontario.
- Anthony, C. (2011). "How half a century of research was required to understand bacterial growth on C1 and C2 compounds; the story of the serine cycle and the ethylmalonyl-CoA pathway." *Sci Prog*, **94**, 109-37.
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., Gasteiger, E., Grosdidier, A., Hernandez, C., Ioannidis, V., Kuznetsov, D., Liechti, R., Moretti, S., Mostaguir, K., Redaschi, N., Rossier, G., Xenarios, I. und Stockinger, H. (2012). "ExPASy: SIB bioinformatics resource portal." *Nucleic Acids Research*, **40**, 31.
- Asenjo, J. A. und Suk, J. S. (1986). "Microbial Conversion of Methane into Poly-Beta-Hydroxybutyrate (Phb) - Growth and Intracellular Product Accumulation in a Type-I Methanotroph." *Journal of Fermentation Technology*, **64**, 271-278.
- Astier, Y., Balendra, S., Hill, H. A. O., Smith, T. J. und Dalton, H. (2003). "Cofactor-independent oxygenation reactions catalyzed by soluble methane monooxygenase at the surface of a modified gold electrode." *European Journal of Biochemistry*, **270**, 539-544.
- Atta, M., Fontecave, M., Wilkins, P. C. und Dalton, H. (1993). "Abduction of iron(III) from the soluble methane monooxygenase hydroxylase and reconstitution of the binuclear site with iron and manganese." *European Journal of Biochemistry*, **217**, 217-23.
- Balasubramanian, R. und Rosenzweig, A. C. (2007). "Structural and mechanistic insights into methane oxidation by particulate methane monooxygenase." *Accounts of Chemical Research*, **40**, 573-580.
- Banerjee, R., Proshlyakov, Y., Lipscomb, J. D. und Proshlyakov, D. A. (2015). "Structure of the key species in the enzymatic oxidation of methane to methanol." *Nature*, **518**, 431-434.
- Behrens, C. (2017). "China zapft neuartige Energiequelle am Meeresgrund an ", *Sueddeutsche Zeitung* <http://www.sueddeutsche.de/wissen/methanhydrat-china-zapft-neuartige-energiequelle-am-meeresgrund-an-1.3515802>.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. und Stryer, L. (2002). "Biochemistry, Fifth Edition." W.H. Freeman.
- Best, D. J. und Higgins, I. J. (1981). "Methane-Oxidizing Activity and Membrane Morphology in a Methanol-Grown Obligate Methanotroph, *Methylosinus-Trichosporium* Ob3b." *Journal of General Microbiology*, **125**, 73-84.
- Bisswanger, H. (2014). "Enzyme assays." *Perspectives in Science*, **1**, 41-55.
- Blanchette, C. D., Knipe, J. M., Stolaroff, J. K., DeOtte, J. R., Oakdale, J. S., Maiti, A., Lenhardt, J. M., Sirajuddin, S., Rosenzweig, A. C. und Baker, S. E. (2016). "Printable enzyme-embedded materials for methane to methanol conversion." *Nature Communications*, **7**, 11900.
- Blanksby, S. J. und Ellison, G. B. (2003). "Bond dissociation energies of organic molecules." *Accounts of Chemical Research*, **36**, 255-263.
- Borodina, E., Nichol, T., Dumont, M. G., Smith, T. J. und Murrell, J. C. (2007). "Mutagenesis of the "Leucine gate" to explore the basis of catalytic versatility in soluble methane monooxygenase." *Applied and Environmental Microbiology*, **73**, 6460-6467.
- Bothe, H., Møller J. K., Mergel, A., Larsen, J., Jørgensen, C., Bothe, H., Jørgensen, L. (2002). "Heterotrophic bacteria growing in association with *Methylococcus capsulatus* (Bath) in a single cell protein production process." *Applied Microbiology Biotechnology*, **59**, 33-39.
- Bourque, D., Pomerleau, Y. und Groleau, D. (1995). "High cell density production of poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) from methanol by *Methylobacterium extorquens*:

- Production of high-molecular-mass PHB." *Applied Microbiology Biotechnology*, **44**, 367-376.
- Bowman, J. P. und Sayler, G. S. (1994). "Optimization and maintenance of soluble methane monooxygenase activity in *Methylosinus trichosporium* OB3b." *Biodegradation*, **5**, 1-11.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Brandstetter, H., Whittington, D. A., Lippard, S. J. und Frederick, C. A. (1999). "Mutational and structural analyses of the regulatory protein B of soluble methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath)." *Chemistry & Biology*, **6**, 441-9.
- Brazeau, B. J. und Lipscomb, J. D. (2003). "Key amino acid residues in the regulation of soluble methane monooxygenase catalysis by component B." *Biochemistry*, **42**, 5618-31.
- Brusseau, G. A., Tsien, H. C., Hanson, R. S. und Wackett, L. P. (1990). "Optimization of trichloroethylene oxidation by methanotrophs and the use of a colorimetric assay to detect soluble methane monooxygenase activity." *Biodegradation*, **1**, 19-29.
- Burrows, K. J., Cornish, A., Scott, D. und Higgins, I. J. (1984). "Substrate Specificities of the Soluble and Particulate Methane Mono-Oxygenases of *Methylosinus-Trichosporium* Ob3b." *Journal of General Microbiology*, **130**, 3327-3333.
- Butt, T. R., Edavettal, S. C., Hall, J. P. und Mattern, M. R. (2005). "SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins." *Protein Expression and Purification*, **43**, 1-9.
- Callaghan, A. J., Smith, T. J., Slade, S. E. und Dalton, H. (2002). "Residues near the N-terminus of protein B control autocatalytic proteolysis and the activity of soluble methane mono-oxygenase." *European Journal of Biochemistry*, **269**, 1835-1843.
- Cantone, S., Ferrario, V., Corici, L., Ebert, C., Fattor, D., Spizzo, P. und Gardossi, L. (2013). "Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods." *Chemical Society Reviews*, **42**, 6262-6276.
- Çelik, M. B., Özdalyan, B. und Alkan, F. (2011). "The use of pure methanol as fuel at high compression ratio in a single cylinder gasoline engine." *Fuel*, **90**, 1591-1598.
- Chang, S. L., Wallar, B. J., Lipscomb, J. D. und Mayo, K. H. (1999). "Solution structure of component B from methane monooxygenase derived through heteronuclear NMR and molecular modeling." *Biochemistry*, **38**, 5799-5812.
- Chatwood, L. L., Muller, J., Gross, J. D., Wagner, G. und Lippard, S. J. (2004). "NMR structure of the flavin domain from soluble methane monooxygenase reductase from *Methylococcus capsulatus* (Bath)." *Biochemistry*, **43**, 11983-11991.
- Chen, Y. und Yoch, D. (1987). "Regulation of two nickel-requiring (inducible and constitutive) hydrogenases and their coupling to nitrogenase in *Methylosinus trichosporium* OB3b." *Journal of Bacteriology*, **169**, 4778-4783.
- Chmiel, H. (2001). "Bioprozesstechnik." 2. Edition ed., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2008, 211 ff.
- Choi, D. W., Do, Y. S., Zea, C. J., McEllistrem, M. T., Lee, S. W., Semrau, J. D., Pohl, N. L., Kisting, C. J., Scardino, L. L., Hartsel, S. C., Boyd, E. S., Geesey, G. G., Riedel, T. P., Shafe, P. H., Kranski, K. A., Tritsch, J. R., Antholine, W. E. und DiSpirito, A. A. (2006). "Spectral and thermodynamic properties of Ag(I), Au(III), Cd(II), Co(II), Fe(III), Hg(II), Mn(II), Ni(II), Pb(II), U(IV), and Zn(II) binding by methanobactin from *Methylosinus trichosporium* OB3b." *Journal of Inorganic Biochemistry*, **100**, 2150-61.
- Chu, K. H. und Alvarez-Cohen, L. (1998). "Effect of nitrogen source on growth and trichloroethylene degradation by methane-oxidizing bacteria." *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 3451-3457.
- Colby, J., Stirling, D. I. und Dalton, H. (1977). "The soluble methane mono-oxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath). Its ability to oxygenate n-alkanes, n-alkenes, ethers, and alicyclic, aromatic and heterocyclic compounds." *Biochemical Journal*, **165**, 395-402.

- Cooley, R. B., Dubbels, B. L., Sayavedra-Soto, L. A., Bottomley, P. J. und Arp, D. J. (2009). "Kinetic characterization of the soluble butane monooxygenase from *Thaueria butanivorans*, formerly 'Pseudomonas butanovora'." *Microbiology*, **155**, 2086-2096.
- Cornish, A., Nicholls, K. M., Scott, D., Hunter, B. K., Aston, W. J., Higgins, I. J. und Sanders, J. K. M. (1984). "In vivo C-13 Nmr Investigations of Methanol Oxidation by the Obligate Methanotroph *Methylosinus-Trichosporium Ob3b*." *Journal of General Microbiology*, **130**, 2565-2575.
- Coufal, D. E., Blazyk, J. L., Whittington, D. A., Wu, W. W., Rosenzweig, A. C. und Lippard, S. J. (2000). "Sequencing and analysis of the *Methylococcus capsulatus* (Bath) soluble methane monooxygenase genes." *European Journal of Biochemistry*, **267**, 2174-2185.
- Dalton, H. (2005). "The Leeuwenhoek Lecture 2000 the natural and unnatural history of methane-oxidizing bacteria." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **360**, 1207-22.
- Davis, K. J., Cornish, A. und Higgins, I. J. (1987). "Regulation of the Intracellular Location of Methane Mono-Oxygenase during Growth of *Methylosinus-Trichosporium Ob3b* on Methanol." *Journal of General Microbiology*, **133**, 291-297.
- De St. Groth, S. F., Webster, R. G. und Datyner, A. (1963). "Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips." *Biochimica et Biophysica Acta*, **71**, 377-391.
- Dedysh, S. N., Naumoff, D. G., Vorobev, A. V., Kyrpides, N., Woyke, T., Shapiro, N., Crombie, A. T., Murrell, J. C., Kalyuzhnaya, M. G., Smirnova, A. V. und Dunfield, P. F. (2015). "Draft Genome Sequence of *Methyloferula stellata* AR4, an Obligate Methanotroph Possessing Only a Soluble Methane Monooxygenase." *Genome Announcements*, **3**.
- Denisov, I. G., Baas, B. J., Grinkova, Y. V. und Sligar, S. G. (2007). "Cooperativity in Cytochrome P450 3A4: Linkages in Substrate Binding, Spin State, Uncoupling and Product Formation." *Journal of Biological Chemistry*, **282**, 7066-7076.
- DiCosimo, R., McAuliffe, J., Poulouse, A. J. und Bohlmann, G. (2013). "Industrial use of immobilized enzymes." *Chemical Society Reviews*, **42**, 6437-6474.
- Dillmann, A. (2014). "Kultivierung von *Methylosinus trichosporium* OB3b auf Methanol als C-Quelle und rekombinante Produktion des regulatorischen Proteins B aus *Methylosinus trichosporium* OB3b," Masterarbeit, Naturwissenschaftliche Fakultät, Institut für Biochemie und Biotechnologie Martin- Luther- Universität Halle-Wittenberg.
- Duan, Z. H. und Mao, S. D. (2006). "A thermodynamic model for calculating methane solubility, density and gas phase composition of methane-bearing aqueous fluids from 273 to 523 K and from 1 to 2000 bar." *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, **70**, 3369-3386.
- Dubbels, B. L., Sayavedra-Soto, L. A. und Arp, D. J. (2007). "Butane monooxygenase of 'Pseudomonas butanovora': purification and biochemical characterization of a terminal-alkane hydroxylating diiron monooxygenase." *Microbiology*, **153**, 1808-1816.
- Earnhardt, J. N., Qian, M., Tu, C., Lakkis, M. M., Bergenhem, N. C. H., Laipis, P. J., Tashian, R. E. und Silverman, D. N. (1998). "The Catalytic Properties of Murine Carbonic Anhydrase VII." *Biochemistry*, **37**, 10837-10845.
- Eckstein, M., Daußmann, T. und Kragl, U. (2004). "Recent Developments in NAD(P)H Regeneration for Enzymatic Reductions in One- and Two-Phase Systems." *Biocatalysis and Biotransformation*, **22**, 89-96.
- Es, I., Vieira, J. D. und Amaral, A. C. (2015). "Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **99**, 2065-82.
- Fei, Q., Guarnieri, M. T., Tao, L., Laurens, L. M., Dowe, N. und Pienkos, P. T. (2014). "Bioconversion of natural gas to liquid fuel: opportunities and challenges." *Biotechnology Advances*, **32**, 596-614.
- Fernandez-Lafuente, R. (2009). "Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation." *Enzyme and Microbial Technology*, **45**, 405-418.

- Fox, B. G., Froland, W. A., Dege, J. E. und Lipscomb, J. D. (1989). "Methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b. Purification and properties of a three-component system with high specific activity from a type II methanotroph." *The Journal of Biological Chemistry*, **264**, 10023-33.
- Fox, B. G., Froland, W. A., Jollie, D. R. und Lipscomb, J. D. (1990). "Methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b." *Methods in Enzymology*, **188**, 191-202.
- Foye, W. O. und Chao, C. C. (1984). "Antiradiation Compounds .19. Metal-Binding Abilities of Thioureas." *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **73**, 1284-1286.
- Froland, W. A., Andersson, K. K., Lee, S. K., Liu, Y. und Lipscomb, J. D. (1992). "Methane monooxygenase component B and reductase alter the regioselectivity of the hydroxylase component-catalyzed reactions. A novel role for protein-protein interactions in an oxygenase mechanism." *The Journal of Biological Chemistry*, **267**, 17588-97.
- Gassner, G. T. und Lippard, S. J. (1999). "Component interactions in the soluble methane monooxygenase system from *Methylococcus capsulatus* (Bath)." *Biochemistry*, **38**, 12768-12785.
- Getz, E. B., Xiao, M., Chakrabarty, T., Cooke, R. und Selvin, P. R. (1999). "A Comparison between the Sulfhydryl Reductants Tris(2-carboxyethyl)phosphine and Dithiothreitol for Use in Protein Biochemistry." *Analytical Biochemistry*, **273**, 73-80.
- Green, J. und Dalton, H. (1985). "Protein B of soluble methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). A novel regulatory protein of enzyme activity." *The Journal of Biological Chemistry*, **260**, 15795-801.
- Green, J. und Dalton, H. (1986). "Steady-state kinetic analysis of soluble methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath)." *Biochemical Journal*, **236**, 155-62.
- Green, J. und Dalton, H. (1988). "The biosynthesis and assembly of protein A of soluble methane monooxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath)." *The Journal of Biological Chemistry*, **263**, 17561-5.
- Grosse, S., Laramée, L., Wendlandt, K. D., McDonald, I. R., Miguez, C. B. und Kleber, H. P. (1999). "Purification and characterization of the soluble methane monooxygenase of the type II methanotrophic bacterium *Methylocystis* sp strain WI 14." *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 3929-3935.
- Hanefeld, U., Gardossi, L. und Magner, E. (2009). "Understanding enzyme immobilisation." *Chemical Society Reviews*, **38**, 453-468.
- Hanson, R. S. und Hanson, T. E. (1996). "Methanotrophic bacteria." *Microbiological Reviews*, **60**, 439-+.
- Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F. und Stevanato, R. (2013). "Enzyme immobilization: an update." *Journal of Chemical Biology*, **6**, 185-205.
- Hou, C., Patel, R., Laskin, A. und Barnabe, N. (1982). "Epoxidation of alkenes by methane monooxygenase: Generation and regeneration of cofactor, NADH, by dehydrogenases." *Journal of Applied Biochemistry*, **4**, 379-383.
- Hu, A. S. L. und Cline, A. L. (1964). "The regulation of some sugar dehydrogenases in a pseudomonad." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **93**, 237-245.
- Hubley, J. H., Thomson, A. W. und Wilkinson, J. F. (1975). "Specific Inhibitors of Methane Oxidation in *Methylosinus-Trichosporium*." *Archives of Microbiology*, **102**, 199-202.
- Jahng, D. und Wood, T. K. (1996). "Metal ions and chloramphenicol inhibition of soluble methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **45**, 744-749.
- James, G. T. (1978). "Inactivation of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride in buffers." *Analytical Biochemistry*, **86**, 574-579.
- Jiang, H., Chen, Y., Jiang, P., Zhang, C., Smith, T. J., Murrell, J. C. und Xing, X.-H. (2010). "Methanotrophs: Multifunctional bacteria with promising applications in environmental bioengineering." *Biochemical Engineering Journal*, **49**, 277-288.

