

Aspekte der synthetischen Biotechnologie

Kumulative Habilitationsschrift

Zur Habilitation vorgelegte Arbeiten

Teil I: Synopse

Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

von

Dr. rer. nat. Sascha Beutel

geb. 30.05.1971 in der Freien und Hansestadt Hamburg

Hannover, 2017

Danksagung

Die vorliegende Arbeit ist Bestandteil eines Habilitationsverfahrens an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Leibniz Universität Hannover. Sie wurde im Zeitraum von 2011 bis 2017 am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover durchgeführt. Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Thomas Scheper, der mir optimale Arbeitsmöglichkeiten für die Realisierung meiner Ideen zur Verfügung stellte. Die zahllosen Hilfestellungen und seine uneingeschränkte Unterstützung trugen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Für die anregende und produktive Zusammenarbeit möchte ich allen Projektpartnern danken, die mit Ihren wertvollen Beiträgen maßgeblich zum Gelingen der Arbeiten beigetragen haben. Hier sind zum einen die Industriepartner Symrise AG, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Presens Precision Sensing GmbH und Surflay GmbH zu nennen sowie zum anderen die universitären Kooperationspartner wie das Institut für Biochemie, Abt. Biotechnologie & Enzymkatalyse, Universität Greifswald von Prof. Uwe Bornscheuer sowie die Arbeitsgruppe von Prof. Ester Segal vom Technion, Haifa, Israel.

Weiterhin gilt mein Dank den verschiedenen Fördermittelgebern, die durch ihre finanzielle Unterstützung diese Forschungsarbeiten ermöglichten: Bundesministerium für Bildung und Forschung, Bundesministerium für Wirtschaft und Energie, Niedersächsisches Ministerium für Wissenschaft und Kultur und Europäischer Fonds für Regionalentwicklung.

Besonderer Dank gilt natürlich auch allen denjenigen, die durch ihre wissenschaftlichen Arbeiten zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben: Dr. Steffen Hartwig, Dr. Thore Frister, Dr. Semra Alemdar, M.Sc. Francisco Aguilar-Cascante, Dr. Jörg Schmidt-Hager, Dr. Christian Ude, Dr. Tim Lücking, Dr. Sarah Schreiber, Dr. Anna Glyk, Dr. Andrea Mönster, Dr. Anne Schmidt, Dr. Patrick Jonczyk und Dr. Phillip Grünert. Zudem danke ich Dr. Dörte Solle und Dr. Janina Bahnemann für das Korrekturlesen und die Hilfestellungen bei der englischen Übersetzung. Bedanken möchte ich mich auch bei Martina Weiß, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand sowie bei den Werkstätten des TCI, ohne deren unermüdlichen Einsatz viele Untersuchungen nicht möglich gewesen wären. Vielmals danken möchte ich auch unserer Verwaltung, v.a. Ulla Dreschel und Cornelia Alic, die mich immer unterstützten und mir alle Formalitäten so zuverlässig vom Hals hielten. Der gesamten aktuellen und auch der Ex-TCI-Belegschaft bin ich für lockeres und angenehmes Arbeiten sowie für unzählige Anregungen und fachliche Hilfestellungen zu Dank verpflichtet. Das TCI ist und bleibt das beste Institut der Welt.

Meinen Freunden möchte ich für die vielfältigen Zerstreuungen, angenehmen Abwechslungen und netten Abende danken, die sehr geholfen haben, immer wieder den Kopf für das Wesentliche freizubekommen und mich motiviert haben, niemals aufzugeben. Meinen Eltern, meiner Schwester

und allen Poppelbaums danke ich dafür, dass sie immer für mich da waren und mich vorbehaltlos unterstützt haben auf diesem langen Weg. Meinen beiden Kindern Tim-Jonas und Anna-Marie danke ich dafür, dass Sie mein Leben so sehr bereichern und ihre eigenen Wünsche immer wieder zurückgestellt haben, so lange, wie ich für das Anfertigen dieser Arbeit benötigte.

In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern,
die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben,
während sich der weite Ozean des Unbekannten
vor unseren Augen erstreckt.

Sir Isaac Newton (1643 - 1727), englischer Mathematiker, Physiker und Astronom

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Teil I: Synopse

Zusammenfassung (deutsch).....	VII
Summary (english).....	VIII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1. Einleitung.....	1
2. Synthetische Biologie zur Nutzung pflanzlicher Sesquiterpensynthesen.....	4
2.1 Terpene.....	4
2.2 Sesquiterpenbiosynthese.....	5
2.3 Auswahl von Sesquiterpensynthesen für die synthetische Biotechnologie.....	6
2.3.1 Molekularbiologische Arbeiten zur Produktion der Patchoulolsynthase.....	8
2.3.2 Expression der PTSi im Produktionsorganismus.....	8
2.3.3 Charakterisierung des Reaktionsverhaltens der PTSi.....	11
2.3.4 Weiterführende Arbeiten zur Charakterisierung der PTSi.....	15
2.3.5 Molekularbiologische Arbeiten zur Produktion der α -Humulensynthase.....	17
2.3.6 Charakterisierung des Reaktionsverhaltens der HUM.....	18
2.3.7 Oxidation des α -Humulens zu Zerumbon.....	20
2.3.8 Molekularbiologische Arbeiten zur Produktion der (+)-Zizaensynthase	23
2.3.9 Expression der ZIZ im Produktionsorganismus.....	24
2.3.10 Charakterisierung des Reaktionsverhaltens der ZIZ.....	24
3. Methoden der Bioprozessentwicklung.....	29
3.1 Upstream enabling technologies.....	30
3.1.1 Sensorentwicklung für die Bestimmung der Biomassekonzentration in Schüttelkolben.....	31
3.1.2 Untersuchung der Anwendungsbreite des entwickelten Biomassensensors.....	33
3.1.3 Anwendung des entwickelten Biomassensensors zur Bestimmung von Proteinaggregaten.....	34
3.1.4 pH-Statierung im Schüttelkolben.....	36
3.1.5 3D-Druck-Technologie in der Bioprozessentwicklung.....	38
3.1.6 Biokompatibilitätstestung von 3D-Druck-Materialien.....	40
3.2 Downstream enabling technologies.....	42
3.2.1 Tiefenfiltermodifikation für den Einsatz in der Enzymaufreinigung.....	42
3.2.2 Membranadsorber für die Enzymaufreinigung.....	44
3.2.3 PGA-Aufreinigung mittels Membranchromatographie.....	46
3.2.4 Membranchromatographische Aufreinigung von Cellulasen und Lipasen.....	47
3.2.5. Wässrige Zweiphasenextraktion in der Enzymaufreinigung.....	49
3.2.3.1 Grundlegende Untersuchungen zur Phasenbildung in PEG/Salz-Systemen.....	50
3.2.3.2 Quantifizierung der systembildenden Komponenten in PEG/Salz-Systemen.....	52
3.2.3.3 Bestimmbarkeit der enzymatischen Zielkomponente in PEG/Salz-Systemen.....	53
3.2.3.4 Statistische Versuchsplanung für die Enzymaufreinigung mit PEG/Salz-Systemen.....	54
3.2.3.5 ATPS-Anwendungen mit Enzymen.....	56
4. Synthetische Biotechnologie am Beispiel der Polyphenolproduktion.....	59
4.1 Polyphenolbiosynthese.....	59

4.1.1	Naringeninabbau in Destruenten.....	61
4.2	Kultivierung strikt anaerober Mikroorganismen.....	64
4.3	Einsatz von <i>E. ramulus</i> für die Phloretinproduktion.....	65
4.4	Einsatz der synthetischen Biotechnologie in der Phloretinproduktion.....	66
5.	Fazit.....	69
6.	Literaturverzeichnis.....	71

Teil II: Schriftensammlung

Schriftensammlung.....	A - Y
------------------------	-------

Zusammenfassung

Die synthetische Biotechnologie ermöglicht die rekombinante Produktion komplexester Naturstoffe mittels geeigneter, maßgeschneiderter, biologischer Systeme. Sie stellt eine Alternative zur konventionellen Naturstoffproduktion dar, bei der die Naturstoffe entweder über extraktive Verfahren aus den natürlichen Ressourcen isoliert werden oder mit rein chemischen Synthesen hergestellt werden. Die synthetische Biotechnologie ermöglicht die kontrollierte Produktion der Naturstoffe mit den passenden Enzymsystemen, die aus den entsprechenden Ursprungsorganismen ermittelt und in geeigneten Produktionsorganismen exprimiert werden. Die synthetische Biotechnologie nutzt die synthetische Biologie und die Bioprozesstechnik, um wirtschaftliche und nachhaltige Produktionsverfahren für hochkomplexe, biologische Komponenten zu ermöglichen und so die Biologisierung der chemischen Industrie voranzutreiben.

Im Rahmen dieser Arbeit werden zunächst beispielhafte Naturstoffe aus der großen Naturstoffklasse der Sesquiterpene für eine Bearbeitung im Sinne der synthetischen Biotechnologie ausgewählt. Die Enzyme, die an deren Synthese beteiligt sind, werden in einem synthetischen Biologieansatz untersucht, d.h. im Ursprungsorganismus identifiziert, rekombinant in *E. coli* exprimiert und mit diesem Stamm in löslicher und aktiver Form produziert. Eine eingehende Untersuchung der Reaktionswege und die Ermittlung der kinetischen Daten dieser Enzyme liefert die relevanten Informationen für eine biotechnologische Prozessgestaltung. Zum Beispiel können, wie gezeigt wird, die Stoffwechselwege zur Produktion des universellen Synthons Farnesyldiphosphat in den Produktionsstamm integriert werden, so dass sich die Sesquiterpene direkt aus der Kohlenstoffquelle produzieren lassen. Auch eine nachgeschaltete Konversion der produzierten Sesquiterpene zu Terpenoiden wurde am Beispiel der Oxidation von α -Humulen zum antikanzerogenen Zerumbon untersucht.

Neben den Arbeiten zur synthetischen Biologie werden im Bereich Bioprozessentwicklung verschiedene innovative Sensorikkomponenten, Prozesselemente und –technologien vorgestellt. So wird ein Sensorik-Konzept zur Biomassebestimmung in Schüttelkolbenkulturen untersucht, das umfangreich evaluiert und für verschiedene Applikationen getestet wurde. Weiterhin werden Ansätze für eine Regelung von Bioprozessen schon im Schüttelkolbenmaßstab getestet, wofür ein 3D-gedruckter Dosageaufsatz als Kolbendeckel verwendet wird. Der 3D-Druck wird auch als Technologie zur Produktion maßgeschneiderter Bauteile für die Bioprozessentwicklung untersucht und die Biokompatibilität neuer Materialien getestet. Im Bereich der Produktaufarbeitung werden verschiedene Technologien wie die Membranchromatographie und der Einsatz von wässrigen Zweiphasensystemen für die Aufreinigung von Enzymen untersucht und auch innovative Ansätze wie die Layer-by-Layer-Modifikation von handelsüblichen Tiefenfiltern für spezifische Interaktionen mit Enzymen getestet.

In einem abschließenden Prozessbeispiel werden Produktionsansätze auf klassisch-biotechnologischer Basis synthetisch biotechnologischen gegenübergestellt. Anhand der Produktion des Flavonoids Phloretin durch Konversion des Flavonoids Naringenin werden zunächst Wege zur Realisierung des Prozesses auf Basis des Ursprungsorganismus untersucht. Die Etablierung eines ökonomischen Prozessablaufes gelingt letztlich aber erst nach rekombinanter Expression der beteiligten Enzyme in einem Produktionsorganismus. Zum einen können so unerwünschte Folgereaktionen unterbunden werden und zum anderen eine Hochzelldichtekultivierung realisiert werden, die eine ausreichende Volumenproduktivität gewährleistet, so dass der Prozess auf Basis dieses synthetisch biotechnologischen Ansatzes wirtschaftlich ist.

Schlagworte: Synthetische Biotechnologie, rekombinante Naturstoffproduktion, Enzymtechnik

Summary

Synthetic biotechnology comprises as an essential part the recombinant production of complex natural compounds in tailored biological systems. It serves as a powerful alternative for conventional methods, such as extraction from natural resources. Synthetic biotechnology enables the controlled synthesis of enzymes involved in the natural production *in planta*. Therefore, these enzymes have to be identified and isolated from the host organisms and have to be expressed recombinantly in a suitable production strain. Successful economic production of recombinant natural compounds requires the strategic combination of synthetic biology and bioprocess development.

In this study, several exemplary natural compounds produced by synthetic biotechnology are investigated. A variety of sesquiterpenes from the largest class of natural compounds, the terpenes, were chosen for a systematic evaluation. Therein, the relevant enzymes for the production of the desired sesquiterpenes were examined in a synthetic biology approach. They were identified in the host organisms, recombinantly expressed and produced in *E. coli*, with focus on the enzyme's solubility and activity. A detailed investigation of the conversion mechanisms and the enzyme kinetics provided the insights needed to establish a biotechnological production scheme. Furthermore, a biotransformation with incorporated metabolic pathways for the production of the universal substrate farnesyldiphosphate, directly from carbon-feedstock, was tested. α -humulensynthase was chosen as an example to explore the subsequent conversion of the produced sesquiterpenes by fast organic oxidation to sesquiterpenoids, here to produce the anticarcinogenic zerumbone.

Apart from these synthetic biology studies, several innovative sensor components, process elements and technologies were investigated, showing the potential to improve the development of bioprocesses. On the one hand, a sensor concept for the online biomass monitoring in shake flask cultivation was evaluated and tested regarding various parameters. Furthermore, online-sensor signals were investigated for the control of bioprocesses with a specially designed dosage shake flask lid, which was 3D-printed. 3D-printing technology was also used for the development of new customized lab materials, which were evaluated regarding their biocompatibility. On the other hand, several downstream processes, such as membrane chromatography and aqueous two-phase extraction, were examined with respect to their capability to isolate and purify enzymes. Herein, an innovative approach to enhance the enzyme specificity of conventional depth filtration was investigated by layer-by-layer technology-based modification.

Finally, the production process of another exemplary natural compound, the flavonoid phloretin, by means of enzymatic conversion of the flavonoid naringenin is presented. At first, a classical biotechnological production with a wild-type strain was tested. The strict anaerobic cultivation in classical and new single-use reactor systems with a subsequent bioconversion is, however, impractical due to the complexity of the process. Thus, a synthetic biotechnological process was established. High cell density cultivation of the recombinant *E. coli* production strain and a subsequent bioconversion with whole cells resulted in an economically feasible production process, enabling a reliable daily production of more than 3 g/L phloretin.

Key words: Synthetic biotechnology, recombinant natural compound production, enzyme technology

Abkürzungsverzeichnis

aGTL	aus <i>Geobacillus thermoleovorans</i>
ANOVA	Analysis of variance
AS	Aminosäure
ATPS	Aqueous two-phase system
BCA	Bicinchoninsäure
BET	Brunauer-Emmet-Teller
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BMWi	Bundesministerium für Wirtschaft und Energie
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
BTM	Biotrockenmasse
CAD	Computer-aided design
CAI	Codon Adaptionsindex
CalB	<i>Candida Antarctica</i> Lipase B
CCC	Central composite circumscribed
CCD	Central Composite Design
CCF	Central composite face-centred
cDNA	Komplementäre Desoxyribonucleinsäure
Cel5A	Cellulase aus <i>Fervidobacterium gondwanense</i>
CHI	Chalkonisomerase
CHO	Chinese hamster ovary
¹³ C-NMR	Kohlenstoff-13-Kernspinresonanzspektroskopie
CPR	Cytochrom P450 Reduktase
cspA	Cold shock Protein A
CT	α -Chymotrypsin
CTB	Cell titer blue
CYP450	Cytochrom P 450 Monooxygenase
DDXXD	Aminosäureabfolge im Einlettercode (D = Asparaginsäure, X=variable Position)
DO	Dissolved oxygen, Sauerstoffpartialdruck in Lösung
DoE	Design of experiments
E.C.	Enzyme Commission number
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEV	Effective excluded volume
EFRE	Europäischer Fonds für Regionalentwicklung
EOT	Effective optical thickness
ERED	Enoatreductase
EU	Europäische Union
FDA	Food and Drug Administration
FPLC	Fast protein liquid chromatography
FPP	Farnesyldiphosphat
FSC	Forward scatter
GC-FID	Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor

GC-MS	Gaschromatographie mit folgender Massenspektrometrie
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GPP	Geranyldiphosphat
GGPP	Geranylgeranyldiphosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
H454C	Aminosäureaustausch in Position 454 im Einlettercode Histidin gegen Cystein
HCP	Host cell Proteine
His-tag	Histidin-tag
His-PTSi	Histidin-getagtes Patchoulsynthase-Isoenzym
hLIF	humaner Leukämie-inhibierender Faktor
HPLC	High performance/pressure liquid chromatography
HUM	Humulensynthase
IB	Inclusion body
IDA	Iminodiacetat
IMAC	Immobilized metal ion affinity chromatography
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyronosid
ISPR	In-situ product removal
K458N	Aminosäureaustausch in Position 458 im Einlettercode Lysin gegen Asparagin
kDa	Kilo Dalton
LB	Lysogeny broth (Kulturmedium)
LED	Light emitting diode
log P	Verteilungskoeffizient
LYS	Lysozym
MEP	Methylerythritolphosphatstoffwechselweg
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
MVA	Mevalonatstoffwechselweg
MW	Molekulargewicht
N458	Aminosäureposition im Einlettercode: Asparagin in Position 458
NADH	Reduzierte Form des Nicotinamidadenindinucleotid
NIH	National Institute of Health
NPP	Neryldiphosphat
NSE/DTE	Aminosäureabfolge im Einlettercode (N= Asparagin, S= Serin, E= Glutaminsäure, D = Asparaginsäure, T= Threonin)
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
OFAT	One factor at time
OTR	Oxygen transfer rate
OVA	Ovalbumin
PA	Polyamid
PAH	Polyallylaminhydrochlorid
PAT	Process Analytical Technology
PEG	Polyethylenglykol
PEI	Polyethylenimin
PGA	Pen-G-Amidase
PH	Phloretinhydrolase

pl	Isoelektrischer Punkt
p-NPA	para-Nitrophenylacetat
PSS	Polynatrium-4-styrolsulfonat
PTS	Patchoulolsynthase
PTSi	Patchoulolsynthase-Isoenzym
Q ₁₀	dynamische Bindungskapazität 10%
Q _{max}	maximale dynamische Bindungskapazität (100%)
REM	Rasterelektronenmikroskop
ROS	Radical oxygen species
RSM	Response surface methodology
SB	Super broth (Kulturmedium)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SFR	Shake flask reader
SIPA	Silizium Photonenarray
SLS	selektives Lasersintern
SSC	Side scatter
STR	stirred tank reactor (Rührkesselreaktor)
STS	Sesquiterpensynthase
SUMO	small Ubiquitin-like Modifier
TB	Terrific broth (Kulturmedium)
aq. TBHP	wässriges tertiäres Butylhydroperoxid
TEAP	Triethylammoniumphosphat
TFD	Teil-faktorielles Design
TRX	Thioredoxin
TRX-His-PTSi	Patchoulolsynthase-Isoenzym mit Thioredoxininfusionsprotein und internem His-tag
ULP1	Ubiquitin-like-specific protease 1
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultraviolette Strahlung
VFD	Voll faktorielles Design
ZIM	Zentrale Innovationsoffensive Mittelstand
ZIZ	Zizaensynthase

1. Einleitung

Naturstoffe finden in unserer modernen Gesellschaft eine breite Verwendung. Sie werden unter anderem für pharmakologische Anwendungen eingesetzt, als Duft- und Aromastoffe verwendet und auch sonst vielfältig technisch genutzt, z.B. als Strukturbausteine für die organische Synthese.

Die Herstellung der Naturstoffe erfolgt heute noch überwiegend durch Extraktion aus den natürlichen, oftmals pflanzlichen Ressourcen. Bei der agrarischen Produktion kommt es allerdings aufgrund von unkalkulierbaren klimatischen Schwankungen, einem unkontrollierten Einsatz von Herbiziden und Pestiziden oder auch politischen Instabilitäten in den Herstellerländern, oft zu Qualitäts- und Versorgungsproblemen. Der Marktpreis schwankt daher stark. Darüber hinaus sind die natürlichen Ressourcen oftmals knapp und ihre Ausbeutung würde die Biodiversität drastisch einschränken. Aus diesem Grund werden alternative Produktionswege gesucht, um langfristige Versorgungssicherheit und Preisstabilität zu gewährleisten. Die klassische organische Synthese könnte eine Alternative darstellen, gerät hier jedoch an ihre Grenzen, da die zumeist komplex aufgebauten Naturstoffe auf diese Weise nur durch aufwändige Totalsynthesen mit geringen Ausbeuten und somit nicht ökonomisch dargestellt werden können.

Eine praktikable Alternative stellt hingegen die synthetische Biotechnologie dar, bei der die entsprechenden Verbindungen unter Einsatz genetisch veränderter biologischer Systeme produziert werden. Sie bietet die Möglichkeit, die natürliche Biosynthese der Naturstoffe zu adaptieren und in geeigneten biologischen Produktionsorganismen geregelt ablaufen zu lassen. So kann eine ökonomische, reproduzierbare Produktion unter milden Bedingungen in wässrigen Medien erreicht werden.

Die synthetische Biotechnologie umfasst die zwei aufeinander aufbauenden Arbeitsfelder der synthetischen Biologie und der Bioprozessentwicklung. Die synthetische Biologie beinhaltet überwiegend molekularbiologische Arbeiten zur Identifizierung der an der Biosynthese eines Naturstoffes beteiligten Biokatalysatoren, zumeist Enzyme, für die Isolierung der sie codierenden DNA, deren funktionale Expression in einem xenogenen Wirtsorganismus sowie die grundlegende Charakterisierung der hergestellten Enzyme. Die

daran anschließende Bioprozessentwicklung umfasst vor allem verfahrenstechnische Arbeiten zur Optimierung der rekombinanten Enzymproduktion, zur Aufskalierung, zur Isolierung und Aufreinigung der Enzyme sowie deren Einsatz für die eigentlich angestrebte Naturstoffsynthese und die Aufreinigung der so erzeugten Produkte.

Als Produktionsorganismen für die Enzymproduktion bieten sich Mikroorganismen wie Bakterien oder Hefen an, die schnell wachsen und in Submerskultur kontrolliert in geschlossenen Reaktorsystemen kultiviert werden können. Die darauffolgende Naturstoffproduktion kann dann entweder als Enzymkatalyse auf Basis isolierter Biokatalysatoren erfolgen, oder als Ganzzellbiokatalyse unter Verwendung intakter Mikroorganismen. Letzteres bringt oft Vorteile mit sich, z.B. wenn cofaktor-abhängige Reaktionen ablaufen, da Cofaktor-Regenerationssysteme einfach mit in die Produktionszelllinie integriert werden können oder wenn Enzymkaskaden ablaufen, da die sequentiell arbeitenden Enzyme in den Zellen räumlich stabilisiert werden können. Nachteilig kann hingegen eine Produktanreicherung in den Zellen wirken, wenn Sekretionssysteme für die Produkte fehlen, so dass es zu cytotoxischen Anreicherungen kommen kann.

Die etablierten Produktionsverfahren für Naturstoffe auf Basis der synthetischen Biotechnologie sind in der Lage eine nachhaltige Produktion unter definierten Bedingungen zu ermöglichen, die dezentral vor Ort erfolgen kann und Unabhängigkeit von den am Markt verfügbaren Kapazitäten gewährleistet. Die Nutzung der synthetischen Biotechnologie zur Herstellung komplexer Naturstoffe ist Thema dieser Arbeit. Ihre grundlegenden Aspekte sollen im Folgenden eingehend beschrieben werden.

Zunächst sollen an ausgewählten Beispielen aus der Naturstoffklasse der Sesquiterpene die Arbeiten zur synthetischen Biologie beschrieben werden, die dazu dienen, diese Naturstoffe überhaupt biotechnologisch darstellbar zu machen. Hierzu gehört neben der Expression der beteiligten Schlüsselenzyme, der Sesquiterpensynthesen, in *Escherichia coli*, die eingehende mechanistische und kinetische Charakterisierung sowie die Untersuchung von Möglichkeiten für den prozesstechnischen Einsatz, z.B. auch unter Verwendung nicht-natürlicher Substrate, ganzzellkatalytischer Ansätze oder sogar durch Kombination mit Verfahren der organischen Synthese.

Der auf den Ergebnissen der synthetischen Biologie aufbauende Bereich der Bioprozessentwicklung ist das zweite wesentliche Arbeitsfeld der synthetischen Biotechnologie. Dieses soll im folgenden Abschnitt eingehend behandelt werden. Denn die Fragilität der an den Umsetzungen beteiligten pflanzlichen Enzyme stellt neue Herausforderungen an die Technologien, die für die Bioprozessentwicklung eingesetzt werden. Schon im Bereich der Anzucht der rekombinanten Mikroorganismen, die die relevanten Enzyme exprimieren, können neue analytische online-Methoden helfen, einerseits Zellwachstum und aktive Enzymexpression zu überwachen und andererseits die Übertragung der Verfahren in größere Maßstäbe zu verbessern. Auch geeignete Aktorikelemente und maßgeschneiderte Labormaterialien können dabei helfen, diese Skalierbarkeit zu optimieren, z.B. in dem sie die Abbildung von Produktionsstrategien wie Fütterungs- oder Statierungsverfahren schon im Labormaßstab ermöglichen.

Aber auch die Aufarbeitung der Enzyme ist entsprechend aufwändig. Denn die herkömmlichen Aufarbeitungstechniken sind oft ungeeignet, da sie die Enzymaktivität zu stark beeinträchtigen. Verschiedene innovative Aufarbeitungstechniken zur schonenden Isolierung und Aufreinigung von Enzymen z.B. mittels Membranchromatographie oder wässriger Zweiphasenextraktion werden daher eingehend untersucht und auf ihre Eignung getestet.

Abschließend sollen anhand eines erfolgreich entwickelten Prozessbeispiels noch einmal die gesamten Arbeiten zum Einsatz der synthetischen Biotechnologie aufgezeigt und kritisch diskutiert werden. Hierbei wird zunächst ein klassischer biotechnologischer Ansatz verfolgt, der aber aufgrund verschiedener Limitierungen nicht ökonomisch umsetzbar ist und daher gegen einen synthetisch-biotechnologischen Produktionsansatz ersetzt wird. Das dargestellte Verfahren beinhaltet die Biokonversion von Flavonoiden, hier die Umsetzung von Naringenin zu Phloretin, und stellt somit ein Anwendungsbeispiel aus der großen Naturstoffklasse der Polyphenole dar. Für den Prozess wird mittels synthetischer Biologie eine Enzymkaskade aus einem Fäkalbakterium genutzt, um mit dem Produktionsorganismus *E. coli* ganzzellkatalytisch das gewünschte Flavonoid zu synthetisieren. Das Verfahren wurde bioprozesstechnisch bis zur Wirtschaftlichkeitsgrenze optimiert und entwickelt, patentrechtlich geschützt und in die industrielle Anwendung übertragen. Es belegt die Chancen, die die synthetische Biotechnologie für eine moderne Naturstoffproduktion bietet, zeigt aber ebenso noch einmal die Herausforderungen auf, die mit einer ökonomischen Nutzung verbunden sind.

2. Synthetische Biologie zur Nutzung pflanzlicher Sesquiterpensynthesen

Das erste große Arbeitsfeld der synthetischen Biotechnologie ist die synthetische Biologie, deren Ziel es ist, natürliche Biosynthesewege rekombinant in geeigneten Produktionsorganismen abzubilden und so eine verlässliche, steuerbare Produktion zu ermöglichen. Hierfür müssen mit molekularbiologischen Methoden die für die beteiligten Enzyme codierenden Gene in den Ursprungsorganismen identifiziert, isoliert, kloniert und funktional in den Produktionsorganismen exprimiert werden. Darüber hinaus sind eine grundlegende Charakterisierung der beteiligten Enzyme und eine Optimierung der Enzymproduktion nötig, bevor sie für die eigentlich angestrebten bioprozesstechnischen Anwendungen eingesetzt werden können.

2.1 Terpene

Die mit der synthetischen Biologie verbundenen Arbeiten sollen exemplarisch zunächst am Beispiel der Terpensynthese behandelt werden. Diese größte und strukturvariabelste Stoffklasse von Sekundärmetaboliten umfasst nach derzeitigem Kenntnisstand weit über 55.000 Verbindungen und kommt ubiquitär in mehrzelligen Organismen, vor allem aber in Pflanzen vor, in denen sie oft als duftgebende Bestandteile der ätherischen Öle zu finden sind [1-3]. Die wirtschaftliche Gewinnung beruht bis heute vor allem auf der Ausbeutung der pflanzlichen Ressourcen, was aufgrund der starken Nachfrage immer öfter auch zu einer Übernutzung führt, so dass alternative Produktionswege dringend benötigt werden.

Das der Isoprenregel folgende Strukturprinzip der Terpene führt zur Unterscheidung der Hemi- (C₅), Mono- (C₁₀), Sesqui- (C₁₅), Di- (C₂₀), Sester- (C₂₅), Tri- (C₃₀), Tetra- (C₄₀) und Polyterpene (>C₄₀), die auf der variierenden Anzahl von strukturbildenden Isopreneinheiten (C₅, 2-Methyl-buta-1,3-dien) beruhen [4]. Von großem Interesse sind vor allem die Sesquiterpene, da sie neben der breiten wirtschaftlichen Nutzung als Duft- und Aromastoffe auch einen einfachen Zugang zu komplexen Strukturmotiven eröffnen, die nur schwer durch organische Synthese darstellbar sind und z.B. pharmakologischen Nutzen versprechen [5-7].

2.2 Sesquiterpenbiosynthese

Die Sesquiterpenbiosynthese erfolgt *in vivo* aus dem universellen Substrat E,E-Farnesyldiphosphat (FPP), das durch zwei alternative Stoffwechselwege, den Mevalonatweg (MVA) und den Methylerythritolphosphatweg (MEP) aus einfachen Grundbausteinen wie Acetyl-CoA bzw. Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat synthetisiert werden kann [8-10]. Nachfolgend wird das FPP dann durch eine hochkomplex dirigierte Reaktionskaskade, die durch die jeweilige Sesquiterpensynthase (STS) katalysiert wird, weiter umgesetzt (s. Abb. 1).

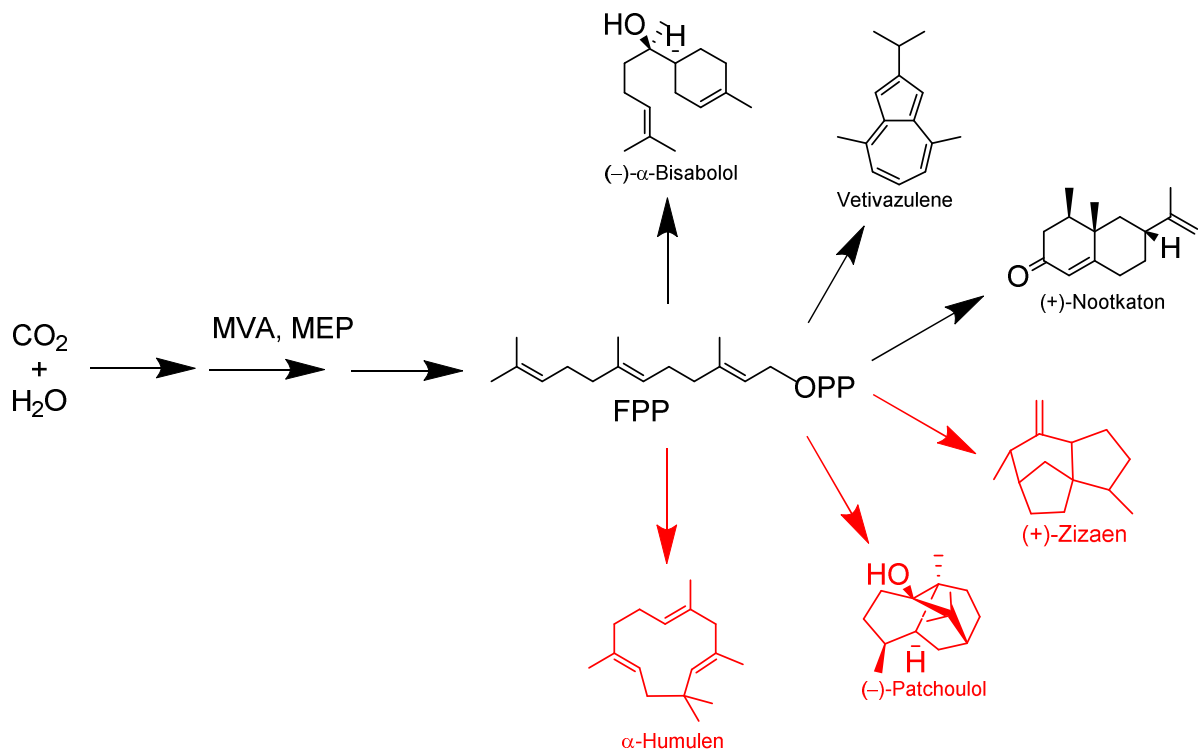


Abb. 1: Allgemeines Schema der Biosynthese von Sesquiterpenen. Das Schlüsselsubstrat E,E-Farnesyldiphosphat wird durch die Sesquiterpensynthesen in verschiedene Sesquiterpene umgesetzt, einige beispielhafte Sesquiterpene dargestellt (in rot unterlegt die in der vorliegenden Arbeit behandelten).

