

**Herstellung, Charakterisierung und Anwendung einer
rekombinanten Patchoulolsynthase zur biokatalytischen
Herstellung von Sesquiterpenen**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

M.Sc. Thore Hermann Wilhelm Frister

geboren am 10.04.1986 in Kiel

2015

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper

Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Detlef W. Bahnemann

Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Prüfungsvorsitz: PD Dr. rer. nat. Ulrich Krings

Institut für Lebensmittelchemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Tag der Promotion: 12. Oktober 2015

*Wer nicht von dreitausend Jahren
sich weiß Rechenschaft zu geben,
bleibt im Dunkeln unerfahren,
mag von Tag zu Tage leben.*

J. W. von Goethe

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper danke ich herzlich für die Möglichkeit diese Dissertation in seinem Arbeitskreis anzufertigen.

Für die Übernahme des Korreferats bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Bahnemann.

Bei Herrn Dr. Sascha Beutel möchte ich mich für die Unterstützung und die hervorragende Betreuung während der Masterarbeit und der Promotion bedanken. Besonders bedanke ich mich für das mir entgegen gebrachte Vertrauen und die vielen Freiheiten in der Ausgestaltung meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Herrn PD Dr. Ulrich Krings danke ich für die Hilfe bei der Durchführung zahlreicher Analysen und für viele lehrreiche und angenehme Fachgespräche rund um die Duftstoffanalytik.

Herzlich danke ich Cornelia Alic, Ulrike Dreschel, Martin Pähler, Thorsten Stempel und ganz besonders Martina Weiß für technische Unterstützung, hilfreiche Tipps und Tricks und die Aufrechterhaltung des betrieblichen Alltags.

Bei Herrn Dr. Torsten Kulke und Herrn Dr. Johannes Panten von der Symrise AG bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des Kooperationsprojektes und für interessante Gespräche über die Welt der Düfte und Parfüms.

Herrn Dr. Jörg Fohrer danke ich für die Durchführung von NMR-Analysen.

Für ihre interessierte, wissbegierige und tatkräftige Mitarbeit an meinem Promotionsthema während ihrer Abschlussarbeiten möchte ich mich bei Katharina Schnatz, Laura Thöns, Sarah Irmscher, Johanna Ritzer und Sinem Taşdelen bedanken. Ich hoffe, dass sie die Zusammenarbeit genauso genossen haben wie ich und dass sie in der gemeinsamen Zeit etwas Nützliches gelernt haben.

Viele meiner Kollegen haben auf unterschiedlichste Weise zum Gelingen dieser Arbeit beitragen; sei es durch ihren Rat und Tat, ihre Hilfsbereitschaft oder einfach dadurch da zu sein, um gemeinsam zu lachen und die Höhen und Tiefen einer Promotion zu bewältigen. Neben vielen anderen sind hier vor allem Semra, Gesa, Sarah, Christian, Franziska, Patrick, Ingo und Fred zu nennen. Für die vielen schönen Erlebnisse innerhalb und außerhalb des Instituts danke ich meinen TCI-Freunden der ersten Stunde Michi, Philipp, Matthias und Steffen. Steffen, dir danke ich außerdem für die Betreuung in meiner Masterarbeit und die hervorragende und vertrauensvolle Zusammenarbeit während unserer beider Promotionen.

Außerdem möchte ich allen anderen Mitarbeitern des TCI für die tolle gemeinsame Zeit danken. Ihr seid der Grund warum ich mich am Institut immer wohlfühlt habe!

Meiner Familie danke ich, dass sie immer für mich da war und mich in jeder Situation unterstützt hat.

Schließlich bedanke ich mich bei meiner Verlobten Christina für alles was sie für mich getan hat. Ihr Vertrauen, ihre Geduld und ihre bedingungslose und fortwährende Unterstützung sind nicht Worte zu fassen. Ich liebe dich!

Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte eine rekombinante Patchoulolsynthase (PTS) im Hinblick auf eine technische Verwendung als Biokatalysator für die Herstellung von hochwertigen Sesquiterpenen untersucht werden. Zunächst wurde ein reproduzierbarer Bioprozess für die rekombinante Herstellung der PTS in *E. coli* entwickelt. In einem 2 L Bioreaktor wurden dazu Experimente zur Hochzelldichtekultivierung durchgeführt, bei denen die Produktion der löslichen PTS durch die Variation des feed-Stroms und der Temperaturbedingungen während der Induktion optimiert wurde. Auf diese Weise konnte die lösliche PTS mit einem Titer von 4 g/L produziert werden. Zur Isolierung der PTS aus den *E. coli* Zellen, wurde eine Aufreinigungsstrategie entwickelt. Neben der Optimierung des Zellaufschlusses und der Ultrafiltration, wurden verschiedene Chromatographieverfahren evaluiert. Auf Basis dessen konnte die PTS in einer hohen Reinheit von 94% isoliert und gleichzeitig die Grundlage für einen scale-up des downstreaming processing gelegt werden.

Das aufgereinigte Enzym wurde anschließend hinsichtlich seiner funktionalen und kinetischen Eigenschaften charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass die PTS eine für Sesquiterpensynthesen ungewöhnlichen Substratinhibierung aufweist. Hinweise aus der Literatur deuten darauf hin, dass der Grund für dieses Verhalten im Auftreten eines intermediären Sesquiterpens im Mechanismus der Produktbildung zurück zu führen ist. Mit Hilfe von Deuterierungsexperimenten konnte der in der Literatur postulierte Reaktionsmechanismus dahingehend ergänzt werden, dass auch die auftretende Substratinhibierung plausibel erklärbar ist. Darüber hinaus bestand ein Schwerpunkt der funktionalen Charakterisierung der PTS in der Untersuchung der Substratflexibilität (substrate scope). Dabei zeigte sich, dass die PTS in der Lage ist, sehr unterschiedliche Prenylpyrophosphate umzusetzen. Speziell die Verwendung eines definierten Gemisches aus den *E,Z*-Isomeren des FPP als alternatives Substrat führt zu einem neuem Patchouli-ähnlichen Öl, das ein interessanter Duftstoff für die Parfümindustrie darstellt.

Außerdem wurden Techniken zur *in situ* Isolierung von Sesquiterpenen aus wässrigen Reaktionspuffern untersucht. Die Schwerpunkte lagen dabei in der Optimierung der Flüssig-Flüssig-Extraktion und der Verwendung von hydrophoben Adsorbentmaterialien. Die Versuche zeigten, dass sich beide Verfahren prinzipiell für die quantitative Isolierung von Sesquiterpenen geeignet sind, aber zu einer Denaturierung der PTS führen.

Schlagwörter: Sesquiterpene, Sesquiterpensynthesen, Biokatalyse, Enzymtechnik, Patchouliöl, Patchoulol

Abstract

In this work, a recombinant patchoulol synthase cDNA variant (PTS) was characterised in regard to a potential use as a new biocatalyst for the production of high valuable sesquiterpenes such as patchoulol. Initially, a reproducible fed-batch-bioprocess for the heterologous production of the PTS in *E. coli* was developed. For that purpose, experiments for high-cell-density cultivations were performed in a 2 L bioreactor to optimise soluble PTS formation by varying important process parameters such as the temperature and feed profile during the induction phase. Using the optimised cultivation protocol, the soluble PTS was gained in a high concentration of 4 g/L. To isolate the PTS from the *E. coli* cells, downstreaming strategy was developed. Thereto, important unit operations such as cell disruption, cross-flow filtration and several chromatographic methods were evaluated and optimised towards the purification of the recombinant PTS. By applying the developed downstreaming strategy, a purity of 94% was achieved.

Subsequently, the purified enzyme was characterised thoroughly concerning its functional and kinetic properties. The experiments showed, that PTS exhibits a substrate inhibition which is unusual for the sesquiterpene synthases. Literature references indicate, that the reason for this kinetic behaviour is caused by the formation of an intermediate sesquiterpene formed in the active pocket site of the PTS. By performing deuteration experiments, the formation mechanism available in the literature was modified to explain the substrate inhibition. The focus of the functional enzyme characterisation was the evaluation of the substrate scope. For that purpose several non-natural prenyl diphosphates were synthesised and then converted by the PTS unveiling its unique catalytic potential. In these experiments, a new fragrance ingredient for the perfume industry was obtained by converting the *E,Z*-isomers of farnesyl diphosphate (FPP) to a patchouli-like essential oil.

Furthermore, methods for the *in situ* isolation of sesquiterpenes from aqueous reaction mixtures were evaluated. The experiments were focused on the optimisation of liquid-liquid-extraction as well as on the use hydrophobic adsorber materials. In principle both methods are feasible for quantitative isolation of sesquiterpenes but result in the denaturation of the PTS.

Keywords: sesquiterpenes, sesquiterpene synthases, biocatalysis, enzyme technology, patchouli oil, patchoulol

Publikationsliste

Fachartikel

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*, **2015**, 176, 8, 2185-2201.

T. Frister, S. Beutel, Moschusduft und Patchouliöl – Zwei interessante Duftbausteine für Parfümerie und Kosmetik, *Chemie in unserer Zeit*, **2015**, 49, **online veröffentlicht im April**.

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*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2015**, **submitted**.

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*, **2015**, 458, 4, 883 - 889.

S. Hartwig, **T. Frister**, S. Alemdar, R. G. Berger, U. Krings, Z. Li, 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**, 97, 61-71.

Vorträge

T. Frister, S. Hartwig, S. Alemdar, S. Irmscher, T. Scheper, S. Beutel, Production and characterization of a recombinant patchoulol synthase isoenzyme, *International Conference on Flavour and Fragrance Biotechnology*, Frankfurt am Main, Germany, **2015**.

T. Frister, S. Hartwig, S. Beutel, T. Scheper, EFRE-VPR: Innovation cluster refinement of plant resources, *Forum Innovation in Food, Biotechnica*, Hannover, Germany, **2013**.

T. Frister, S. Hartwig, S. Beutel, T. Scheper, Production of terpene-based flavor compounds via bioconversion of synthesized terpene intermediates, *DECHEMA Frühjahrstagung der Biotechnologen*, Frankfurt am Main, Germany, **2013**.

Posterbeiträge

S. Alemdar, S. Hartwig, **T. Frister**, J. König, S. Beutel, T. Scheper, Towards the biocatalytic production of α -humulene: recombinant expression and characterization of α -humulene synthase from *Z. zerumbet*, *International Conference on Flavour and Fragrance Biotechnology*, Frankfurt am Main., Germany, **2015**.

T. Frister, S. Hartwig, P. Grünert, S. Alemdar, S. Irmscher, T. Scheper, S. Beutel, Recombinant production of a patchoulol synthase isoenzyme and its application for the synthesis of sesquiterpens, *2nd Conference of Scientific Cooperation between Lower Saxony and Israel*, Hannover, Germany, **2015**.

T. Frister, S. Hartwig, S. Alemdar, K. Schnatz, L. Thöns, T. Scheper, S. Beutel, Biocatalytic production of patchoulol and other high valuable sesquiterpenes, *Biocat2014*, Hamburg, Germany, **2014**.

S. Hartwig, **T. Frister**, T. Scheper, S. Beutel, Increasing heterologous expression of plant sesquiterpene synthases in *E. coli* by use of fusion strategies, *Biocat2014*, Hamburg, Germany, **2014**.

T. Frister, S. Hartwig, S. Alemdar, K. Schnatz, L. Thöns, T. Scheper, S. Beutel, Characterisation of a recombinant patchoulol synthase isoenzyme for the production of high-value sesquiterpenes, *European Congress on Biotechnology*, Edinburgh, United Kingdom, **2014**.

S. Hartwig, **T. Frister**, T. Scheper, S. Beutel, Fusion protein and solubility enhancing strategies for heterologous expression of novel plant sesquiterpene synthases, *European Congress on Biotechnology*, Edinburgh, United Kingdom, **2014**.

S. Beutel, **T. Frister**, S. Hartwig, T. Scheper, Simple and efficient route for the production of terpenes by enzymatic means, *Engineering Conferences International*, Toyama, Japan, **2013**.

T. Frister, S. Hartwig, S. Beutel, T. Scheper, Biokatalytische Umsetzung von synthetischem Farnesylpyrophosphat zur Herstellung von Duftstoffen, *Biotechnica*, Hannover, **2013**.

T. Frister, S. Hartwig, S. Beutel, T. Scheper, Biotechnological production of terpenes using synthetic farnesyl pyrophosphate, *1st European Conference on Natural Products*, Frankfurt am Main, Germany, **2013**.

S. Hartwig, **T. Frister**, S. Alemdar, S. Beutel, T. Scheper, Optimizing terpene synthase expression and bioconversion of FPP as a model system for production of high value sesquiterpenes, *1st European Conference on Natural Products*, Frankfurt am Main, Germany, **2013**.

T. Frister, S. Hartwig, S. Beutel, T. Scheper, Large-scale synthesis of farnesyl diphosphate as substrate for recombinant sesquiterpene synthases, *TERPNET 2013: 11th International Meeting on Biosynthesis, Function and Biotechnology of Isoprenoids in Terrestrial and Marine Organisms*, Kolymvari, Crete, Greece, **2013**.

S. Hartwig, **T. Frister**, S. Beutel, T. Scheper, Optimizing recombinant expression of patchoulol synthase from *P. cablin* and enzymatic FPP bioconversion as a model system for high level sesquiterpene production, *TERPNET 2013: 11th International Meeting on Biosynthesis, Function and Biotechnology of Isoprenoids in Terrestrial and Marine Organisms*, Kolymvari, Crete, Greece, **2013**.

T. Frister, S. Hartwig, S. Beutel, T. Scheper, Production of terpene-based flavour compounds via bioconversion of synthesized terpene intermediates, *DECHEMA Frühjahrstagung der Biotechnologen*, Frankfurt am Main, Germany, **2013**.

Im Rahmen der Promotion betreute Abschlussarbeiten aus denen Ergebnisse in die vorliegende Dissertation eingeflossen sind

Sarah Irmscher, Masterarbeit: Entwicklung von Verfahren zur *in situ*-Isolierung von Sesquiterpenen aus wässrigen Reaktionslösungen, im Fach Life Science an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 01/2015 – 06/2015.

Laura Thöns, Masterarbeit: Biokatalytische Herstellung von Sesquiterpenen, im Fach Life Science an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 05/2014 – 10/2014.

Katharina Schnatz, Masterarbeit: Charakterisierung einer Patchoulolsynthase in Hinblick auf die biokatalytische Herstellung von Sesquiterpenen, im Fach Biochemie an der Medizinischen Hochschule Hannover, 10/2013 – 04/2014.

Johanna Ritzer, Bachelorarbeit: Synthese und Aufreinigung von Prenylpolyphosphaten zum Einsatz in der Terpensynthese im Fach Life Science an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 01/2014 – 04/2014.

Sinem Taşdelen, Bachelorarbeit: Extraktion von Sesquiterpenen aus wässrigen Lösungen, im Fach Chemie an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, 03/2013 – 05/2013.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 2. Zielsetzung | 3 |
| 3. Theoretischer Hintergrund | 4 |
| 3.1 Patchouliöl | 4 |
| 3.2 Terpene | 8 |
| 3.3 Sesquiterpenbiosynthese | 8 |
| 3.3.1 Patchouliöl-Biosynthese..... | 12 |
| 3.4 Verwendung von Patchouliöl als Duftstoff in der Parfümerie | 14 |
| 4. Experimenteller Teil | 17 |
| 4.1 Herstellung der rekombinanten Patchoulolsynthase | 17 |
| 4.1.1 Kultivierung in definiertem Medium im 2 L STR Maßstab..... | 18 |
| 4.1.2 Fed-batch-Kultivierung mit exponentiellen feed-Profil und Temperaturabsenkung während der Induktionsphase..... | 20 |
| 4.1.3 Fed-batch Kultivierung mit konstantem feed und Temperaturabsenkung während der Induktionsphase..... | 22 |
| 4.1.4 Fed-batch Kultivierung mit konstantem feed und ohne Temperaturabsenkung während der Induktionsphase..... | 25 |
| 4.1.5 Zusammenfassung und Diskussion der Kultivierungsversuche..... | 27 |
| 4.2 Aufreinigung der Patchoulolsynthase | 29 |
| 4.2.1 Untersuchung von Detergenzien für den Zellaufschluss..... | 30 |
| 4.2.2 TMP-Scouting zur Optimierung der cross-flow-Filtration..... | 32 |
| 4.2.3 Untersuchungen zur Aufreinigung der PTS mittels Ionenaustauschchromatographie..... | 34 |
| 4.2.4. Untersuchungen zur Aufreinigung der PTS mittels Nickel-Affinitätschromatographie..... | 36 |
| 4.2.4.1 Untersuchung des Elutionsverhaltens der PTS bei einem Imidazol-Gradienten..... | 37 |
| 4.2.4.2 Entwicklung eines Stufenprogramms für die selektive Elution der Patchoulolsynthase in der Nickel-Affinitätschromatographie..... | 38 |
| 4.2.4.3 Aufreinigung der Patchoulolsynthase mittels Nickel-Affinitätschromatographie unter Anwendung eines Stufenprogramms..... | 40 |
| 4.2.4.4 Zusammenfassung und Diskussion der Aufreinigung der PTS mittels Nickel-Affinitätschromatographie..... | 44 |
| 4.2.5 Untersuchung der Stabilität der Patchoulolsynthase..... | 44 |
| 4.2.6 Zusammenfassung und Diskussion der Aufreinigung der PTS..... | 45 |
| 4.3 Substratsynthese | 47 |
| 4.4 Charakterisierung der Patchoulolsynthase | 50 |
| 4.4.1 Massenspektrometrische Analyse der rekombinanten Patchoulolsynthase..... | 51 |
| 4.4.2 Untersuchung des Produktspektrums..... | 53 |
| 4.4.3 Kinetische Untersuchungen..... | 55 |
| 4.4.3.1 Entwicklung eines Enzymaktivitäts-Assays für die Bestimmung des Temperatur- und pH-Optimum der Patchoulolsynthase..... | 56 |

| | |
|---|------------|
| 4.4.3.2 Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Substratkonzentration | 58 |
| 4.4.4 Temperatur und pH-Abhängigkeit der Produktselektivität | 62 |
| 4.4.5 Deuterierungsversuche zur Untersuchung des Reaktionsmechanismus der Patchoulsynthase | 64 |
| 4.4.5.1 Massenspektrometrische Untersuchung von deuteriertem Patchouliöl | 65 |
| 4.4.5.2 Herstellung und Aufreinigung von deuteriertem Patchouliol zur Untersuchung des Deuterierungsmusters mittels NMR | 68 |
| 4.4.5.3 Zusammenfassung und Diskussion der Deuterierungsversuche | 72 |
| 4.4.6 Versuche zur Substrat-Flexibilität (substrate scope) | 73 |
| 4.4.6.1 Umsetzungsversuche mit den Monoterpenvorläufern Geranyl- und Nerylpyrophosphat | 74 |
| 4.4.6.2 Umsetzungsversuche mit alternativen Sesquiterpenvorläufern | 77 |
| 4.4.6.3 Umsetzungsversuche mit Farnesylmonophosphat und Farnesyltriphosphat | 80 |
| 4.4.6.4 Umsetzungsversuch mit einem Oxy-funktionalisierten Substratanalogen | 81 |
| 4.4.6.5 Zusammenfassung der Versuche zur Substratflexibilität | 83 |
| 4.4.7 Zusammenfassung und Diskussion der Charakterisierung der Patchoulsynthase | 84 |
| 4.5 Untersuchung integrierter Verfahren zur Herstellung und <i>in situ</i> Isolierung von Sesquiterpenen in wässrigen Lösungen | 86 |
| 4.5.1 Verfahren zur Isolierung von Sesquiterpenen aus wässrigen Lösungen | 87 |
| 4.5.1.1 Extraktion mit organischen Lösemitteln | 87 |
| 4.5.1.2 Isolierung von Sesquiterpenen mit Hilfe eines hydrophoben Adsorbens | 88 |
| 4.5.1.3 Zusammenfassung und Diskussion der Versuche zur Isolierung von Sesquiterpenen | 91 |
| 4.5.2 Integrierte Verfahren zur enzymatischen Herstellung von Patchouliöl | 91 |
| 4.5.2.1 Umsetzung im 2-Phasen Reaktor | 92 |
| 4.5.2.2 Isolierung von enzymatischem Patchouliöl mit Hilfe eines Adsorbens | 93 |
| 4.5.2.3 Zusammenfassung und Diskussion | 95 |
| 4.5.3 Zusammenfassung und Diskussion der Versuche zur Herstellung und Isolierung von Sesquiterpenen | 96 |
| 5. Zusammenfassung und Ausblick | 98 |
| 6. Anhang | 104 |
| A Material | 104 |
| B Methoden | 111 |
| C Zusätzliche experimentelle Daten | 116 |
| 7. Literaturverzeichnis | 124 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|--|
| 2D | Zweidimensional |
| BTM | Biotrockenmasse |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| DCM | Dichlormethan |
| DE | Diethylether |
| DMAPP | Dimethylallylpyrophosphat |
| DNA | Desoxyribonucleinsäure |
| et al. | <i>lat.</i> et alii |
| FID | Flammenionisationsdetektor |
| FPLC | <i>engl.</i> fast protein liquid chromatography |
| FPP | Farnesylpyrophosphat |
| GC | Gaschromatographie |
| GGPP | Geranylgeranylpyrophosphat |
| GPP | Geranylpyrophosphat |
| HCP | <i>engl.</i> host cell protein |
| HPLC | <i>engl.</i> high performance liquid chromatography |
| IPP | Isopentylpyrophosphat |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid |
| LB | <i>engl.</i> lysogeny broth |
| M | Proteinmarker |
| MALDI | <i>engl.</i> matrix-assisted laser desorption/ionization |
| MEP | Methylerythritolphosphat |
| MS | Massenspektrometrie |
| NMR | <i>engl.</i> nuclear magnetic resonance |
| NPP | Nerylpyrophosphat |
| OD | Optische Dichte |
| PAGE | <i>engl.</i> polyacrylamide gel electrophoresis |
| pH | <i>lat.</i> potentia hydrogenii |
| pI | Isoelektrischer Punkt |
| pO_2 | Sauerstoffpartialdruck |
| PTS | Patchoulolsynthase |
| rel. AU | Relative Absorptionseinheiten |
| RI | Kovats Indizes |
| rpm | <i>engl.</i> rounds per minute |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | <i>engl.</i> sodium dodecyl sulfate |
| TB | <i>engl.</i> terrific broth |
| TMP | Transmembrandruck |
| ZYP | Definiertes Medium mit N-Z-Aminen (Z) und Hefeextrakt (Y) in einem Phosphat-Puffer (P) |

1. Einleitung

Egal ob Duschgel, Waschmittel oder hochwertiges Parfüm, Düfte sind aus vielen Haushalts- und Körperpflegeprodukten heute nicht mehr weg zu denken. Düfte sollen den Verbraucher ansprechen und ihn in seiner Erwartung an das Produkt bestätigen: Waschmittel soll frisch riechen und ein Parfüme einen anziehenden, attraktiven Duft verströmen. Obwohl die geruchsaktiven Substanzen nur einen Anteil von weniger als einem Prozent des Produktes ausmachen, sind sie doch einer der wichtigsten Bestandteile des Artikels. Neben dem Aussehen ist der Geruch die einzige Eigenschaft, die der Verbraucher mit seinen Sinnen erfahren kann. Die eigentliche Funktion des Produktes, also z.B. die reinigende Wirkung eines Waschmittels, kann der Mensch mit seinen Sinnen nicht erfassen.

Die meisten Duftstoffe gehören zur Naturstoffklasse der Terpene, zu der über 40.000 verschiedene Verbindungen zählen. In der Natur kommen Terpene vor allem in Pflanzen in Form von ätherischen Ölen und Harzen vor. Aufgrund der komplexen Struktur des Kohlenstoffgerüsts weisen viele dieser Verbindungen eine hohe biologische Aktivität auf und erfüllen daher in der Natur die verschiedensten Funktionen. Einige Terpene werden von Pflanzen als Abwehrstoffe zum Fraßschutz vor Raupen gebildet, während andere Insekten anlocken sollen, um für die Bestäubung der Blüten zu sorgen. Manche Terpene wurden auch als Ausgangspunkt für die Entwicklung von Medikamenten zur Behandlung von Brustkrebs (Taxol) und Malaria (Artemisinin) verwendet.

Die Gewinnung von Terpenen für die Herstellung von Duftstoffen erfolgt heute vor allem mittels Destillation oder mit Hilfe von extraktiven Verfahren aus den Blättern, Blüten oder Wurzeln der Pflanze. Als Produkt werden dabei ätherische Öle erhalten, aus denen anschließend die Terpene isoliert werden. Viele Pflanzen die für die Terpenherstellung benötigt werden, wachsen in den tropischen Klimazonen Südostasiens und Ostafrikas. Durch Missernten und politische Krisen in den Erzeugerländern kann es zu Lieferengpässen und starken Preisschwankungen bei wichtigen Duftstoffen kommen. Auf Grund der steigenden Nachfrage aus den aufstrebenden Schwellenländern muss die Anbaufläche für die Gewinnung der Duftstoffe stetig erweitert werden. Dadurch werden nicht nur die tropischen Regenwälder bedroht, sondern die Duftstoffproduktion tritt auch in Konkurrenz zur Herstellung von Nahrungsmitteln.

Da die chemische Synthese von Duftstoffen häufig zu aufwändig ist, wird in der Industrie verstärkt an der Entwicklung biotechnologischer Prozesse gearbeitet. Die Grundlage für einen Bioprozess stellen Mikroorganismen dar, die mit der genetischen Information der Duftstoff-produzierenden Pflanze ausgestattet sind. Die Bakterien werden dadurch in die Lage versetzt katalytisch aktive Proteine, sog. Enzyme, zu produzieren. Diese Biokatalysatoren haben die Aufgabe, eine bestimmte Verbindung in die Aromastoffe umzuwandeln. Diese Verbindung wird aus lokalen landwirtschaftlichen Erzeugnissen gewonnen und in einer kurzen chemischen Synthese in eine biologisch aktive Form überführt, bevor die enzymatische Reaktion erfolgen kann.

Mit Hilfe solcher Verfahren, werden Preisschwankungen reduziert und das Produktportfolio der Hersteller wird in Richtung einer besseren ökologischen Nachhaltigkeit weiterentwickelt. Duftstoffe aus biotechnologischen Prozessen weisen außerdem eine bessere Qualität auf, da Verunreinigungen aus der Pflanze, wie z.B. giftige Alkaloide, nicht gebildet werden. Für die Hersteller von Kosmetik und Körperpflegeprodukten sind biotechnologische Verfahren zur Gewinnung von Duftstoffen daher eine attraktive Alternative zur herkömmlichen extraktiven Isolation dieser Verbindungen aus der Pflanze.

2. Zielsetzung

In dieser Arbeit soll die Grundlage für ein enzymatisches Verfahren zur enzymatischen Herstellung von wertvollen Sesquiterpenen auf Basis einer rekombinanten Patchoulolsynthase (PTS) gelegt werden. Dazu soll ein robuster und gut skalierbarer fed-batch-Prozess im 2 L Maßstab entwickelt werden, mit dem die PTS heterolog in *E. coli* produziert werden kann. Dazu steht aus Vorarbeiten ein *E. coli* BL21 (DE3) Stamm mit einem mit IPTG-induzierbaren Expressionssystem (pET16b::his-FXa-PTSopt) zur Verfügung [1]. Wichtig bei der Bioprozessentwicklung ist, die Bildung von inclusion bodies zu vermeiden um die Ausbeute an löslicher PTS zu erhöhen. Dies soll durch die Wahl des Substrats und durch die Optimierung prozesstechnischer Parameter erreicht werden.

Weiterhin soll eine Aufreinigungsstrategie für die Isolierung der PTS aus der *E. coli* Biomasse erarbeitet werden. Dazu sollen geeignete downstream processing Operationen identifiziert und für die Aufreinigung der PTS optimiert werden. Im Vordergrund steht dabei, die PTS in einer möglichst hohen Reinheit zu erhalten. Da das Enzym über einen His-tag verfügt, bildet die Durchführung einer Metall-Chelat-Affinitätschromatographie dabei einen Schwerpunkt. Parallel dazu sollen aber auch erste Erkenntnisse im Hinblick auf eine Aufreinigung im Technikumsmaßstab gesammelt werden.

Auf Basis des aufgereinigten Enzym-Präparates, soll die PTS umfassend charakterisiert werden. Dazu sollen neben kinetischen und mechanistischen Studien vor allem die funktionalen Eigenschaften erfasst werden, um das Potenzial der PTS als ein Katalysator für die enzymatische Herstellung von Sesquiterpenen auf Basis von aktivierten Terpenalkoholen einschätzen zu können. Der Untersuchung der Substratflexibilität (substrate scope) kommt dabei eine besondere Bedeutung zu. Dafür sollen verschiedene Terpenalkohole mit Hilfe einer chemischen Synthese in die korrespondierenden Diphosphate überführt werden. Neben der Bereitstellung des natürlichen Substrates *E,E*-Farnesylpyrophosphat (FPP) und einigen Monoterpenvorläufern liegt der Fokus dabei vor allem auf der Synthese der *E,Z*-Isomere des FPP. Die alternativen Substrate sollen mit der PTS umgesetzt und die resultierenden Produkte mittels GC-MS analysiert werden. Besonders die sesquiterpenoiden Produkte sollen im Hinblick auf eine mögliche Verwendung als Duftstoff geprüft werden.