- Jiang, Y., Wilkins, P. C. und Dalton, H. (1993). "Activation of the hydroxylase of sMMO from *Methylococcus capsulatus* (Bath) by hydrogen peroxide." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **1163**, 105-12.
- Johnson, D. W. (2012). "Global Methanol Market Review." IHS Markit.
- Jollie, D. R. und Lipscomb, J. D. (1991). "Formate dehydrogenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b. Purification and spectroscopic characterization of the cofactors." *Journal of Biological Chemistry*, **266**, 21853-21863.
- Kadkhodayan, S., Coulter, E. D., Maryniak, D. M., Bryson, T. A. und Dawson, J. H. (1995). "Uncoupling Oxygen Transfer and Electron Transfer in the Oxygenation of Camphor Analogues by Cytochrome P450-CAM: DIRECT OBSERVATION OF AN INTERMOLECULAR ISOTOPE EFFECT FOR SUBSTRATE C-H ACTIVATION." *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 28042-28048.
- Kalidass, B., Farhan Ul-Haque, M., Baral, B. S., DiSpirito, A. A. und Semraua, J. D. (2015). "Competition between Metals for Binding to Methanobactin Enables Expression of Soluble Methane Monooxygenase in the Presence of Copper." *Applied and Environmental Microbiology*, **81**, 1024-1031.
- Kind, A. (2016). "Lösliche Methanmonooxygenase von *Methylosinus trichosporium* OB3b: Untersuchungen zur Thermostabilität und zur rekombinanten Produktion in *Escherichia coli*," Masterarbeit, Naturwissenschaftliche Fakultät, Institut für Biochemie und Biotechnologie Martin- Luther- Universität Halle- Wittenberg.
- King, G. M. und Schnell, S. (1994). "Ammonium and Nitrite Inhibition of Methane Oxidation by *Methylobacter albus* BG8 and *Methylosinus trichosporium* OB3b at Low Methane Concentrations." *Applied and Environmental Microbiology*, **60**, 3508-3513.
- Koh, S. C., Bowman, J. P. und Sayler, G. S. (1993). "Soluble Methane Monooxygenase Production and Trichloroethylene Degradation by a Type-I Methanotroph, *Methylomonas-Methanica-68-1*." *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 960-967.
- Kopp, D. A., Berg, E. A., Costello, C. E. und Lippard, S. J. (2003). "Structural features of covalently cross-linked hydroxylase and reductase proteins of soluble methane monooxygenase as revealed by mass spectrometric analysis." *The Journal of Biological Chemistry*, **278**, 20939-45.
- Kopp, D. A., Gassner, G. T., Blazyk, J. L. und Lippard, S. J. (2001). "Electron-transfer reactions of the reductase component of soluble methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath)." *Biochemistry*, **40**, 14932-41.
- Kvenvolden, K. A. (2002). "Methane hydrate in the global organic carbon cycle." *Terra Nova*, **14**, 302-306.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature*, **227**, 680-685.
- Lawton, T. J. und Rosenzweig, A. C. (2016). "Methane-Oxidizing Enzymes: An Upstream Problem in Biological Gas-to-Liquids Conversion." *Journal of the American Chemical Society*, **138**, 9327-9340.
- Leak, D. J. und Dalton, H. (1986). "Growth Yields of Methanotrophs .1. Effect of Copper on the Energetics of Methane Oxidation." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **23**, 470-476.
- Lee, S. W., Keeney, D. R., Lim, D. H., Dispirito, A. A. und Semrau, J. D. (2006). "Mixed pollutant degradation by *Methylosinus trichosporium* OB3b expressing either soluble or particulate methane monooxygenase: can the tortoise beat the hare?" *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 7503-9.
- Lehmköster, J. (2014). "World Ocean Review- 3 Rohstoffe aus dem Meer- Chancen und Risiken." Maribus GmbH, Hamburg, 94-117.
- Listewnik, H. F., Wendlandt, K. D., Jechorek, M. und Mirschel, G. (2007). "Process design for the microbial synthesis of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) from natural gas." *Engineering in Life Sciences*, **7**, 278-282.
- Liu, A., Jin, Y., Zhang, J., Brazeau, B. J. und Lipscomb, J. D. (2005). "Substrate radical intermediates in soluble methane monooxygenase." *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **338**, 254-61.

- Lloyd, J. S., Bhambra, A., Murrell, J. C. und Dalton, H. (1997). "Inactivation of the regulatory protein B of soluble methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath) by proteolysis can be overcome by a Gly to Gin modification." *European Journal of Biochemistry*, **248**, 72-79.
- Lloyd, J. S., Finch, R., Dalton, H. und Murrell, J. C. (1999). "Homologous expression of soluble methane monooxygenase genes in *Methylosinus trichosporium* OB3b." *Microbiology*, **145**, 461-470.
- Lontoh, S. und Semrau, J. D. (1998). "Methane and trichloroethylene degradation by *Methylosinus trichosporium* OB3b expressing particulate methane monooxygenase." *Applied and Environmental Microbiology*, **64**, 1106-1114.
- Marblestone, J. G., Edavettal, S. C., Lim, Y., Lim, P., Zuo, X. und Butt, T. R. (2006). "Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO." *Protein Science*, **15**, 182-9.
- Marston, A., Kissling, J. und Hostettmann, K. (2002). "A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants." *Phytochemical Analysis*, **13**, 51-4.
- Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lafuente, R. und Guisan, J. M. (2000). "Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment*." *Enzyme and Microbial Technology*, **26**, 509-515.
- Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lorente, G., Pedroche, J., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M., Tam, A. und Daminati, M. (2002). "Epoxy sepabeads: a novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment." *Biotechnology Progress*, **18**, 629-34.
- Matsen, J. B., Yang, S., Stein, L. Y., Beck, D. und Kalyuzhnaya, M. G. (2013). "Global Molecular Analyses of Methane Metabolism in Methanotrophic Alphaproteobacterium, *Methylosinus trichosporium* OB3b. Part I: Transcriptomic Study." *Frontiers in Microbiology*, **4**, 40.
- Mehta, P. K., Mishra, S. und Ghose, T. K. (1989). "Growth-Kinetics and Methanol Oxidation in *Methylosinus-Trichosporium* Ncib 11131." *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **11**, 328-335.
- Merkx, M., Kopp, D. A., Sazinsky, M. H., Blazyk, J. L., Muller, J. und Lippard, S. J. (2001). "Dioxygen activation and methane hydroxylation by soluble methane monooxygenase: A tale of two irons and three proteins." *Angewandte Chemie-International Edition*, **40**, 2782-2807.
- Merkx, M. und Lippard, S. J. (2002). "Why OrfY? Characterization of MMOD, a long overlooked component of the soluble methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath)." *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 5858-5865.
- Meyer, A., Schmid, A., Held, M., Westphal, A. H., Röthlisberger, M., Kohler, H.-P. E., van Berkel, W. J. H. und Witholt, B. (2002). "Changing the Substrate Reactivity of 2-Hydroxybiphenyl 3-Monooxygenase from *Pseudomonas azelaica* HBP1 by Directed Evolution." *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 5575-5582.
- Moir, J. W. B. und Wood, N. J. (2001). "Nitrate and nitrite transport in bacteria." *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, **58**, 215-224.
- Muller, J., Lugovskoy, A. A., Wagner, G. und Lippard, S. J. (2002). "NMR structure of the [2Fe-2S] ferredoxin domain from soluble methane monooxygenase reductase and interaction with its hydroxylase." *Biochemistry*, **41**, 42-51.
- Murrell, J. C. (1994). "Molecular genetics of methane oxidation." *Biodegradation*, **5**, 145-59.
- Murrell, J. C., Gilbert, B. und McDonald, I. R. (2000a). "Molecular biology and regulation of methane monooxygenase." *Archives of Microbiology*, **173**, 325-332.
- Murrell, J. C., McDonald, I. R. und Gilbert, B. (2000b). "Regulation of expression of methane monooxygenases by copper ions." *Trends in Microbiology*, **8**, 221-5.
- Nakajima, T., Uchiyama, H., Yagi, O. und Nakahara, T. (1992). "Purification and Properties of a Soluble Methane Monooxygenase from *Methylocystis* Sp M." *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **56**, 736-740.

- Nash, T. (1953). "The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction." *The Biochemical Journal*, **55**, 416-21.
- Oldenhuis, R., Oedzes, J. Y., Vanderwaarde, J. J. und Janssen, D. B. (1991). "Kinetics of Chlorinated-Hydrocarbon Degradation by Methylosinus-Trichosporium Ob3b and Toxicity of Trichloroethylene." *Applied and Environmental Microbiology*, **57**, 7-14.
- Oldenhuis, R., Vink, R. L. J. M., Janssen, D. B. und Witholt, B. (1989). "Degradation of Chlorinated Aliphatic-Hydrocarbons by Methylosinus-Trichosporium Ob3b Expressing Soluble Methane Monooxygenase." *Applied and Environmental Microbiology*, **55**, 2819-2826.
- Ouimet, C. M., Shao, H., Rauch, J. N., Dawod, M., Nordhues, B., Dickey, C. A., Gestwicki, J. E. und Kennedy, R. T. (2016). "Protein Cross-Linking Capillary Electrophoresis for Protein-Protein Interaction Analysis." *Analytical Chemistry*, **88**, 8272-8278.
- Park, S., Hanna, M. L., Taylor, R. T. und Droege, M. W. (1991). "Batch Cultivation of Methylosinus-Trichosporium Ob3b .1. Production of Soluble Methane Monooxygenase." *Biotechnology and Bioengineering*, **38**, 423-433.
- Park, S. H., Shah, N. N., Taylor, R. T. und Droege, M. W. (1992). "Batch Cultivation of Methylosinus-Trichosporium-Ob3b .2. Production of Particulate Methane Monooxygenase." *Biotechnology and Bioengineering*, **40**, 151-157.
- Patel, R., Hou, C., LASKIN, A. und Felix, A. (1982). "Epoxidation of alkenes and hydroxylation of alkanes by soluble methane monooxygenase: regeneration of cofactor NADH." *Journal of Applied Biochemistry*, **4**, 175-184.
- Periana, R. A., Taube, D. J., Evitt, E. R., Löffler, D. G., Wentreck, P. R., Voss, G., Masuda, T. (1993). "A Mercury-Catalyzed, High-Yield System for the Oxidation of Methane to Methanol." *Science*, **259**, 340-343.
- Phelps, P. A., Agarwal, S. K., Speitel, G. E. und Georgiou, G. (1992). "Methylosinus-Trichosporium Ob3b Mutants Having Constitutive Expression of Soluble Methane Monooxygenase in the Presence of High-Levels of Copper." *Applied and Environmental Microbiology*, **58**, 3701-3708.
- Pilkington, S. J. und Dalton, H. (1990). "Soluble Methane Monooxygenase from Methylococcus-Capsulatus Bath." *Methods in Enzymology*, **188**, 181-190.
- Pongtharangkul, T., Chuekitkumchorn, P., Suwanampa, N., Payongsri, P., Honda, K. und Panbangred, W. (2015). "Kinetic properties and stability of glucose dehydrogenase from Bacillus amyloliquefaciens SB5 and its potential for cofactor regeneration." *AMB Express*, **5**, 68.
- Rodrigues, A. D., Valdman, B. und Salgado, A. M. (2009). "Analysis of Methane Biodegradation by Methylosinus Trichosporium Ob3b." *Brazilian Journal of Microbiology*, **40**, 301-307.
- Roos, W. und Luckner, M. (1984). "Relationships Between Proton Extrusion and Fluxes of Ammonium Ions and Organic Acids in Penicillium cyclopium." *Microbiology*, **130**, 1007-1014.
- Ross, M. O. und Rosenzweig, A. C. (2016). "A tale of two methane monooxygenases." *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 1-13.
- Rusmini, F., Zhong, Z. Y. und Feijen, J. (2007). "Protein immobilization strategies for protein biochips." *Biomacromolecules*, **8**, 1775-1789.
- Saris, N.-E. L., Mervaala, E., Karppanen, H., Khawaja, J. A. und Lewenstam, A. (2000). "Magnesium: An update on physiological, clinical and analytical aspects." *Clinica Chimica Acta*, **294**, 1-26.
- Sazinsky, M. H., Merckx, M., Cadieux, E., Tang, S. Y. und Lippard, S. J. (2004). "Preparation and X-ray structures of metal-free, dicobalt and dimanganese forms of soluble methane monooxygenase hydroxylase from Methylococcus capsulatus (Bath)." *Biochemistry*, **43**, 16263-16276.
- Schleizinger, J. J., Struntz, W. D. J., Goldstone, J. V. und Stegeman, J. J. (2006). "Uncoupling of cytochrome P450 1A and stimulation of reactive oxygen species production by co-planar polychlorinated biphenyl congeners." *Aquatic Toxicology*, **77**, 422-432.

- Schöpfer, M. (2014). "Untersuchungen zur Kultivierung von *Methylococcus capsulatus* (Bath) und rekombinante Produktion der Reduktase MMOR aus *Methylosinus trichosporium* OB3b," Masterarbeit, Naturwissenschaftliche Fakultät, Institut für Biochemie und Biotechnologie Martin- Luther- Universität Halle- Wittenberg.
- Scott, D., Brannan, J., Higgins, I. J. (1981). "The Effect of Growth-Conditions on Intra-Cytoplasmic Membranes and Methane Mono-Oxygenase Activities in *Methylosinus-Trichosporium* Ob3b." *Journal of General Microbiology*, **125**, 63-72.
- Segel, I. H. (1993). "Enzyme Kinetics Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems." Wiley Classic Library Edition 1993 ed., John Wiley and Sons, Inc.
- Semprini, L., Roberts, P. V., Hopkins, G. D. und McCarty, P. L. (1990). "A Field Evaluation of In-Situ Biodegradation of Chlorinated Ethenes: Part 2, Results of Biostimulation and Biotransformation Experiments." *Ground Water*, **28**, 715-727.
- Semrau, J. D., DiSpirito, A. A. und Yoon, S. (2010). "Methanotrophs and copper." *FEMS Microbiology Reviews*, **34**, 496-531.
- Semrau, J. D., Jagadevan, S., Dispirito, A. A., Khalifa, A., Scanlan, J., Bergman, B. H., Freemeier, B. C., Baral, B. S., Bandow, N. L., Vorobev, A., Haft, D. H., Vuilleumier, S. und Murrell, J. C. (2013). "Methanobactin and MmoD work in concert to act as the 'copper-switch' in methanotrophs." *Environmental Microbiology*.
- Shah, N. N., Hanna, M. L. und Taylor, R. T. (1996). "Batch cultivation of *Methylosinus trichosporium* OB3b .5. Characterization of poly-beta-hydroxybutyrate production under methane-dependent growth conditions." *Biotechnology and Bioengineering*, **49**, 161-171.
- Shaofeng, H., Shuben, L., Jiayin, X., Jianzhong, N., Chungu, X., Haidong, T. und Wei, T. (2007). "Purification and biochemical characterization of soluble methane monooxygenase hydroxylase from *Methylosinus trichosporium* IMV 3011." *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **71**, 122-9.
- Sheldon, R. A. (2007). "Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance." *Advanced Synthesis & Catalysis*, **349**, 1289-1307.
- Shinohara, Y., Uchiyama, H., Yagi, O. und Kusakabe, I. (1998). "Purification and characterization of component B of a soluble methane monooxygenase from *Methylocystis* sp. M." *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **85**, 37-42.
- Shu, L., Nesheim, J. C., Kauffmann, K., Munck, E., Lipscomb, J. D. und Que, L., Jr. (1997). "An Fe2IVO2 diamond core structure for the key intermediate Q of methane monooxygenase." *Science*, **275**, 515-8.
- Sigma-Aldrich. (2017). "Produktinformation Glucose dehydrogenase from *Pseudomonas* sp." <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/19359?lang=de®ion=DE>.
- Sirajuddin, S. und Rosenzweig, A. C. (2015). "Enzymatic oxidation of methane." *Biochemistry*, **54**, 2283-94.
- Sluis, M. K., Sayavedra-Soto, L. A. und Arp, D. J. (2002). "Molecular analysis of the soluble butane monooxygenase from 'Pseudomonas butanovora'a." *Microbiology*, **148**, 3617-3629.
- Smith, T. J., Slade, S. E., Burton, N. P., Murrell, J. C. und Dalton, H. (2002). "Improved system for protein engineering of the hydroxylase component of soluble methane monooxygenase." *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 5265-73.
- Söhngen, N. L. (1906). "Ueber Bakterien, welche Methan als Kohlenstoffnahrung und Energiequelle gebrauchen." *Parasitenkunde und Infektionskrankheiten*, **II**, 513- 517.
- Song, H., Zhang, Y., Kong, W. und Xia, C. (2012). "Activities of Key Enzymes in the Biosynthesis of Poly-3-Hydroxybutyrate by *Methylosinus trichosporium* IMV3011." *Chinese Journal of Catalysis*, **33**, 1754-1761.
- Stafford, G. P., Scanlan, J., McDonald, I. R. und Murrell, J. C. (2003). "rpoN, mmoR and mmoG, genes involved in regulating the expression of soluble methane monooxygenase in *Methylosinus trichosporium* OB3b." *Microbiology*, **149**, 1771-1784.
- Stein, L. Y., Yoon, S., Semrau, J. D., Dispirito, A. A., Crombie, A., Murrell, J. C., Vuilleumier, S., Kalyuzhnaya, M. G., Op den Camp, H. J., Bringel, F., Bruce, D., Cheng, J. F.,

