

Biokatalytische Ganzzellproduktion des Sesquiterpens Presilhiperfolan-8 β -ol in stoffwechseloptimierten *Escherichia coli*

Maik Wildhagen, Tabea Pudenz, Trang Nguyen, Andreas Kirschning und Sascha Beutel*

DOI: 10.1002/cite.202200115

 This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.



Supporting Information
available online

Herrn Prof. Dr. Christian Wandrey zum 80. Geburtstag gewidmet.

Die fermentative Ganzzellproduktion in *Escherichia coli* ermöglicht die Produktion komplexer Naturstoffe, wie Terpene, aus einfachen, günstigen und nachhaltigen C-Quellen. Ziel der Arbeit war es, einen solchen Prozess zur Synthese von Presilhiperfolan-8 β -ol (PSP) zu entwickeln. Der Biosyntheseweg dieses tricyclischen Sesquiterpenalkohols konnte erfolgreich in *E. coli* eingebracht werden. Der resultierende Multiplasmid-Stamm ist in der Lage, in vivo über den Mevalonat-Weg Farnesylpyrophosphat zu bilden, welches dann durch die Sesquiterpencyclase BcBOT2 zu PSP umgesetzt wird. Das überwiegend in das Kulturmedium sekretiert Produkt konnte via GC-MS identifiziert und via GC-FID quantifiziert werden. Der entwickelte Stamm produzierte in vivo bei 20 °C in 48 h 10 mg L⁻¹ PSP direkt aus der C-Quelle Glycerin.

Schlagwörter: BcBOT2, Fermentation, Ganzzellproduktion, Presilhiperfolan-8 β -ol, Sesquiterpene

Eingegangen: 27. Juni 2022; **revidiert:** 09. Dezember 2022; **akzeptiert:** 18. Januar 2023

Whole-Cell Biocatalytical Production of the Sesquiterpene Presilhiperfolan-8 β -ol in Pathway-Engineered *Escherichia coli*

Fermentative whole-cell production in *Escherichia coli* offers the option of producing complex natural products such as terpenes from simple, inexpensive, and sustainable carbon sources. The aim of this study was to develop such a process for the synthesis of presilhiperfolan-8 β -ol (PSP). The biosynthetic pathway of this tricyclic sesquiterpene alcohol was successfully introduced into *E. coli*. The resulting multi-plasmid strain was able to produce farnesyl pyrophosphate in vivo via the mevalonate pathway, which was then converted to PSP by the sesquiterpene cyclase BcBOT2. The product, which is mainly secreted into the culture medium, was identified via GC-MS and quantified via GC-FID. The constructed strain produced 10 mg L⁻¹ PSP in 48 h at 20 °C directly from carbon feedstock.

Keywords: BcBOT2, Fermentation, Presilhiperfolan-8 β -ol, Sesquiterpenes, Whole-cell production

1 Einleitung

Terpene setzen sich aus Isopreneinheiten zusammen und bilden mit ihren bisher mehr als 80 000 bekannten Verbindungen die größte Klasse sekundärer Naturstoffe [1]. Für diesen Facettenreichtum sind vor allem die sogenannten Terpenocyclasen (TCn) verantwortlich. Mit Hilfe dieser Enzyme kann aus einfachen linearen diphosphorylierten Terpenvorläufern eine sehr große Bandbreite an

¹Maik Wildhagen, ¹Tabea Pudenz, ²Trang Nguyen,
²Dr. Andreas Kirschning, ¹Dr. Sascha Beutel
(beutel@iftc.uni-hannover.de)

¹Leibniz Universität Hannover, Institut für Technische Chemie,
Callinstraße 5, 30167 Hannover, Deutschland.

²Leibniz Universität Hannover, Institut für Organische Chemie,
Schneiderberg 1 B, 30167 Hannover, Deutschland.

(oligo)cyclischen Verbindungen hervorgehen. Hierfür durchlaufen die Vorläufer innerhalb des aktiven Zentrums des Enzyms nach Abspaltung der Pyrophosphatgruppe eine Reaktionskaskade an Cyclisierungen, Umlagerungen, De- und Reprotonierungen [2]. In dieser Arbeit soll der Fokus hauptsächlich auf das Enzym Presilphiperfolan-8 β -ol-Synthase (BcBOT2) gelegt werden. Hierbei handelt es sich um eine Sequiterpencyclase (STC), welche die Cyclisierung ausgehend vom C15-Terpenvorläufer Farnesylpyrophosphat (FPP) **1** zum tricyclischen Sesquiterpenalkohol Presilphiperfolan-8 β -ol (PSP) **2** katalysiert (s. Abb. 1) [3–5]. Die STC BcBOT2 wurde erstmals aus dem Pilz *Botrytis cinerea* isoliert, welcher als Hauptverursacher der Grauschimmelkrankheit verantwortlich ist und Nutzpflanzen wie Obst und Gemüse befallen kann [6] und damit für weitreichende ökonomische Folgen auf den Ernteertrag sorgt [7, 8]. In diesem Fall sondert der Pilz eine Vielzahl an Stoffwechselprodukten ab, die für dessen Pathogenität verantwortlich sind. Ein sehr bekanntes Phytotoxin hierfür ist das Sesquiterpen Botrydial **3**, das aus dem Zwischenprodukt PSP hervorgeht [9]. In Hinblick auf die Biosynthese von Botrydial, konnte gezeigt werden, dass sich das BcBOT2-Gen innerhalb des BOT-Genclusters wiederfindet [10]. Neben dem STC codierenden BcBOT2-Gen, zur Biosynthese des Zwischenproduktes PSP, codieren die Gene BcBot1, BcBot3, BcBot4 jeweils für drei verschiedene P450 Monoxygenasen und BcBot5 für eine Acyltransferase [3]. BcBOT6 dient als Transkriptionsfaktor in der Regulation der Expression. BcBOT7 ist eine Dehydrogenase [10]. In Bezug auf die Struktur und Größe, setzt sich BcBOT2 aus einem Bündel an α -Helices zusammen und besitzt eine Proteingröße von 47,43 kDa. Innerhalb des aktiven Zentrums befinden sich an Position 141 und 285 ein aspartatreiches DDQFD-Motiv und eine N(S/T)(E/D)-Triade bzw. ein NDVLSYRKD-Motiv [1]. Diese konservierten Bereiche sind charakteristisch für Klasse I TCn, welche auf ein Metallcluster aus Mg²⁺ als Co-Faktor angewiesen sind und die Spaltung der Pyrophosphatgruppe initiieren [1]. Zusätzlich zur Bildung von PSP ist BcBOT2 auch in der Lage, unnatürliche FPP-Derivate umzusetzen, welche zusätzlich Heteroatome enthalten [11]. So konnte eine Vielzahl unnatürlicher Sesquiterpenoide synthetisiert werden. Auch eine gezielte Mutagenese wurde bereits mit BcBOT2 durchgeführt, wodurch weitere bicyclische und tricyclische Sesquiterpenalkohole erhalten wurden [11].

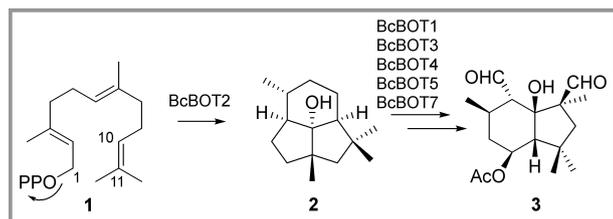


Abbildung 1. Schematische Zusammenfassung der Bildung von Botrydial **3** von PSP **2** mit FPP **1** als Ausgangsverbindung.