Schließlich sollen grundlegende Versuche zum Aufbau eines integrierten Prozesses zur enzymatischen Herstellung und Isolierung von Sesquiterpenen durchgeführt werden.

3. Theoretischer Hintergrund

3.1 Patchouliöl

Patchouliöl ist das ätherische Öl der Patchouli-Pflanze. Es handelt sich dabei um eine gelbe, zähflüssige Substanz, die einen intensiven holzig-erdigen Geruch aufweist. Patchouliöl ist vor Sandelholzöl und Vetiveröl das wichtigste ätherische Öl für die Herstellung von Parfüms und hochwertigen Duschgels und Shampoos. Traditionell wird es in Indien zur Aromatisierung von Speisen verwendet und dient außerdem zur Behandlung von Textilien zur Insektenabwehr.

Das Öl ist in den Blättern, Blüten und Wurzeln der Patchouli-Pflanze enthalten und wird daraus mittels Wasserdampfdestillation isoliert. Besonders die Arten des indischen Patchouli *Pogostemon cablin* und des javanischen Patchouli *Pogostemon heyneanus* sind dabei von Bedeutung. Die Pflanze ist ein strauchartiges Gewächs, das eine Höhe von bis 100 cm erreicht und teilweise verholzt ist. Abbildung 1 zeigt ein Foto einer indischen Patchouli-Pflanze.



Abbildung 1: Blätter und Blütenstand der indische Patchouli-Pflanze *Pogostemon cablin* [2].

Ursprünglich kommt sie in den tropischen Regionen Südostasiens und in Bergwäldern ab einer Höhe von 800-1.000 m vor. Zur kommerziellen Gewinnung des Patchouliöls wird die Patchouli-Pflanze aber zusätzlich auch in den subtropischen Zonen Chinas und Ostafrikas angebaut. Zu den Hauptproduzenten zählen Indonesien, China, Indien und Malaysia. Die weltweite Produktion beträgt 1.000 – 1.500 t pro Jahr, die zum größten Teil nach Europa und die USA exportiert werden [3]. Seit der Jahrtausendwende wächst die Nachfrage nach luxuriösen Kosmetikprodukten in den Schwellenländern Asiens beständig, so dass ein Teil des Patchouliöls in Form von Parfüms reexportiert wird.

Bei Patchouliöl handelt es sich um ein sehr wertvolles ätherisches Öl mit einem derzeitigen Weltmarktpreis von 40-90 EUR/kg. Der Preis unterliegt jedoch starken Schwankungen und erreichte im Jahr 2008 in der Spitze 150 EUR/kg [3]. Diese Schwankungen sind vor allem auf witterungsbedingte Missernten zurückzuführen. Hinzu kommt, dass Kultivierung und Züchtung der Patchouli-Pflanze noch nicht auf dem Niveau anderer Kulturpflanzen angelangt ist.

Auf Grund des hohen Preises und der einfach durchführbaren Wasserdampfdestillation ist die Produktion von Patchouliöl für viele Bauern in den Entwicklungsländern Asiens und Ostafrika eine attraktive Einnahmequelle. Die Patchouli-Pflanze zählt daher zu den sog. cash crops, einer Gruppe von Pflanzen, deren Erzeugnisse zur Armutsbekämpfung in Entwicklungsländern dienen können [4]. Der Anbau der Patchouli-Pflanze erfolgt in solch kleinen Betrieben allerdings häufig nicht professionell, was dazu führt, dass die Pflanzen mit zu viel oder falschen Pflanzenschutzmitteln behandelt werden. Rückstände dieser Produkte können in das ätherische Öl gelangen und auf diese Weise die Qualität beeinträchtigen. Abbildung 2 zeigt den Anbau der Patchouli-Pflanze sowie die Wasserdampfdestillation zur Gewinnung des Patchouliöls in kleinen Agrarbetrieben in Madagaskar und Indonesien.



Abbildung 2: Anbau der Patchouli-Pflanze in Madagaskar (links) [5] und Isolierung des Patchouliöls aus dem Pflanzenmaterial mittels Wasserdampfdestillation in Indonesien (rechts) [6].

Ein weiteres Problem der Patchouliöl-Produktion in Kleinunternehmen stellt die Wasserdampfdestillation dar. Die dabei verwendete Ausstattung entspricht teilweise nicht den in der EU und den USA erforderlichen Standards zur Herstellung von Kosmetikprodukten, so dass Schwermetalle aus der Destillationsanlage in das Öl gelangen können. Bevor das Patchouliöl für die Herstellung von Parfüms verwendet werden kann, muss es daher aufwändig aufgereinigt werden.

Problematisch bei Gewinnung von Patchouliöl sind außerdem die sozio-ökologischen Konsequenzen. Auf Grund der kontinuierlich steigenden Nachfrage nach Patchouliöl muss die

Anbaufläche die Kultivierung von Patchouli-Pflanzen stetig ausgeweitet werden. Das führt dazu, dass entweder Anbauflächen auf denen bisher Nahrungsmittel produziert wurden für die Patchouliöl-Produktion genutzt werden oder neue Anbauflächen durch die Rodung von Wäldern geschaffen werden müssen. Besonders in Entwicklungsländern ist die Versorgung der Bevölkerung mit Nahrungsmitteln nicht immer gewährleistet, weshalb sich der Anbau von cash crops als sozial problematisch erweisen kann [7]. Die Zerstörung von Bergwäldern um die erforderliche Anbaufläche zur Verfügung zu stellen, ist aus ökologischer Sicht keine gute Alternative. Dabei ist auch zu berücksichtigen, dass die Endverbraucher in den Industrienationen zunehmend Wert auf eine transparente Zulieferungskette und die Einhaltung ökologischer und ethischer Standards legen. Die Hersteller von Parfüms und Kosmetikprodukten sind demnach gezwungen sich verstärkt mit der Herkunft und den Herstellungsverfahren ihrer Duftstoffe auseinander zu setzen.

Neben dem hohen Weltmarktpreis stellen diese Überlegungen den Ausgangspunkt für die Entwicklung alternativer Herstellungsverfahren für die Produktion von Patchouliöl dar. Im April 2014 wurde ein biotechnologisch produziertes Patchouliöl unter dem Namen Clearwood® (Firmenich, Genf, Schweiz) auf dem Markt eingeführt. Für die Produktion kommen Mikroorganismen zum Einsatz, die genetisch so modifiziert wurden, dass sie über den gesamten für die Patchouliölsynthese benötigten Stoffwechselweg verfügen. Auf diese Weise können die Mikroorganismen einfache Kohlenhydrate wie Glucose zu Patchouliöl umsetzen. Dabei handelt es sich um das erste kommerziell erhältliche nicht-pflanzlich produzierte ätherische Öl. Da der Hersteller Clearwood® als einen teilweisen Ersatz für das pflanzliche Patchouliöl bewirbt, ist davon auszugehen, dass es olfaktorisch geringfügig vom pflanzlichen Öl abweicht [8]. Die Herausforderung stellt dabei die komplexe Zusammensetzung mit über 23 verschiedenen Inhaltsstoffen dar [9]. Eine Auswahl der Verbindungen ist in Abbildung 3 dargestellt.

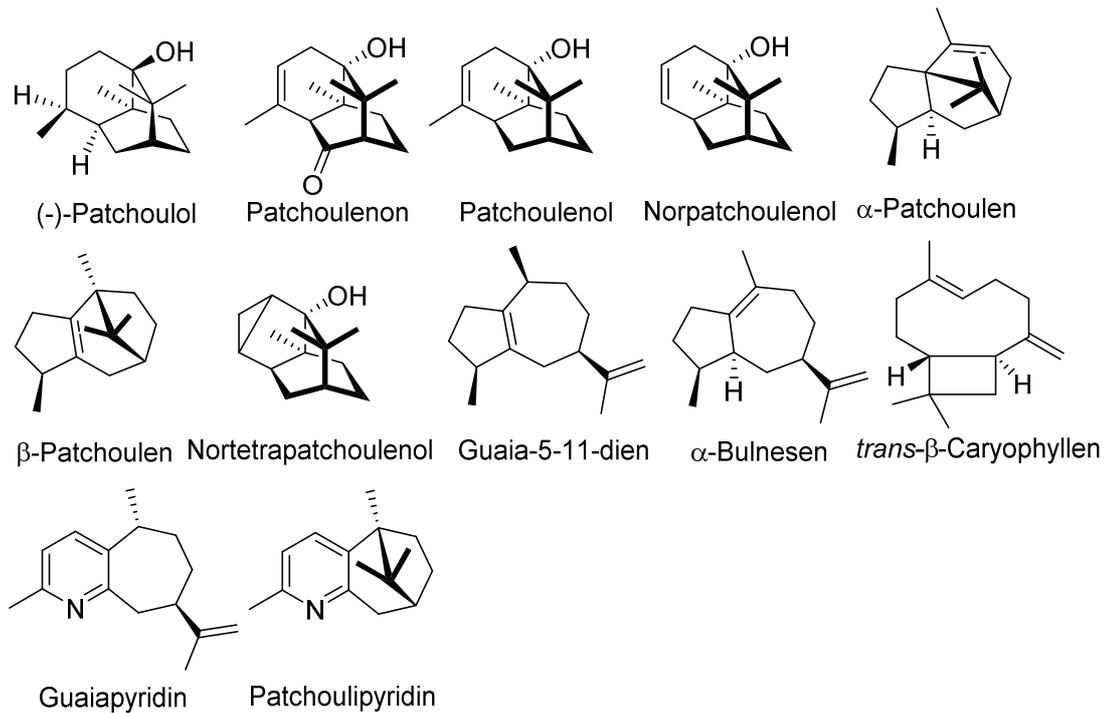


Abbildung 3: Ausgewählte Inhaltsstoffe von Patchouliöl aus der indischen Patchouli-Pflanze.

Bei den Inhaltsstoffen des Patchouliöls handelt es sich mit Ausnahme von Guaiapyridin und Patchoulipyridin ausschließlich um Sesquiterpene. Die Hauptkomponente ist das (-)-Patchoulol, das einen Anteil zwischen 25-60% aufweist und maßgeblich für den charakteristischen Duft des Öls verantwortlich ist. Erst 1963 wurde die komplexe Struktur des Patchoulols von Georg Büchi aufgeklärt [10]. Die Geruchsschwelle von (-)-Patchoulol liegt bei einer Temperatur von 25°C bei 0,93 ng/L Luft, was, verglichen mit vielen anderen natürlichen Duftstoffen, ein sehr niedriger Wert ist [11]. So weist der Duftstoff Menthol eine Geruchsschwelle von 6.000 ng/L auf [12].

Zur erdigen Note des Patchouliduftes tragen die Abbau- und Umlagerungsprodukte Patchoulenon, Patchoulenol und Norpatchoulenol bei. Auch das Nortetrapatchoulenol weist zwar einen erdig-camphrigartigen Geruch auf, trägt aber mit einem Anteil von 0,001% am ätherischen Öl trotz der niedrigen Geruchsschwelle von 1,0 ng/L praktisch nicht zum Duftbild bei [11]. Die ebenfalls enthaltenden Sesquiterpene α -Bulnesen, Guaia-5,11-dien, *trans*- β -Caryophyllen sowie α - und β -Patchoulen tragen kaum zum Geruch des Patchouliöls bei. Die Alkaloide Patchoulipyridin und Guaiapyridin können das Geruchsbild sogar negativ beeinflussen und haben darüber hinaus auch noch hautreizenden Eigenschaften [13].

Vor dem Hintergrund des Produktspektrums, werden auch die möglichen Unterschiede zwischen dem pflanzlichen und dem biotechnologischen Patchouliöl erklärbar. Da es sich bei Inhaltsstoffen wie Norpatchoulenol und Patchoulenon um Derivate des Patchoulols handelt, deren Bildung auf Umlagerungs- oder Oxidationsreaktionen in der Pflanze oder bei der Wasserstoffdestillation

zurückzuführen ist [11], sind diese Stoffe vermutlich nicht im biotechnologisch hergestellten Öl enthalten.

3.2 Terpene

Terpene stellen mit über 40.000 bekannten Verbindungen die größte Naturstoffklasse dar. Bei den Verbindungen handelt es sich um sekundäre Inhaltsstoffe, die vor allem in Pflanzen, aber auch teilweise in Bakterien und tierischen Organismen, vorkommen. So sind pflanzliche Terpene der Hauptbestandteil ätherischer Öle.

Formal leiten sich alle Terpene vom C_5 -Körper Isopren ab und werden auf Basis dessen, gemäß ihres Kohlenstoffgerüsts, in Untergruppen eingeteilt. Verbindungen mit 10 Kohlenstoffatomen werden als Monoterpene, Verbindungen mit 15 Kohlenstoffatomen als Sesquiterpene und Verbindungen mit 20 Kohlenstoffatomen als Diterpene bezeichnet. Dieser Systematik folgend, gibt es auch noch die Gruppe der Sester- (C_{25}), Tri- (C_{30}) und Tetraterpene (C_{40}). Chemisch zeichnen sich diese Naturstoffe durch eine große strukturelle Vielfalt des Kohlenstoffgerüsts aus, die sich häufig im Auftreten komplexer Ringsysteme äußert. Außerdem verfügen Terpene in der Regel nur über wenig funktionelle Gruppen, was sie für Totalsynthesen nur schwer zugänglich macht.

In der Natur erfüllen Terpene die unterschiedlichsten Aufgaben: Einige werden von Pflanzen gebildet, um Insekten für die Bestäubung anzulocken während andere zur Abwehr von Fressfeinden dienen. Darüber hinaus erfüllen viele Terpene eine regulatorische Funktion in Organismen.

Auf Grund ihrer biologischen Wirksamkeit werden sie als Duft- und Aromastoffe, umweltfreundliche Insektizide und zur Desinfizierung eingesetzt. Darüber hinaus sind manche Terpene pharmakologisch relevant. So handelt es sich bei dem Diterpen-Derivat Taxol um einen Mitose-Inhibitor, der als Zytostatikum für die Behandlung von Brustkrebs eingesetzt wird. Von noch größerer Bedeutung ist Artemisinin, das von der WHO als first-line Therapie für Malariaerkrankungen empfohlen wird [14]. Da die synthetische Herstellung von Terpenen aufwändig und nur selten wirtschaftlich durchführbar ist [15–19], gewinnen biotechnologische Verfahren zunehmend an Bedeutung [20–24].

3.3 Sesquiterpenbiosynthese

Die Biosynthese von Sesquiterpenen in der Pflanze erfolgt ausgehend von den aktivierten Isopreneinheiten Isopentylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP). Diese Stoffwechselintermediate werden über den Mevalonat- und den Methylerythritolphosphat-Weg (MEP) hergestellt. Obwohl beide Stoffwechselwege IPP und DMAPP bereitstellen, basieren sie auf unterschiedlichen Ausgangsstoffen und laufen in der Pflanzenzelle räumlich getrennt voneinander

ab. Während der Mevalonat-Weg in den Mitochondrien und dem Cytosol abläuft, ist der MEP-Weg in den Plastiden lokalisiert.

Der Mevalonat-Weg beginnt im Mitochondrium mit der Kondensierung von Acetyl-Coenzym A (CoA) und Acetoacetyl-CoA zu 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA). Das HMG-CoA wird in das Cytosol transportiert und dort von der HMG-CoA Reduktase zu Mevalonat reduziert. Dieser Schritt ist für den Mevalonat-Weg geschwindigkeitsbestimmend und dient zur Regulation des Stoffwechselweges. Ausgehend von Mevalonat wird in weiteren Schritten unter Verbrauch von drei Äquivalenten ATP IPP gebildet, dass mit Hilfe der IPP-Isomerase teilweise zu DMAPP isomerisiert wird [25, 26].

Über den MEP-Weg können in Pflanzen IPP und DMAPP unabhängig vom Mevalonat-Weg produziert werden. Dazu werden Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat unter Beteiligung von insgesamt sieben Enzymen zu 4-Hydroxy-3-methyl-but-2-en-1-yl-diphosphat (HMBPP) umgesetzt. Dieses Intermediat wird schließlich mit Hilfe der IPP/DMAPP-Synthase zu IPP und DMAPP im Verhältnis 85:15 reduziert [27, 28]. Eine schematische Darstellung der Terpenbiosynthese ist in Abbildung 4 dargestellt.

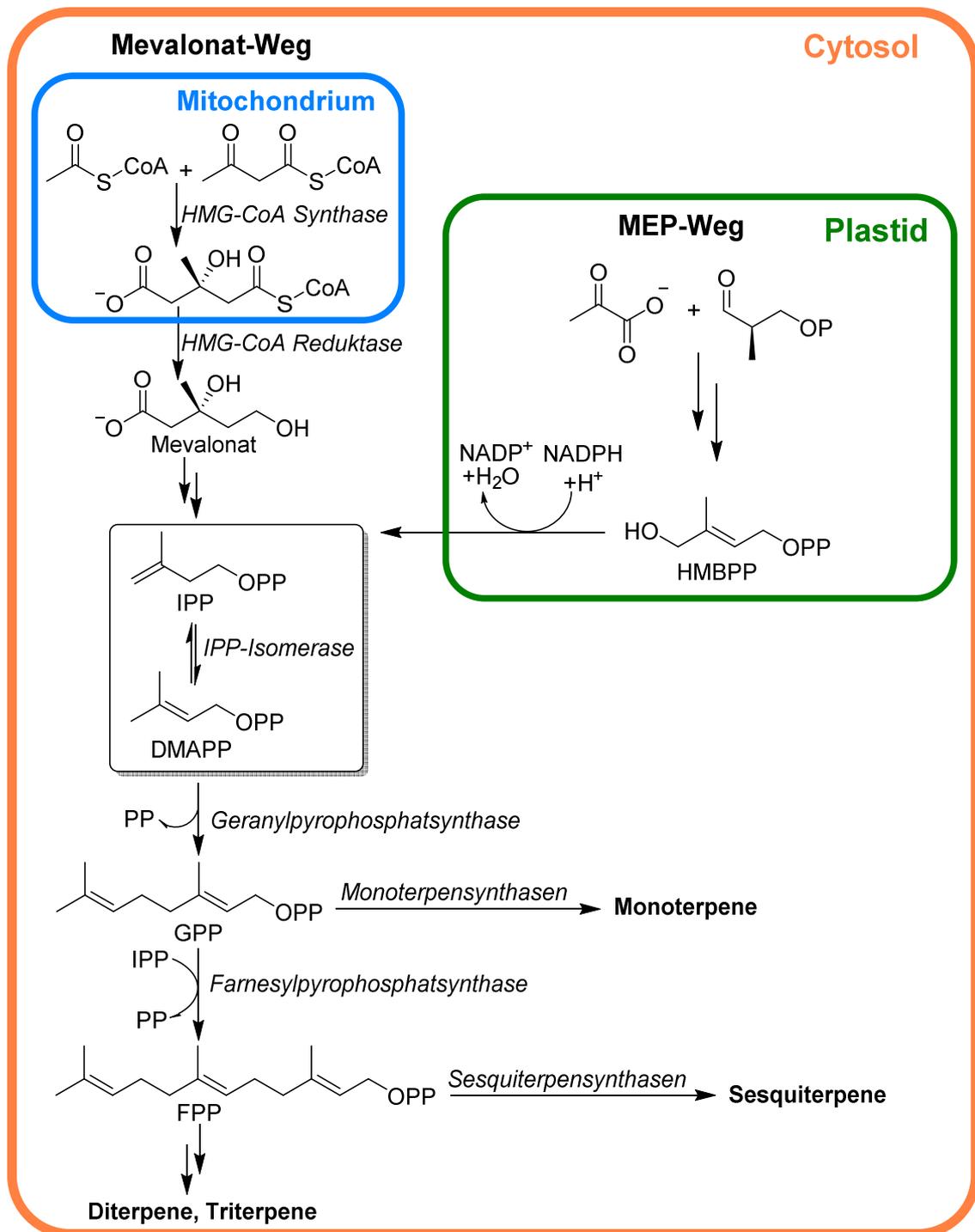


Abbildung 4: Schematische Übersicht über die Biosynthese von Sesquiterpenen in Pflanzen.

Für den Aufbau des Terpengrundgerüsts werden die beiden Bausteine IPP und DMAPP von der Geranylpyrophosphatase unter Abspaltung einer Pyrophosphat-Gruppe zu Geranylpyrophosphat (GPP) kondensiert. Bei GPP handelt es sich um das zentrale Intermediat für die Biosynthese aller Monophosphate. Zusätzlich dient es zur posttranslationalen Funktionalisierung von Proteinen und Naturstoffen. Die Umsetzung von GPP zu Monoterpenen erfolgt dabei mit Hilfe von Monoterpensynthasen.

Ausgehend von GPP kann durch die Verknüpfung mit einer weiteren IPP-Einheit Farnesylpyrophosphat (FPP) gebildet werden, dem universellen Intermediat für die Biosynthese von Sesquiterpenen. Durch die Kondensation mit weiteren IPP-Einheiten werden die Ausgangsverbindungen für die Biosynthese der größeren Terpengruppen bereitgestellt.

Nach der Bildung von *E,E*-FPP besteht der letzte Schritt der Sesquiterpenbiosynthese in der Überführung des FPP in die einzelnen Sesquiterpene. Diese Umsetzung erfolgt mit speziellen Enzymen, den sog. Sesquiterpensynthasen. Dabei kann ein Enzym für die Herstellung eines oder mehrerer Produkte verantwortlich sein.

Die Enzyme dieser Klasse weisen hinsichtlich der Molmasse und Anzahl der Aminosäuren eine große Ähnlichkeit auf, während sich die Primärstruktur der Enzyme häufig stark unterscheidet. Charakteristisch für alle Sesquiterpensynthasen, ist das Auftreten mehrerer aspartatreicher Abschnitte mit der Konsensussequenz DDXXD in der Nähe des aktiven Zentrums [29]. Dieses Strukturmotiv dient zur Koordinierung von Magnesiumionen, die ihrerseits die Bindung von *E,E*-FPP-Molekülen ermöglichen. Dabei wird das Substratmolekül so positioniert, dass der Prenyl-Rest in das Innere der aktiven Tasche weist und das Diphosphat-Ion nach der Abspaltung die Tasche verlassen kann [30].

Im Gegensatz zu anderen Sesquiterpensynthasen, verfügt die PTS über einen weiteren konservierten Abschnitt der Aminosäuresequenz. Es handelt sich dabei um das NSE/DTE-Motiv, das sich in der aktiven Tasche gegenüber von dem DDXXD-Motiv befindet und möglicherweise als eine zusätzliche Bindestelle fungiert. In der Literatur wird vermutet, dass das Vorhandensein dieses Strukturmotives im Zusammenhang mit dem großen Produktspektrum der PTS steht [31]. Nach der Koordination der Diphosphat-Gruppe an das Magnesiumion erfolgt die Bildung eines hochreaktiven primären Carbeniumions unter Abspaltung des Diphosphats. Dieses Carbeniumion stellt den Ausgangspunkt für den Aufbau der teilweise sehr komplexen Kohlenstoffatomgerüste dar [32].

Im Inneren des Enzyms bilden mehrere hydrophob funktionalisierte α -Helices eine Faserstruktur aus und bilden so einen Reaktionsraum in dem das Carbeniumion vor einem Quenching mit Wassermolekülen aus dem Reaktionsmedium geschützt ist. In der Literatur wird daher angenommen, dass es sich bei dem Reaktionsraum um eine vollständig wasserfreie Umgebung handelt [33]. Das auf diese Weise abgeschirmte Carbeniumion reagiert in einer für jede Sesquiterpensynthese individuelle Kaskade von intramolekularen Ringschluss- und Umlagerungsreaktionen [34]. Dabei werden zahlreiche kationische Übergangszustände und Intermediate durchlaufen. Die richtungsbestimmende Triebkraft hinter der Reaktionskaskade ist dabei die Stabilität der auftretenden Intermediate. Diese können sowohl thermodynamisch als auch kinetisch getrieben, in Richtung eines bestimmten Endproduktes weiter reagieren [35]. Am Ende jeder Reaktionskaskade wird das Carbeniumion zu einem neutralen Sesquiterpenmolekül

gequench. Dazu dient entweder eine Deprotonierung unter Ausbildung einer Doppelbindung oder in einigen Fällen die Addition von Wasser, die zur Bildung eines Alkohols führt [33].

Die Rolle der Sesquiterpensynthesen bei der Biosynthese von Sesquiterpenen beschränkt sich also auf die Bildung des Carbeniumions und die Bereitstellung eines Reaktionsraumes. Der eigentliche Bildungsmechanismus ist vor allem chemisch-physikalisch getrieben. Die Sesquiterpensynthesen beeinflussen die Reaktionskaskade nur passiv durch die morphologische und elektrochemische Beschaffenheit des Reaktionsraumes, die durch die dort vorhandenen Aminosäuren bestimmt wird [36, 37].

3.3.1 Patchouliöl-Biosynthese

Die Biosynthese von Patchouliöl erfolgt nach der gleichen Systematik wie bei allen Sesquiterpensynthesen. Das zentrale Enzym ist dabei die Patchoulolsynthase (PTS). Zum Produktspektrum der PTS zählen neben dem tricyclischen tertiären Alkohol Patchoulol auch Verbindungen, die ein gänzlich anderes Kohlenstoffgerüst aufweisen, wie z.B. *trans*- β -Caryophyllen und α -Bulnesen.

Der von der PTS katalysierte Bildungsmechanismus unterscheidet sich in doppelter Hinsicht von dem vieler anderer Sesquiterpensynthesen. Zum einen handelt es sich bei der PTS um eine multi-Produkt Sesquiterpensynthase, die in der Lage ist in einem Schritt mindestens 20 verschiedenen Verbindungen zu produzieren [9]. Außerdem zählt die PTS zu den Sesquiterpensynthesen, die nicht nur das Kohlenstoffgerüst aufbauen, sondern auch eine Hydroxy-Funktion in das Zielmolekül einführen.

Der erste Schritt besteht, wie bei allen Sesquiterpensynthesen, in der Dephosphorylierung von *E,E*-FPP. An dem dabei gebildeten primären Farnesylkation kann nun entweder einen 10,1-Ringschluss zum Germacrenylkation oder ein 11,1-Ringschluss zum Humulylkation erfolgen. Die Bildung des Humulylkations erfolgt dabei nur im untergeordneten Maße und resultiert nach einem zweiten Ringschluss schließlich in dem Produkt *trans*- β -Caryophyllen. Ausgehend von dem Germacrendienylkation erfolgen zwei weitere Ringschlüsse, was zur Bildung des Kations 1 führt. Dieses Intermediat kann nach Faraldos *et al.* nach einer Deprotonierung in ein Sesquiterpen mit einer bisher unbekannt Position der Doppelbindung überführt werden [38]. Es befindet sich dabei in einer hydrophoben Tasche im Inneren der PTS. Dort kann es reprotoniert und so in die Reaktionskaskade zurückgeschleust werden. Dort erfolgt eine sigmatrope Umlagerung in Form eines 1,3-Hydrishifts, der zur Bildung von Kation 2 führt. Dieses Intermediat kann durch eine Deprotonierung direkt in α - oder β -Patchoulen überführt werden, in Richtung Patchoulol weiterreagieren oder nach einer Ringöffnung den Ausgangspunkt für alle Guaiaen-Verbindungen bilden.

Bei der Reaktion in Richtung des Patchouls erfolgt eine Wagner-Meerwein-Umlagerung zu Kation 3. In der Literatur wird postuliert, dass auch von diesem Carbeniumion aus eine Ringöffnung zum Guaianyl kation möglich ist. Die Bildung von Kation 4 erfolgt durch eine weitere Wagner-Meerwein-Umlagerung, bei der das Kohlenstoffgerüst des Patchouls bereits konstituiert wird. Im geringen Maße kann es bei Kation 4 in einem sigmatropen Prozess zur Umlagerung einer Methylgruppe an die Position der positiven Ladung in Kation 4 kommen. Das auf diese Weise erzeugte Intermediat führt nach einer Deprotonierung zur Bildung von Selinen mit seiner terminalen Doppelbindung. Für die Bildung von Patchoulol wird im letzten Schritt das Kation 4 mit Wasser aus der Reaktionslösung abgefangen. Der Mechanismus ist in Abbildung 5 dargestellt.