Die bisher circa 70 beschriebenen STS sind vom Cofaktor Mg^{2+} abhängig, von dem im aktiven Zentrum 3 Kationen im konservierten, sogenannten DDXD-Motiv von Aspartat komplexiert werden (auch mit Mn^{2+} konnte teilweise Aktivität nachgewiesen werden) [11]. Dieser Cofaktor ist immanent für die die Reaktionskaskade einleitende Bildung des Farnesylykations, bei der sich die Pyrophosphatgruppe des FPP an das Mg^{2+} koordiniert und abstrahiert wird [12]. Das Farnesylykation unterläuft daraufhin eine Cyclisierung und je nach STS weitere Hydridshifts, Wagner-Meerwein-Umlagerungen, De- und Reprotonierungen und andere

Reaktionen, die zu einer großen Zahl an möglichen Strukturvarianten führen [13]. STS können hierbei äußerst präzise regio- und stereospezifische Reaktionen durchführen, sind aber trotzdem durchaus variabel. So produzieren viele STS gezielt ein einzelnes Molekül beziehungsweise Enantiomer, andere sind hingegen äußerst promiskuitiv und produzieren ein ganzes Spektrum verschiedener Produkte [14].

2.3 Auswahl von Sesquiterpensynthesen für die synthetische Biotechnologie

Um die Machbarkeit eines synthetischen Biotechnologieansatzes für die Produktion von Sesquiterpenen zu testen und die Vielfältigkeit der herstellbaren Sesquiterpene zu untersuchen, wurden im Rahmen des EU-geförderten Vorhabens „EFRE-Innovationsfonds - Veredelung pflanzlicher Rohstoffe“ insgesamt drei Sesquiterpensynthesen ausgewählt, die aufgrund ihrer nachfolgend beschriebenen, individuellen Charakteristika für eine wissenschaftliche Betrachtung besonders interessant sind. An diesen sollen die grundlegend wichtigen Arbeiten zur Charakterisierung und Nutzbarmachung dieser Enzyme beschrieben werden. Die drei ausgewählten Sesquiterpensynthesen sind:

1. Die Patchoulolsynthase (PTS) synthetisiert das bekannte aromatische ätherische Öl aus *Pogostemon cablin* (indischer Patschuli) [15]. Sie ist in der Lage aus dem FPP ein komplexes Gemisch aus über 24 Sesquiterpenen herzustellen, so dass sie sich durch eine hohe Produktvariabilität auszeichnet [16]. Sie ist darüber hinaus eine der wenigen Vertreter der STS, die selbst die finale Hydroxylierung zum Hauptprodukt (ca. 40%), dem (-)-Patchoulol, vornimmt [17] (siehe Kapitel 2.3.1 – 2.3.5).
2. Die α -Humulensynthase (HUM) aus *Zingiber zerumbet* (Shampooingwer) synthetisiert aus dem FPP das α -Humulen, es produziert nur geringe Mengen des Nebenproduktes β -Caryophyllen (5%) [18]. α -Humulen stellt einen wichtigen Precursor für die Produktion des Krebsmedikamentes Zerumbon dar, das aus ihm durch doppelte Oxidation und Bildung einer Ketogruppe am C8 dargestellt werden kann. Diese Folgereaktion wird *in planta* durch Cytochrom P450 Monooxygenasen (CYP450) katalysiert [19, 20] (siehe Kapitel 2.3.6 – 2.3.7).
3. Die Zizaensynthase (ZIZ) aus *Chrysopogon zizanioides* (Vetivergras) katalysiert die Produktion des (+)-Zizaens, eines wichtigen Intermediates der duftgebenden

2. Synthetische Biologie zur Nutzung pflanzlicher Sesquiterpensynthesen

Bestandteile des Vetiveröls, eine der wertvollsten hölzernen Basisnoten in der Parfümerie [6]. Es werden nur geringe Mengen an Nebenprodukten gebildet (9,3%). Durch Oxidation mit CYP450 gehen aus dem selbst geruchlosen (+)-Zizaen sukzessive das Khusimol (ca. 10% Anteil im Vetiveröl), das Zizanal und die Zizanoesäure hervor [21] (siehe Kapitel 2.3.8 – 2.3.10).

Um eine eingehende Charakterisierung der ausgewählten Sesquiterpensynthesen zu ermöglichen, ist es unerlässlich, das entsprechende Enzym allein in einem Wirtsorganismus zu exprimieren, es aufzureinigen und mit diesem Umsetzungen des Schlüsselsubstrates FPP zu untersuchen, da nur so spezifische Daten zu Kinetik oder Produktspektrum ermittelt werden können.

Für die Herstellung von FPP wurde aufgrund des hohen Marktpreises für FPP eine modifizierte Keller-Synthese [22] etabliert, bei der Farnesol mit Triethylammoniumphosphat (TEAP) in Trichloracetonitril phosphoryliert wird (s. Abb. 2).

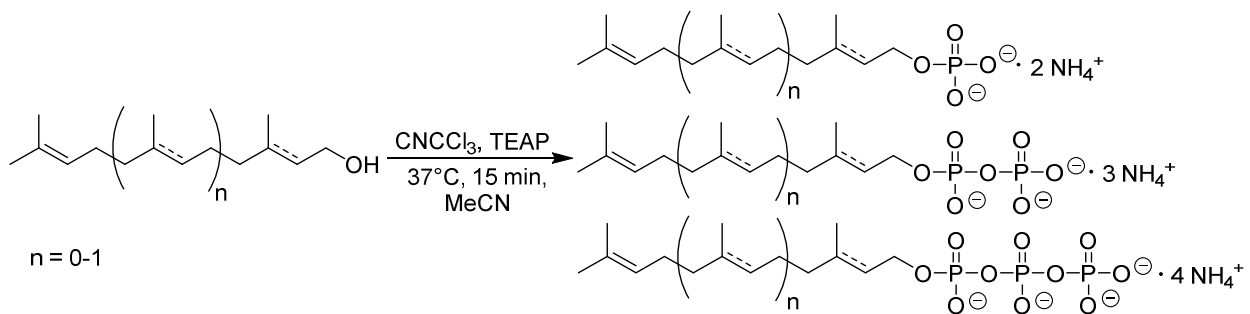


Abb. 2: Prenylphosphatsynthese nach Keller et al., 1993

Durch die folgende chromatographische Aufreinigung über eine Kieselgelsäule zur Abtrennung von Mono- und Triphosphaten kann das Farnesyldiphosphat auf diese Weise mit einer Ausbeute von $Y_{P/S} = 15\%$ hergestellt werden. Das Verfahren konnte erfolgreich bis in den g-Maßstab aufskaliert werden [23].

2.3.1 Molekularbiologische Arbeiten zur Produktion der Patchoulolsynthase

Die Patchoulolsynthase (PTS, E.C. 4.2.3.70: (2E,6E)-Farnesyldiphosphat-diphosphatlyase) besteht aus 552 Aminosäuren (64,2 kDa) codiert in 1.656 Basenpaaren. Zur funktionalen Expression wurde die mRNA aus einer Patchulipflanze isoliert und über reverse Transkription mittels oligo(dT)-Primern hieraus eine komplementäre cDNA-Bibliothek erstellt. Mit Primern, die aus einer beschriebenen (-)-Patchoulolsynthasesequenz (GenBank AY508730) [24] abgeleitet wurden, konnte so ein >1.600bp langer Sequenzabschnitt identifiziert und mittels PCR amplifiziert werden. Die folgende Sequenzierung mittels cycle-sequencing ergab, dass das amplifizierte DNA-Fragment ein offenes Leseraster (ORF, open reading frame) von 1.656bp hat. Dies codiert ein Protein mit 552 Aminosäuren. Ein Alignment mit der bekannten PTS-Sequenz ergab eine 96,6%ige Übereinstimmung, was bei 26 stillen Mutationen insgesamt 19 Aminosäureaustauschen entspricht. Hierbei wurden keine Austausche im STS-typischen, konservierten Mg-bindenden DDXXD-Motiv gefunden, jedoch die Austausche H454C und K458N im sogenannten NSE/DTE-Motiv, welches dem DDXXD-Motiv gegenüberliegt und für das eine Beteiligung im aktiven Zentrum vermutet wird. Diese könnten zu einer Beeinflussung der Enzymaktivität bzw. dem Produktspektrum führen. Solche Aminosäureaustausche können resultieren, wenn nicht dieselbe Kulturpflanzensorte verwendet wird. So kann sich das produzierte Enzym geringfügig von der schon beschriebenen PTS unterscheiden. In diesem Fall wurde somit ein PTS-Isoenzym (PTSi) gefunden, dass daher auch in der GenBank veröffentlicht wurde.

Enzymdatenbankeintrag 1:

S. Hartwig, T. Frister, S. Alemdar, Z. Li, U. Krings, R.G. Berger, T. Scheper, S. Beutel, Pogostemon cablin patchoulol synthase variant mRNA, complete cds, NCBI, GenBank Acc. No. KF983531, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/589912511> (2014)

2.3.2 Expression der PTSi im Produktionsorganismus

Die PTSi-Sequenz wurde für die Expression in *E.coli* K12 codon-optimiert, was zu einer Verbesserung des Codon-Adaptionsindex (CAI) von 0,299 auf 0,746 führte [25, 26]. Diese

verbesserte Sequenz wurde zunächst in einen pET17b-Vektor eingefügt, was aber zu keiner stabilen Expression führte und die PTSi nur in Form unlöslicher Proteinaggregate produzierte (inclusion bodies) [27]. Lösliche PTSi konnte erfolgreich unter Verwendung eines pET16b-Vektors produziert werden, der einen N-terminalen His-tag (6xHis) für die nachfolgende Enzymaufreinigung durch Immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) inkludiert und durch die Kontrolle des T7-Promotors eine Induktion mit IPTG ermöglicht, so dass Wachstum und Proteinproduktion entkoppelt werden können [28, 29]. Darüber hinaus wurde eine Fusion mit einem Thioredoxin-Rest (TRX, 109 AS, 11,7 kDa) getestet, welcher als Löslichkeitsvermittler dient [30]. Die erhaltenen Vektoren wurden in verschiedene *E.coli* Stämme kloniert und in TB-Medium (terrific broth) kultiviert. Hierbei zeichnete sich vor allem der *E.coli* BL21(DE3) durch ein wesentlich besseres Wachstumsverhalten bei kaum geringerer löslicher Proteinproduktion gegenüber alternativ getesteten Stämmen, wie *E.coli* Tuner, *E.coli* Rosetta2 u.a. aus [31-33]. Die erstellten Produktionsstämme *E.coli* BL21(DE3) pET16b::PTSi(co) und *E.coli* BL21(DE3) pET32b::PTSi lieferten unter optimierten Kultivierungsbedingungen (TB-Medium, 20°C, 0,5mM IPTG) 45mg lösliche His-PTSi bzw. 52mg lösliche TRX-His-PTSi je g Biotrockenmasse.

Zur Aufreinigung der löslich produzierten PTSi wurde der integrierte His-tag genutzt, indem mit dem Überstand des Zellysates nach Zentrifugation eine IMAC-Aufreinigung (Membranadsorber IDA75, Iminodiacetat-funktionalisiert) dekoriert mit Co^{2+} -Ionen durchgeführt wurde. Die Elution der rekombinanten Zielproteine wurde mit 500mM Imidazol erreicht. Alle erzeugten PTSi-Varianten konnten so mit einer Reinheit von >90% aufgereinigt werden, auch der interne His-tag im TRX-His-PTSi konnte effektiv gebunden und eluiert werden, wie SDS-PAGE und Western blots mit anti-His Antikörpern bestätigten.

Aktivitätstests der PTSi-Varianten konnten in wässriger Lösung in Gegenwart von 15mM MgCl_2 und dem natürlichen Substrat E,E-FPP erfolgreich durchgeführt werden. Die Extraktion der Produkte erfolgte durch Ausschütteln nach Überschichtung mit Hexamethyldisiloxan. GC-FID- (Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor) und korrespondierende GC-MS-Untersuchungen (Massenspektrometrie) bestätigten die Ähnlichkeit des Produktspektrums der produzierten Sesquiterpene mit kommerziellem Patchouliöl, es zeigten sich aber auch deutliche Abweichungen. So wurden vier identische Produkte gefunden, (-)-Patchoulol, α -Bulnesen, Patchoulene und α -Guaien, darüber hinaus konnten aber auch

2. Synthetische Biologie zur Nutzung pflanzlicher Sesquiterpensynthesen

weitere Sesquiterpene wie das Germacren A identifiziert werden, das im kommerziellen Öl aufgrund bekannter Folgereaktionen (z.B. Cope-Umlagerung zum β -Elemen) nicht nachweisbar ist (s. Abb. 3).

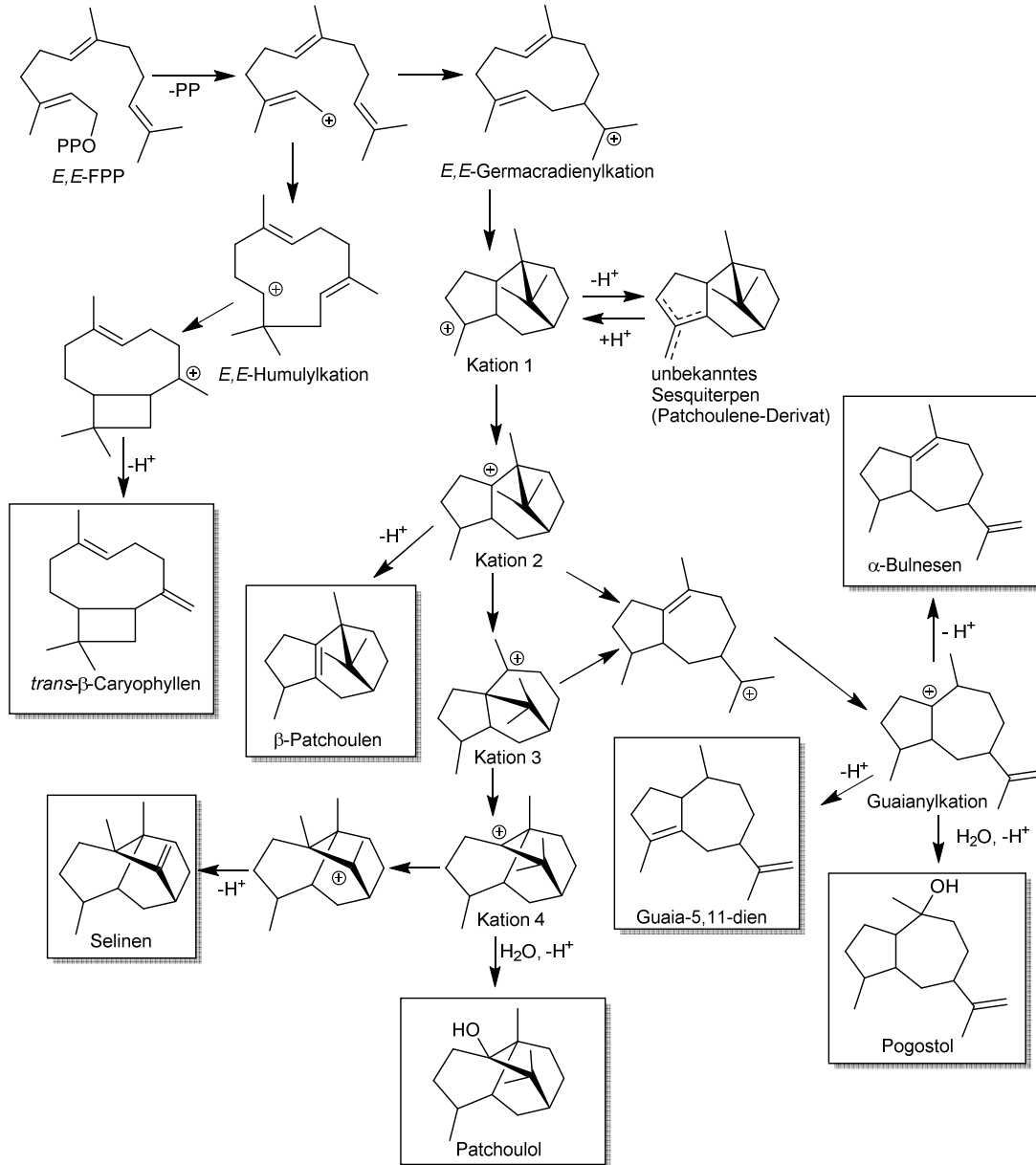


Abb. 3: Reaktionsmechanismus der PTSi bei Umsetzung von *E,E*-FPP zu einigen ausgewählten Sesquiterpenen des Patchouliöls

Darüber hinaus wurden mit Nerolidol und Farnesol zwei acyclische Produkte gebildet, was ein Zeichen für eine hohe Fehlerrate des Enzyms ist, da diese Produkte nur entstehen, wenn der Eintritt des Carbokations nach Abspaltung der Pyrophosphatgruppe ins aktive Zentrum nicht erfolgt und ein direktes Abfangen durch Wasser folgt. Verschiedene weitere Produkte

der Reaktion konnten aufgrund der niedrigen Konzentrationen hier noch nicht identifiziert werden.

Die Veränderung des Produktspektrums der rekombinant produzierten PTSi könnte v.a. den Aminosäureaustauschen im NSE/DTE-Motiv geschuldet sein, dessen Beteiligung als zweite Bindungsstelle im aktiven Zentrum diskutiert wird. Unter Berücksichtigung des zu pI 5,2 bestimmten isoelektrischen Punktes der PTSi könnte die durch die Austausch H454C (Histidin gegen Cystein) und v.a. K458N (Lysin gegen Aspartat) erhöhte Elektronendichte bei eingestellten pH 7,5 eine Stabilisierung des Carbokations auf der Stufe des cyclischen E,E-Germacradienylkations und des bicyclischen Guainylkations bewirken und so die Produktion von Germacren A und bicyclischen Produkten wie α -Guaien und α -Bulnesen begünstigen.

Publikation 1:

S. Hartwig; T. Frister; S. Alemdar; Z. Li, U. Krings, R.G. Berger, T. Scheper, S. Beutel, Expression, purification and activity assay of a patchoulol synthase cDNA variant fused to thioredoxin in *Escherichia coli*, Protein Expression and Purification (2014), 97C, 61-71

2.3.3 Charakterisierung des Reaktionsverhaltens der PTSi

In weiterführenden Untersuchungen wurde neben der Aufskalierung der PTSi-Produktion vom Schüttelkolben in den 2L-Maßstab eine eingehende Untersuchung der optimalen Katalysebedingungen, der kinetischen Daten sowie des Produkt- und Substratspektrums durchgeführt.

Für die Bestimmung der optimalen Temperatur- und pH-Bedingungen der enzymatischen Reaktion wurde ein Assay auf Basis von O`Maille et al., 2004 [34] etabliert, bei dem die Reaktionsmischung mit iso-Oktan zur Produktextraktion überschichtet wurde. Dies weist einen guten Verteilungskoeffizienten log P für Sesquiterpene auf bei gleichzeitig geringem Dampfdruck (log P Patchoulol = 4,484, log P α -Bulnesen = 6,63). Mithilfe dieses Assays konnten globale Maxima für T und pH bei 38°C respektive pH 7,25 gefunden werden. Unter optimalen Bedingungen wurden dann die kinetischen Daten ermittelt, wobei sich auf

Grundlage des Michaelis-Menten-Modells eine unkompetitive Substratinhibierung zeigte, die die Reaktionsgeschwindigkeit bei hohen Substratkonzentrationen stark herabsetzte. Diese würde die Bildung eines inaktiven Enzym-Substrat-Substratkomplexes bedeuten, dessen Stabilität von seiner Dissoziationskonstante K_i abhängen würde. Dieser Befund stimmt mit der von Faraldos et al., 2010 [35] gefundenen doppelten Deuterierung von Sesquiterpenen durch die PTS bei Einsatz einfach deuterierten FPPs überein, aus der er auf das Vorhandensein eines zweiten Substratmoleküls im aktiven Zentrum schloss, dass ein Deuteron zur Verfügung stellt. Diese zusätzliche Tasche wäre einzigartig unter den bisher beschriebenen Sesquiterpensynthasen und würde für ein großes aktives Zentrum sprechen, indem mehrere Substratmoleküle Platz fänden.

Als kinetische Parameter der rekombinanten PTSi konnte eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von $v_{\max}=6,93\pm 1,33 \mu\text{M}/\text{min}$, eine Michaelis-Konstante von $K_M=8,0\pm 6,5 \mu\text{M}$ sowie eine Wechselzahl von $k_{\text{cat}}=0,072 \text{ s}^{-1}$ bestimmt werden. Hieraus ergibt sich eine Spezifitätskonstante von $k_{\text{cat}}/K_M=9\cdot 10^3 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ und letztlich eine spezifische Enzymaktivität von 1,92 U/mg. Die katalytische Effizienz, repräsentiert durch die Spezifitätskonstante, ist damit niedrig (ca. zwei Zehnerpotenzen unter dem Durchschnitt), aber noch in einem für Enzyme des sekundären Metabolismus typischen Bereich ($10^3\text{-}10^7 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$), wobei die Affinität zum Substrat, repräsentiert durch K_M , im Vergleich (Durchschnitt $\sim 10^2 \mu\text{M}$) außerordentlich hoch ist, und so die im Vergleich (Durchschnitt $\sim 10 \text{ s}^{-1}$) äußerst niedrige katalytische Konstante, dargestellt durch K_{cat} , kompensiert [36-38]. Auch dies deutet auf die Möglichkeit einer starken unkompetitiven Substratinhibierung hin. Zwar erreichen viele Substratmoleküle das aktive Zentrum, aber letztlich werden nur wenige in Produktmoleküle umgesetzt, da die sich zwangsläufig bildenden Enzym-Substrat-Substratkomplexe nur langsam wieder dissoziieren [39]. Im Vergleich zu Literaturdaten [14, 40] fällt eine leicht geringere Affinität der PTSi zum Substrat FPP auf, was an den Mutationen der PTSi liegen kann, während gleichzeitig Wechselzahl und spezifische Aktivität erhöht sind, was vermutlich auf die nicht optimalen Aufreinigungsstrategien dieser Autoren zurückzuführen ist [41].

Die Optimierung der GC-FID- und GC-MS-Methoden sowie der Abgleich mit Datenbank-spektren (Wiley08/NIST08, 2008) und eine Normierung der Retentionszeiten über die Kovats-Indizes ermöglichte die genauere Identifikation der Hauptprodukte der Umsetzung und zeigte, dass neben dem bevorzugten initialen 1,10-Ringschluss des Farnesylikations zum

Germacradienylkation zu geringen Teilen (ca. 5%) auch ein 1,11-Ringschluss zum Humulylkation stattfindet, der letztlich zum β -Caryophyllen führt und somit Substrat der gewünschten Produktbildungsroute zum (-)-Patchoulol entzieht. Ein kleiner Teil der Carbokationen nach initialem 1,10-Ringschluss zum Germacradienylkation und weiteren Ringschlüssen zu einem tricyclischen Patchoulenylkation wird direkt deprotoniert und führt so zur Gruppe der Patchoulene, die sich nur durch die Position einer Doppelbindung unterscheiden (ca. 2-5%). Der Rest der Substratmoleküle (90-93%) kann nun in zwei alternative Routen einmünden, beide getrieben von der hohen Spannung des tricyclischen Carbokations und dessen Bestreben eine energetisch günstigere Konformation einzunehmen. Dies wird dadurch erreicht, dass die Reaktion entweder unter Öffnung der C1-Verbrückung zum Guaianylkation weiterläuft, was letztlich zu den bicyclischen Produkten α -Bulnesen, α -Guaien und Guaia-5,11-dien führt, oder die hohe Ringspannung des Fünfrings wird durch eine Wagner-Meerwein-Umlagerung herabgesetzt, so dass das Patchoulyl-Kation resultiert, welches dann relativ schnell durch Wasser abgefangen und zum (-)-Patchoulol hydroxyliert wird. Die Bevorzugung der „bicyclischen Katalyseroute“ konnte für die PTSi im Vergleich zur pflanzlichen PTS festgestellt werden, wobei sich ein kumulierter Anteil der entsprechenden bicyclischen Produkte von 40-60% gegenüber ca. 25-40% (-)-Patchoulol zeigte. Die schon zuvor vermutete Stabilisierung des Guaianylkations durch die Austausch H454C (Histidin gegen Cystein) und vor allem K458N (Lysin gegen Asparagin) wird hier noch einmal bestätigt, und auch das ebenfalls untersuchte Produktverhältnis in Abhängigkeit von pH und T spricht für die These. So erhöht sich der Anteil bicyclischer Produkte mit steigendem pH und T (bis pH 8,5 und 44°C untersucht) weiter bis zu circa 65%, während sich der (-)-Patchoulol-Anteil gleichzeitig auf bis zu 10% reduziert. Der steigende pH stabilisiert somit das Guaianylkation, wobei letztlich nicht geklärt werden kann, ob dies aufgrund des Raumgewinns beim Übergang von der Imidazol- zur Thiol-Seitengruppe (H454C) oder aufgrund der verringerten Basizität (H454C und K458N) erfolgt. Für eine Maximierung der (-)-Patchoulolproduktion hingegen empfehlen sich niedrige Umsetzungstemperaturen von 30-36°C bei optimalem pH 7,25; so kann bis zu 35-40% (-)-Patchoulol-Anteil erreicht werden, während sich der Anteil der bicyclischen Produkte auf circa 40% reduziert.

Da die bisherigen Untersuchungen auf ein großes aktives Zentrum hindeuten, in dem vielfältige Reaktionsmöglichkeiten bestehen und in dem sogar mehrere Substratmoleküle Platz finden, wurden weitere Untersuchungen mit alternativen Substraten durchgeführt, da

2. Synthetische Biologie zur Nutzung pflanzlicher Sesquiterpensynthesen

nur geringe sterische Hinderungen zu erwarten sind. So wurden Umsetzungen sowohl mit den E,Z- und Z,E-Isomeren des FPP durchgeführt, als auch mit kleineren (Nerylidiphosphat (NPP) und Geranylidiphosphat (GPP)) und größeren (Geranylgeranylidiphosphat (GGPP)) Substraten.

Bei Umsetzung des 2Z,6E-FPP wurde eine Fülle von 13 verschiedenen Produkten identifiziert, mit den Hauptprodukten α -Gurjunen (26,2%), γ -Gurjunen (24,5%), Germacren B (19%), Ylangen (6%) und dem einfachen Dephosphorylierungsprodukt 2Z,6E-Farnesol (5,6%), wobei kein einziges der bekannten PTi-Produkte gebildet wurde. Bei Umsetzung des 6Z,2E-FPP wurden hingegen insgesamt nur 4 Produkte gefunden, wovon das einfache Dephosphorylierungsprodukt 2E,6Z-Farnesol mit 4,9% eines war. Das bekannte γ -Elemen wurde zu nur 3,1% gebildet, während zwei unbekannte Sesquiterpene mit 52,2% respektive 39,9% die Hauptprodukte waren.

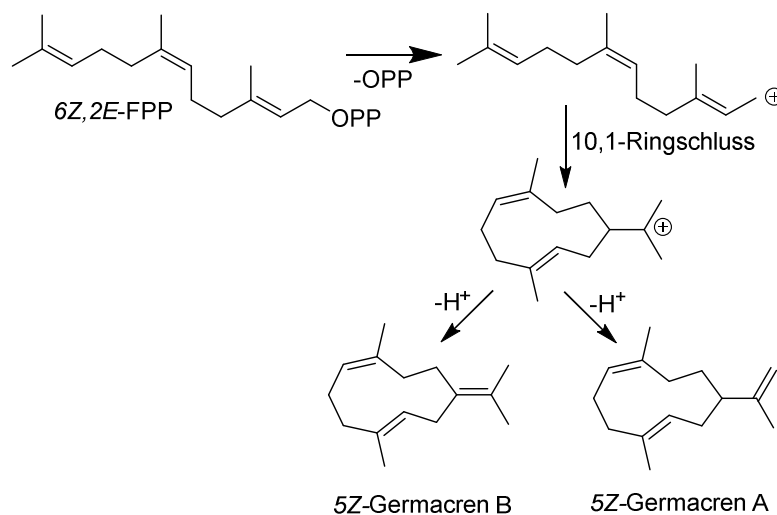


Abb. 4: Postulierte Reaktionsprodukte der PTi bei Umsetzung mit 6Z,2E-FPP

Diese könnten unter Berücksichtigung der massenspektrometrischen Fragmentierung und des in Abb. 4 dargestellten Reaktionsmechanismus 5Z-Germacren A bzw. 5Z-Germacren B sein, da hier beim 1,10-Ringschluss die Z-konfigurierte Doppelbindung im resultierenden Germacradienylkation erhalten bleibt, was eine einfache Deprotonierung begünstigen könnte [42-49].

Während die Umsetzung mit C₂₀-Substrat (GGPP) keine Produkte liefert, konnten mit C₁₀-Substraten (NPP, GPP) eine Vielzahl an Monoterpenen erzeugt werden. Während das GPP zu

fast 60% zu acyclischen Produkten wie Geraniol und β -Myrcen führte, war dies beim NPP nur zu cirka 9% der Fall. Die weiteren Produkte folgten alle aus dem in der Monoterpensynthese zentralen intermediären Nerylkation, das durch einen 1,6-Ringschluss in das Terpinylkation übergeht. Dieses wiederum kann Wasser addieren, was zum α -Terpinol führt (Produktanteil 22,5% (GPP) respektive 32,6% (NPP)), es kann deprotoniert werden, was zu Limonen (Produktanteil 17,2% (GPP) respektive 39,3% (NPP)) beziehungsweise α -Terpinolen (Produktanteil 0 % (GPP) resp. 10,3% (NPP)) führt oder durch weitere Umlagerungen und Ringschlüsse abreagieren, wie im Falle des Sabinen (Produktanteil 1,5% (GPP) respektive 3,4% (NPP)). Bemerkenswert ist auch die hier ebenfalls nachweisbare finale Hydroxylierung von Produkten in der Reaktionskaskade (z.B. α -Terpinol), was eine Gegenwart von Wasser im aktiven Zentrum nahelegt und wiederum die These des weiten, offenen aktiven Zentrums untermauert [50-56].

Publikation 2:

T. Frister, S. Hartwig, S. Alemdar, K. Schnatz, L. Thöns, T. Scheper, S. Beutel: Characterisation of a Recombinant Patchoulol Synthase Variant for Biocatalytic Production of Terpenes. Applied Biochemistry and Biotechnology, DOI 10.1007/s12010-015-1707-y (2015)

2.3.4 Weiterführende Arbeiten zur Charakterisierung der PTSi

Die dargestellten Untersuchungen stellen die Basis für weitere, noch nicht veröffentlichte Arbeiten dar, die sich unter anderem mit der Umsetzung in deuteriertem Wasser (D_2O) befassen, um die Beteiligung des Umgebungswassers an der ablaufenden Reaktionskaskade zu identifizieren. Die Umsetzung in D_2O zeigte ein unerwartetes Deuterierungsmuster im ^{13}C -NMR. Während β -Caryophyllen, das einzige Produkt des 1,11-Ringschlusses nicht deuteriert wurde, wurden alle Produkte, die aus dem 1,10-Ringschluss resultierten, ein- bis zweifach deuteriert, das (-)-Patchoulol zum Teil sogar dreifach (s. Abb. 5) [57].

2. Synthetische Biologie zur Nutzung pflanzlicher Sesquiterpensynthesen

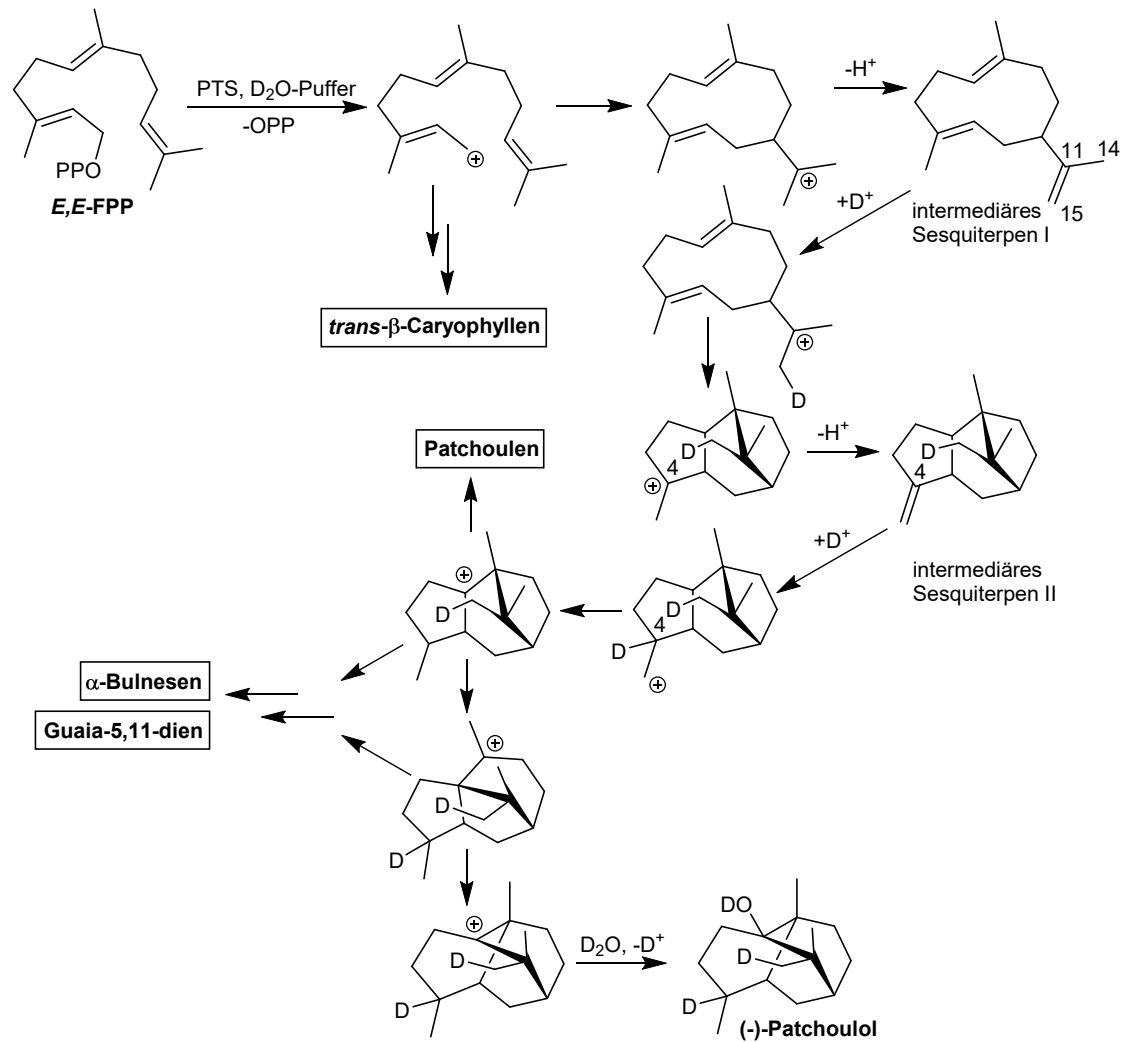


Abb. 5: Postulierter Reaktionsmechanismus für die (-)-Patchoulolbildung der PTSi mit intermediären Sesquiterpenen [57].