- Copeland, A., Goodwin, L., Han, S., Hauser, L., Jetten, M. S., Lajus, A., Land, M. L., Lapidus, A., Lucas, S., Medigue, C., Pitluck, S., Woyke, T., Zeytun, A. und Klotz, M. G. (2010). "Genome sequence of the obligate methanotroph *Methylosinus trichosporium* strain OB3b." *Journal of Bacteriology*, **192**, 6497-8.
- Stier, M. (2017). "Prozessentwicklung zur Herstellung von Methanol und Ameisensäure aus Biogas mittels einer Formaldehyd-Dismutase," Doctoral thesis, Fraunhofer-Institut für Grenzflächen-und Bioverfahrenstechnik Stuttgart, Universität Stuttgart.
- Stirling, D. I. und Dalton, H. (1979). "Properties of the methane mono-oxygenase from extracts of *Methylosinus trichosporium* OB3b and evidence for its similarity to the enzyme from *Methylococcus capsulatus* (Bath)." *European Journal of Biochemistry*, **96**, 205-12.
- Strong, P., J., Laycock, B., Mahamud, S. N. S., Jensen, P. D., Lant, P. A., Tyson, G., Pratt, S. (2016). "The Opportunity for High-Performance Biomaterials from Methane." *Microorganisms*, **4**, 11.
- Strong, P. J., Xie, S. und Clarke, W. P. (2015). "Methane as a Resource: Can the Methanotrophs Add Value?" *Environmental Science & Technology*.
- Stryer, L. B., J.M., Tymoczko, J.L. (2002). "Biochemistry." W.H.Freeman & Co Ltd.
- Theisen, A. R., Murrell, J. C. (2005). "Facultative Methanotrophs Revisited." *Journal of Bacteriology*, **187**, 4303-4305.
- Tinberg, C. E. und Lippard, S. J. (2010). "Oxidation Reactions Performed by Soluble Methane Monooxygenase Hydroxylase Intermediates H-peroxo and Q Proceed by Distinct Mechanisms." *Biochemistry*, **49**, 7902-7912.
- Tinberg, C. E. und Lippard, S. J. (2011). "Dioxygen Activation in Soluble Methane Monooxygenase." *Accounts of Chemical Research*, **44**, 280-288.
- Tsien, H. C., Brusseau, G. A., Hanson, R. S. und Wackett, L. P. (1989). "Biodegradation of Trichloroethylene by *Methylosinus-Trichosporium* Ob3b." *Applied and Environmental Microbiology*, **55**, 3155-3161.
- Twala, B. V., Sewell, B. T. und Jordaan, J. (2012). "Immobilisation and characterisation of biocatalytic co-factor recycling enzymes, glucose dehydrogenase and NADH oxidase, on aldehyde functional ReSyn polymer microspheres." *Enzyme and Microbial Technology*, **50**, 331-6.
- U. Kragl, W. Kruse, W.Hummel und C.Wandrey. (1996). "Enzyme engineering aspects of biocatalysis: Cofactor regeneration as example." *Biotechnology and Bioengineering*, **52**, 309-319.
- Valentine, A. M., Stahl, S. S. und Lippard, S. J. (1999). "Mechanistic studies of the reaction of reduced methane monooxygenase hydroxylase with dioxygen and substrates." *Journal of the American Chemical Society*, **121**, 3876-3887.
- Vandecasteele, J.-P. (1980). "Enzymatic Synthesis of l-Carnitine by Reduction of an Achiral Precursor: the Problem of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Recycling." *Applied and Environmental Microbiology*, **39**, 327-334.
- Wallar, B. J. und Lipscomb, J. D. (2001). "Methane monooxygenase component B mutants alter the kinetics of steps throughout the catalytic cycle." *Biochemistry*, **40**, 2220-2233.
- Wang, W., Iacob, R. E., Luoh, R. P., Engen, J. R. und Lippard, S. J. (2014). "Electron transfer control in soluble methane monooxygenase." *Journal of the American Chemical Society*, **136**, 9754-62.
- Wang, W., Liang, A. D. und Lippard, S. J. (2015). "Coupling Oxygen Consumption with Hydrocarbon Oxidation in Bacterial Multicomponent Monooxygenases." *Accounts of Chemical Research*, **48**, 2632-9.
- Wang, W. und Lippard, S. J. (2014). "Diiron oxidation state control of substrate access to the active site of soluble methane monooxygenase mediated by the regulatory component." *Journal of the American Chemical Society*, **136**, 2244-7.
- Ward, N., Larsen, O., Sakwa, J., Bruseth, L., Khouri, H., Durkin, A. S., Dimitrov, G., Jiang, L. X., Scanlan, D., Kang, K. H., Lewis, M., Nelson, K. E., Methe, B., Wu, M., Heidelberg, J. F., Paulsen, I. T., Fouts, D., Ravel, J., Tettelin, H., Ren, Q. H., Read, T., DeBoy, R. T., Seshadri, R., Salzberg, S. L., Jensen, H. B., Birkeland, N. K., Nelson, W. C.,

- Dodson, R. J., Grindhaug, S. H., Holt, I., Eidhammer, I., Jonassen, I., Vanaken, S., Utterback, T., Feldblyum, T. V., Fraser, C. M., Lillehaug, J. R. und Eisen, J. A. (2004). "Genomic insights into methanotrophy: The complete genome sequence of *Methylococcus capsulatus* (Bath)." *Plos Biology*, **2**, 1616-1628.
- West, C. A., Salmond, G. P. C., Dalton, H. und Murrell, J. C. (1992). "Functional Expression in *Escherichia-Coli* of Protein-B and Protein-C from Soluble Methane Monooxygenase of *Methylococcus-Capsulatus* (Bath)." *Journal of General Microbiology*, **138**, 1301-1307.
- Whittenbury, R., Davies, S. L., Davey, J. F. (1970a). "Exospores and Cysts Formed by Methane-Utilizing Bacteria." *Journal of General Microbiology*, **61**, 219-226.
- Whittenbury, R., Phillips, K. C., Wilkinson, J. F. (1970b). "Enrichment, Isolation and Some Properties of Methane-Utilizing Bacteria." *Journal of General Microbiology*, **61**, 205-218.
- Whittington, D. A. und Lippard, S. J. (2001). "Crystal structures of the soluble methane monooxygenase hydroxylase from *Methylococcus capsulatus* (Bath) demonstrating geometrical variability at the dinuclear iron active site." *Journal of the American Chemical Society*, **123**, 827-838.
- Wilhelm, E., Battino, R. und Wilcock, R. J. (1977). "Low-pressure solubility of gases in liquid water." *Chemical Reviews*, **77**, 219-262.
- Wolff, R. (2016). "Ist Alkohol doch eine Lösung?" <http://www.taz.de/!5270826/>.
- Wong, C., Drucekhammer, D. G. und Sweers, H. M. (1985). "Enzymatic vs. fermentative synthesis: thermostable glucose dehydrogenase catalyzed regeneration of NAD(P)H for use in enzymatic synthesis." *J Am Chem Soc*, **107**, 4028-4031.
- Woodland, M. P. und Dalton, H. (1984). "Purification and Characterization of Component A of the Methane Monooxygenase from *Methylococcus-Capsulatus* (Bath)." *The Journal of Biological Chemistry*, **259**, 53-59.
- Wu, C.-H., Chen, S., Shortreed, M. R., Kreitinger, G. M., Yuan, Y., Frey, B. L., Zhang, Y., Mirza, S., Cirillo, L. A., Olivier, M. und Smith, L. M. (2011). "Sequence-Specific Capture of Protein-DNA Complexes for Mass Spectrometric Protein Identification." *Plos One*, **6**, e26217.
- Yoch, D. C., Li, J., Hu, C.-Z. und Scholin, C. (1988). "Ammonia switch-off of nitrogenase from *Rhodobacter sphaeroides* and *Methylosinus trichosporium*: no evidence for Fe protein modification." *Arch Microbiol*, **150**, 1-5.
- Yu, Y., Ramsay, J. A. und Ramsay, B. A. (2009a). "Production of soluble methane monooxygenase during growth of *Methylosinus trichosporium* on methanol." *Journal of Biotechnology*, **139**, 78-83.
- Yu, Y., Ramsay, J. A. und Ramsay, B. A. (2009b). "Use of allylthiourea to produce soluble methane monooxygenase in the presence of copper." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **82**, 333-9.
- Zehr, J. P., Jenkins, B. D., Short, S. M. und Steward, G. F. (2003). "Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison." *Environmental Microbiology*, **5**, 539-554.
- Zhang, J. Y. und Lipscomb, J. D. (2006). "Role of the C-terminal region of the B component of *Methylosinus trichosporium* OB3b methane monooxygenase in the regulation of oxygen activation." *Biochemistry*, **45**, 1459-1469.
- Zhang, J. Y., Wallar, B. J., Popescu, C. V., Renner, D. B., Thomas, D. D. und Lipscomb, J. D. (2006). "Methane monooxygenase hydroxylase and B component interactions." *Biochemistry*, **45**, 2913-2926.
- Zhang, Y., Xin, J., Chen, L., Song, H. und Xia, C. (2008). "Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular weight by methanotroph from methane and methanol." *Journal of Natural Gas Chemistry*, **17**, 103-109.
- Zhao, H. und van der Donk, W. A. (2003). "Regeneration of cofactors for use in biocatalysis." *Current Opinion in Biotechnology*, **14**, 583-589.
- Zhen, X. und Wang, Y. (2015). "An overview of methanol as an internal combustion engine fuel." *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **52**, 477-493.

7 Anhang

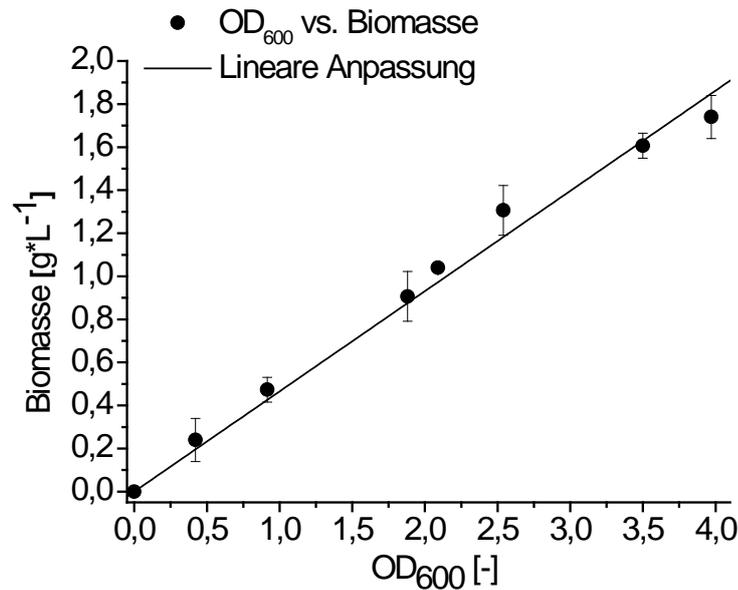


Abbildung 7-1: Abhängigkeit der Biomasse von *Methylosinus trichosporium* OB3b gewachsen mit CH₄ von der optischen Dichte bei 600 nm Ein Datenpunkt entspricht dem Mittelwert von n= drei unabhängigen Messungen. $OD_{600}=1 = 0,467 \pm 0,013 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $R^2 = 0,9948$

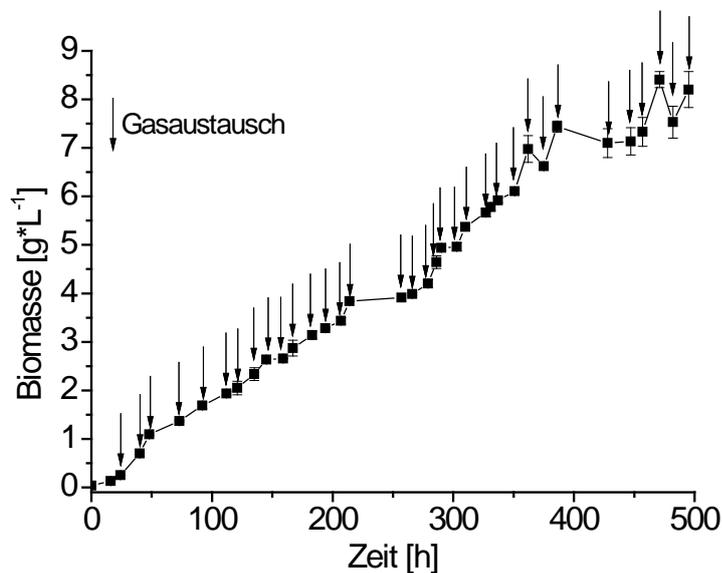


Abbildung 7-2: Wachstum von *Methylosinus trichosporium* OB3b auf NMS-Medium mit CH₄ als C-Quelle bei mehrfachem Gasaustausch und erneuter Einstellung der CH₄-Atmosphäre um O₂ als limitierenden Faktor der Kultivierung im Schüttelkolbenmaßstab zu identifizieren. Nach Gasaustausch weiteres Wachstum bis 500 Stunden Kultivierungszeit möglich. Mittelwert von n= zwei Kolben Jeder Pfeil entspricht dem Zeitpunkt des Gasaustausches und der neuen Zugabe von CH₄. sMMO-Aktivität konnte über den gesamten Kultivierungszeitraum nachgewiesen werden. Nach 24 h = $1.800 \pm 200 \mu\text{mol}_{1\text{-Naphthol}} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, nach 500 Stunden = $300 \pm 50 \mu\text{mol}_{1\text{-Naphthol}} \cdot \text{g}_{\text{BTM}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$

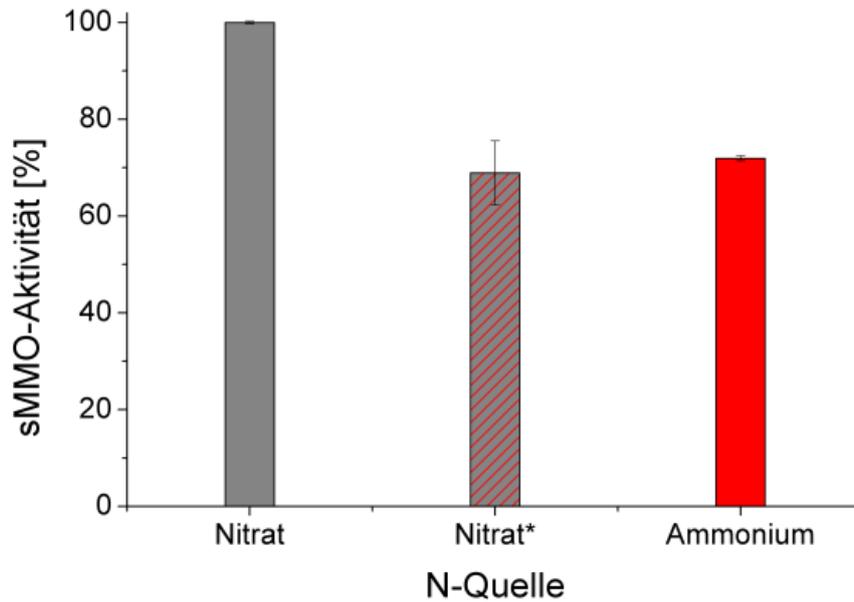


Abbildung 7-3: Vergleich der sMMO-Aktivität in *Methylosinus trichosporium* OB3b-Kulturen, die auf Medien mit unterschiedlichen N-Quellen (10 mM Nitrat bzw. Ammonium) kultiviert wurden. * Kultur, die im Nitrat-Medium kultiviert wurde, während des Naphthalin-Assays aber mit 10 mM Ammonium inkubiert wurde. n= zwei Messungen. Abbildung aus [Dillmann, 2014]

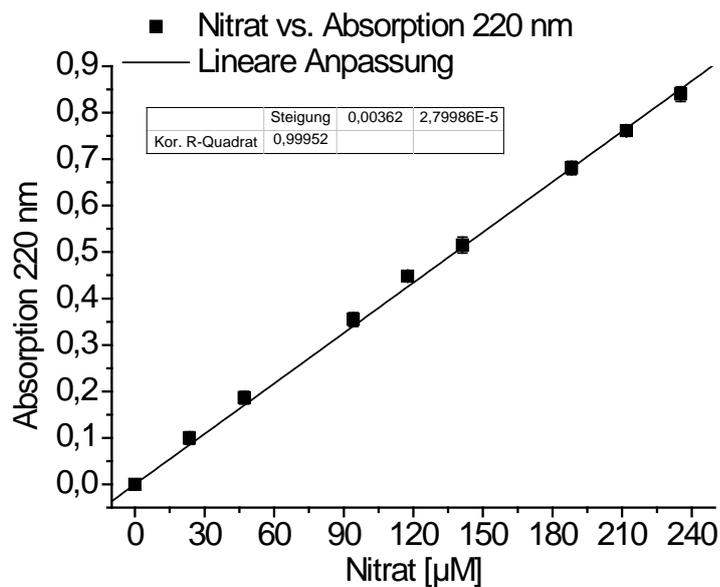


Abbildung 7-4: Kalibriergerade Nitratmessung innerhalb der Fermentationen. Es sind Mittelwerte aus n= drei Messungen dargestellt. Erhaltene Kalibriergerade: $y = 0,00362 \cdot x$.

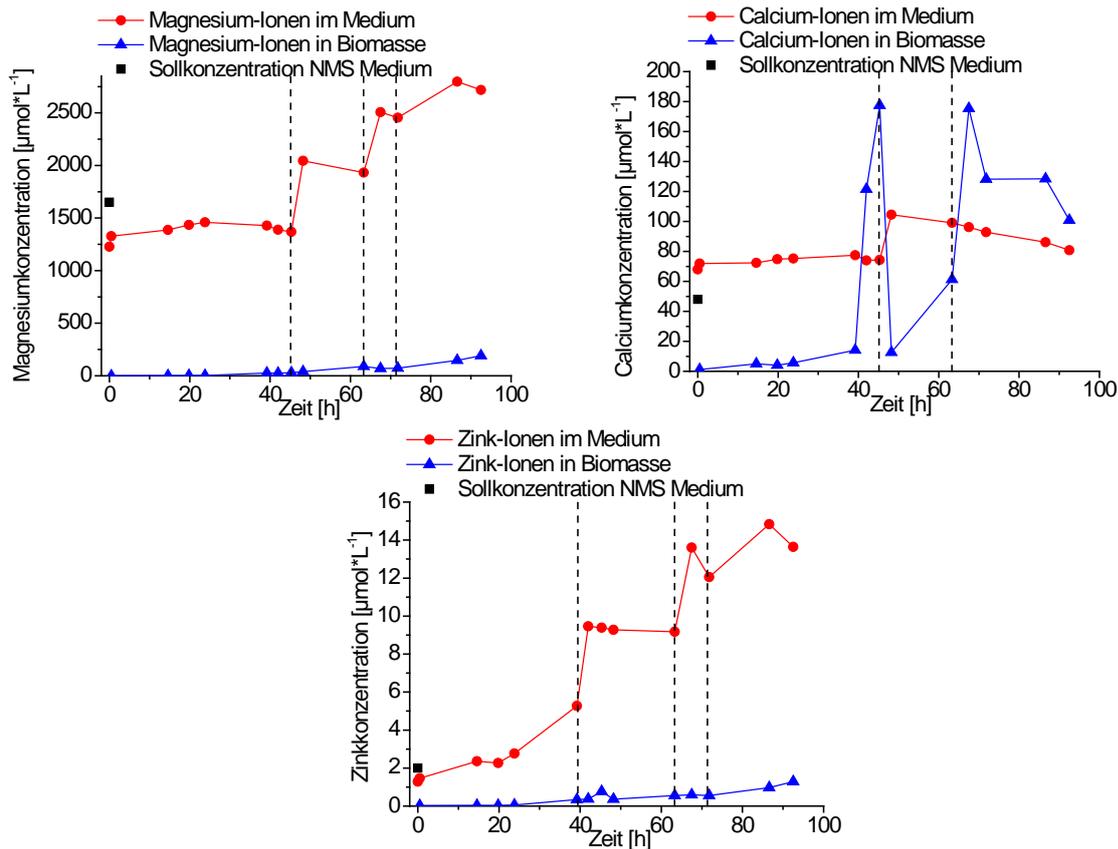


Abbildung 7-5: Konzentrationen von Magnesium-, Calcium- und Zinkionen im Medium (rot) und in der Biomasse (blau) bei Fermentation A von *M. trichosporium* OB3b mit CH_3OH als C-Quelle, mod. NMS Medium (Tabelle 3-3) mit Zusatz an $5 \mu\text{M}$ ATU bei 30°C und pH 6,9 im 6,8 L-Maßstab. Berechnet aus ICP-MS-Daten. Angabe in $\mu\text{mol Metall} \cdot \text{L}^{-1}$. Die Zinkkonzentration wurde mit Faktor zehn multipliziert, da ein Verdünnungsfehler vorlag. Die gestrichelten Linien entsprechen dem Zeitpunkt der Zugabe der jeweiligen Komponente (Tabelle 3-6, S.70). Berechnung für Biomasse über folgende Gleichung.

$$C_{\text{Metall in BTM}} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} \right] = C_{\text{Metall pro BTM}} \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{g BTM}} \right] \times C_{\text{BTM}} \left[\frac{\text{g BTM}}{\text{L}} \right] \quad (\text{Formel 7-1})$$

Mit $C_{\text{Metall in BTM}}$ = Metallkonzentration zum Zeitpunkt t, bezogen auf das Fermentationsvolumen; $C_{\text{Metall pro BTM}}$ = Metallkonzentration zum Zeitpunkt t, bezogen auf die eingesetzte Biomasse; C_{BTM} = Biomassenkonzentration im Fermenter zum Zeitpunkt t.