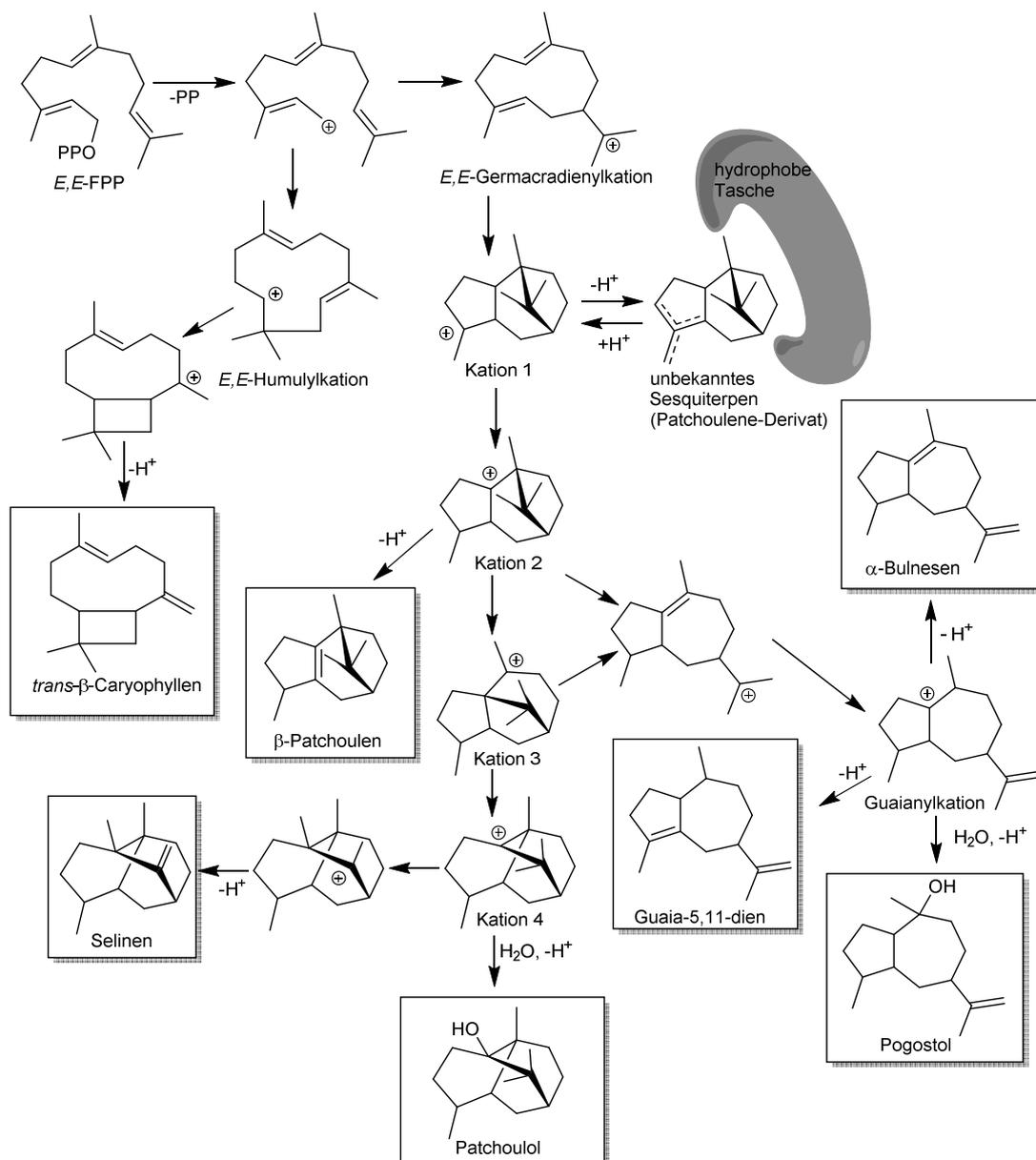


Abbildung 5: Reaktionsmechanismus der Umsetzung von *E,E*-FPP zu einigen ausgewählten Bestandteilen des Patchouliöls [9, 30, 38].

Obwohl in der Literatur davon ausgegangen wird, dass der Reaktionsraum im Enzym ein wasserfreier Bereich ist, zeigt der Mechanismus, dass bei der PTS die Anwesenheit von Wasser für die Bildung von Patchoulol und Pogostol erforderlich ist. Daher muss Wasser auf irgendeinem Weg in den Reaktionsraum gelangen können, ohne die Reaktionskaskade zu beeinträchtigen. Da das Wasser bei der Patchoulolsynthese in stöchiometrischen Mengen verbraucht wird, ist es auch nicht möglich, dass die Hydroxyl-Gruppe in Form eines an eine Aminosäure gebundenen Hydroxidion bereitgestellt wird.

3.4 Verwendung von Patchouliöl als Duftstoff in der Parfümerie

Das Patchouliöl gelangte erst 1826 auf Kaschmirtüchern aus Indien nach Europa. Das ätherische Öl diente dabei als Insektenschutz, um Fraßschäden an den wertvollen Tüchern zu vermeiden. Auf Grund seines exotischen Duftes fand es schnell in der sich gerade entwickelnden Parfümindustrie Verwendung [39].

Bis heute ist Patchouliöl ein zentraler Duftbaustein für die Parfümerie und das wichtigste ätherische Öl bei Herstellung von Parfüms und hochwertigen Körperpflegeprodukten. So enthalten ca. 50% aller Parfüms Patchouliöl in teilweise sehr hohen Konzentrationen im Duftstoffanteil. Dazu zählt z.B. das Parfüm *Patchouli* (1970, Reminiscence, Frankreich, Paris) mit 65% Patchouliöl im Duftstoffanteil und auch das *Borneo 1834* (2005, Serge Lutens Les Salons du Palais Royal Shiseido, Frankreich, Paris) mit 56% [40].

Bei Parfümen handelt es sich um alkoholische Lösungen, in denen die Duftstoffe stark verdünnt vorliegen. Klassischerweise werden dabei vier Parfümartentypen unterschieden: Das Eau de Cologne weist einen Duftstoffanteil von 3-5% auf, das Eau de Toilette 6-9%, das Eau de Parfum 10-14% und das Extrait 15-30%. Das häufigste verwendete Parfüm ist das Eau de Parfum, da die Duftstoffkonzentration hoch genug ist, um eine langanhaltende Duftentfaltung sicher zu stellen und es gleichzeitig einfach zu dosieren ist. Um die Komposition von Parfümen zu beschreiben, werden die Duftstoffe in eine Kopf-, Herz- und Basisnote eingeteilt. Diese Einteilung erfolgt auf Basis der Flüchtigkeit der Duftstoffe [41].

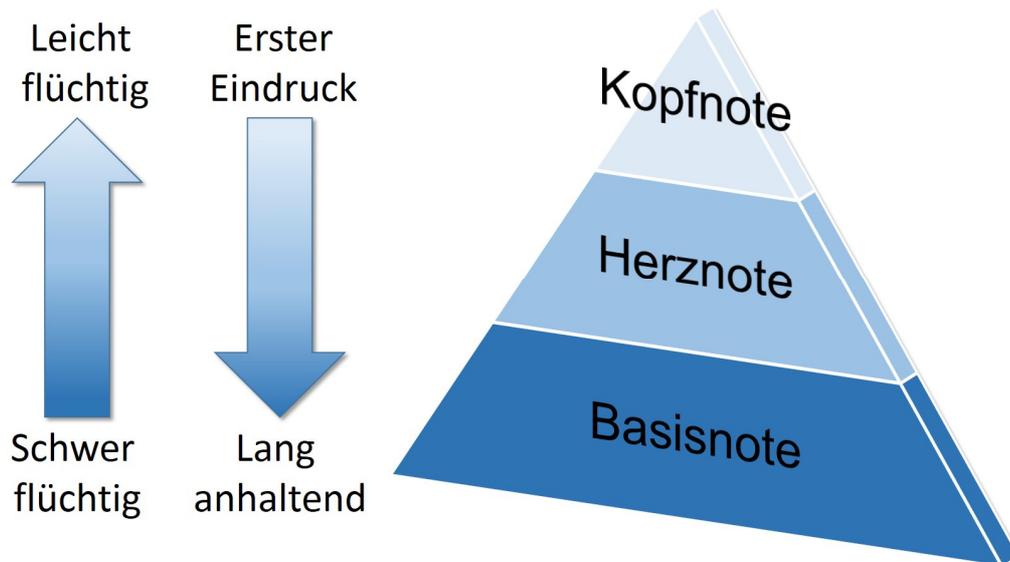


Abbildung 6: Die Duftstoffe in Parfüms werden gemäß ihrer Flüchtigkeit in die Kopf-, Herz- und Basisnote eingeteilt.

Bei den Duftstoffen der Kopfnote handelt es sich um leicht flüchtige Substanzen, die beim Auftragen des Parfüms auf die Haut den ersten Eindruck des Parfüms vermitteln. Ein typischer Duftstoff der Kopfnote ist z.B. das Bergamottöl, das einen hohen Anteil leicht flüchtiger Monoterpene wie Limonen, Linalool und Nerol enthält. Die Herznote des Parfüms bildet den Charakter des Parfüms und hat die Aufgabe, einen harmonischen Übergang zwischen der Kopf- und der Basisnote zu bilden. Dabei spielt Patchouliöl sowohl in Herren- als auch in Damenparfüms eine wichtige Rolle. Die Basisnote eines Parfüms enthält schwer flüchtige Duftstoffe, die dadurch am längsten auf der Haut bleiben und die ihren Duft nur langsam verströmen. Der Duft dieser Riechstoffe tritt daher erst ca. 30 min nach dem Auftragen in Erscheinung und bleibt danach bis zu einer Woche lang wahrnehmbar [41, 42]. Mit einem relativ hohen Siedepunkt von 287°C zählt Patchouliöl zu den klassischen Duftstoffen der Basisnote.

Neben dem charakteristischen Duft wird Patchouliöl auch wegen seiner Eigenschaften als Fixateur in vielen Parfüms eingesetzt. Fixateure haben in Parfümen die Aufgabe, die Verdunstung der einzelnen Riechstoffe aneinander anzugleichen, um ein konsistentes Duftbild der Komposition zu erzeugen. Dabei soll gleichzeitig eine kontinuierliche Freisetzung der Duftstoffe erreicht werden, um dadurch den Duftcharakter möglichst lange aufrecht zu erhalten. Diese Funktionen erfüllen die Fixateure, indem sie den Dampfdruck der leichter flüchtigen Komponenten reduzieren. Wie die Verringerung des Dampfdrucks erfolgt, hängt dabei von dem verwendeten Fixateur ab. Der Effekt kann durch die Bildung von Azeotropen, Wasserstoffbrückenbindungen oder Dipol-Dipol-Wechselwirkungen hervorgerufen werden [43].

Das Patchouliöl bis heute von so großer Bedeutung ist, liegt vor allem an fehlenden synthetischen Alternativen. Das ist insofern bemerkenswert, als das von etwa 3.000 heute zugelassenen

Duftstoffen etwa 80% synthetischen Ursprungs sind. 20% werden aus pflanzlichen Rohstoffen gewonnen, zu denen auch die ätherischen Öle gehören, auf die jedoch nur ein Anteil von 5% aller verwendeten Duftstoffe entfällt [3]. Obwohl intensiv an Ersatzstoffen für Patchouliöl gearbeitet wurde, ist außer dem biotechnologisch produzierten Clearwood® keine Alternative für pflanzliches Patchouliöl kommerziell verfügbar. Abbildung 7 zeigt die Strukturformeln von zwei synthetischen Patchouli-Duftstoffen.

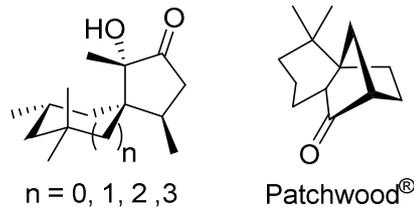


Abbildung 7: Es wird intensiv an der Entwicklung synthetischer Patchouli-Duftstoffen gearbeitet. Das Ergebnis dieser Forschungen sind Spiro-Verbindungen (links) und ein bicyclisches Keton (rechts), das unter dem Namen Patchwood® auf dem Markt ist.

Bei der von Givaudan (Vernier, Schweiz) entwickelten Gruppe von spirocyclischen α -Hydroxy-Keto-Verbindungen handelt es sich um sehr intensive Patchouli-Duftstoffe, die teilweise eine äußerst geringe Geruchsschwelle von 0,027 ng/L aufweisen [11, 44]. Allerdings können diese Substanzen derzeit nicht zu marktfähigen Preisen produziert werden. Das bicyclische Keton Patchwood® wird hingegen als Duftstoff vertrieben. Es stellt jedoch keinen vollständigen Ersatz für Patchouliöl dar, da es neben dem für Patchouliöl typischen holzig-erdigen Duft auch fruchtige Facetten aufweist [11].

4. Experimenteller Teil

4.1 Herstellung der rekombinanten Patchoulolsynthase

In diesem Abschnitt sollte ein Bioprozess zur rekombinanten Herstellung der Patchoulolsynthase (PTS) entwickelt werden. Bei dem dabei verwendeten Stamm (*E. coli* PTS) handelt es sich um einen *E. coli* BL21 (DE3) Stamm, der in Vorarbeiten konstruiert wurde (6. A10). Der Stamm enthält einen mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induzierbaren T7-Promoter als Expressionssystem auf Basis pET16b-Vektors (pET16b::his-FXa-PTS). Da es sich bei der PTS ursprünglich um ein pflanzliches Enzym handelt, wurde das Gen der PTS für die Codonverwendung von *E. coli* optimiert [1]. Als Selektionsmarker befindet sich eine Ampicillin-Resistenz auf dem Vektor. Der kommerziell erhältliche BL21 (DE3) Stamm ist für die Herstellung rekombinanter Proteine optimiert, indem die Produktion von Proteasen auf das notwendige Minimum reduziert wurde.

Die Herausforderung bei der rekombinanten Produktion relativ großer Pflanzenproteine (>50 kDa) stellt die Bildung von inclusion bodies dar [45, 46]. Bei inclusion bodies handelt es sich um unlösliche Proteinaggregate von fehlerhaft oder unvollständig gefalteten Proteinen im Cytoplasma. Trotz der korrekten Primärstruktur weisen diese Proteine keine biologische Aktivität auf. Um den Anteil des unlöslichen, inaktiven Enzyms in den inclusion bodies möglichst gering zu halten und gleichzeitig die Ausbeute an löslichen Enzym zu erhöhen, mussten die Kultivierungsbedingungen bei der Proteinexpression optimiert werden. Der Wahl des Mediums und der Kohlenstoffquelle, der Temperatur und der Induktorkonzentration kommen dabei eine zentrale Rolle zu [47].

In Vorarbeiten von Hartwig *et al.* wurde die lösliche Produktion der PTS bereits in terrific broth Medium (TB-Medium) im Schüttelkolbenmaßstab optimiert [1]. Auf Basis dieser Ergebnisse sollte in diesem Abschnitt ein Bioprozess mit einer Hochzelldichtekultivierung im 2 L Rührkesselreaktor entwickelt werden, um eine möglichst große Menge aktiver PTS produzieren zu können. Dabei sind zwei Aspekte von Bedeutung: Einerseits sollte bei der Kultivierung eine hohe Biomasse-Konzentrationen erreicht werden, andererseits müssen die Kultivierungsbedingungen nach der Induktion der Proteinexpression so gewählt werden, dass ein hoher Anteil der PTS in aktiver Form produziert wird. Um beiden Aspekten Rechnung zu tragen, ist es notwendig, einen fed-batch Prozess auf Basis eines definierten Mediums zu entwerfen.

Das in diesen Versuchen verwendete Medium basiert auf dem von Studier *et al.* [48] entwickelten ZYP-Medium, das von Dr. Ioannis Pavlidis (Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald) und Philipp Grünert (Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover) weiterentwickelt wurde. Es handelt sich um ein gepuffertes Medium, das abweichend von der originalen Zusammensetzung jedoch nicht als Autoinduktionsmedium verwendet wird. Anstatt einer Kombination von Glycerin, Glucose und Lactose wurde in dieser Arbeit Glycerin als

Kohlenstoffquelle mit einer Konzentration von 20 g/L verwendet, um im fed-batch Prozess die negativen Auswirkungen einer Überfütterung zu begrenzen. Der Vorteil von Glycerin gegenüber Glucose ist, dass es bei einer Überfütterung mit Glucose zum sog. Crabtree-Effekt kommt, der zu einer erhöhten Acetat-Produktion führt. Da ein Teil des Substrates dann nicht mehr für den Aufbau von Biomasse oder für die Proteinproduktion zur Verfügung steht, sinkt dadurch die Substrat-Biomasse- und die Substrat-Produkt-Ausbeute [49]. Daher sollten bei der Entwicklung des Prozesses Maßnahmen ergriffen werden, um die Acetat-Produktion besonders während der Induktionsphase zu begrenzen [50, 51]. Neben Glycerin enthält das Medium einen Phosphatpuffer, Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle sowie alle für *E. coli* essentiellen Spurenelemente. Die genaue Zusammensetzung des Mediums ist dem Anhang zu entnehmen (6. A5).

4.1.1. Kultivierung in definiertem Medium im 2 L STR Maßstab

In diesem Versuch sollte das Wachstumsverhalten des *E. coli* PTS Stamms mit dem condonoptimierten PTS Gen in definiertem Medium in einem Bioreaktor untersucht werden. Im Hinblick auf die Entwicklung eines fed-batch-Prozesses, sollte dabei vor allem die spezifische Wachstumsrate beim unlimitierten Wachstum bestimmt werden.

Dazu wurde eine Vorkultur angesetzt, in dem 20 mL lysogeny broth Medium (LB-Medium, 6. A4) mit 100 μ M Carbenicillin in einem 100 mL Schüttelkolben mit 1 mL einer Kryokultur angeimpft wurden. Als Selektionsmarker wurde Carbenicillin verwendet, da es verglichen mit dem verwandten Ampicillin stabiler ist. Die Kultur wurde für 6 h bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Für die zweite Vorkultur wurden 5 mL der Kulturbrühe in einem Arbeitsvolumen von 100 mL des definierten Mediums (6. A5) mit 100 μ M Carbenicillin in einem 500 mL Animpfkolben gegeben und für 10 h bei 30°C und 150 rpm kultiviert.

Die Kultivierung im Bioreaktor wurde in einem Biostat A plus (Sartorius-Stedim Biotech, Göttingen, Deutschland) durchgeführt, der mit einer pH-Elektrode (EasyFerm Plus K8 200; Hamilton, Reno, USA) und einer Elektrode für die Bestimmung des Sauerstoffpartialdrucks (OxyFerm FDA 225; Hamilton, Reno, USA) ausgestattet war. Der Bioreaktor wurde mit 1,1 L Medium (6. A5) mit 100 μ M Carbenicillin befüllt und mit der zweiten Vorkultur ($OD_{600} = 4,74$ rel. AU) auf einen Startwert von $OD_{600} = 0,54$ rel. AU inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei einer Temperatur von 30 °C und der pH-Wert wurde mittels 0,5 M HCl und NH_4OH -Lösung (25% w/w) auf pH 7 statiert. Die Gelöstsauerstoffkonzentration wurde über die Rührerdrehzahl kaskadierend auf 30% (v/v) geregelt. In regelmäßigen Abständen wurden Proben zur Bestimmung der optischen Dichte und der Biotrockenmasse (BTM) gezogen (6. B12). Nach dem vollständigen Verbrauch des Glycerins wurde die Kultivierung beendet und die Biomasse geerntet. Es wurden 49,4 g Feuchtbioasse erhalten.

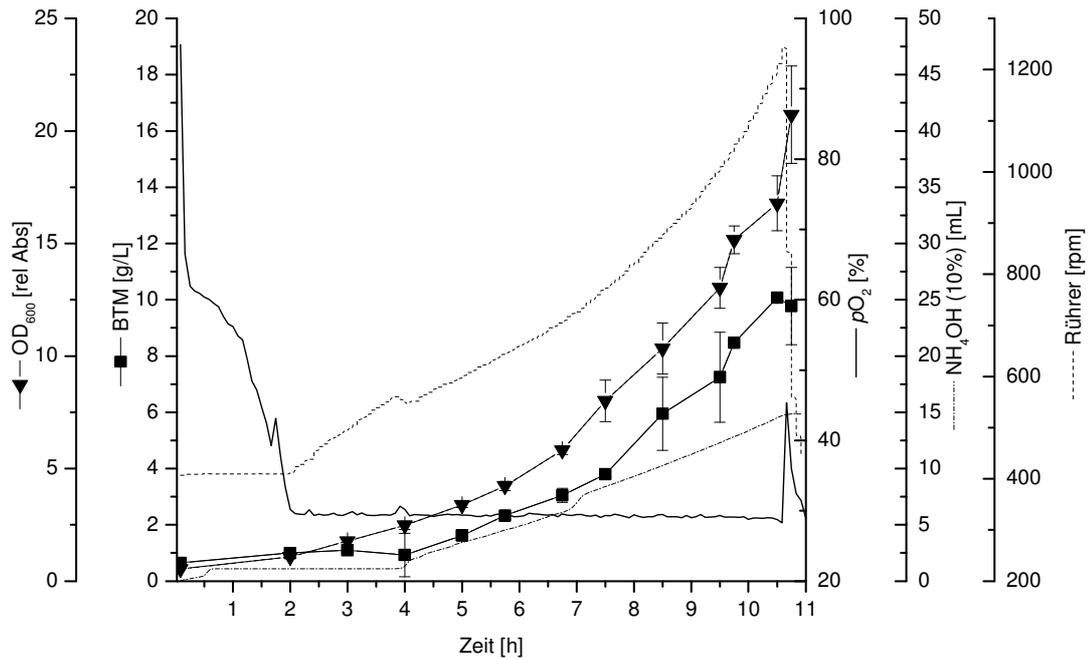


Abbildung 8: Kultivierung von *E. coli* PTS in definiertem Medium im 2 L Rührkesselreaktor. Anhand des OD₆₀₀-Wertes und der BTM ist zu erkennen, wie die Kultur nach einer lag-Phase exponentiell wächst, bis nach 10,75 h das Substrat aufgebraucht ist.

Aus dem Verlauf der Messwerte für die optische Dichte und der BTM ist ersichtlich, dass die Kultur nach der lag-Phase ein exponentielles Wachstum aufweist. Dabei ist zu erkennen, wie parallel zum Wachstum der Bakterien die Rührergeschwindigkeit von der Regelungssoftware sukzessive erhöht wird, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung sicherzustellen. Der Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks bei 10,75 h zeigt an, dass zu diesem Zeitpunkt das Substrat Glycerin aufgebraucht wurde.

Auf Basis der BTM zu Beginn und zum Ende der exponentiellen Phase wurde die maximale Wachstumsrate des *E. coli* PTS Stammes auf $\mu_{\max} = 0,27 \text{ h}^{-1}$ bestimmt. Für den Biomasse-Ausbeute-Koeffizienten wurde ein Wert von $Y_{X/S} = 0,46$ berechnet. Der Wert für die maximale Wachstumsrate eines *E. coli* BL21 Stamms bei 30°C und mit Glycerin als Substrat liegt im Bereich der Daten aus der Literatur und aus Vorarbeiten [52].

In dem Versuch konnte gezeigt werden, dass *E. coli* PTS im Bioreaktor in dem definierten Medium kultiviert werden kann. Durch die Charakterisierung des Wachstumsverhaltens wurden wichtige Kennzahlen für die Entwicklung eines fed-batch-Prozesses ermittelt.

4.1.2. Fed-batch-Kultivierung mit exponentiellen feed-Profil und Temperaturabsenkung während der Induktionsphase

In diesem Versuch sollte auf Basis der zuvor gewonnenen Erkenntnisse eine fed-batch-Kultivierung zur rekombinanten Produktion der PTS durchgeführt werden. Der erste Schritt sollte dabei aus einer batch-Phase bestehen, in der die Kultivierung gestartet wird und die Bakterien im unlimitierten Wachstum ihre maximale Wachstumsrate erreichen. Im Anschluss daran sollte in der feed-Phase über eine von einer Software gesteuerte Pumpe die Wachstumsrate über ein exponentielles feed-Profil vorgegeben werden. Zu einem bestimmten Zeitpunkt sollte dann die Induktion der Proteinexpression erfolgen. Da in Vorarbeiten als optimale Temperatur für die Produktion der PTS 20°C bestimmt wurde, sollte bei dieser Kultivierung die Temperatur im Reaktor zusammen mit der Induktion absenkt werden [1].

Für die erste Vorkultur wurde 1 mL einer Kryokultur in 20 mL LB-Medium (6. A4) mit 100 µg/mL Carbenicillin gegeben und für 6 h bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Für die zweite Vorkultur wurden 100 mL des definierten Mediums (6. A5) mit 100 µg/mL Carbenicillin in einem 500 mL Schüttelkolben mit 5 mL der ersten Vorkultur angeimpft und für 10 h bei 30°C und 150 rpm kultiviert.

Die Kultivierung wurde in einem Biostat A plus (Sartorius-Stedim Biotech, Göttingen, Deutschland) durchgeführt, der mit einer pH-Elektrode (EasyFerm Plus K8 200; Hamilton, Reno, USA) und einer Elektrode für die Bestimmung des Sauerstoffpartialdrucks (OxyFerm FDA 225; Hamilton, Reno, USA) ausgestattet war. Der Bioreaktor wurde mit 900 mL Medium (6. A5) mit 100 µg/mL Carbenicillin befüllt und mit der gesamten zweiten Vorkultur ($OD_{600} = 3,54$ rel. AU) auf einen Startwert von $OD_{600} = 0,42$ rel. AU inokuliert. Die Kultivierung in der batch-Phase wurde bei 30°C und pH 7,0 durchgeführt. Der pH-Wert wurde durch die Titration mit 1 M HCl und NH_4OH -Lösung (10% w/w) geregelt. Es wurde dabei Ammoniak-Lösung verwendet, da während der späteren feed-Phase die zu Beginn im Medium vorgelegte Stickstoffmenge nicht mehr ausreicht. Der pO_2 -Wert wurde auf 30% (v/v) geregelt, indem die Rührer im kaskadierenden Modus betrieben wurde. Die Begasung erfolgte während der batch-Phase mit 1 vvm Luft. Für die Bestimmung der optischen Dichte und der BTM wurden regelmäßig Proben aus dem Reaktor genommen (6. B12). Da die Analyse der Glycerin und Acetat-Konzentration nur offline mittels HPLC erfolgen konnte (6. B3), wurde der Medienüberstand dazu eingefroren.

Nach 11,5 h ($OD_{600} = 24,15$ rel. AU) war das in der batch-Phase vorgelegte Substrat aufgebraucht, was sich im schnellen Anstieg der Sauerstoffkonzentration im Medium äußerte. Zu diesem Zeitpunkt wurde die feed-Phase eingeleitet, indem die Pumpe (ISMATEC IPS, IDEX Health & Science GmbH, Wertheim, Deutschland) zur Dosierung der Substratzugabe gestartet wurde. Zur Steuerung der Pumpe wurde die Software ORK-Feeder (V. 1.1.0.0, Patrick Lindner, Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover) verwendet, mit der ein exponentiell ansteigendes,

substratlimitierendes feed-Profil berechnet wurde. Über die Flussrate der feed-Pumpe wurde dadurch eine bestimmte Wachstumsrate vorgegeben. Da die maximale Wachstumsrate des verwendeten Stammes in Kapitel 4.1.1 bei $\mu_{\max} = 0,27 \text{ h}^{-1}$ lag, wurde in diesem Versuch eine etwas geringere Wachstumsrate von $0,20 \text{ h}^{-1}$ eingestellt, um eine Überfütterung zu vermeiden. Bei der feed-Lösung handelte es sich um 40% (v/v) Glycerin mit 4 mM MgSO_4 und Spurenelementen (6. A6). Um auch während der fed-batch-Phase eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Kultur sicherzustellen, wurde zusätzlich zur Begasung mit Luft eine nach Bedarf geregelte Begasung mit Sauerstoff aktiviert.

Nach 8,5 h ($\text{OD}_{600} = 49,60 \text{ rel. AU}$) wurde die Temperatur auf 20°C abgesenkt und die Expression der PTS durch die Zugabe von IPTG auf eine Konzentration von $500 \mu\text{M}$ induziert. Mit Beginn der Induktionsphase wurden zusätzlich Proben für die Quantifizierung der Proteinproduktion mittels densitometrischer Untersuchungen der SDS-PAGE genommen (6. B8, B13). 9 h ($\text{OD}_{600} = 48,57 \text{ rel. AU}$) nach Beginn der Induktion wurde die Kultivierung beendet und die Biomasse geerntet. Insgesamt wurden bei der Kultivierung 160,65 g Feuchtbioasse produziert. In Abbildung 9 ist der Verlauf der fed-batch-Kultivierung gemeinsam mit der Entwicklung der Konzentration der löslichen PTS dargestellt.

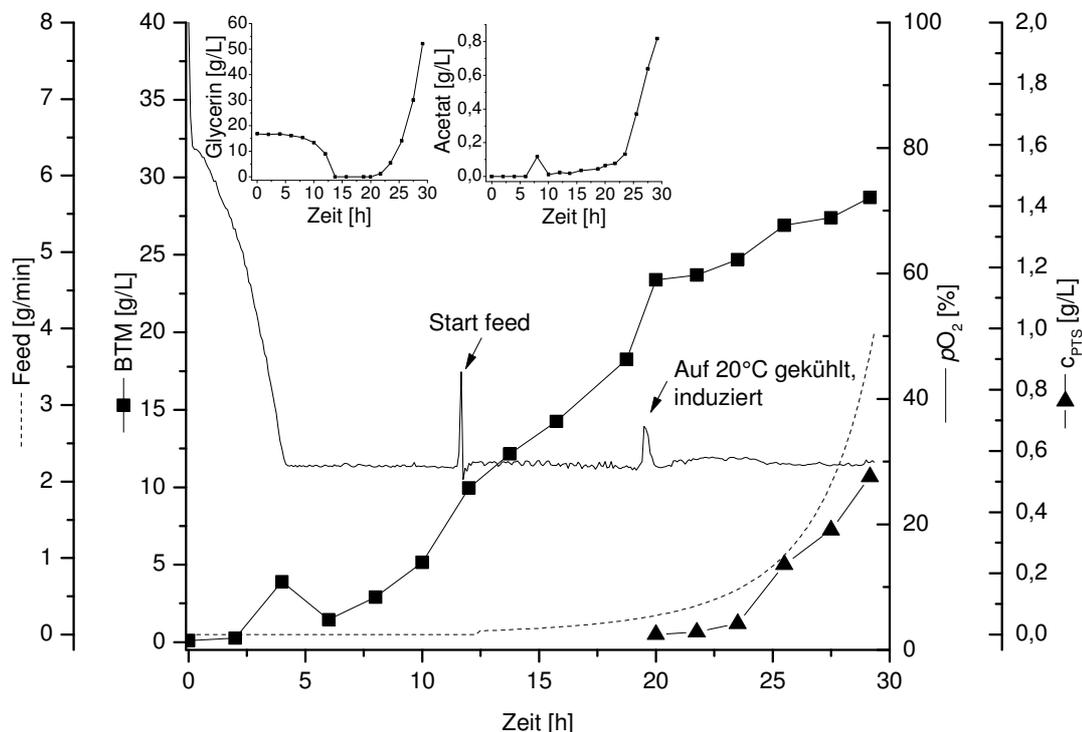


Abbildung 9: Verlauf der fed-batch-Kultivierung mit exponentiellen feed-Profil. Ab dem Zeitpunkt der Induktion nimmt die BTM nur noch leicht zu, während eine deutliche Produktion der löslichen PTS zu beobachten ist.