Ziel dieser Arbeit ist es nun, die STC BcBOT2 in einem stoffwechsoptimierten *Escherichia coli* Stamm zu exprimieren, um eine In-vivo-Biosynthese von Presilphiperfolan-8 β -ol aus einer einfachen Kohlenstoffquelle zu ermöglichen. Somit soll gezeigt werden, dass eine Bildung von tricyclischen Sesquiterpenalkoholen in einem fermentativen Ganzzellproduktionssystem möglich ist. Dabei bietet ein solches Produktionssystem einige Vorteile gegenüber der Biokatalyse mit isolierten Enzymen. Neben den zelleigenen Cofaktor-Regenerationssystemen werden durch die Ganzzellproduktion kostspielige Aufreinigungsprozesse der Enzyme eingespart [12]. Weiterhin stellt die Zelle eine geschützte Umgebung für die Enzyme dar, weil pH und Osmolarität durch natürliche Homöostase reguliert werden [13]. Sofern das Produkt von den Zellen sekretiert wird, wird durch den Rückhalt der Enzyme innerhalb der Zellen auch die downstream Prozessierung vereinfacht [14]. Gerade bei mehrstufigen Synthesen, wie der Biosynthese von Sesquiterpenen, bieten ganzzellkatalytische Produktionssysteme ein großes Potential. Durch die molekularbiologischen Methoden können viele Enzyme heterolog in Organismen wie *E. coli* und *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert werden [15]. Die Fortschritte in der Systembiologie kombiniert mit „omics“-Technologien und bioinformatischen Methoden liefern ständig neue postulierte Enzyme und Stoffwechselwege [14]. Diese können heterolog in einen Organismus eingebracht und nach einer Art Baukasten-Prinzip kombiniert werden [14, 16, 17]. Mit den Erkenntnissen des „metabolic engineering“ können so Stoffwechselwege für verschiedenste Produkte entwickelt werden. In früheren Arbeiten hat sich die Ganzzellproduktion von verschiedenen Sesquiterpenen, wie (-)-Patchoulol [18], β -Caryophyllen [19], α -Humulen [20] und (-)- α -Bisabolol [21], bereits als möglich gezeigt [22]. Um eine ganzzellkatalytische Produktion von Sesquiterpenen zu erreichen, muss eine zelluläre Produktion des Vorläufers FPP als Substrat für die STC sichergestellt sein. *E. coli* verfügt über einen zelleigenen Stoffwechselweg zur Herstellung von FPP, den Methylerythritolphosphatweg (MEP-Weg), der durch die Überexpression der 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-synthase (DXS) zu einer erhöhten intrazellulären FPP-Konzentration führt [23, 24]. Ein wichtiger Schritt für die Produktion von Terpenen in einem Ganzzellsystem war die Co-Expression des Mevalonat-Wegs (MEV-Weg) in Mikroorganismen von Keasling und Mitarbeitern. So konnte die natürliche Regulation des MEP-Wegs umgangen und eine weitaus höhere FPP-Konzentration erreicht werden, die dann der STC zur Verfügung steht [25].

2 Experimentelles

2.1 Erstellung des stoffwechsoptimierten *E. coli* Stamms

Eine Übersicht aller verwendeten und in dieser Arbeit entstandenen Stämme und Plasmide ist in Tab. 1 aufgeführt.

Tabelle 1. Überblick über die in der Arbeit verwendeten Stämme und Plasmide.

Plasmid-Bezeichnung	Plasmid Name	Beschreibung (Replikationsursprung, Promotor, Antibiotikaresistenz und Gene)	Ref.
pMev	pBbA5c-MevT(CO)-MBIS(CO, ispA)	p15A, PlacUV5 und Ptrc, Chloramphenicol ^R , beinhaltet Gene aus dem Mevalonatweg: <i>AtoB</i> , <i>HMGs</i> , <i>tHMGR</i> , <i>MK</i> , <i>PMK</i> , <i>PMD</i> , <i>Idi</i> und <i>IspA</i> .	[26]
pBcBOT2	pET28a(+)-BcBOT2	pBR322, PT7, Kanamycin ^R , beinhaltet Gen der Presilphiperfolan-8 β -ol-Synthase: <i>BcBOT2</i> .	[27]
Stamm Bezeichnung	Stamm	Plasmide	Ref.
<i>E. coli</i> _Mev_DH10B	<i>E. coli</i> DH10B	pMev	[26]
<i>E. coli</i> _Mev_BL21	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pMev	[*]
<i>E. coli</i> _BcBOT2	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pBcBOT2	[27]
<i>E. coli</i> _PSPgz	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pBcBOT2 und pMev	[*]

*) im Rahmen dieser Arbeit erzeugte Stämme

Das Plasmid pBbA5c-MevT(CO)-T1-MBIS(CO, ispA) (pMev; Addgene Plasmid #35152) wurde freundlicherweise im Klonierungsstamm *E. coli* DH10B von Jay Keasling und Taek Soon Lee für diese Arbeiten zur Verfügung gestellt [25, 26]. Das Plasmid pET28a(+)-BcBOT2 (pBcBOT2) lag im Stamm *E. coli* BL21(DE3) vor, der bereits in früheren Arbeiten beschrieben wurde [27]. Die Plasmide wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen, Niederlande) aus Übernachtskulturen der entsprechenden Stämme isoliert. Die Identität der Plasmide wurde mit analytischen Restriktionsverdau nachgewiesen (s. Abbn. S1 und S2 in den Supporting Information). Die erhaltene Plasmid-DNA wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Für den Stamm *E. coli*_PSPgz wurde *E. coli* BL21(DE3) mit den Plasmiden pBcBOT2 und pMev co-transformiert. Der Stamm *E. coli*_Mev_BL21 wurde durch Einbringen von pMev in *E. coli* BL21(DE3) erzeugt. Die Transformationen wurden nach der Hitzeschockmethode durchgeführt [28] und chemisch kompetente Zellen von Novagen (Merck, Deutschland) verwendet. Für den Stammerhalt wurden die transformierten Stämme auf Lysogeny Broth (LB) Agarplatten, mit entsprechenden Antibiotika (Kanamycin $50\ \mu\text{g L}^{-1}$ und oder Chloramphenicol $34\ \mu\text{g L}^{-1}$), ausplattiert sowie als Glycerin-Kryokulturen bei -80°C gelagert.

2.2 Kultivierung der Stämme und PSP-Produktion

Alle Kultivierungen erfolgten in Schüttelkolben mit Schikanken und luftdurchlässiger Membran im Deckel im Rotationsinkubator. Für Vorkulturen wurde 20 mL LB, versetzt mit entsprechenden Antibiotika (Kanamycin $50\ \mu\text{g L}^{-1}$ und oder Chloramphenicol $34\ \mu\text{g L}^{-1}$), mit einer Einzelkolonie von einer LB-Agarplatte inokuliert. Die Vorkulturen wurden bei 37°C und 150 Upm über Nacht inkubiert. Für die Hauptkulturen wurde 100 mL des Komplexmediums Terrific Broth (TB), versetzt mit entsprechenden Antibiotika (Kanamycin $50\ \mu\text{g L}^{-1}$ und oder Chloramphenicol $34\ \mu\text{g L}^{-1}$), verwendet. Das Volumen zur Inokulation wurde

so gewählt, dass eine Startzelldichte (OD_{600}) von 0,1 rel. AU erreicht wurde. Bis zur Induktion der Proteinexpression wurden die Kulturen bei 37°C und 150 Upm inkubiert. Die Induktion geschah nach dem Erreichen einer Zelldichte (OD_{600}) von 0,8–1,0 rel. AU durch die Zugabe von 0,5 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG). Danach folgte die PSP-Produktion bei einer Temperatur von 16°C bzw. 20°C und 150 Upm. Für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), der gaschromatografischen Analytik und der Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) wurden 6, 12, 24 und 48 h nach Induktion Proben entnommen.

2.3 Enzymatische Umsetzung von FPP mit BcBOT2

Als Vergleich für die entstehenden Produkte der Ganzzellproduktion von PSP mit *E. coli*_PSPgz wurde die Umsetzung von FPP mit der isolierten STC BcBOT2 betrachtet. Dafür wurde die Terpenocyclase im Produktionsstamm *E. coli*_BcBOT2, entsprechend Abschn. 2.2, überexprimiert. Da das Enzym über einen N-terminalen Histidin-Tag verfügt, war eine Aufreinigung mittels Affinitätschromatografie mit Nickel-Nitrilotriessigsäure-Säule (Ni-NTA) möglich. Die Herstellung, Aufreinigung und enzymatische Umsetzung von FPP mit BcBOT2 ist in früheren Arbeiten beschrieben [11, 27]. Die In-vitro-Reaktion wurde im 1 mL Maßstab in TRIS-Puffer (50 mM, pH 8.0) mit DTT (5 mM) durchgeführt. Es wurden $150\ \mu\text{M}$ FPP zusammen mit 5 mM MgCl_2 mit $0,03\ \text{g L}^{-1}$ isoliertem und gereinigtem BcBOT2 bei 25°C für 30 min umgesetzt.

2.4 Extraktion terpenoider Produkte aus wässriger Lösung

Die Extraktion der terpenoiden Produkte wurde stets mit n-Hexan durchgeführt, da sich dies als geeignetes Lösemittel für PSP erwiesen hat [27]. Für den Nachweis und die

Quantifizierung der terpenoiden Produkte im Kulturmedium wurden die Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei $10\,000\times g$ und 4°C abgetrennt. Der Überstand wurde abgenommen und nach der Zentrifugation verbliebende, unlöslich Zellbestandteile mit Hilfe eines Spritzenvorfilter (0,2 μm Porengröße, Sartorius, Deutschland) entfernt.