Dieser Befund bestätigt einerseits die schon von Faraldos et al., 2010 [35] postulierte Existenz eines intermediären ungeladenen Sesquiterpens (intermediäres Sesquiterpen II Abb. 5), das aus dem tricyclischen Carbokation bei Lokalisation der positiven Ladung am C4 durch Bildung einer Methylengruppe entsteht, die aber auch vom im aktiven Zentrum befindlichen D_2O reprotoniert wird und nicht zwingend von einem weiteren Substratmolekül. Andererseits weist die Doppeldeuterierung der Produkte auf das Vorhandensein eines zweiten ungeladenen, intermediären Sesquiterpens hin, in diesem Fall (+)-Germacren A (intermediäres Sesquiterpen I Abb. 5), dass schon früher in der Reaktionskaskade durch Deprotonierung eines der gleichwertigen, endständigen C14 oder C15 aus dem Germacradienylkation hervorgeht. Dieses kann auch von D_2O reprotoniert

werden, wie schon in den mechanistischen Überlegungen von Deguerrey et al., 2006 [17] erwogen, allerdings nicht am C8, was direkt zum Guaianylikation führen würde, sondern wieder an C14 oder C15, was zu einem deuterierten Germacradienylikation führt. Nur diese De- und Reprotonierungen können die hohe Zahl und Lokalisierung der eingebauten Deuterone erklären, wobei im (-)-Patchoulol letztlich durch das Abfangen mit deuterierten Wasser ein weiteres Deuteron eingebaut wird, was zur partiellen Dreifachdeuterierung führt. Deutlich wird durch diese Untersuchungen, dass zu jedem Zeitpunkt der enzymatischen Reaktion Wasser im aktiven Zentrum anwesend und an den Reaktionsabläufen beteiligt ist.

Weitere Arbeiten befassen sich derzeit mit der Erweiterung des Substratspektrums auf z.B. oxy-funktionalisierte, prenylierte oder phenylierte FPP-Analoga, die wertvolle neue Strukturbausteine für die organische Synthese zugänglich machen könnten und so aufwändige Synthesewege vereinfachen. Alle diese Arbeiten dienen dazu, diese äußerst promiskuitive PTSi detailliert zu charakterisieren, um ihr Potential und ihre wesentlichen Merkmale für eine grundlegende Nutzbarmachung zu ermitteln. Es zeigt sich aber auch eines der grundlegenden Probleme von Enzymen des sekundären Metabolismus: große Variabilität bei schlechter Effektivität. Wie dennoch auf konventionelle Weise, das heißt ohne Einsatz von Enzyme Engineering, eine Strategie zur Nutzung derartiger Enzyme für die Produktion definierter Sesquiterpene entwickelt werden kann, soll am folgenden Beispiel der α -Humulensynthase dargestellt werden.

2.3.5 Molekularbiologische Arbeiten zur Produktion der α -Humulensynthase

Die α -Humulensynthase (HUM, E.C. 4.2.3.104: (2E,6E)-Farnesyldiphosphat-diphosphatlyase) wurde beschrieben als Enzym bestehend aus 548 Aminosäuren (64,5 kDa) codiert in 1.644 Basenpaaren. Zur funktionalen Expression wurde die von Yu et al., 2011 [19] beschriebene cDNA-Sequenz (GenBank-Sequenz: AB247331) zunächst für die Expression in *E. coli* codon-optimiert, so dass der CAI durch 211 Transitionen und 198 Transversionen von 0,488 auf 0,708 erhöht werden konnte [58]. Im Anschluss wurde sie in Form zweier doppelsträngiger DNA-strings synthetisiert (684 bp resp. 1.000 bp), in einen pET16b-Vektor eingefügt und erfolgreich in *E.coli* BL21(DE3) transformiert. Die Kultivierung dieses Produktionsstamms

erfolgte in einem geregelten 2l-Rührkesselreaktor (STR, stirred tank reactor), wobei eine umfangreiche Optimierung hinsichtlich der löslichen HUM-Ausbeute durch die Variation von Medienzusammensetzung, Induktionszeitpunkt und Induktorkonzentration erfolgte. So konnten unter optimalen Bedingungen in einem SB-Medium (super broth) mit dreifach erhöhter Tryptonkonzentration im Vergleich zu TB-Medium, bei Entkopplung der initialen Wachstumsphase bei 37°C von der Enzymproduktionsphase bei verminderten 20°C sowie Induktion bei $OD_{600}=1,0$ mit 0,15 mM IPTG bis zu 156 mg/l HUM (3,35 mg/g Feuchtzellgewicht) produziert werden, wobei allerdings ein optimaler Erntezeitpunkt vor Erschöpfung der Aminosäuren nach circa 9h Produktionsphase beachtet werden sollte. Die produzierte HUM wurde hierbei zu circa 40% in löslicher, aktiver Form produziert. Die Aufreinigung erfolgte nach Zellaufschluss und Zentrifugation mittels IMAC unter Ausnutzung des durch den pET16b-Vektor eingebrachten His-tag, wobei sich die Verwendung von Co^{2+} -dekorierten NTA-Liganden (Nitrilotriessigsäure) am effektivsten hinsichtlich Ausbeute (95%) und Reinheit (63%) erwies. Durch weitere Optimierung der Elutionsbedingungen durch Einsatz eines Imidazol-Stufengradienten konnten zelleigene Proteine, sogenannte host cell Proteine (HCP) bei 50 mM Imidazol fast quantitativ abgetrennt werden, so dass die HUM bei 500 mM Imidazol mit ca. 92% Reinheit eluierte. Die Reinheit konnte auch mit Hilfe eines anti-His-Western blot bestätigt werden. Die produzierte HUM weist einen experimentell durch 2D-Gelelektrophorese mit isoelektrischer Fokussierung ermittelten isoelektrischen Punkt von pI 5,61 auf, was dem theoretischen pI 5,65 sehr nah kommt und dem anderer STS entspricht.

2.3.6 Charakterisierung des Reaktionsverhaltens der HUM

Untersuchungen der katalytischen Aktivität wurden mit der isolierten HUM im Zweiphasensystem mit iso-Octan durchgeführt, die Analyse der Produkte erfolgte mit GC-FID. Es zeigte sich eine 94,5:5,5%-Verteilung von α -Humulen zu β -Caryophyllen, die als einzige Produkte gebildet werden (s. Abb. 6).

2. Synthetische Biologie zur Nutzung pflanzlicher Sesquiterpensynthesen

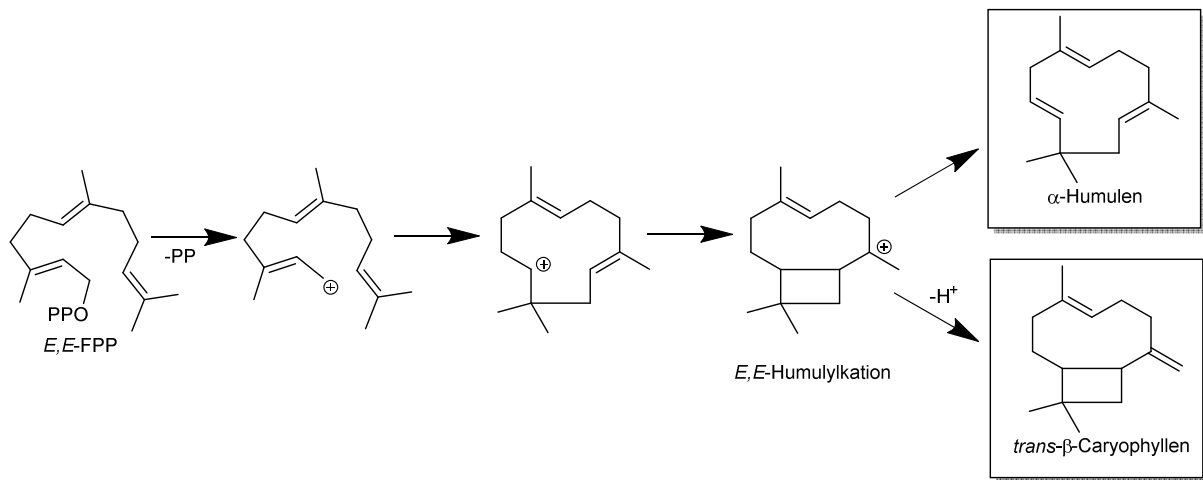


Abb. 6: Reaktionsmechanismus der HUM bei Umsetzung von *E,E*-FPP zu α -Humulenen und β -Caryophyllen

Die optimalen Reaktionsbedingungen wurden zu pH 7,5 und 38°C bestimmt. Unter diesen Bedingungen konnten als kinetische Parameter der rekombinanten HUM eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von $v_{\max}=0,2 \mu\text{M/s}$, eine Michaelis-Konstante von $K_M=32,79 \mu\text{M}$ sowie eine Wechselzahl von $k_{\text{cat}}=3,91 \text{ s}^{-1}$ bestimmt werden. Hieraus ergibt sich eine Spezifitätskonstante von $k_{\text{cat}}/K_M=1,19 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ und letztlich eine spezifische Enzymaktivität von 3,63 U/mg. Die katalytische Effizienz, ist damit in einem für Enzyme des sekundären Metabolismus typischen Bereich ($10^5 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$), wobei die Affinität zum Substrat, repräsentiert durch K_M , im Vergleich (Durchschnitt $\sim 10^2 \mu\text{M}$) etwas größer ist, während die katalytische Konstante, dargestellt durch K_{cat} (Durchschnitt $\sim 10 \text{ s}^{-1}$), geringfügig niedriger liegt [37]. Insbesondere der von Bar-Even et al., 2011 konstatierte Befund, dass Enzyme für Substrate $>350 \text{ g/mol}$ in der Regel hohe Affinitäten von $K_M \sim 40 \mu\text{M}$ zeigen, wird hierdurch eindrucksvoll untermauert. [36]

Die HUM setzt das initial aus FPP gebildete Farnesylkation bei der Reaktion ausschließlich in Richtung des 1,11-Ringschlusses zum Humulylkation um und offenbart so ein gänzlich gegensätzliches Verhalten zur PTS, die den 1,10-Ringschluss bevorzugt. Auf den Ringschluss kann sodann direkt eine Deprotonierung zum α -Humulenen erfolgen oder aber ein weiterer Ringschluss zwischen C2 und C10 mit dann folgender Deprotonierung zum β -Caryophyllen, wobei die einfache Deprotonierung bei weitem überwiegt. Die erzeugte HUM kann somit effektiv und mit hoher Reinheit α -Humulenen herstellen, was selbst ein zentrales Intermediat in der Herstellung des pharmazeutisch unter anderem für die Krebsbehandlung hoch

interessanten Zerumbons ist, das aus ihm durch doppelte Oxidation am C8 zum Keton hervorgeht [59-65].

Publikation 3:

S. Alemdar, S. Hartwig, T. Frister, J.C. König, T. Scheper, S. Beutel: Heterologous Expression, Purification, and Biochemical Characterization of α -Humulene Synthase from *Zingiber zerumbet* Smith. Applied Biochemistry and Biotechnology (2016), 178(3), 474-489, DOI:10.1007/s12010-015-1888-4

2.3.7 Oxidation des α -Humulens zu Zerumbon

Um eine Produktionsstrategie für Zerumbon zu entwickeln, muss zunächst ein ökonomischer Ansatz für die α -Humulen-Herstellung gefunden werden. Hierfür ist die Produktion und Isolierung der HUM mit anschließender Umsetzung von synthetisch hergestelltem FPP nicht sinnvoll, da sie viele ineffektive Verfahrensschritte enthält, die aufeinander aufbauend die Produktion erschweren. Sinnvoller wäre ein größerer synthetischer Biotechnologieansatz mit aktiven lebenden Zellen, die neben der HUM auch die Stoffwechselwege zur Produktion des FPP enthalten. Dies sollte eine selbstständige Produktion des Substrates FPP direkt aus den Nährstoffen des Mediums gewährleisten, so dass durch einfache Fütterung mit z.B. Glucose α -Humulen direkt als Produkt gewonnen werden könnte.

Diesen Weg hat auch J. Keasling beschritten und ein Plasmid erzeugt, das einen vollständig in *E.coli* funktionierenden Mevalonat-Stoffwechselweg enthält. Dieses Plasmid pBbA5c-MevT(CO)-T1-MBIS(CO, ispA) wurde für diese Arbeiten zur Verfügung gestellt (Addgene plasmid # 35152) [66] und in den verwendeten *E.coli* BL21(DE3) pET16b::*HUM*(co) integriert. Dieser Produktionsstamm wurde im 2L-STR in definiertem Medium bei 37°C angezogen und nach Induktion mit IPTG bei 20°C auf die Produktbildung hinsichtlich α -Humulen untersucht. Es zeigte sich eine geringfügige intermediäre Produktkonzentration von 2,6 mg/l, die aber schnell wieder verstoffwechselt wurde. Zudem wurde nur ein geringer Anteil des Produktes sekretiert, so dass eine in situ-Produktabtrennung in Betracht gezogen werden musste, um einen schnellen Produktabbau zu unterbinden und einen großen Gradienten für die

Produktdiffusion ins Medium zu bieten [67]. Hierfür wurden vor allem extraktive Verfahren mit organischen Lösemitteln, wie Dichlormethan, Pentan, iso-Oktan, Nonan und Ethylacetat in Betracht gezogen, aber auch adsorptive wie der Einsatz des hydrophoben Adsorberharzes Amberlite® XAD4 mit anschließender Produktelution unter Variation des Elutionsmittels in Vorversuchen berücksichtigt [68, 69]. Die extraktiven Verfahren zeigten sich hierbei dem adsorptiven unterlegen, mit einer maximalen Ausbeute von 46% (Ethylacetat) vor allem der Kombination aus Amberlite® XAD4 mit Elution durch Acetonitril (78% Ausbeute). In folgenden Kultivierungen in Gegenwart von 10% (w/w) Amberlite® XAD4 konnte keine Beeinträchtigung des Wachstumsverhaltens des Produktionsstamms festgestellt werden und eine effektive α -Humulen-Produktion bis zu einer volumetrischen Ausbeute von 60,2 mg/l nach 24h, was einer 230%igen Steigerung der Produktivität entspricht. Durch die in situ-Adsorption mit folgender Acetonitril-Elution konnte das α -Humulen darüber hinaus in einer Reinheit von 95% isoliert werden (5% β -Caryophyllen).

Das entwickelte Produktionsschema stellt eine gute Basis für eine mögliche Zerumbon-Produktion dar und könnte durch die Integration der weiteren Enzyme α -Humulen-8-Hydroxylase und Zerumbonsynthase, die *in planta* die Oxidation vom α -Humulen zum Zerumbon katalysieren, erreicht werden, wodurch ein weiteres Plasmid eingebracht werden müsste oder ein bestehendes erweitert, was wiederum einen erheblichen Entwicklungsaufwand mit sich brächte [19, 20]. Alternativ könnte hier aber auch durch die besondere allylische Stellung des C8 im α -Humulen eine, wie von J.A.R. Salvador et al., 2002, beschriebene, einfache allylische Oxidation in einer einstufigen Reaktion durchgeführt werden [70, 71] (s. Abb. 7). Die hier adaptierte Variante dieser Reaktion wurde in Acetonitril durchgeführt, dem Elutionsmittel, in dem das produzierte α -Humulen nach der Isolierung aus der Kulturbrühe final vorliegt und statt unter reiner Sauerstoffatmosphäre unter normaler Luft, um die Generierung zu vieler Oxidationsnebenprodukte zu vermeiden.

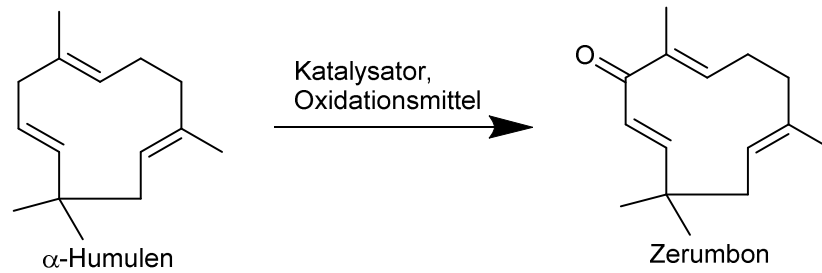


Abb. 7: Allylische Oxidation von α -Humulen zu Zerumbon

Als Oxidans wurde 70% wässriges tertiäres Butylhydroperoxid (TBHP) eingesetzt und Übergangsmetallsalze als Katalysatoren. Das Reaktionssystem wurde mit Hilfe eines DoE-Ansatzes (design of experiments) nach Box-Behnken-Design statistisch untersucht und so die optimalen Reaktionsparameter identifiziert. Diese lagen bei 2,18 mM Substrat, 60,7°C, 0,0073 molaren Äquivalenten Katalysator sowie 4,64 molaren Äquivalenten Oxidans. Mit jedem untersuchten Übergangsmetallsalz konnte hierbei ein vollständiger Umsatz erzielt werden, wobei sich Unterschiede in Hinblick auf das Produktspektrum und die Produktion von Zerumbon zeigten. So wurde ein Maximum von 51,6% an Zerumbon mit MnCl_2 als Katalysator produziert, während insgesamt 3 Nebenprodukte gebildet wurden. Von diesen konnten bisher Humulen-6,7-Epoxid und Vidriflorol als vermutliche Produkte identifiziert werden, die Untersuchungen werden fortgeführt [72].

Obwohl die Produktivität des hier kombinierten Ansatzes aus synthetischer Biotechnologie und organischer Synthese noch viele Optimierungsmöglichkeiten bietet, zeigt sich sein Potential in der eleganten Direktheit und geringen Anzahl der Prozessschritte durch Produktion von α -Humulen direkt aus einer Kohlenstoffquelle, in situ-Adsorption während des Prozesses und anschließende Oxidation direkt im Elutionsmittel des Adsorbers. Die allylische Stellung des zu oxidierenden Kohlenstoffs erweist sich hierbei als Schlüsselement, die durch ihre dirigierende Wirkung eine effektive Oxidation zum Zerumbon so erst ermöglicht. Die Etablierung eines technischen Produktionsverfahrens erscheint hierdurch möglich, was die HUM unter den STS auszeichnet.

Publikation 4:

S. Alemdar, J.C. König, S. Hartwig, T. Frister, T. Scheper, S. Beutel: Bioproduction of α -humulene in metabolically engineered *Escherichia coli* and application in zerumbon synthesis. *Engineering in Life Science* (2017), 17(8), 900-907, DOI: 10.1002/elsc.201700043

Das folgende Fallbeispiel der (+)-Zizaensynthese soll noch einmal weitere Herausforderungen bei der technischen Nutzung der Sesquiterpensynthesen beleuchten.

2.3.8 Molekularbiologische Arbeiten zur Produktion der (+)-Zizaensynthese

Da keine Isolierung von Erbgut aus dem vorliegenden getrockneten Vetivergras gelang, wurde eine nicht annotierte cDNA-Sequenz (GenBank Acc. No. HI931360), die vermutlich für eine (+)-Zizaensynthese (ZIZ, E.C. 4.2.3.X: (2E,6E)-Farnesyldiphosphat-diphosphatlyase) codiert und die bisher nur als cDNA-Sequenz beschrieben und patentiert wurde [73], für die Expression in *E.coli* codon-optimiert, so dass der CAI von 0,551 auf 0,707 erhöht werden konnte. Die so erhaltene 1.668 bp lange Sequenz wurde zunächst in einem BLAST-Ansatz (Basic local alignment search tool) untersucht und zwei Sesquiterpensynthesen mit einer Sequenzähnlichkeit von <52% als nächste Verwandte identifiziert (β -Sesquiphellandrensynthase, β -Caryophyllensynthase). Ein Alignment auf Aminosäureebene zeigte zudem das Vorhandensein der konservierten DDXXD- und NSE/DTE-Motive, die das codierte Enzym als ein Mitglied der Terpensynthase-Superfamilie identifizieren. Die adaptierte Sequenz wurde daher in der GenBank veröffentlicht.

Enzymdatenbankeintrag 2:

S, Hartwig, T. Frister, S.Alemdar, S., Z. Li, T. Scheper, S. Beutel: Synthetic construct zizaene synthase gene, complete cds, NCBI GenBank Acc. No. KP231534, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KP231534.1/> (2015)

2.3.9 Expression der ZIZ im Produktionsorganismus

Die cDNA-Sequenz wurde in Form von zwei doppelsträngigen DNA-Fragmenten mittels seamless cloning, einer dem Gibson-Assembly verwandten PCR-basierten Klonierungstechnik [74], in das jeweilige Vektorrückgrat inkloniert, wobei neben dem standardmäßigen pET16b- hier auch ein pETSUMO- und ein pETColdI-Vektor in die Untersuchungen einbezogen wurden, die verschiedene Vorteile für die Expression xenogener Enzyme bringen könnten. Die SUMO-Domäne (small Ubiquitin-like modifier) zum einen ist ein als Löslichkeitsvermittler bekanntes Fusionsprotein von cirka 13 kDa Größe [75, 76], der pColdI-Vektor zum anderen unterliegt der Kontrolle des cspA-Promotors (cold shock protein A), wodurch eine langsamere aber bessere Expression aufgrund verringerter Fehlfaltungen bei niedrigen Temperaturen (ca. 15°C) resultieren soll [77, 78]. Nach Transformation der Vektoren in *E.coli* BL21(DE3) wurden die erhaltenen Teststämme in TB-Medium kultiviert und in Bezug auf die lösliche Expression des Zielenzyms untersucht. Während der pET16b::ZIZ(co) enthaltene Stamm keine lösliche Expression zeigte, konnten mit dem pETSUMO::ZIZ(co) enthaltenen 325 mg/l bzw. mit dem pETColdI::Ziz(co) enthaltenen 221 mg/l des Zielenzyms produziert werden. Die niedrigere Ausbeute bei Kälteschockinduktion ist hierbei zumindest zum Teil auf das erheblich verringerte Wachstum bei 15°C zurückzuführen. Das so produzierte Enzym wurde unter Ausnutzung des enthaltenen 6xHis-tags über Ni²⁺-dekorierte Sepharose-IMAC aufgereinigt und so in über 95% Reinheit erhalten. Mittels der SUMO-Protease ULP1 konnte die SUMO-Domäne geschnitten werden und so das mit 64 kDa eine für STS typische Größe aufweisende Enzym erhalten werden [79]. Zur Bestätigung der Identität der (+)-Zizaensynthase wurde außerdem ein tryptischer Verdau mit folgendem Sequenzabgleich des Peptidmassenfingerprints durchgeführt, der bei einer Sequenzabdeckung von cirka 18% die Identität des Zielenzyms weiter untermauerte [80, 81]. Auch der durch isoelektrische Fokussierung per 2D-Gelelektrophorese ermittelte isoelektrische Punkt von pI 4,95 liegt nah bei dem theoretisch berechneten von pI 5,09.

2.3.10 Charakterisierung des Reaktionsverhaltens der ZIZ

Das erhaltene Enzym wurde im Zweiphasenreaktionssystem mit iso-Oktan und dem Substrat FPP untersucht. Als Hauptprodukt der Umsetzung konnte per GC-MS so (+)-Zizaen bestätigt

2. Synthetische Biologie zur Nutzung pflanzlicher Sesquiterpensynthesen

werden, dass mit einem Anteil von über 90% produziert wurde und somit letztlich auch die Identität der (+)-Zizaensynthese verifiziert. Im Gegensatz zu den beiden bisher behandelten Sesquiterpensynthesen findet bei der ZIZ zunächst eine Umlagerung zum Nerolidylkation statt, wobei nicht geklärt werden konnte, ob dies vor oder nach der Abspaltung der Pyrophosphatgruppe erfolgt (s. Abb. 8).

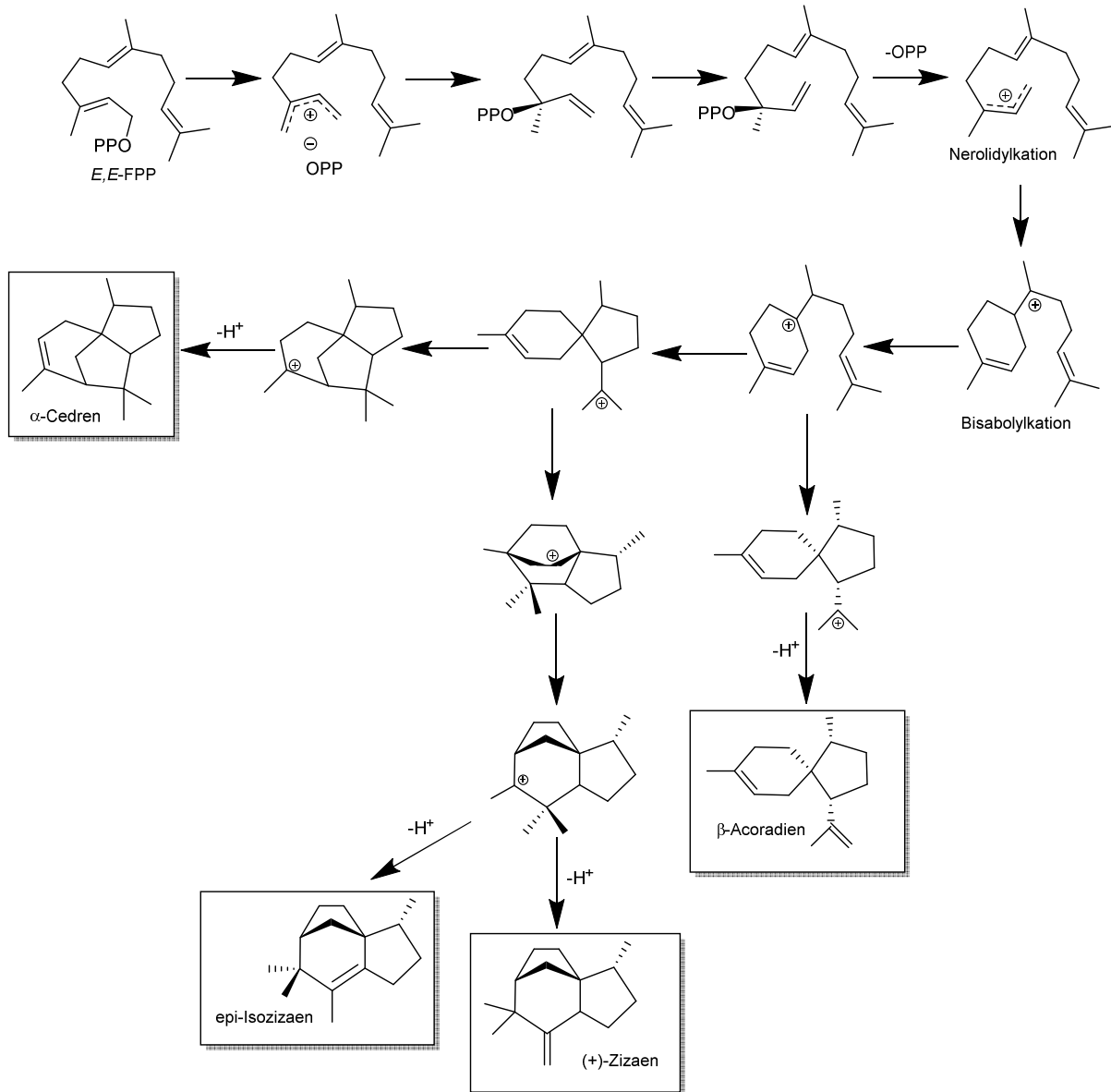


Abb. 8: Reaktionsmechanismus der ZIZ bei Umsetzung von *E,E*-FPP zu ausgewählten Sesquiterpenen des Vetiveröls

Das Nerolidylkation zyklisiert sodann durch einen 1,6-Ringschluss zum Bisabolykation. Dies kann sich weiter umlagern und zyklisieren und führt so direkt zu den Acoradienyl- und Cedrylkationen. Dieser Reaktionsfolge entsprechend wurden als weitere Nebenprodukte α -

Cedren (2,8%) und β -Acoradien (6,5%) identifiziert, deren Entstehung aber nur in geringem Maße erfolgt. Das erwartete weitere Nebenprodukt der Hauptproduktbildungsroute zum (+)-Zizaen, das epi-Isozizaen, konnte nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden, da es in zu geringen Mengen gebildet wurde.

Die kinetischen Parameter wurden bei einer optimalen Temperatur von 30°C bestimmt. Unter diesen Bedingungen konnten unter Annahme eines Michaelis-Menten-Modells eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von $v_{\max}=0,0054 \mu\text{M/s}$, eine Michaelis-Konstante von $K_M=1,111 \mu\text{M}$ sowie eine Wechselzahl von $k_{\text{cat}}=0,049 \text{ s}^{-1}$ bestimmt werden. Hieraus ergibt sich eine Spezifitätskonstante von $k_{\text{cat}}/K_M=4,43 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ und eine spezifische Enzymaktivität von 0,0454U/mg. Die katalytische Effizienz, repräsentiert durch die Spezifitätskonstante, liegt damit knapp die Hälfte unter dem Durchschnitt, aber noch im für den sekundären Metabolismus typischen Bereich ($10^3\text{-}10^7 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$), wobei die Affinität zum Substrat, repräsentiert durch K_M außerordentlich hoch ist und so, wie schon bei der PTSi, die äußerst niedrige katalytische Konstante kompensiert [37]. Auch der schon zitierte, von Bar-Even et al., 2011, konstatierte Befund, dass Enzyme für Substrate, die größer als 350 g/mol sind, in der Regel hohe Affinitäten zeigen, wird noch einmal bestätigt. [36]

Die Arbeiten zeigen die grundlegende Zugänglichkeit des (+)-Zizaen über einen synthetischen Biotechnologieansatz. (+)-Zizaen konnte bisher nur über komplexe organische Synthese künstlich hergestellt werden [82, 83]. Ein produktiver Einsatz der ZIZ erscheint allerdings zum gegenwärtigen Zeitpunkt fraglich, da die Produktion löslichen und somit aktiven Enzyms äußerst komplex ist und die kinetischen Daten zudem nur eine geringe Aktivität zeigen. Unter Umständen könnten hier zielgerichtete Mutationen eine evolutive Verbesserung der Enzymaktivität bewirken oder aber die Kultivierung in anderen Wirtsorganismen eine verbesserte Produktion aktiven Enzyms. Letztlich muss aber berücksichtigt werden, dass auch in diesem Fall, wie schon bei der HUM, das Produkt (+)-Zizaen nur ein Zwischenprodukt auf dem eigentlichen Weg zum prospektiven Zielprodukt Khusimol sind, dem hauptduftgebenden Bestandteil des wertvollen Vetiveröls. Jedoch liegt im (+)-Zizaen die zu oxidierende Methylgruppe nicht in allylischer Stellung vor, sondern terminal, so dass keine einfache organische Oxidation durchgeführt werden kann. Stattdessen muss hier der Weg über die enzymatische Oxidation mit z.B. Cytochrom P450 Monooxygenase (CYP450) gegangen werden, eine membrangebundene, NADPH-abhängige Enzymklasse, die zudem

eines Reduktionssystems in Form einer CYP450-Reduktase (CPR) bedarf und nur äußerst schwierig aktiv zu exprimieren ist [84].

Publikation 5:

S. Hartwig, T. Frister, S. Alemdar, Z. Li, T. Scheper, S. Beutel: SUMO-fusion, purification, and characterization of a (+)-zizaene synthase from *Chrysopogon zizanioides*. *Biochemical and biophysical Research Communications* 458, 883-889 (2015)

Die hier vorgestellten Arbeiten zur synthetischen Biologie zeigen einerseits das große Potential von Enzymen des pflanzlichen Metabolismus in Hinblick auf die Vielfalt und Komplexität der erzeugbaren Struktur motive. Andererseits zeigen die umfangreichen Untersuchungen aber auch die Herausforderungen auf, die einer technischen Nutzung im Sinne der synthetischen Biotechnologie entgegenstehen, wie eine stabile lösliche und aktive Enzymexpression in den Produktionsorganismen zu erreichen oder die Integration von substratbildenden Reaktionen oder derivatisierenden Folgereaktionen zu realisieren.

Die drei ausgewählten Sesquiterpensynthesen unterscheiden sich signifikant in ihrem Verhalten, auch wenn die wichtigsten Strukturelemente, wie die Mg^{2+} -bindenden DDXXD- und NSE/DTE-Motive, bei allen Enzymen dieser Superfamilie konserviert sind. So bevorzugt jedes der Enzyme einen anderen initialen Ringschluss, vom 1,6-Ringschluss der ZIZ über den 1,10-Ringschluss der PTSi bis zum 1,11-Ringschluss der HUM. Dies legt nahe, dass die Mg^{2+} -bindenden Domänen zwar für die initiale Dephosphorylierung verantwortlich sind, aber nur eine untergeordnete Rolle bei der direkt folgenden Ringschlussreaktion spielen. Insgesamt zeigt die große Variabilität der STS beim Ringschluss das Potential dieser Enzymklasse für die Produktion komplexer terpenoider Strukturen, die z.B. als Strukturbausteine für folgende organische Synthesen dienen können, wie am Beispiel der Zerumbonsynthese gezeigt wurde.