In der batch-Phase ist eine exponentielle Zunahme der BTM zu erkennen. Auf Grund der Verdünnung geht die Zunahme der BTM mit dem Start des Feeds in ein lineares Wachstum über.

Gebremst durch die niedrigere Temperatur und die Induktion der PTS-Produktion nimmt die BTM in den letzten 10 h der Kultivierung nur geringfügig zu. Nach der Induktion dauerte es 3 h bis die Konzentration der löslichen PTS kontinuierlich zu steigen begann. Aus den Resultaten der HPLC-Analytik zur Bestimmung der Glycerin und Acetat-Konzentration geht hervor, dass das Substrat während der batch-Phase vollständig verbraucht wird. Auch nach dem Einschalten der Pumpe befinden sich die Bakterien zunächst in einer Substratlimitierung, so dass auch die Acetat-Produktion nicht ansteigt. Mit der Induktion und dem Absenken der Temperatur sinkt die Stoffwechselaktivität der Bakterien, während die Flussrate des feeds weiterhin exponentiell erhöht wird. Dies resultiert in einem deutlichen Anstieg der Glycerin-Konzentration, die schließlich auch eine moderate Zunahme der Acetat-Konzentration auf bis 0,8 g/L nach sich zieht.

In diesem Versuch wurde die PTS erstmals erfolgreich in einer fed-batch-Kultivierung produziert. Mit Hilfe des exponentiellen feed-Profiles war es möglich während der fed-batch-Phase eine hohe Biomasse als Ausgangspunkt für die Produktion der PTS zu erzeugen. Da die Temperatur, gemäß den Erkenntnissen aus den Vorarbeiten, abgesenkt wurde, konnte die PTS in löslicher Form produziert werden. Während der Induktionsphase nahm die Proliferation vor allem auf Grund der reduzierten Temperatur ab, sodass es in Kombination mit dem exponentiellen feed-Profil schließlich zu einer deutlichen Überfütterung kam. Aus metabolischen Gründen führte die sehr hohe Glycerin-Konzentration nicht zu einem starken Anstieg der Acetat-Konzentration, die das Wachstum und die Protein-Produktion hätte beeinträchtigen können. In der Literatur werden Acetat-Konzentration von >1,5 g/L als wachstumshemmend beschrieben [53]. Die Anreicherung von Glycerin im Medium ist dennoch problematisch, da eine Überfütterung die Bildung von inclusion bodies fördern kann, was sich negativ auf die Ausbeute der löslichen PTS auswirkt. Zusätzlich wird auf Grund der hohen Viskosität und der geringeren Löslichkeit von Sauerstoff in Glycerin die Sauerstoffversorgung der Bakterien erheblich beeinträchtigt, was sich ebenfalls negativ auf die Proteinexpression auswirkt.

4.1.3. Fed-batch Kultivierung mit konstantem feed und Temperaturabsenkung während der Induktionsphase

In dieser Kultivierung sollte der fed-batch-Prozess aufbauend auf den Erkenntnissen aus Kapitel 4.1.2 weiterentwickelt werden. Vor allem sollte dabei eine Überfütterung in der Induktionsphase vermieden werden, um optimale Bedingungen für die Produktion löslicher PTS zu schaffen. In Kapitel 4.1.2 war die Ursache der Überfütterung ein zu hoher feed-Strom während der Induktion. Da das Wachstum der Bakterien durch die niedrigere Temperatur verlangsamt wird und dadurch auch der Substratverbrauch geringer ist, sollte in diesem Versuch das feed-Profil angepasst werden. In der fed-batch-Phase sollte zunächst wieder über eine exponentielle Zunahme des feed-Stroms Biomasse für die spätere PTS-Produktion erzeugt werden. Ab dem Zeitpunkt der Induktion sollte der feed-Strom abgesenkt und auf diesem Level konstant gehalten werden.

Für die Vorkultur wurde 1 mL einer Kryokultur in 10 mL LB-Medium (6. A4) mit 100 µg/mL Carbenicillin gegeben und für 7 h bei 37°C und 130 rpm inkubiert. Die zweite Vorkultur wurde gestartet indem 100 mL des definierten Mediums (6. A5) mit 100 µg/mL Carbenicillin in einem 500 mL Animpfkolben mit der gesamten ersten Vorkultur angeimpft und für 6,5 h bei 30°C und 120 rpm kultiviert wurde.

Die Kultivierung im Bioreaktor wurde in einem Biostat A plus in der in Kapitel 4.1.2 beschriebenen Konfiguration durchgeführt. Der Reaktor wurde mit 900 mL Medium (6. A5) mit 100 µg/mL Carbenicillin befüllt und mit der gesamten zweiten Vorkultur ($OD_{600} = 2,01$ rel. AU) auf einen Startwert von $OD_{600} = 0,28$ rel. AU inokuliert. Die Kultivierung wurde bei 30°C und einem pH-Wert von 7,0 durchgeführt. Dabei wurde der pH-Wert durch die automatische Zugabe von 1 M HCl und NH_4OH -Lösung (10% w/w) konstant gehalten. Der pO_2 -Wert wurde bei 30% (v/v) konstant gehalten, indem die Rührergeschwindigkeit kaskadierend mit einer minimalen Geschwindigkeit von 400 rpm geregelt wurde. Der Bioreaktor wurde mit in der batch-Phase mit 1 vvm Luft begast. Für die Bestimmung der optischen Dichte und der BTM (6. B12) wurden regelmäßig Proben genommen, diese zentrifugiert und der Überstand für die offline Bestimmung der Glycerin und Acetat-Konzentration mittels HPLC verwendet (6. B3).

Nach 13 h ($OD_{600} = 29,56$ rel. AU) wurde der charakteristische Peak des Sauerstoffpartialdrucks detektiert und die fed-batch-Phase eingeleitet. Dazu wurde die Software ORK-Feeder zur Steuerung der Peristaltikpumpe für den feed-Strom gestartet und mit dem gleichen feed-Profil wie in Kapitel 4.1.2 eine Wachstumsrate von $\mu = 0,2 \text{ h}^{-1}$ eingestellt. Als feed wurde eine Glycerin-Lösung (40% w/w) verwendet, die mit 100 µg/mL Carbenicillin und 0,5 mL Antischaum versetzt wurde. Zusätzlich wurde Spurenelemente der im Anhang angegebenen Konzentrationen hinzugefügt (6. A6). Mit dem Start der fed-batch-Phase wurde außerdem in der Regelungssoftware des Bioreaktors die nach Bedarf geregelte Begasung mit Sauerstoff aktiviert.

Nach 11,75 h ($OD_{600} = 110,04$ rel. AU) wurde der feed, der zu diesem Zeitpunkt eine Rate von 0,375 g/min Glycerin aufwies, gestoppt und auf einen konstanten Wert von 0,153 g/min eingestellt. Anschließend wurde die Temperatur auf 20°C abgesenkt und 1,5 mL einer 500 mM IPTG-Lösung in den Reaktor gegeben, um die Produktion der PTS zu induzieren. In der Induktionsphase wurden zusätzliche Proben gezogen, um die Entwicklung der Konzentration der löslichen PTS mittels densitometrischer Analysen Coomassie-gefärbter SDS-PAGE Gele zu untersuchen (6. B8, B13). 6 h nach der Induktion kam es zu Schwankungen des pO_2 -Wertes in Kombination mit einer verstärkten Schaumbildung im Reaktor, so dass in mehreren Portionen insgesamt 1 mL zusätzliches Antischaum-Reagenz in die Kulturbrühe gegeben wurde. 10 h nach Beginn der Induktion wurde die Kultivierung beendet ($OD_{600} = 128,36$ rel. AU) und die Biomasse geerntet. Insgesamt konnten aus der Kulturbrühe 350,42 g Biofeuchtmasse isoliert werden.

Der Kultivierungsverlauf ist gemeinsam mit den offline gemessenen Daten für die PTS-Produktion und die Glycerin- und Acetat-Konzentration (6. B3) in Abbildung 10 dargestellt.

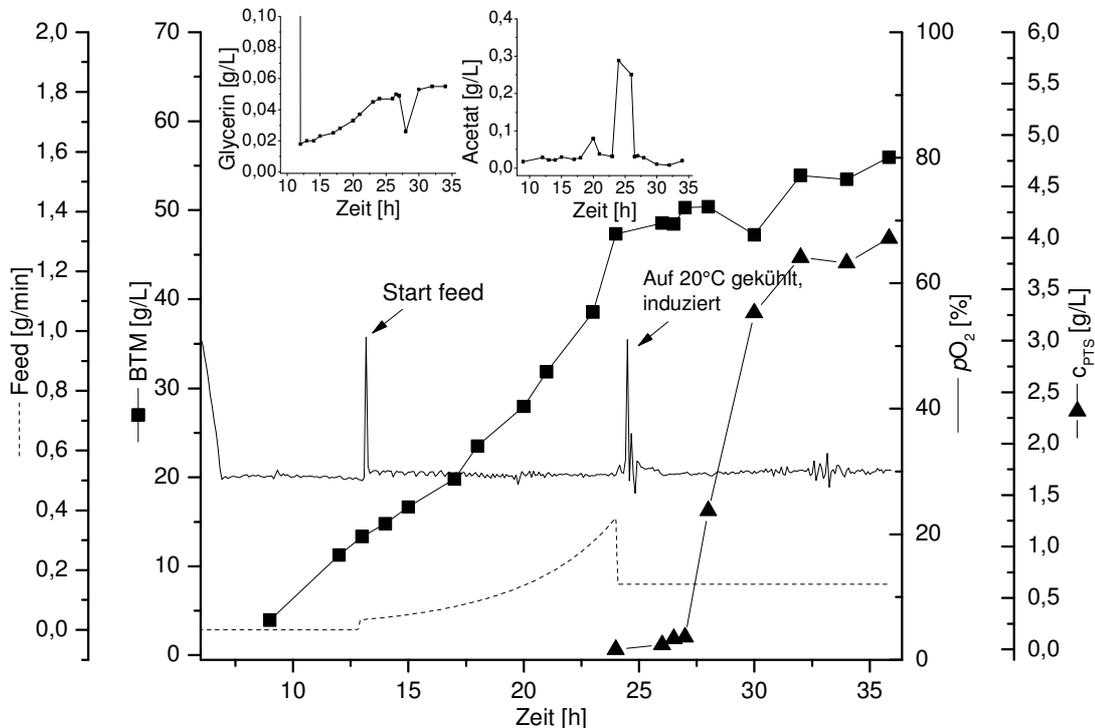


Abbildung 10: Verlauf der fed-batch-Kultivierung mit reduziertem feed und Temperaturabsenkung in der Induktionsphase. Nach der Induktion konnte durch ein Absenken des feeds eine Überfütterung vermieden werden.

Aus der Abbildung geht hervor, dass in der batch-Phase und in der anschließenden fed-batch-Phase erfolgreich eine hohe Biomasse aufgebaut werden konnte. Ab dem Induktionsbeginn und der damit verbundenen Absenkung der Temperatur nimmt die BTM nur noch langsam zu. Die sehr geringen Werte für die Glycerin-Konzentrationen zeigen, dass sich die Bakterien auch während der Induktionsphase in einer Substratlimitierung befunden haben. Dementsprechend ist auch die gemessene Acetat-Konzentration während der gesamten Kultivierung niedrig. Der Anstieg bei 25 h auf 0,3 g/L ist auf die Induktion und die Absenkung der Temperatur zurückzuführen. Die Konzentration der löslichen PTS steigt 2 h nach der Induktion zunächst stark an und stagniert schließlich nach 6 h. Zu diesem Zeitpunkt kam es auch zu der oben beschriebenen Schaumbildung und zur Schwankung des pO₂-Wertes, die in der Abbildung zu erkennen ist. Diese Anzeichen können darauf hinweisen, dass die Zellen teilweise lysiert sind. Möglicherweise besteht dabei ein Zusammenhang mit dem Erreichen der maximalen PTS-Konzentration.

In dieser Kultivierung konnte die PTS in einem fed-batch-Prozess durch Anwendung eines optimierten feed-Profiles in relativ hohen Konzentrationen in löslicher Form produziert werden. Durch das Absenken der feed-Rate mit Induktion auf ein konstantes Level, konnte eine

Überfütterung der Bakterien erfolgreich verhindert werden. Es wurde gezeigt, dass etwa 6 h nach der Induktion die Konzentration der PTS nicht mehr signifikant ansteigt und es zu diesem Zeitpunkt zur Lyse einiger Zellen kommt, sodass die Induktionsphase auf 6 h begrenzt werden könnte.

4.1.4 Fed-batch Kultivierung mit konstantem feed und ohne Temperaturabsenkung während der Induktionsphase

In diesem Versuch sollte die fed-batch-Kultivierung auf Basis der in den Kapitel 4.1.2 und 4.1.3 gewonnenen Erkenntnisse in Richtung einer gesteigerten Ausbeute an löslicher PTS weiterentwickelt werden. Das Ziel war daher, die Biomasse-Konzentration auch noch während der Induktionsphase zu steigern. Dazu sollte von dem bisherigen Ansatz, die Temperatur zur Induktion auf 20°C zu reduzieren, abgerückt werden und stattdessen der gesamte Prozess isotherm bei 30°C durchgeführt werden. Die Temperaturabsenkung bei der Induktion wurde auf Grund der Resultate aus Vorarbeiten vorgenommen, um die Menge an löslicher PTS zu steigern [1]. Dieser Effekt wird durch die Verlangsamung metabolischer Prozesse erreicht. Auch die Expression des Gens vom Zielprotein auf dem Plasmiden wird dadurch gebremst und die produzierten Proteine können besser gefaltet werden, was die Bildung von inclusion bodies reduziert. In diesem Versuch soll untersucht werden, ob nicht auch eine Substratinhibierung den Metabolismus von *E. coli* soweit bremsen kann, dass die PTS trotz einer Kultivierungstemperatur von 30°C in löslicher Form produziert werden kann. Die Vorarbeiten, auf denen das bisherige Verfahren basiert, können dazu keine Informationen liefern, da sie im Schüttelkolben in TB-Medium durchgeführt wurden [54]. Die dort untersuchten Kultivierungen fanden also unter nicht vergleichbaren Bedingungen statt.

Die erste Vorkultur wurde gestartet, indem 1 mL einer Kryokultur in 10 mL LB-Medium (6. A4) mit 100 µg/mL Carbenicillin gegeben und für 7 h bei 37°C und 130 rpm inkubiert wurde. Für die zweite Vorkultur wurden 3 mL der ersten Vorkultur in 100 mL Arbeitsvolumen des definierten Mediums (6. A5) mit 100 µg/mL Carbenicillin in einem 500 mL Animpfkolben gegeben und für 6,5 h bei 30°C und 130 rpm kultiviert.

Als Bioreaktor wurde ein Biostat A (Sartorius-Stedim Biotech, Göttingen, Deutschland) in der in Kapitel 4.1.2 beschriebenen Konfiguration verwendet. Der Reaktor wurde mit 900 mL Medium (6. A6), mit 100 µg/mL Carbenicillin befüllt und mit der gesamten zweiten Vorkultur ($OD_{600} = 2,95$ rel. AU) auf einen Startwert von $OD_{600} = 0,38$ rel. AU angeimpft. Die Kultivierung in der batch-Phase wurde unter den in Kapitel 4.1.2 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Zur Bestimmung der optischen Dichte und der BTM wurden regelmäßig Proben aus dem Reaktor gezogen. Der Überstand wurde dabei für die offline Bestimmung der Glycerin- und Acetat-Konzentration mittels HPLC verwendet (6. B3).

Nach 12 h ($OD_{600} = 29,03$ rel. AU) war die batch-Phase beendet und die fed-batch-Phase wurde eingeleitet, indem die Software ORK-Feeder zur Steuerung der Peristaltikpumpe für den feed-Strom gestartet wurde. Dabei wurde eine Wachstumsrate von $\mu = 0,2 \text{ h}^{-1}$ mit dem gleichen feed-Profil wie in Kapitel 4.1.2 eingestellt. Als feed-Lösung wurde eine Glycerin-Lösung (40% w/w) verwendet (6. A6).

Nach 10,5 h ($OD_{600} = 108,28$ rel. AU) betrug die feed-Rate 0,326 g/min Glycerin. Der exponentielle Anstieg der feed-Rate wurde gestoppt und bei diesem Wert konstant gehalten. Unmittelbar nach Auftreten des Peaks des pO_2 -Wertes wurde die Induktionsphase durch die Zugabe von 1,5 mL einer 500 mM IPTG-Lösung gestartet. In der Induktionsphase wurden zusätzliche Proben für die Bestimmung der PTS-Konzentration mittels SDS-PAGE gezogen (6. B8). 10 h nach Beginn der Induktion wurde die Kultivierung beendet ($OD_{600} = 152,48$ rel. AU) und die Biomasse geerntet. Dabei konnten aus den 1,7 L Kulturbrühe insgesamt 472,8 g Biofeuchtmasse isoliert werden.

Der Kultivierungsverlauf ist gemeinsam mit den offline gemessenen Daten für die PTS-Produktion und die Glycerin- und Acetat-Konzentration in Abbildung 11 dargestellt.

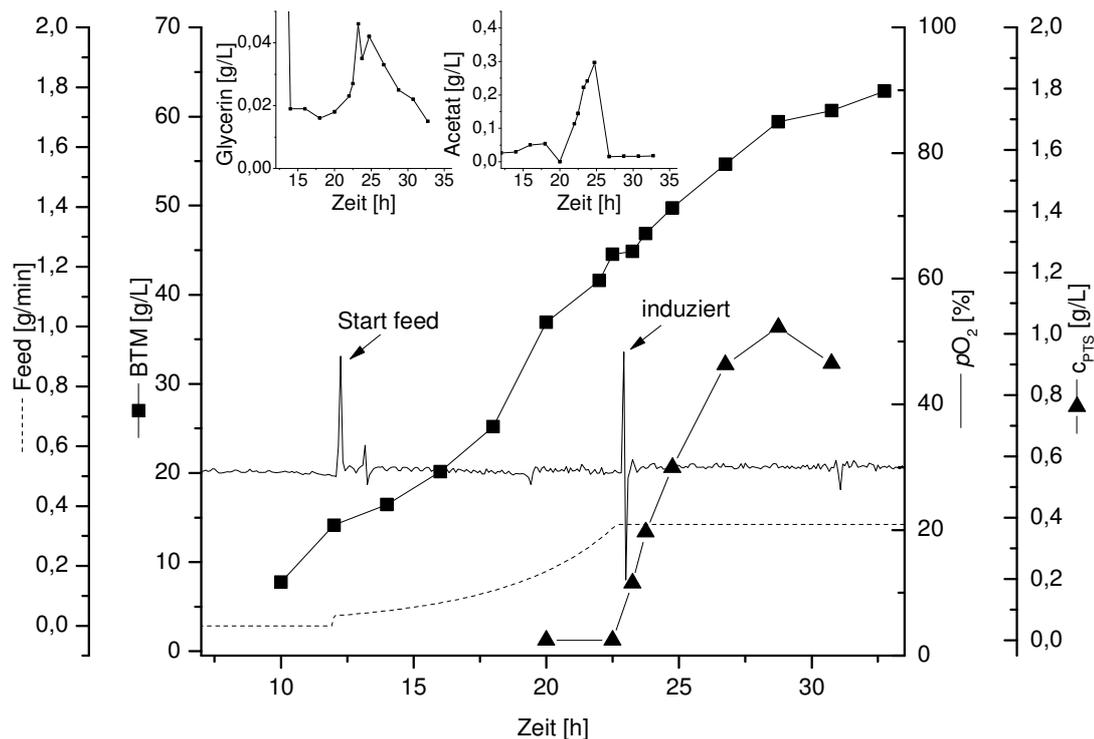


Abbildung 11: Verlauf der fed-batch-Kultivierung mit konstantem feed ohne Absenkung der Temperatur zur Induktion. Auch in der Induktionsphase nimmt die BTM weiter zu; die Konzentration der löslichen PTS erreicht allerdings schon 6 h nach der Induktion ihren Maximalwert und stagniert danach.

Die Abbildung zeigt den Verlauf der Kultivierung zusammen mit den offline durchgeführten Analysen für die Bestimmung der PTS-, Glycerin und Acetat-Konzentration. Es ist zu erkennen, dass die BTM auch nach der Induktion noch kontinuierlich ansteigt und am Ende der Kultivierung einen

Wert von 62 g/L erreicht. Die Konzentration der PTS beginnt unmittelbar nach der Induktion mit IPTG stark anzusteigen und erreicht nach 6 h ihr Maximum. Aus den Resultaten der Glycerin-Analytik geht hervor, dass die Substrat-Konzentration während der gesamten Kultivierung sehr niedrig war und die Bakterien somit in einer Substratlimitierung gehalten werden konnten. Der geringfügige Anstieg der Glycerin-Konzentration bei 23-25 h ist auf die Induktion zurückzuführen, die das Wachstum und damit den Substratverbrauch vorübergehend gebremst hat. Die Ergebnisse der Acetat-Bestimmung zeigen, dass zu keinem Zeitpunkt der Kultivierung eine für das Wachstum oder die Proteinproduktion kritische Acetat-Konzentration von 1,5 g/L erreicht wurde.

In dieser Kultivierung sollte die Menge an löslicher PTS dadurch gesteigert werden, dass während der Induktionsphase die Temperatur bei 30°C gehalten wurde, um so eine weitere Proliferation zu erzielen. Statt durch die Absenkung der Temperatur, sollte die Produktion der PTS durch eine konsequente Substratlimitierung in der Induktionsphase verlangsamt werden, um so die Bildung von inclusion bodies zu verringern und die Ausbeute an löslichem Protein zu steigern. Das Ziel, die Biomasse-Konzentration auch nach der Induktion weiter zu steigern und gleichzeitig eine Substratlimitierung sicherzustellen, wurde erreicht. Obwohl damit von den in den Vorarbeiten gewonnen Erkenntnissen abgewichen wurde, konnte erfolgreich lösliche PTS produziert werden.

4.1.5 Zusammenfassung und Diskussion der Kultivierungsversuche

In diesem Abschnitt sollte ein fed-batch-Prozess für die Hochzelldichtekultivierung des *E. coli* PTS Stammes entwickelt werden. Das Ziel war dabei, in einem Bioreaktor möglichst viel PTS in löslicher Form produzieren zu können. Für die Entwicklung eines derartigen Prozesses war es notwendig, die Erkenntnisse aus den in TB-Medium durchgeführten Vorarbeiten auf die Verwendung des chemisch definierten ZYP-Mediums anzuwenden. Als Kohlenstoffquelle wurde in dieser Arbeit das Glycerin anstatt Glucose verwendet, um die Gefahr einer Überfütterung zu reduzieren [49, 55].

Dazu wurde zunächst eine batch-Kultivierung ohne Induktion in einem 2 L Bioreaktor durchgeführt, um das Wachstumsverhalten zu untersuchen. Dabei konnten prozesstechnisch wichtige Parameter wie die maximale Wachstumsrate, der Substrat-Ausbeute-Koeffizient und die Endkonzentration der Biomasse bestimmt werden. Die Parameter liegen mit $\mu_{\max} = 0,27 \text{ h}^{-1}$, $Y_{X/S} = 0,46$ und einer BTM am Ende der Kultivierung von 9,8 g/L im Bereich der Literaturwerte für Kultivierungen vergleichbare Stämme bei 30°C mit Glycerin als Substrat [52].

Auf Basis der in der batch-Kultivierung gewonnenen Daten, wurde erstmals eine fed-batch-Kultivierung zur rekombinanten Produktion der PTS durchgeführt. Dabei wurde ein exponentielles Profil zur Steuerung der feed-Pumpe berechnet und ab dem Ende der batch-Phase zum Hochziehen der Kultur verwendet. Um eine Produktion der PTS in löslicher Form sicherzustellen, wurde die Temperatur bei der Induktion auf 20°C gesenkt. Am Ende der Kultivierung wurde auf diese Weise

eine BTM von 27 g/L und ein PTS-Titer von 0,52 g/L erreicht. Allerdings kam es zum Ende der Kultivierung zu einer starken Überfütterung verbunden mit einem Anstieg der Acetat-Konzentration. Die Ursache dafür war eine Kombination aus einem zu hohen feed-Strom und dem reduzierten Substratverbrauch der Bakterien auf Grund der abgesenkten Temperatur und der Induktion der Proteinproduktion.

Eine Überfütterung wirkt sich negativ auf das Wachstum und die Produktion rekombinanter Proteine aus und sollte daher vermieden werden. Während bei einer Überfütterung mit Glucose vor allem die Acetat-Produktion problematisch ist, wird bei zu hohen Glycerin-Konzentrationen im Medium die Sauerstoffaufnahme der Bakterien beeinträchtigt.

Im nächsten Kultivierungsversuch wurde deswegen der feed-Strom zum Zeitpunkt der Induktion reduziert und auf diesem Niveau konstant gehalten. Auf diese Weise gelang es, die Glycerin-Konzentration während der Induktionsphase gering zu halten und so eine Überfütterung zu verhindern. In der Kultivierung konnte dadurch der PTS-Titer auf 4 g/L bei einer BTM von 56 g/L erheblich gesteigert werden. Allerdings war nach der Induktion nur noch eine geringe Zunahme der Biomasse-Konzentration zu beobachten. Die Biomasse, die bis zum Beginn der Induktion aufgebaut wurde, ist demnach maßgeblich für die maximal produzierbare PTS-Menge.

Um die Ausbeute an löslicher PTS, ohne eine Maßstabsvergrößerung, zu erhöhen, sollte der Prozess so verändert werden, dass auch noch nach der Induktion ein Wachstum der Biomasse erzielt werden kann. Der wachstumslimitierende Parameter in den durchgeführten Kultivierungen war vor allem die Absenkung der Temperatur auf 20°C. Deswegen wurde eine Kultivierung durchgeführt ohne die Temperatur bei der Induktion zu reduzieren.

In Vorarbeiten wurde zwar gezeigt, dass die niedrigere Temperatur zu einem höheren Anteil an löslicher PTS führt, aber die Ergebnisse sind nicht zwangsläufig auf den in dieser Arbeit entwickelten fed-batch-Prozess übertragbar [54]. Der entscheidende Effekt der Temperaturabsenkung besteht in der Verlangsamung des bakteriellen Metabolismus, womit auch die Expression des rekombinanten Zielproteins gebremst wird. Dadurch bekommen die synthetisierten Proteine mehr Zeit sich korrekt zu falten und die Bildung von inclusion bodies wird vermindert. Anstatt die Temperatur zu senken, sollte im letzten Kultivierungsversuch die Verlangsamung des Metabolismus durch eine konsequente Substratlimitierung erreicht werden.

Das Ziel des Versuches, auch nach der Induktion ein Wachstum der Biomasse aufrechterhalten zu können, wurde erreicht. Dabei wurden während der Induktionsphase nur geringe Glycerin-Konzentrationen gemessen, so dass sich die Bakterien in einer Substratlimitierung befunden haben müssen. Das übergeordnete Ziel, auf diese Weise die Ausbeute an löslicher PTS über 4 g/L hinaus zu steigern, konnte allerdings nicht erreicht werden, obwohl bei der Kultivierung eine hohe BTM von 62,9 g/L erzielt wurde. Vermutlich konnte die Verlangsamung des Metabolismus durch die

Substratinhibierung nicht den gleichen positiven Effekt auf die PTS-Produktion ausüben wie eine Herabsetzung der Temperatur auf 20°C.

In diesem Abschnitt wurde auf Basis von Vorarbeiten [1, 52] in Schüttelkolben mit TB-Medium ein fed-batch-Prozess zur Hochzelldichtekultivierung des *E. coli* PTS Stammes entwickelt. Durch die Modifizierung des feed-Profiles konnte dabei ein PTS-Titer von 4 g/L erreicht werden. In der Literatur ist kein vergleichbarer Prozess zur rekombinanten Produktion von Sesquiterpensynthasen publiziert. Es wurde also nicht nur ein neues Verfahren entwickelt um genug PTS für die weiteren Untersuchungen in dieser Arbeit herzustellen, sondern gleichzeitig auch der Grundstein für die Entwicklung eines Prozesses zur technischen Produktion der PTS gelegt.