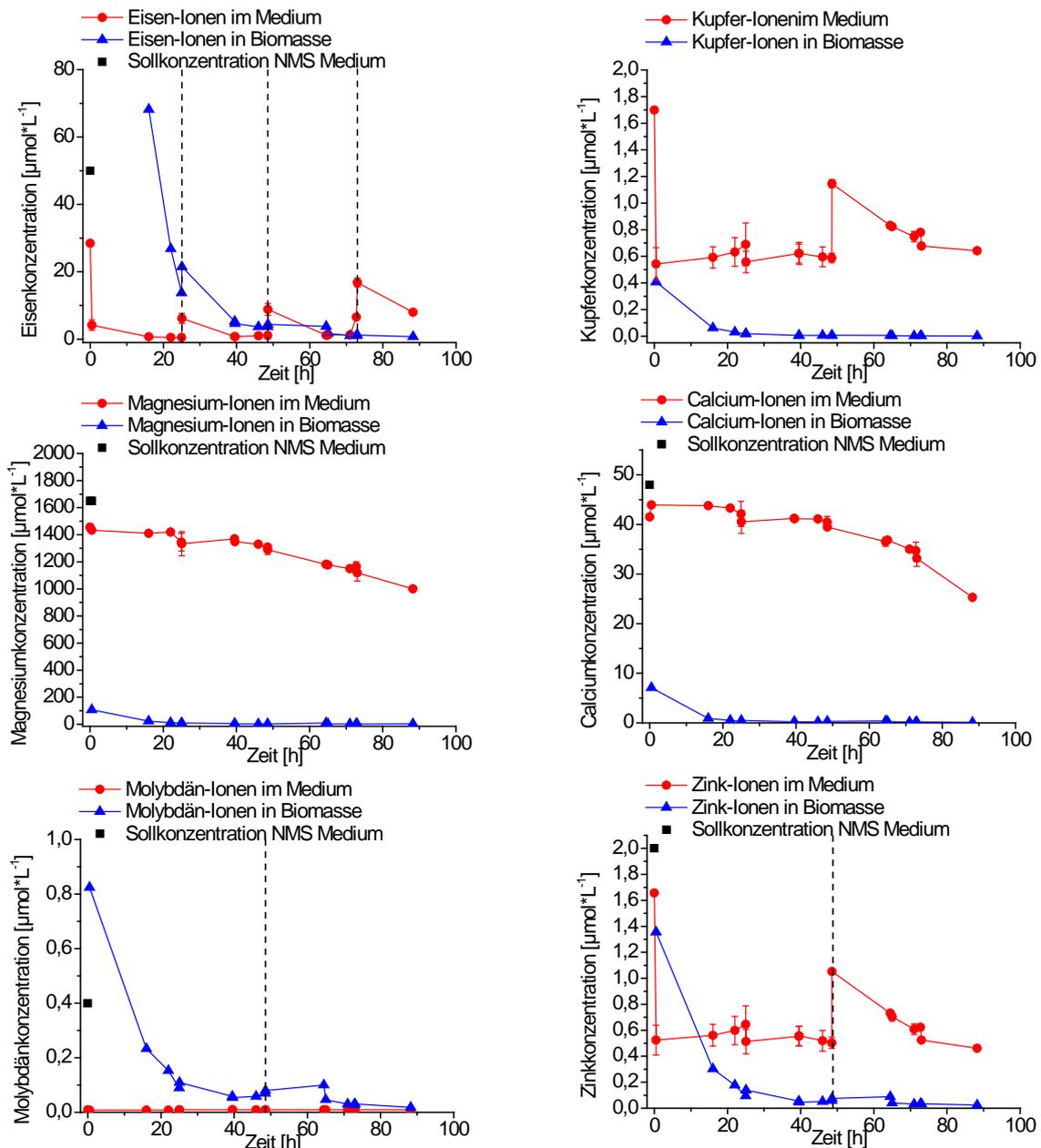


Abbildung 7-6: Konzentration von Eisen-, Kupfer-, Magnesium-, Calcium-, Molybdän-, und Zinkionen im Medium (rot) und in der Biomasse (blau) bei Fermentation B von *M. trichosporium* OB3b mit CH_3OH als C-Quelle, mod. NMS Medium (Tabelle 3-3) mit Zusatz an $5 \mu\text{M}$ ATU bei 30°C und pH 6,9 im 6,8 L-Maßstab mit Nitrat-Feed. Berechnet aus ICP-MS-Daten. Angabe in $\mu\text{mol Metall} \cdot \text{L}^{-1}$. Die gestrichelten Linien entsprechen dem Zeitpunkt der Zugabe der jeweiligen Komponente, Ausnahme Kupfer welches nicht aktiv zugegeben wurde sondern vermutlich durch Verunreinigungen der Spurenelementelösung zugesetzt wurde (Tabelle 3-8, S.76). Berechnung für Biomasse über Formel 7-1.

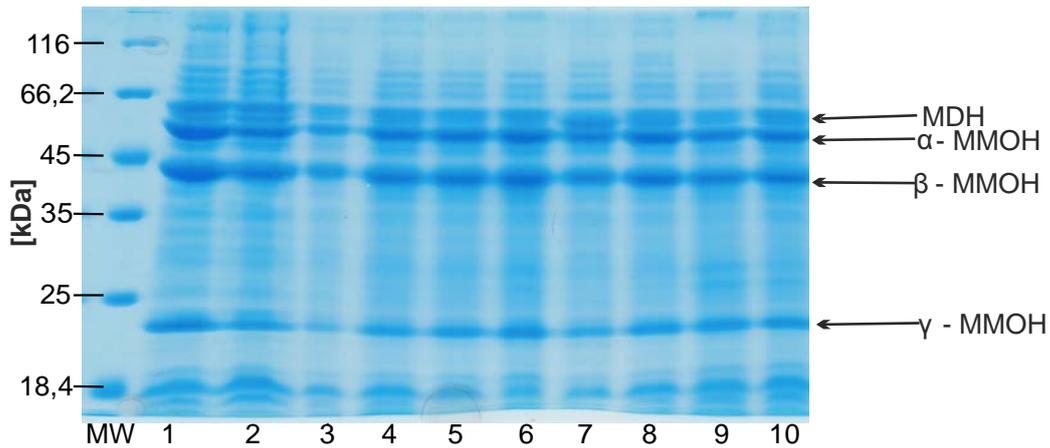


Abbildung 7-7: 12,5 %iges-SDS-PA-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben aus der Fermentationen von *M. trichosporium* OB3b mit CH_3OH als C-Quelle, mod. NMS Medium (Tabelle 3-3) mit Zusatz an $5 \mu\text{M}$ ATU bei 30°C und pH 6,9 im 6,8 L und 68 L-Maßstab. MW-Marker (PageRuler™, *Unstained Low Range Protein Ladder*, Thermo Scientific), Es wurden 1/OD Proben aufgetragen; 1-Vorkultur CH_4 ; 2- CH_3OH -Vorkultur; 3-6,8 L 16 h; 4-6,8 L 39,5 h; 5-6,8 L 64,5 h; 6-6,8 L 88,3 h; 7-68 L 24,8 h; 8-68 L 49 h; 9-68 L 79 h; 10 bis 68 L 95,8 h.

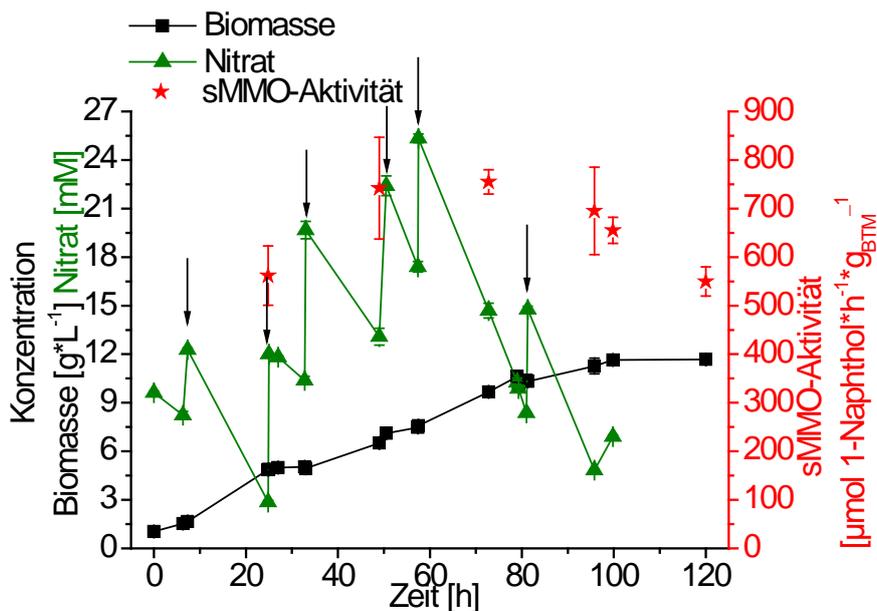


Abbildung 7-8 :Fermentation C von *M. trichosporium* OB3b mit CH_3OH als C-Quelle, mod. NMS Medium (Tabelle 3-3) mit Zusatz an $5 \mu\text{M}$ ATU bei 30°C und pH 6,9 im 68 L-Maßstab. Biomassenkonzentration (schwarz), Nitrat-Konzentration (grün) und sMMO-Aktivität (rot). Die Pfeile symbolisieren Zugaben an Medienkomponenten genaue Auflistung siehe Tabelle 7-1.

Tabelle 7-1: Zur Fermentation von *M. trichosporium* OB3b mit CH₃OH als C-Quelle, mod. NMS Medium (Tabelle 3-3) mit Zusatz an 5 µM ATU bei 30 °C und pH 6,9 im 68 L-Maßstab aus Abbildung 7-8 zugegebene Medienkomponenten.

Zeitpunkt [h]	Zugegebene Lösung	Zugegebene Konzentration [65 L]
7,3	310 mL 1 M NaNO ₃	NaNO ₃ -4,7 mM
25	630 mL 1 M NaNO ₃	NaNO ₃ -9,7 mM
27	280 mL 5 mM Fe(II)	Fe(II)-21,5 µM
33	600 mL 1 M NaNO ₃	NaNO ₃ -9,2 mM
50	710 mL 1 M NaNO ₃	NaNO ₃ -10,9 mM
57,5	600 mL 1 M NaNO ₃	NaNO ₃ -9,2 mM
	280 mL 5 mM Fe(II)	Fe(II)-21,5 µM
79	320 mL 165 mM Mg ²⁺ /4,8 mM Ca ²⁺	Mg ²⁺ -0,86 mM
	100 mL Spurenelemente Lösung	Ca ²⁺ -26,1 µM
81,3	435 mL 1 M NaNO ₃	NaNO ₃ -6,7 mM

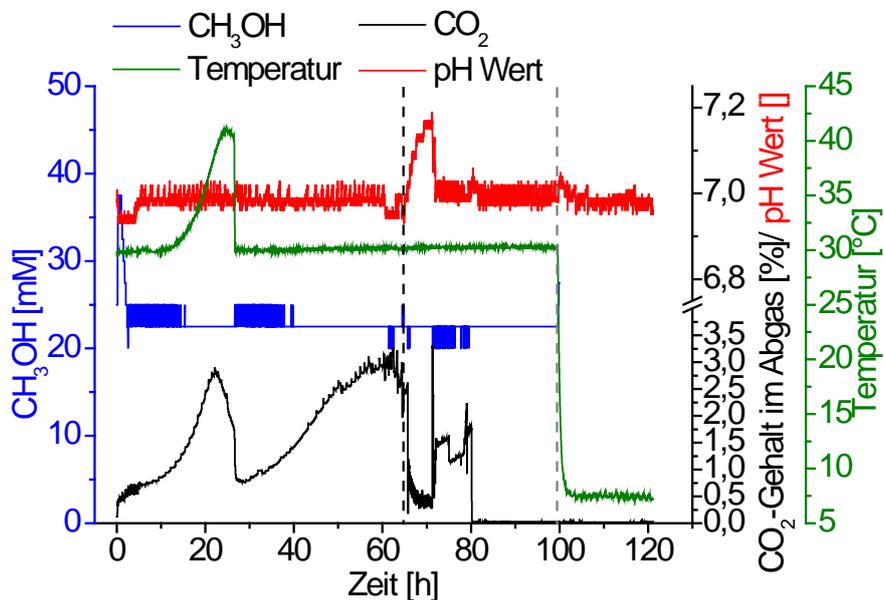


Abbildung 7-9: CH₃OH-Konzentration (blau), CO₂-Gehalt (schwarz) in der Abluft, pH Wert (rot) und Temperatur (grün) bei Fermentation C von *M. trichosporium* OB3b mit CH₃OH als C-Quelle, mod. NMS Medium (Tabelle 3-3) mit Zusatz an 5 µM ATU bei 30 °C und pH 6,9 im 68 L-Maßstab. Die erste gestrichelte schwarze Linie markiert den Zeitpunkt des Verstopfen des Abgasfilters und das Ablösen der Säurezufuhr, die zweite gestrichelte graue Linie entspricht dem Zeitpunkt des Abkühlens des Reaktors auf 8 °C für 20 h.

Tabelle 7-2: Zusammenfassung der Fermentation C von *M. trichosporium* OB3b mit CH₃OH als C-Quelle, mod. NMS Medium (Tabelle 3-3) mit Zusatz an 5 µM ATU bei 30 °C und pH 6,9 im 68 L-Maßstab.

Parameter	Wert
Kultivierungszeit	99,8 h (20 h bei 8 °C)
Finales Volumen	68 L
Finale Biomassenkonzentration	11,7 g*L ⁻¹
Verbrauchtes CH ₃ OH	4735 g = 5956 mL
Ertragskoeffizient $Y_{\text{BTM}/\text{CH}_3\text{OH}}$	0,17 g _{BTM} *g _{CH₃OH} ⁻¹
Durchschn. spez. Wachstumsrate $\bar{\mu}$	Berechnung über expon. Anpassung nicht möglich
Max. spez. Wachstumsrate μ_{max}	0,06 h ⁻¹ [0-25 h]
Geerntete Biofeuchtmasse	3940 g
Finale sMMO-Aktivität	550 µmol _{1-Naphthol} *h ⁻¹ *g _{BTM} ⁻¹
Verbrauchte 7,5 % H ₂ SO ₄	Nicht messbar weil Schlauch abgeplatzt
Verbrauchte 10,0 % NaOH	Nicht messbar weil Medium in Flasche zurück gedrückt
Zugegebene Nitratlösung [1 M]	2.685 mL (41,3 mM)
Verbrauchtes Nitrat	48,9 mM [2,5 g _{BTM} *g _{Nitrat} ⁻¹]
Verbrauchtes Antischaummittel (Sigma SE-15)	3.000 mL 0, 2 % 2.000 mL 1,5 %

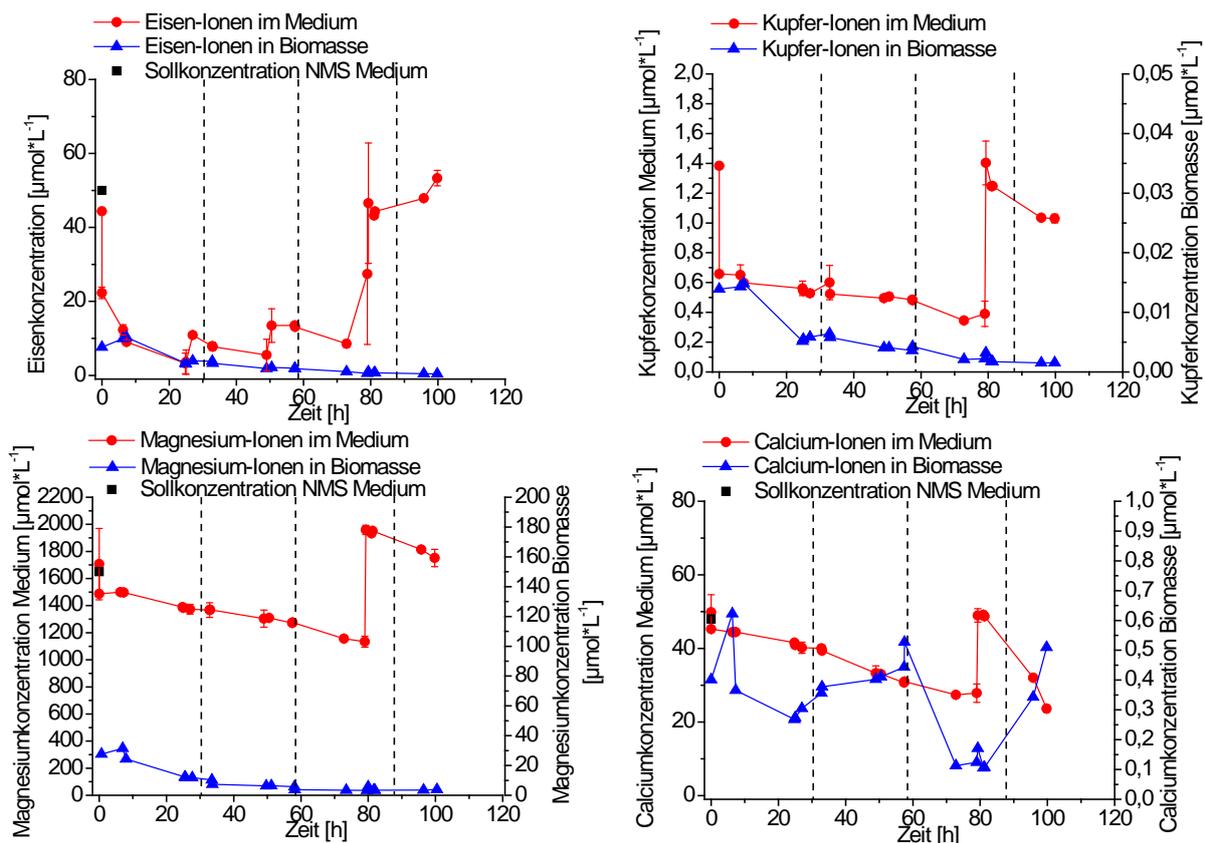


Abbildung 7-10: Konzentrationen von Eisen-, Kupfer-, Magnesium-, und Calciumionen im Medium (rot) und in der Biomasse (blau) bei der Fermentation C von *M. trichosporium* OB3b mit CH₃OH als C-Quelle, mod. NMS Medium (Tabelle 3-3) mit Zusatz an 5 µM ATU bei 30 °C und pH 6,9 im 68 L-Maßstab mit Nitrat-Feed. Berechnet aus ICP-MS-Daten. Angabe in µmol Metall *L⁻¹. Die gestrichelten Linien entsprechen dem Zeitpunkt der Zugabe der jeweiligen Komponente (Tabelle 7-1). Berechnung für Biomasse über Formel 7-1.