Der für die HUM gewählte ganzzellkatalytische Ansatz erscheint für einen Einsatz im Sinne der synthetischen Biotechnologie am erfolgversprechendsten. Dabei ist die STS in einem lebenden Organismus in eine Reaktionskaskade eingebunden, so dass das Sesquiterpen direkt aus der Kohlenstoffquelle des Kulturmediums produziert wird. Wenn das Produkt

2. Synthetische Biologie zur Nutzung pflanzlicher Sesquiterpensynthesen

zudem durch in situ-Produktanreicherung laufend aus dem Prozess entfernt wird, kann einer cytotoxischen Anreicherung vorgebeugt werden. So kann das Produkt, hier α -Humulen, in großen Mengen produziert und isoliert werden und steht in hoher Reinheit für folgende Derivatisierungen, wie in diesem Fall der Oxidation zum Zerumbon, zur Verfügung.

3. Methoden der Bioprozessentwicklung

Neben den beschriebenen Arbeiten zur synthetischen Biologie ist die Bioprozessentwicklung der zweite große Bereich der synthetischen Biotechnologie und ebenso elementar für die Etablierung wirtschaftlicher Bioprozesse. Die Entwicklung biotechnologischer Prozesse zur Verwendung von Enzymen und deren ökonomische Nutzung bedarf einer Vielzahl von Optimierungsarbeiten, die sich auf alle Verfahrensschritte entlang der gesamten Prozesskette beziehen. Die Prozesskette beinhaltet:

1. prozessvorbereitende Arbeitsschritte wie Zellbankhaltung, Medienvorbereitung, Autoklavierung und Anzucht der Produktionsorganismen (Upstream processing),
2. den eigentlichen Prozess bestehend aus der Kultivierung und Expression aktiven Enzyms und dem Einsatz des Enzyms für die angestrebte Umsetzung sowie
3. die Isolierung, Aufreinigung und Konfektionierung des Produktes (Downstream processing).

Während aller dieser Prozessschritte müssen die wichtigsten Betriebsparameter und Messgrößen überwacht werden, um eine optimale Produktion zu erreichen. Die hierfür eingesetzten Analyseverfahren können z.B. frühzeitig Wachstumslimitierungen der Produktionsorganismen erkennen helfen und so das Prozessverständnis verbessern. Eine online-Analytik, die in time Messdaten einer relevanten Prozessgröße liefert, gilt hierbei als Goldstandard, ermöglicht sie doch neben dem Monitoring auch Regelung, Steuerung und ggf. die Vorhersage des Prozessverlaufs [85]. Thematisiert und unterstützt wird die Implementierung entsprechender prozessbegleitender Analytik auch durch die PAT-Initiative (process analytical technology) der FDA (Food and Drug Administration) der USA [86], die initiiert wurde, um Prozesssicherheit und -verständnis von zertifizierten Produktionsprozessen zu erhöhen. Eine online-Analytik ist jedoch nicht immer einfach einsetzbar. Dies kann durch die Kultivierungssysteme selbst bedingt sein, wenn für das Screening in Mikrotiterplatten keine miniaturisierte Sensorik vorliegt oder bei Vorkulturen im klassischen Schüttelkolben, für die durch die Bauart nur optische online-Messmethoden anwendbar sind. Ebenso kann aber auch eine Limitierung der Messbarkeit vorliegen, z.B. durch fehlende spezifische Sensorelemente oder wenn die Autoklavierbarkeit des Sensors nicht möglich ist,

so dass oft auf offline-Daten zurückgegriffen werden muss, was das Prozesswissen und auch die -steuerbarkeit erheblich einschränkt.

3.1 Upstream enabling technologies

Im Bereich des Upstream Processing (prozessvorbereitende Verfahrensschritte) stellt die Übertragbarkeit von Schüttelkolbenkultivierungen, die klassisch für die Bioprozessentwicklung im Labormaßstab sowie die Anzucht von Vorkulturen (seed train) eingesetzt werden, in den Reaktormaßstab ein häufig auftretendes Problem dar [87]. Nicht nur die Veränderung vom orbital geschüttelten zum rührerdurchmischten System stellt Herausforderungen, vor allem der Mangel an online-Daten wichtiger Messgrößen aus Schüttelkolbenkultivierungen macht die Skalierung aufwändig. Bisher können im Schüttelkolben nur die Basisparameter pH und DO (dissolved oxygen, pO_2 , Sauerstoffpartialdruck in Lösung) online überwacht werden. Allerdings muss dafür eine spezielle Schüttelkolbenvariante verwendet werden, die mit fluoreszenzbasierten Sensorspots ausgerüstet ist [88]. Die Biomassekonzentration hingegen wird durch Probenahme und offline-Analyse bestimmt, so dass für die Erfassung immer wieder die Sterilbarriere unterbrochen werden und eine Kontamination riskiert werden muss. Um dies zu umgehen, wurden bisher indirekte Verfahren etabliert, z.B. kann über die aus dem DO-Wert zugängliche Sauerstofftransfer rate (OTR, oxygen transfer rate) auf die Biomassekonzentration geschlossen werden [89, 90]. Die Biomassekonzentration als wichtigste und zentrale Prozessgröße in Kultivierungsprozessen sollte aber direkt und online bestimmbar sein, um einen lückenlosen Kultivierungsverlauf zu dokumentieren und auch kleine bzw. kurzfristige metabolische Änderungen zu erfassen [91]. Zu diesem Zweck wurde ein Sensor konstruiert, der in der Lage ist, die Biomassekonzentration online ohne Probenahme im Schüttelkolben zu messen. Im Folgenden wird die Entwicklung dieses Sensors beschrieben (siehe Kapitel 3.1.1), seine Anwendungsbreite anhand verschiedener Modellorganismen und Zelllinien evaluiert (siehe Kapitel 3.1.2) sowie die weitergehende Applikation für die Bestimmung von zellinternen Proteinaggregaten (siehe Kapitel 3.1.3). Darauf folgend wird die Machbarkeit der Nutzung entsprechender online-Schüttelkolbensensorik für die gezielte Steuerung von Bioprocessen in diesem Maßstab untersucht, wobei die 3D-Drucktechnik für die Prototypenerstellung eines

Dosageaufsatzes eingesetzt wird (siehe Kapitel 3.1.4). Abschließend wird der Einsatz des 3D-Drucks im Bereich der Bioprozessentwicklung anhand verschiedener anwendungsspezifisch maßgeschneiderter Labormaterialien evaluiert (siehe Kapitel 3.1.5) und das Druckmaterial hinsichtlich seiner Biokompatibilität untersucht (siehe Kapitel 3.1.6).

3.1.1 Sensorentwicklung für die Bestimmung der Biomassekonzentration in Schüttelkolben

Einen funktionalen Ansatz für die online-Biomassebestimmung in Schüttelkolben stellt die nicht-invasive 180°-Streulichtmessung dar, bei der Licht durch den transparenten Boden des Schüttelkolbens in die Kulturbrühe eingestrahlt wird und das abhängig von der Trübung zurückgestrahlte Streulicht mit einer Photodiode online ohne Zeitverlust detektiert wird [92]. Der große Linearitätsbereich dieser Methode, z.B. gegenüber der klassischen offline-optischen Dichte-Messung, einer Transmissionsmessung, die immer umfangreiche Verdünnungsreihen erfordert, ermöglicht die Detektion über den gesamten relevanten Messbereich für Schüttelkolbenkultivierungen [93]. Der Einsatz eines solchen 180°-Streulichtsensoren kann in einem kompakten Aufbau realisiert werden, der einfach unterhalb des Schüttelkolbens auf dem Schüttler montiert wird; die Daten können z.B. über Bluetooth an einen Messrechner übermittelt werden. Die Messung kann zudem in jedem handelsüblichen Schüttelkolben mit transparentem Boden erfolgen. Ein entsprechender Sensor wurde im Rahmen des vom BMWi über die ZIM-Initiative geförderten Vorhabens „Optischer online-Sensor zur Bestimmung des Wachstums in geschüttelten Kulturen“ konstruiert [94].

Der Sensor besteht aus einer LED (light emitting diode, 630 nm) und einer parallel angeordneten Photodiode für die Detektion des Streulichtes. Über diesen sind optische Filter zur Transmission im Bereich der Dominanzwellenlänge positioniert. Diese einfache Messanordnung, dargestellt in Abb. 9A, ermöglicht nach Feinabstimmung der optischen Gänge prinzipiell schon die Messung des 180°-Streulichtes, also der Trübung der darüberstehenden Lösung [95]. Allerdings führt die Bewegung des Schüttelkolbens bei der Orbitaldurchmischung zu einer schnellen Rotation der Flüssigkeit im Kolben, wie in Abb. 9B dargestellt ist. Die sich ausbildende Form ist eine Flüssigkeitssichel mit stark variierender

3. Methoden der Bioprozessentwicklung

Flüssigkeitshöhe und abhängig von ihrer Position im Kolben beeinträchtigt sie Intensität (Amplitude) und Güte des Sensorsignals [96].

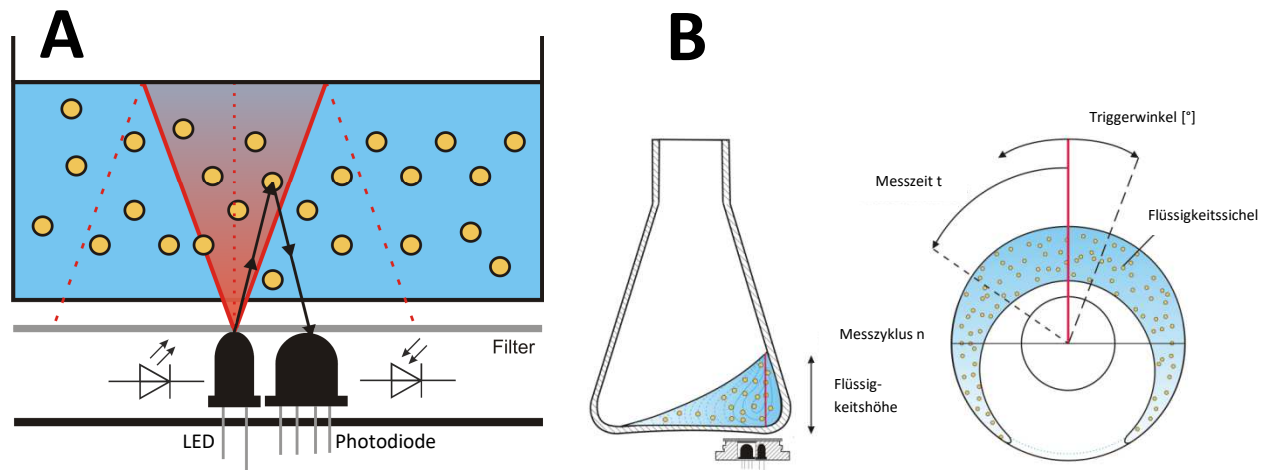


Abb. 9: A: Schematischer Aufbau des konstruierten Streulichtensors für die Biomassebestimmung in Schüttelkolben; B: Querschnitt und Aufsicht auf Schüttelkolben mit rotierender Flüssigkeitssichel

Aus diesem Grund wurde dem Sensoraufbau ein Beschleunigungssensor (G-Sensor) hinzugefügt, der über einen Triggerwinkel die Position der maximalen Flüssigkeitshöhe über dem Streulichtsensor mit dem Auslösen der Messung synchronisiert, so dass stabile Signale maximaler Amplitude resultieren. Diese anhand von Formazin-Modelllösungen gewonnenen Basiserkenntnisse wurden zunächst anhand von Testkultivierungen zweier einfacher Modellorganismen, *E.coli* und *Saccharomyces cerevisiae* auf reale Kultivierungsprozesse übertragen. Hierbei wurden neben der 180°-Streulichtmessung zur Korrelation offline sowohl die Biotrockenmasse (BTM) als auch die OD_{600} bestimmt [97]. Es zeigten sich nicht-lineare Korrelationen von Streulicht zu OD_{600} und BTM, die Bleasdale-Nelder- (im Fall von *S. cerevisiae*) bzw. Belehradek- (im Fall von *E.coli*) Funktionen entsprechen [98]. Die Korrelation ist bis in den maximal untersuchten Bereich von $OD_{600}=30,5$ stabil mit einem Fehler von $<12\%$, was hauptsächlich auf den Bereich sehr niedriger $OD_{600}<1,2$ zurückzuführen ist, wo die Messung durch Oberflächenreflexionen der nur wenig trüben Kulturbrühe gestört werden kann. Die Kultivierungsverläufe insgesamt werden nach Glättung des Rohsignals durch einen Median 45 äußerst präzise wiedergespiegelt und ermöglichen so erstmals die online-Erfassung des Zellwachstums in Schüttelkolben.

Publikation 6:

J. Schmidt-Hager, C. Ude, M. Findeis, G. T. John, T. Scheper, S. Beutel: Development of a Novel Non-Invasive Online Biomass Detector System for Shake Flask Cultivations, Engineering in Life Science, DOI: 10.1002/elsc.201400026 (2014)

3.1.2 Untersuchung der Anwendungsbreite des entwickelten Biomassesensors

Von grundlegender Bedeutung für die Sensorentwicklung ist die Anwendungsbreite, v.a. in Bezug auf die Organismenvielfalt. Hierzu wurden weitere umfangreiche Untersuchungen mit einer repräsentativen Auswahl von industriell für die Produktion von Enzymen relevanten Mikroorganismen und Zelllinien durchgeführt. Untersucht wurden *Apergillus niger* (Pilz), *Kluyveromyces pastoris* (Hefe), *Lactobaillus zae* (fakultativ anaerobes Bakterium) und CHO-K1 (chinese hamster ovary, Tierzelllinie) bei Kultivierung in den jeweiligen Standardmedien. Zur Korrelation der Streulichtmessung wurden parallel durch offline-Probenahme OD, Biotrockenmasse und die Zellzahl per automatischem Zellzähler (Cedex) bestimmt.

Die Kultivierungsverläufe aller Mikroorganismen ließen sich trotz nicht-linearer und individueller Korrelationen präzise mit dem Streulichtsensor abbilden, wobei wiederum der Effekt der Oberflächenreflektionen bei geringer Trübung eine Messung im Bereich niedriger Zellzahlen ($<10^8$ Zellen/ml) erschwerte. Die Tierzelllinie CHO-K1, die in wesentlich geringeren Zellzahlen kultiviert wird (10^6 - 10^7 Zellen/ml), konnte daher mit dem bestehenden Aufbau nicht detektiert werden [99].

Nach Einbau eines Reflektors in den Schüttelkolben über dem Sensor konnte aber auch diese Zelllinie im Bereich von $6,7 \cdot 10^5$ - $1,5 \cdot 10^7$ Zellen/ml erfolgreich bestimmt werden. Der Reflektor ermöglichte zudem auch eine Messung der lag-Phasen von Mikroorganismenkulturen ab einer $OD_{600} = 0,58$ (ca. 0,1 g/l BTM). Weiterhin wurde eine Abhängigkeit der Amplitude des Streulichtsignals vom Kulturmedium festgestellt. Insbesondere Komplexmedien, die Hefeextrakte u.ä. enthalten, verursachen eine Eigenabsorption des Mediums, die die Signalintensität verringert. Ebenso tragen Vitamine und Maillard-Reaktionsprodukte, die aus der Medienautoklavierung resultieren, zu dieser unerwünschten Signalverschlech-

terung bei. Auch die Zellmorphologie spielt offensichtlich eine wesentliche Rolle hinsichtlich des Streuverhaltens, so dass sich z.B. die Amplitude des Streulichtsignals bei Zellzahlen von $1-2 \cdot 10^9$ Zellen/ml von *L. zeae* zu *K. pastoris* um den Faktor 10 erhöht. Auch Morphologieänderungen der Zelloberflächen durch Stress, verursacht z.B. durch Nährstoffmangel, können so identifiziert werden, wobei die aufgeführten Aspekte insgesamt auch zur Notwendigkeit einer individuellen Kalibration jedes betrachteten Systems führen [100, 101]. Die Auswirkungen von Morphologieänderungen auf das 180°-Streulichtsignal belegen die außergewöhnliche Sensitivität des Sensors, die auch die Determinierung von Systemveränderungen, wie z.B. Diauxien nach Erschöpfung des primären Substrates oder durch klassische Limitierungen, wie z.B. durch O₂-Mangel, erlaubt, so dass eine Prozesssteuerung schon im Schüttelkolbenmaßstab ermöglicht wird [102].

Publikation 7:

C. Ude, J. Schmidt-Hager, M. Findeis, G. T. John, T. Scheper, S. Beutel: Application of an online-Biomass Sensor in an Optical Multisensory Platform Prototype for Growth Monitoring of biotechnical relevant Microorganism and Cell Lines in Single use Shake Flasks, Sensors, 14, 17390-17405; doi:10.3390/s140917390 (2014)

3.1.3 Anwendung des entwickelten Biomassesensors zur Bestimmung von Proteinaggregaten

Dies führt zu der Überlegung, ob nicht auch die Bildung von Proteinaggregaten, sog. Inclusion bodies (IB) in den produzierenden Zellen anhand des Streulichtsignals erfasst werden kann, da diese auch die optischen Eigenschaften der Zellen beeinflussen können [103]. Inclusion bodies sind ein häufiges Problem bei der Expression xenogener Enzyme in mikrobiellen Wirtsorganismen. Sie führen zu inaktiven Enzymen und daher wird durch eine Vielzahl von Maßnahmen versucht, ihrer Bildung entgegenzuwirken, z.B. durch oben schon beschriebene Maßnahmen wie Codon-Optimierung, cold expression, Fusionsproteine, etc. Eine online-Überwachung der IB-Bildung schon in der frühen Entwicklungsphase von Bioprocessen könnte helfen, diese besser zu verstehen und zu kontrollieren. Um die

Anwendbarkeit des 180°-Streulichtensors für diesen Zweck zu evaluieren, wurden Testkultivierungen mit *E. coli* BL21, einem wichtigen Expressionsstamm, als Modellorganismus durchgeführt. Dieser wurde sowohl als unmodifizierter Stamm als auch in zwei genetisch modifizierten Varianten eingesetzt; zum einen ein hLIF (humaner Leukämie-inhibierender Faktor) exprimierender [104], zum anderen ein GST-GFP (Glutathion-S-transferase-getaggtetes grün fluoreszierendes Protein) produzierender [105]. Diese rekombinanten Stämme verfügen beide über eine nachgewiesene Neigung zur IB-Bildung. Parallel zur online-Streulichtmessung während der Kultivierung wurden durchflusscytometrische Untersuchungen an offline-Proben durchgeführt und in einem Bypass einzelne Zellen auf einem Silizium-Photonenarray (SiPA) eingefangen und die Veränderung ihrer optischen Eigenschaften anhand des EOT-Wertes (effective optical thickness) während des Prozesses bestimmt [106-108]. Im Anschluss wurden die so erhaltenen Zellproben zudem rasterelektronenmikroskopisch (REM) auf ihre Morphologie hin untersucht.

Es zeigte sich eine eindeutige Beeinflussung des Streulichtensorsignals durch die Induktion der Proteinexpression mit IPTG, das dadurch im Expressionsverlauf immer höhere Amplituden zeigt sowohl im Vergleich zu nicht-induzierten Kulturen als auch im Vergleich zu induzierten Kulturen des nicht-modifizierten *E. coli* BL21 [109]. Diese Signalveränderung korreliert linear mit der offline bestimmten IB-Konzentration bis zu einer Konzentration von 100mg/l IB und geht einher mit im REM sichtbaren Morphologieänderungen der Zellen. Nach Induktion zeigt sich die Zelloberflächenstruktur im Vergleich zu nicht-induzierten Zellen wie vernarbt, stark granuliert mit Dellen und Einschnürungen [110-116], wie in Abb. 10 an je 12 vergleichenden REM-Aufnahmen von *E.coli*-Zellen aufgezeigt wird.

Auch die durchflusscytometrische Untersuchung ergab eine signifikante, zeitlich mit der Amplitudenänderung des 180°-Streulichtsignals korrelierende Änderung des Seitwärtsstreulichtes (SSC, side scatter) sowie ein unverändertes Vorwärtsstreulichtsignal (FSC, forward scatter) [117], was eine Änderung der optischen Eigenschaften der Zellen bestätigt und eine mögliche Signalveränderung durch Zellaggregation widerlegt [118-124]. Die EOT-Analyse der Einzelzellen bestätigte dies darüber hinaus, da sich auch hier eine EOT-Zunahme kurz nach der Induktion zeigte, die eine Änderung des Refraktionsindex der Zellen bedeutet [125, 126].

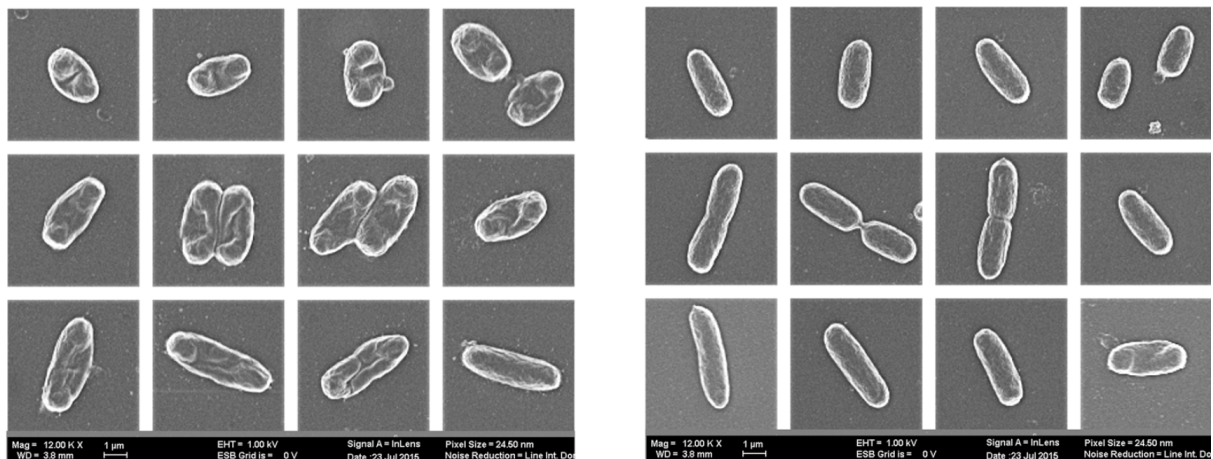


Abb. 10: REM-Aufnahmen von Zellen von *E.coli* BL21 hLIF Links: drei Stunden nach Induktion; Rechts: nach drei Stunden ohne Induktion

Der Stress, dem die Zellen durch die Einwirkung des Induktors sowie die Produktion des Zielenzyms ausgesetzt sind, führt somit zu einer signifikanten und messbaren Veränderung der optischen Eigenschaften, wobei letztlich nicht geklärt werden konnte, ob die Veränderung des 180°-Streulichtsignals durch die IB selbst oder die Veränderungen der Zelloberfläche verursacht wird, was aber unerheblich ist, da eine eindeutige Korrelation besteht und eine online-Überwachung der IB-Bildung somit möglich ist.

Publikation 8:

C. Ude, N. Ben-Dov, A. Jochums, Z. Li, E. Segal, T. Scheper, S. Beutel: Online analysis of protein inclusion bodies produced in *E. coli* by monitoring alterations in scattered and reflected light. *Applied Microbiology and Biotechnology* (2016), 100 (9), 4147-4159, DOI:10.1007/s00253-016-7403-1

3.1.4 pH-Statierung im Schüttelkolben

Die vielfältigen Möglichkeiten des entwickelten 180°-Streulichtsenors führten zur Integration des Sensors in ein kommerzielles Messtablär von Fa. PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg, den Shake flask reader vario (SFR). Dieses Messtablär, das für die online-Messung von pH und DO entwickelt wurde, konnte so sinnvoll in seiner Funktionalität

aufgewertet werden, womit ein kombiniertes nicht-invasives Monitoring der wichtigsten Basismessgrößen in Schüttelkolbenkultivierungen realisiert ist. Die umfangreiche online-Datenaufnahme macht zudem eine aktive Prozesssteuerung prinzipiell möglich, wobei diese durch die grundlegende Konstruktion von Schüttelkolben und vor allem -deckel erschwert wird. Der Kolbendeckel, der eine Sterilbarriere darstellt, kann während des Prozesses nicht einfach abgenommen werden, ohne eine Kontamination zu riskieren, so dass eine Zugabe von Korrektur- oder Nährstofflösungen ebenso wie die offline-Probenahme kritisch zu sehen ist. Um eine Prozesssteuerung dennoch zu realisieren, wurde daher beispielhaft ein Dosagemodul für die pH-Statierung entwickelt, das als Kolbendeckel auf den Schüttelkolben geschraubt wird und anhand des pH-Messsignals aus dem Messtablar den pH-Wert regelt.

Das Dosagemodul wurde in einem zweiteiligen Aufbau konzipiert, wobei der untere, autoklavierbare Teil ausschließlich passive Elemente enthält und mit der Zellkultur in Kontakt steht, während der obere Teil, der über einen Kopplungsmechanismus aufgesetzt wird, nicht autoklavierbar ist und die gesamte Elektronik (Mikrocontroller), Aktorik (Mikropumpe, Ventile) sowie die Reservoirs für die pH-Korrekturmittel (2-3 M NaOH, 2-3 M HCl) enthält [127-129]. Aufgrund der umfangreichen Anforderungen an die geometrischen Dimensionen z.B. zur Integration aller Bauteile auf kleinstem Raum oder in Hinblick auf eine mögliche Kopflastigkeit des Schüttelkolbens bei Betrieb mit dem Dosagemodul, wurde die Entwicklung des Dosagemoduls mit Hilfe des rapid prototyping unter Einsatz moderner 3D-Druckverfahren (SLS, selective laser sintering) durchgeführt [130-132]. Zum einen konnte so mit einem bioverträglichen Kunststoff (PA12, Polyamid) gearbeitet werden [133], der ein geringes Eigengewicht hat (Gesamtleergewicht Dosagemodul 111,3 g), zum anderen konnten so auch komplexe Strukturen, wie gekrümmte Kanäle direkt in das Modul eingedruckt werden, was mit klassischen Frästechniken nicht möglich ist [134]. Das entwickelte Dosagemodul wurde dann anhand von Modellkultivierungen von *E.coli* K12 in Standardmedium evaluiert. Die pH-Statierung erwies sich als am genauesten mit einem adaptiven P-Regler (Proportionalitätsregler), so konnten die Schüttelkolbenkulturen über 24 h in einem Bereich von +/-0,05 pH-Einheiten konstant gehalten werden [135]. Dies führte im Vergleich zur unregulierten Vergleichskultur zu einer um über 50% höheren Zellmasse. Das Dosagemodul kann mit bis zu 3 M Säure und Lauge betrieben werden, was bei einem Volumen von je 11,5 ml für circa 24 h Kultivierungsdauer ausreicht; ein Nachfüllen ist aber ebenso einfach möglich. Die

Untersuchungen zeigen, dass eine pH-Regelung von Schüttelkolben mit dem entwickelten Dosagemodul praktikabel ist, wobei prinzipiell auch jede andere Korrektur- oder Nährstofflösung eingesetzt werden könnte, so dass z.B. auch ein fed-batch-Betrieb im Schüttelkolbenmaßstab durchgeführt werden kann.

Publikation 9:

C. Ude, T. Hentrop, P. Lindner, T.-H. Lücking, T. Scheper, S. Beutel: New Perspectives in Shake Flask pH Control using a 3D-printed Control Unit based on pH online Measurement. Sensors and Actuators, B: Chemical (2015), 221, 1035-1043, DOI 10.1016/j.snb.2015.07.017 (2015)

3.1.5 3D-Druck-Technologie in der Bioprozessentwicklung

Die im vorangegangenen Abschnitt vorgestellte 3D-Drucktechnologie eröffnet über das *rapid prototyping* hinaus die Perspektive im Sinne des *rapid toolings* auch einfache Labormaterialien für die Prozessentwicklung, bedarfsgerecht und individuell maßgeschneidert für die jeweilige Anwendung, direkt vor Ort zu produzieren. Aufgrund der aktuellen Patentlage nach dem Auslaufen wichtiger mit dem 3D-Druck assoziierter Patente wird dieser Technologie künftig auch eine verstärkte Anwendung in der Bioprozessentwicklung finden [136-147]. Im Bereich der betrachteten Schüttelkolbenkultivierungen wurde z.B. ein sterilisierbarer Kolbendeckel aus biokompatiblen Polyamid gestaltet, der über je zwei Luer-Konnektoren männlich und weiblich verfügt, so dass die händische Zugabe von Induktoren, Nährstoff- oder Korrekturlösungen ebenso wie die offline-Probenahme wesentlich vereinfacht werden und keine Kontamination mehr riskiert werden muss (s. Abb. 11A).

Das grundlegende Design wurde mithilfe von CAD-Programmen (computer-aided design) erstellt. Die Entwicklung wurde dann anhand einfacher FDM-gedruckter (fused deposition modelling) Baumuster bis zum optimierten, finalen Design vorangetrieben, bevor dann der funktionale maßgeschneiderte Kolbendeckel mittels SLS-Verfahren in hoher Auflösung gedruckt wurde [148]. Dieser konnte nach dem Abkühlen direkt verwendet werden.

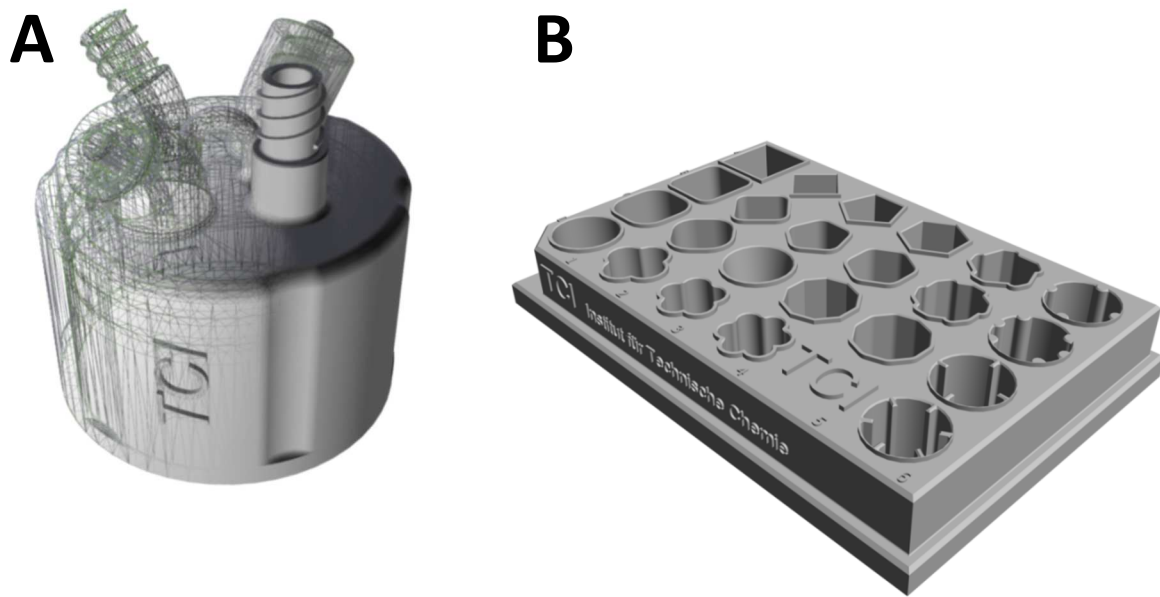


Abb. 11: A: CAD-Visualisierung eines maßgeschneiderten Schüttelkolbendeckels mit Luerlock-Anschlüssen; B: CAD-Zeichnung einer Screening-Mikrotiterplatte mit variablen wells

Um das Potential der 3D-Drucktechnologie für die Prozessentwicklungen im Laborbereich aufzuzeigen, wurde als weiteres maßgeschneidertes Modul eine Mikrotiterplatte mit individueller Gefäßgeometrie entworfen und mittels 3D-Druck gefertigt (s. Abb. 11B). Diese Gefäße (wells) verursachen aufgrund ihrer jeweiligen Form eine unterschiedliche Brechung von Strömungen von z.B. Kulturlösungen in den wells, unterscheiden sich daher in der Turbulenz und führen so zu abweichender Homogenität und Sauerstoffeintrag in die Lösung [149]. Die mit individualisierten wells ausgerüsteten Mikrotiterplatten können so als Screening-Plattform dienen, um die optimale well-Geometrie für ein Kultivierungssystem in diesem Kleinstmaßstab zu finden. In einem Folgeschritt können dann weitere Mikrotiterplatten gedruckt werden, die ausschließlich die als optimal identifizierten well-Geometrien enthalten. Um einen negativen Effekt des 3D-Druckmaterials auf die Prozesse auszuschließen, wurde der Druck auch hier in dem nach USP Klasse 6 (United States Pharmacopeia) als biokompatibel zertifizierten PA12 von 3D-Druck Systems Inc. (Rockhill, USA) durchgeführt.

Publikation 10:

T. H. Lücking, F. Sambale, S. Beutel, T. Scheper: 3D-printed individual labware in biosciences by rapid prototyping: A proof of principle, *Engineering in Life Science*, 15(1), 51-56, DOI: 10.1002/elsc.201400093 (2015)

3.1.6 Biokompatibilitätstestung von 3D-Druck-Materialien

Ein weiterer Kunststoff mit UV-Stabilisierer, PA12 UV, der durch erhöhte UV-Stabilität weitere Vorteile für die Verwendung in Bioprozessen brächte, wurde gemäß ISO 10993-12:2012 [150] auf seine Biokompatibilität getestet und seine Eignung für den Einsatz in der Bioprozesstechnik untersucht [151].