4.2 Aufreinigung der Patchoulolsynthese

Auf diesen Ergebnissen aufbauend sollte eine Aufreinigungsstrategie entwickelt werden, um die PTS aus der in Abschnitt 4.1 produzierten Biomasse in aktiver Form zu isolieren. Das Enzym sollte dabei so weit aufgereinigt werden, dass es hinsichtlich seiner Funktionalität und seiner kinetischen Eigenschaften umfassend charakterisiert werden konnte. Vor diesem Hintergrund wurden zwei Kategorien von Störstoffen identifiziert, die dazu abgereichert werden sollten: Phosphatasen, die mit der PTS um das Substrat Farnesylpyrophosphat (FPP) konkurrieren und niedermolekulare Zellbestandteile, die die auf Gaschromatographie (GC) basierende Sesquiterpenanalytik beeinträchtigen könnten.

Der Abreicherung von Phosphatasen kommt eine besondere Bedeutung zu und stellt gleichzeitig eine Herausforderung dar. Phosphatasen katalysieren die Hydrolyse von Phosphorsäureestern und/oder Di- und Triphosphaten. Manche dieser Enzyme sind dabei sehr unspezifisch, so dass sie in der Lage sind, eine Vielzahl unterschiedlicher Produkte zu dephosphorylieren. Zusätzlich weisen viele Phosphatasen eine sehr viel höhere Aktivität als Sesquiterpensynthasen auf, so dass sie auch in geringen Konzentrationen FPP schneller hydrolysieren können als es die PTS verbrauchen kann. Eine Recherche in der EcoCyc *E. coli* Database (SRI International, Menlo Park, USA) ergibt, dass im *E. coli* K-12 Stamm insgesamt 83 verschiedene Phosphatasen (EC 3.1.3.-, 3.1.4.-, 3.1.5.-) exprimiert werden. Welche dieser Phosphatasen tatsächlich in der Lage sind FPP zu dephosphorylieren, konnte dabei aber nicht ermittelt werden.

Zu den problematischen molekularen Zellbestandteilen zählen alle Substanzen, die mit unpolaren Lösemitteln aus der wässrigen Phase extrahierbar sind. Diese Stoffe stellen insofern ein Problem dar, weil für die Versuche zur Charakterisierung der PTS die unpolaren Reaktionsprodukte für die GC-Analyse mit organischen Lösemitteln extrahiert werden müssen. Würden die Störstoffe aus den Zellen nicht abgereichert werden, würden sie zusammen mit den Produkten der PTS extrahiert werden und im GC-FID (6. B1) oder GC-MS Artefakte verursachen.

Zur Aufreinigung der PTS sollte zunächst der Zellaufschluss mit Hilfe von Detergenzien optimiert werden. Für die Abreicherung von molekularen Störstoffen und kleinen Proteinen sollte eine cross-flow-Filtration etabliert werden, die gleichzeitig einem Pufferwechsel dienen sollte. Darüber hinaus sollten verschiedene Chromatographietechniken für die weitere Aufreinigung der PTS evaluiert werden. Da die rekombinante PTS über einen His-tag verfügt, sollte dabei vor allem die Durchführung einer Nickel-Affinitätschromatographie untersucht werden.

4.2.1 Untersuchung von Detergenzien für den Zellaufschluss

Detergenzien können beim Zellaufschluss dabei helfen auch unlösliches Protein in Form von inclusion bodies teilweise in Lösung zu bringen [56]. In diesem Versuch sollten die beiden Detergenzien Triton[®] X-100 und Tween[®]-20 in Verbindung mit dem in der Literatur verwendeten Aufschlusspuffer für Sesquiterpensynthasen untersucht werden. Bei beiden Detergenzien handelt es sich um nichtionische Tenside, die in der Biochemie und der pharmazeutischen Industrie verwendet werden [57]. In dem Versuch sollte untersucht werden, ob die PTS-Ausbeute durch den Einsatz der Detergenzien gesteigert werden kann und ob dabei die Enzymaktivität beeinträchtigt wird.

Dazu wurden je 100 mL des Aufschlusspuffers (50 mM MOPS, 150 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin, pH 7,4) mit 1% (m/v) Tween[®]-20 bzw. 0,5% (m/v) Triton[®] X-100 versetzt und gerührt, bis die Detergenzien vollständig gelöst waren. 3 Ansätze mit je 250 mg Biofeuchtmasse einer *E. coli* PTS Kultur wurden in 10 mL der drei verschiedenen Lysis-Puffern resuspendiert und mit einer Ultraschallsonde (Microfluidizer Processor M-11L, Microfluidics, Westwood, USA) aufgeschlossen (6. B9) und anschließend für 30 min bei 7,2 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels SDS-PAGE analysiert (6. B8). Das Gel ist in Abbildung 12 dargestellt.

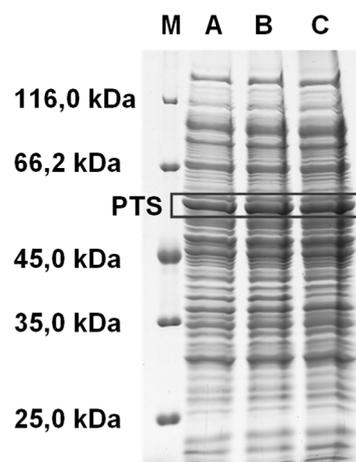


Abbildung 12: SDS-PAGE-Gel des Überstands nach dem Zellaufschluss mit Hilfe verschiedener Detergenzien (12 %iges Trenngel mit Coomassie-Färbung (M = Marker). Die Intensität der PTS-Bande ist bei dem Lysis-Puffer ohne Detergenz (A) genauso intensiv wie bei dem Puffer mit 1% (m/v) Tween[®]-20 (B) und 0,5% (m/v) Triton[®]-X100 (C).

Im Elektropherogramm ist zu erkennen, dass die Bande der PTS in allen drei Proben im Verhältnis zu den anderen Banden innerhalb der gleichen Probe gleich intensiv ist. Der Zusatz von Detergenzien zum Aufschlusspuffer konnte demnach die Ausbeute an löslicher PTS gegenüber dem Aufschlusspuffer ohne Detergenz nicht steigern.

Zusätzlich wurde die Aktivität der PTS in den unterschiedlichen Lysis-Puffern überprüft, indem 475 μL des Überstands mit 500 μL Umsetzungspuffer (50 mM MOPS, 10 mM MgCl_2 , pH 7,3) und 25 μL einer 1 g/L FPP-Lösung versetzt wurden. Die Reaktionslösung wurde mit 200 μL iso-Oktan überschichtet und für 15 min bei 30°C inkubiert. Die Lösung wurde für 30 s intensiv geschüttelt und danach kurz zentrifugiert. Die organische Phase wurde abgenommen und mittels GC-FID (6. B1) analysiert. Die Resultate sind in Abbildung 13 dargestellt.

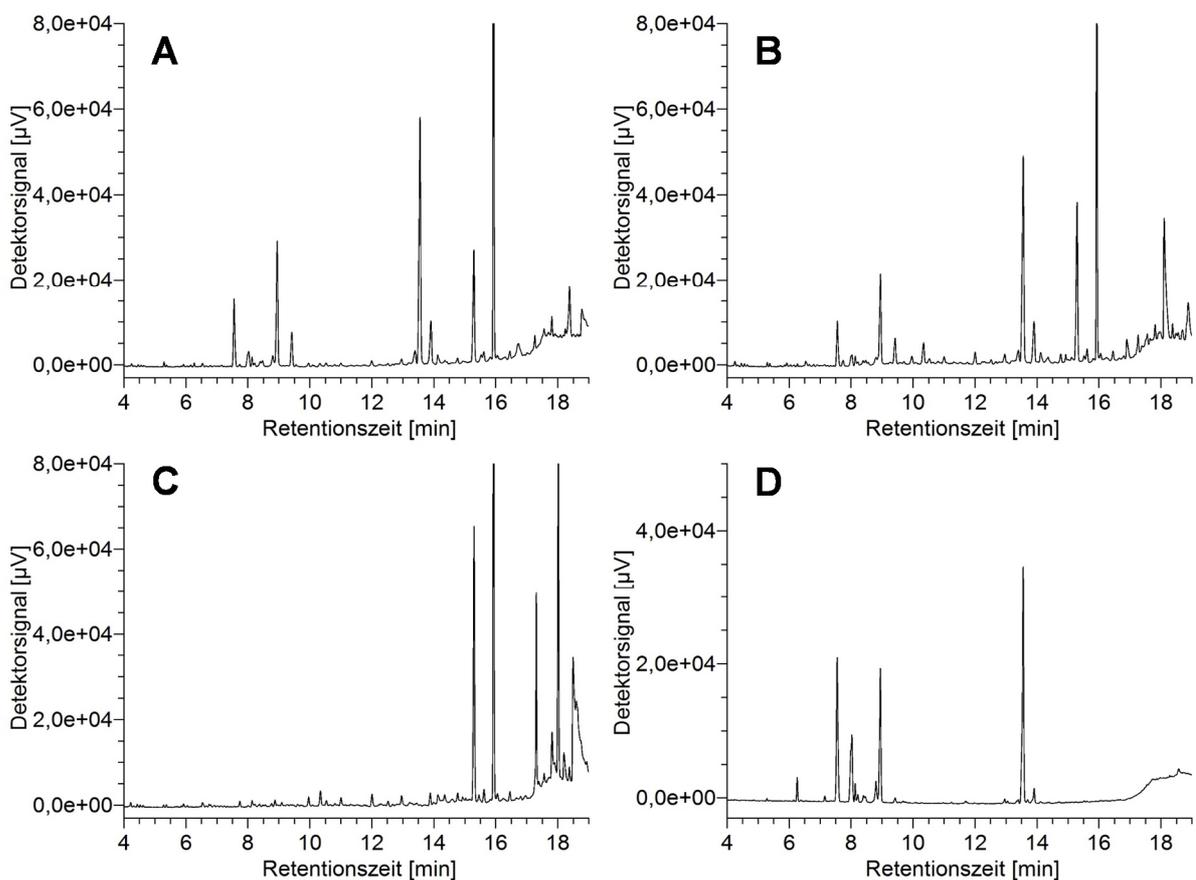


Abbildung 13: Resultate der Gaschromatographie der Aktivitätstests der Zellysats mit unterschiedlichen Aufschlusspuffern. A = kein Detergenz, B = 1% (m/v) Tween®-20, C = 0,5% (m/v) Triton® X-100, D = Patchouliöl Standard (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Die Abbildung zeigt, dass die Verwendung von Detergenzien beim Zellaufschluss unterschiedliche Auswirkungen auf die Aktivität der PTS hat. Während die PTS im Aufschlusspuffer ohne Detergenz und im Puffer mit Tween®-20 aktiv ist, hat die Verwendung von Triton® X-100 zur Inaktivierung des Enzyms geführt. Die Ursache dafür könnte sein, dass das Triton® X-100 die Tertiärstruktur der PTS zerstört hat und so die enzymatische Aktivität verloren geht.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Verwendung von Detergenzien die Ausbeute der PTS beim Zellaufschluss nicht verbessern konnte und im Fall von Triton® X-100 sogar zum Verlust der Aktivität führt.

4.2.2 TMP-Scouting zur Optimierung der cross-flow-Filtration

Durch den Einsatz einer 10 kDa MWCO Filterkassette soll eine cross-flow-Filtration durchgeführt werden, um niedermolekulare Bestandteile und kleine Proteine abzureichern und gleichzeitig den Lysis-Puffer auszutauschen. Bei der Etablierung einer cross-flow-Filtration im Rahmen einer Aufreinigungsstrategie besteht das Hauptproblem in der Ansammlung von Feinstpartikeln und Stoffen, die die Membran nicht passieren können wie z.B. größere Proteine. Die dadurch entstehende Gelschicht reduziert die Permeatflussrate, sodass die Filtration erheblich verlangsamt wird. Um die Bildung der Gelschicht zu reduzieren, kann entweder die Flussrate des cross-flows (CF) gesteigert oder der Transmembrandruck (TMP) erhöht werden. Eine Steigerung des TMP resultiert bei Wasser oder einem Puffer in einem proportionalen Anstieg der Permeatflussrate, da sich dort keine Gelschicht bilden kann. Bei der Filtration einer Protein-Lösung verhalten sich der TMP und die Permeatflussrate hingegen nicht proportional, sodass bei hohen TMPs die Permeatflussrate nicht weiter ansteigt. Daher müssen die optimalen Parameter für die cross-flow-Filtration in einem TMP-Scouting ermittelt werden.

Dabei sollten zwei Modelle untersucht werden: Modell 1 sollte den Zustand des Lysats zu Beginn der cross-flow-Filtration simulieren und Modell 2 den Zustand des 10fach konzentrierten Lysats vor dem ersten Umpufferungsschritt. Dadurch sollte ermittelt werden, ob der TMP während der Diafiltration angepasst werden muss. Das Vorbild der Modelle ist dabei das Lysat der Biomasse von *E. coli* PTS aus Kapitel 4.1.3 mit einer Konzentration der löslichen PTS von 4 g/L. Für die Herstellung des Modell-Lysats wurde Biomasse eines *E. coli* BL21 Stamms ohne PTS-Gen verwendet. 200 g der eingefrorenen Biomasse wurden in 2 L Aufschlusspuffer (50 mM MOPS, 150 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin, pH 7,3) resuspendiert und mit einer french-press in 6 Durchläufen bei 9.000 psi aufgeschlossen (6. B10). Das Zelllysate wurde für 60 min bei 4,7 xg bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und auf zwei 1 L Aliquote aufgeteilt.

Für die Herstellung von Modell 1 wurde das Lysat mit 4 g/L Rinderserumalbumin (BSA) und für Modell 2 mit 40 g/L BSA versetzt. BSA wurde verwendet, da weder die PTS noch irgendeine andere Terpensynthase kommerziell erhältlich ist und BSA mit einer Größe von 66,4 kDa und einem pI von 4,7 der PTS (64,4 kDa, pI 5,3) ähnelt.

Um sicherzustellen, dass die verwendete Membran unbeschädigt und nicht verblockt war, wurde zunächst das Verhalten von Wasser und dem Aufschlusspuffers untersucht. Dazu wurden bei einem

CF von 1 L/min mehrere TMPs durch die Erhöhung des Retentatdruckes eingestellt und die resultierende Permeat-Flussrate mittels eines 250 mL Messzylinders und einer Stoppuhr bestimmt.

Bei den Messungen für das TMP-Scouting mit den Modell-Lösungen wurde das Retentat im Kreislauf zurück in das gerührte Vorlage-Reservoir geleitet. Zur Bestimmung der Permeat-Flussrate wurde das Permeat für 30 s in einem 250 mL Messzylinder gesammelt, das Volumen abgelesen und die Lösung danach wieder in das Reservoir zurückgegeben. Die Abhängigkeit der Permeat-Flussrate vom TMP wurde für beide Modell-Lösungen bei zwei verschiedenen CF durchgeführt. Die Ergebnisse des TMP-Scouting sind zusammen mit den abgeleiteten optimalen Arbeitsbereichen in Abbildung 14 dargestellt.

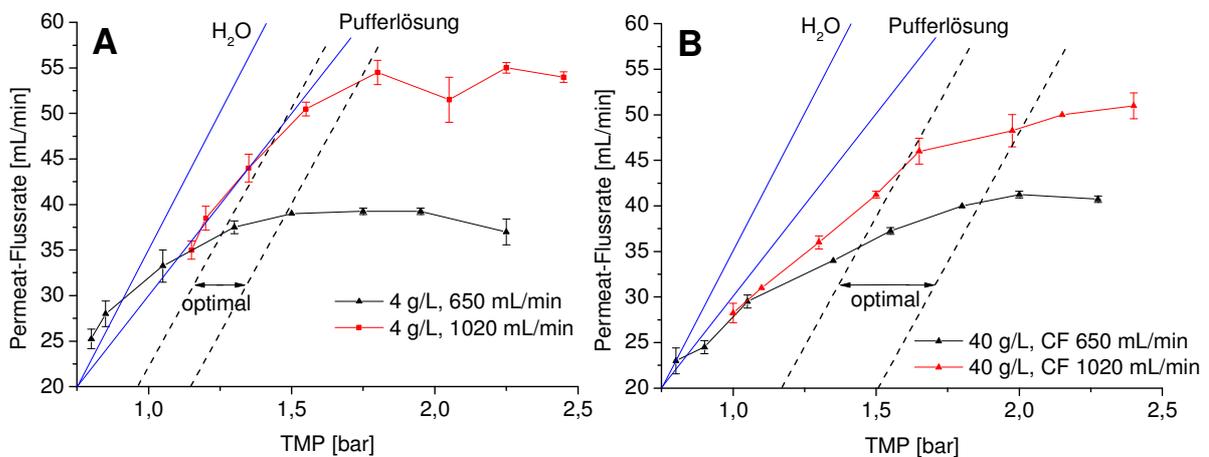


Abbildung 14: Resultate des TMP-Scouting mit dem Lysat eines *E. coli* BL21 Stamms mit 4 g/L BSA (A) und 40 g/L BSA (B).

Die Abbildung zeigt deutlich den Einfluss der Gelbildung auf die Permeat-Flussrate. In Diagramm A weisen die Kurve der Modell-Lösung 1 mit einer BSA-Konzentration von 4 g/L die gleiche Anfangssteigung auf wie die Gerade, die das Verhalten des Aufschlusspuffers beschreibt. Bei der geringeren CF weicht die Kurve der Modell-Lösung 1 früher von der Geraden ab als bei der höheren CF. Dieses Verhalten ist darauf zurückzuführen, dass der höhere CF dem weiteren Anwachsen der Gelschicht auf der Membranoberfläche entgegen wirkt.

Beim TMP-Scouting mit Modell-Lösung 2 mit 40 g/L BSA (Diagramm B) ist eine stärkere Gelbildung als in Diagramm A zu beobachten. Die Kurven weisen schon bei geringen TMPs eine kleinere Anfangssteigung als die Gerade des Aufschlusspuffers auf. Der Grund dafür ist die signifikant höhere Protein-Konzentration, die zu einer höheren Viskosität der Lösung führt. Der Einfluss der Viskosität wird in den beiden Geraden deutlich, die das Verhalten von Wasser und dem Aufschlusspuffer beschreiben. Die Gerade des Puffers hat eine geringere Steigung als die Wasser-Gerade, da der Puffer 10% (v/v) Glycerin enthält, was die Viskosität der Lösung erhöht.

Auf Basis der im TMP-Scouting gewonnenen Erkenntnisse kann für jede der beiden Modell-Lösungen ein optimaler Arbeitsbereich ermittelt werden, in dem die cross-flow-Filtration durchgeführt werden sollte. Der Arbeitsbereich sollte so hoch wie möglich, aber kurz vor dem Bereich der Gelbildung liegen, in dem der Einfluss des TMP auf die Flussrate entkoppelt wird. Auf diese Weise kann eine Beeinträchtigung der Filterleistung vermieden und die cross-flow-Filtration zügig durchgeführt werden. Für die Modell-Lösung 1 sollte die Filtration demnach mit einem CF von 1,02 L/min bei einem TMP von 1,4 - 1,75 bar durchgeführt werden; bei der Modell-Lösung 2 liegt dieser Bereich bei 1,6 - 2,0 bar. Durch den Vergleich der beiden Arbeitsbereiche kann nun festgestellt werden, ob im Verlauf der Diafiltration der TMP angepasst werden muss.

In diesem Versuch wurde eine cross-flow-Filtration mit einer Filterkassette mit einem cutoff von 10 kDa für die Aufreinigung der PTS optimiert. Auf Grundlage dieser Ergebnisse kann nach dem Zellaufschluss und einer Zentrifugation die PTS von molekularen Bestandteilen und kleinen Proteine getrennt werden. Gleichzeitig kann die PTS dabei in einen anderen Puffer überführt werden, um z.B. die richtigen Startbedingungen für eine chromatographische Aufreinigung herzustellen.

4.2.3 Untersuchungen zur Aufreinigung der PTS mittels Ionenaustauschchromatographie

In diesem Versuch sollte ermittelt werden, ob die PTS über eine Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt werden kann. Im Hinblick auf eine technische Verwendung der PTS als *in vitro* Biokatalysator wäre die Ionenaustauschchromatographie als kostengünstiges und gut skalierbares Verfahren ideal, um die PTS im größeren Maßstab aufzureinigen.

Da die PTS einen pI von pH 5,3 aufweist, sollte daher versucht werden, sie an einen starken Anionenaustauscher zu binden und sie anschließend mit Hilfe eines NaCl-Gradienten selektiv zu eluieren. Dabei ist der pH-Wert der Lösung von großer Bedeutung um eine Bindung der PTS an Anionenaustauscher sicherzustellen.

Für den Versuch wurden 250 mg Feuchtbioasse in 5 mL einem Lysis-Puffers (20 mM MES, pH 6,5) mittels Ultraschall aufgeschlossen (6. B9). Dieser Puffer wurde eingesetzt, da er auch zur Beladung des Ionenaustauschers verwendet werden sollte. pH 6,5 wurde gewählt, um eine Bindung der PTS an den Anionenaustauscher sicherzustellen. Nach dem Zellaufschluss wurde die unlösliche Proteinfraction abgetrennt, indem für 1 h bei 8,0 $\times g$ und 4°C zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde als Ausgangsmaterial für die Chromatographie verwendet.

Für die Aufreinigung wurde ein starker Anionenaustauscher in Form eines Membranadsorbers (Sartobind Q75, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland) an einer Biologic Duo-Flow FPLC-Anlage (Bio Rad, Berkeley, USA) verwendet. Die Detektion von Proteinen erfolgte durch die Absorption bei 280 nm und wurde mit einem Dioden-Array-Detektor gemessen. Bei der

Chromatographie wurden 2 Puffer verwendet: Puffer A war der Aufschlusspuffer (6. A7), und Puffer B war der Aufschlusspuffer mit 1 M NaCl.

Die Beladung wurde durchgeführt, indem das Lysat mit einer Flussrate von 2,5 mL/min über den Membranadsorber gepumpt wurde. Danach wurde mit 25 mL Puffer A nicht bindendes Protein von der Säule gespült. Die Elution erfolgte mit einem NaCl-Gradienten. Dazu wurde bei einer Flussrate von 2,5 mL/min der Anteil von Puffer B kontinuierlich über einen Zeitraum von 20 min auf 100% erhöht. Das Eluat wurde in 5 mL Fraktionen aufgefangen. Das Chromatogramm der Elution ist in Abbildung 15 dargestellt.

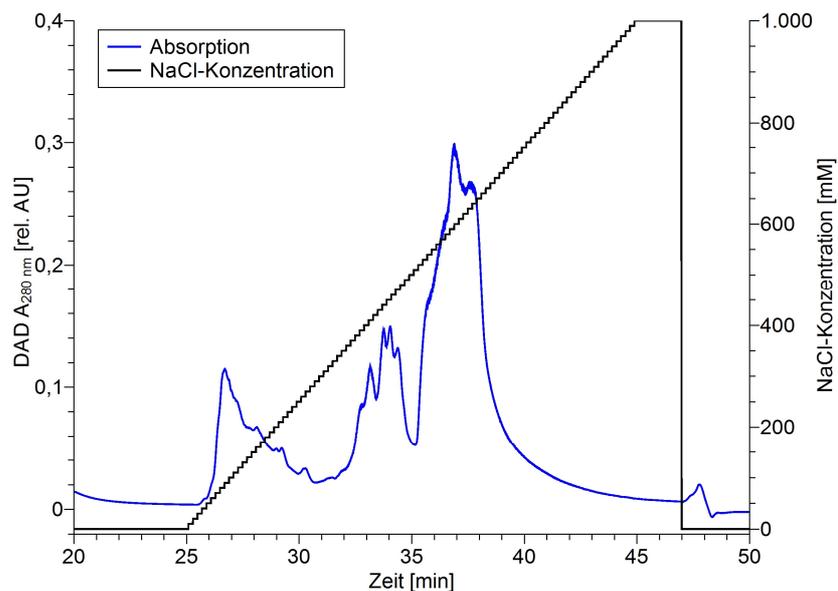


Abbildung 15: Chromatogramm der Elution der Aufreinigung der PTS mit Hilfe eines starken Anionenaustauschers.

Das Chromatogramm zeigt zahlreiche Peaks, was darauf hinweist, dass viele verschiedene Proteine vom Membranadsorber eluiert wurden. Obwohl bei dieser Elution keine Basislinientrennung erreicht wurde, können die Proteine in drei große Gruppen im Chromatogramm unterteilt werden. Um zu ermitteln an welcher Stelle die PTS eluiert, wurden die gesammelten 5 mL Fraktionen mittels SDS-PAGE (6. B8) analysiert. Die Resultate sind in Abbildung 16 dargestellt.

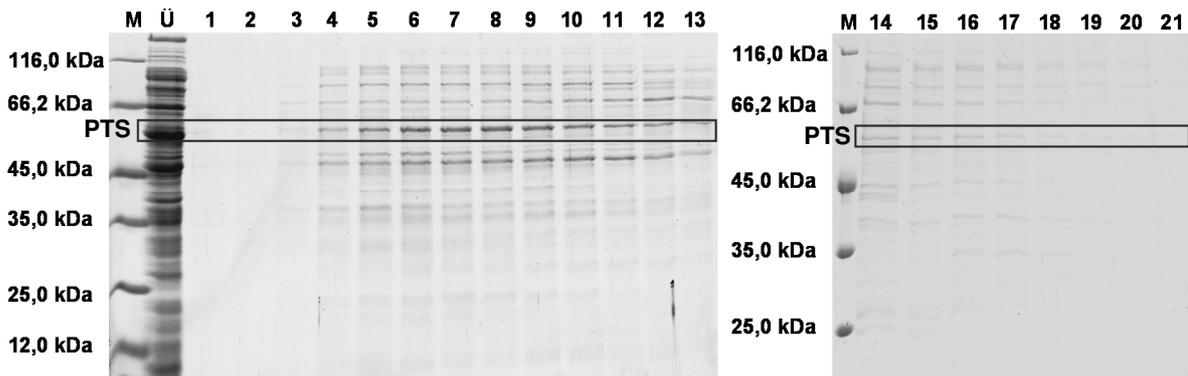


Abbildung 16: SDS-PAGE-Gele der Elutionsfraktionen der Aufreinigung der PTS mit einem Anionenaustauscher (12 %ige Trenngele mit Coomassie-Färbung, M = Marker, Ü = Überstand, Elutionsfraktionen 1-21).

Aus den Resultaten der SDS-PAGE geht hervor, dass die PTS erfolgreich an den Anionenaustauscher gebunden und anschließend wieder eluiert werden kann. Anhand der Flussrate von 5 mL/min kann berechnet werden, zu welchem Zeitpunkt die PTS eluiert wurde. Dabei zeigt sich, dass die Elution zusammen mit vielen anderen Proteinen in einem breiten Bereich von 29-41 min erfolgt. Am intensivsten ist die PTS-Bande jedoch in den Fraktionen 5-11, was einer Elutionszeit von 30-36 min entspricht.

Der Versuch hat belegt, dass eine Ionenaustauschchromatographie mit der PTS prinzipiell durchgeführt werden konnte. Aus den Ergebnissen geht jedoch hervor, dass der Aufreinigungseffekt dabei gering war. Die Herausforderung besteht darin, dass ca. 80% der HCPs von *E.coli* einen ähnlichen pI wie die PTS aufweisen ($\text{pH } 5,3 \pm 0,5$) [58] und sich somit nur schwierig mittels Ionenaustauschchromatographie von der PTS trennen lassen.

4.2.4. Untersuchungen zur Aufreinigung der PTS mittels Nickel-Affinitätschromatographie

Da die in dieser Arbeit verwendete PTS über einen His₆-tag am N-Terminus verfügt, kann sie mit Hilfe einer Metall-Chelat-Chromatographie (IMAC) aufgereinigt werden. Dabei kommt eine stationäre Phase aus quervernetzter Agarose zum Einsatz, die mit Iminodiessigsäure oder Nitrilotriessigsäure funktionalisiert ist. Ni²⁺-Ionen koordinieren an die Carboxy-Gruppen und werden dadurch an die stationäre Phase gebunden. Beim Beladen der Säule mit dem Zielprotein, das einen His-tag trägt, bildet sich ein Nickel-Chelat-Komplex aus und bindet das Protein auf diese Weise an die Säule. Zum Eluieren wird Imidazol verwendet, das das Protein aus dem Chelat-Komplex wieder verdrängt. Mit diesem Verfahren können Proteine sehr selektiv gebunden werden. Dennoch können auch manche *E. coli* host cell Proteine (HCP), die über Histidin-reiche Regionen verfügen, an die mit Ni²⁺-Ionen beladene IMAC-Säule binden. Daher muss das Elutionsprotokoll für die PTS optimiert werden, um eine selektive Aufreinigung zu gewährleisten.

4.2.4.1 Untersuchung des Elutionsverhaltens der PTS bei einem Imidazol-Gradienten

In diesem Versuch sollte die Elution der PTS von einer mit Ni^{2+} -Ionen beladenen IMAC-Säule untersucht werden. Dabei sollte ermittelt werden, ob HCPs aus dem *E. coli* PTS Zelllysats unselektiv an die Säule binden und welche Imidazol-Konzentration notwendig ist, um die PTS quantitativ zu eluieren.

Dazu wurde eine mit Ni^{2+} -Ionen beladene Säule (HiTrap IMAC FF, GE Healthcare, Fairfield, USA) mit einem Säulenvolumen von 5 mL an einer Biologic Duo-Flow FPLC-Anlage mit zwei Pumpen (Bio Rad, Berkeley, USA) verwendet. Für die Detektion von Proteinen wurde die Absorption bei 280 nm mit einem Dioden-Array-Detektor gemessen. 5,1 g Feuchtbioasse wurden in 50 mL Lysis-Puffer (6. A7) mit 10 mM Imidazol mittels Ultraschall aufgeschlossen (6. B9) und für 1 h bei 8,0 xg und 4°C zentrifugiert.