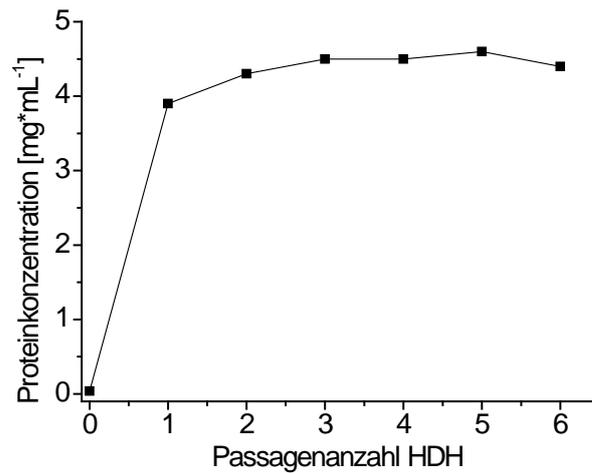


Abbildung 7-11: Proteinkonzentration im Rohextrakt in Abhängigkeit der Passagenanzahl durch den Hochdruckhomogenisator (HDH, EmulsiFlex-C5) beim Zellaufschluss von *Methylo-sinus trichosporium* OB3b. Proteinkonzentration ermittelt mittels Bradford Bestimmung.

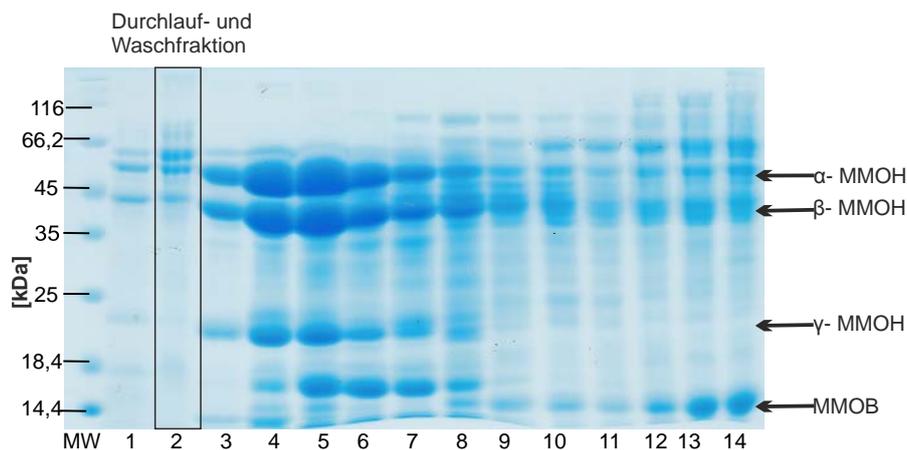


Abbildung 7-12: 12,5 %iges-SDS-PA-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben aus dem Reinigungsverlauf der 1. AEC. MW-Marker (PageRuler™, *Unstained Low Range Protein Ladder*, Thermo Scientific), 1- Rohextrakt (10 µg), 2- Durchlauf- und Waschfraktion mit MMOH-Bandenmuster, 3- 14 Elutionsfraktionen jeweils 10 µL einer 1:3 Verdünnung mit SDS-Probenpuffer aufgetragen. Die aufgetragenen Proben entsprechen einer anderen Reinigung als derer die in Kapitel 3.3, S.84 beschrieben wurde.

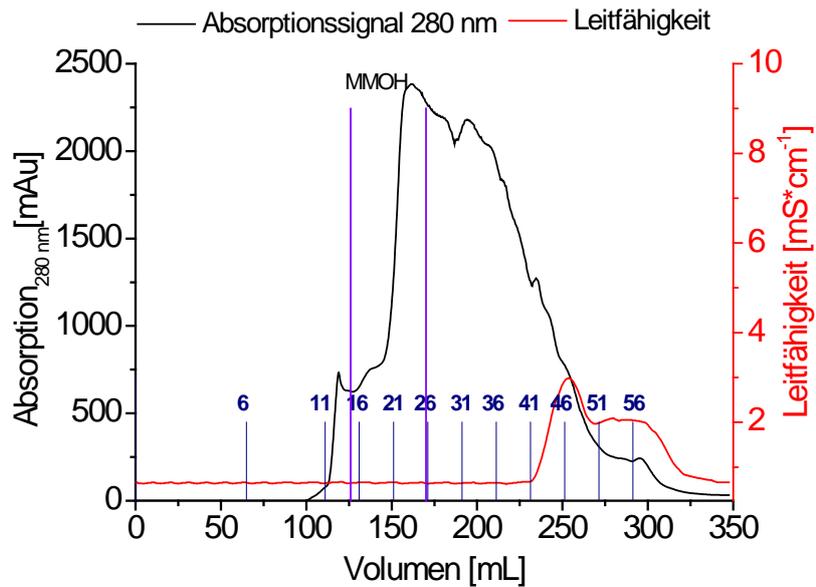


Abbildung 7-13: Chromatogramm der SEC zur Reinigung der MMOH mit Zusatz an 0,2 mM Fe(II) mit Absorption bei 280 nm (mAu, schwarz), Leitfähigkeit ($\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$, rot), Grenzen der eluierten MMOH-Fractionen (Fraktionen 15 bis 25) (violett) und Fraktionierung der aufgefangenen Proben (blau). Puffer, 25 mM MOPS pH 7,0.

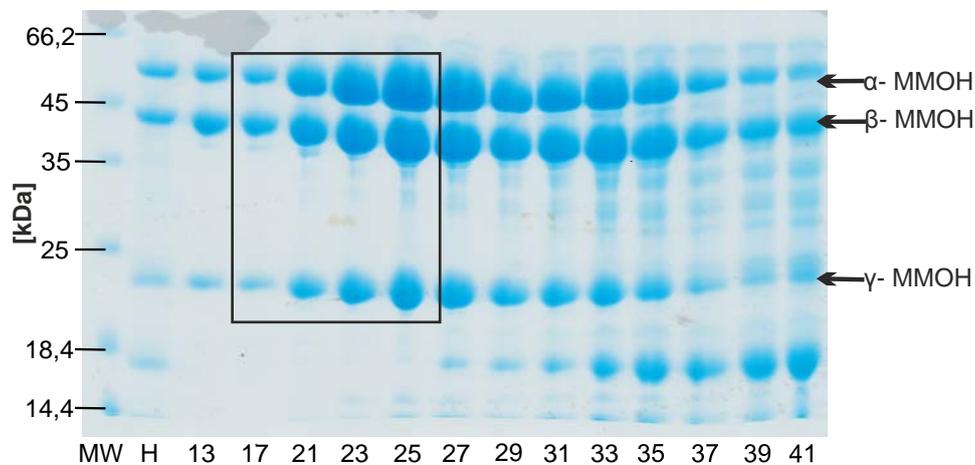


Abbildung 7-14: 12,5 %iges-SDS-PA-Gel der SEC aus Abbildung 7-13 zur Reinigung der MMOH mit Zusatz an 0,2 mM Fe(II). MW-Marker (PageRuler™), H-konzentrierte MMOH-Fraktion nach der 1. AEC (10 μg), 13 bis 41 Elutionsfraktionen aus Abbildung 7-13, jeweils 10 μL einer 1:3 Verdünnung mit SDS-Probenpuffer aufgetragen. Schwarzer Rahmen entspricht der vereinigten MMOH-Fraktion.

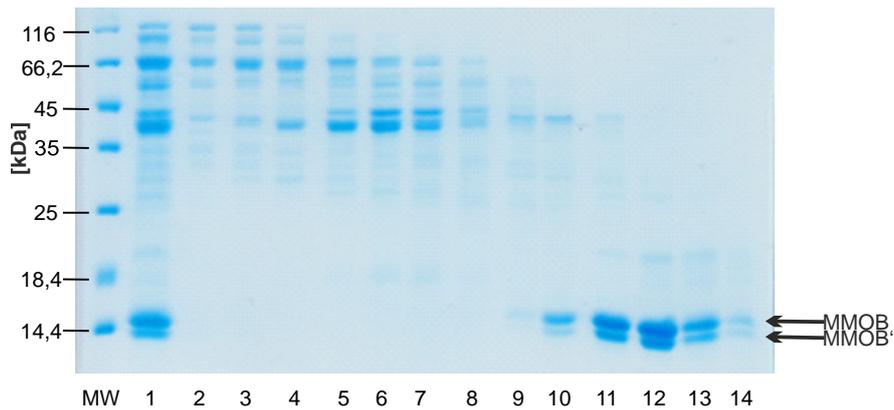


Abbildung 7-15: 16,0 %iges-SDS-PA-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben aus dem Reinigungsverlauf der der SEC zur Reinigung von MMOB. MW-Marker (PageRuler™), 1- MMOB Fraktion nach 2. AEC (10 µg); 2- 14 Elutionsfraktionen 17 bis 29 der SEC, jeweils 10 µL einer 1:2 Verdünnung mit SDS-Probenpuffer aufgetragen. Fraktion 12 wurde für eine ESI-MS Analyse ausgeschnitten

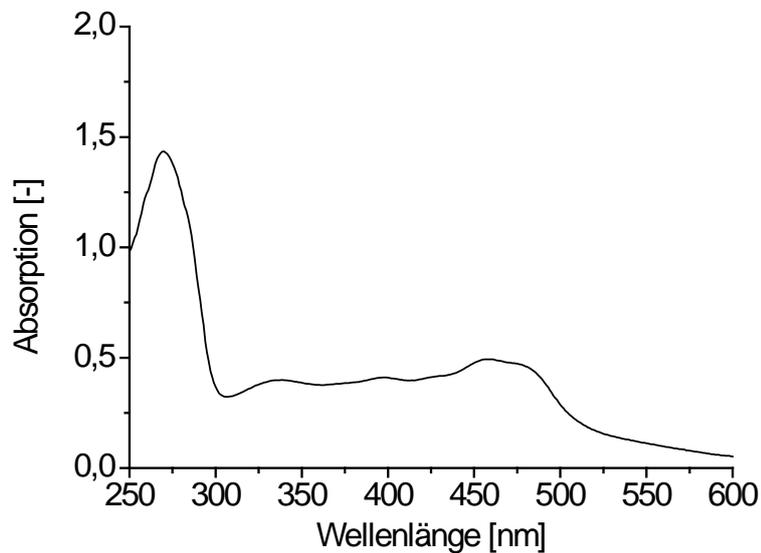


Abbildung 7-16: Spektrum der MMOR-Fraktion (Proteinkonzentration $1,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} = 26 \text{ µM}$, mittels Bradford Bestimmung) nach SEC. Puffer: 25 mM MOPS, 1 mM TCEP, pH 7,0. Bei 30 °C.

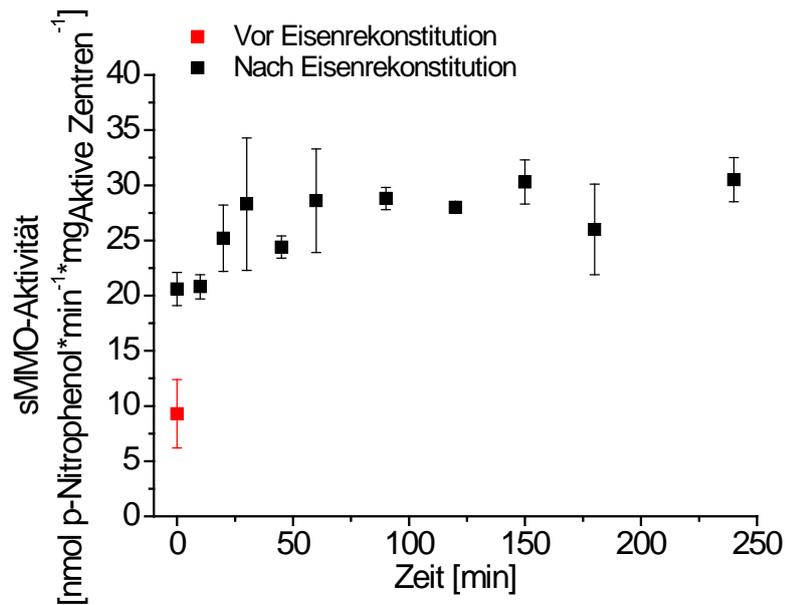


Abbildung 7-17: Spezifische sMMO-Aktivität im Nitrobenzol-Assay vor und nach Eisenrestitution der MMOH in Abhängigkeit der Inkubationszeit der MMOH. Die Messungen erfolgten zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Eisenrestitution. Dargestellt sind Mittelwerte aus $n=$ zwei Messungen. Eisenrestitution: MMOH 47,5 μM in Eisenrestitutionspuffer (25 mM MOPS pH 7,0 mit 120 mM NaCl, 2 mM DTT (oder DTE), 5 v/v% Glycerin, 0,5 mM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$) verdünnt und bei 25 °C inkubiert. Die sMMO-Aktivität wurde auf die Zahl der aktiven Zentren der MMOH bezogen. Die Messung erfolgte bei einem stöchiometrischen Verhältnis der sMMO von $\text{MMOH}_{\text{Aktive Zentren}}$ 2 μM ; rek. MMOB 1 μM ; MMOR, 1 μM in 25 mM MOPS-Puffer pH 7,0, bei 30 °C und mit 1,5 mM Nitrobenzol

Tabelle 7-3: Extinktionskoeffizienten von *p*-Nitrophenol innerhalb der eingesetzten Messpuffer bei verschiedenen pH Werten im 0,5 mL und 0,2 mL-Maßstab. TMA-Puffer = 50 mM Tris 25 mM MES 25 mM Natriumacetat

Puffer	pH Wert	Extinktionskoeffizient <i>p</i> -Nitrophenol 420 nm [$\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
0,5 mL Küvetten-Maßstab im Ultrospec 2100 Spektrometer		
25 mM MOPS	7,0	6860
25 mM MOPS, 50 mM NaCl	7,5	9210
TMA-Puffer	7,5	8715
Puffer	pH Wert	Extinktionskoeffizient <i>p</i> -Nitrophenol 420 nm [M^{-1}]
0,2 mL 96 well Platten-Maßstab im Fluostar Galaxy Spektrometer		
25 mM MOPS, 50 mM NaCl	7,5	5324
TMA-Puffer	7,5	5403
TMA-Puffer	6,0	691
TMA-Puffer	6,4	1898
TMA-Puffer	6,9	3591
TMA-Puffer	7,2	5148
TMA-Puffer	7,75	6662
TMA-Puffer	8,25	7643
TMA-Puffer	8,75	7774