Proben für den Nachweis und die Quantifizierung der terpenoiden Produkte in den Zellen wurde gemäß der Zelldichte (OD_{600}) von 2,0 rel. AU normiert aus der Kulturbrühe entnommen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min, $10\,000\times g$ und 4°C) abgetrennt und das medienfreie Pellet in 300 μL Extraktionspuffer (40 mM TRIS-HCl, 100 mM NaCl, pH 7,5) suspendiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Ultraschallsonde (Bandelin, Deutschland) aufgeschlossen (Amplitude 40 %, 4 s angeschaltet, 8 s Pause, Gesamtzeit 10 min). Die Zelltrümmer sowie unlösliche Zellbestandteile wurden über Zentrifugation (20 min, $10\,000\times g$ und 4°C) und anschließend mittels Spritzenvorfilter (0,2 μm) abgetrennt.

Das zellfreie Medium, das zell- und medienfreie Lysat sowie der enzymatische In-vitro-Reaktionsansatz wurde in 5 mL Glasgefäße überführt und mit n-Hexan überschichtet. Das Gemisch wurde für 30 s kräftig geschüttelt und die Phasen mittels Zentrifugation (5 min, $6000\times g$ bei Raumtemperatur) getrennt. Die organische Phase wurde abgenommen und bis zur gaschromatografische Analyse bei -20°C gelagert.

2.5 Analytische Methoden

2.5.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgellelektrophorese SDS-PAGE

Die Proben für die SDS-PAGE wurden ebenfalls auf eine OD_{600} von 2,0 rel. AU normiert aus der Kulturbrühe entnommen. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation (10 min, $10\,000\times g$ und 4°C) pelletiert und der Überstand verworfen. Der Zellaufschluss wurde enzymatisch mithilfe des BugBuster[®] Protein-Extraktionsreagenz (Merk, Deutschland) nach angeben des Herstellers durchgeführt. Lösliche und unlösliche Proteinfractionen wurden über Zentrifugation (20 min, $10\,000\times g$ und 4°C) getrennt. Im Überstand befindet sich die lösliche Proteinfraction („soluble fraction“, SF) das Pellet stellt die unlösliche Proteinfraction („insoluble fraction“, IF) dar. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit dem gleichen Volumen ddH_2O suspendiert. Beide Proteinfractionen wurden mit 4x Laemmli Ladepuffer versetzt und bei 95°C für 5 min erhitzt. Alle Analysen wurden in 10 %igen SDS-Polyacrylamidgelen durchgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei konstanter Spannung und variierenden Stromstärke. Die Färbung der Gele erfolgte über kolloidales Coomassie.

2.5.2 Gaschromatografie mit Flammenionisationsdetektor

Die quantitative Analyse der Produkte aus den extrahierten Proben der Kultivierungen und des enzymatischen *in vitro* Reaktionsansatzes erfolgten mittels Gaschromatografie mit Flammenionisationsdetektor (GC-FID) über das GC-2030 plus System (Shimadzu, Japan). Von allen Proben wurde 1 μL *splitless* über einen Autosampler injiziert. Die Injektor-Temperatur betrug 240°C und als Trägergas wurde Wasserstoff verwendet. Zur Auftrennung der Produkte die Zebtron[™] ZB-WAXPlus Säule (30 m Länge, 0,25 mm Innendurchmesser, 0,25 μm Filmdicke) (Phenomenex, USA) eingesetzt. Folgendes Ofenprogramm wurde verwendet: Starttemperatur 40°C für 20 s; Erhitzen auf 200°C mit einer Heizrate von $10^\circ\text{C min}^{-1}$; 200°C für 30 s halten; Erhitzen auf die Endtemperatur von 230°C mit einer Heizrate von $30^\circ\text{C min}^{-1}$; Endtemperatur halten für 2 min. Die Detektortemperatur betrug 300°C . Die Geraniolkonzentration wurde mit einer Kalibrationsreihe eines Geraniolstandards berechnet (s. Abb. S4). Da PSP-Standards nicht erhältlich sind, wurde zur Quantifizierung von PSP β -Cedrol als Standard verwendet (s. Abb. S5).

2.5.3 Gaschromatografie mit Massenspektrometrie

Die Identifizierung der Produkte wurde per Gaschromatografie mit Massenspektrometrie (GC-MS) durchgeführt. Als Säule wurde die DB-5MS UI (Agilent Technologies, USA) verwendet und als Trägergas wurde Helium verwendet. Alle weiteren gewählten Parameter sind nachfolgend aufgeführt: Injektion: on column; Injektor-Temperatur 60°C ; Starttemperatur 40°C für 3 min; Erhitzen auf 300°C mit einer Heizrate von $10^\circ\text{C min}^{-1}$; Endtemperatur von 300°C für 10 min; Ionisation: Elektronenspray; MS-Quad: 150°C ; Scanbereich 33 m/z bis 300 m/z.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Entwicklung des stoffwechseleoptimierten *E. coli* Stamms

Der herzustellende *E. coli* Stamm soll in der Lage sein, aus einer Kohlenstoffquelle wie Glycerin PSP zu synthetisieren. Hierfür wurden zwei Vektoren in den Organismus eingebracht. Der Vektor pBbA5c-MevT(CO)-T1-MBIS(Co, ispA) (pMev) enthält die genetische Information für die Enzyme des Mevalonatwegs inklusive der FPP-Synthase IspA, sodass der Organismus in der Lage ist zusammen mit der zell-eigenen Biosynthese über den MEP-Weg ausreichend FPP zu bilden. Auf dem Vektor pET28a(+)-BcBOT2 (pBcBOT) befindet sich die genetischen Informationen für die STC BcBOT2, welche im Anschluss FPP zum gewünschten Produkt umsetzen soll (s. Abb. 2).

Alle Gene für die Expression in *E. coli* sind codon-optimiert. Die Expression der Gene von pMev wird über zwei