Hierfür wurde der pulverisierte Kunststoff 72h im jeweiligen Kulturmedium inkubiert und mit den entstandenen Extraktionsmedien daraufhin Kultivierungen der adhärent wachsenden Modellzelllinien A549 (humane epitheliale Lungenzelllinie) und NIH-3T3 (Mausfibroblast) durchgeführt [152]. Die Untersuchungen der Zellvitalität nach 24 h zeigten weder bei PA12 noch bei PA12 UV Verschlechterungen im Wachstum, wie durch CTB(CellTiterBlue)-Assay, LDH(Lactatdehydrogenase)-Assay sowie manuelle Zellzählung bestätigt werden konnte [153]. Eine in Suspension in Extraktionsmedium kultivierte CHO-Zelllinie (chinese hamster ovary, CHO-K1-HP) zeigte hingegen sogar ein wesentlich verbessertes Wachstum im PA12 UV-Extraktionsmedium, was auf den zugefügten UV-Stabilisierer zurückzuführen sein könnte, der vom Hersteller nicht offengelegt wird. Es könnte sich hierbei um ein Antioxidans handeln, welches die Anzahl radikaler Sauerstoffspezies (ROS, radical oxygen species) erniedrigt, die einen negativen Effekt auf das Zellwachstum haben [154-156]. Mit $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml im Vergleich zu $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml konnte im PA12 UV-Extraktionsmedium eine doppelt so hohe Lebendzellzahl als im unbehandelten und im PA12-Extraktionsmedium erreicht werden.

Nach uneingeschränkter Bestätigung der Biokompatibilität wurde die oben beschriebene Mikrotiterplatte mit individueller Gefäßgeometrie für die Kultivierung eingesetzt, um den Einfluss der well-Geometrie auf das Zellwachstum zu untersuchen. Als Modell wurde die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gewählt, die als schnell wachsender Eukaryot einen hohen

Sauerstoffbedarf aufweist. Die Kultivierungen wurden anhand der OD_{600} nach 24 h Kultivierung bewertet. Es zeigte sich ein deutlich positiver Effekt durch Ecken in der well-Form. So war die OD_{600} in quadratischen wells um den Faktor 2,5 höher als in runden, was an der vergrößerten Turbulenz der Strömung im eckigen well liegen könnte, die eine bessere Durchmischung und einen höheren Sauerstoffeintrag ins Medium ermöglicht. Diese These wird auch durch das graduell verbesserte Wachstum bei den abgerundeten Varianten (5mm- und 10mm-Eckenradius) unterstützt und ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Funke et al., 2009 [149].

Publikation 11:

T. H. Lücking, F. Sambale, B. Schnaars, D. Bulnes-Abundis, S. Beutel, T. Scheper: 3D-printed individual labware in biosciences by rapid prototyping: In vitro biocompatibility and applications for eukaryotic cell cultures, *Engineering in Life Science*, 15(1), 57-64, DOI: 10.1002/elsc.201400094 (2015)

Die hier vorgestellten Konstruktions-, Sensorik- und Aktorik-Elemente können als typische Beispiele für enabling technologies im Upstream-Bereich der Bioprozessentwicklung angesehen werden, die das Prozesswissen und die Steuerbarkeit der Bioprozesse schon im frühen Entwicklungsstadium erhöhen, wenn die Stammentwicklung, die Optimierung der Kultur- und Expressionsbedingungen oder die Anzucht im Fokus stehen. Sie verringern so wesentlich die Prozessentwicklungszeiten und können darüber hinaus helfen erste Kenntnisse zur angestrebten Prozessarchitektur (z.B. Statierungs- oder Fütterungsstrategien) zu erlangen. Die 3D-Drucktechnologie eröffnet bei der Gestaltung solcher enabling technologies zusätzlich neue Möglichkeiten, sowohl durch die hohe Variabilität und Individualisierbarkeit der Bauelemente als auch durch die bedarfsgerechte Herstellung vor Ort.

3.2 Downstream enabling technologies

Ebenso wie im Upstream-Bereich ist auch im Downstream Processing eine stetige Weiterentwicklung der angewandten Techniken unabdingbar. Im Downstream Processing betrifft dies vor allem die Aufarbeitungstechnologien, da einerseits ein großer Kostenanteil der Gesamtprozesskosten in der Isolierung und Aufreinigung liegt und andererseits manch existierende Lösungen zur wissenschaftlichen Untersuchung, wie beispielhaft die Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie anhand integrierter His-tags, nicht für die industrielle Anwendung geeignet sind. So werden vor allem kostensparende und schonende Verfahren mit wenigen Prozessschritten gesucht, die die zu produzierenden Zielenzyme möglichst effektiv isolieren und gleichzeitig wenig in ihrer Aktivität beeinträchtigen. Verschiedene Techniken können für die schonende Aufreinigung von Enzymen in Frage kommen, wie etwa die wässrige Zweiphasenextraktion oder die Membranchromatographie, die zudem eine Einsparung von Prozessschritten ermöglicht. Dies kann zu einer Einsparung von Zeit und Kosten führen, ebenso wie die Verbesserung herkömmlicher Aufarbeitungsmaterialien durch nachträgliche Funktionalisierung. Die im Folgenden beschriebenen Arbeiten zum Einsatz innovativer Verfahrensansätze und Prozesstechnologien für die Aufarbeitung gliedern sich wie folgt:

1. Modifizierung herkömmlicher Aufarbeitungsmedien für die gezielte Interaktion mit Enzymen (siehe Kapitel 3.2.1),
2. Evaluation der Membranchromatographie für die Enzymaufreinigung als Alternative zur klassischen Säulenchromatographie (siehe Kapitel 3.2.2),
3. Grundlegende Untersuchungen zum Einsatz der schonenden wässrigen Zweiphasenextraktion für die Aufreinigung von Enzymen(siehe Kapitel 3.2.3).

3.2.1 Tiefenfiltermodifikation für den Einsatz in der Enzymaufreinigung

Ein Beispiel für eine solche nachträgliche Funktionalisierung wurde in dem BMBF-geförderten Vorhaben „Neue Reaktionskonzepte für enzymatische Reaktionen auf der Basis von immobilisierten Enzymen“ untersucht [157-160]. Hier wurde die Möglichkeit untersucht die

kombinierte Isolierung und Immobilisierung eines industriell relevanten Modellenzym (hier: *Candida antarctica* Lipase B (CalB), E.C. 3.1.1.3) mit modifizierten Tiefenfiltern in einem einzelnen Prozessschritt zu erreichen. Hierfür wurden Tiefenfilter, die standardisiert in biotechnologischen Prozessen für die Klärung von Zellkulturbrühe eingesetzt werden, verwendet. Sie bestehen aus einer Filtermatrix aus Cellulose und Kieselgel mit großer adsorptiver Kapazität. Sie eignen sich dadurch für die Entfernung von Partikeln, Zellen, Zelltrümmern, Kolloiden und anderen Störstoffen, wie z.B. host cell Proteinen [161] und gelten als effektive und kostengünstige Trenntechnik insbesondere bei der Bearbeitung großer Prozessvolumina oder von Kulturmedien mit hohen Zelldichten [162]. Um aber die Tiefenfilter für eine definierte Aufreinigungsaufgabe zu nutzen und das Zielenzym so stark zu binden, dass es direkt als Immobilisat eingesetzt werden kann, muss neben der rein adsorptiven Wirkung der Tiefenfilter eine spezifischere und stärkere Wechselwirkung mit dem Zielprotein erreicht werden.

Hierfür wurden die Tiefenfilter mit dem innovativen Layer-by-Layer-Verfahren mit alternierend geladenen Polyelektrolytschichten funktionalisiert, so dass sowohl anionische als auch kationische Wechselwirkungen mit dem Modellenzym getestet werden konnten [163, 164]. Die eingesetzten Tiefenfilter waren 3,9 mm dick, enthielten 49% Kieselerde als Filterhilfsmittel und wiesen einen Wasserdurchfluss von 60 l/m²min bei 100 kPa auf; die BET-Oberfläche (Brunauer-Emmet-Teller) betrug circa 455 m². Als Polyelektrolyten wurden PEI (Polyethylenimin) und PAH (Polyallylaminhydrochlorid) als kationische sowie PSS (Polynatrium-4-styrolsulfonat) als anionischer Schichtbildner verwendet, so dass bei Variation der Schichtbildner und unter zusätzlicher Verwendung von Glutaraldehyd als quervernetzendem Stabilisator eine Vielzahl an möglichen Oberflächen resultierte.

Die so erhaltenen Tiefenfilter wurden für die Immobilisierung des Modellenzym CalB getestet, das aufgrund seines breiten isoelektrischen Bereiches (pI 4,0-8,0) keine explizite Präferenz für anionische oder kationische Wechselwirkungen zeigt. Die Untersuchungen ergaben die beste Performance für die PAH/PSS-beschichteten anionischen Tiefenfilter, die eine Kapazität von 1,0 mg/m² (bestimmt nach Bradford) und eine Aktivität von 122,8 U/g in Bezug auf p-Nitrophenylacetat (p-NPA) aufwiesen. Dieser im Vergleich zu Literaturdaten sehr geringe Bedeckungsgrad (0,34% nach dem Langmuir-Modell) lässt eine Immobilisierung der CalB in einer Einzellege vermuten, so dass keine Diffusionslimitierungen resultieren sollten,

was durch die im Vergleich zu den Literaturdaten außerordentlich hohe Aktivität untermauert wird. Die erzeugten Immobilisate sind darüber hinaus sehr stabil, ein Verlust der halben Aktivität erfolgte innerhalb von 108 Tagen.

Um neben der Immobilisierungseffizienz auch die Eignung für die direkte Isolierung des Modellenzym aus einer Kulturbrühe zu testen, wurden die Tiefenfilter für die CalB-Isolierung aus zellfreiem Kulturüberstand sowie ultraschall-behandelter Kulturbrühe eines in TB-Medium kultivierten CalB-produzierenden *E.coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS pET26b(+)-CalB-Stammes eingesetzt [165]. Es zeigte sich eine Verringerung der Kapazitäten um circa 15%, unabhängig von der applizierten Zelldichte, während sich die Aktivität nach einem Maximum von circa 80 U/g bei $OD_{600} = 5$ mit steigender Zelldichte stetig verringerte. Dies kann mit der steigenden Konzentration an host cell Proteinen erklärt werden, die um die Bindungsstellen im Tiefenfilter konkurrieren und die CalB so verdrängen. Es zeigt sich somit eine prinzipielle Eignung der modifizierten Tiefenfilter für eine gleichzeitige Isolierung und Immobilisierung, wobei dem Einsatz bei zu hohen Zell- bzw. Proteinkonzentrationen durch die kompetitive Bindung an die Polyelektrolytschichten Grenzen gesetzt sind. Unter Umständen könnte ein Ansatz unter Ausnutzung von Affinitätswechselwirkungen hier die bessere Wahl sein, da so die unerwünschte Bindung von host cell Proteinen unterbunden wird.

Publikation 12:

S. Schreiber, A. Thiefes, U. Schuldt, L. Dähne, T. Scheper, S. Beutel: New Application of Depth Filters for the Immobilization of *Candida antarctica* lipase B, *Applied Microbiology and Biotechnology* (2016), DOI: 10.1007/s00253-016-7764-5

3.2.2 Membranadsorber für die Enzymbereinigung

Neben solch innovativen Konzepten zur Kombination von Prozessschritten durch Modifikation herkömmlicher Aufarbeitungsmedien stellt sich gemeinhin für jedes aufzureinigende Enzym die Frage nach dem optimalen Trennverfahren, eine Frage die nach wie vor zumeist mit klassischer Säulenchromatographie beantwortet wird. Diese gilt als Goldstandard, da sie vielfältige Interaktionsprinzipien sowie großes Trennvermögen und Auflösung mit hohem

industriellem Reifegrad verbindet [166]. Allerdings bringt sie auch einige Nachteile mit sich, wie die absatzweise Betriebsführung, die schlechte Skalierbarkeit bzgl. der Länge, einen begrenzten konvektiven Fluss oder die große Prozessdauer aufgrund von Diffusionslimitierungen. So wird die Suche nach neuen Verfahren begründet, die diese Einschränkungen überwinden sollen [167]. Eine Möglichkeit, die Vorteile der Säulenchromatographie unter Vermeidung ihrer Nachteile auszunutzen, besteht in der sogenannten Membranchromatographie, bei der die Liganden auf Membranen als Trägermaterial immobilisiert werden [168]. Hierdurch kann zwar einerseits keine so hohe Bindungskapazität erzeugt werden, andererseits aber eine höhere Durchströmungsgeschwindigkeit realisiert werden aufgrund geringerer Diffusionslimitierung und aktiven Transports zu den Bindungsstellen. Zudem ist eine leichte Skalierbarkeit gegeben, was die Membranchromatographie für den industriellen Einsatz besonders interessant macht [169].

Im Rahmen des BMBF-geförderten Vorhabens „Neue Membranadsorbertechnologie zur Aufarbeitung in der Enzymproduktion“ wurde die Eignung membranchromatographischer Verfahren für die Isolierung und Aufreinigung industriell relevanter Modellenzyme untersucht [170]. Diese wurden hierbei so gewählt, dass sie einerseits die wichtigsten technischen Einsatzgebiete abdeckten und andererseits verschiedene Interaktionsprinzipien [171]. Ausgewählt wurden:

1. die Penicillin-G-Amidase (PGA, E.C. 3.5.1.11), exprimiert in *E.coli* als Modell für Ionenaustausch und Repräsentant pharmazeutischer Enzyme (4% Marktanteil) (siehe Kapitel 3.2.2.1),
2. die Cellulase Cel5A aus *Fervidobacterium gondwanense* mit 6xHis-tag (E.C. 3.2.1.4), exprimiert in *E.coli* als Modell für Affinitätschromatographie und Repräsentant für Enzyme der Papier- und Waschmittelindustrie (8% resp. 38% Marktanteil) (siehe Kapitel 3.2.2.2),
3. die Lipase aGTL (E.C. 3.1.1.3) aus *Geobacillus thermoleovorans*, exprimiert und sekretiert von *Staphylococcus carnosus* als Modell für hydrophobe Interaktionschromatographie sowie sekretierte Enzyme und Repräsentant der Lebensmittelindustrie (50% Marktanteil) (siehe Kapitel 3.2.2.2).

3.2.2.1 PGA-Aufreinigung mittels Membranchromatographie

Für die Untersuchung der PGA (MW 70 kDa, pI 8,5) wurde der Produktionsstamm *E. coli* 5KpHM12 in LB-Medium (lysogeny broth) kultiviert und mittels Ultraschallbehandlung und Zentrifugation ein Zelllysat hergestellt [172]. Dieses wurde zunächst in sogenannten bind&elute-(Bindungs- und Elutions-) Versuchen mit Ionenaustauschmembranen im Hochdurchsatzscreening eingesetzt, um sowohl die optimale Wechselwirkung als auch die Basisparameter für die Isolierung zu ermitteln. Es ergab sich eine optimale Wechselwirkung mit starken Kationenaustauschermembranen, die mit Sulfonsäuremolekülen funktionalisiert sind. Bei Beladung bei pH 6,0 und Elution bei pH 6,0 in Gegenwart von 0,05 M NaCl konnten so 98% der PGA isoliert werden ohne sichtbare Verunreinigung durch host cell Proteine; die so isolierte PGA wies eine Restaktivität von 80-85% auf. Das Verfahren wurde auf eine FPLC-Anlage übertragen (Fast protein liquid chromatography), so dass Durchbruchverhalten und dynamische Bindungskapazitäten ermittelt werden konnten. Diese zeigten dynamische Bindungskapazitäten von $Q_{10} = 0,69 \text{ mg/cm}^2$ für 10% Durchbruch respektive $Q_{\max} = 0,95 \text{ mg/cm}^2$ für 100% Durchbruch bei Unabhängigkeit von der Flussrate bis 5ml/min. So konnte mit dem Zelllysat letztlich eine vierfache Aufkonzentrierung der PGA und ein Aufreinigungsfaktor von 101,3 (ermittelt aus der Aktivität) in einem einzelnen Prozessschritt realisiert werden, was das große Potential der Membranchromatographie belegt. Der Einsatz eines alternativ hergestellten Membranmaterials mit sogenannter doppelporöser Struktur statt der üblicherweise aufgepfropften Hydrogelschicht konnte darüber hinaus die Bindungskapazität der Membran noch einmal um das 2,5-fache auf $2,48 \text{ mg/cm}^2$ steigern.

Publikation 13:

A. Münster, L. Villain, T. Scheper, S. Beutel: One-step-purification of penicillin G amidase from cell lysate using ion-exchange membrane adsorbers, Journal of Membrane Science, Volume 444 (2013), 359-364

3.2.2.2 Membranchromatographische Aufreinigung von Cellulasen und Lipasen

Die Aufreinigung der Cellulase Cel5A (MW 41 kDa) diente aufgrund des integrierten His-tags als Modellenzym für die IMAC mit Iminodiacetat-funktionalisierten Membranen [170]. Zunächst wurde der rekombinante *E. coli* M15Cel5A in Schüttelkolbenkulturen in LB-Medium angezogen und bei einer $OD_{600} = 0,6-0,7$ mit 1mM IPTG die Produktion der Cellulase 5A induziert. Die abzentrifugierte Zellmasse wurde resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung lysiert. Nach Zentrifugation zur Abtrennung der Zelltrümmer wurde der Überstand für die Untersuchungen zur affinitätschromatographischen Aufreinigung der Cel 5A anhand des His-Tags mittels IDA-funktionalisierten Cellulosemembranen verwendet. Zunächst wurden unter Standardbedingungen im Hochdurchsatzformat verschiedene divalente Kationen für die Koordination an die Iminodiacetat-Liganden und des Zielenzyms getestet und eine Bewertung hinsichtlich Bindungskapazität und Enzymrestaktivität nach Aufreinigung durchgeführt [173]. Es zeigte sich, dass Zn^{2+} die insgesamt beste Performance zeigte, mit der zweithöchsten Bindungskapazität von $Q_{max} = 0,54 \text{ mg/cm}^2$ für das Zielenzym, dem niedrigsten Anteil an host cell Proteinen in den Elutionsfraktionen und einer enzymatischen Restaktivität nach Aufreinigung von 98%.

Für dieses System (Zn^{2+} -dekorierte, IDA-funktionalisierte hydrogel-gepfropfte Cellulosemembran) wurden die Bindungs- und Elutionsbedingungen optimiert, die eine optimale Bindung bei pH 6,0 in Gegenwart von 20 mM Imidazol, 50 mM Natriumacetat sowie 500 mM NaCl zeigte und eine optimale Elution bei pH 8,0, 200 mM Imidazol, 50 mM NaH_2PO_4 und 500 mM NaCl. Unter diesen Bedingungen konnten 94% des Enzyms mit 98% Restaktivität aus dem Zelllysat isoliert werden. Eine folgende Aufskalierung in die Prozessmodulgeometrie (totvolumen-optimiert, kleinste Skalierung 3ml Bettvolumen) und Betrieb in einer FPLC zeigte das Potential dieses einstufigen Aufreinigungsverfahrens und lieferte die Cellulase 5A als Produkt, nahezu frei von HCP, mit einer Aktivität von 197,68 U/mg bei einem Aufreinigungsfaktor von 4,3. Der Vergleich mit Literaturdaten belegt die außerordentlich gute Aufreinigungseffizienz, die auch in diesem Fall wie schon bei der PGA durch den Einsatz eines prototypischen Membranmaterials mit doppelporöser statt gepfropfter Struktur noch einmal fast um den Faktor 4 auf $Q_{max} = 1,97 \text{ mg/cm}^2$ gesteigert werden konnte, während die Restaktivität unverändert blieb [174].

Für die Untersuchung zur Aufreinigung der Lipase aGTL (MW 46 kDa, pI 6,77) wurde der rekombinante *Staphylococcus carnosus* pXR-aGTL im Schüttelkolben in LB-Medium bis zu $OD_{600} = 0,6-0,7$ angezogen und sodann mit 0,5% (v/v) Xylose die Produktbildung induziert [170]. Nach 24h Inkubation wurde die Zellmasse abzentrifugiert und der Zellkulturüberstand, der die sekretierte Lipase aGTL enthielt, weiterverwendet. Aktivitätsuntersuchungen zeigten hierbei eine Sekretionseffizienz von cirka 66% des produzierten Enzyms [175].

Zwei unterschiedliche Membranadsorber wurden für die Aufreinigung getestet, zum einen eine klassische HIC-Phenylmembran, zum anderen eine sogenannte mixed-mode-Membran, in der neben der hydrophoben Interaktion auch elektrostatische Wechselwirkungen möglich sind. Die verwendete mixed-mode-Kationenaustauschmembran zeigte im Screening hierbei beste Aufreinigungsperformance bei Bindung bei pH 5,0 und Elution bei pH 8,0, so dass in einem einzelnen Aufreinigungsschritt 93% der Lipase aGTL mit einer verbliebenen Restaktivität von 98% gewonnen werden konnten. Die hohe maximale dynamische Bindungskapazität von $Q_{max} = 1,86 \text{ mg/cm}^2$ konnte auch in der folgenden Aufskalierung in die Prozessmodulgeometrie (3ml Bettvolumen) und Betrieb in einer FPLC bestätigt werden. Die Lipase aGTL konnte so als finales Produkt bei einem Aufreinigungsfaktor von 7,8 mit einer spezifischen Aktivität von 6,86 U/mg gewonnen werden, so dass sich auch hier das große Potential der Membranchromatographie zeigt, als einstufiges Aufreinigungsverfahren hohe Produktqualität und -quantität in kurzer Prozesszeit zu erzeugen [176].

Anhand der drei ausgesuchten Modellenzym-Aufreinigungsprozesse kann die grundlegende Adaptierbarkeit der Membranchromatographie für verschiedenste Trennaufgaben und Bindungswechselwirkungen belegt werden, wobei die einfache Skalierbarkeit der Membranadsorber in der Prozessmodulgeometrie (Wickelmodule) helfen kann, diese leicht auch für industrielle Einsätze zu qualifizieren und ausreichende Membranfläche für die Bindungswechselwirkungen auch bei hohem Durchsatz anzubieten. Somit ermöglicht die Membranchromatographie es, genau die Nachteile der klassischen Säulenchromatographie zu kompensieren, nämlich die schlechte Skalierbarkeit ebenso wie den geringen Durchsatz aufgrund der zeitintensiven Diffusion der Zielmoleküle zu den Bindungsstellen.

Buchkapitel 1:

S. Beutel, L. Villain, T. Scheper: Industrial Application of Membrane Chromatography for the Purification of Enzymes, Chapter 13: 294-313, in Applied Biocatalysis – From Fundamental Science To Industrial Application L. Hilterhaus, A. Liese, U. Kettling, G. Antranikian (Herausgeber,) 1. Auflage, August 2016. XXVI, 435 Seiten, ISBN 978-3-527-33669-2, Wiley-VCH, Weinheim

3.2.3 Wässrige Zweiphasenextraktion in der Enzymaufreinigung

Ein weiterer fundamentaler Aspekt der Aufreinigung von Enzymen oder allgemein Biomolekülen ist der Erhalt der biologischen Aktivität. Herkömmliche Aufreinigungsverfahren wie die Lösemittelextraktion oder die Destillation scheiden daher oft für einen Einsatz aus, da sie das Produkt entweder chemisch oder thermisch zu sehr beeinflussen. Aber auch hier werden Möglichkeiten gesucht, um einen Einsatz dieser ansonsten hoch effizienten Trenntechniken doch zu ermöglichen [177]. Einen Ansatz hierzu bietet z.B. die Extraktion in wässrigen Zweiphasensystemen (ATPS = aqueous two-phase systems), bei der auf den Einsatz von organischen Lösemitteln verzichtet wird und die Phasenbildung durch inkompatible Polymere bzw. Polymer-Salz-Systeme erzwungen wird, so dass eine schonende Extraktion von Biomolekülen in rein wässrigen Systemen stattfinden kann [178-181]. Jedoch sind diese ATPS komplex und das Verteilungsverhalten von Biomolekülen in den resultierenden Phasen bisher zumeist nur empirisch untersucht worden [182, 183]. Aus diesem Grund ist zunächst eine grundlegende Untersuchung der Bildung von wässrigen Zweiphasensystemen für relevante Phasenbildner und die Charakterisierung in Hinblick auf Binodalkurven, Konoden, kritische Entmischungspunkte und effektive Ausschlussvolumina wichtig [184], bevor ein Einsatz für die Aufreinigung von Enzymen in Betracht kommt.

Die im Folgenden beschriebenen Arbeiten beschreiben die grundlegende Evaluation wässriger Zweiphasensysteme für die Anwendung in der Enzymaufreinigung und gliedern sich wie folgt:

1. Untersuchung der Einflüsse beteiligter Komponenten auf die Phasenbildung (siehe Kapitel 3.2.3.1),

3. Methoden der Bioprozessentwicklung

2. Evaluation quantitativer Analytik für die phasenbildenden Komponenten (siehe Kapitel 3.2.3.2),
3. Evaluation quantitativer Analytik für die enzymatische Zielkomponente (siehe Kapitel 3.2.3.3),
4. Einsatz statistischer Versuchsplanung für die Entwicklung und Optimierung von ATPS für die Enzymaufreinigung (siehe Kapitel 3.2.3.4),
5. Review erfolgreich etablierter ATPS-Verfahren im Bereich der Enzymtechnik (siehe Kapitel 3.2.3.5).

3.2.3.1 Grundlegende Untersuchungen zur Phasenbildung in PEG/Salz-Systemen

Um Gesetzmäßigkeiten bezüglich der Phasenbildung und somit der die Gleichgewichtsverteilung einer Zielkomponente bedingenden Ursachen zu erfassen, wurden exemplarisch ATPS in den Systemen Polyethylenglykol (PEG)/Kaliumphosphat und PEG/Natriumcitrat durchgeführt, wobei Variationen hinsichtlich der Konzentrationen der Phasenbildner, der PEG-Molekülmasse (2.000 - 8.000 g/mol), des pH (pH 5-9) und der Konzentration von NaCl als Additiv (0 - 8% (w/w)) betrachtet wurden [185-192]. Zunächst wurde für alle Kombinationen mittels der Cloudpoint-Methode die jeweilige Binodale des ATPS ermittelt. Hierbei wird anhand der Titration definierter Salzlösung in eine definiert konzentrierte Polymerlösung der mit Erreichen des Zweiphasengebietes einsetzende Trübungspunkt und so letztlich die Zusammensetzung des ATPS in diesem Punkt bestimmt. Dies erlaubt aus vielen Einzelmessungen letztlich die Binodalkurve für das ATPS zu konstruieren und ihren Verlauf mathematisch zu beschreiben. Hierbei wurden beste Übereinstimmungen ($R^2 > 0,999$) mit einer von Hu et al., 2004 vorgeschlagenen empirischen nicht-linearen Korrelationsfunktion gefunden [193]. Anhand dieser Binodaldaten wurden dann bekannte ATPS-Zusammensetzungen innerhalb des Zweiphasengebietes hergestellt und intensiv durchmischt, damit sich das thermodynamische Gleichgewicht einstellen konnte. Nach Phasentrennung wurden die resultierenden Top- und Bottom-Phasen separiert, volumetrisch und gravimetrisch gemessen und die jeweiligen Konzentrationen von Polymer (über Brechungsindexmessung) und Salz (über Leitfähigkeitsmessung) bestimmt, so dass anhand dieser Daten die Konoden

konstruiert werden konnten, deren Phasenzusammensetzungen in den Schnittpunkten mit der Binodalen sehr gut sowohl mit der Othmer-Tobias-Gleichung [194] als auch mit der Bancroft-Gleichung [195] korrelierten ($R^2 > 0,999$).

Anhand dieser umfangreichen experimentellen Daten konnten verschiedene grundlegende Tendenzen ermittelt werden. Einen großen Einfluss hat die PEG-Molekülmasse. Bei sukzessiver Vergrößerung des Polymers von 2.000 g/mol bis 8.000 g/mol verändert sich zwar die Form der Binodalkurve nur geringfügig, aber die Lage wird stark in Richtung geringerer Konzentrationen der Phasenbildner gedrängt, unabhängig vom eingesetzten Salz [196]. Das heißt, dass bei großen Polymeren wesentlich geringere Konzentrationen, auch des Salzes, für die Phasenbildung benötigt werden und dass das Zweiphasengebiet insgesamt vergrößert wird. Dies dürfte auf der mit der Molekülgröße steigenden Hydrophobizität beruhen, die die Inkompatibilität mit dem Salz vergrößert und so ein Aussalzen des Polymers begünstigt, was letztlich die Bildung der Polymerphase bedeutet. Bestätigt wird dies auch durch die mit der Molekülmasse steigenden effektiven Ausschlussvolumina (effective excluded volume, EEV), ein von Guan et al. [197, 198] entworfenes Modell zur Beschreibung des Anteils einer Phase, der für die Lösung der anderen Komponente nicht zur Verfügung steht.

Auch der pH-Wert zeigte einen signifikanten Einfluss auf die Lage der Binodalkurve. So verschiebt sich diese mit steigendem pH in Richtung geringerer Konzentrationen der Phasenbildner. Erklärbar ist dies durch die Kosmotropie der Salze gemäß der Hofmeister-Reihe [199], die mit steigendem pH die Hydratation steigern sowie die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen bewirken und somit letztlich zu einer stärkeren Strukturierung des Wassers führen [200]. Das hierfür nötige Wasser steht entsprechend nicht mehr für die Lösung des Polymers zur Verfügung. Bestätigt wird dies auch durch das Resultat, dass sich der Effekt vom Citrat zum Phosphat hin verstärkt, in Richtung zunehmender Kosmotropie der Salze [201, 202]. Auch die Zugabe von NaCl als Additiv bewirkt einen entsprechenden Hydratationseffekt, der die für die Ausbildung der zwei Phasen nötigen Konzentrationen weiter verringert [203-205]. Diese grundlegenden Tendenzen bei der Ausbildung der koexistierenden Phasen der ATPS können helfen die Verteilung von Enzymen zwischen diesen im thermodynamischen Gleichgewicht zu verstehen.

Publikation 14:

A. Glyk, T. Scheper, S. Beutel: Influence of different phase-forming Parameters on the Phase Diagram of several PEG-Salt Aqueous Two-Phase Systems, Journal of Chemical & Engineering Data, 59(3), 850-859; DOI 10.1021/je401002w (2014)

3.2.3.2 Quantifizierung der systembildenden Komponenten in PEG/Salz-Systemen

Ein bislang in der Untersuchung von ATPS relativ unbeachteter Aspekt ist die Beeinflussung der Quantifizierbarkeit der Systemkomponenten durch die Gegenwart der anderen. Um hier einen systematischen Ansatz zu schaffen, wurde zunächst die Quantifizierung der phasenbildenden Komponenten in Gegenwart der aufzureinigenden Proteine respektive Enzyme untersucht. Um deren Einfluss auf die Bestimmbarkeit zu ermitteln, wurden ATPS exemplarisch in Gegenwart des Modellproteins bovines Serum Albumin (BSA) untersucht. Die untersuchten ATPS der Systeme Polyethylenglykol (PEG)/Kaliumphosphat und PEG/Natriumcitrat wurden hinsichtlich des Einflusses steigender BSA-Konzentrationen von 0-2% (w/w) und der Konzentrationen der Phasenbildner, der PEG-Molekülmasse (2.000 - 8.000 g/mol) und des pH (pH 5-9) auf die messbare Leitfähigkeit (zur Quantifizierung der Salze) respektive den Brechungsindex (zur Quantifizierung der PEG) betrachtet.

Es zeigte sich eine Abhängigkeit der Leitfähigkeit von der Proteinkonzentration, die sich um 0,015 mS/cm je 1% (w/w) BSA erhöhte. Zudem zeigte sich eine Erhöhung der Leitfähigkeit mit steigendem pH, was auf die vermehrte Freisetzung von Ionen zurückzuführen ist und eine leichte Verringerung der Leitfähigkeit mit steigender PEG-Molekülmasse, was auf der mit der PEG-Größe steigenden Viskosität und der daraus resultierenden geringeren Ionenmobilität beruht [206]. Die Brechungsindex-Messung zeigte einen noch ausgeprägteren Einfluss der Proteinkonzentration, die sich um $\Delta n_D = 0,001$ je 1% (w/w) BSA erhöhte. Ebenso zogen steigende PEG-Molekülmassen, steigende PEG-Konzentrationen sowie steigende Salzkonzentrationen signifikante Erhöhungen des messbaren Brechungsindex nach sich, was vermutlich auf die Erhöhung der Dichte der Lösung zurückzuführen ist [207]. Insgesamt kann konstatiert werden, dass anwesende Proteine wie auch die weiteren Bestandteile die Messung der phasenbildenden Komponenten beeinflussen, so dass auf eine entsprechende

Probenverdünnung zu achten ist, um die Komponenten in Lösung exakt (im Bereich linearer Korrelation) zu bestimmen; die hierfür ermittelten Konzentrationsbereiche für die Messungen sind: 0-2% (w/w) BSA, 0-10% (w/w) PEG und 0-5% (w/w) Salz.

Publikation 15:

A. Glyk, T. Scheper, S. Beutel: Determination of aqueous two-phase system phase-forming components in the presence of bovine serum albumin, Notes & Tips, Analytical Biochemistry, 455, 10-12; DOI 10.1016/j.ab.2014.03.009(2014)

3.2.3.3 Bestimmbarkeit der enzymatischen Zielkomponente in PEG/Salz-Systemen

Ebenso grundlegend ist im Umkehrschluss auch die Bestimmbarkeit von Enzymen in Gegenwart der phasenbildenden Komponenten [208-211]. Der Einfluss dieser Komponenten auf die exakte Quantifizierung von verschiedenen Modellproteinen mittels Standardmethoden, wie Bradford- und BCA-Assay (Bicinchoninsäure) wurde daher auch eingehend untersucht [212, 213]. Als Modellproteine respektive -enzyme wurden BSA, Ovalbumin (OVA), Lysozym (LYS) und α -Chymotrypsin (CT) in Zielkonzentrationen von 1 mg/ml verwendet. Es wurden auch hier wiederum PEG von 2.000 – 8.000 g/mol als Polymer- sowie Kaliumphosphat und Natriumcitrat als Salzkomponenten in Massenanteilen von 0-30% (w/w) untersucht.