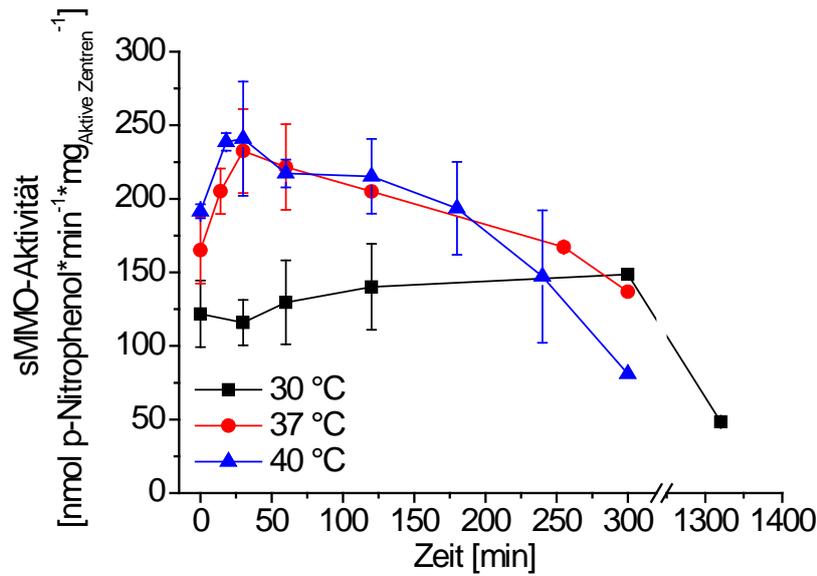


Abbildung 7-18: Spezifische sMMO-Aktivität in Abhängigkeit der Inkubationszeit bei 30; 37 und 40 °C im Nitrobenzol-Assay. Angegeben sind Mittelwerte aus $n =$ zwei Messungen. Es wurden folgende Bedingungen verwendet: $\text{MMOH}_{\text{aktive Zentren}}$: rek. MMOB: MMOR = 2:1:1 μM ; 5 mM Nitrobenzol; 1 mM NADH; Messpuffer 25 mM MOPS + 50 mM NaCl pH 7,5. Daten aus [Kind, 2016]

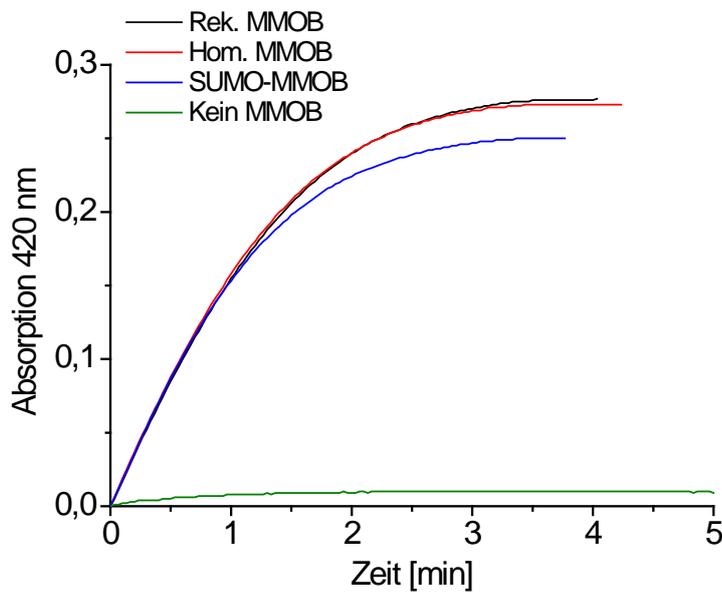


Abbildung 7-19: Progresskurven der sMMO-Aktivität im Nitrobenzol-Assay bei Verwendung von rek. MMOB; hom. MMOB; SUMO-MMOB und ohne MMOB. Folgende Bedingungen wurden eingestellt: $\text{MMOH}_{\text{aktive Zentren}}$: MMOB: MMOR = 1:1:1 μM ; 5 mM Nitrobenzol; 1 mM NADH; 30 °C; Messpuffer 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat pH 7,5. Für die Berechnung der sMMO-Aktivität wurden der Anstieg der Kurven in der ersten Minute verwendet.

Tabelle 7-4: Spezifische sMMO-Aktivität bei verschiedenen MMOB/SUMO-MMOB zu MMOH Verhältnissen. Daten entsprechen Mittelwerten aus n= zwei Messungen Hinter den Aktivitäten sind die entsprechenden prozentualen Aktivitäten bezogen auf 100 % beim Verhältnis 1:1 aufgelistet. Folgende Bedingungen wurden eingestellt: $\text{MMOH}_{\text{aktive Zentren}}:\text{MMOR} = 1:1 \mu\text{M}$; 1 mM Nitrobenzol; 1 mM NADH; 30 °C; Messpuffer 25 mM MOPS, 50 mM NaCl, pH 7,5.

Verhältnis MMOB/SUMO-MMOB zu MMOH [μM]	Enzymaktivität [nmol p-Nitrophenol * min ⁻¹ *mg _{Aktive Zentren} ⁻¹]	
	MMOB	SUMO-MMOB
1	157,6 ± 12,3 [100 %]	136,5 ± 2,5 [100 %]
8	86,7 ± 9,5 [55 %]	88,9 ± 2,6 [65 %]
15	57,2 ± 3,1 [36 %]	63,7 ± 6,6 [47 %]
30	33,2 ± 2,6 [21 %]	45,0 ± 3,9 [33 %]

Tabelle 7-5: Eigene Messungen und Literaturdaten zum Vergleich der sMMO-Aktivität bei verschiedenen MMOB zu MMOH Verhältnissen [Wallar und Lipscomb, 2001]. Folgende Bedingungen wurden eingestellt: $\text{MMOH}_{\text{aktive Zentren}}:\text{MMOR} = 1:1 \mu\text{M}$; 1 mM Nitrobenzol; 1 mM NADH; 30 °C; Messpuffer 25 mM MOPS, 50 mM NaCl, pH 7,5. Bedingungen Literatur bei 25 °C in 50 mM MOPS pH 7,6; 0,4 mM NADH, 1,2 mM Nitrobenzol. Die Unterschiede der Ausgangsaktivitäten waren vermutlich auf die unterschiedlichen Messbedingungen zurückzuführen.

Verhältnis MMOB zu MMOH [μM]	Enzymaktivität [%]	Enzymaktivität [%]
	Eigene Daten	[Wallar und Lipscomb, 2001].
1	100 % (157,6 mU*mg ⁻¹ _{Aktive Zentren})	100 % (57,6 mU*mg ⁻¹ _{Aktive Zentren})
4	n.b.	75
8	55	54
15	36	n.b.
16	n.b.	42
24	n.b.	33
30	33	n.b.

n.b.-nicht bestimmt

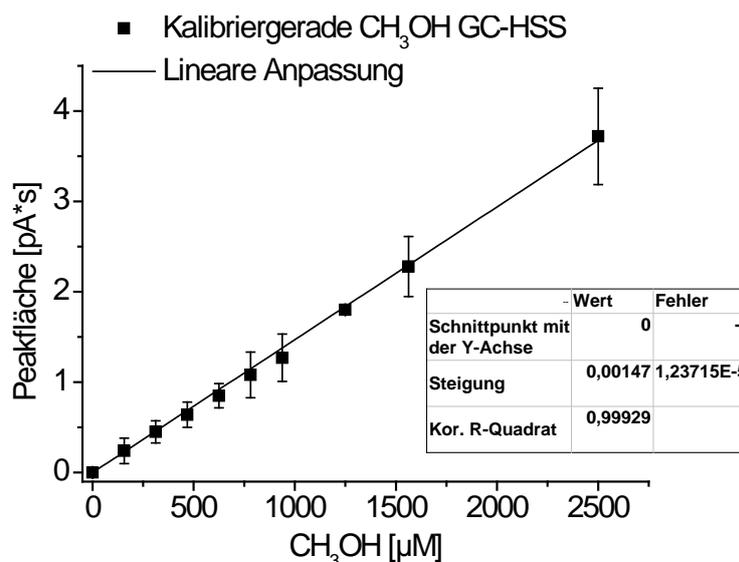


Abbildung 7-20: Kalibriergerade für CH₃OH-Messung Mittels GC-HSS. Angegeben sind die Mittelwerte aus n= drei Messungen. Die im Puffer gemessene CH₃OH-Konzentration wurde von allen Werten abgezogen. Erhaltene Kalibriergerade: $c_{\text{CH}_3\text{OH}} [\mu\text{M}] = 680,3 \cdot \text{Peakfläche} [\text{pA}\cdot\text{s}]$

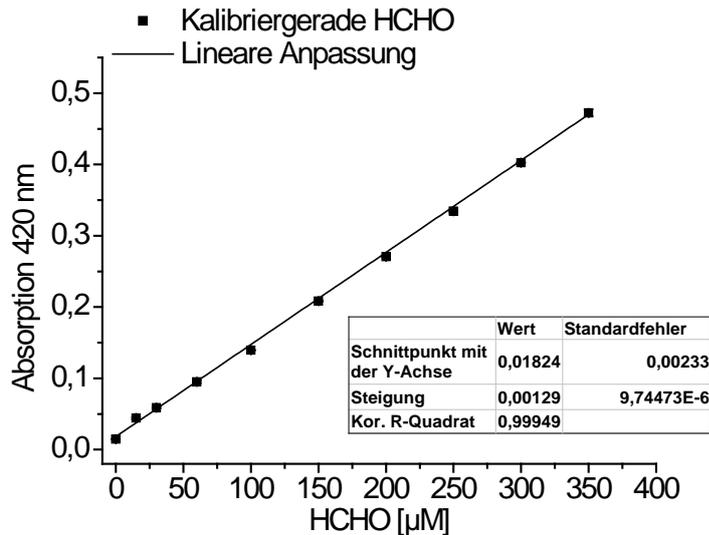


Abbildung 7-21: Kalibriergerade für HCHO-Messung mittels Nash Methode. Angegeben sind die Mittelwerte aus $n=$ zwei Messungen. Erhaltene Kalibriergerade: $c_{\text{HCHO}} [\mu\text{M}] = 775,2 \cdot (\text{Absorption } 420 \text{ nm } [-] - 0,01824)$. Messungen erfolgten im TMA-Puffer pH 7,5.

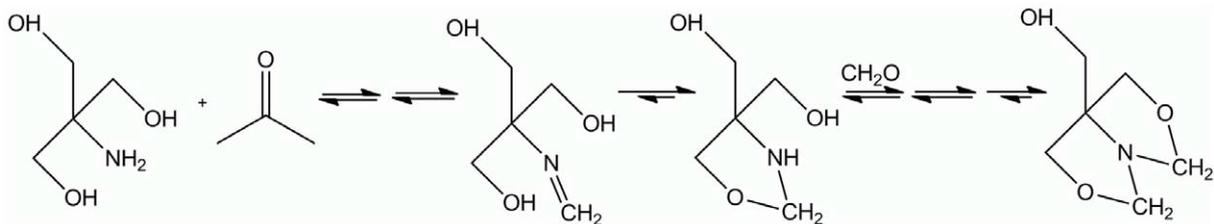


Abbildung 7-22: Reaktion von HCHO mit Tris beim Stoppen der Protein Quervernetzung. Es entsteht ein stabiles Produkt. 1-aza-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octane-5-methanol. Abbildung aus [Wu et al., 2011] doi:10.1371/journal.pone.0026217.g011.

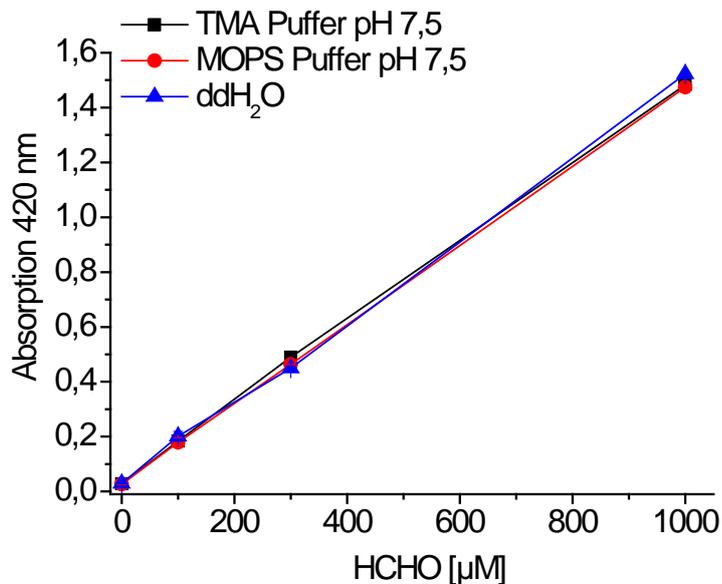


Abbildung 7-23: Vergleich der HCHO-Messungen in 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Acetat (TMA) Puffer pH 7,5, 25 mM MOPS + 50 mM NaCl Puffer pH 7,5 und ddH₂O. Angegeben sind die Mittelwerte aus $n=$ zwei Messungen. Lineare Anpassung : TMA: $y = 0,00145 \cdot x + 0,0394$; MOPS: $y = 0,00144 \cdot x + 0,0301$; ddH₂O: $y = 0,00149 \cdot x + 0,0305$.

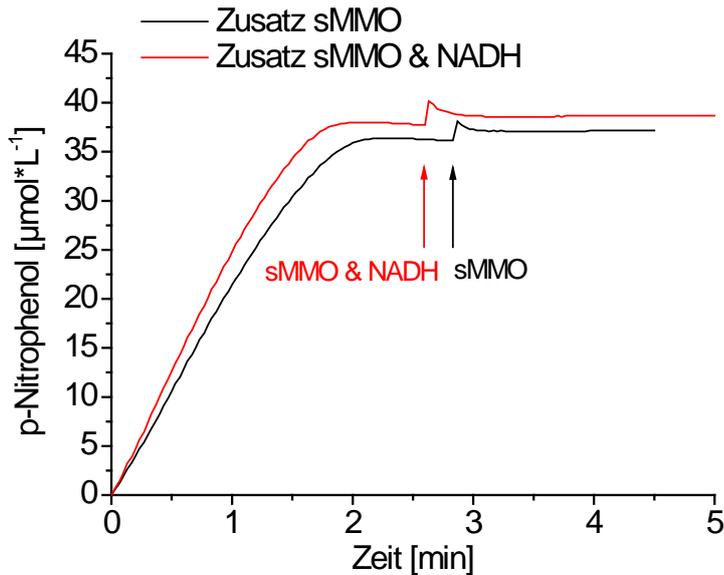


Abbildung 7-24: Progresskurven für die *p*-Nitrophenolbildung durch die sMMO mit Zusatz an sMMO und sMMO+ NADH im Nitrobenzol-Assay nach stagnieren der *p*-Nitrophenolbildung. Folgende Bedingungen wurden eingestellt: $\text{MMOH}_{\text{aktive Zentren}}$: rek. MMOB : MMOR = 2:2:2 μM ; 5 mM Nitrobenzol; 1 mM NADH; 30 °C; Messpuffer 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat pH 7,5. Pfeile geben Zeitpunkt der sMMO (schwarz) ; sMMO+ NADH (rot) Zugabe an.

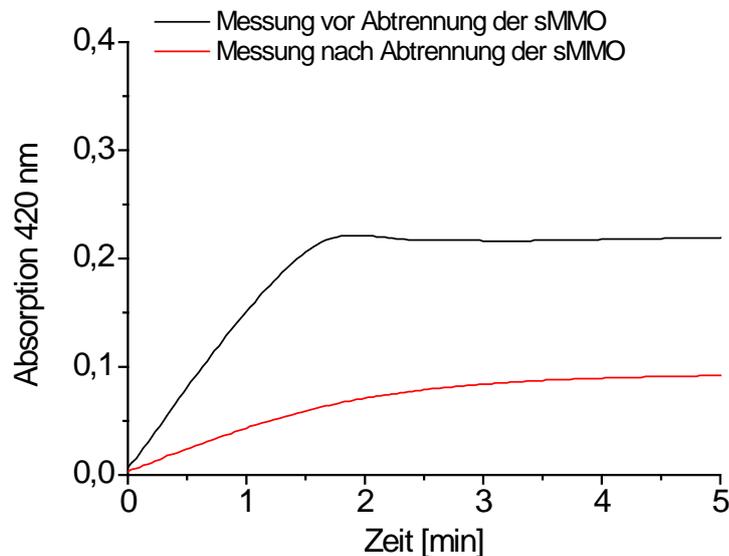


Abbildung 7-25: Progresskurven der sMMO-Aktivität im Nitrobenzol-Assay vor und nach der Abtrennung der sMMO Komponenten von der Reaktionsbrühe im Nitrobenzol-Assay. Es wurden folgende Bedingungen verwendet: Messung vor Abtrennung (schwarze Linie): $\text{MMOH}_{\text{aktive Zentren}}$: rek. MMOB : MMOR = 2:2:2 μM (0,47 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Protein); 5 mM Nitrobenzol; 1 mM NADH; 30 °C; Messpuffer 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat pH 7,3; 25 mM MOPS-Puffer pH 7,5. Nach Abtrennung der sMMO (rote Linie): Elutionsfraktion der Entsalzungssäule unverdünnt (0,29 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Protein); andere Bedingungen identisch. Proteinverdünnung nach Entsalzung = 1,6x. Verdünnung im Aktivitätsassay (Zugabe NB und NADH) = 1,6 x, d.h. Gesamtverdünnung im Vergleich zum Ausgangstest = 2,6x = 38 % Restaktivität sollten gemessen werden.

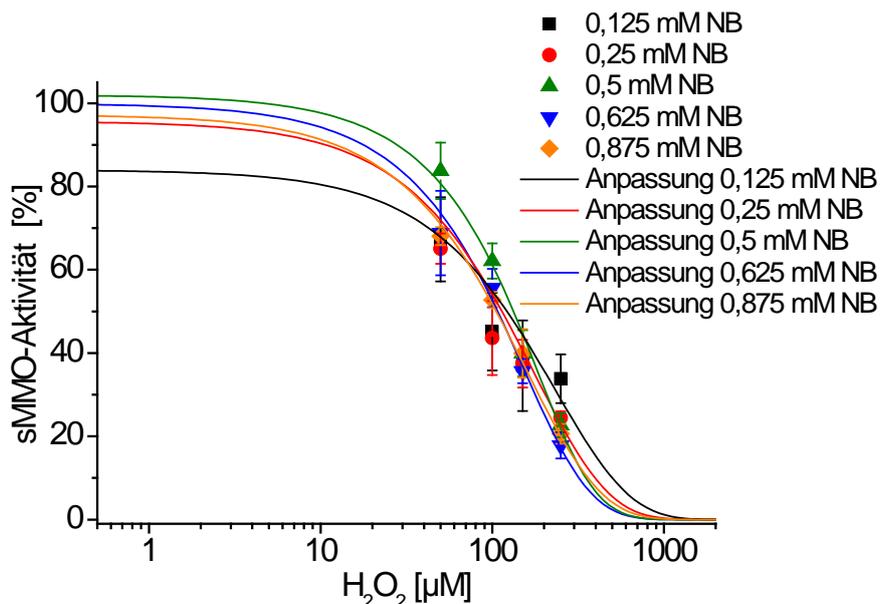


Abbildung 7-26: Dosis-Wirkungs-Diagramm der sMMO-Aktivität in Abhängigkeit der zugesetzten H_2O_2 -Konzentration bei verschiedenen Nitrobenzolkonzentrationen. Halblogarithmische Darstellung der Daten aus Abbildung 3-44, S.123 mit Interpolation der Daten über Formel 3-2.