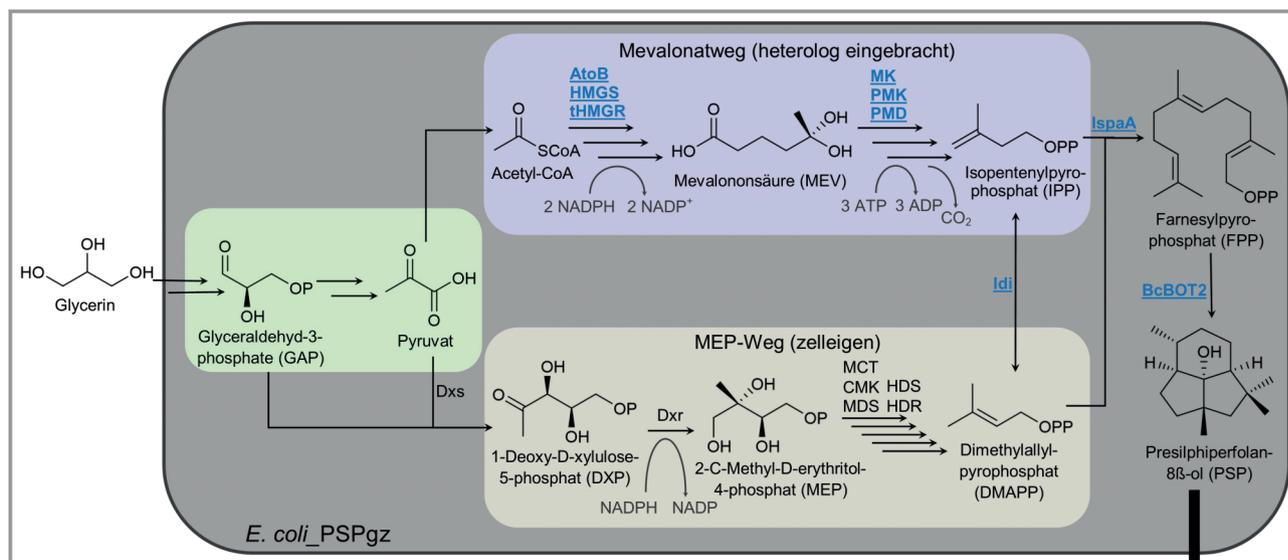


Abbildung 2. Schematische Darstellung der Biosynthese von Presilphiperfolan-8 β -ol in dem stoffwechsoptimierten Stamm *E. coli_PSPgz* mit zelleigenem MEP-Weg und den heterolog eingebrachten Mevalonatweg. Heterolog exprimierte Enzyme sind fett und unterstrichen. DXP-Synthase (Dxs), DXP-Reduktoisomerase (Dxr), MEP-Cytidyl-Transferase (MCT), Cytidyl-MEP-Kinase (CMK), MEP-2,4-Cyclodiphosphate-Synthase (MDS), (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphat-Synthase (HDS) und (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl Diphosphat-Reductase (HDR) sind die Enzyme des natürlich vorhandenen MEP-Wegs. Der heterologe Mevalonatweg besteht aus den Enzymen Acetoacetyl-CoA-Thiolase (AtoB), 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Synthase (HMGS), eine verkürzte (truncated) Version der 3-s-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Reduktase (tHMGR), Mevalonat-Kinase (MK), Phosphomevalonat-Kinase (PMK), Mevalonatdiphosphat-Decarboxylase (PMD) und Isopentenylpyrophosphat-Isomerase (Idi) deren genetische Information sich auf dem Plasmid pMev befinden. Zusätzlich wird das Enzym FPP-Synthase (IspA) heterolog exprimiert, dessen genetische Information sich ebenfalls auf pMev befindet. Die Umsetzung von FPP zu PSP wird durch die heterolog exprimierte Presilphiperfolan-8 β -ol-Synthase (BcBOT2) katalysiert.

synthetische Operons geregelt, sodass zentrale Enzyme in korrekter Konzentration vorliegen. Die Gene der Enzyme für die Bildung von Mevalonat aus Acetyl-CoA, befinden sich unter Kontrolle eines lacUV5-Promotors und bilden das „top-Operon“ (s. Abb. S2A). Über die Enzyme des „bottom-Operons“, welche sich unter Kontrolle des aktiveren trc-Promotors befinden, wird Mevalonat zu FPP umgesetzt (s. Abb. S2A). Die STC BcBOT2, welche sich auf einem zweiten Vektor befindet, unterliegt der Kontrolle eines T7-Promotors (s. Abb. S1A). Folglich lässt sich die Expression aller für die PSP-Produktion zuständigen Enzyme durch die Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) gezielt induzieren.

Die Vektoren pMev und pBcBOT2 konnten erfolgreich in *E. coli* BL21(DE3) co-transformiert werden. Da die Vektoren unterschiedliche Antibiotikaresistenz (Kan^R , Cm^R) vorweisen, konnte der entsprechende Selektionsdruck sichergestellt werden. Auf LB-Agarplatten, die beide Antibiotika enthielten, konnten Kolonien des co-transformierten Stammes wachsen. Alle nachfolgenden Kultivierungen wurden ebenfalls mit beiden Antibiotika durchgeführt, um sicherzustellen, dass es nicht zum Plasmid-Verlust kommt. Die Kultivierung des so erhaltenen Stammes *E. coli_PSPgz* wurde im Komplexmedium Terrific Broth (TB) durchgeführt. Dieses nährstoffreiche Medium wurde gewählt, da es die Biomasseproduktion fördert und bereits bei andern Ganzzellproduktionsstämmen eine erhöhte Terpenproduk-

tion zu beobachten war [18,25]. Dem TB-Medium wird Glycerin zugesetzt, welches sich bei der Ganzzellproduktion von β -Carotin als bessere Kohlenstoffquelle im Vergleich zu Glucose erwiesen hatte [29]. Desweiteren wurden die Wachstums- und Produktionsphase der Kultivierung getrennt. Um möglichst optimale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten, wurde bis zum Erreichen der Induktionszell-dichte eine Temperatur von 37 °C gewählt. Nach der Induktion der Proteinexpression wurde die Temperatur auf 16 °C bzw. 20 °C herabgesetzt, um die Bildung von unlöslichen Aggregaten, sogenannter Einschlusskörperchen (inclusion bodies), der rekombinanten Proteine zu vermeiden. In früheren Versuchen für die Ganzzellproduktion von Patchouli wurde außerdem der höchste Produkttiter bei 20 °C erreicht [18].

3.2 Expressionsanalyse von *E. coli_PSPgz*

Anhand der SDS-PAGE wurde die Überexpression der rekombinanten Gene von *E. coli_PSPgz* evaluiert, wobei die lösliche und unlösliche Proteinfraction getrennt wurden. Die Expression der STC BcBOT2, welches ein theoretisches Molekulargewicht von 47,43 kDa aufweist, ist in den SDS-Gelen deutlich zu erkennen (s. Abb. 3) [30]. Sowohl bei einer Produktionstemperatur von 20 °C als auch von 16 °C konnte die Bildung von inclusion bodies nicht ver-

mieden werden. Während bei 20 °C der Anteil an löslichen BcBOT2 im Verlauf der Kultivierung kontinuierlich abnimmt, ist bei einer Produktionstemperatur von 16 °C der Anteil an löslichen BcBOT2 24 h nach Induktion am größten (s. Abb. 3B). 48 h nach der Induktion ist bei der Produktionstemperatur von 20 °C liegt BcBOT2 fast vollständig als inclusion bodies vor (s. Abb. 3C). Auch wenn in solchen Aggregaten die Aktivität unter Umständen nicht ganz verloren geht, wird sie doch häufig als geringer beobachtet [31]. Deshalb ist die Bildung dieser Einschlusskörperchen eher zu vermeiden. Da im Cytosol lokalisierte STC in Wildtypen aktiv sind, kann auch bei dem löslich vorliegenden BcBOT2 davon ausgegangen werden, dass es in der aktiven Konformation vorliegt [32]. Die Enzyme des Mevalonatwegs konnten nicht mit der SDS-PAGE nachgewiesen werden, weil sie in zu geringen Mengen exprimiert werden. Dies liegt an der Regulierung der Expression der Mev-Gene über den *trc* und *UV5* Promotor, welche weitaus geringere Transkriptionsmengen liefern als der *T7*-Promotor, mit dem die BcBOT2-Expression reguliert wird. Der Nachweis einer erfolgreichen Co-Transformation konnte somit nur über den Nachweis der Produktbildung geschehen.

3.3 Gaschromatografischer Nachweis der Produktbildung

Durch den Nachweis des Produktes über gaschromatografische Analytik soll die gazzellkatalytische Synthese von PSP überprüft werden. Eventuelle terpenoide Produkte, die durch den Gazzellproduktionsstamm *E. coli_PSPgz* gebildet

werden, wurden aus dem zellfreien Medium sowie aus den lysierten Zellen der Fermentation extrahiert. Als Negativkontrollen dienten Proben des zellfreien Mediums aus der Fermentation von *E. coli_Mev_BL21*, *E. coli_BcBOT2* sowie nicht induzierten *E. coli_PSPgz*. Neben den Proben aus der Fermentation wurde als Vergleich für die entstehenden Produkte der Gazzellproduktion ein enzymatischer In-vitro-Reaktionsansatz mit isoliertem BcBOT2 und FPP verwendet.

Abb. 4 zeigt die GC-FID Chromatogramme der extrahierten Proben des Gazzellproduktionsstamms und der Negativkontrollen. In der GC-FID Analyse der Proben des zellfreien Mediums der *E. coli_PSPgz* Kultivierung sind zwei Peaks (1 und 2) mit höherer Intensität auszumachen (s. Abb. 4). Die Chromatogramme der Proben der lysierten Zelle der *E. coli_PSPgz* Fermentation sowie der In-vitro-Enzymreaktion zeigen dagegen nur den Peak 2. Bei Peak 1 mit der Retentionszeit von 10,5 min handelt es sich um ein Nebenprodukt, das bei der fermentativen Gazzellproduktion entstanden ist. Dieses Nebenprodukt konnte mittels eines kommerziell erhältlichen Standards über die GC-FID sowie mit Hilfe von GC-MS als Geraniol bestätigt werden. Dabei stimmt die Retentionszeit des Peaks der gaschromatografisch aufgetrennten Kultivierungsproben mit der Retentionszeit des Geraniolstandards überein (Daten nicht aufgeführt). Außerdem konnte über die NIST-Datenbank das Fragmentierungsmuster der GC-MS Analytik des Peaks als Geraniol identifiziert werden (s. Abbn. S12 und S13). Geraniol ist ein acyclisches Monoterpen und entsteht aus dem C10-Terpenvorläufer Gernaylpyrophosphat (GPP) [33]. Die Geraniolbildung ist auf heterolog exprimierte FFP-Synthase