Die Untersuchungen zeigten einen signifikanten Effekt steigender PEG-Molekülmasse sowie PEG- und Salzkonzentrationen auf die bestimmbare Proteinkonzentration mit beiden Standard-Proteinassays, wobei der BCA-Assay durchweg für alle untersuchten Modellproteine bessere Ausbeuten zeigte (bis zu 10% bei hohen Konzentrationen der phasenbildenden Komponenten). Der BCA-Assay ist dem Bradford-Assay hier also überlegen, auch wenn die Durchführung etwas zeitaufwändiger ist. Der Effekt könnte auf einer kompetitiven Bindung der Polymere an die Färbeagenzien beruhen oder auf der Koordination der PEG an die Proteinmoleküle, die so für die Farbreaktion nicht mehr zur Verfügung stehen. Auch die zunehmende Viskosität der PEG mit steigender Molekülmasse könnte einen Beitrag leisten

[214-216]. Insgesamt lässt sich auch hier konstatieren, dass eine definierte Probenverdünnung unabdingbar ist, um exakte Proteinkonzentrationen in ATPS zu erfassen.

Publikation 16:

A. Glyk, S. Heinisch, T. Scheper, S. Beutel: Comparison of colorimetric methods for the quantification of model proteins in aqueous two-phase systems. Notes & Tips, Analytical Biochemistry 477, 35-37 (2015)

3.2.3.4 Statistische Versuchsplanung für die Enzymbereinigung mit PEG/Salz-Systemen

Die bisherigen Untersuchungen zeigen die hohe Komplexität der ATPS, in denen die vielen beteiligten Komponenten aufeinander Einfluss nehmen. Dies macht auch die Adaption, Auslegung und Optimierung der ATPS für spezifische Trennprobleme aufwändig und schwer vorhersagbar. Insbesondere klassische Optimierungsverfahren, wie der OFAT-Ansatz (one factor at time) geraten hier an ihre Grenzen und führen zu großen Versuchszahlen, ohne jedoch die direkten und wechselseitigen Auswirkungen der einflussnehmenden Faktoren im Detail zu berücksichtigen [217-219]. Geeigneter erscheinen hier Methoden der statistischen Versuchsplanung (DoE, design of experiments), bei denen auch Wechselwirkungen der ausgewählten Faktoren berücksichtigt werden und die Zahl der Experimente für eine vollständige System-Optimierung maßgeblich verringert [220]. Zunächst müssen in einem Screening-Ansatz die signifikanten Faktoren identifiziert werden, was z.B. durch VFD (voll faktorielles Design) oder TFD (Teil-faktorielles Design) erreicht werden kann, bei denen in 2^k respektive 2^{k-n} Experimenten die Faktorlevel (+) oder (-) in allen möglichen Kombinationen getestet und so die Effekte und Wechselwirkungen der Faktoren identifiziert werden [221]. Zugleich ermöglichen die Experimente die Größenordnungen der Faktoren anzupassen und die obligatorischen Centerpoint-Experimente die der statistischen Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse. Die typischerweise in DoE für ATPS untersuchten 2-5 relevanten Faktoren sind PEG-Molekulargewicht, PEG-Konzentration, Salzkonzentration, pH und Additivkonzentration, die Temperatur wird wegen mangelnder Signifikanz zumeist nicht berücksichtigt [222]. Die von diesen Faktoren abhängigen Antwortgrößen des Systems sind

in der Regel der Verteilungskoeffizient K , der Aufreinigungsfaktor P und bei Enzymen zudem die Aktivitätsausbeute Y .

Nach der Durchführung und Auswertung der Experimente werden die signifikanten Faktoren ausgewählt, außerdem kann anhand des Responseplots gegebenenfalls der Design-Space optimiert werden, falls das Optimum nicht innerhalb der Faktorenkombination liegen sollte. Auf diesen Schritt folgt nun die eigentliche Optimierung der signifikanten Faktoren hinsichtlich der Antwortvariablen unter Verwendung der Response surface Methodologie (RSM) [223-225]. Dies kann in verschiedenen multiplen Versuchsdesigns erfolgen, wie z.B. dem CCD (central composite design), das entweder als CCC- (central composite circumscribed) oder als CCF-Design (central composite face-centred) gestaltet werden kann, bei denen jeweils weitere Experimente über (CCC) oder in den Responseflächen (CCF) des vom Versuchsraum aufgespannten Würfels durchgeführt werden, oder dem Box-Behnken Design (BBD), bei dem die Eckpunkte des Versuchsraums unberücksichtigt bleiben und stattdessen Versuche auf den Kanten durchgeführt werden [221, 226-228]. Hierbei wird die optimale mathematische Funktion zur Beschreibung der Antwortwerte in Abhängigkeit von den berücksichtigten Faktoren gesucht. Hierbei handelt es sich zumeist um eine Polynomfunktion, die auch nicht-lineare Einflüsse der einzelnen Faktoren und Interaktionen zwischen ihnen berücksichtigt. Die mittels statistischer Regressionsanalyse oder ANOVA (analysis of variance) optimierten Faktorwerte erlauben so die Bestimmung der optimalen Versuchsbedingungen zur Maximierung der Antwortvariablen anhand einer wesentlich geringeren Anzahl von Einzelexperimenten, die dennoch alle komplexen und wechselseitigen Einflüsse der Faktoren berücksichtigt. Die statistische Versuchsplanung kann somit ein äußerst effizientes Mittel für die Auslegung von ATPS für spezifische Aufreinigungsprozesse von Enzymen darstellen und wurde schon erfolgreich auf verschiedene Trennprobleme angewendet [230-238].

Publikation 17:

A. Glyk, D. Solle, T. Scheper, S. Beutel: Optimization of PEG- salt aqueous two- phase systems by design of experiments. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems (2015), 149 (Part_A), 12-21, DOI:10.1016/j.chemolab.2015.09.014

3.2.3.5 ATPS-Anwendungen mit Enzymen

Der Einsatz von ATPS für die Isolierung und Aufreinigung von Enzymen bzw. die Produktaufreinigung in Enzymprozessen lässt sich technisch auf verschiedene Arten durchführen. Führt die einstufige Extraktion zumeist nur zu geringer Produktivität lassen sich Produktausbeute und -reinheit durch mehrstufige Extraktion leicht erhöhen [239]. Darüber hinaus können mehrstufige Extraktionssysteme auch zur Rückextraktion genutzt werden, wenn z.B. die hinsichtlich ihrer Umweltauswirkungen kritisch zu betrachtende PEG-Phase wieder verwendet werden soll [240]. Aber auch hinsichtlich der Prozessintegration können ATPS auf verschiedene Weisen genutzt werden.

So lassen sich ATPS als ISPR-Methode (in situ product removal) einsetzen, indem sie direkt mit der Kulturbrühe vermischt und inkubiert werden. Ziel ist bei dieser sogenannten extraktiven Fermentation der direkte und selektive Übergang eines sekretierten Enzyms in eine der sich ausbildenden Phasen, die einfach abgetrennt werden kann [241]. Verschiedene Prozesse unter Einsatz der extraktiven Fermentation für die Produktion von Enzymen konnten schon realisiert werden [242-251].

Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz der extraktiven Disruption, die für die Produktion beziehungsweise Aufreinigung nicht-sekretierter Enzyme eingesetzt werden kann [252-254]. Hierbei wird die Biomasse einer Kultivierung in ein geeignetes ATPS überführt, in dem dann der Zellaufschluss durch mechanische Techniken (z.B. Ultraschall) vollzogen wird. Aufgrund seiner Eigenschaften separieren sich Kontaminanten und Zielenzym in unterschiedliche Phasen, zumeist wird das Enzym in der PEG-Phase angereichert, während Kontaminanten in der salzreichen Phase verbleiben; die Zelltrümmer wiederum formen eine gut abtrennbare Zwischenphase. Auch für diese extraktive Disruption finden sich erfolgreiche Umsetzungen zur Isolierung verschiedener Enzyme aus Bakterien und Hefen [255-263].

Neben diesen Techniken zur Isolierung von Enzymen aus Kulturbrühe (mit oder ohne Zellaufschluss) aufgrund des Verteilungskoeffizienten besteht natürlich auch die Möglichkeit, die für die Phasenbildung eingesetzten Polymere so zu modifizieren, dass sie eine Affinität für das Zielenzym aufweisen [264, 265]. So wird über die aufgrund der Polaritäten bestehen-

3. Methoden der Bioprozessentwicklung

den Verteilungstendenzen hinaus eine spezifische Bindung ermöglicht, die die Effizienz der Methode entsprechend stark erhöht. So lassen sich durch Stärke- oder Alginat-Liganden verschiedene Amylasen spezifisch binden, während Trimethylamin eine selektive Bindung der Pen-G-Amidase ermöglicht [266-274].

Als letzte Variante lassen sich ATPS natürlich auch als Lösemittel bei der enzymatischen Umsetzung einsetzen, was extraktive Biokonversion genannt wird. Wenn die Systemkomponenten intelligent gewählt werden, kann das System ähnlich wie bei einer Phasentransferkatalyse funktionieren, wobei das Enzym in der PEG-reichen Top-Phase die Umsetzung katalysiert und das erzeugte Produkt in die salzreiche Bottom-Phase wandert. So wird nicht nur eine Gleichgewichtverlagerung der enzymatischen Reaktion durch Entzug des Produktes erreicht, sondern gleichzeitig auch eine effektive Anreicherung des Produktes in der Bottom-Phase, so dass es einfach abzutrennen ist und die das Enzym tragende Top-Phase wesentlich länger verwendet werden kann, ohne eine Immobilisierung der Enzyme durchführen zu müssen. Die extraktive Biokonversion wurde erfolgreich in verschiedenen Enzymprozessen eingesetzt, wobei vor allem der Einsatz in der Antibiotikaherstellung beziehungsweise -konversion mittels Pen-G-Amidase herausragt [275-284].

ATPS werden erfolgreich auch in der Enzymgroßproduktion eingesetzt, wobei die gute direkte Skalierbarkeit ein wichtiger Faktor für die Verbreitung dieser Methodik ist. Nachteilig wirkt sich hingegen die zumeist, außer bei der Rückextraktion, nötige nachträgliche Abtrennung und Rückgewinnung der PEG, für die zusätzliche Ultrafiltrations-, Zentrifugations- oder Adsorptionsprozessschritte nötig sind. Insgesamt zeigt sich die ATPS bei Vergleich mit alternativen Trenntechniken aber als äußerst effektiv, was an verschiedenen Fallbeispielen wie der Extraktion von Papain aus Papaya-Latex [285], der Aufreinigung von in rekombinantem *E.coli* produzierter Pen-G-Amidase [178] oder der Phytase-Aufreinigung aus *Aspergillus niger*-Kultur gezeigt werden konnte [286]. Durch jeden dieser ATPS-Prozesse konnte die Enzymausbeute mindestens verdoppelt werden bei gleichzeitig höherer Produktreinheit. Zudem konnten unit operations eingespart werden und Prozesszeiten signifikant verkürzt. Die ATPS sind somit eine außerordentlich vielversprechende Trenn- und Aufreinigungstechnik, die sich durch einfache Handhabbarkeit bei hoher Effektivität empfiehlt. Aufgrund der hohen Komplexität und schweren Vorhersagbarkeit der ATPS ist jedoch immer

3. Methoden der Bioprozessentwicklung

ein systematischer statistischer Versuchsansatz zu empfehlen, um zu lange Screening- und Entwicklungszeiten zu vermeiden.

Publikation 18:

A. Glyk, T. Scheper, S. Beutel: PEG–salt aqueous two-phase systems: an attractive and versatile liquid–liquid extraction technology for the downstream processing of proteins and enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology* (2015), 99(16), 6599-6616, DOI 10.1007/s00253-015-6779-7 (2015)

4. Synthetische Biotechnologie am Beispiel der Polyphenolproduktion

Abschließend sollen anhand eines erfolgreich entwickelten Produktionsprozesses noch einmal alle Entwicklungsarbeiten zur Realisierung von Naturstoffproduktionen mittels synthetischer Biotechnologie dargestellt werden. Denn die Bereiche der synthetischen Biologie und der Bioprozessentwicklung greifen nahtlos ineinander und nur die Gesamtschau aller Bereiche und Aspekte ermöglicht es letztlich das optimale Prozessdesign zu ermitteln.

Die hier beschriebenen Arbeiten wurden im Rahmen von zwei BMBF-geförderten Kooperationsvorhaben, das erste mit dem Titel „Biokatalytische Gewinnung von Flavonoiden“ und das zweite mit dem Titel „Optimierung der biokatalytischen Herstellung von Phloretin“, als Bestandteil des Biokatalyse2021-Clusters durchgeführt. Die Vorhaben wurden in Kooperation mit der Universität Greifswald und Fa. Symrise bearbeitet. Die Vorhaben hatten das Ziel durch Biotransformation die Überführung des günstigen und gut verfügbaren Naringenins in Phloretin, ein schlecht verfügbares, teures Polyphenol zu erreichen, um eine unabhängige Produktion auf biotechnologischer Basis zu etablieren.

Das Interesse an Phloretin gründet v.a. auf seiner technisch aufwändigen, extraktiven Gewinnung aus Obstbaumrinde (*Malus spp.*) verbunden mit seinen vielseitigen technischen und physiologischen Funktionalitäten [287, 288]. Phloretin und sein Glykosid Phloridzin verfügen z.B. über süßkraftverstärkende sowie bitterkeitsmaskierende Eigenschaften, was sie für die Aroma- und Lebensmittelindustrie interessant macht und wie alle Flavonoide über antioxidative Eigenschaften, die sie für die Kosmetikindustrie als Anti-Ageing-Zusatz oder als UV-Schutz empfehlen [289-291]. Auch verschiedene pharmakologische Wirkungen wurden beschrieben, wie verringerte Myokardinfarkt-, Lungen- und Darmkrebsrisiken [292-295] oder eine Osteoporose-prophylaktische Wirkung [296], so dass auch die Pharmaindustrie eine Nutzung anstrebt. Diese vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten bedingen einen hohen wirtschaftlichen Druck auf die verfügbaren Mengen von Phloretin, so dass stark schwankende Marktpreise resultieren und alternative Darstellungswege zur Sicherung der Versorgung bei steigender Nachfrage dringend gesucht werden.

Die Prozessentwicklung, die im Folgenden beschrieben wird, kann als beispielhaft angesehen werden hinsichtlich des Potentials sekundärer Stoffwechselwege für die Produktion schlecht verfügbarer Polyphenole, aber ebenso hinsichtlich der zu überwindenden Hürden, um einen

solchen Prozess nutzbar zu machen. Die Prozessentwicklung wurde von der Identifizierung der beteiligten Enzyme über die Untersuchung eines klassisch biotechnologischen Verfahrensansatzes bis hin zu einem ökonomischen synthetisch-biotechnologischen Verfahren erarbeitet. Die dafür durchgeführten Arbeiten gliedern sich wie folgt:

1. Beschreibung der Polyphenolbiosynthese und des Abbaus in Destruenten (siehe Kapitel 4.1),
2. Grundlegende Untersuchungen zur Kultivierung von Destruenten (siehe Kapitel 4.2)
3. Klassisch biotechnologische Phloretinproduktion auf Basis strikt anaerober Bakterien (siehe Kapitel 4.3),
4. Phloretinproduktion auf Basis synthetisch-biotechnologischer Verfahren (siehe Kapitel 4.5).

4.1 Polyphenolbiosynthese

Die Polyphenole sind eine der größten Verbindungsklassen unter den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen und umfassen auch die Flavonoide, eine circa 9.000 Verbindungen große Stoffklasse, zu der vor allem Pflanzenfarbstoffe zählen und die sich vom Flavanmolekül (2-Phenylchroman) als Strukturmotiv ableiten [297]. Die anabolen Stoffwechselwege der Flavonoidbiosynthese in Pflanzen sind in Abb. 12 dargestellt. Sie gehen von der Aminosäure Phenylalanin aus, aus der die ganze Vielfalt der Flavonoide durch evolutionär individuell spezialisierte Enzyme gebildet wird [298].

Eine eingehendere Betrachtung des Enzyms EC.5.5.1.6, der Naringenchalkonisomerase (CHI), die die in Abb. 12 grau unterlegte Isomerisierung vom Flavanon Naringenin zu Naringenchalkon katalysiert, zeigt, dass allein diese Reaktion, die im Prinzip von einem Intermediat zum nächsten erfolgt, in verschiedenster Form weiterführen kann, sei es vom Naringenin ausgehend oder vom Chalkon [299-302]. Hier kommt der Vorteil katalytischer Gleichgewichtsreaktionen zum Tragen, die so eine Regulierung bestimmter Produktströme innerhalb der Zellen ermöglichen.

4. Synthetische Biotechnologie am Beispiel der Polyphenolproduktion

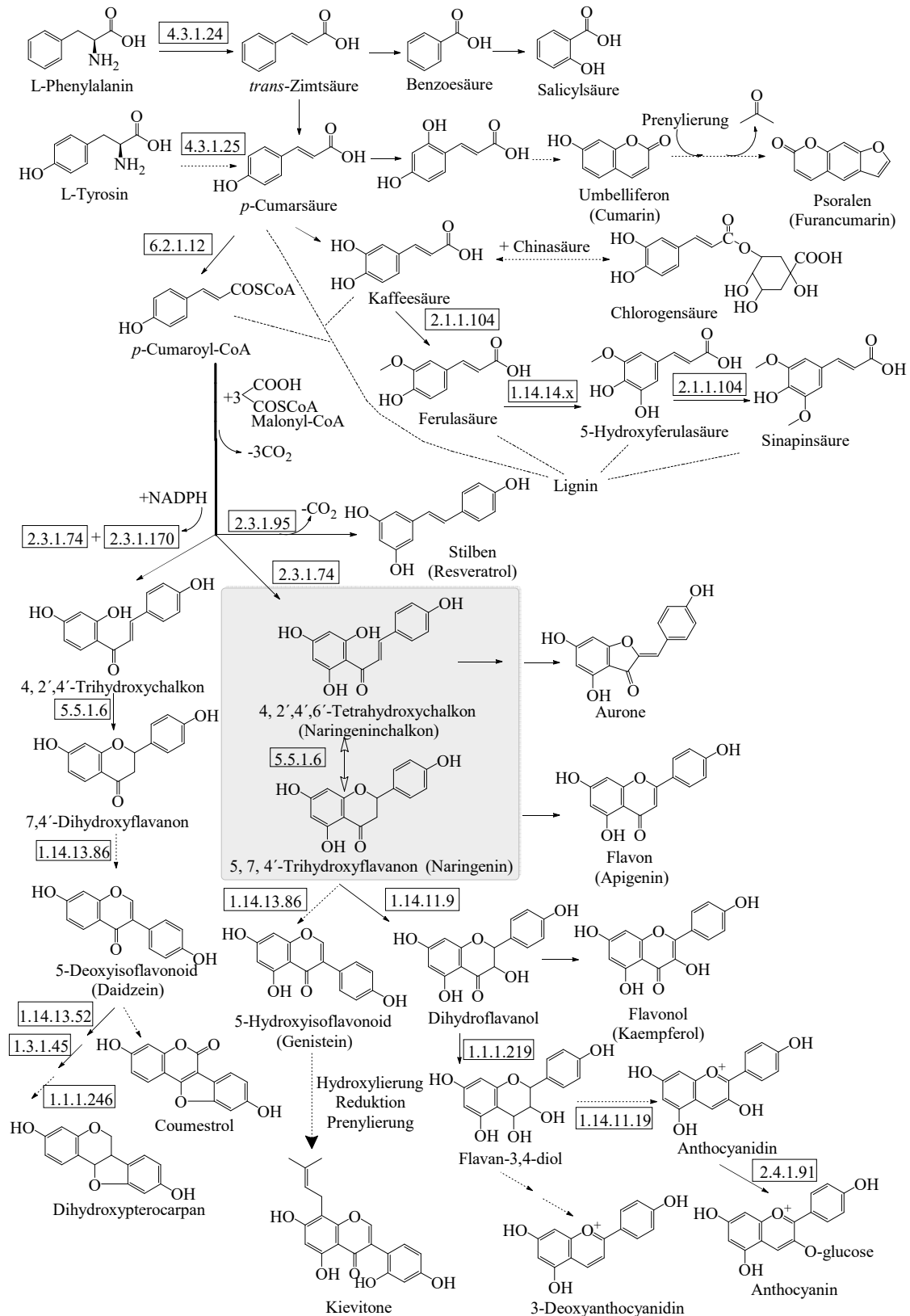


Abb. 12: Flavonoidbiosynthese in Pflanzen

Diese Isomerisierung nimmt eine Schlüsselposition in der Flavonoidbiosynthese ein, denn sie stellt einen bottleneck von Naringenin ausgehend zu Isoflavonoiden über Flavanole bis zu Anthocyanidinen dar, kann aber ebenso über das aktivere Isomer Naringenchalkon weiter zu Auronen umgesetzt oder auch katabolisch abgebaut werden [303]. Die CHI ist in Pflanzen entsprechend omnipräsent und gut beschrieben. Mechanistisch interessant ist an der Umsetzung, dass das Chiralitätszentrum des Naringenins an C2 beim Übergang zum Chalkon verloren geht [304, 305].

4.1.1 Naringeninabbau in Destruenten

Katabolische Abbaureaktionen werden vor allem in degradierenden Organismen, sogenannten Destruenten wie z.B. Darmbakterien oder Pilzen gefunden und können wiederum zu weiteren interessanten Sekundärmetaboliten führen, wie am Beispiel des postulierten Naringenin-Abbaus im strikt anaeroben, gram-positiven Darmbakterium *Eubacterium ramulus* unter Beteiligung der von Herles et al., 2004, ersten beschriebenen bakteriellen Chalkonisomerase anschaulich gemacht werden soll [306]. Der postulierte Abbauweg über das Naringenchalkon, dargestellt in Abb. 13, führt zum Dihydrochalkon Phloretin, das in der Reaktionskaskade aber selbst nur ein Intermediat darstellt und von der Phloretinhydrolase (PH, E.C. 3.7.1.4) im *E. ramulus* umgehend weiter zu Phloroglucinol und 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure abgebaut wird [307].

Hierbei ist allerdings zu beachten, dass in dem postulierten Abbauweg noch unbekannt ist, durch welches Enzym genau der NADH-abhängige Hydrierungsschritt vom Naringenchalkon zum Phloretin katalysiert wird. Da diese Reduktion aber der langsamste und somit geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, wodurch Phloretin analytisch in dieser Reaktionsfolge nur in Spurenkonzentrationen nachweisbar ist, ist eine Identifizierung dieses Enzyms von allergrößter Wichtigkeit.

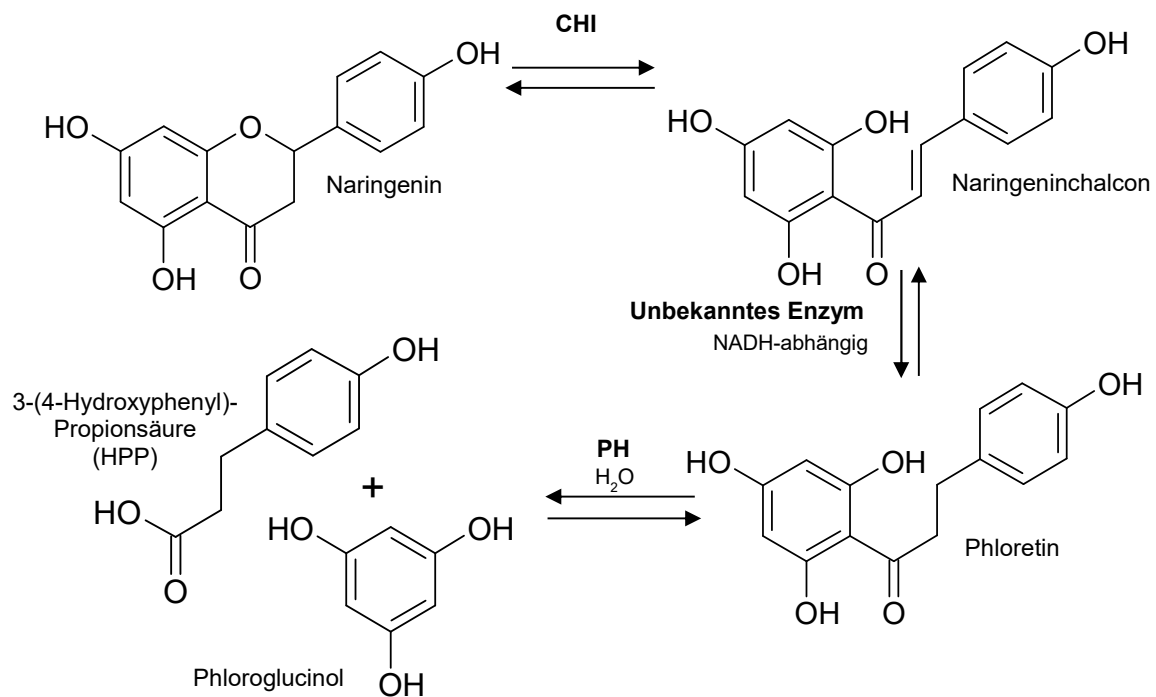


Abb. 13: Postulierter Abbauweg von Naringenin in *E. ramulus* [306]

Der Abbauweg in *E. ramulus* könnte einen Ansatzpunkt für eine entsprechende enzymatische Herstellung darstellen, wenn es gelänge, den unerwünschten weiteren Abbau des Phloretins durch die Phloretinhydrolase zu unterbinden [308].

Durch Vollgenomsequenzierung des *E. ramulus* konnte am Institut für Biochemie, Abt. Biotechnologie & Enzymkatalyse, Universität Greifswald aufgrund konservierter Sequenzmotive, wie z.B. einer homologen Sequenzabfolge von 4 Cystein-Resten, als beteiligtes Enzym eine Enoatreduktase (ERED, E.C. 1.3.1.31) identifiziert werden [309, 310]. Die Ergebnisse zu diesen Arbeiten wurden gemeinsam veröffentlicht.

Publikation 19:

M. Gall, M. Thomsen, C. Peters, I. Pavlidis, P. Jonczyk, P. Grünert, S. Beutel, T. Scheper, E. Gross, M. Backes, T. Geißler, J. Ley, J-M. Hilmer, G. Krammer, G. Palm, W. Hinrichs, U. Bornscheuer: Enzymatic Conversion of Flavonoids using Bacterial Chalcone Isomerase and Enoate Reductase, Angewandte Chemie Int. Ed. (2013) DOI: 10.1002/anie.201306952

4.2 Kultivierung strikt anaerober Mikroorganismen

Die Nutzung dieser Enzyme für die Phloretinproduktion könnte mit isolierten Enzymen *aus E. ramulus* erfolgen oder mit intakten Zellen bei Inhibierung der Phloretinabbaureaktion durch die Phloretinhydrolase. Dieser klassische biotechnologische Ansatz würde zudem eine Verwendung gentechnisch veränderter Mikroorganismen umgehen, da die Europäische Aromenverordnung (EG Nr. 1334/2008) die Deklaration als natürliche Geschmacksstoffe sonst ausschließen würde [311]. So wurde die Produktion unter Einsatz von *E. ramulus* angestrebt und die Hungate-Technik zur Kultivierung strikt anaerober Mikroorganismen eingesetzt [312-314]. Die strikt anaerobe Kultivierung, die mit hohem technischem Aufwand verbunden ist, führte allerdings nur zu geringen Zelldichten, im Schüttelkolben max. etwa $OD_{600} = 1,8-2,0$ und im 10L-batch-Reaktor (STR) ca. $OD_{600} = 9,2$. Als große Herausforderung stellte sich hier neben der technischen Handhabbarkeit auch die große Scherstressempfindlichkeit des *E. ramulus* dar. Dies berücksichtigend wurden alternative Reaktorsysteme für die schonendere Kultivierung in Betracht gezogen, unter anderem auch ein Einwegbioreaktor-(disposable bag reactor)-System, das durch seine Wellen-induzierte Durchmischung eine scherstressminimierte Kultivierung ermöglichen sollte [315-318]. Die Scherstressreduktion durch diese Kultivierungstechnik konnte anhand verschiedener kultivierter Bakterien und Pilze wie *Flamulina velucipes* (DSMZ1658) [319] und *Pleurotus sapidus* (DSMZ8266) [320] belegt werden. Die Pilzkulturen zeigten eine feine Pelettierung der Biomasse, die keine größeren dreidimensionale Aggregate bildete, so dass eine ausreichende Versorgung der gesamten Kultur mit Nährstoffen gewährleistet blieb, was sich auch in den höheren Biomassekonzentrationen im Vergleich zu klassischen Reaktorkultivierungen zeigte [321]. Diese veränderte Morphologie der kultivierten Zellen vereinfacht darüber hinaus das gesamte Handling der Kulturbrühe und es bedarf keiner aufwändigen Homogenisierung. Die Verwendung von Einwegbioreaktor-Technologie ermöglicht so erstmals eine echte Submerskultur von aggregat-bildenden Pilzzellen.

Publikation 20:

P. Jonczyk, M. Takenberg, S. Hartwig, S. Beutel, R.G. Berger, T. Scheper: Cultivation of shear stress sensitive microorganisms in disposable bagreactor systems, Journal of Biotechnology 167 (2013), 370-376

4.3 Einsatz von *E. ramulus* für die Phloretinproduktion

Die Kultivierung von *E. ramulus* konnte im disposable Bioreaktorsystem in gleicher Skalierung mit vergleichbarer Qualität ($OD_{600} = 8,7$) wie im STR durchgeführt werden, was aufgrund einer ermittelten Substratinhibierung ab 12 g/l Glucose die natürliche Grenze für eine batch-Kultivierung darstellt. Daher wurde auch ein fed-batch-Ansatz untersucht, bei dem die Substratkonzentration von Glucose zwischen 1,5-4,0 g/l stadiert wurde und so der *E. ramulus* mit einer spezifischen Wachstumsrate von $\mu = 0,25 \text{ h}^{-1}$ innerhalb 18 h bis zu einer $OD_{600} = 13,3$ angezogen werden konnte.

Mit der so produzierten *E. ramulus*-Biomasse wurden Darstellungsversuche für Phloretin aus Naringenin gemacht, so z.B. in Ganzzellbiotransformationsansätzen wie auch mit Zellrohextrakt unter Zugabe des Cofaktors NADH. Auch unter Einsatz verschiedener Inhibitoren konnte allerdings die Abbaureaktion von Phloretin nicht effektiv unterbunden werden, so dass insgesamt nur eine maximale Produktkonzentration von $7,1 \cdot 10^{-4} \text{ g/l}$ (26 μM) Phloretin bei Anwesenheit von 10 mM EDTA, dem effektivsten Inhibitor, erreicht werden konnte. Auch Mutanten mit deletierter Phloretinhydrolase-Sequenz konnten nicht erfolgreich etabliert werden und auch eine Aufreinigung der Enzyme erwies sich als technisch zu aufwändig, so dass der Einsatz von *E. ramulus* für die wirtschaftliche Produktion von Phloretin letztlich nicht realisierbar war [299, 300].

Publikation 21:

P. Jonczyk, A. Schmidt, I. Bice, M. Gall, E. Gross, J-M.Hilmer, U. Bornscheuer, S. Beutel, T. Scheper, Strikt anaerobe Batch-Kultivierung von *Eubacterium ramulus* in einem neuartigen Einweg-Beutelreaktorsystem, Chemie Ingenieur Technik, Volume 83, 12 (2011), 2147-2152

4.4 Einsatz der synthetischen Biotechnologie in der Phloretinproduktion

Aus diesem Grund wurde in den weiteren Arbeiten ein synthetisch biotechnologischer Ansatz verfolgt, bei dem unter Einsatz eines rekombinanten Produktionsorganismus wie *E. coli* oder *Komagataella phaffii* (ehemals *Pichia pastoris*) die beiden Schlüsselenzyme CHI und ERED heterolog exprimiert werden. Als vorteilhaft ist bei diesem Ansatz zudem, dass diese Produktionsorganismen über keine Phloretinhydrolase verfügen, so dass der unerwünschte Phloretinabbau unterbleiben sollte. Beide Ansätze wurden untersucht und letztlich ein produktiver *E.coli*-Stamm ausgewählt, der bei Entkopplung von Wachstums- und Expressionsphase beide Enzyme löslich produziert. Der in Kooperation mit dem Institut für Biochemie, Abt. Biotechnologie & Enzymkatalyse, Universität Greifswald entwickelte und optimierte Produktionsstamm *E. coli* SE1 CHI_sERed wurde patentrechtlich geschützt. Er setzt Naringenin gemäß dem in Abb. 14 dargestellten Reaktionsmechanismus zu Phloretin um.