Tabelle 7-6: Aus Abbildung 7-26 mit Formel 3-2 erhaltene mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) für H_2O_2 im Nitrobenzol-Assay.

Nitrobenzolkonzentration [mM]	H_2O_2 IC_{50} [μM]
0,125	132
0,25	145
0,375	116
0,5	145
0,625	123
0,75	107
0,875	119
1,0	141

Tabelle 7-7: Spezifische sMMO-Aktivität im Nitrobenzol-Assay mit Zusatz von HCHO vor Start der Reaktion in MOPS und Tris-MES-Acetat-Puffer. Angegeben sind Mittelwerte aus $n=$ drei Messungen. Folgende Bedingungen wurden eingestellt: $\text{MMOH}_{\text{aktive Zentren}}$: rek. MMOB : MMOR = 1:1:1 μM ; 1 mM Nitrobenzol; 1 mM NADH; 30 °C; Messpuffer 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat pH 7,5 bzw. 25 mM MOPS + 50 mM NaCl pH 7,5.

HCHO [μM]	Spezifische sMMO-Aktivität [$\text{mU} \cdot \text{mg}_{\text{aktive Zentren}}^{-1}$]	
	MOPS-Puffer	Tris-MES-Acetat-Puffer
0	143,8 \pm 18,1	146,1 \pm 2,5
100	133,7 \pm 2,3	142,0 \pm 3,5
300	121,3 \pm 9,6	136,3 \pm 9,6

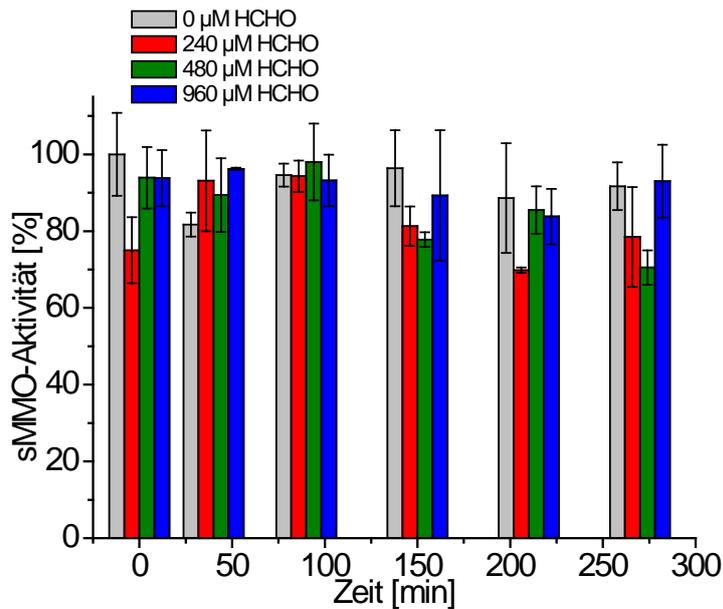


Abbildung 7-27: sMMO-Aktivität [%] nach Inkubation der sMMO mit verschiedenen HCHO-Konzentrationen. Angegeben sind Mittelwerte aus $n=$ drei Messungen. Es wurden folgende Bedingungen verwendet: $\text{MMOH}_{\text{aktive Zentren}}$: rek. MMOB : $\text{MMOR} = 1:1:1 \mu\text{M}$; $0,75 \text{ mM}$ Nitrobenzol; 1 mM NADH; $30 \text{ }^\circ\text{C}$; Messpuffer 50 mM Tris- 25 mM MES- 25 mM Natriumacetat pH 7,5. $100 \text{ \%} = 67 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$. Inkubation bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$

Tabelle 7-8: CH_3OH - und HCHO -Konzentration beim Umsatz von CH_4 durch die sMMO mit und ohne Zusatz an Katalase. Angegeben sind Mittelwerte aus $n=$ zwei Messungen. Es wurden folgende Bedingungen verwendet: $\text{MMOH}_{\text{aktive Zentren}}$: rek. MMOB : $\text{MMOR} = 3:3:3 \mu\text{M}$; Katalase $640 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ in 1 mL Flüssigvolumen; $63,5 \mu\text{mol}$ CH_4 (20 \% CH_4 in 8 mL Gasvolumen); $53,9 \mu\text{mol}$ O_2 ($16,8 \text{ \%}$ O_2 in 8 mL + gelöster Anteil in 1 mL); 1 mM NADH; $30 \text{ }^\circ\text{C}$; Messpuffer 50 mM Tris- 25 mM MES- 25 mM Natriumacetat pH 7,5. Reaktionsstopp nach drei bzw. zehn Minuten durch Acetat Zugabe. Messung CH_3OH über GC-HSS und HCHO spektroskopisch mittels Nash Methode.

Zeit [min]	sMMO		sMMO + Katalase	
	CH_3OH [μM]	HCHO [μM]	CH_3OH [μM]	HCHO [μM]
3	$278,1 \pm 59,4$	$180,0 \pm 3,3$	$612,5 \pm 153,1$	$156,5 \pm 6,6$
10	$628,1 \pm 13,3$	$246,4 \pm 3,3$	$834,4 \pm 118,8$	$203,1 \pm 6,6$

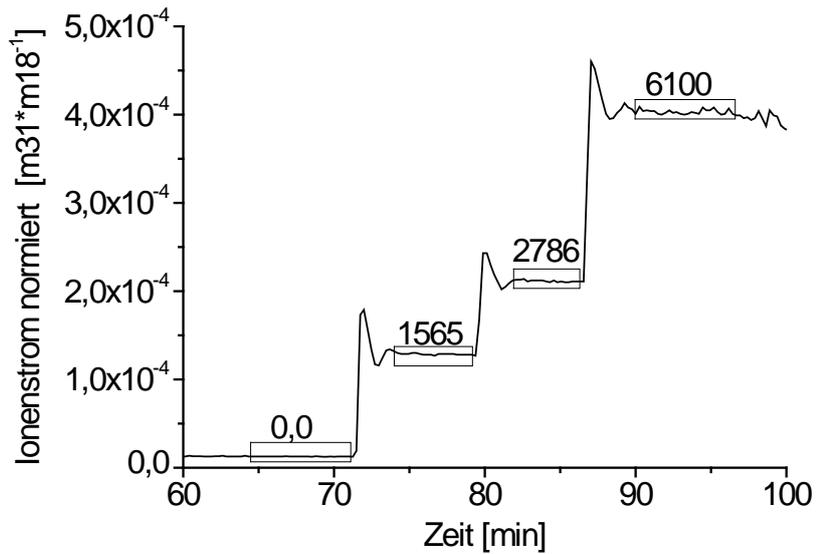


Abbildung 7-28: Kalibriermessung CH_3OH im Reaktor mittels FoxySPEC®. Normiertes Massensignal $m=31 \cdot (\text{Massensignal } m=18)^{-1}$. $M=31$ steht für CH_3OH und $m=18$ für H_2O ; Nach Zusätzen an definierten Mengen von CH_3OH (Zahlen in μM) wurde ein stabiles Messsignal notiert (Rahmen) und anschließend mit der eingesetzten CH_3OH -Menge korreliert. Die Normierung mittels des H_2O Signals erfolgte um etwaige Schwankungen der Messung auszugleichen.

Aus den Daten von Abbildung 7-28 ergab sich folgende Kalibriergerade:

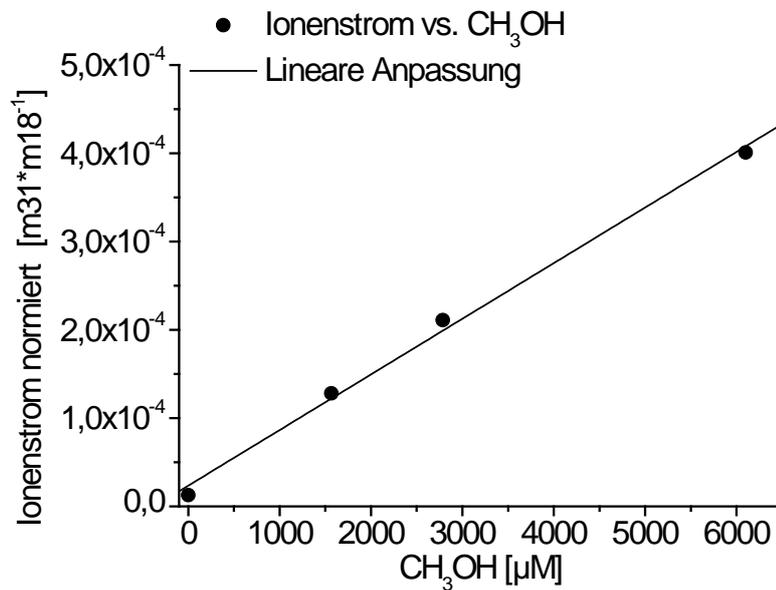


Abbildung 7-29: Kalibriergerade der CH_3OH -Bestimmung mittels FoxySPEC®. Datenpunkte entnommen aus Abbildung 7-28. Geradengleichung: $y=6,303\text{E-}8x+2,344\text{E-}5$.

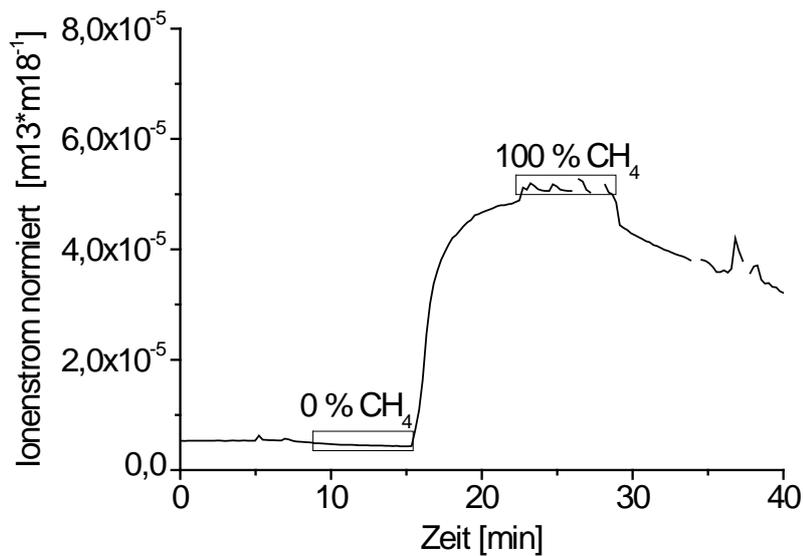


Abbildung 7-30: Kalibriermessung CH_4 im Reaktor mittels FoxySPEC®. Normiertes Massensignal $m=13 \cdot (\text{Massensignal } m=18)^{-1}$. $M=13$ steht für CH_4 und $m=18$ für H_2O ; Nach Strippen mittels He wurde der Wert für 0 % CH_4 ($0 \mu\text{M}$) notiert und nach Begasung mit reinem CH_4 erfolgte die Messung des 100 % (bei 30°C $1,26 \text{ mM}$ [Duan und Mao, 2006]), CH_4 Wertes in der Flüssigphase (Rahmen). Aus diesen Werten wurde eine Zwei-Punkt Kalibrierung für CH_4 erstellt. Dies erfolgte für jede Messung. Die Normierung mittels des H_2O Signals erfolgte um etwaige Schwankungen der Messung auszugleichen.

Die gesammelten Daten zu den CH_3OH - und CH_4 -Kalibriergeraden sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 7-9: Auflistung der Daten zu den CH_3OH - und CH_4 -Kalibriergeraden der Messungen im Reaktor mittels FoxySPEC®. Geradengleichungen im Format: $y=mx+n$

Messung	m	n
1. CH_3OH	$6,303\text{E}-8$	$2,344\text{E}-5$
2. CH_3OH	$5,350\text{E}-8$	$1,178\text{E}-5$
1. CH_4	$4,28\text{E}+05$	-1,9
2. CH_4	$4,98\text{E}+05$	-2,07
3. CH_4	$5,17\text{E}+05$	-2,15
4. CH_4	$4,00\text{E}+05$	-1,58
5. CH_4	$5,31\text{E}+05$	-2,13
6. CH_4	$5,81\text{E}+05$	-2,72
7. CH_4	$6,44\text{E}+05$	-3,09
8. CH_4	$1,19\text{E}+06$	-5,88

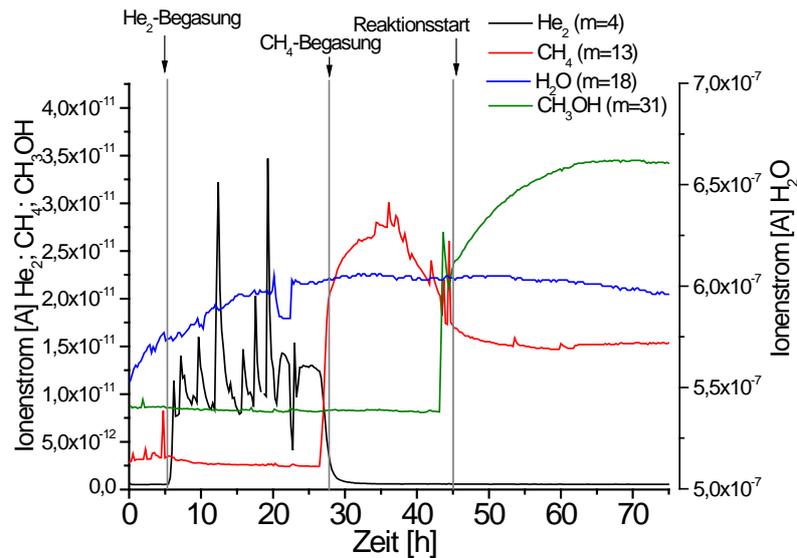


Abbildung 7-31: Gemessene Ionenströme für verschiedene Massensignale in der sMMO-Reaktion mit CH_4 und 5 mM NADH als Substrate im 10 mL-Maßstab. Analyse über FoxySPEC® Massenspektrometer. Dargestellt sind die aufgezeichneten Massenströme für He (schwarz, $m=4$); CH_4 (rot, $m=13$); H_2O (blau, $m=18$) und CH_3OH (grün, $m=31$). Die Einzelnen Reaktionsphasen waren: 5 bis 26 Minuten He-Begasung; 26 bis 38 Minuten CH_4 -Begasung; 38 Minuten Zugabe O_2 (3 mL); 41 Minuten Zugabe Proteine; 43 Minuten Reaktionsstart durch NADH-Zugabe; 76 Minuten Reaktionsende. Folgende Bedingungen wurden eingestellt: $\text{MMOH}_{\text{aktive Zentren}}:\text{rek.MMOB}:\text{MMOR} = 1:1:1 \mu\text{M}$; NADH 10 μmol (1 mM); Temperatur 30 °C; Messpuffer 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat, pH 7,3. Flüssigvolumen 10 mL; Gasvolumen 15 mL; 488 μmol CH_4 (12 mL+Gelöstanteil); 123 μmol O_2 (3 mL).

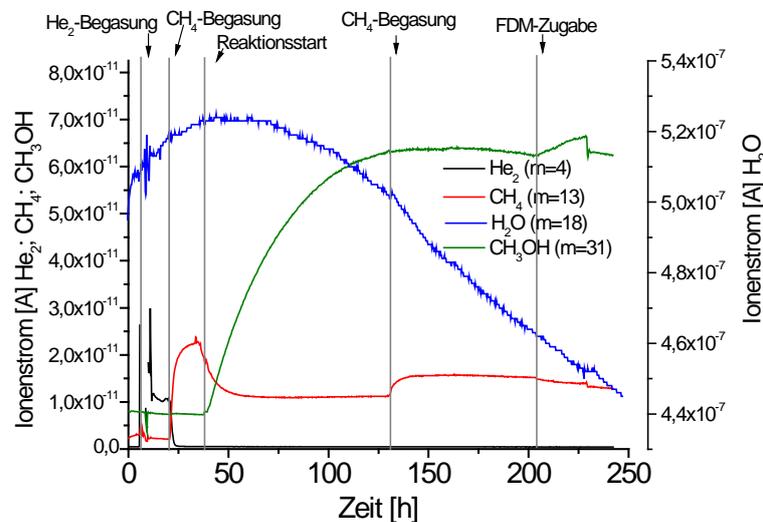


Abbildung 7-32: Gemessene Ionenströme für verschiedene Massensignale in der sMMO-Reaktion mit Zusatz an Katalase und GDH sowie CH_4 und NAD^+ als Substrate im 10 mL-Maßstab. Analyse über FoxySPEC® Massenspektrometer. Dargestellt sind die aufgezeichneten Massenströme für He (schwarz, $m=4$); CH_4 (rot, $m=13$); H_2O (blau, $m=18$) und CH_3OH (grün, $m=31$). Die Einzelnen Reaktionsphasen waren: 5 bis 20 Minuten He-Begasung; 20 bis 35 Minuten CH_4 -Begasung; 35 Minuten Zugabe O_2 (3 mL); 37 Minuten Zugabe Proteine; 39 Minuten Reaktionsstart durch NADH-Zugabe; 76 Minuten CH_4 -Begasung; 158 Minuten Stopp CH_4 -Begasung; 205 Minuten FDM-Zugabe; 241 Minuten Reaktionsende. Folgende Bedingungen wurden eingestellt: $\text{MMOH}_{\text{aktive Zentren}}:\text{rek.MMOB}:\text{MMOR} = 1:1:1 \mu\text{M}$; Katalase 640 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$; GDH 75 $\text{mU}\cdot\text{mL}^{-1}$; NAD^+ 10 μmol (1 mM); 500 μmol Glucose (50 mM); Temperatur 30 °C; Messpuffer 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat, pH 7,3. Flüssigvolumen 10 mL; Gasvolumen 15 mL; 488 μmol CH_4 (12 mL+ gelöster Anteil); 123 μmol O_2 (3 mL).