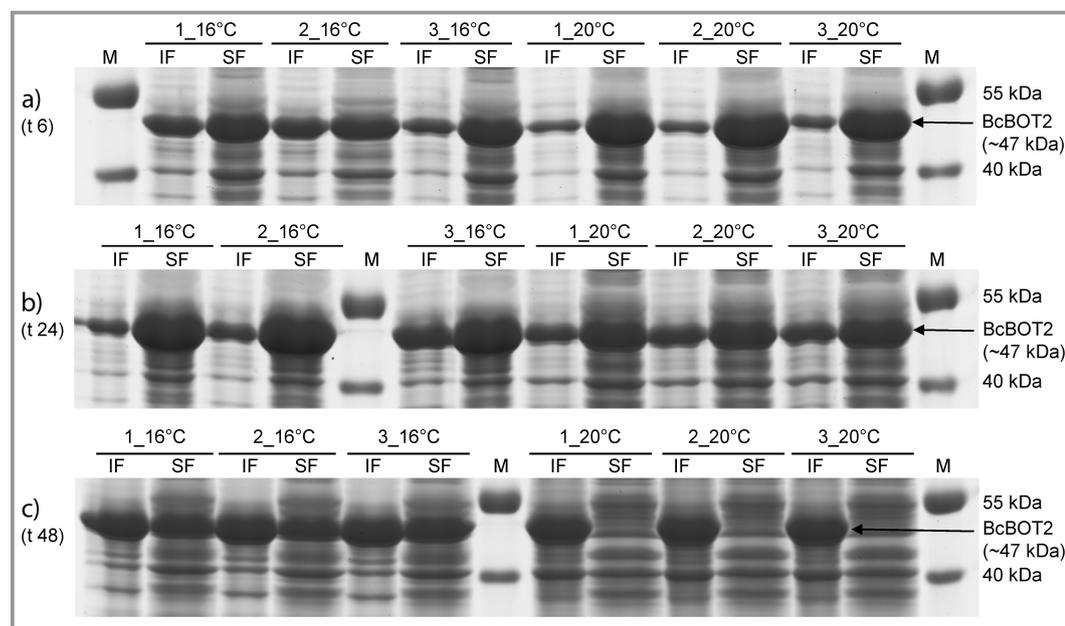


Abbildung 3. Analyse der Überexpression der unlöslichen (IF) und löslichen (SF) Proteinfraction der Fermentation des stoffwechseleptimierten *E. coli* Stamm *E. coli_PSPgz* bei unterschiedlichen Produktionstemperaturen (16 °C und 20 °C) mittels 10 % SDS-PAGE. Die SDS-PAGE wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt (1, 2 und 3). Proben der Fermentation 6 (A), 24 (B) und 48 (C) Stunden nach der Induktion sind dargestellt M: Proteinmarker).

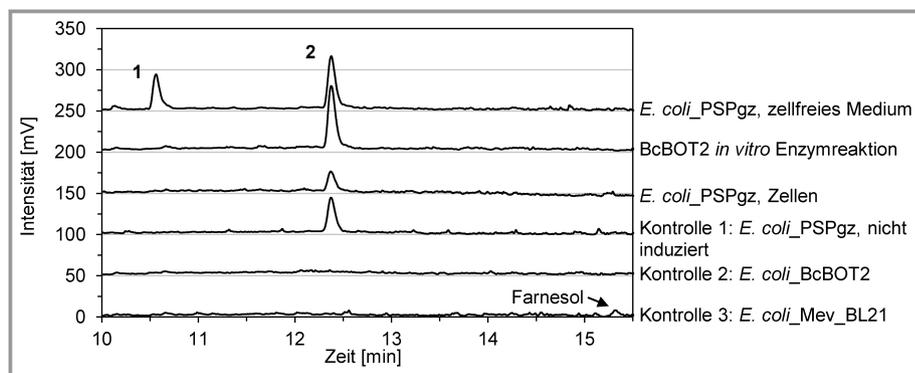


Abbildung 4. Ergebnisse der GC-FID Analyse terpenoider Substanzen der Ganzzellproduktion von PSP sowie der Kontrollen. Basislinien der Chromatogramme sind um jeweils 50 mV verschoben. Proben aus *E. coli* Kultivierungen wurden 25 h nach Induktion entnommen. Mittels GC-MS identifizierte Produkte Geraniol (1) und Presilphiperfolan-8 β -ol (2). Vollständige Chromatogramme in Abbn. S6–S11.

IspA zurückzuführen. Neben FPP kann diese auch GPP bilden [34]. GPP wird dann durch, nativ in *E. coli* vorkommende, Dephosphorylasen zu Geraniol umgesetzt [35].

Bei Peak 2 der GC-FID Analyse mit einer Retentionszeit von 12,3 min handelt es sich um das erwartete Produkt PSP. Dies konnte unter anderem mit Hilfe des In-vitro-Enzymtests mit isoliertem BcBOT2 bestätigt werden. Das aus dem In-vitro-Enzymtest extrahierte PSP weist wie das

in *E. coli_PSPgz* fermentativ hergestellte Produkt einen Peak mit der Retentionszeit von 12,3 min auf (s. Abb. 4). Zusätzlich stimmen die Fragmentierungsmuster der GC-MS Analyse des enzymatisch hergestellten PSP mit dem fermentativ hergestellten Produkt 2 überein (s. Abb. 5). Als Referenz wurde außerdem das Fragmentierungsmuster von Pinedo et al. herangezogen [3]. In der Arbeit wurde mit BcBOT2 enzymatisch hergestelltes PSP und eine authentische PSP-Probe über Massenspektrometrie und NMR identifiziert. Der Molpeak von PSP liegt bei einem m/z-Wert

von 222 und ist auch in dieser Arbeit in den Massenspektren von PSP zu erkennen [3]. Weitere übereinstimmende Peaks befinden sich unter anderem bei einem m/z-Wert von 207, 189, 175, 161, 149, 125, 69 und 55.

In den Negativkontrollen wurde bei dem nicht induzierten *E. coli_PSPgz* PSP detektiert (Peak 2, s. Abb. 4). Es ist anzunehmen, dass PSP durch die Basalexpression der heterolog eingebrachten Stoffwechsellzyme gebildet wird.