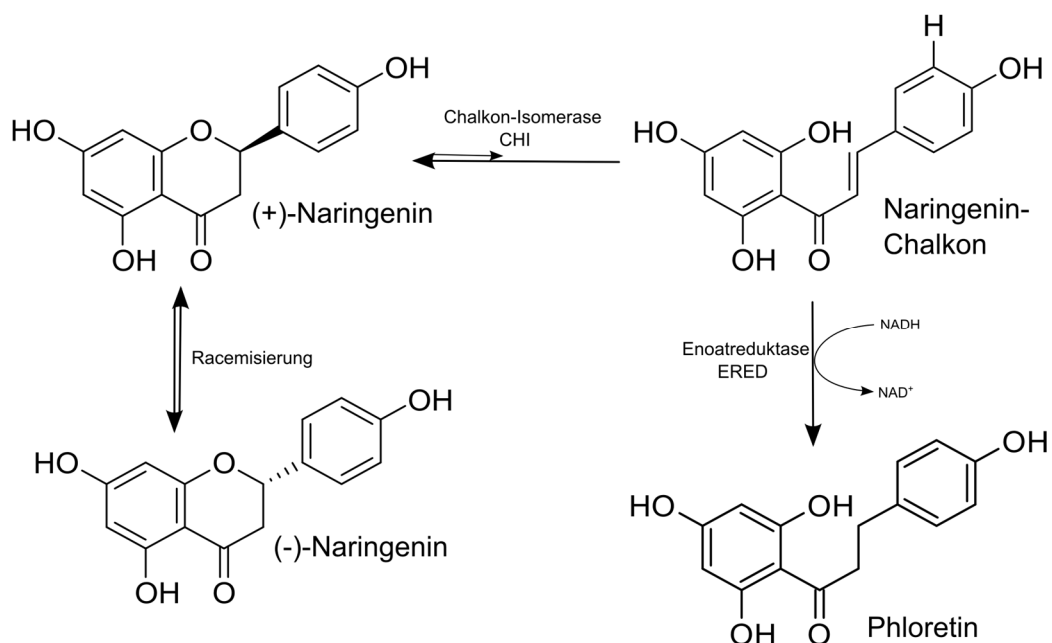


Abb. 14: Reaktionsmechanismus der enzymatischen Konversion von Naringenin zu Phloretin

Die weiteren Untersuchungen zeigten jedoch, dass auch mit diesem Produktionsstamm die Prozessentwicklung eine Herausforderung darstellte [322]. Eine Isolierung der Enzyme war

4. Synthetische Biotechnologie am Beispiel der Polyphenolproduktion

aufgrund ihrer Instabilität, insbesondere der durch die Cystein-Reste gebildeten Schwefelcluster der ERED, nicht möglich; so musste ein ganzzellkatalytischer Ansatz verfolgt werden. Vorteilhaft bei dieser Prozessstrategie ist, dass auf eine NADH-Zufütterung oder ein Cofaktor-Regenerationssystem für NADH verzichtet werden kann, da die Zellen dieses selbst regenerieren.

In der Ganzzellbiotransformation erwiesen sich die Zellen jedoch aufgrund mangelnder geeigneter Transmembran-Transportersysteme als Akkumulatoren für Flavonoide, sowohl für Naringenin als auch für Phloretin. Dadurch blieben auch in situ-Produktanreicherungs-techniken (ISPR) zur Gewinnung des Phloretins aus dem laufenden Biotransformationsprozess erfolglos und ein Aufschluss der Zellen nach der Biotransformation war unumgänglich. Die Akkumulation führte zudem schnell zu hohen, cytotoxischen Flavonoidkonzentrationen in den Zellen. Weitergehende chirale HPLC-Analysen (High performance/pressure liquid chromatography) zeigten darüber hinaus, dass das katalytische Gleichgewicht der CHI stark auf die Seite des Naringenins verschoben ist und außerdem, dass nur eines der Naringenin-Enantiomere, das (+)-Naringenin, umgesetzt wird, so dass eine Ausbeute von 50% bei Einsatz racemischer Eduktlösung nicht übertroffen werden kann. Da die chemische Racemisierung von (-)-Naringenin zu (+)-Naringenin nur sehr langsam erfolgt, konnten nur geringfügige Steigerungen des Umsatzes in sinnvollen Zeiten erreicht werden [322].

Die Strategie zur Realisierung eines wirtschaftlichen Biotransformationsprozesses musste daher so angepasst werden, dass allein über die Volumenproduktivität, das heißt einer entsprechend hohen Biomassekonzentration, geeignete Produkttiter erzeugt werden konnten. Dies konnte mit einer Hochzelldichtekultivierung im fed-batch-Modus erreicht werden, bei der der Produktionsstamm *E. coli* SE1 mit Glucose als Substrat in einem definierten Medium und einer mittleren Wachstumsrate von $\mu = 0,13 \text{ h}^{-1}$ innerhalb von 24 h bis zu einer $OD_{600} = 200,0$ hochgezogen werden konnte [323]. Dieser Prozess konnte in den 30L-Maßstab aufskaliert werden. Mit entnommenen 90% der Kulturbrühe konnte dann die Biotransformation in einem separaten Reaktor durchgeführt werden, während die verbliebenen 10% als Inokulum für die nächste Anzuchtstufe dienen, so dass eine quasi-kontinuierlicher Produktionsprozess auf repeated-fed-batch-Basis etabliert werden konnte.

4. Synthetische Biotechnologie am Beispiel der Polyphenolproduktion

Die Biotransformation wurde dann sequentiell mit einer definierten Zelldichte von $OD_{600}=200,0$ durchgeführt. Bei Zugabe von 20 mM Naringenin (ca. 5,5 g/l) konnten so innerhalb von 22 h bis zu 12 mM (ca. 3,28 g/l) Phloretin hergestellt werden, was einer Ausbeute von $Y_{P/S}=0,6$ entspricht. Dies übersteigt aufgrund der langen Reaktionszeit und der dadurch signifikant werdenden, langsamen chemischen Racemisierung des Naringenins den theoretischen Umsatz von 50% sogar. Die Produktisolierung kann direkt aus der Reaktionslösung nach Aufschluss der Zellen durch selektive Bindung der Flavonoide an eine Polyethersulfon(PES)-membran erfolgen, die über hohe Flavonoidbindekapazitäten verfügt und sogar eine höhere Selektivität für Phloretin (0,45 mg/cm²) gegenüber Naringenin (0,15 mg/cm²) ausweist [324, 325]. Mittels dieser Prozessstrategie können somit nun über 3 g/l Phloretin in 24 h aus Naringenin hergestellt werden, so dass der Gesamtprozess wirtschaftlich anwendbar ist. Der Gesamtprozess wurde mit einer Steigerung der Produktivität um einen Faktor von >4.600 im Vergleich zu *E. ramulus* mit EDTA-Inhibierung somit erfolgreich optimiert und die Prozessarchitektur bis zu einer Skalierung von 30 l abgebildet. Für die weitere Entwicklung des Prozesses bis in den Produktionsmaßstab wurde dieser an den Industriepartner übergeben.

Patent 1:

J.M. Hilmer, E. Gross, G. Krammer, J. Ley, M. Gall, U. Bornscheuer, M. Thomsen, C. Peters, P. Jonczyk, S. Beutel, T. Scheper: Method for the biotechnological manufacture of dihydrochalcones, Patent-Nr.: EP 2692729-A1, DE 102012213492-A1 (2014)

5. Fazit

Die dargestellten Arbeiten zur Anwendung der synthetischen Biotechnologie zeigen ihr großes Potential für die Produktion komplexer Naturstoffe. Die zunächst am Beispiel ausgewählter Sesquiterpensynthesen beschriebenen Arbeiten aus dem Bereich der synthetischen Biologie ermöglichten die Identifizierung der an einer Naturstoffbiosynthese beteiligten Enzyme, ihre eingehende Charakterisierung und ihre Übertragung in einen Produktionsorganismus. So wird die Voraussetzung geschaffen, mithilfe der im zweiten Teil der Arbeit beschriebenen verfahrenstechnischen Methoden mit dem gewählten Produktionsorganismus einen ökonomischen Bioprozess zu entwickeln, in dem die komplexen Naturstoffe aus einfachen Substraten synthetisiert werden. Abschließend wurde anhand eines Beispielprozesses zur Flavonoidsynthese dargestellt, wie ein klassischer biotechnologischer Prozess unter Einsatz des natürlichen Mikroorganismus an verschiedenen Limitierungen scheiterte und stattdessen ein synthetischer Biotechnologieansatz gewählt werden musste, um einen wirtschaftlichen Produktionsprozess zu realisieren.

Um dies zu erreichen, sind bei der Entwicklung viele Herausforderungen zu überwinden. Beispielhaft seien die oft mangelhafte aktive Expression der xenogenen Enzyme in den Produktionsorganismen genannt oder eine mögliche cytotoxische Anreicherung des Produkts in den Zellen, die zum Erliegen der enzymatischen Umsetzung führen kann. Jedes System verhält sich individuell und zeigt eigene Facetten und Charakteristika, die für eine erfolgreiche Umsetzung berücksichtigt werden müssen. Daher müssen die eingesetzten Methoden und Verfahrenselemente einer ständigen Überprüfung standhalten oder durch alternative Techniken ersetzt werden. Um dies zu erreichen, müssen sowohl neuartige als auch Weiterentwicklungen herkömmlicher Technologien stetig evaluiert werden. Eine hohe Informationsdichte durch online-Analysenverfahren ist dafür sehr hilfreich, um genaue und lückenlose Informationen über den jeweiligen Prozessverlauf zu erhalten. So lässt sich der optimale Prozessverlauf ermitteln, der dabei hilft, eine verfahrenstechnische Prozessarchitektur zu finden, mit der die angestrebte Naturstoffproduktion ökonomisch als synthetisch biotechnologisches Verfahren umsetzbar ist.

Insbesondere die in dieser Arbeit behandelten Naturstoffklassen der Sesquiterpene und Flavonoide sind für vielfältige Anwendungen interessant. Der große Bedarf an

Sesquiterpenen und Flavonoiden kann heute nicht mehr durch organische Synthese oder die Gewinnung aus den entsprechenden pflanzlichen Rohstoffen gedeckt werden. Die organische Synthese dieser komplexen Strukturen ist wirtschaftlich uninteressant, die pflanzlichen Rohstoffe sind meist nur begrenzt verfügbar und eine extensive Nutzung führt zu einer Verringerung der natürlichen Biodiversität.

Die synthetische Biotechnologie kann daher wie gezeigt dazu beitragen, Unabhängigkeit von den marktverfügbaren Ressourcen aus herkömmlicher Produktion zu erreichen, und so eine nachhaltige und ökonomisch sinnvolle Versorgungssicherheit gewährleisten. Bei dezentraler Produktion vor Ort könnten Sie darüber hinaus sogar eine just-in-time-Versorgung nach Bedarf ermöglichen und so die erheblichen Logistikkosten reduzieren helfen. Auch für die Herstellerländer brächte dies Vorteile, denn so stünden die Anbauflächen, die bisher für die Naturstoffproduktion genutzt werden, wieder für die Nahrungsmittelproduktion zur Verfügung.

Literaturverzeichnis

- [1] E. Breitmaier „Terpene. Aromen, Düfte, Pharmaka, Pheromone“. 1. Wiley-VCH Verlag, 2012.
- [2] D. W. Christianson „Unearthing the roots of the terpenome“. eng. Curr. Opin. Chem. Biol. 12 (2008), 141–150.
- [3] S. C. Roberts „Production and engineering of terpenoids in plant cell culture“. Nat. Chem. Biol. 3 (2007), 387–395.
- [4] L. Ruzicka „History of the isoprene rule: Faraday lecture“. Proc. Chem. Soc. (London) 11 (1959), 341–360.
- [5] S. Koul “A comprehensive treatise on terpenes“. Saarbrücken: Lap Lambert Academic Publishing, (2011).
- [6] G. Ohloff et al. “Scent and chemistry. The molecular world of odors“. Zürich: Wiley-VCH Verlag, (2012).
- [7] S. Burt „Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review“. eng. J. Food Microbiol. 94 (2004), 223–253.
- [8] S. S. Chandran et al. „Microbial production of isoprenoids“. Process Biochem. 46 (2011), 1703–1710.
- [9] M. Rohmer „The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants“. Nat. Prod. Rep. 16 (1999), 565–574.
- [10] H. K. Lichtenthaler „The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants“. Annu. Rev. Plant Bio. 50 (1999), 47–65.
- [11] C. A. Lesburg et al. „Crystal structure of pentalenene synthase: Mechanistic insights on terpenoid cyclization reactions in biology“. Science 277 (1997), 1820–1824.
- [12] C. M. Starks et al. „Structural basis for cyclic terpene biosynthesis by tobacco 5-epi-aristolochene synthase“. Science 277 (1997), 1815–1820.
- [13] J. Degenhardt et al. „Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants“. Phytochemistry 70 (2009), 1621–1637.
- [14] D. J. Miller und R. K. Allemann „Sesquiterpene synthases: passive catalysts or active players?“ Nat. Prod. Rep. 29 (2012), 60–71.
- [15] H. G. Ramya et al. „An introduction to patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) - A medicinal and aromatic plant: It’s importance to mankind“. Agric. Eng. Int. 15 (2013), 243–250.
- [16] C. M. Bure und N. M. Sellier „Analysis of the essential oil of Indonesian patchouli (*Pogostemon cablin* benth.) using GC/MS (EI/CI)“. J. Essent. Oil Res. 16 (2004), 17–19.

- [17] F. Deguerry et al. „The diverse sesquiterpene profile of patchouli, *Pogostemon cablin*, is correlated with a limited number of sesquiterpene synthases“. Arch. Biochem. Biophys. 454 (2006), 123–136.
- [18] N. J. Yob et al. „*Zingiber zerumbet* (L.) Smith: A Review of Its Ethnomedicinal, Chemical, and Pharmacological Uses“. eng. Evid. Based Compl. Altern. Med. 2011 (2011), 543216.
- [19] F. Yu et al. “*Zingiber zerumbet* CYP71BA1 catalyzes the conversion of α -humulene to 8-hydroxy- α -humulene in zerumbone biosynthesis“ Cell. Mol. Life Sci. (2011) 68, 1033–1040
- [20] S. Okamoto et al. „A short-chain dehydrogenase involved in terpene metabolism from *Zingiber zerumbet*“. FEBS Journal 278 (2011) 2892–2900
- [21] K. A. Hammer et al. „Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts“. eng. J. Appl. Microbiol. (1999), 86, 985–990.
- [22] R. K. Keller und R. Thompson. „Rapid synthesis of isoprenoid diphosphates and their isolation in one step using either thin layer of flash chromatography“. J. Chromatogr. 645 (1993), 161–167.
- [23] S. Hartwig “Biokatalytische Wege zur Darstellung funktioneller Sesquiterpene“. Dissertation Leibniz Universität Hannover (2015)
- [24] F. Näf et al. „A Stereocontrolled Access to (\pm)-, (-)-, and (+)-Patchouli Alcohol“. HCA 64 (1981), 1387–1397.
- [25] R. Novy et al. „Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression“. inNovations 12 (2001), 1–3.
- [26] P. Puigbò et al. “OPTIMIZER: a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences“. Nucleic Acids Research, (2007) 35, W126–W131.
- [27] K. Terpe „Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems“. Appl. Microbiol. Biotechnol. 72 (2006), 211–222.
- [28] C. Huang et al. „Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements“. eng. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 39 (2012), 383–399.
- [29] E. Hochuli et al. „Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent“. Nat. Biotechnol. 6 (1988), 1321–1325.
- [30] E. R. LaVallie et al. „A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm“. Nat. Biotechnol. 11 (1993), 187–193.
- [31] F. W. Studier und B. A. Moffatt „Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes“. J. Mol. Biol. 189 (1986), 113–130.
- [32] H. Tegel et al. „Increased levels of recombinant human proteins with the *Escherichia coli* strain Rosetta(DE3)“. Protein Expr. Purif. 69 (2010), 159–167.
- [33] J. Huang et al. „Mechanisms by which T7 lysozyme specifically regulates T7 RNA polymerase during different phases of transcription“. eng. J. Mol. Biol. 293 (1999), 457–475.
- [34] P. E. O'Maille et al. “A single-vial analytical and quantitative gas chromatography-mass spectrometry assay for terpene synthases“. Anal. Biochem. (2004) 335, 210.

- [35] J. A. Faraldos et al. „Doubly Deuterium-Labeled Patchouli Alcohol from Cyclization of Singly Labeled [2- 2 H 1]-Farnesyl Diphosphate Catalyzed by Recombinant Patchoulol Synthase”. J. Am. Chem. Soc. (2010), 132, 2998.
- [36] A. Bar-Even et al. “The Moderately Efficient Enzyme: Evolutionary and Physicochemical Trends Shaping Enzyme Parameters”. Biochemistry (2011), 50, 4402–4410
- [37] A. Bar-Even et al. “The Moderately Efficient Enzyme: Futile Encounters and Enzyme Floppiness”. Biochemistry (2015) 54, 4969–4977
- [38] M. Vardakou, et al. “Comparative analysis and validation of the malachite green assay for the high throughput biochemical characterization of terpene synthases”. MethodsX (2014), 1, 187.
- [39] H. Bisswanger „Enzymkinetik: Theorie und Methoden“. 3rd ed., Wiley-VCH, Weinheim (2000).
- [40] Firmenich, Marketing Sheet: CLEARWOOD®, Product number 970953, http://firmenich.cdn.ovx.fr/uploads/files/ingredients/marketing-sheet/perfumery/CLEARWOOD%C2%AE_970953.pdf?bd4033a (17.06.2017)
- [41] S. L. Munck und R. Croteau “Purification and characterization of the sesquiterpene cyclase patchoulol synthase from *Pogostemon cablin*”. Archives of Biochemistry and Biophysics (1990), 282, 58.
- [42] E. E. Stashenko et al. „A study of the compositional variation of the essential oil of ylang-ylang (*Cananga odorata* Hook Fil. et Thomson, formagenuina) during flower development”. J. High Resol. Chromatogr. (1995), 18, 101.
- [43] A. Hymete et al. “Essential oil from seeds and husks of *Aframomum corrorima* from Ethiopia”. Flavour Fragr. J. (2006), 21, 642.
- [44] J. Rohloff und A. M. Bones “Volatile profiling of *Arabidopsis thaliana* - putative olfactory compounds in plant communication”. Phytochemistry (2005), 66, 1941.
- [45] J. Cai et al. “Comparative analysis of clary sage (*S. sclarea* L.) oil volatiles by GC–FTIR and GC–MS”. Food Chemistry (2006), 99, 401.
- [46] A. E. Kabouss et al. “Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Leaf Essential Oil of *Argania spinosa* L. Skeels”. Journal of Essential Oil Research (2002), 14, 147.
- [47] M. Miyazawa und N. Tamura “Components of the essential oil from sprouts of *Polygonum hydropiper* L. (‘Benitade’). Flavour Fragr. J. (2007), 22, 188.
- [48] H. Y. Zhang et al. “Screening and analysis of bioactive compounds in traditional Chinese medicines using cell extract and gas chromatography-mass spectrometry”. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis (2007), 43, 151.
- [49] D. Lesueur et al. “Analysis of the root oil of *Fokienia hodginsii* (Dunn) Henry et Thomas (Cupressaceae) by GC, GC–MS and 13C-NMR”. Flavour Fragr. J. (2006), 21, 171.
- [50] T. Feng et al. “Chemical Composition of Essential Oil from the Peel of Chinese *Torreya grandis* Fort”. Organic Chemistry International (2011), 2011, 1.
- [51] C. Cavaleiro et al. “Antifungal activity of Juniperus essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains”. Journal of applied microbiology (2006), 100, 1333.

- [52] S. Vichi et al. "Characterization of volatiles in different dry gins". *Journal of agricultural and food chemistry* (2005), 53, 10154.
- [53] Franco et al. "Volatile Composition of Some Brazilian Fruits: Umbu-caja (*Spondias citherea*), Camu-camu (*Myrciaria dubia*), Araça-boi (*Eugenia stipitata*), and Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*)". *J. Agric. Food Chem.* (2000), 48, 1263.
- [54] K. Umano, et al. "Volatile Chemicals Identified in Extracts from Newly Hybrid Citrus". Dekopon (*Shiranuhi mandarin* Suppl. J.), *J. Agric. Food Chem.* (2002), 50, 5355.
- [55] A. Wei und T. Shibamoto "Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils". *Journal of agricultural and food chemistry* (2007), 55, 1737.
- [56] Y. Zhao et al. "Profile of volatile compounds in 11 brandies by headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry". *Journal of food science* (2009), 74, C90-9.
- [57] T. Frister "Herstellung, Charakterisierung und Anwendung einer rekombinanten Patchoulolsynthese zur biokatalytischen Herstellung von Sesquiterpenen". Dissertation Leibniz Universität Hannover (2015)
- [58] P. M. Sharp und W. H. Li. „The codon Adaptation Index—a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications“. *Nucleic Acids Res.* 15 (1987), S. 1281–1295.
- [59] G. Kader et al. "Antimicrobial activities of the rhizome extract of *Zingiber zerumbet* Linn". *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* (2011), 1, 409–412.
- [60] M. Habsah et al. "Screening of *Zingiberaceae* extracts for antimicrobial and antioxidant activities". *Journal of Ethnopharmacology* (2000), 72, 403–410.
- [61] T.F. Tzeng et al. „The Ethanol Extract of *Zingiber zerumbet* Attenuates Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy“. *Rats. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* (2013), Article ID 340645, 8 pages.
- [62] S.I.A. Wahab et al. „Anti-tumor activities of analogues derived from the bioactive compound of *Zingiber zerumbet*“. *International Journal Of Cancer Research* (2008), 4, 154–159.
- [63] A. Murakami et al. "Zerumbone, an anti-inflammatory phytochemical, induces expression of proinflammatory cytokine genes in human colon adenocarcinoma cell lines2. *BioFactors* (2004), 21, 95–101.
- [64] T. Shamoto et al. "Zerumbone inhibits angiogenesis by blocking NF-κB activity in pancreatic cancer". *Pancreas* (2014), 43, 396–404.
- [65] S. Tewtrakul und S. Subhadhirasakul "Anti-allergic activity of some selected plants in the *Zingiberaceae* family". *Journal of Ethnopharmacology* (2007), 109, 535-538.
- [66] P. P. Peralta-Yahya et al. "Identification and microbial production of a terpene-based advanced biofuel" I. *Nature Communications* (2011), 2, 48.
- [67] R. McKenna et al. "Comparing in situ removal strategies for improving styrene bioproduction". *Bioprocess and Biosystems Engineering* (2015), 38, 165-174.
- [68] A. K. Ghosal und S. D. Manjare "Selection of appropriate adsorption technique for recovery of VOCs: an analysis". *Journal of Loss Prevention in the Process Industries* (2002), 15, 413-421.

- [69] M. Asada und M. L. Shuler "Stimulation of ajmalicine production and excretion from *Catharanthus roseus*: effects of adsorption in situ, elicitors and alginate immobilization". *Applied Microbiology and Biotechnology* (1989), 30, 475-481.
- [70] J. A. R. Salvador und J. H. Clark "The allylic oxidation of unsaturated steroids by tert-butylhydroperoxide using surface functionalised silica supported metal catalysts". *Green Chemistry* (2002), 4, 352-356.
- [71] B. A. Allal et al. "Catalytic oxidation of α -pinene by transition metal using t-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide". *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* (2003) 200, 177-184.
- [72] S. Alemdar "Entwicklung einer biotechnologischen Produktionsstrategie für das Sesquiterpenoid Zerumbon". Dissertation Leibniz Universität Hannover (2017).
- [73] M. Schalk und F. Deguerry. „Method for producing (+)-zizaene“. Firmenich, Weltpatent WO2010134004A1 (2012).
- [74] D.G. Gibson et al., Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases, *Nat. Methods* 6 (2009) 343-345.
- [75] R. T. Hay. „SUMO: A history of modification“. *Mol. Cell* 18 (2005), 1–12.
- [76] M. P. Malakhov et al. „SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins“. *J. Struct. Funct. Genomics* 5 (2004), 75–86.
- [77] G. Qing et al. „Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*“. *Nat. Biotechnol.* 22 (2004), 877–882.
- [78] M. Mitta et al. „Deletion analysis of *cspA* of *Escherichia coli*: Requirement of the AT-rich UP element for *cspA* transcription and the downstream box in the coding region for its cold shock induction“. *Mol. Microbiol.* 26 (1997), 321–335.
- [79] D. Mukhopadhyay und M. C. Dasso. „Modification in reverse: the SUMO proteases“. *Trends Biochem. Sci.* 32 (2007), 286–295.
- [80] D. N. Perkins et al. „Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data“. *Electrophoresis* 20 (1999), 3551–3567.
- [81] M. R. Wilkins et al. „Detailed peptide characterization using PEPTIDEMASS - A World- Wide-Web-accessible tool“. *Electrophoresis* 18 (1997), 403–408.
- [82] R.M. Coates und R.L. Sowerby "Stereoselective total synthesis of (\pm)-zizaene". *J. Am. Chem. Soc.* 94 (1972), 5386-5388.
- [83] L.C. Pati et al. "A stereocontrolled total synthesis of (\pm)-zizaene", *Tetrahedron* 58 (2002), 1773-1778.
- [84] M. Schalk und F. Deguerry „Cytochrome P450 and use thereof for the enzymatic oxidation of terpenes“. Firmenich. Weltpatent WO2013064411A1 (2013).
- [85] S. Beutel et al. "In situ sensor techniques in modern bioprocess monitoring". *Appl Microbiol Biotechnol* (2011), 91 (6), 1493-1505
- [86] Guidance for Industry: "PAT — A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance". U.S. Department of Health and Human Services,

- Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), Office of Regulatory Affairs (ORA), Pharmaceutical CGMPs (2004)
- [87] J. Büchs "Introduction to advantages and problems of shaken cultures". *Biochem. Eng. J.* (2001), 7, 91–98.
- [88] K. Schneider et al. "Optical device for parallel on-line measurement of dissolved oxygen and pH in shake flask cultures". *Bioprocess. Biosys. Eng.* (2010), 33, 541–547.
- [89] M. Samorski et al. "Quasi-continuous combined scattered light and fluorescence measurement: A novel measurement technique for shaken micro titer plates". *Biotechnol. Bioeng.* (2005), 92, 61–68.
- [90] T. Anderlei et al. "Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks". *Biochem. Eng. J.* (2004), 17, 187–194.
- [91] R. Ulber et al. "Optical sensor systems for bioprocess monitoring". *Anal. Bioanal. Chem.* (2003), 376, 342–348
- [92] R. Madrid und C. Felice "Microbial Biomass Estimation". *Crit. Rev. Biotech.* (2005), 25, 97–112.
- [93] K. Kiviharju et al. "Biomass measurement online: the performance of in situ measurements and software sensors". *J. Ind. Microbiol. Biotech.* (2008), 35, 657–665.
- [94] J. Schmidt-Hager "Entwicklung und Optimierung eines Analysesystems zur online-Überwachung des Wachstums in geschüttelten Kulturen". Dissertation Leibniz Universität Hannover (2013).
- [95] A. Dunn und R. Richards-Kortum "Three-dimensional computation of light scattering from cells". *IEEE J. Quantum Electron.* (1996), 2, 898–905.
- [96] J. Büchs et al. "Calculating liquid distribution in shake flasks on rotary shakers at waterlike viscosities". *Biochem. Eng. J.* (2007), 34, 200–208.
- [97] G. Geppert und H. Thielemann "Streulichtphotometer zur kontinuierlichen Bestimmung der Biomassekonzentration in Fermentationsmedien". *Acta Biotechnol.* (1984), 4, 361–367.
- [98] J. Bleasdale und J. Nelder "Plant population and crop yield". *Nature* (1960), 188, 342.
- [99] P. Wu et al. "Evaluation and applications of optical cell density probes in mammalian cell bioreactors". *Biotech. Bioeng.* (1995), 45, 495–502.
- [100] R. A. Flynn et al. „Parallel transport of biological cells using individually addressable VCSEL arrays as optical tweezers". *Sens. Actuators B Chem.* (2002), 87, 239–243.
- [101] Y. Liu et al. "Realtime measurement of Single Living Bacterium's Refractive Index Measurement using Optofluidic Immersion Refractometry", *Procedia Engineering* (2014), 87, 356–359.
- [102] C. Ude "Multisensornetzwerke für Parallelreaktorsysteme". Dissertation Leibniz Universität Hannover (2016).

- [103] R. Drezek et al. "Light scattering from cells: finite-difference time-domain simulations and goniometric measurements". *Appl Opt* (1999), 38, 3651.
- [104] Z. Li et al. "Simple defined autoinduction medium for high-level recombinant protein production using T7-based *Escherichia coli* expression systems". *Appl Microbiol Biotechnol* (2011), 91, 1203-1213.
- [105] M. Tomala et al. "Preparation of bioactive soluble human leukemia inhibitory factor from recombinant *Escherichia coli* using thioredoxin as fusion partner". *Protein Expr Purif* (2010), 73, 51-57.
- [106] Y. Mirsky et al. "Optical biosensing of bacteria and cells using porous silicon based, photonic lamellar gratings". *Appl Phys Lett* (2013), 103, 033702.
- [107] N. Massad-Ivanir et al. "Trap and track: designing self-reporting porous Si photonic crystals for rapid bacteria detection". *Analyst* (2014), 139, 3885.
- [108] E. Yablonovitch "Inhibited spontaneous emission in solid-state physics and electronics". *Phys Rev Lett* (1987), 58, 2059-2062.
- [109] F. Hoffmann und U. Rinas "Stress induced by recombinant protein production in *Escherichia coli*". *Physiological stress responses in bioprocesses*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, (2004), 73-92.
- [110] A. Castellanos-Mendoza et al. "Influence of pH control in the formation of inclusion bodies during production of recombinant sphingomyelinase-D in *Escherichia coli*". *Microb Cell Factories* (2014), 13, 137.
- [111] A. Espargaró et al. "Thioflavin-S staining coupled to flow cytometry. A screening tool to detect in vivo protein aggregation". *Mol Biosyst* (2012), 8, 2839.
- [112] M. Fioroni et al. " β -barrel channel proteins as tools in nanotechnology". Springer Netherlands, Dordrecht (2014).
- [113] F. Gubellini et al. "Physiological response to membrane protein overexpression in *E. coli*". *Mol Cell Proteomics* (2011), 10, M111.007930.
- [114] S. Kyle et al. "Recombinant production of the therapeutic peptide lunasin". *Microb Cell Factories* (2012), 11, 28.
- [115] S. Sun et al. "A histone-like protein induces plasmid DNA to form liquid crystals in vitro and gene compaction in vivo". *Int J Mol Sci* (2013), 14, 23842-23857.
- [116] H. Zengin und A. Baysal "Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy". *Molecules* (2014), 19, 17773-17798.
- [117] Wittrup KD, Mann MB, Fenton DM, Tsai LB, Bailey JE Single-cell light scatter as a probe of refractile body formation in recombinant *Escherichia coli*". *Nat Biotechnol* (1988), 6, 423-426.
- [118] G. Lewis et al. "The application of multi-parameter flow cytometry to the study of recombinant *Escherichia coli* batch fermentation processes". *J Ind Microbiol Biotechnol* (2004), 31, 311-322.

- [119] R. Medwid et al. "Evaluation of *Escherichia coli* cell disruption and inclusion body release using nucleic acid binding fluorochromes and flow cytometry". *Biotechniques* (2007), 43, 777-782.
- [120] A. Neumeyer et al. "Monitoring of population dynamics of *Corynebacterium glutamicum* by multiparameter flow cytometry: population dynamics of *Corynebacterium glutamicum*". *Microb Biotechnol* (2013), 6, 157-167.
- [121] C. J. Hewitt und G. Nebe-Von-Caron "The application of multi-parameter flow cytometry to monitor individual microbial cell physiological state". *Physiological stress responses in bioprocesses*. Springer, Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, (2004), 197–223.
- [122] M. E. Laubacher et al. „Cell sorting enriches *Escherichia coli* mutants that rely on peptidoglycan endopeptidases to suppress highly aberrant morphologies". *J Bacteriol* (2013), 195, 855-866.
- [123] D. E. Nelson und K. D. Young "Penicillin binding protein 5 affects cell diameter, contour, and morphology of *Escherichia coli*". *J Bacteriol* (2000), 182, 1714-1721.
- [124] G. N. Rolinson "Effect of beta-lactam antibiotics on bacterial cell growth rate". *J Gen Microbiol* (1980), 120, 317-323.
- [125] R. L. Crisman und T. W. Randolph "Refolding of proteins from inclusion bodies is favored by a diminished hydrophobic effect at elevated pressures". *Biotechnol Bioeng* (2009), 102, 483-492.
- [126] G. Margreiter et al. "Size characterization of inclusion bodies by sedimentation field-flow fractionation". *J Biotechnol* (2008), 138, 67-73.
- [127] F. Amirouche et al. "Current micropump technologies and their biomedical applications". *Microsyst. Technol.* (2009), 15, 647-666.
- [128] B.D. Iverson und S.V. Garimella "Recent advances in microscale pumping technologies: a review and evaluation". *Microfluid. Nanofluidics.* (2008), 5, 145-147
- [129] H.T.G. van Lintel et al. "A piezoelectric micropump based on micromachining of silicon". *Sens. Actuators.* (1988), 15, 153-167.
- [130] B. Berman "3-D printing: The new industrial revolution". *Bus. Horiz.* (2012), 55, 155-162
- [131] R.D. Goodridge et al. "Laser sintering of polyamides and other polymers". *Prog. Mater. Sci.* (2012), 57, 229-267.
- [132] M. Hofmann "3D Printing Gets a Boost and Opportunities with Polymer Materials". *ACS Macro Lett.* (2014), 3, 382-386.
- [133] Evonik Industries, VESTAMID® L-polyamide 12, <http://www.vestamid.com/sites/lists/RE/DocumentsHP/VESTAMID-L-compounds-EN.pdf>. (21.06.2017)
- [134] V.A. Lifton et al. "Options for additive rapid prototyping methods (3D printing) in MEMS technology". *Rapid Prototyp. J.* (2014), 20, 403-412.
- [135] M. A. Duarte-Mermoud et al. „Experimental evaluation of combined model reference adaptive controller in a pH regulation process", *Int. J. Adapt. Control Signal Process.* (2002), 16, 85-106.