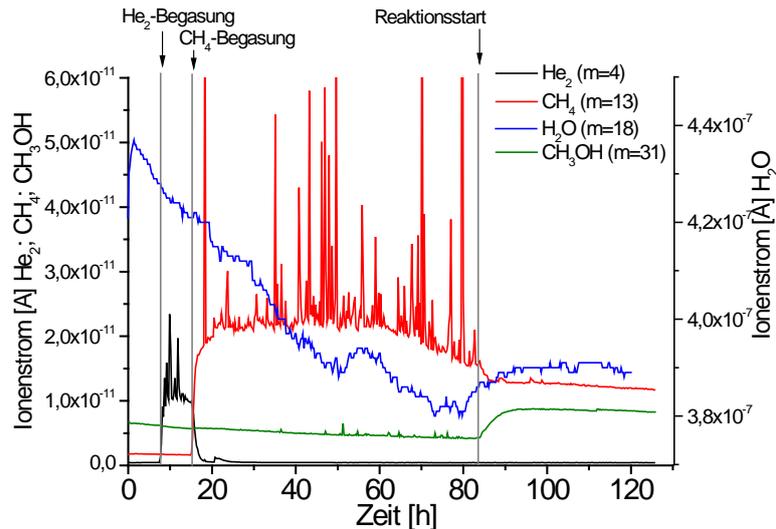


Abbildung 7-33: Gemessene Ionenströme für verschiedene Massensignale in der sMMO-Reaktion mit Zusatz an GDH sowie CH_4 und NAD^+ als Substrate im 10 mL-Maßstab. Analyse über FoxySPEC® Massenspektrometer. Dargestellt sind die aufgezeichneten Massenströme für He_e (schwarz, $m=4$); CH_4 (rot, $m=13$); H_2O (blau, $m=18$) und CH_3OH (grün, $m=31$). Die Einzelnen Reaktionsphasen waren: 5 bis 20 Minuten He -Begasung; 20 bis 78 Minuten CH_4 -Begasung; 78 Minuten Zugabe O_2 (3 mL); 80 Minuten Zugabe Proteine; 82 Minuten Reaktionsstart durch NAD^+ -Zugabe; 110 Minuten Zugabe Katalase; 123 Minuten Reaktionsende. Folgende Bedingungen wurden eingestellt: $\text{MMOH}_{\text{aktive Zentren}}:\text{rek.MMOB}:\text{MMOR} = 1:1:1 \mu\text{M}$; Katalase $640 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$; GDH $75 \text{ mU}\cdot\text{mL}^{-1}$; NAD^+ $10 \mu\text{mol}$ (1 mM); $500 \mu\text{mol}$ Glucose (50 mM); Temperatur $30 \text{ }^\circ\text{C}$; Messpuffer 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat, pH 7,3. Flüssigvolumen 10 mL; Gasvolumen 15 mL; $488 \mu\text{mol}$ CH_4 (12 mL+ gelöster Anteil); $123 \mu\text{mol}$ O_2 (3 mL).

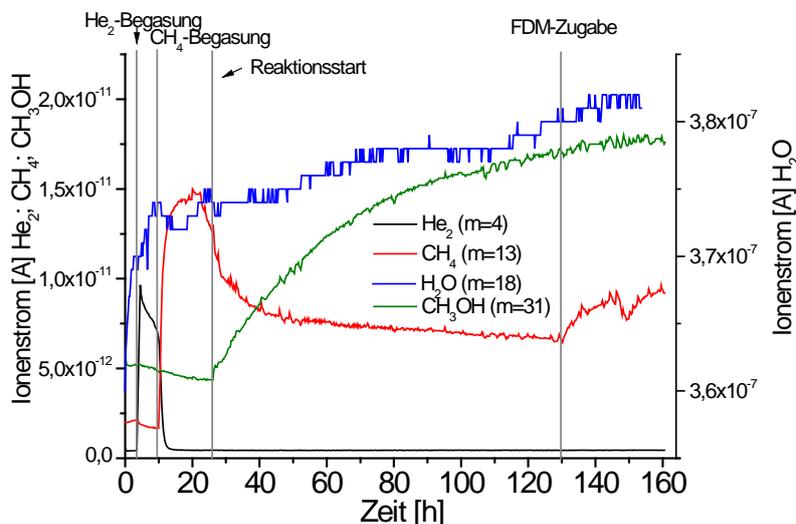


Abbildung 7-34: Gemessene Ionenströme für verschiedene Massensignale in der sMMO-Reaktion verringerte MMOR-Konzentration mit Zusatz an Katalase und GDH sowie mit CH_4 und 1 mM NAD^+ als Substrate im 10 mL-Maßstab. Analyse über FoxySPEC® Massenspektrometer. Dargestellt sind die aufgezeichneten Massenströme für He_e (schwarz, $m=4$); CH_4 (rot, $m=13$); H_2O (blau, $m=18$) und CH_3OH (grün, $m=31$). Die Einzelnen Reaktionsphasen waren: 0 bis 13 Minuten He -Begasung; 13 bis 21 Minuten CH_4 -Begasung; 21 Minuten Zugabe O_2 (3 mL); 23 Minuten Zugabe Proteine; 24 Minuten Reaktionsstart durch NAD^+ -Zugabe; 79 Minuten Begasung mit CH_4 ; 88 Minuten Reaktionsende. Folgende Bedingungen wurden eingestellt: $\text{MMOH}_{\text{aktive Zentren}}:\text{rek.MMOB}:\text{MMOR} = 1:1:0,1 \mu\text{M}$; Katalase $640 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$; GDH $75 \text{ mU}\cdot\text{mL}^{-1}$; NAD^+ $10 \mu\text{mol}$ (1 mM); $500 \mu\text{mol}$ Glucose (50 mM); Temperatur $30 \text{ }^\circ\text{C}$; Messpuffer 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat, pH 7,3. Flüssigvolumen 10 mL; Gasvolumen 15 mL; $488 \mu\text{mol}$ CH_4 (12 mL+ gelöster Anteil); $123 \mu\text{mol}$ O_2 (3 mL).

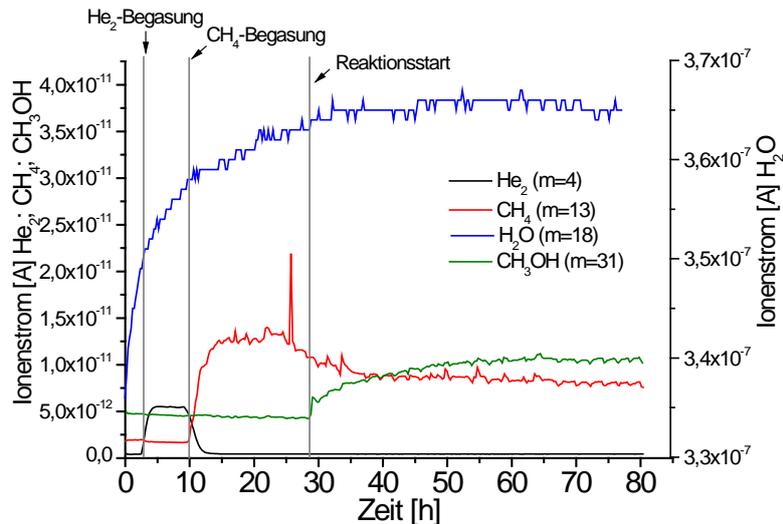


Abbildung 7-35: Gemessene Ionenströme für verschiedene Massensignale in der sMMO-Reaktion verringerte MMOR-Konzentration mit CH_4 und 1 mM NADH als Substrate im 10 mL-Maßstab. Analyse über FoxySPEC® Massenspektrometer. Dargestellt sind die aufgezeichneten Massenströme für He_e (schwarz, $m=4$); CH_4 (rot, $m=13$); H_2O (blau, $m=18$) und CH_3OH (grün, $m=31$). Die Einzelnen Reaktionsphasen waren: 0 bis 11 Minuten He -Begasung; 11 bis 25 Minuten CH_4 -Begasung; 25 Minuten Zugabe O_2 (3 mL); 27 Minuten Zugabe Proteine; 28 Minuten Reaktionsstart durch NADH-Zugabe; 80 Minuten Reaktionsende. Folgende Bedingungen wurden eingestellt: $\text{MMOH}_{\text{aktive Zentren:rek.MMOB}}$: MMOR = 1:1:0,1 μM ; NADH 10 μmol (1 mM); Temperatur 30 °C; Messpuffer 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat, pH 7,3. Flüssigvolumen 10 mL; Gasvolumen 15 mL; 488 μmol CH_4 (12 mL+ gelöster Anteil); 123 μmol O_2 (3 mL).

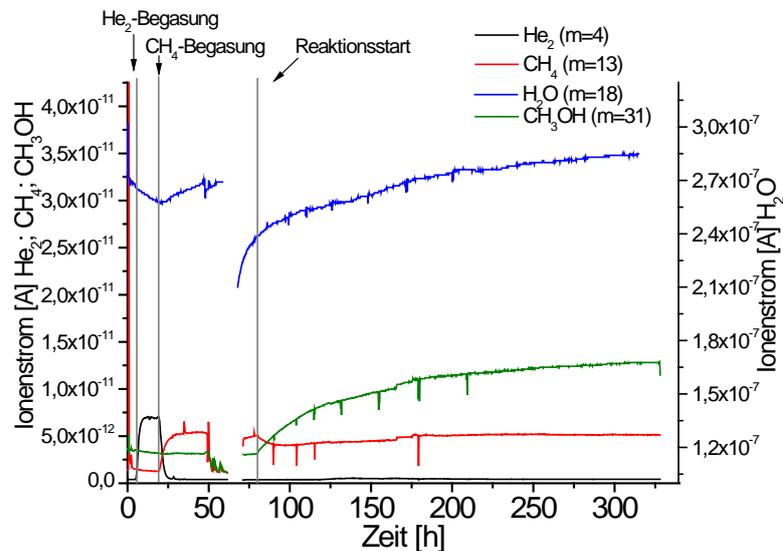


Abbildung 7-36: Gemessene Ionenströme für verschiedene Massensignale in der sMMO-Reaktion mit Zusatz an Katalase und GDH sowie CH_4 und NAD^+ als Substrate im 10 mL-Maßstab. Analyse über FoxySPEC® Massenspektrometer. Dargestellt sind die aufgezeichneten Massenströme für He_e (schwarz, $m=4$); CH_4 (rot, $m=13$); H_2O (blau, $m=18$) und CH_3OH (grün, $m=31$). Die Einzelnen Reaktionsphasen waren: 0 bis 24 Minuten He -Begasung; 24 bis 35 Minuten CH_4 -/ O_2 -Begasung; 52 Minuten Zugabe Proteine; 55 Minuten Rückstossdruck in MS-Leitung zu hoch, deshalb Transferstrecke undicht, Messung gestoppt und nach Reperatur bei 78 Minuten wiederaufgenommen; 85 Minuten Reaktionsstart durch NAD^+ -Zugabe; 218 Minuten FDM-Zugabe; 333 Minuten Reaktionsende. Folgende Bedingungen wurden eingestellt: $\text{MMOH}_{\text{aktive Zentren:rek.MMOB}}$: MMOR = 1:1:0,1 μM ; Katalase 640 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$; GDH 75 $\text{mU}\cdot\text{mL}^{-1}$; NAD^+ 2500 μmol (1 mM); 12500 μmol Glucose (50 mM); Temperatur 30 °C; Messpuffer 50 mM Tris-25 mM MES-25 mM Natriumacetat, pH 7,3. Flüssigvolumen 250 mL; Gasvolumen 1255 mL; 15167 μmol CH_4 (375 mL+ gelöster Anteil); 7267 μmol O_2 (180 mL + gelöster Anteil).

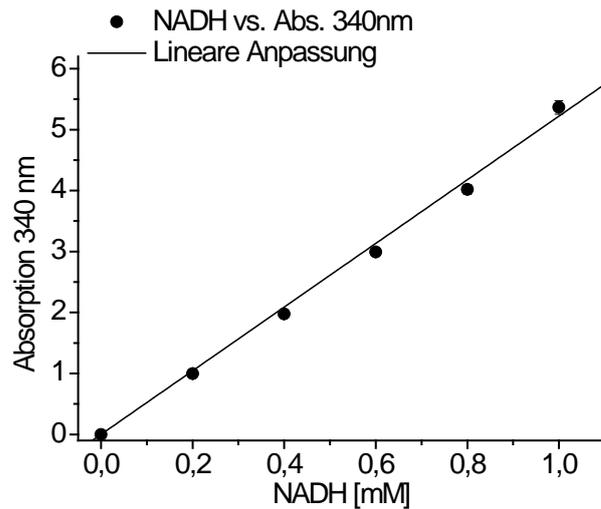


Abbildung 7-37: Kalibriergerade von NADH bei 340 nm für Reaktormessungen. Geradengleichung $y = 5,165x$

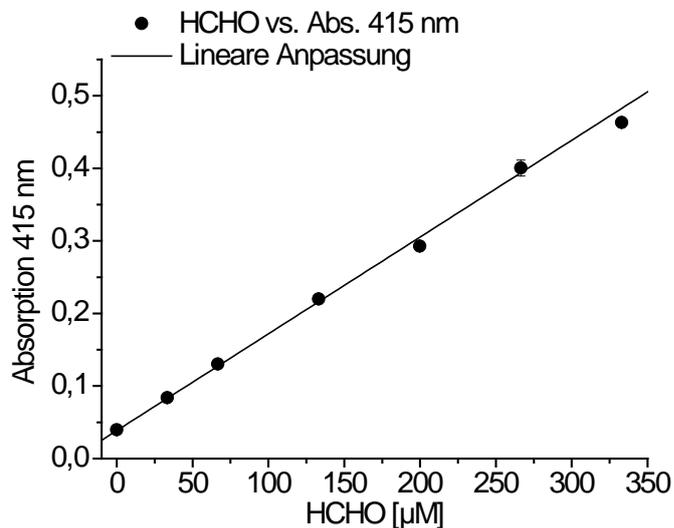


Abbildung 7-38: Kalibriergerade für HCHO über Nash Methode für Reaktormessungen. Geradengleichung: $y = 0,00133x + 0,03856$

Tabelle 7-10: Umsatzberechnung Reaktormessungen 10 und 250 mL-Maßstab:

Komponente	10 mL			250 mL		
	Anteil/ Volumen	Masse/ Konzentration	Stoff- menge [µmol]	Anteil/ Volumen	Masse/ Konzentration	Stoff- menge [µmol]
CH₄	12 mL Gas- phase + ge- löster Anteil	7,65 +0,175 = 7,83 mg	488	30 % (375 mL) + gelös- ter Anteil	238,9 + 4,4 = 243,3 mg	15167
O₂	3 mL + gelös- ter Anteil	3,86 +0,075 = 3,93 mg	123	14,35 % (180 mL) + gelös- ter Anteil	230,7 + 1,875 = 232,6 mg	7267
NADH/NAD⁺	-	1 mM	10	-	1 mM	2500
Glucose	-	50 mM	500	-	50 mM	12500

CH₄-Dichte = 0,637 mg·mL⁻¹ (30 °C); M = 16,04 g·mol⁻¹, gelöst am Reaktionsstart 17,5 mg·l⁻¹, O₂-Dichte = 1,286 mg·mL⁻¹ (30 °C), M = 32,0 g·mol⁻¹, Löslichkeit (30 °C) 7,5 mg·L⁻¹.

Für eine CH_3OH -Konzentration von z.B. $540 \mu\text{M CH}_3\text{OH} + 33,3 \mu\text{M HCHO}$ im 10 mL-Maßstab (Kapitel 3.6.1, S:139) ergab sich eine gebildete Produktstoffmenge von $5,4 \mu\text{mol} + 0,33 \mu\text{mol} = 5,7 \mu\text{mol}$. Daraus berechnete sich der Umsatz für CH_4 , O_2 und NADH. Nach dem gleichen Schema erfolgte die Berechnung des Umsatzes im 250 mL-Maßstab

Tabelle 7-11: Eigenschaften der für die Immobilisierung verwendeten Trägermaterialien

Parameter	Gerichtete Immobilisierung	Ungerichtete Immobilisierung
Material	Streamline Chelating	ReloZyme-Epoxy S grade
Funktionelle Gruppe	Iminodiessigsäure	Epoxid
Porengröße [nm]	-	40-60
Partikelgröße [μM]	100-300	100-300
Ziel Protein	SUMO-MMOB	MMOH
Puffer	25 mM MOPS, pH 7.5; 50 mM NaCl	Phosphat Puffer für Immobilisierung/MOPS-Puffer für Aktivität
Ladekapazität	Keine Angabe (<i>Chelating Sepharose 5 mg/mL</i>)	min. 30 $\mu\text{mol/g}$ wet Oxirans
Struktur	6 % Agarose mit Quarz Kern (bessere Sedimentation)	Polymethacrylate

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Andreas Griethe
Geburtsdatum/ort: 12.02.1988 in Leinefelde
Nationalität: Deutsch

Schulischer und akademischer Werdegang

05.2013-10.2017	Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie, Abteilung Aufarbeitung biotechnologischer Produkte.
10.2010-11.2012	Studium der Biotechnologie an der TU Braunschweig, Abschluss Master of Science
10.2007-9.2010	Studium der Biotechnologie an der TU Braunschweig, Abschluss Bachelor of Science
2006-2007	Zivildienst in der Verwaltungsgemeinschaft Lindenberg
1998-2006	Staatl. Gymnasium Marie Curie in Worbis, Abschluss Abitur

Halle (Saale), den