Bei der Chromatographie kamen zwei Puffer (A und B) zum Einsatz, die auf dem den Lysis-Puffer (6. A7) basierten, wobei Puffer A zusätzlich mit 10 mM Imidazol und Puffer B mit 500 mM Imidazol versetzt war. Für die Aufreinigung wurde die Säule mit dem Überstand aus der Zentrifugation mit einer Flussrate von 2,5 mL/min beladen und anschließend mit 30 mL Puffer A gewaschen. Die Imidazol-Elution mit Puffer B wurde in Form eines Gradienten durchgeführt bei dem die Imidazol-Konzentration innerhalb von 60 min von 10 auf 500 mM erhöht wurde. Beginnend mit dem ersten Peak wurden 6 Fraktionen gesammelt. Das Chromatogramm ist in Abbildung 17 dargestellt.

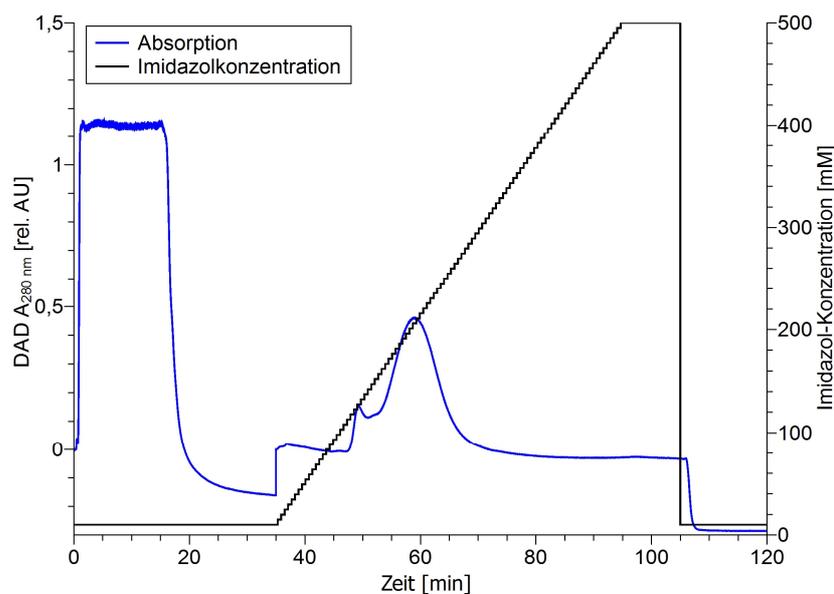


Abbildung 17: FPLC-Chromatogramm der Beladung und Elution der PTS mit Hilfe eines Imidazol-Gradienten.

Das Chromatogramm zeigt die Beladung der Säule und die anschließende Elution mittels eines Imidazol-Gradienten. Dabei sind zwei Peaks bei 48 und 57 min zu erkennen, was darauf hindeutet, dass neben der PTS auch HCPs an die Säule gebunden wurden. Um zu untersuchen, welcher Peak der PTS zuzuordnen ist, wurden die während der Elution gesammelten Fraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt (6. B8). Die Resultate sind in Abbildung 18 dargestellt.

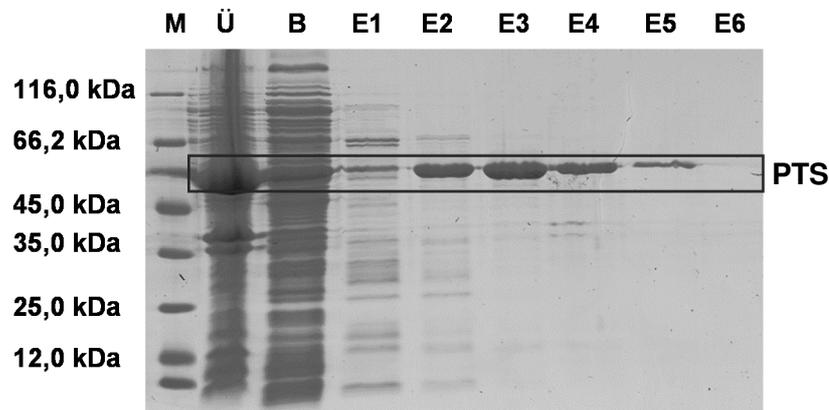


Abbildung 18: SDS-PAGE der Aufreinigung der PTS mit einem Imidazol-Gradienten (12 %iges Trenngel mit Coomassie-Färbung, M = Marker, Ü = Überstand, B = Beladung, E1-E6 = Elutionsfraktionen 1-6).

Das angefärbte Gel zeigt, dass die PTS beim Beladen erfolgreich an die Säule gebunden und anschließend wieder eluiert werden konnte. Die erste Elutionsfraktion enthält nur wenig PTS, aber relativ viele andere Proteine, die unselektiv an die Säule gebunden haben. In E2-E4 ist eine deutliche PTS-Bande zu erkennen, wobei die Intensitäten der Banden der HCPs abnehmen. Während in E5 noch eine schwache PTS-Bande erkennbar ist, enthält E6 keine PTS mehr.

Somit konnte gezeigt werden, dass die PTS erfolgreich an eine mit Ni^{2+} -Ionen beladenen Säule gebunden und anschließend mit Imidazol wieder eluiert werden kann. Bei der Elution mit einem linearen Gradienten zeigte sich das neben der PTS andere Proteine unselektiv an die Säule binden. Die Elution der Verunreinigungen erfolgt dabei schon bei etwas geringeren Imidazol-Konzentrationen als die PTS.

4.2.4.2 Entwicklung eines Stufenprogramms für die selektive Elution der Patchouloisynthese in der Nickel-Affinitätschromatographie

Zuvor wurde gezeigt, dass ein Teil der unselektiv an die IMAC-Säule gebundenen Proteine bei geringeren Imidazol-Konzentrationen eluiert wird als die PTS. Auf Basis dessen sollte ein Stufenprogramm entwickelt werden, bei dem die Verunreinigungen gezielt abgereichert werden. Die dazu notwendige Imidazol-Konzentration sollte ermittelt werden, indem bei der Elution der Anteil des Imidazol-haltigen Elutionspuffers schrittweise auf 100 mM erhöht wurde.

Bei der Chromatographie kamen zwei Puffer (A und B) zum Einsatz, die auf dem den Lysis-Puffer (6. A7) basierten, wobei Puffer A mit 10 mM und Puffer B mit 500 mM Imidazol versetzt war. Für den Versuch wurden 6,1 g Biofeuchtmasse in 45 mL Puffer A resuspendiert und mittels Ultraschall (6. B9) aufgeschlossen. Die unlösliche Proteinfraction wurde durch eine Zentrifugation für 1 h bei 8,0 \times g und 4°C abgetrennt. Der Überstand wurde mit einer FPLC-Anlage, wie in Kapitel 4.2.4.1 beschrieben, mit einer Flussrate von 2,5 mL/min auf die IMAC-Säule aufgebracht. Um nichtbindendes Protein von der Säule zu entfernen, wurde mit 50 mL Puffer A gespült.

Die Elution wurde mit einer Mischung aus 95% Puffer A und 5% Puffer B begonnen, woraus sich eine Imidazol-Konzentration 35 mM ergibt. Danach wurde der Anteil von Puffer B in mehreren Stufen auf bis zu 20% erhöht. Das Eluat wurde dabei in 10 Fraktionen á 25 mL aufgefangen. Das Chromatogramm ist in Abbildung 19 dargestellt.

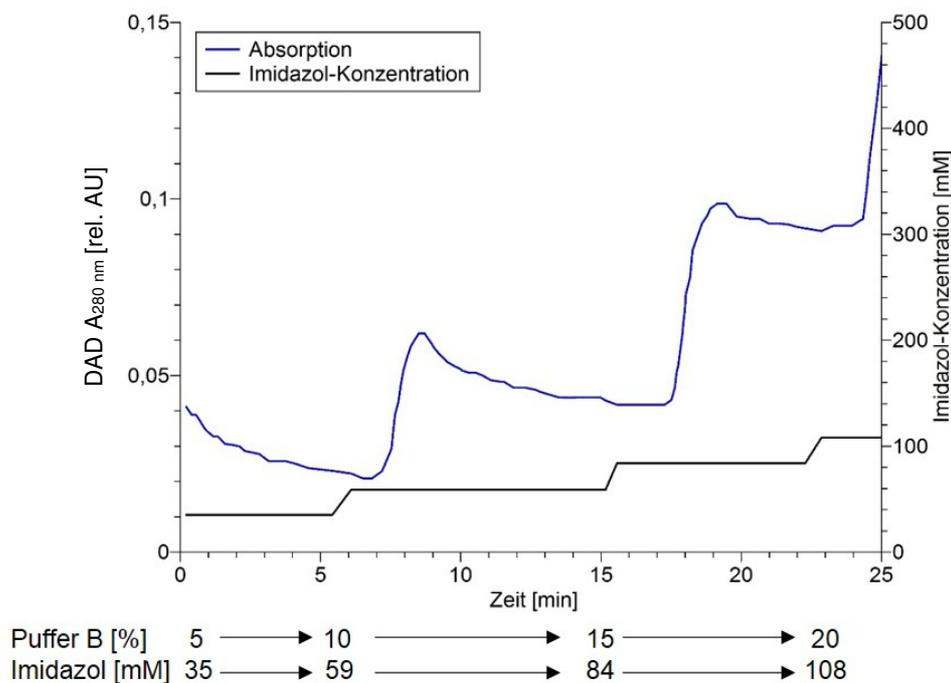


Abbildung 19: Chromatogramm der stufenweisen Elution der PTS. Die Imidazol-Konzentration wurde dabei die Zumischung von Puffer B gesteuert.

Abbildung 19 zeigt das Chromatogramm der stufenweisen Elution mit Imidazol. Es ist zu erkennen, dass schon bei einer Imidazol-Konzentration von 35 mM Protein von Säule eluiert wird. Nach der Steigerung der Imidazol-Konzentration auf 59 mM ist ein Peak bei 8,5 min zu erkennen, wobei die Absorption danach nicht wieder auf das ursprüngliche Niveau zurückfällt, sondern sich bei 0,04 rel. AU stabilisiert. Dieses Verhalten ist auf die Eigenabsorption von Imidazol zurückzuführen. Die Stufe auf 84 mM Imidazol resultiert schließlich in einem überproportionalen hohen Anstieg der Absorption, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass bei dieser Imidazol-Konzentration die PTS eluiert wird.

Um zu untersuchen, ob die unselektiv bindenden Proteine durch die schrittweise Elution tatsächlich von der PTS getrennt werden konnten, wurden die gesammelten Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert (6. B8). Das Gel ist in Abbildung 20 abgebildet.

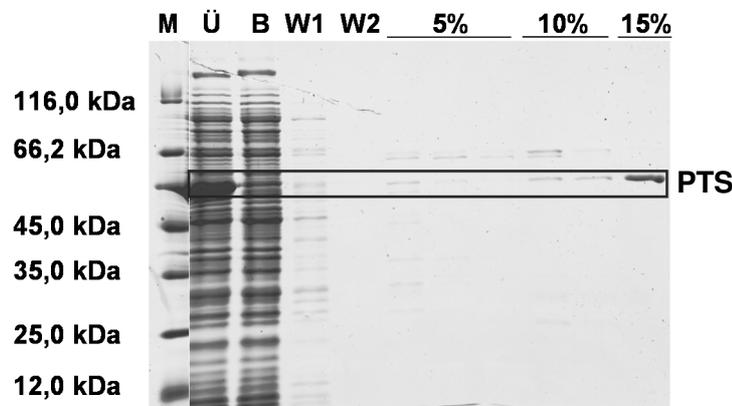


Abbildung 20: SDS-PAGE der stufenweisen Elution von einer IMAC-Säule (12%iges Trenngel mit Coomassie-Färbung, M = Marker, Ü = Überstand, B = Beladung, W1, W2 = Waschfraktionen, 5-15% = Anteil Puffer B in den Elutionsfraktionen).

Das Gel der SDS-PAGE zeigt, dass die PTS erfolgreich aus dem Überstand des Zellaufschlusses an die IMAC-Säule gebunden werden kann. Bei den Proben aus den Elutionsfraktionen ist zu erkennen, dass schon bei einem geringen Anteil von Puffer B unselektiv gebundenes Protein von der IMAC-Säule eluiert wird. Dabei handelt es sich hauptsächlich um HCPs, die unselektiv an die Säule gebunden haben. In der ersten und zweiten Spur der 5%-Elution ist zwar bei der Größe der PTS eine schwache Bande zu erkennen, allerdings könnte es sich dabei auch um ein HCP der gleichen Größe handeln. Bei der Steigerung des Anteils von Puffer B ist zu beobachten, dass weitere Verunreinigungen eluiert werden. Die PTS Bande ist den beiden 10%-Spuren schwach erkennbar. In der Spur der nächsten Imidazolstufe (15% B) ist außer der intensiven PTS-Bande kein anderes Protein mehr zu erkennen.

In diesem Versuch wurde untersucht, ob es möglich ist mit einem stufenweisen Imidazol-Elution die unselektiv an der IMAC-Säule gebundenen HCPs von der PTS zu trennen. Die Resultate zeigen, dass alle Verunreinigungen bei einer Imidazol-Konzentration von 59 mM abgetrennt werden können, ohne dass die PTS dabei in signifikanten Mengen verloren wird.

4.2.4.3 Aufreinigung der Patchoulolsynthase mittels Nickel-Affinitätschromatographie unter Anwendung eines Stufenprogramms

In Kapitel 4.2.4.3 konnte gezeigt werden, dass die bei der IMAC unselektiv gebundenen HCPs mit bei einer Imidazol-Konzentration von 59 mM im Elutionspuffer eluiert werden können. Die PTS bleibt dabei an der Säule gebunden und eluiert erst bei höheren Imidazol-Konzentrationen. Auf Basis

dieser Ergebnisse sollte in diesem Versuch ein 2-stufiges Elutionsprogramm verwendet werden, um die PTS in hoher Reinheit aus dem Zelllysat zu isolieren. In der ersten Stufe sollte die Imidazol-Konzentration auf 59 mM erhöht werden, um die Verunreinigungen zu eluieren. Die zweite Stufe mit einer Imidazol-Konzentration von 500 mM sollte der Isolierung der PTS dienen. Im Anschluss an die chromatographische Aufreinigung sollte mit Hilfe einer densitometrischen Analyse die Reinheit der PTS bestimmt werden. Zusätzlich war ein Aktivitätstest geplant, um sicherzustellen, dass das Enzym nach der Aufreinigung intakt ist. Weiterhin sollte dabei untersucht werden, ob das Ziel, störende Phosphatasen abzureichern, erreicht wurde.

Für die Durchführung der chromatographischen Aufreinigung wurden zwei Puffer (A und B) verwendet. Beide Puffer basierten auf dem Lysis-Puffer (6. A7), wobei Puffer A zusätzlich mit 10 mM und Puffer B mit 500 mM Imidazol versetzt war. 5,5 g Biofeuchtmasse wurden in 50 mL Puffer A resuspendiert und mit einer Ultraschallsonde (6. B9) aufgeschlossen. Die unlösliche Proteinfraction wurde abgetrennt, indem für 1 h bei 8,0 \times g und 4°C zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde, wie in Kapitel 4.2.4.1, beschrieben, mit einer FPLC-Anlage mit einer Flussrate von 2,5 mL/min auf die IMAC-Säule aufgebracht. Anschließend wurde mit 50 mL Puffer A gespült, um nichtbindendes Protein von der Säule zu entfernen.

Zur Elution der unselektiv gebundenen HCPs wurde die Imidazol-Konzentration auf 59 mM erhöht, indem eine Mischung aus 90% Puffer A und 10% Puffer B an der FPLC eingestellt wurde. Mit dieser Konzentration wurde für 15 min mit einer Flussrate von 2,5 mL/min eluiert. In einer Stufe wurde danach für 35 min mit 100% Puffer B eluiert. Das Chromatogramm ist in Abbildung 21 abgebildet.

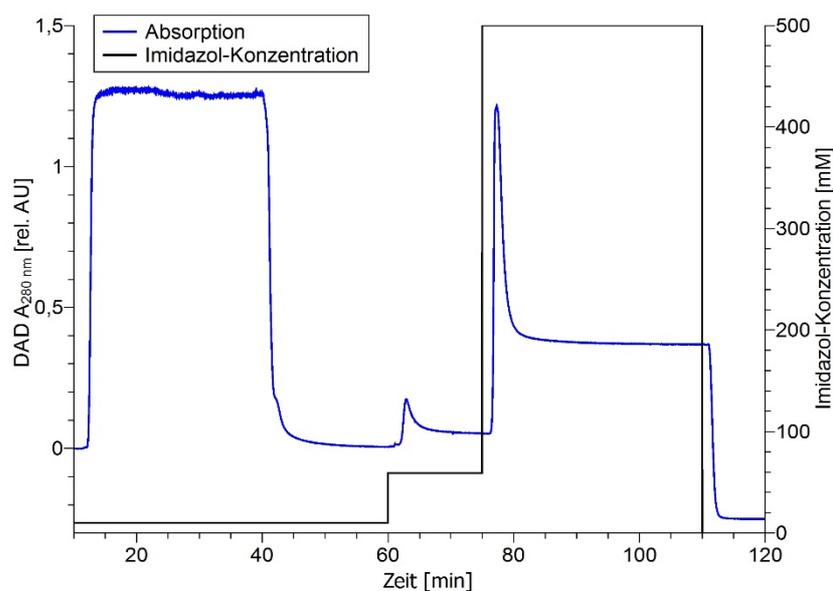


Abbildung 21: Chromatogramm der IMAC-Aufreinigung der PTS mit Hilfe des optimierten Stufenprogramms.

Die Abbildung zeigt das Chromatogramm des optimierten Stufenprogramms. Es ist zu erkennen, dass nach der 10%-Stufe bereits eine geringe Menge Protein eluiert wird. Der Großteil des auf der IMAC-Säule gebundenen Proteins wird allerdings erst mit der 100%-Stufe eluiert, bei der die Imidazol-Konzentration auf 500 mM ansteigt.

Um festzustellen, welche Proteine bei den beiden Stufen eluieren, wurde das Eluat in 10 Fraktionen á 5 mL gesammelt und mittels SDS-PAGE analysiert. Das Gel ist in Abbildung 22 dargestellt.

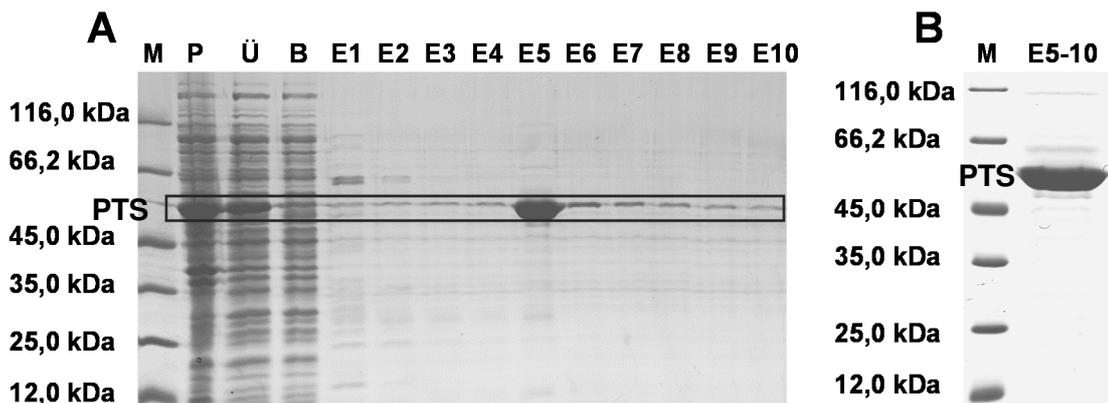


Abbildung 22: SDS-PAGE der IMAC-Aufreinigung der PTS mit dem optimierten Stufenprogramm (A) und der vereinigten PTS enthaltenden Fraktionen nach dem Umpuffern (B) für die Reinheitsbestimmung (12%iges Trenngel mit Coomassie-Färbung, M = Marker, P = Pellet, Ü = Überstand, B = Beladung, E1-E10 = Elutionsfraktionen).

Gel A zeigt die Resultate der SDS-PAGE von den Proben der chromatographischen Aufreinigung. Es ist zu erkennen, dass zu Beginn der 10%-Stufe vor allem HCPs eluiert werden, da die PTS-Bande nur schwach ausgeprägt ist. Allerdings bleibt die PTS-Bande auch in den folgenden Fraktionen sichtbar, während die Intensität der HCP-Banden abnimmt. In der Fraktion E5, in der das erste Eluat der 100%-Stufe aufgefangen wurde, ist eine sehr intensive PTS-Bande erkennbar, die in den folgenden Elutionsfraktionen sukzessive an Intensität verliert.

Auf Basis von Gel A wurden die Fraktionen E5-E10 vereinigt, umgepuffert und eingengt. Der Pufferwechsel war notwendig, da Imidazol auf Grund seiner hohen Basizität die Aktivität von Enzymen beeinträchtigen kann. Für das Umpuffern wurden zwei 20 mL Diafiltrationseinheiten (Vivaspin, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland) mit einem cutoff von 10 kDa verwendet. Zum Umpuffern, wurde der Lagerungspuffer (6. A9) verwendet. Zur densitometrischen Bestimmung der Reinheit wurde eine Probe des aufgereinigten Enzyms 1:10 verdünnt und eine SDS-PAGE durchgeführt (6. B8, B13).

Gel B in Abbildung 22 zeigt das Resultat der Aufreinigung der PTS. Neben der gut sichtbaren Bande der PTS sind noch wenige anderen Banden zu erkennen, die jedoch nur eine schwache Intensität aufweisen.

Die Konzentration der PTS-Lösung wurde photometrisch mit einem NanoDrop Spektrophotometer (ND-1.000, PEQLAB Biotechnologies GmbH, Erlangen) bestimmt. Dafür wurde mit Hilfe der Software CloneManager (Scientific & Educational Software, Morrisville, USA) der molare Extinktionskoeffizient auf Basis der Aminosäuresequenz auf 90.190 M/cm berechnet. In Kombination mit der Molekulargewicht der PTS von 64,4 kDa ergab sich damit eine Konzentration von $11,0 \pm 1,2$ mg/mL. Zusätzlich wurde die Konzentration über ein Bradford-Assay (6. B11) mit einer BSA-Kalibrationsreihe auf $10,4 \pm 1,3$ mg/mL bestimmt.

Zur densitometrischen Bestimmung der Reinheit der PTS wurde die digitale Farbdichte der PTS-Bande ins Verhältnis der Summe aller in der Spur vorhandenen Banden mittels der Software AlphaEaseFC (Genetic Technologies, Florida, USA) ins Verhältnis gesetzt (6. 13). Die mit drei Proben durchgeführte densitometrische Auswertung ergab dabei eine Reinheit der PTS von 94%.

Um die Aktivität der aufgereinigten PTS zu überprüfen, wurde ein Aktivitätstest mit 2 μ L der PTS-Lösung und 50 μ M *E,E*-FPP versetzt, mit 200 μ L iso-Oktan überschichtet und für 18 h bei 30°C inkubiert. Die Mischung wurde kräftig geschüttelt, kurz zentrifugiert und die organische Phase mittels Gaschromatographie (GC, 6. B1) analysiert. Das Chromatogramm ist in Abbildung 23 dargestellt.

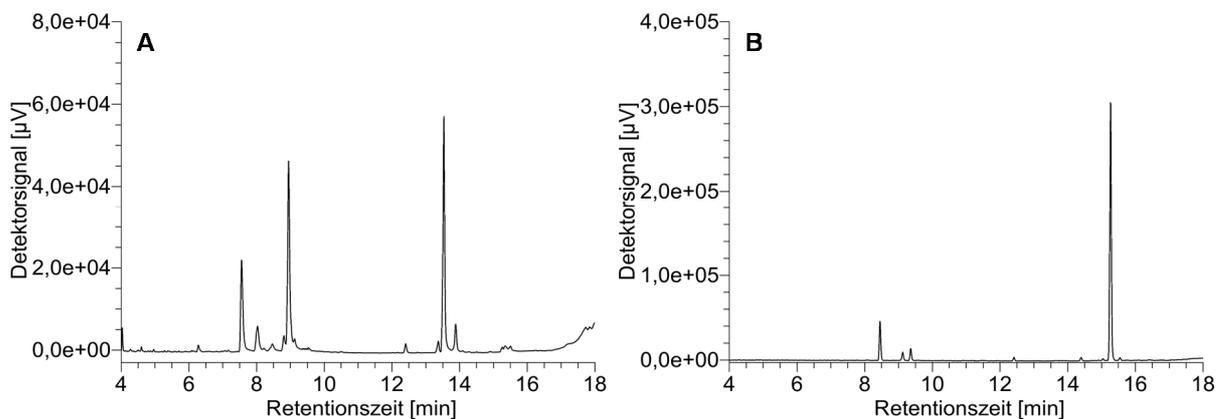


Abbildung 23: Gaschromatogramm des Aktivitätstests der aufgereinigten PTS (A) im Vergleich zu *E,E*-Farnesol (B, 50 μ g/mL).

In Chromatogramm A sind die charakteristischen Peaks des Patchouliöls zu erkennen, so dass daraus geschlossen werden kann, dass die PTS nach der Aufreinigung aktiv ist. Chromatogramm B zeigt die GC-Analyse eines *E,E*-Farnesol Standards mit einem Peak bei 15,3 min. Beim Vergleich der beiden Chromatogramme wird deutlich, dass der Peak des *E,E*-Farnesols nicht im Chromatogramm des PTS-Umsetzungsversuches vorhanden ist. Das Fehlen dieses Peaks belegt, dass alle Phosphatasen, die in Lage sind *E,E*-FPP zu dephosphorylieren, bei der Aufreinigung entfernt wurden.

Die rekombinante PTS wurde erfolgreich mittels IMAC aufgereinigt, indem ein Stufenprogramm zur gezielten Abreicherung unselektiv gebundener HCPs zur Anwendung kam. Die isolierte PTS wurde dabei in hoher Reinheit erhalten und war frei von Phosphatasen.

4.2.4.4 Zusammenfassung und Diskussion der Aufreinigung der PTS mittels Nickel-Affinitätschromatographie

In diesem Kapitel wurde die Aufreinigung der rekombinanten PTS mit einer Nickel-Affinitätschromatographie untersucht. Dazu wurden Versuche zum Elutionsverhalten der PTS durchgeführt und auf Basis der dabei gewonnenen Erkenntnisse ein Stufenprogramm zur Isolation der PTS entwickelt: In einer ersten Stufe wird die Imidazol-Konzentration auf 59 mM angehoben, was zur Elution unselektiv gebundener HCPs führt. Danach wird die Imidazol-Konzentration in einer zweiten Stufe auf 500 mM gesteigert, um die PTS vollständig zu eluieren. Das dabei gewonnene Enzym liegt in aktiver Form vor, ist frei von Phosphatasen und weist eine hohe Reinheit von 94% auf.

4.2.5 Untersuchung der Stabilität der Patchoulsynthase unter verschiedenen Lagerbedingungen

In diesem Versuch sollte die Lagerstabilität der PTS untersucht werden, um zu ermitteln unter welchen Bedingungen die PTS gelagert werden sollte. Diese Informationen sind insbesondere im Hinblick auf die geplante kinetische Charakterisierung der PTS von großer Bedeutung, da sichergestellt werden muss, dass die Enzymaktivität nicht durch die Lagerung oder den Umgang, z.B. durch mehrfache Auftau-Einfrier-Zyklen, beeinträchtigt wird.

Die PTS wurde dazu unter drei verschiedenen Bedingungen bei +20°C, +3°C und -22°C gelagert, wobei das Enzym für jeden Aktivitätstest aufgetaut und nach dem Versuch wieder eingefroren wurde. Das Enzym war für die Lagerung im Lagerungspuffer gelöst (6. A9). Zusätzlich sollte der Einfluss von Imidazol auf die Stabilität der PTS bei +3°C untersucht werden indem der Aktivitätspuffer mit 500 mM Imidazol versetzt wurde.

Dazu wurden über eine Woche täglich Aktivitätsversuche durchgeführt, um zu untersuchen, wie sich die Aktivität des Enzyms verglichen mit dem Ausgangswert verändert hat. Für den Aktivitätstest wurden in einem 500 µL Ansatz 0,5 µM PTS und 50 µL FPP gemischt, mit 200 µL iso-Oktan überschichtet und für 10 min bei 37°C inkubiert. Das Gemisch wurde kräftig geschüttelt und danach kurz zentrifugiert. Die organische Phase wurde entnommen und die Sesquiterpenkonzentration mittels GC-FID (6. B1) analysiert. Die Resultate sind in Abbildung 24 dargestellt.