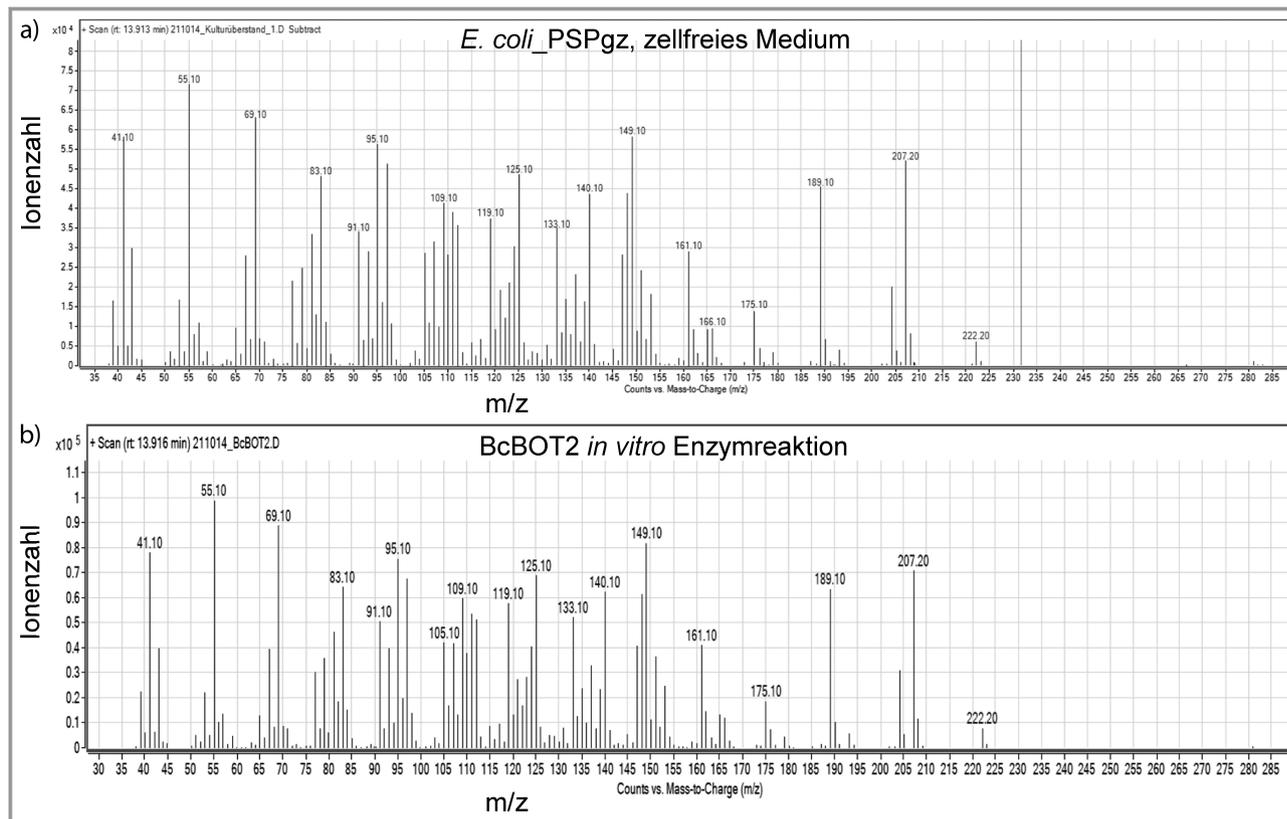


Abbildung 5. Massenspektrum des als PSP vermuteten Peaks (2) der Extraktion des zellfreien Mediums von *E. coli_PSPgz* (A) im Vergleich mit dem Massenspektrum des PSP aus der *in vitro* Enzymreaktion mit BcBOT2 (B).

Insbesondere der lacUV5 Promotor, welcher zusätzlich die Expression der T7-Polymerase in *E. coli* DE3 Stämmen kontrolliert, hat eine erhöhte Grundexpression [36]. Da die T7 Polymerase auch für die Transkription von BcBOT2 zuständig ist, ist der Promotor auch für die Produktbildung im nicht induzierten *E. coli* PSPgz verantwortlich. Im zellfreien Medium von *E. coli* BcBOT, konnten keine terpenoiden Produkte detektiert werden (s. Abb. 4). Demzufolge ist die endergon gebildete FPP-Menge als Substrat für BcBOT2 nicht ausreichend, um PSP zu bilden. Der Stamm *E. coli* Mev_BL21, ist durch das Fehlen von BcBOT2 ebenfalls nicht in der Lage PSP zu bilden. Jedoch ist zu erwarten, dass über den eingebrachten MEV-Weg ein Überschuss an FPP gebildet wird und dies zur Akkumulation von FPP und Farnesol führt [37,38]. Farnesol konnte in geringen Mengen im zellfreien Medium der *E. coli* Mev_BL21-Kultivierung detektiert werden (s. Abb. 4). Zudem zeigte die Kultivierung ein gehemmtes Wachstum im Vergleich zu den anderen Kontrollen (s. Abb.S3), welches durch die Toxizität des sich anreichernden FPP erklärt werden kann [25,39].

3.4 Quantifizierung der Produkte und Einfluss der Produktionstemperatur auf die PSP-Produktion

Um zu untersuchen, wie sich die Konzentration des Produktes PSP und des Nebenproduktes Geraniol über den Verlauf der Kultivierung ändert, wurde eine quantitative Analyse durchgeführt. Des Weiteren wurde der Einfluss der Temperatur auf die PSP bzw. Geraniol-Produktion untersucht und das Verhältnis zwischen PSP im Medium und in den Zellen bestimmt.

Abb.6 zeigt die Wachstumskurven von *E. coli* PSPgz Kultivierungen bei 16 °C und 20 °C sowie die PSP-Titer im zellfreien Medium und in den Zellen. Wie zu erwarten, wird bei einer Produktionstemperatur von 20 °C die maximale Zelldichte schneller erreicht. Im Vergleich der PSP-Titer zeigt sich, dass sich die Menge an PSP im Medium erst ab einer Kultivierungsdauer von 28 h unterscheidet. Bei 16 °C steigt der PSP-Titer im Medium dann nicht mehr, während bei 20 °C eine maximale PSP-Menge im Medium ($9,2 \text{ mg L}^{-1}$) 48 h nach Induktion erreicht wird. Dass der Produkttiter nach 48 h weiter steigen wird, kann ausgeschlossen werden. Zum einem befindet sich *E. coli* PSPgz bereits in der

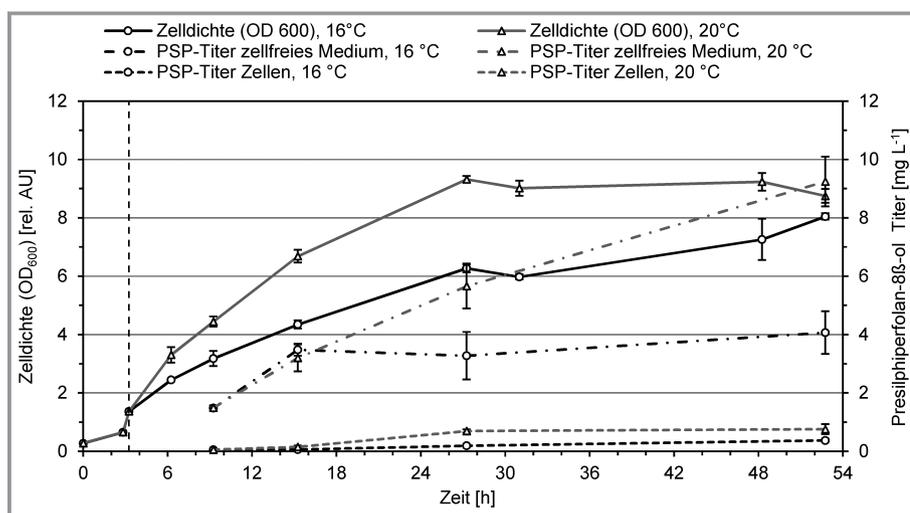


Abbildung 6. Wachstum und Produktion des erstellten Ganzzellproduktionsstamms *E. coli* PSPgz. Das Wachstum wurde über die optische Dichte bei 600 nm bestimmt. Der Presilphiperfolan-8 β -ol Titer des zellfreien Mediums und der Zellen wurde durch Extraktion der Proben mit n-Hexan und GC-FID ermittelt. Die Produktion von PSP wurde nach 3,25 h induziert (gestrichelte senkrechte Linie). Die Daten entsprechen den Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung als Fehlerbalken.

stationären Phase und zum anderen hat sich in früheren Arbeiten gezeigt, dass durch Degradation der Produkte von *E. coli* und Verdunstung die Terpenmenge nach längerer Kultivierungsdauer wieder abnimmt [40, 41].

Wie bereits erwähnt, geht die höhere Produktionstemperatur mit der Bildung von inclusion bodies und damit einem Aktivitätsverlust einher (s. Abb. 3). Nichtsdestotrotz lieferte die höhere Produktionstemperatur einen höheren Produkt-Titer. Dies kann auf die höhere Biomasse zurückgeführt werden. Abb.7B zeigt die PSP-Ausbeute bezogen auf die Biotrockenmasse. Die PSP-Ausbeuten im zellfreien Medium der beiden Produktionstemperaturen unterscheiden sich nicht signifikant. Ein weiterer Faktor für die höhere PSP-Konzentration bei 20 °C ist auf die Temperatur zurückzuführen. BcBOT2 zeigt in einem In-vitro-Enzymtest die höchste Aktivität bei einer Temperatur zwischen 20 °C und 25 °C [11].

Um zu beurteilen, wo sich das PSP der fermentativen Ganzzellproduktion befindet, wurde neben dem PSP-Titer im Medium auch die PSP-Konzentration innerhalb der Zellen bestimmt. Die extrahierte PSP-Menge aus den Lysaten der Proben ist in Abbn. 6 und 7 grafisch dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass PSP nur zu einem sehr geringen Teil in den Zellen akkumuliert. Die höchste PSP-Konzentration in den Zellen ($\sim 0,8 \text{ mg L}^{-1}$) wurde bei einer Produktionstemperatur von 20 °C 48 h nach Induktion gemessen. Im Durchschnitt befindet sich etwa 94 % des Produktes im Medium und nur etwa 6 % des PSP in den Zellen. Demnach wird ein Großteil des Produktes von *E. coli* PSPgz in das Medium sekretiert, wodurch eine aufwändigere Aufreinigung mit Zellaufschluss oder In-situ-Produktabtrennung entfällt.