- [136] C. Deckard "Apparatus for producing parts by selective sintering". US Patent 5639070, (1997).
- [137] J. Allison et al. "Method of making a three-dimensional object by stereolithography". US Patent 5609812, (1993).
- [138] M. Lewis et al. "Rapid and accurate production of stereolithographic parts". US Patent 5610824, (1997).
- [139] J. Comb und S. Crump "Process of support removal for fused deposition modelling". US Patent 5503785, (1996).
- [140] C. Hull et al. "Method of building three dimensional objects with sheets". US Patent 5637169, (1997).
- [141] C. Deckard "Method for producing parts by selective sintering". US Patent 5639070, (1997).
- [142] R. Anderson et al. "Increasing the useful range of cationic photoinitiators in stereolithography". US Patent 5494618, (1996).
- [143] T. Almquist et al. "Recoating of stereolithographic layers". US Patent 5651934, (1997).
- [144] R. Brown et al. "Apparatus and method for thermal normalization in three-dimensional article manufacturing", US Patent 5572431, (1996).
- [145] B. Khoshevis "Additive fabrication apparatus and method". US Patent 5529471, (1996).
- [146] P. Forderhase und M. Ganninger "Selective laser sintering with composite plastic material". US Patent 5733497, (1998).
- [147] C. Hull "Method for production of three-dimensional objects by stereolithography". US Patent 5762856, (1990).
- [148] S. Upcraft und R. Fletcher "The rapid prototyping technologies". *Assem. Autom.* (2003), 23, 318-330.
- [149] M. Funke et al. "The baffled microtiter plate: increased oxygen transfer and improved online monitoring in small scale fermentations". *Biotechnol. Bioeng.* (2009), 103, 1118–1128.
- [150] NSAI, Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity (ISO 10993-5:2009), (2009).
- [151] A. Abe et al. "Biocompatibility of Nylon Resin Discs Fabricated by Selective Laser Sintering". *J. Oral Tissue Eng.* (2013), 11, 42-50.
- [152] NSAI, Biological evaluation of medical devices - Part 12: Sample preparation and reference materials (ISO 10993-12:2012), (2012).
- [153] A. Kroll et al. "Cytotoxicity screening of 23 engineered nanomaterials using a test matrix of ten cell lines and three different assays". *Part. Fibre Toxicol.* (2011), 8, 9.
- [154] B. Halliwell "Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem?". *FEBS Lett. Apr.* (2003), 540, 3-6.

- [155] J. M. C. Gutteridge und B. Halliwell "Free Radicals and Antioxidants in the Year 2000: A Historical Look to the Future". Ann. N. Y. Acad. Sci. (2006), 899, 136-147.
- [156] B. Halliwell "Biochemistry of oxidative stress". Biochem. Soc. Trans. (2007), 35, 1147-1150.
- [157] S. Schreiber "Neue Applikationen der Enzymaufreinigung". Dissertation Leibniz Universität Hannover (2017).
- [158] E. M. Anderson et al. „One biocatalyst - many applications: the use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis". Biocatal Biotransfor (1998), 16, 181-204
- [159] P. Trodler et al. "Rational design of a new one-step purification strategy for *Candida antarctica* lipase B by ion-exchange chromatography". J Chrom A (2008), 1179, 161-167
- [160] J. Uppenberg et al. "The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*". Structure (1994), 15, 293-308
- [161] Y. Yigzaw et al. "Exploitation of the adsorptive properties of depth filters for host cell protein removal during monoclonal antibody purification". Biotechnol Progr (2006), 22, 288-296.
- [162] M. Prashad und K. Tarrach "Depth filtration: cell clarification of bioreactor offloads". Filtr Separat (2006), 43, 28-30.
- [163] G. Ladam et al. „Protein adsorption onto auto-assembled polyelectrolyte films“. Langmuir (2001), 17, 878-882.
- [164] K. Ohlrogge und K. Ebert „Membranen. Grundlagen, Verfahren und industrielle Anwendungen“. VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Wiley (2006).
- [165] M. W. Larsen et al. „Expression of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris* and various *Escherichia coli* systems“. Protein Expres Purif (2008), 62, 90-97
- [166] T. M. Przybycien et al. „Trends in bioseparation“. Current Opinion in Biotechnology (2004), 15, 469-478.
- [167] J. Thömmes und M. Etzel „Alternatives to chromatographic separation“. Biotechnol. Progr. (2007), 23, 42-45.
- [168] Ö. Kökpınar et al. „ innovative modular membrane adsorber system for high-throughput downstream screening for protein purification“. Biotechnol. Progr. (2006), 22, 1215-1219.
- [169] J. Thömmes und M. R. Kula „Membrane chromatography – An integrative concept in the downstream processing of proteins“. Biotechnol. Progr. (1995), 11, 357-367.
- [170] A. Mönster "Neue Membranadsorbertechnologie zur Anwendung in der Enzymproduktion". Dissertation Leibniz Universität Hannover (2011).
- [171] M. F. Chaplin und C. Bucke „Enzyme Technology“. Cambridge University Press (1990).
- [172] R. S. Singh et al. „Partial purification and characterization of exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 for preparation of high-fructose syrup“. J. Microbiol. Biotechnol. (2007), 17, 733–738.

- [173] G. L. Miller "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars". *Anal. Chem.* (1959), 31 (3), 426-428.
- [174] I. H. Park et al. "gene cloning of endoglucanase Cel5A from cellulose-degrading *Paenibacillus xylanolyticus* KJ-03 and purification and characterization of the recombinant enzyme". *Protein J.* (2012), 31, 238-245.
- [175] U. K. Winkler und M. Stuckmann "Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*". *J. Bacteriol.* (1979), 138 (3), 663-670.
- [176] N. Krieger et al. "Purification of a *Penicillium citrinum* lipase by chromatographic processes". *Bioprocess Eng.* (1999), 20, 59-65.
- [177] F. A. van Winssen et al. „Tunable aqueous polymer-phase impregnated resins-technology—a novel approach to aqueous two-phase extraction". *J. Chromatogr. A* (2014), 1329, 38-44.
- [178] O. Aguilar et al. "Direct comparison between ion-exchange chromatography and aqueous two-phase processes for the partial purification of penicillin acylase produced by *E. coli*". *J. Chromatogr. B* (2006), 835(1–2), 77–83.
- [179] P. Å. Albertsson "Partition of cell particles and macromolecules". Wiley, New York (1986).
- [180] P. Å. Albertsson et al. "Aqueous two-phase separations". Separation processes in biotechnology, *Bioprocess Technology*, (1990) vol 9. Marcel Dekker, New York, 287-327.
- [181] A. Glyk " Characterization and Application of PEG-Salt Aqueous Two-Phase Systems for Liquid-Liquid Extraction of Proteins". Dissertation Leibniz Universität Hannover (2017).
- [182] J. Benavides und M. Rito-Palomares "Practical experiences from the development of aqueous two-phase processes for the recovery of high value biological products". *J. Chem. Technol. Biotechnol.* (2008), 83 (2), 133-142.
- [183] M. Rito-Palomares M "Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products". *J. Chromatogr. B* (2004), 807 (1), 3-11.
- [184] F. Dismer et al. "Molecular dynamics simulations of aqueous two-phase systems: understanding phase formation and protein partitioning". *Chem. Eng. Sci.* (2013), 96, 142-151.
- [185] L. H. Meller da Silva et al. „Equilibrium phase behavior of poly(ethylene glycol) + potassium phosphate + water two-phase systems at various pH and temperatures". *J. Chem. Eng. Data* (1997), 42, 398-401.
- [186] J. Vernau und M. R. Kula "Extraction of proteins from biological raw materials using aqueous poly(ethylene) glycol–citrate phase systems". *Biotechnol. Appl. Biochem.* (1990), 12, 397-404.

- [187] T. Murugesan und M. Perumalsamy "Liquid-liquid equilibria of polyethylene glycol 2000 + sodium citrate + water at (25, 30, 35, 40, and 45) °C". *J. Chem. Eng. Data* (2005), 50, 1392-1395.
- [188] M. T. Zafarani-Moattar et al. "Liquid-liquid equilibrium of an aqueous two phase system containing polyethylene glycol and sodium citrate: Experimental and correlation". *Fluid Phase Equilib.* (2004), 219, 149-155.
- [189] M. Perumalsamy et al. "Experimental and correlation of liquid-liquid equilibria of an aqueous two phase system containing PEG6000 + sodium citrate". *J. Chem. Eng. Data* (2007), 52, 1186-1188.
- [190] R. M. Oliveira et al. "Liquid-liquid equilibria of biphasic systems composed of sodium citrate + polyethylene(glycol) 1500 or 4000 at different temperatures". *J. Chem. Eng. Data* (2008), 53, 895-899.
- [191] N. Voros et al. "Liquid-liquid phase equilibria of aqueous two-phase systems containing salts and polyethylene glycol". *Fluid Phase Equilib.* (1993), 90, 333-335.
- [192] M. T. Zafarani-Moattar und R. Sadeghi "Liquid-liquid equilibria of aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and sodium dihydrogen phosphate or disodium hydrogen phosphate experiment and correlation". *Fluid Phase Equilib.* (2001), 181, 95-112.
- [193] M. Hu et al. "Liquid-liquid and liquid-liquid-solid equilibrium in PEG + Cs₂SO₄ + H₂O". *J. Chem. Eng. Data* (2004), 49, 1440-1443
- [194] D. F. Othmer und P. E. Tobias „Liquid-liquid extrction – Data toluene and acetaldehyde systems". *Ind. Eng. Chem.* (1942), 34, 690-692.
- [195] P. G. Gonzales-Tello et al. Liquid-liquid equilibrium in the system poly(ethylene glycol) + MgSO₄ + H₂O at 298 K". *J. Chem. Eng. Data* (1996), 41, 1333-1336.
- [196] D. Forciniti et al. "Influence of polymer molecular weight and temperature on phase composition in aqueous two-phase systems". *Fluid Phase Equilib.* (1991), 61, 243-262.
- [197] Y. Guan et al. "A new excluded volume theory and its application to the coexistence curves of aqueous polymer two-phase system". *Macromolecules* (1993), 26, 3971-3979.
- [198] Y. Guan et al. "Application of a statistical geometrical theory to aqueous two-phase systems". *J. Chromatogr. B* (1994), 668, 31-45.
- [199] W. Kunz et al. "Zur Lehre von der Wirkung der Salze' (About the Science of the Effect of Salts): Franz Hofmeister's historical papers". *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* (2004), 9, 19-37.
- [200] M. K. Shahbazinasab und F. Rahimpou "Liquid-liquid equilibrium data for aqueous two-phase systems containing PPG725 and salts at various pH values". *J. Chem. Eng. Data* (2012), 57, 1867-1874.
- [201] M. T. Zafarani-Moattar und S. Hamzehzadeh "Effect of pH on the phase separation in the ternary aqueous system containing the hydrophilic ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium

- bromide and the kosmotropic salt potassium citrate at $T = 298.15\text{ K}$ ". *Fluid Phase Equilib.* (2011), 304, 110-120.
- [202] J. G. Huddleston und F. D. Rogers "Phase diagram data for several PEG + salt aqueous biphasic systems at $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ". *J. Chem. Eng. Data* (2003), 48, 1230-1236.
- [203] L. P. Malpiedi et al. "Liquid-liquid equilibrium phase diagrams of polyethyleneglycol + sodium tartrate + water two-phase systems". *J. Chem. Eng. Data* (2008), 53, 1175-11782.
- [204] J. C. Merchuk et al. "Aqueous two-phase systems for protein separation Studies on phase inversion". *J. Chromatogr. B.* (1998), 711, 285-293.
- [205] L. A. Ferreira und J. A. Teixeira "Salt effect on the aqueous two-phase system PEG 8000-sodium sulfate". *J. Chem. Eng. Data* (2011), 56, 133-137.
- [206] F. Rahimpour und M. Pirdashti "Effective Parameters on the Partition Coefficient of Guanidine Hydrochloride in the Poly (Ethylene Glycol) + Phosphate + Water System at 298.15 K ". *I. J. Ch. E.* (2010), 7 (1), 67-75.
- [207] M. E. Taboada et al. "Compositions, Densities, Conductivities, and Refractive Indices of Potassium Chloride or/and Sodium Chloride + PEG 4000 + Water at 298.15 and Liquid-Liquid Equilibrium of Potassium Chloride or Sodium Chloride + PEG 4000 + Water at 333.15 K ". *J. Chem. Eng. Data* (2005), 50, 264-269.
- [208] M. González-González et al. "Colorimetric protein quantification in aqueous two-phase systems". *Process Biochem.* (2011), 46, 413-417.
- [209] H. Barbosa et al. "Protein quantification in the presence of poly(ethylene glycol) and dextran using the Bradford method". *Anal. Biochem.* (2009), 395, 108-110.
- [210] A.C. Dumetz et al. Comparative effects of salt, organic, and polymer precipitants on protein phase behavior and implications for vapor diffusion". *Cryst. Growth Des.* (2009), 9, 682-691.
- [211] S.C. Silvério et al. "Interference of some aqueous two-phase system phase-forming components in protein determination by the Bradford method". *Anal. Biochem.* (2012), 421, 719-724.
- [212] M.M. Bradford "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal. Biochem.* (1976), 72, 248-254.
- [213] P.K. Smith et al. "Measurement of protein using bicinchoninic acid". *Anal. Biochem.* (1985), 150, 76-85.
- [214] D. H. Atha und K. C. Ingham "Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols. Analysis in terms of excluded volume". *J. Biol. Chem.* (1981), 256, 12108-12117.
- [215] K. C. Ingham "Precipitation of proteins with polyethylene glycol". *Methods in Enzymology*, Academic Press, San Diego (1990), 301-306.
- [216] S. J. Compton und C. G. Jones "Mechanism of dye response and interference on the Bradford protein assay". *Anal. Biochem.* (1985), 151, 369-374.

- [217] S. Raja et al. "Aqueous two phase systems for the recovery of biomolecules – A review". Sci. Technol. (2011, 1, 7-16.
- [218] J. Antony "Design of Experiments for Engineers and Scientists". 1st ed., Butterworth Heinemann, Amsterdam (2003).
- [219] D.C. Montgomery "Design and Analysis of Experiments". 8th ed., Wiley, New Jersey (2013).
- [220] J. S. Lawson und J. Erjavec "Modern Statistics for Engineering and Quality Improvement". 1st ed., Duxbury, California (2000).
- [221] L. Eriksson et al. "Design of Experiments". 3rd ed., MKS Umetrics AB, Umeå (2008).
- [222] Y. Lu et al. "The optimization of aqueous two-phase extraction of lysozyme from crude hen egg white using response surface methodology". J. Chem. Technol. Biotechnol. (2013), 88, 415-421.
- [223] S. Raja und V.R. Murty "Optimization of aqueous two-phase systems for the recovery of soluble proteins from tannery wastewater using response surface methodology". J. Eng. (2013), 1-10.
- [224] F. Francis et al. "Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*". Biochem. Eng. J. (2003), 15, 107-115.
- [225] R. H. Myers und D. C. Montgomery "Response Surface Methodology". 2nd ed., Wiley, New York (2002).
- [226] P. A. J. Rosa et al. "Application of central composite design to the optimisation of aqueous two-phase extraction of human antibodies". J. Chromatogr. A (2007), 1141, 50-60.
- [227] J. Zolgharnein et al. "Comparative study of Box–Behnken, central composite, and Doehlert matrix for multivariate optimization of Pb (II) adsorption onto *Robinia* tree leaves". J. Chemom. (2013), 27, 12-20.
- [228] G. E. P. Box und D. W. Behnken "Some new three level designs for the study of quantitative variables". Technometrics (1960), 2, 455-475.
- [229] F. Rahimpour et al. "Optimizing refolding and recovery of active recombinant *Bacillus halodurans* xylanase in polymer–salt aqueous two-phase system using surface response analysis". J. Chromatogr. A (2007), 1141, 32-40.
- [230] Z. D. V. L. Mayerhoff et al. „Purification of xylose reductase from *Candida mogii* in aqueous two-phase systems". Biochem. Eng. J. (2004), 18, 217-223.
- [231] D. Peričin et al. "Optimization of conditions for acid protease partitioning and purification in aqueous two-phase systems using response surface methodology". Biotechnol. Lett. (2009), 31, 43-47.
- [232] J. T. D. Faria et al. "Use of response surface methodology to evaluate the extraction of *Debaryomyces hansenii* xylose reductase by aqueous two-phase system". J. Chromatogr. B (2009), 877, 3031-3037.

- [233] H. S. Mohammadi et al. "Response surface methodology to optimize partition and purification of two recombinant oxidoreductase enzymes, glucose dehydrogenase and D-galactose dehydrogenase in aqueous two-phase systems". *Protein Expression Purif.* (2015), 108, 41-47
- [234] J. C. Marcos et al. "Application of surface response analysis to the optimization of penicillin acylase purification in aqueous two-phase systems". *Enzyme Microb. Technol.* (2002), 31, 1006-1014.
- [235] Y.-Q. Ling et al. "Optimization of affinity partitioning conditions of papain in aqueous two-phase system using response surface methodology". *Sep. Purif. Technol.* (2010), 73, 343-348.
- [236] D. Garai und V. Kumar "Aqueous two phase extraction of alkaline fungal xylanase in PEG/phosphate system: Optimization by Box–Behnken design approach". *Biocatal. Agric. Biotechnol.* (2013), 2, 125-131.
- [237] X. Ren et al. "Optimization of recombinant hyperthermophilic esterase production from agricultural waste using response surface methodology". *Bioresour. Technol.* (2006), 97, 2345-2349.
- [238] S.-N. Su et al. "Optimization of adsorption conditions of papain on dye affinity membrane using response surface methodology". *Bioresour. Technol.* (2009), 100, 2336-2340.
- [239] K. S. M. S. Raghavarao et al. "Aqueous two-phase extraction for downstream processing of enzymes/proteins". *Advances in applied microbiology*, Academic Press, New York (1995) 41, 97-171
- [240] J. Benavides et al. "Aqueous two-phase systems". *Comprehensive biotechnology. Principles and practices in industry, agriculture, medicine and the environment*, 2nd ed. Academic Press, Burlington (2011), 697–713
- [241] R. M. Banik et al. „Technological aspects of extractive fermentation using aqueous two-phase Systems". *World J Microbiol Biotechnol* (2003), 19(4), 337-348.
- [242] S. Hotha und R. M. Banik "Production of alkaline protease by *Bacillus thuringiensis* H 14 in aqueous two-phase systems". *J. Chem. Technol. Biotechnol.* (1997), 69(1), 5-10.
- [243] M. A. Bim und T. T. Franco "Extraction in aqueous two-phase systems of alkaline xylanase produced by *Bacillus pumilus* and its application in kraft pulp bleaching". *J. Chromatogr. B* (2000), 743(1–2), 349-356.
- [244] M. T. Cunha et al. "Integration of production and aqueous two-phase systems extraction of extracellular *Fusarium solani pisi* cutinase fusion proteins". *J. Biotechnol.* (2003) 100(1), 55-64.
- [245] W. Chouyyok et al. "Extraction of alkaline protease using an aqueous two-phase system from cell free *Bacillus subtilis* TISTR 25 fermentation broth". *Process Biochem.* (2005), 40(11), 3514-3518.

- [246] R. P. Bezerra et al. „Extraction of amylase from fermentation broth in poly (ethylene glycol) salt aqueous two-phase system. *Braz. ArchBiol. Technol.* (2006), 49(4), 547-555.
- [247] K. Naganagouda und V. H. Mulimani “Aqueous two-phase extraction (ATPE): an attractive and economically viable technology for downstream processing of *Aspergillus oryzae* α -galactosidase. *Process Biochem.* (2008), 43(11), 1293-1299.
- [248] T. S. Porto et al. “Liquid–liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system”. *Chem. Eng. Process* (2008), 47(4), 716-721.
- [249] J. M. P. Barbosa et al. “Purification of lipase produced by a new source of *Bacillus l* submerged fermentation using an aqueous two-phase system”. *J. Chromatogr. B* (2011) 879(32), 3853-3858.
- [250] A. Marini et al. “Isolation of a *Aspergillus niger* lipase from a solid culture medium with aqueous two-phase systems”. *J. Chromatogr. B* (2011), 879(22), 2135-2141.
- [251] H. S. Ng et al. “Primary capture of cyclodextrin glycosyltransferase derived from *Bacillus cereus* by aqueous two phase system”. *Sep. Purif. Technol.* (2011), 81(3), 318-324.
- [252] M. Rito-Palomares und A. Lyddiatt “Practical implementation of aqueous two-phase processes for protein recovery from yeast”. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* (2000), 75(7), 632-638.
- [253] M. R. Kula et al. “Purification of enzymes by liquid-liquid extraction”. *Reaction engineering. Advances in biochemical engineering* (1982), 24. Springer, Berlin, 73–118.
- [254] H. Hustedt et al. “Protein recovery using two-phase systems”. *Trends Biotechnol.* (1985), 3(6), 139-144.
- [255] W. Hummel et al. „D-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase from *Lactobacillus casei*”. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1985), 21(1-2), 7-15.
- [256] M. Rito-Palomares und A. Lyddiatt “Impact of cell disruption and polymer recycling upon aqueous two-phase processes for protein recovery”. *J. Chromatogr. B* (1996), 680(1–2), 81-89.
- [257] J. C. Marcos et al. “Variation of penicillin acylase partition coefficient with phase volume ratio in poly(ethylene glycol)–sodium citrate aqueous two-phase systems”. *J. Chromatogr. B* (1998), 711(1–2), 295-299.
- [258] M. Rito-Palomares et al. “Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for c-phycoyanin recovery from *Spirulina maxima*”. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* (2001), 76(12), 1273-1280.
- [259] M. Rito-Palomares und A. Lyddiatt “Process integration using aqueous two-phase partition for the recovery of intracellular proteins”. *Chem. Eng. J.* (2002), 87(3), 313-319.

- [260] M. C. Madhusudhan und K. S. M. S. Raghavarao "Aqueous two phase extraction of invertase from baker's yeast: effect of process parameters on partitioning". *Process Biochem.* (2011), 46(10), 2014-2020.
- [261] M. C. Madhusudhan et al. "Integrated process for extraction and purification of alcohol dehydrogenase from Baker's yeast involving precipitation and aqueous two phase extraction". *Biochem. Eng. J.* (2008), 38(3), 414-420.
- [262] H. S. Mohammadi und E. Omidinia "Process integration for the recovery and purification of recombinant *Pseudomonas fluorescens* proline dehydrogenase using aqueous two-phase systems". *J. Chromatogr. B* (2013), 929, 11-17.
- [263] A. M. Targovnik et al. "Extractive purification of recombinant peroxidase isozyme c from insect larvae in aqueous two-phase systems". *Sep. Purif. Technol.* (2012), 98, 199-205.
- [264] H. M. Park et al. "Affinity separation by protein conjugated IgG in aqueous two-phase systems using horseradish peroxidase as a ligand carrier". *J. Chromatogr. B.* (2007), 856(1-2), 108-112.
- [265] Y. Liu et al. "Advances in aqueous two-phase systems and applications in protein separation and purification". *Can. J. Chem. Eng. Technol.* (2011), 2(2), 1-7
- [266] S. Teotia et al. "Integration of affinity precipitation with partitioning methods for bioseparation of chitin binding lectins". *Food Bioprod. Process* (2006), 84(1), 37-43.
- [267] S. Teotia und M. N. Gupta "Reversibly soluble macroaffinity ligand in aqueous two-phase separation of enzymes". *J. Chromatogr. A* (2001), 923(1-2), 275-280.
- [268] M. E. Silva und T. T. Franco TT "Purification of microbial β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* by bioaffinity partitioning". *Rev Microbiol.* (1999), 30(4), 324-331.
- [269] B. A. Andrews et al. "PEG activation and ligand binding for the affinity partitioning of proteins in aqueous two-phase systems". *Biotechnol Tech* (1990), 4(1), 49-54.
- [270] G. Birkenmeier et al. "Immobilized metal ion affinity partitioning, a method combining metal-protein interaction and partitioning of proteins in aqueous two-phase systems". *J. Chromatogr. A* (1991), 539(2), 267-277.
- [271] T. de Gouveia und B. V. Kilikian "Bioaffinity extraction of glucoamylase in aqueous two-phase systems using starch as free bioligand". *J. Chromatogr. B* (2000), 743(1-2), 241-246.
- [272] Y. Guan et al. "Use of aqueous two-phase systems in the purification of human interferon- α 1 from recombinant *Escherichia coli*". *Enzym Microb. Technol.* (1996), 19(6), 446-455.
- [273] S. Fernandes et al. "Purification of recombinant cutinase by extraction in an aqueous two-phase system facilitated by a fatty acid substrate". *Biotechnol. Bioeng.* (2001), 73(6), 465-475.

- [274] M. R. Gavasane und V. G. Gaikar "Aqueous two-phase affinity partitioning of penicillin acylase from *E. coli* in presence of PEG derivatives". *Enzym Microb. Technol.* (2003), 32(6), 665-675.
- [275] W. Kuhlmann et al. „Racemat-Spaltung von Aminosäuren durch Immobilisierung von Acylase im wäßrigen Zweiphasensystem“. *Chem. Ing. Tech.* (1980), 52(7), 607-607.
- [276] C. Aguirre et al. "Partition and substrate concentration effect in the enzymatic synthesis of cephalexin in aqueous two-phase systems". *Process Biochem.* (2010), 45(7), 1163-1167.
- [277] E. Andersson et al. "Enzymatic conversion in aqueous two-phase systems: deacylation of benzylpenicillin to 6-aminopenicillanic acid with penicillin acylase". *Enzym Microb. Technol.* (1984), 6(7), 301-306.
- [278] J. P. Chen und C. H. Wang "Lactose hydrolysis by β -galactosidase in aqueous two-phase systems". *J. Ferment. Bioeng.* (1991), 71(3), 168-175.
- [279] H. N. Chang et al. „Continuous production of 6-APA in an aqueous two-phase system“. *Ann. NY Acad. Sci.* (1992), 672(1), 643-648.
- [280] M. Canales et al. "Extractive bioconversion to produce the *Aedes albopictus* akirin in an aqueous two-phase system supporting *Pichia pastoris* growth and protein secretion". *Biochem. Eng. J.* (2009), 46(2), 105–114.
- [281] L. C. Liao et al. "Bioconversion with whole cell penicillin acylase in aqueous two-phase systems". *Process Biochem.* (1999), 34(5), 417-420.
- [282] N. Papamichael et al. "Continuous aqueous phase extraction of proteins: Automated processing and recycling of process chemicals". *J. Chem. Technol. Biotechnol.* (1992), 54(1), 47-55.
- [283] P. Selvakumar et al. "Enzymatic hydrolysis of bovine hide and recovery of collagen hydrolysate in aqueous two-phase systems". *Sep. Purif. Technol.* (2012), 89, 282-287.
- [284] D. Z. Wei et al. "Enzymatic synthesis of cephalexin in aqueous two-phase systems". *Biochem. Eng. J.* (2002), 11(2–3), 95-99.
- [285] S. Nitsawang et al. "Purification of papain from *Carica papaya* latex: aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation". *Enzym Microb. Technol.* (2006), 39(5), 1103-1107.
- [286] K. Bhavsar et al. "Downstream processing of extracellular phytase from *Aspergillus niger*: chromatography process vs. aqueous two phase extraction for its simultaneous partitioning and purification". *Process Biochem.* (2012), 47(7), 1066-1072.
- [287] C. Gosch et al. "Phloridzin: Biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants". *Phytochemistry* (2010), 71(8-9), 838-843.
- [288] K. Xu et al. "High-speed counter-current chromatography preparative separation and purification of phloretin from apple tree bark". *Separation and Purification Technology* (2010), 72(3), 406-409.

- [289] J. Ley et al. "Structural analogues of hispolon as flavor modifiers. in Expression of Multi-disciplinary Flavour Science", Proceedings of the 12 th Weurman Symposium, July 1-4 2008, Interlaken, Switzerland (2010).
- [290] R. J. Nijveldt et al., "Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications". American Journal of Clinical Nutrition (2001), 74(4), 418-425.
- [291] B. G. Auner et al. „Antioxidative activity and cytotoxicity of four different flavonoids for dermal applications". Journal of Drug Delivery Science and Technology (2005), 15(3), 227-232.
- [292] M. G. L. Hertog et al. „Dietary Antioxidant Flavonoids and Risk of Coronary Heart-Disease - the Zutphen Elderly Study". Lancet (1993), 342(8878), 1007-1011.
- [293] P. Knekt et al. "Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms". American Journal of Epidemiology (1997), 146(3), 223-230.
- [294] K.Y. Christensen et al. „The Risk of Lung Cancer Related to Dietary Intake of Flavonoids". Nutrition and Cancer-an International Journal (2012), 64(7), 964-974.
- [295] S. Veeriah et al. "Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics". Molecular Carcinogenesis (2006), 45(3), 164-174.
- [296] C. Puel et al. "Prevention of bone loss by phloridzin, an apple polyphenol, in ovariectomized rats under inflammation conditions". Calcified Tissue International (2005), 77(5), 311-318.
- [297] C. A. Williams und R.J. Grayer "Anthocyanins and other flavonoids". Natural Product Reports, (2004) 21(4), 539-573.
- [298] A. R. Dixon und N.L. Paiva "Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism". The Plant Cell 7: (1995), 1085-1097
- [299] A. Schmidt „Biokatalytische Gewinnung von Flavonoiden“ Dissertation Leibniz Universität Hannover (2011).
- [300] C. Herles „Untersuchungen zum enzymatischen Abbau ausgewählter Flavonoide durch *Eubacterium ramulus*“, Dissertation Universität Potsdam (2003).
- [301] H. Schneider und M. Blaut "Anaerobic degradation of flavonoids by *Eubacterium ramulus*". Archives of Microbiology, (2000) 173(1), 71-75.
- [302] L. Schoefer "Transformation of flavonoids by bacteria from the human intestinal tract". Dissertation Universität Potsdam (2002).
- [303] S. Özmen "Untersuchungen zur Biosynthese und Degradation sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe in der Rinderernährung". Dissertation Leibniz Universität Hannover (2014).
- [304] R. A. Bednar und J.R. Hadcock "Purification and Characterization of Chalcone Isomerase from Soybeans". Journal of Biological Chemistry (1988), 263(20), 9582-9588.
- [305] H. I. Mckhann und A.M. Hirsch "Isolation of Chalcone Synthase and Chalcone Isomerase Cdnas from Alfalfa (*Medicago-Sativa* L) - Highest Transcript Levels Occur in Young Roots and Root-Tips". Plant Molecular Biology (1994). 24(5), 767-777.
- [306] C. Herles et al. "First bacterial chalcone isomerase isolated from *Eubacterium ramulus*". Archives of Microbiology (2004), 181(6), 428-434.

- [307] L. Schoefer et al. "Cloning and expression of a phloretin hydrolase gene from *Eubacterium ramulus* and characterization of the recombinant enzyme". Applied and Environmental Microbiology (2004), 70(10), 6131-6137.
- [308] H. Schneider „Abbau von Flavonoiden durch Mikroorganismen des Gastrointestinaltrakts“. Logos Verlag Berlin (1999), ISBN 978-3-89722-330-1.
- [309] R. E. Williams und N. C. Bruce "New uses for an Old Enzyme ' – the Old Yellow Enzyme family of flavoenzymes". Microbiology (2002), 148, 1607-1614
- [310] F. Rohdich et al. "Enoate Reductases of *Clostridia* Cloning, sequencing and expression". J. Biol. Chem. 2001, 276, 5779 – 5787
- [311] Verordnung über Aromen und bestimmte Lebensmittelzutaten mit Aromaeigenschaften zur Verwendung in und auf Lebensmittel (EG Nr. 1334/2008), Amtsblatt der Europäischen Union 31.12 2008, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:354:0034:0050:de:PDF> (19.06.2017)
- [312] P. N. Levett "Anaerobic bacteria : a functional biology", Open University Press, Milton Keynes; Philadelphia (1990).
- [313] R. E. Hungate "The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria". Bacteriol Rev (1950), 14, 1-49.
- [314] M. P. Bryant "Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria". Am J Clin Nutr (1972), 25, 1324-1328.
- [315] T. Dreher et al. "High Cell Density *Escherichia coli* Cultivation in Different Single-Use Bioreactor Systems". Chemie Ingenieur Technik (2013), 85(1-2), 162-171.
- [316] R. Eibl et al. "Disposable bioreactors: the current state-of-the-art and recommended applications in biotechnology". Applied Microbiology and Biotechnology (2010), 86(1), 41-49.
- [317] R. Eibl et al. "Disposable bioreactors for plant liquid cultures at Litre-scale". Engineering in Life Sciences (2009), 9(3), 156-164.
- [318] R. Eibl et al. "Bag Bioreactor Based on Wave-Induced Motion: Characteristics and Applications". Disposable Bioreactors (2009), 115, 55-87.
- [319] H. Bouws et al. "Fungal secretomes – nature's toolbox for white biotechnology". Applied Microbiology and Biotechnology (2008), 80, 381–388.
- [320] A. Grimrat et al. "Koji fermentation based on extracellular peptidases of *Flammulina velutipes*". European Food Research and Technology (2011), 232, 415–424.
- [321] P. Jonczyk "Biologische Wege zur Gewinnung von Flavonoiden". Dissertation Leibniz Universität Hannover (2013).
- [322] P. P. Grünert "Entwicklung eines biotechnologischen Plattformprozesses für die Produktion von Flavonoiden durch Ganzzellbiotransformation". Dissertation Leibniz Universität Hannover (2016).
- [323] S.Y. Lee "High cell-density culture of *Escherichia coli*". Trends in Biotechnology (1996), 14(3), 98-105

- [324] D. Stark und U. Stockar "Process integration in biochemical engineering". Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology Bd. 80 (2003), Springer Berlin Heidelberg.
- [325] M.R. Freeman et al. "In situ product removal as a tool for bioprocessing". Biotechnology (1993), 11(9), 1007-1012