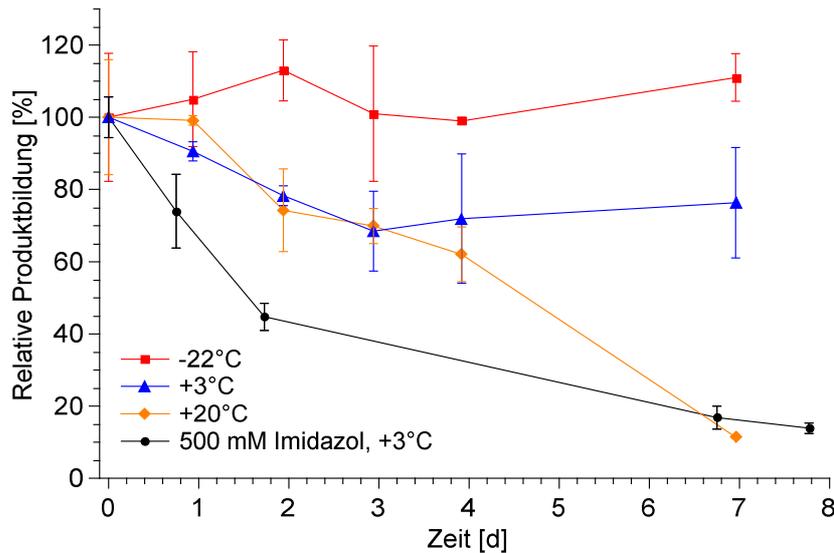


Abbildung 24: Resultate der Untersuchung der Aktivität der PTS unter verschiedenen Lagerbedingungen.

Abbildung 24 zeigt die Entwicklung der Aktivität der PTS bei verschiedenen Lagerbedingungen. Bei einer Lagerung bei -22°C inklusive mehrerer Auftau-Einfrier-Zyklen ist nach 7 Tagen kein Aktivitätsverlust der PTS erkennbar. Die Lagerung bei 3°C führt im gleichen Zeitraum hingegen zu einem Aktivitätsverlust von ca. 20%. Bei einer Lagerung bei 20°C , sinkt die Produktbildung der PTS kontinuierlich auf nur 10% des ursprünglichen Wertes innerhalb von 7 Tagen. Der negative Einfluss von Imidazol auf die Aktivität der PTS wird deutlich, wenn die Resultate mit denen der Lagerung bei 3°C verglichen werden. Schon nach 18 h ist eine deutliche Abnahme der relativen Produktbildung zu beobachten.

Die Untersuchung verschiedener Lagerbedingungen ergab, dass die in der Literatur [9] empfohlene Lagerung bei -20°C innerhalb von 7 Tagen zu keinem Aktivitätsverlust der PTS führt. Eine Lagerung der PTS bei höheren Temperaturen hat hingegen einen erheblich negativen Einfluss auf die Aktivität. Auch die Lagerung bei hohen Imidazol-Konzentrationen sollte vermieden werden, da in diesem Fall die PTS-Aktivität schon nach kurzer Zeit abnimmt.

4.2.6 Zusammenfassung und Diskussion der Aufreinigung der PTS

In diesem Kapitel wurde verschiedenste Verfahren für das downstream processing untersucht und darauf aufbauend eine Aufreinigungsstrategie für die Isolierung der PTS aus *E. coli* PTS Zelllysat entwickelt. Die auf diese Weise isolierte PTS wies eine hohe Reinheit von 94% auf und konnte damit für die spätere funktionale und kinetische Charakterisierung verwendet werden. Es wurden systematisch alle elementaren Verfahrensschritte, vom Zellaufschluss über verschiedene Chromatographieverfahren bis zur Formulierung und Lagerung der PTS untersucht.

Zunächst wurde der Einsatz von Detergenzien in Kombination mit dem Glycerin basierten Lysis-Puffer beim Zellaufschluss untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass weder mit TWEEN 20[®] noch mit Triton X-100[®] die Ausbeute der PTS gesteigert werden kann. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Triton X-100[®] auch zu einer Inaktivierung des Enzyms führt. Demnach ist der Zellaufschluss am besten mit dem in der Literatur beschriebenen Aufschlusspuffer durchzuführen, um die PTS in löslicher Form aus den Zellen freizusetzen.

Unabhängig davon welches Verfahren für die weitere Aufreinigung verwendet werden soll, ist es notwendig, die Pufferbedingungen in einer Diafiltration zu ändern, um z.B. den pH-Wert oder die Salz-Konzentration im Hinblick auf einen folgenden Chromatographieschritt anzupassen. Daher wurde eine cross-flow-Filtration mit einem cutoff von 10 kDa für die Aufreinigung der PTS optimiert. Neben dem Pufferaustausch werden dabei auch molekulare Störstoffe und kleine Proteine abgereichert. Da bei cross-flow-Filtrationen die Gelbildung von großer Bedeutung für die Geschwindigkeit und Qualität des Filtrationsschrittes ist, wurde eine TMP-scouting durchgeführt. Die Versuche wurden mit Equipment im Technikumsmaßstab durchgeführt, sodass die ermittelten Parameter auch als Grundlage zur Entwicklung eines technischen Prozesses dienen können.

Weiterhin wurden chromatographische Verfahren zur Isolierung der PTS untersucht. Dabei wurde zunächst versucht, die PTS mit einem Anionenaustauscher aufzureinigen. Dieses Trennverfahren ist vor allem in Hinblick auf eine Maßstabsvergrößerung des Aufreinigungsverfahrens attraktiv, da es kostengünstig und leicht skalierbar ist. Es zeigte sich jedoch, dass ohne eine weitere Optimierung kein signifikanter Aufreinigungseffekt erzielt werden kann.

Da die rekombinante PTS mit einem His-tag ausgestattet ist, wurde in einer Versuchsreihe ein Elutionsprogramm mit Imidazol-Lösung zur Isolierung der PTS mittels IMAC mit Ni²⁺-Ionen entwickelt. Dazu wurde das Elutionsverhalten der PTS zuerst mit einem linearen Konzentrationsgradienten und anschließend durch die stufenweise Erhöhung der Imidazol-Konzentration untersucht. Auf Basis dieser Ergebnisse wurde ein Elutionsprogramm konzipiert, mit dem unspezifisch gebundene HCPs getrennt von der PTS eluiert werden können.

Schließlich wurde die Stabilität der PTS bei verschiedenen Temperaturen und in Gegenwart hoher Imidazol-Konzentrationen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die PTS bei -22°C stabil ist und auch mehrere Auftau-Einfrier-Zyklen keinen negativen Einfluss auf die Aktivität der PTS haben.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass in diesem Abschnitt die rekombinante PTS aktiv und in hoher Reinheit aus *E. coli* Biomasse isoliert und formuliert werden konnte. Parallel dazu wurden erfolgreich die Grundlagen für ein Verfahren zur Aufreinigung der PTS im Technikumsmaßstab gelegt.

4.3 Substratsynthese

In diesem Kapitel sollten verschiedene Substrate für die PTS synthetisiert werden. Dazu sollte die schnelle und robuste Methode nach Keller *et al.* verwendet werden, die in Vorarbeiten optimiert wurde [1, 59]. Mit Hilfe dieser Methode sollte das natürliche Substrat *E,E*-Farnesylpyrophosphat (FPP), die *E,Z*-Isomere *2E,6Z*-FPP und *2Z,6E*-FPP und die beiden Monoterpenvorläufer Geranylpyrophosphat (GPP) und Nerylpyrophosphat (NPP) hergestellt werden. Die *E,Z*-Isomere sind dabei von besonderen Interesse, da die korrespondierenden Farnesol-Isomere als Gemisch sehr kostengünstig sind und bei einer erfolgreichen Umsetzung mit der PTS in Sesquiterpene überführt werden. Verglichen mit Monoterpenen handelt es sich bei Sesquiterpenen um sehr wertvolle Substanzen, da sie synthetisch nur schwer zugänglich sind. Die Verwendung der *E,Z*-Isomere von FPP als Substrat für die PTS ist daher besonders attraktiv.

Bei dem Syntheseverfahren werden Terpenalkohole als das Edukt für eine schrittweise Phosphorylierung mit einem Überschuss von Trichloroacetonitril und *bis*-Triethylammoniumphosphat (TEAP, 6. A12) verwendet. Nach der Synthese liegen die Diphosphate als schwer trennbares Gemisch mit den jeweiligen Mono- und Triphosphaten vor. Um in späteren Versuchen zu überprüfen, ob auch die Prenylmono- und Triphosphate von der PTS umgesetzt werden, sollte bei der FPP-Synthese versucht werden, auch das Mono- (FMP) und Triphosphat (FTP) zu isolieren. Während die als Ausgangsstoffe für die Synthese erforderlichen Terpenalkohole Geraniol, Nerol und *E,E*-Farnesol kommerziell verfügbar waren, mussten *2E,6Z*-Farnesol und *2Z,6E*-Farnesol aus einem Farnesol-Isomerengemisch isoliert werden. Die Aufreinigung der Isomere wurde freundlicherweise von der Symrise AG (Holzminden, Deutschland) durchgeführt.

Für die Synthese der Prenylphosphate wurden 0,7 mmol Terpenalkohol in 17,5 mmol Trichloroacetonitril gelöst und auf 37°C erhitzt. Danach wurden unter Rühren drei 1,75 mL Portionen 1 M TEAP-Lösung im Abstand von 5 min hinzugegeben. Dabei änderte sich die Farbe der Lösung von gelb nach dunkel-orange. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 25 dargestellt.

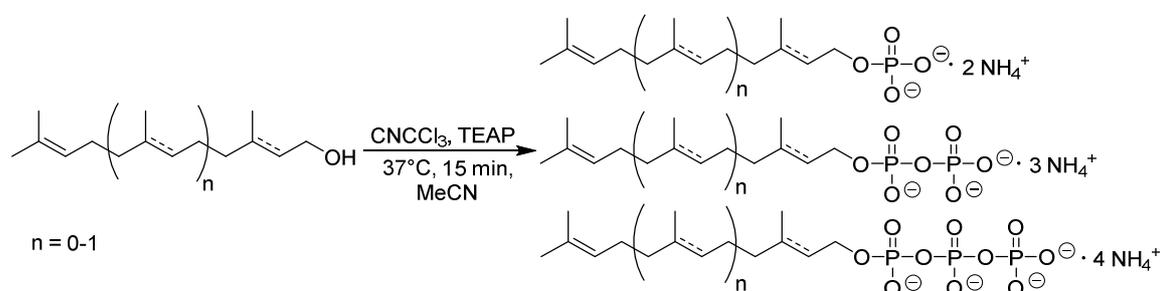


Abbildung 25 Reaktionsschema zur Synthese von Prenylphosphaten nach Keller *et al.* [59].

Zur Isolierung der Reaktionsprodukte wurde eine Säulenchromatographie durchgeführt. Dazu wurde eine mit Kieselgel (0,04-0,063 mm Korngröße, Kieselgel 60, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gepackte Glassäule (l = 26 cm, d = 3,8 cm) verwendet. Da bei der Synthese mit Farnesol nicht nur das Diphosphat sondern auch das Mono- und Triphosphat isoliert werden sollte, wurde für diese Säulenchromatographie die Trennleistung erhöht, indem eine 32 cm lange Säule verwendet wurde.

Als Laufmittel wurde eine iso-Propanol/30% (m/v) NH₄OH/H₂O-Lösung (6:3:0,5) verwendet. Beim Auftragen der Reaktionslösung auf die Säule entstand eine gut sichtbare gelbe Bande. Es wurde solange mit leichtem Überdruck eluiert, bis die Bande das Ende der Säule erreichte. Diese Vorfraktion (200-250 mL) wurde verworfen und erst danach damit begonnen, das Eluat in 4 mL Fraktionen zu sammeln. Um die Produkte durch den Vergleich mit Literaturwerten zu identifizieren und die Fraktionen auszuwählen, die die Zielsubstanz enthielten, wurde jede fünfte Fraktion mittels Dünnschichtchromatographie (DC, 6. B5) analysiert. In Abbildung 26 ist exemplarisch die DC der Fraktionen der Säulenchromatographie zur Aufreinigung von FMP, FPP und FTP dargestellt.

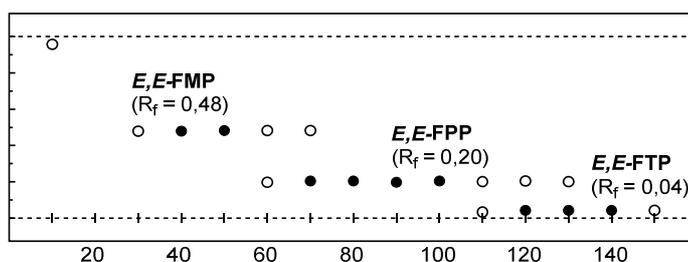


Abbildung 26: DC-Karte der Fraktionen aus der Aufreinigung von FMP, FPP, FTP mittels Säulenchromatographie.

Es ist zu erkennen, dass die bei der Umsetzung nach Keller *et al.* gebildeten Farnesylphosphate gut aufgetrennt werden. Aus den Daten geht hervor, dass die der Hauptprodukte nicht vollständig voneinander getrennt werden konnten. Dennoch war es möglich, aus Fraktionen, die auf der DC nur einen Spot zeigen, jede der drei Verbindungen als Reinstoff zu isolieren.

Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und im Rotationsverdampfer bei 35°C und 85 mbar auf 1/10 des Ausgangsvolumens eingeeengt, um iso-Propanol und Ammoniak zu entfernen. Anschließend wurde die Lösung filtriert, mit 30 mM NH₄HCO₃-Puffer versetzt und bei -20°C eingefroren. Zuvor wurden 100 µL für eine Analyse mittels HPLC (6. B4) entnommen. Die Resultate der DC und HPLC Messungen aller hergestellten Produkte sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Resultate der DC und HPLC-Analysen der Reaktionsprodukte (DC: 10 x 0,6 μ L pro Punkt, Kieselgel beschichtete Aluminiumplatten, entwickelt mit Anisaldehyd-Färbereagenz; HPLC: MeCN/ 30 mM NH_4HCO_3 , C₁₂-Jupiter Proteo 205 x 4,6 mm).

| Substanz | <i>E,E</i> -FPP-STD | <i>E,E</i> -FPP | <i>E,E</i> -FMP | <i>E,E</i> -FTP | <i>2Z,6E</i> -FPP | <i>2E,6Z</i> -FPP | GPP | NPP |
|----------------------|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|-------------------|------|------|
| R _f -Wert | 0,20 | 0,20 | 0,48 | 0,04 | 0,19 | 0,18 | 0,18 | 0,13 |
| Retentionszeit [min] | 6,06 | 6,05 | 7,25 | 5,20 | 5,61 | 5,02 | 2,55 | 2,31 |

Die Größe und die sterische Beschaffenheit des unpolaren Restes in den synthetisierten Prenyldiphosphaten äußert sich in den R_f-Werten: Je größer und je linearer der Prenylrest, desto höher der R_f-Wert. Außerdem ist ersichtlich, dass die Höhe des R_f-Wertes sich umgekehrt proportional zur Anzahl der Phosphat-Gruppen im Molekül verhält. Dieses Verhalten ist plausibel, da die Phosphat-Reste über Wasserstoffbrückenbindungen besonders starke Wechselwirkungen zur stationären Phase aufbauen können. Insgesamt sind die ermittelten Werte vergleichbar mit analytischen Standards und den in der Literatur verfügbaren Werten. In Abbildung 27 sind die Strukturformeln der in diesem Abschnitt synthetisierten Substanzen dargestellt.

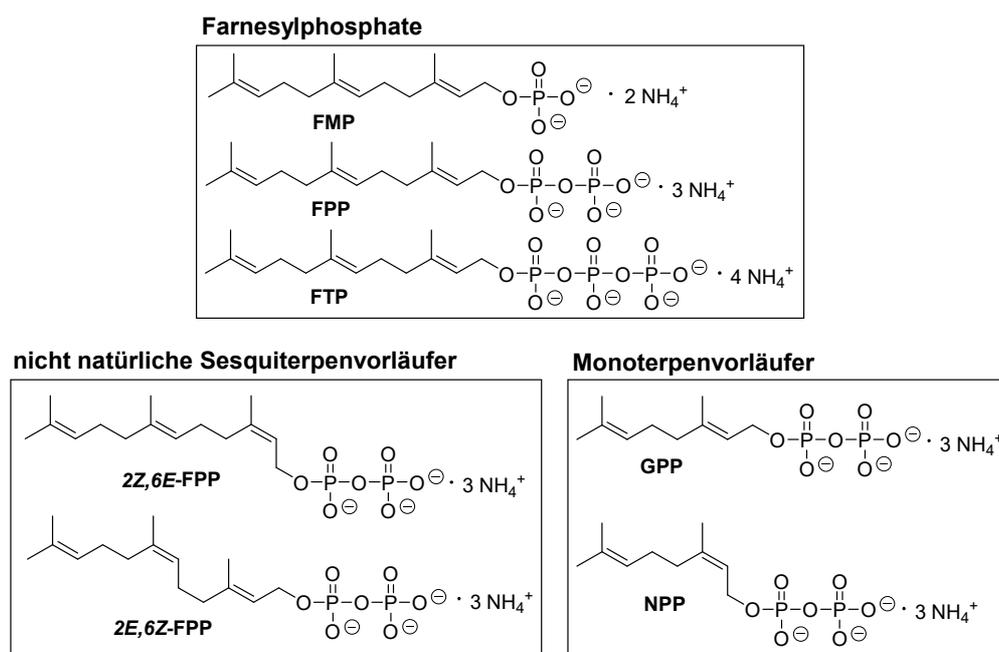


Abbildung 27: Strukturformeln der in dieser Arbeit hergestellten Verbindungen.

In diesem Kapitel wurde die Synthesemethode nach Keller *et al.* erfolgreich angewendet, um verschiedene Prenylphosphate zu synthetisieren. Diese Verbindungen sollen in Kapitel 4.4.6 verwendet werden, um die Substratflexibilität der PTS zu untersuchen. Dabei wurde, neben dem universellen Substrat für alle Sesquiterpensynthasen *E,E*-FPP, auch das Mono- und Triphosphat hergestellt. Zusätzlich wurden weitere Prenyldiphosphate wie die *E,Z*-Isomere des FPPs und die Monoterpenvorläufer GPP und NPP synthetisiert.

Bei der PTS handelt es sich um einen potentiell wirtschaftlich relevanten Biokatalysator für die Herstellung von enzymatischen Patchouliöl. *E,E*-Farnesol wäre der Ausgangsstoff für die Herstellung eines enzymatischen Patchouliöl. Da das *E,E*-Isomer, das z.B. aus Lindenblüten extrahiert wird, mit ca. 20-25 EUR/kg relativ kostenintensiv ist, wäre die Verwendung von synthetischem Farnesol mit einem Preis von 3-15 EUR/kg eine attraktive Alternative. Produktionsbedingt ist synthetisches Farnesol allerdings ein Isomeregemisch, das sich aus *E,E*-, *E,Z*- und *Z,E*-Farnesol im Verhältnis 67:23:10 zusammensetzt. Um das synthetische Farnesol als Ausgangsstoff für das enzymatische Patchouliöl verwenden zu können, muss zuerst untersucht werden, wie sich *E,Z*- und *Z,E*-FPP auf das Produktspektrum der PTS auswirken. Vor diesem Hintergrund kommt der erfolgreichen Synthese der beiden FPP-Isomere unter allen in diesem Kapitel synthetisierten Substraten eine besondere Bedeutung zu.

4.4 Charakterisierung der Patchouliolsynthese

Bei der in dieser Arbeit produzierten Patchouliolsynthese (PTS) handelt es sich um eine cDNA-Variante der pflanzlichen Multi-Produkt-Sesquiterpensynthese (E.C. 4.2.3.70) aus *Pogostemon cablin* (GenBank: ABC87816.1). Das Enzym setzt sich aus 553 Aminosäuren zusammen und weist eine molare Masse von 64,4 kDa auf. Der pI-Wert liegt bei pH 5,3 [1, 9]. Die für die experimentellen Arbeiten verwendete rekombinante PTS-Variante (GenBank: KF983531.1) weist verglichen mit dem pflanzlichen Enzym 19 Aminosäuren-Austausche auf, von denen einige in der unmittelbaren Umgebung des aktiven Zentrums und des ebenfalls katalytisch bedeutenden NSE/DTE-Motivs liegen [1]. Außerdem verfügt die rekombinante PTS über einen His₆-tag mit Faktor Xa Schnittstelle am N-Terminus des Enzyms. Ein weiterer Unterschied zum pflanzlichen Enzym sind die fehlenden posttranslationalen Modifikationen wie z.B. die Glycosylierung, die in der Literatur jedoch nicht als kritisch für die Enzymaktivität beschrieben werden [9].

Auf Grund der Unterschiede zwischen der pflanzlichen PTS und der rekombinanten cDNA-Variante der PTS war es notwendig, das Enzym umfassend zu charakterisieren. Dazu wurde das Enzym zunächst mittels MALDI-MS eindeutig identifiziert und anschließend das Produktspektrum der rekombinanten PTS mit dem aus der Pflanze gewonnenen Patchouliöl verglichen. Im Hinblick auf eine mögliche Verwendung der PTS als Biokatalysator für die Terpenherstellung wurden insbesondere die grundlegenden kinetischen Parameter bestimmt.

Da es sich bei der PTS um ein Enzym handelt, das ein Substrat in eine Vielzahl von Produkten umwandelt, musste weiterhin untersucht werden, ob die veränderte Aminosäuresequenz die Produktselektivität oder sogar das Produktspektrum beeinflusst. Der Mechanismus für die Produktbildung bei Sesquiterpensynthesen ist physikalisch-chemisch getrieben: Das Enzym leitet die Dephosphorylierung ein und stellt danach vor allem einen Reaktionsraum zur Verfügung, indem das

hochreaktive Carbeniumion abreagiert. Dabei kommt den Aminosäuren, die diesen Reaktionsraum bilden, eine entscheidende Rolle zu, welche Produkte am Ende gebildet werden. Sollten eine oder mehrere der ausgetauschten Aminosäuren sich in dieser Region befinden, ist eine erhebliche Änderung des Produktspektrums oder der gesamten katalytischen Funktionalität der PTS denkbar.

Um das biokatalytische Potential der PTS zu untersuchen, wurden zudem Versuche zur Substrat-Flexibilität (substrate scope) durchgeführt. Schließlich wurden durch Deuterierungsexperimente Erkenntnisse über den Ablauf des carbokationischen Reaktionsmechanismus gewonnen.

4.4.1 Massenspektrometrische Analyse der rekombinanten Patchoulolsynthase

Im Abschnitt zuvor wurde in Umsetzungsversuchen bereits die katalytische Aktivität der aufgereinigten PTS mit Hilfe von GC-Analysen festgestellt. Um sicherzustellen, dass es sich bei dem Protein tatsächlich um eine Patchoulolsynthase handelt, wurde eine matrix assisted laser desorption/ionization-time off light (MALDI-TOF) MS-Analyse in Auftrag gegeben. Die Untersuchung wurde freundlicherweise vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (Braunschweig, Deutschland) durchgeführt.

Dazu wurde die Bande der aufgereinigten PTS aus einem Gel einer Coomassie-gefärbten SDS-PAGE ausgeschnitten und ein Trypsin-Verdau durchgeführt. Das Protein wird dabei in zahlreiche Peptidfragmente zersetzt, die anschließend massenspektrometrisch untersucht werden können. Das Fragmentierungsmuster, der sog. peptid mass fingerprint, ist charakteristisch für das verdaute Protein und kann mit den Spektren aus der Proteindatenbank Mascot (Matrix Science Inc., Boston, USA) abgeglichen werden.

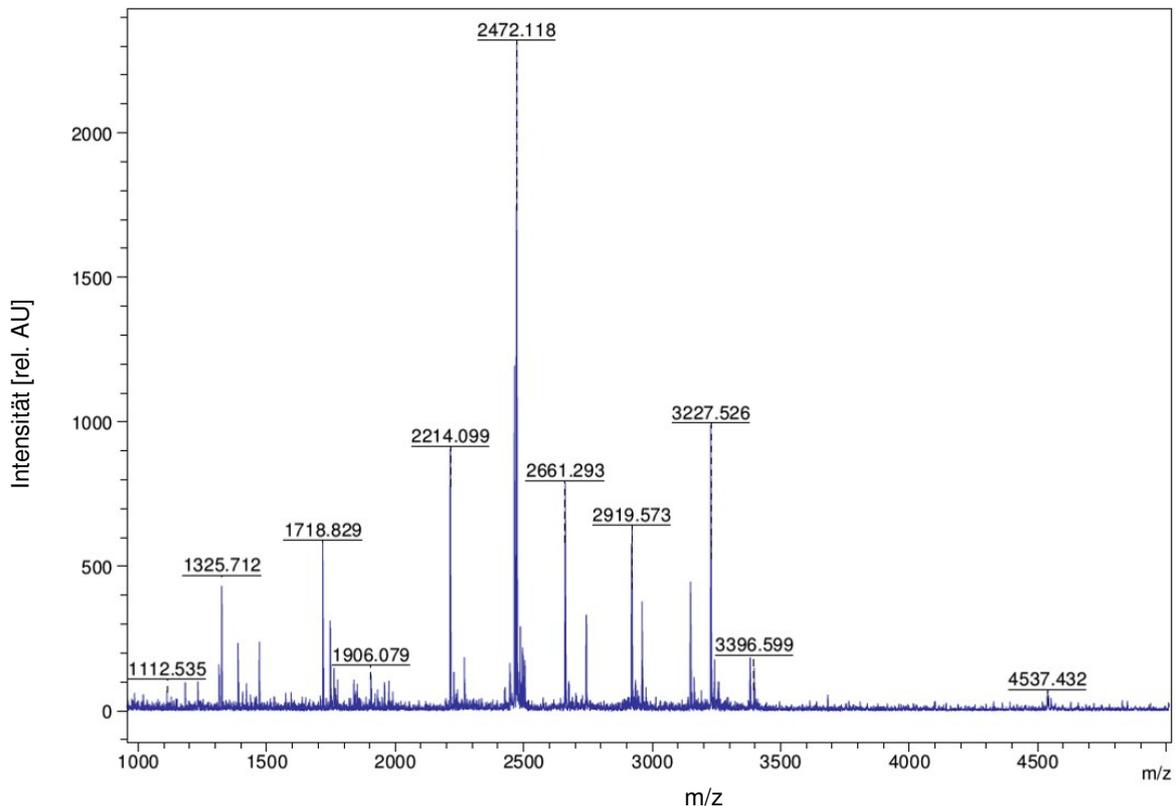


Abbildung 28: Massenspektrum der Peptidfragmente, die durch den tryptischen Verdau der aufgereinigte gebildet wurden.

In Abbildung 28 ist das Massenspektrum des Trypsinverdau der PTS dargestellt. Zur Analyse des peptid mass fingerprint der PTS wurde mit Hilfe von Mascot die Massen der einzelnen Peptidfragmente mit berechneten Fragmenten von Proteinen aus der Datenbank verglichen. Um die Ähnlichkeit des zu analysierenden Proteins mit einem bekannten Protein zu beschreiben, wird von der Software eine Punktzahl, ein sog. score = $-10 \cdot \log(P)$, errechnet. Dabei beschreibt P die Wahrscheinlichkeit, dass die im MS gefundene Fragmentmasse des Analyten ein zufälliges Resultat des tryptischen Verdau ist. Bei einem score von >74 ist die Ähnlichkeit signifikant, da dann $P < 0,05$ ist.

Die größte Übereinstimmung des analysierten Proteins wurde für die Patchoulolsynthase aus *Pogostemon cablin* in der Datenbank gefunden und ein score von 113 errechnet. Demnach liegt die Wahrscheinlichkeit, dass die Übereinstimmung ein zufälliges Ergebnis ist bei $7,3 \cdot 10^{-6}$. Insgesamt konnten 25% der durch den tryptischen Verdau entstandenene Fragmente in der Aminosäuresequenz der Patchoulolsynthase in der Datenbank gefunden werden. Der Grund, warum dieser Wert nicht höher ist, liegt vermutlich an den 19 Abweichungen in der Aminosäuresequenz und an dem His₆-tag am N-Terminus und der dazugehörigen Faktor Xa Schnittstelle. Alle Peptidfragmente, die von auch nur einer der genannten Abweichungen betroffen sind, können in der Datenbank dann nicht mehr richtig zugeordnet werden.

Dennoch konnte mit Hilfe der MS-Analyse bestätigt werden, dass es sich bei dem in dieser Arbeit hergestellten und aufgereinigten Enzym um eine Patchoulolsynthase aus dem Organismus *Pogostemon cablin* handelt.

4.4.2 Untersuchung des Produktspektrums

Um zu untersuchen, ob sich die Abweichungen der Aminosäuresequenz und die fehlende Glycosylierung auf das Produktspektrum der rekombinanten PTS auswirkt, wurden die Produkte der enzymatischen Umsetzung von *E,E*-FPP mittels GC-FID (6. B1) und GC-MS (6. B2) untersucht. Außerdem sollte die Zusammensetzung des rekombinanten Patchouliöls mit der des pflanzlichen verglichen werden. Dazu wurde eine Extraktion von getrockneten Blättern der indischen Patchouli-Pflanze *Pogostemon cablin* durchgeführt.

Die enzymatische Reaktion wurde dazu unter Literaturbedingungen durchgeführt [9]. Dazu wurden 3 mL Umsetzungspuffer (50 mM MOPS, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, pH 7,4) mit 1 µM der aufgereinigten PTS und 100 µM *E,E*-FPP versetzt. Die Lösung wurde für 18 h im Wasserband bei 37°C inkubiert und anschließend mit 1 mL Pentan extrahiert. Die organische Phase wurde abgenommen, auf 200 µL eingengt und anschließend in der GC-FID (6. B1) untersucht.