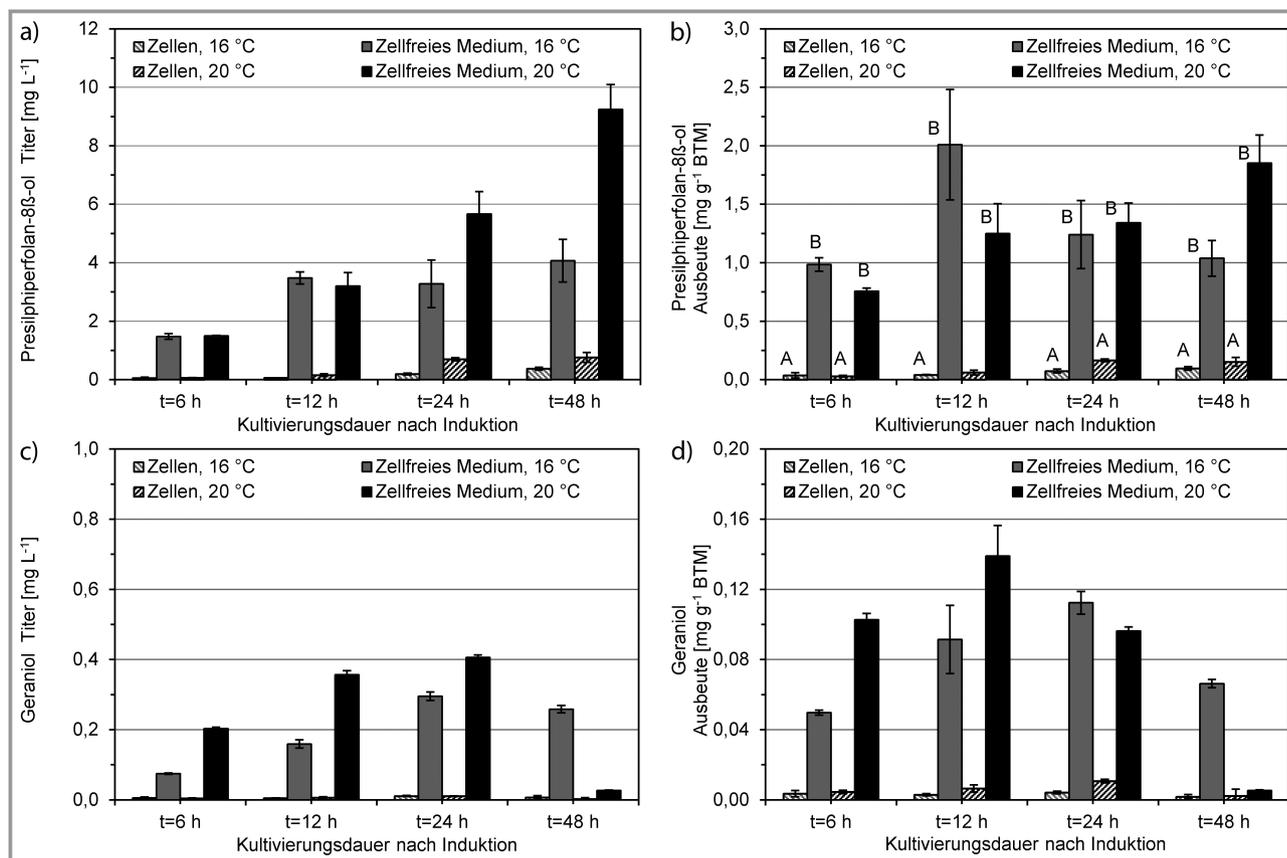


Abbildung 7. Quantifizierung der terpenoiden Produkte zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Fermentation des Ganzzellproduktstamms *E. coli_PSPgz* mittels GC-FID. A) Presilpiperfolan-8 β -ol Titer im zellfreien Medium und Zellen. B) Ausbeute von Presilpiperfolan-8 β -ol bezogen auf die Biotrockenmasse (BTM). Daten wurden mit ANOVA ($\alpha = 0,05$) analysiert, unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede C) Geraniol Titer im zellfreien Medium und Zellen. D) Ausbeute von Geraniol bezogen auf die Biotrockenmasse (BTM). Die Daten entsprechen dem Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung als Fehlerbalken.

Da gefunden wurde, dass bei der fermentativen Ganzzellproduktion von PSP auch Geraniol als Nebenprodukt von *E. coli_PSPgz* anfällt, wurde die Konzentration von Geraniol ebenfalls bestimmt (s. Abb. 7C). Geraniol ist nicht das angestrebte Produkt, für dessen Produktion *E. coli_PSPgz* wichtige Ressourcen verbraucht. Daher sollte die Geraniol-Konzentration so gering wie möglich sein. Die ermittelte Geraniol-Konzentration liegt deutlich unter der Konzentration von PSP. Bei 20 °C 24 h nach der Induktion wurde eine maximale Geraniol-Konzentration von 0,4 mg L⁻¹ ermittelt. Zum Vergleich: die PSP-Konzentration zu diesem Zeitpunkt und Produktionstemperatur ist mit 5,7 mg L⁻¹ in etwa 14-mal höher (s. Abb. 7A). Der geringste Unterschied zwischen Geraniol und PSP-Konzentration ist 6 h nach Induktion bei 20 °C zu beobachten. Hier ist die PSP-Konzentration immerhin noch in etwa 7-mal höher. Die Produktionstemperatur scheint einen ähnlichen Einfluss auf den Geraniol-Titer zu haben, wie auf den PSP-Titer. Bei höherer Produktionstemperatur steigt die Bildung von Geraniol an. Allerdings ist auch zu beobachten, dass mit längerer Kultivierungsdauer die Geraniolkonzentration wieder abnimmt. Dies ist auch anhand der Geraniol-Ausbeute

bezogen auf die Biotrockenmasse (s. Abb. 7D) zu sehen und ist auf die hohe Flüchtigkeit des Geraniols während der Fermentation zurückzuführen [35]. Wie schon für das PSP beobachtet werden konnte, reicht sich auch Geraniol kaum innerhalb der Zellen an.

4 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte der stoffwechsoptimierte Stamm *E. coli_PSPgz* zur Ganzzellproduktion von Presilpiperfolan-8 β -ol erfolgreich erstellt werden. Dieser Stamm ist in der Lage, Farnesylpyrophosphat über die heterolog exprimierten Enzyme des Mevalonat-Stoffwechselwegs zu synthetisieren und dieses mit der ebenfalls heterolog exprimierten Sesquiterpencyclase BcBOT2 zu PSP umzusetzen. PSP wird von dem Stamm hauptsächlich in das Medium sekretiert. Bei einer Produktionstemperatur von 20 °C wurde eine PSP-Konzentration von 10 mg L⁻¹ nach 48 h erzielt. In Hinblick auf die Produktkonzentration und -ausbeute bietet der Prozess noch weiteres Entwicklungspotential. So können neben den Induktionsparametern, auch weitere komplexe

und definierte Medien mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen untersucht und angepasst werden. Auch die Verwendung eines 2-Phasensystems, bei dem die Kultivierung mit Lösemittel überschichtet wird, könnte die Produktausbeute steigern.

Supporting Information

Weiterführende Informationen zu diesem Artikel (Supporting Information) finden Sie unter DOI: <https://doi.org/10.1002/cite.202200115>.

Für die technische Unterstützung wird Martina Weiß und Martin Pähler gedankt sowie Ulrich Krings von Institut für Lebensmittelchemie für die Unterstützung in der GC-MS Analytik. Dem nds. MWK wird gedankt für die Förderung der wissenschaftlichen Arbeiten im Rahmen des ABA-Projektes (FKZ: ZN3822) aus Mitteln des nds. VW-Vorab. Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

Abkürzungen

AtoB	Acetoacetyl-CoA-Thiolase
BcBOT2	Presilphiperfolan-8 β -ol-Synthase
BTM	Biotrockenmasse
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FPP	Farnesylpyrophosphat
GC-FID	Gaschromatografie mit Flammenionisationsdetektor
GC-MS	Gaschromatografie mit Massenspektrometrie
GPP	Geranylpyrophosphat
Gz	Ganzzellproduktion
HMGS	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Synthase
Idi	Isopentenylpyrophosphat-Isomerase
IF	<i>insoluble fraction</i> (unlösliche Proteinfraktion)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IspA	FPP-Synthase
LB	Lysogeny broth
MK	Mevalonat-Kinase
PMD	Mevalonatdiphosphat-Decarboxylase
PMK	Phosphomevalonat-Kinase
PSP	Presilphiperfolan-8 β -ol
rel. AU	<i>relative absorption units</i> (relative Absorptionseinheiten)
SDS-PAGE	Sodium dodecyl Polyacrylamidgelelektrophorese
SF	<i>soluble fraction</i> (lösliche Proteinfraktion)
STC	Sesquiterpencyclase
TB	Terrific broth
TCn	Terpencyclasen
tHMGS	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Reduktase

Literatur

- [1] D. W. Christianson, *Chem. Rev.* **2017**, *117* (17), 11570–11648. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00287>
- [2] D. J. Miller, R. K. Allemann, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29* (1), 60–71. DOI: <https://doi.org/10.1039/c1np00060h>
- [3] C. Pinedo, C.-M. Wang, J.-M. Pradier, B. Dalmais, M. Choquer, P. Le Pêcheur, G. Morgant, I. G. Collado, D. E. Cane, M. Viaud, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3* (12), 791–801. DOI: <https://doi.org/10.1021/cb800225v>
- [4] V. Harms, A. Kirschning, J. S. Dickschat, *Nat. Prod. Rep.* **2020**, *37* (8), 1080–1097. DOI: <https://doi.org/10.1039/c9np00055k>
- [5] S. C. Wang, D. J. Tantillo, *Org. Lett.* **2008**, *10* (21), 4827–4830. DOI: <https://doi.org/10.1021/ol801898v>
- [6] R. Dean, J. A. L. van Kan, Z. A. Pretorius, K. E. Hammond-Kosack, A. Di Pietro, P. D. Spanu, J. J. Rudd, M. Dickman, R. Kahmann, J. Ellis, G. D. Foster, *Mol. Plant Pathol.* **2012**, *13* (4), 414–430. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- [7] B. Williamson, B. Tudzynski, P. Tudzynski, J. A. L. van Kan, *Mol. Plant Pathol.* **2007**, *8* (5), 561–580. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>
- [8] M. Choquer, E. Fournier, C. Kunz, C. Levis, J.-M. Pradier, A. Simon, M. Viaud, *FEMS Microbiol. Lett.* **2007**, *277* (1), 1–10. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00930.x>
- [9] N. Deighton, I. Muckenschnabel, A. J. Colmenares, I. G. Collado, B. Williamson, *Phytochemistry* **2001**, *57* (5), 689–692. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00088-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00088-7)
- [10] A. Porquier, G. Morgant, J. Moraga, B. Dalmais, I. Luyten, A. Simon, J.-M. Pradier, J. Amselem, I. G. Collado, M. Viaud, *Fungal Genet. Biol.* **2016**, *96*, 33–46. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.10.003>
- [11] V. Harms, V. Ravkina, A. Kirschning, *Org. Lett.* **2021**, *23* (8), 3162–3166. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.1c00882>
- [12] C. C. R. de Carvalho, *Biotechnol. Adv.* **2011**, *29* (1), 75–83. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.09.001>
- [13] M. Kadisch, C. Willrodt, M. Hillen, B. Bühler, A. Schmid, *Biotechnol. J.* **2017**, *12* (8), 1600170. DOI: <https://doi.org/10.1002/biot.201600170>
- [14] B. Lin, Y. Tao, *Microb. Cell Fact.* **2017**, *16* (1), 106. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0724-7>
- [15] J. Nielsen, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *55* (3), 263–283. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002530000511>
- [16] Z. Dai, J. Nielsen, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2015**, *36*, 8–15. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.08.006>
- [17] J. D. Keasling, *Science* **2010**, *330* (6009), 1355–1358. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1193990>
- [18] F. Aguilar, K. Ekramzadeh, T. Scheper, S. Beutel, *ACS Omega* **2020**, *5* (50), 32436–32446. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c04590>
- [19] T. Cheng, K. Zhang, J. Guo, Q. Yang, Y. Li, M. Xian, R. Zhang, *Biotechnology Biofuels Bioprod.* **2022**, *15* (1), 39. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13068-022-02136-8>
- [20] H. Harada, F. Yu, S. Okamoto, T. Kuzuyama, R. Utsumi, N. Misa-wa, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *81* (5), 915–925. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1724-7>
- [21] G. H. Han, S. K. Kim, P. K.-S. Yoon, Y. Kang, B. S. Kim, Y. Fu, B. H. Sung, H. C. Jung, D.-H. Lee, S.-W. Kim, S.-G. Lee, *Microb. Cell Fact.* **2016**, *15* (1), 185. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0588-2>
- [22] C.-L. Liu, K. Xue, Y. Yang, X. Liu, Y. Li, T. S. Lee, Z. Bai, T. Tan, *Crit. Rev. Biotechnol.* **2022**, *42* (1), 73–92. DOI: <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1924112>
- [23] M. Harker, P. M. Bramley, *FEBS Lett.* **1999**, *448* (1), 115–119. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00360-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00360-9)

- [24] S.-W. Kim, J. D. Keasling, *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, *72* (4), 408–415. DOI: [https://doi.org/10.1002/1097-0290\(20000220\)72:4<408:AID-BIT1003>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1097-0290(20000220)72:4<408:AID-BIT1003>3.0.CO;2-H)
- [25] V. J. J. Martin, D. J. Pitera, S. T. Withers, J. D. Newman, J. D. Keasling, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21* (7), 796–802. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt833>
- [26] P. P. Peralta-Yahya, M. Ouellet, R. Chan, A. Mukhopadhyay, J. D. Keasling, T. S. Lee, *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 483. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms1494>
- [27] C. Oberhauser, V. Harms, K. Seidel, B. Schröder, K. Ekramzadeh, S. Beutel, S. Winkler, L. Lauterbach, J. S. Dickschat, A. Kirschning, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57* (36), 11802–11806. DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.201805526>
- [28] *Molecular cloning: A laboratory manual*, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. **2012**.
- [29] S.-H. Yoon, S.-H. Lee, A. Das, H.-K. Ryu, H.-J. Jang, J.-Y. Kim, D.-K. Oh, J. D. Keasling, S.-W. Kim, *J. Biotechnol.* **2009**, *140* (3–4), 218–226. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.01.008>
- [30] V. Harms, *Biotransformationen natürlicher und unnatürlicher Substrate zur Bildung von Terpenoiden mit olfaktorischen Eigenschaften*, Ph.D.-Thesis, Leibniz Universität Hannover **2021**.
- [31] E. García-Fruitós, N. González-Montalbán, M. Morell, A. Vera, R. M. Ferraz, A. Arís, S. Ventura, A. Villaverde, *Microb. Cell Fact.* **2005**, *4*, 27. DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-27>
- [32] F. J. Leeper, J. C. Vederas, *Biosynthesis: Aromatic Polyketides, Isoprenoids, Alkaloids*, Topics in Current Chemistry, Vol. 209, Springer, Berlin **2000**.
- [33] J. Zhou, C. Wang, S.-H. Yoon, H.-J. Jang, E.-S. Choi, S.-W. Kim, *J. Biotechnol.* **2014**, *169*, 42–50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.11.009>
- [34] V. C. A. Ward, A. O. Chatzivasileiou, G. Stephanopoulos, *FEMS Microbiol. Lett.* **2018**, *365* (10), fny079. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsle/fny079>
- [35] W. Liu, X. Xu, R. Zhang, T. Cheng, Y. Cao, X. Li, J. Guo, H. Liu, M. Xian, *Biotechnol. Biofuels* **2016**, *9*, 58. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0466-5>
- [36] F. Du, Y.-Q. Liu, Y.-S. Xu, Z.-J. Li, Y.-Z. Wang, Z.-X. Zhang, X.-M. Sun, *Microb. Cell Fact.* **2021**, *20* (1), 189. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01680-6>
- [37] C. Wang, S.-H. Yoon, A. A. Shah, Y.-R. Chung, J.-Y. Kim, E.-S. Choi, J. D. Keasling, S.-W. Kim, *Biotechnol. Bioeng.* **2010**, *107* (3), 421–429. DOI: <https://doi.org/10.1002/bit.22831>
- [38] F. Aguilar, T. Scheper, S. Beutel, *Genes* **2019**, *10* (6), 478. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes10060478>
- [39] C. Wang, J.-E. Park, E.-S. Choi, S.-W. Kim, *Biotechnol. J.* **2016**, *11* (10), 1291–1297. DOI: <https://doi.org/10.1002/biot.201600250>
- [40] S. Alemdar, J. C. König, S. Hartwig, T. Frister, T. Scheper, S. Beutel, *Eng. Life Sci.* **2017**, *17* (8), 900–907. DOI: <https://doi.org/10.1002/elsc.201700043>
- [41] F. Aguilar, T. Scheper, S. Beutel, *Molecules* **2019**, *24* (18). DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24183356>