Um die Zusammensetzung des pflanzlichen Patchouliöls zu untersuchen, musste das ätherische Öl aus den Blättern der Patchouli-Pflanze isoliert werden. Dazu wurden die Blätter einer kommerziell erhältlichen indischen Patchouli-Pflanze (Rühlemann's Kräuter und Duftpflanzen GmbH, Horstedt, Deutschland) von der Pflanze entfernt und für 14 Tage bei 25°C getrocknet. 6 g der getrockneten Blätter wurden mit einem Mörser grob zerkleinert. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial in flüssigen Stickstoff eingefroren und auf zwei 25 mL Mahlbecher einer MM 400 Schwingkugelmühle (Retsch GmbH, Haan, Deutschland) aufgeteilt. Das Mahlen erfolgte mit einer Edelstahlkugel bei 20 Hz für 2 min. Das erhaltene Pulver wurde in ein 100 mL Becherglas überführt und in 20 mL Pentan aufgeschwemmt, um das Patchouliöl zu extrahieren. Die Suspension wurde filtriert und der Filterkuchen danach noch zwei weitere Male auf die gleiche Weise mit Pentan extrahiert. Das klare, hellgrüne Extrakt wies einen intensiven Patchouli-Geruch auf. Eine Probe des Extraktes wurde um den Faktor 250 verdünnt und anschließend in der GC-FID (GC-2010plus, Shimadzu, Kyoto, Japan) analysiert.

Sowohl das pflanzlichen Extrakt, als auch das rekombinante Patchouliöl wurden zusätzlich massenspektrometrisch mittels GC-MS (Fisions GC 8.000 mit Fisions MD800, CE Instruments, Hindley Green, Großbritannien) untersucht. Die Proben wurden freundlicherweise vom Institut für Lebensmittelchemie der Leibniz Universität Hannover im GC-MS vermessen. Zur Identifikation der Inhaltsstoffe wurden die Spektren mit Hilfe der Software Xcalibur 1.2 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) ausgewertet und mit Spektren bekannter Substanzen aus einer digitalen

Spektrenbibliothek (Wiley08/NIST08, 2008) verglichen. Zusätzlich wurden Spektren aus einem kommerziell erhältlichen Patchouliölstandard herangezogen. Die Resultate der MS-Untersuchungen wurden anschließend anhand der Kovats Indizes (RI), einer geräteunabhängige Normierung der Retentionszeiten, mit den Ergebnissen der GC-FID Analyse korreliert.

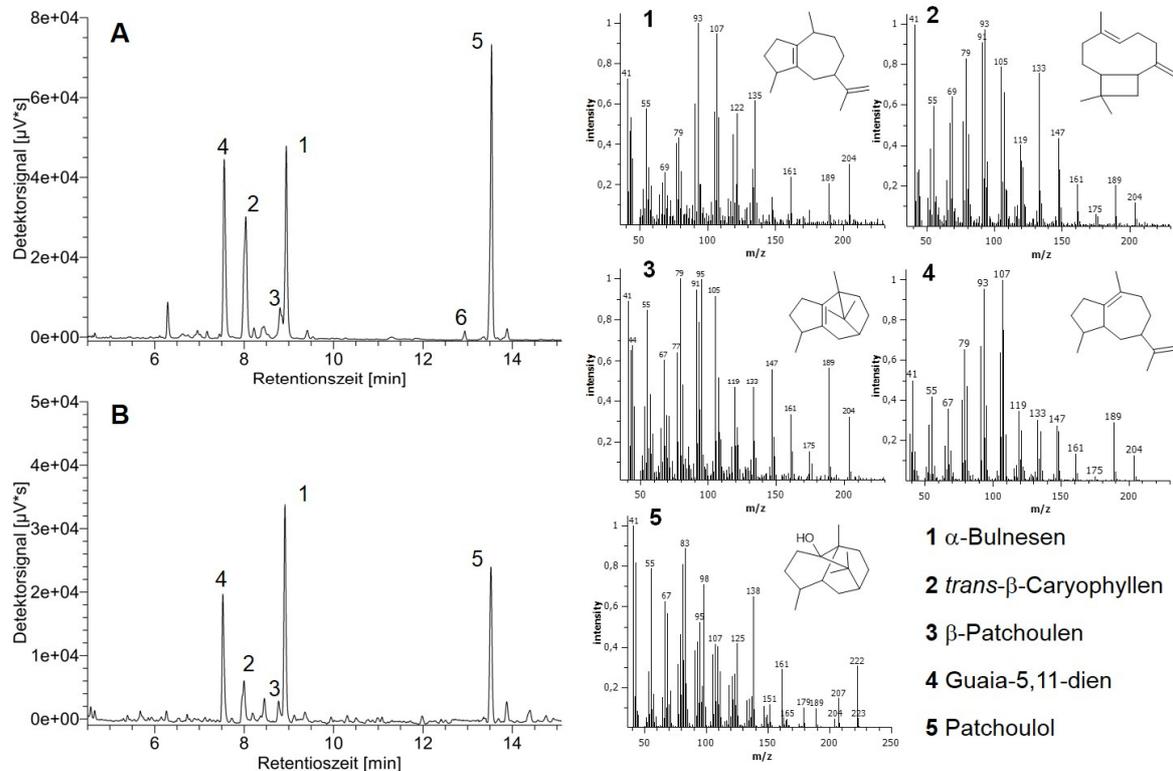


Abbildung 29: Gaschromatogramme und MS-Analysen von pflanzlichen Patchouliöl (A) und enzymatisch produziertem Patchouliöl (B). Beide ätherische Öle setzten sich aus den gleichen Hauptprodukten (1-5) zusammen.

Abbildung 29 zeigt die Gaschromatogramme des Extraktes aus der Patchouli-Pflanze im Vergleich zum Reaktionsprodukt der rekombinanten PTS. Den GC-MS-Analysen zufolge bestehen beide Patchouliöle aus den gleichen Hauptprodukten. Dabei handelt es sich um Patchoulol (RI = 2.155), α -Bulnesen (RI = 1.694), Guaia-5,11-dien (RI = 1.578), *trans*- β -Caryophyllen (RI = 1.609) und β -Patchoulen (RI = 1.682). Da beide Proben den charakteristischen Patchouli-Duft aufweisen deutet daraufhin, dass (-)-Patchoulol gebildet wurde, da das (+)-Enantiomer geruchlos ist [10].

Bei genauerer Betrachtung der beiden Chromatogramme fallen zwei Unterschiede auf: Die Anteile der einzelnen Produkte unterscheiden sich, was sich unter anderem darin zeigt, dass Patchoulol im pflanzlichen Öl der Hauptbestandteil ist. Im Gegensatz dazu, ist im enzymatischen Öl α -Bulnesen das Hauptprodukt. Ein weiterer Unterschied ist der Peak 6 in Chromatogramm A bei der Retentionszeit von 12,9 min, der in Chromatogramm B fehlt. Mit Hilfe einer MS-Analyse konnte diese Substanz als Norpatchoulenol identifiziert werden. In der Literatur wird dieser Stoff als ein Abbauprodukt von Patchoulol beschrieben, das ebenfalls den typischen Patchouli-Geruch aufweist,

allerdings in Patchouliöl nur in so geringen Konzentrationen enthalten ist, dass es nicht zum Duftbild des Patchouliöls beiträgt [60].

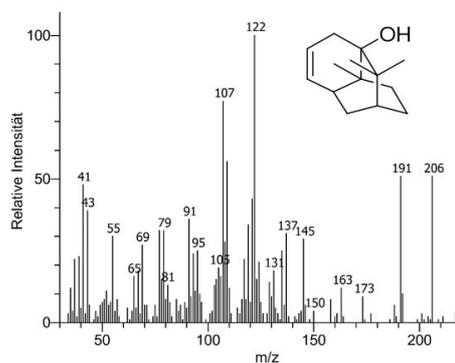


Abbildung 30: Norpatchoulenol und das dazugehörige Massenspektrum. Der C₁₄-Körper konnte nur im Extrakt der Patchouli-Blätter nachgewiesen werden und ist vermutlich das Resultat von enzymatischer Derivatisierung in der Pflanze.

Der genaue Bildungsmechanismus von Norpatchoulenol ist derzeit noch unbekannt. Vermutlich wird die Demethylierung durch enzymatische Prozesse in der Pflanze verursacht. Vor dem Hintergrund der Ergebnisse dieser Arbeit ist diese Erklärung insofern plausibel, als dass das Norpatchoulenol nur im pflanzlichen Öl nicht aber im enzymatischen nachgewiesen werden konnte.

Eine Erklärung für die unterschiedlichen Anteile der Hauptprodukte in den beiden untersuchten Patchouliölen, könnten die Abweichungen in der Aminosäuresequenz der verwendeten PTS-Variante sein.

Im Vergleich zu den in der Literatur verfügbaren Daten über das Produktspektrum PTS sind die Ergebnisse, die in dieser Arbeit erzielt wurden, insgesamt konsistent. Die Massenspektren als auch die berechneten Kovats Indizes stimmen mit den Literaturdaten überein. Dabei muss auch berücksichtigt werden, dass die genaue Zusammensetzung von Patchouliöl von vielen Umweltfaktoren abhängt. Der Genotyp und der Standort der Pflanze können dabei genauso von Bedeutung sein, wie die klimatischen Bedingungen, denen die einzelne Pflanze ausgesetzt ist.

4.4.3 Kinetische Untersuchungen

Da es sich bei der in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten PTS um eine Variante der in der Literatur beschriebenen Patchouliolsynthase handelt, war es notwendig, die grundlegenden kinetischen Parameter zu bestimmen und sie mit den Werten aus der Literatur zu vergleichen. Auch im Hinblick auf eine mögliche Verwendung der PTS als ein Biokatalysator für die Terpensynthese ist die Ermittlung kinetischer Daten von großer Bedeutung. Im Mittelpunkt der Untersuchungen standen, neben dem pH- und Temperaturoptimum, wichtige Kennzahlen wie die Michaelis-Menten-

Konstante K_M , die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} , die Wechselzahl k_{cat} sowie die spezifische Aktivität der PTS.

4.4.3.1 Entwicklung eines Enzymaktivitäts-Assays für die Bestimmung des Temperatur- und pH-Optimum der Patchoulolsynthase

Um die optimalen Reaktionsbedingungen der PTS zu untersuchen, wurde ein Enzymassay zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit auf Basis des Assays von O'Maille *et al.* entwickelt [61].

Für die Bestimmung des pH-Optimums wurde 2,5 mL Umsetzungspuffer (50 mM MOPS, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10% (v/v) Glycerin), eingestellt auf unterschiedliche pH-Werte, mit 0,5 µM aufgereinigter PTS und 50 µM *E,E*-FPP versetzt und gut durchmischt. Fünf Portionen á 500 µL der Reaktionslösung wurden rasch in je ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt mit 200 µL iso-Oktan überschichtet. Die fünf Reaktionsgefäße wurden gut verschlossen und bei 37°C inkubiert. Dieser Temperaturwert wurde gewählt, da in der Literatur dieser als das Optimum der PTS angegeben wird [9].

Um die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmen zu können, wurden die fünf Reaktionsansätze nacheinander nach 2, 4, 6, 8 und 10 min aus dem Wasserbad geholt und sofort kräftig für 30 s durchmischt. Dadurch wird das Enzym durch den Kontakt mit der organischen Phase denaturiert und die enzymatische Reaktion auf diese Weise gestoppt [61]. Gleichzeitig werden dabei die bei der Umsetzung gebildeten Sesquiterpene aus der wässrigen Reaktionslösung extrahiert. Die organische Phase wurde danach abgenommen und die Produkte mittels GC-FID (6. B1) quantifiziert. Aus der Zunahme der Produktkonzentration in den fünf Reaktionsansätzen konnte die Reaktionsgeschwindigkeit der PTS bei dem jeweiligen pH-Wert berechnet werden.

Der beschriebene Assay wurde bei sieben verschiedenen pH-Werten zwischen pH 6,5 - 8,5 durchgeführt und die Reaktionsgeschwindigkeit für jeden pH-Wert drei Mal bestimmt. Für die Bestimmung des Temperaturoptimums wurde der gleiche Enzym-Assay verwendet, wobei die Temperatur variiert und in neun Schritten von 30°C auf 44°C gesteigert wurde. Der pH-Wert des Umsetzungspuffers war für alle Experimente auf pH 7,25 eingestellt. Der untersuchte pH- und Temperaturbereich wurde gewählt, da die optimalen Reaktionsbedingungen für Sesquiterpensynthasen üblicherweise in diesem Bereich liegen [9, 30, 62–65].

Der bei dem Assay verwendete Umsetzungspuffer wurde verwendet, da ähnliche Puffer in der Literatur für Umsetzungsversuche mit Sesquiterpensynthasen eingesetzt werden [9]. Das Volumen der Reaktionslösung von 500 µL hat sich als praktikabel erwiesen, da genug Produkt gebildet wird um es zuverlässig mit einer GC-FID quantifizieren zu können, aber gleichzeitig der Verbrauch des kostenintensiven analytischen *E,E*-FPP Standards auf das notwendige Maß beschränkt wird.

Zum Überschichten der Reaktionslösung ist es sinnvoll, so wenig wie möglich eines organischen, nicht mit Wasser mischbaren Lösemittels zu verwenden, da auf diese Weise die extrahierten Sesquiterpene konzentrierter als in der Reaktionslösung vorliegen und damit leichter nachweisbar sind. Das Volumen von 200 μL ist jedoch notwendig, um die Probe mit Hilfe des Autosamplers in den Gaschromatographen injizieren zu können. Bei einer manuellen Injektion könnten Proben mit einem deutlich geringeren Volumen vermessen werden, allerdings war die manuelle Injektion in Anbetracht der großen Anzahl von Proben keine Option. Als organisches Lösemittel wurde iso-Oktan gewählt, da es sich gut für die Extraktion unpolarer Substanzen mit hohen n-Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (P-Wert) wie Patchoulol mit $\log P = 4,484$ und α -Bulnesen [66] mit $\log P = 6,628$ [66] eignet. Das in einigen Publikationen verwendete n-Hexan unterscheidet sich in den Extraktionseigenschaften praktisch nicht, hat aber den Nachteil leichtflüchtig (Sdp. = 69°C) zu sein, wodurch es schwieriger und weniger exakt zu pipettieren ist. Dieser Aspekt ist insofern von Bedeutung, als das bei der Durchführung des Enzym-Assays teilweise sehr zügig gearbeitet werden muss. Außerdem kann es durch die Verdunstung des Lösemittels zur Verfälschung der Produktkonzentration kommen. Durch die Verwendung von iso-Oktan (Sdp. = 99°C) werden diese Probleme vermieden.

Für die Quantifizierung der Sesquiterpene wurde ein Shimadzu GC-2010plus Gaschromatograph (Shimadzu, Kyoto, Japan) mit Autosampler verwendet, der mit einer Zebron-WAXplus Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm I.D., 0,25 μm Filmdicke, Phenomenex, Torrance, USA) ausgestattet war. Diese Säule ist speziell für die Analytik von Terpenen und anderen Duftstoffen ausgelegt. Da bei der Durchführung des Assays eine große Anzahl von Proben anfiel, wurde eine GC-Methode entworfen, die einerseits die Hauptbestandteile von Patchouliöl ausreichend gut auftrennt, aber gleichzeitig relativ kurz ist.

Weil die PTS nicht nur ein Produkt bildet, sondern viele verschiedene, wurde für die Quantifizierung die Summe der Peakflächen der fünf Hauptprodukte mit der Patchouliölkonzentration korreliert.

Da die Reaktionsgeschwindigkeit von Enzymen typischerweise in Stoffmenge pro Zeit angegeben wird, musste die mit Hilfe der Kalibrationsgerade (C. 1) errechnete Massenkonzentration in eine Stoffmengenkonzentration umgerechnet werden. Von den fünf Hauptinhaltsstoffen des Patchouliöls haben die unfunctionalisierten Sesquiterpene α -Bulnesen, Guaia-5,11-dien, *trans*- β -Caryophyllen und β -Patchoulen jeweils eine molare Masse von 204,4 g/mol und der tertiäre Alkohol Patchoulol eine molare Masse von 222,4 g/mol. Unter Berücksichtigung des Patchoulol-Anteils von 35,2% im analytischen Standard ergibt sich eine durchschnittliche molare Masse von Patchouliöl von 210,7 g/mol.

Mit Hilfe dieser molaren Masse kann auf Basis der im Enzym-Assay gemessenen Zunahme der Produktkonzentration die molare Reaktionsgeschwindigkeit der PTS bei verschiedenen

Reaktionsbedingungen bestimmt werden. Die Resultate der Experimente für die Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen sind in Abbildung 31 dargestellt.

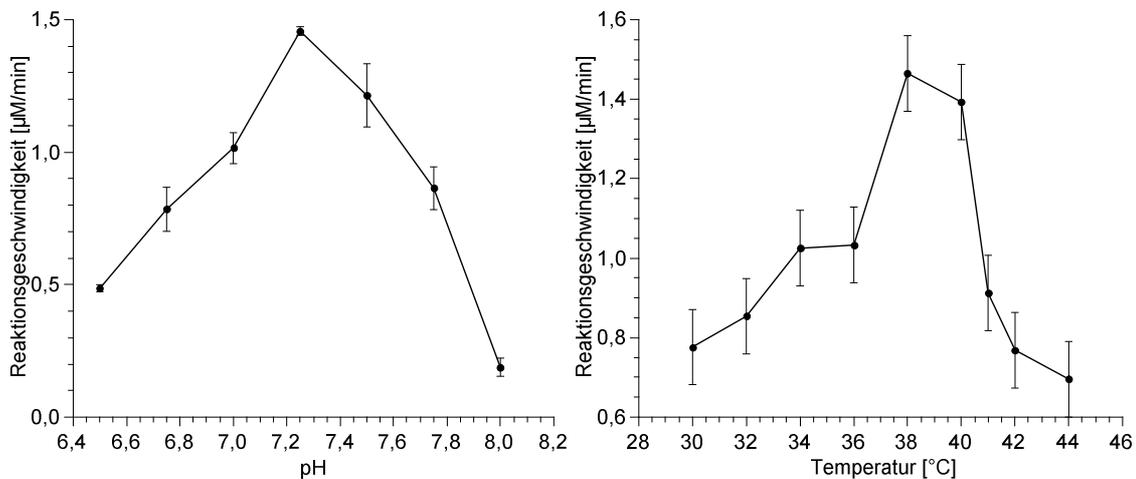


Abbildung 31: Die rekombinante PTS erreicht ihre höchste Reaktionsgeschwindigkeit bei einem pH-Wert von 7,25 und einer Temperatur von 38°C.

Aus den Ergebnissen der Enzym-Assays geht hervor, dass die rekombinante PTS ihr pH-Optimum bei pH 7,25 und ihr Temperaturoptimum bei 38°C hat. Für eine aus der Pflanze *Pogostemon cablin* isolierte PTS wird in der Literatur ein pH-Optimum von pH 7,5 angegeben [30]. In der einzigen Veröffentlichung, die sich mit den Eigenschaften einer rekombinante PTS beschäftigt, wird der optimale pH-Bereich mit pH 7,0 – 7,5 angegeben und das Temperaturoptimum auf 40°C geschätzt [9]. Die in dieser Arbeit ermittelten Werte stützen demnach die publizierten Werte und zeigen, dass die rekombinante Variante der PTS ein ähnliches pH- und Temperatur aufweist wie das natürliche Enzym.

4.4.3.2 Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Substratkonzentration

Um die für die kinetische Charakterisierung wichtigen Parameter K_M , v_{max} und den technischen relevanten k_{cat} -Wert zu bestimmen, musste die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration ermittelt werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob sich die Kinetik der PTS mit der Michaelis-Menten-Gleichung beschreiben lässt.

Dazu wurden mehrere Enzym-Assays mit verschiedenen Konzentrationen von *E,E*-FPP bei den zuvor bestimmten optimalen Reaktionsbedingungen von 38°C und pH 7,25 durchgeführt (6. B14). Bei diesen Bedingungen wurde die Ionenstärke des verwendeten Umsetzungspuffers (50 mM MOPS, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10% (v/v) Glycerin, pH 7,25) auf $I = 179$ mM berechnet. Für die Durchführung des Enzym-Assays wurden 2,5 mL Umsetzungspuffer mit 0,5 µM aufgereinigter PTS und einer *E,E*-FPP-Konzentration zwischen 1 und 200 µM versetzt. In der Literatur wurden

kinetische Untersuchungen an Sesquiterpensynthasen in der Regel in einem Bereich bis 100 μM durchgeführt [61, 67–69]. Um das Verhalten der PTS auch bei höheren Substratkonzentrationen untersuchen zu können, wurde in dieser Arbeit der Messbereich auf bis zu 200 μM ausdehnt.

Die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit erfolgte wie in Kapitel 4.4.3.1 beschrieben. Die Reaktionsansätze wurden nach 1, 2, 4, 6 und 8 min Inkubation aus dem Wasserbad genommen und umgehend für 30 s kräftig durchmischt, um durch den Kontakt mit iso-Oktan die enzymatische Reaktion zu stoppen. Bei den Assays mit sehr geringen *E,E*-FPP Konzentrationen wurden die enzymatischen Umsetzungen nach 10, 30, 60, 90 und 120 s gestoppt. Diese Vorgehensweise war notwendig, da das Substrat ansonsten zu schnell abreagiert ist und dadurch bei den 5 Reaktionsansätzen keine Produktzunahme gemessen werden konnte. Für jede Substratkonzentration wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Die in dem Enzym-Assay bestimmten Reaktionsgeschwindigkeiten wurden in einem Diagramm gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Mit Hilfe der Datenanalyse Software QtiPlot (Ion Vasilief, Craiova, Rumänien), können Funktionen erstellt werden, um die Kinetik eines Enzyms zu beschreiben. Anschließend können die Funktionen an die Messdaten der Reaktionsgeschwindigkeiten angenähert werden. Als Ausgleichsfunktion kam dazu der, auf der Methode der kleinsten Quadrate basierende, Levenberg-Marquardt-Algorithmus zum Einsatz.

Es wurden zwei verschiedene Modelle zur Beschreibung der Kinetik der PTS angewendet. Zunächst wurde ein Michaelis-Menten Verhalten angenommen, was durch Gleichung (1) beschrieben wird [70]. Zusätzlich wurde das Modell einer unkompetitiven Substratinhibierung auf die experimentellen Daten angewendet. Dieses Modell wird mathematisch durch Gleichung (2) beschrieben [71].

$$(1) \quad v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

$$(2) \quad v = \frac{v'_{max} \cdot [S]}{K'_M + [S] + \frac{[S]^2}{K_i}}$$

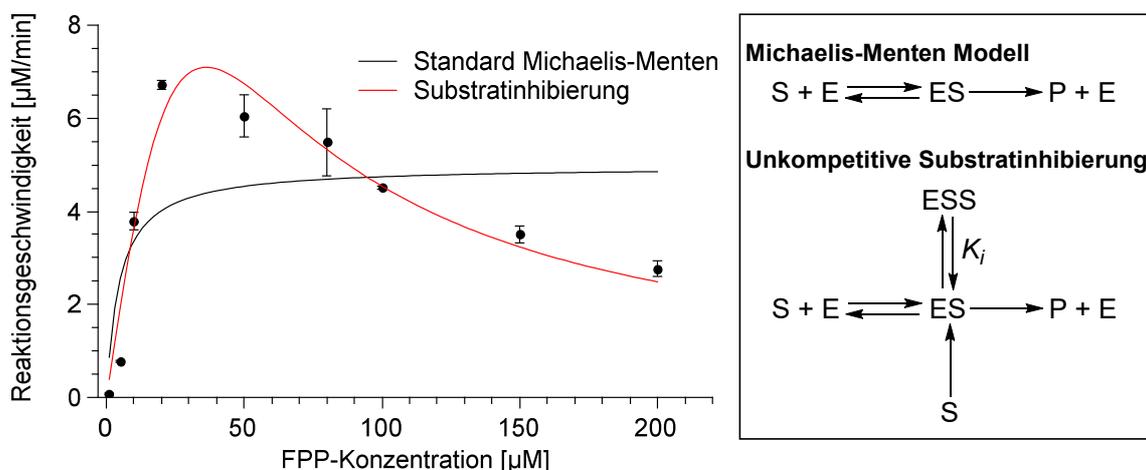


Abbildung 32: Im Diagramm sind die experimentellen Messwerte für die Reaktionsgeschwindigkeit der PTS in Abhängigkeit der Substratkonzentration dargestellt. An die Daten wurden die Funktionen zweier verschiedener Modelle zur Beschreibung von Enzymkinetiken genähert (schwarze und rote Kurve). Auf der linken Seite sind die Reaktionsschemata der beiden Modelle dargestellt.

Die experimentellen Messwerte sowie die angenäherten Funktionen zur Beschreibung der Kinetik sind in Abbildung 32 dargestellt. Aus der Abbildung geht hervor, dass die Reaktionsgeschwindigkeit der PTS ein Maximum bei einer *E,E*-FPP Konzentration von ca. 30 μM aufweist. Bei einer Erhöhung der Substratkonzentration auf 200 μM nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit auf 45% ab. Die Kinetik der PTS folgt demnach nicht dem Michaelis-Menten Modell.

Stattdessen eignet sich das Modell der unkompetitiven Substratinhibierung gut, um das Verhalten der PTS zu beschreiben. Dieses Modell zeichnet sich dadurch aus, dass ausgehend von dem Enzym-Substrat-Komplex unter Bindung eines weiteren Substratmoleküls sich ein inaktiver Substrat-Substrat-Enzym-Komplex bildet. Die Stabilität dieses Komplexes wird in Gleichung (2) durch die Dissoziationskonstante K_i beschrieben. Je größer K_i ist desto geringer ist der inhibierende Einfluss einer gesteigerten Substratkonzentration.

Mit Hilfe der Software QtiPlot wurden die Werte für K_M und v_{\max} bestimmt. Daraus wurden anschließend die Kennzahlen k_{cat} , K_M/k_{cat} und die spezifische Enzymaktivität berechnet. Die Werte sind gemeinsam mit den in der Literatur verfügbaren Daten in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Die kinetischen Parameter der in dieser Arbeit untersuchten PTS im Vergleich zu den publizierten Daten anderer Patchoulolsynthasen.

| Enzym | v_{\max} [$\mu\text{M}/\text{min}$] | K_M [μM] | k_{cat} [s^{-1}] | k_{cat}/K_M [$\text{s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$] | Spez. Aktivität [U/mg] |
|--|--|----------------------------|---|---|---------------------------|
| Rekombinante PTS | $6,93 \pm 1,33$ | $8,0 \pm 6,5$ | $7,2\cdot 10^{-2}$ | 9.000 | 1,92 |
| PTS aus <i>P. cablin</i> Munck <i>et al.</i> [30] | - | $6,8 \pm 0,5$ | $3,0\cdot 10^{-2}$ | 4.412 | 0,02 |
| Rekombinante PTS, Dequerry <i>et al.</i> [9] | - | $4,45 \pm 0,6$ | $4,3\cdot 10^{-4}$ | 97 | - |

Im Vergleich zu den Literaturwerten weist die in dieser Arbeit untersuchte rekombinante PTS einen leicht erhöhten K_M Wert auf. Der k_{cat} und dementsprechend auch der K_M/k_{cat} Wert sind teilweise deutlich höher als die in der Literatur angegebenen. Insgesamt bewegen sich die Werte aber in der gleichen Größenordnung und im Bereich der bislang für Sesquiterpensynthasen bekannten Werte [61, 67–69]. Die sehr geringe spezifische Aktivität der aus der Pflanze isolierten PTS ist den Autoren zufolge auf eine nicht optimale Aufreinigungsstrategie zurückzuführen [30], sodass der in dieser Arbeit ermittelte Wert plausibel ist.

Der größte Unterschied zu den in der Literatur veröffentlichten Daten ist das Auftreten einer Substratinhibierung. In den beiden Publikationen, die kinetische Daten für die PTS enthalten, wird keine Substratinhibierung beschrieben. Allerdings werden in beiden Veröffentlichungen weder Grafiken zur Kinetik der Enzyme gezeigt noch nähere Angaben zum untersuchten Bereich der Substratkonzentration gemacht.

Entscheidend für die Plausibilität der unkompetitiven Substratinhibierung ist die Fähigkeit der PTS, ein zweites Substratmolekül zu binden. In der Literatur wird übereinstimmend berichtet, dass keine Sesquiterpensynthese bekannt ist, die neben dem aktiven Zentrum über eine zweite Substratbindestelle, z.B. für die Regulation der Enzymaktivität, verfügt. Daher ist zu klären, wie das beobachtete Verhalten der PTS zustande kommen kann. Entscheidend ist dabei die Frage, auf welche Weise ein zweites Substratmolekül an die PTS binden kann, um den für das Modell der unkompetitiven Substratinhibierung erforderlichen Substrat-Substrat-Enzym-Komplex zu bilden.

In einer Publikation von Faraldos *et al.* wurde der Reaktionsmechanismus der Bildung von Patchoulol mit Hilfe von ^2H -markiertem *E,E*-FPP untersucht [38]. Um ein bestimmtes, partiell auftretendes Deuterierungsmuster der Reaktionsprodukte zu erklären, postulierten Faraldos *et al.* die Bildung eines unbekanntes Sesquiterpens in einer hydrophoben Tasche im aktiven Zentrum der PTS. Dieses Sesquiterpen kann nach der Übertragung eines Protons von einem anderen Intermediat in die Reaktionskaskade zurückgeführt werden. Der auf Basis dieser Ergebnisse postulierte Reaktionsweg ist in Abbildung 33 dargestellt.

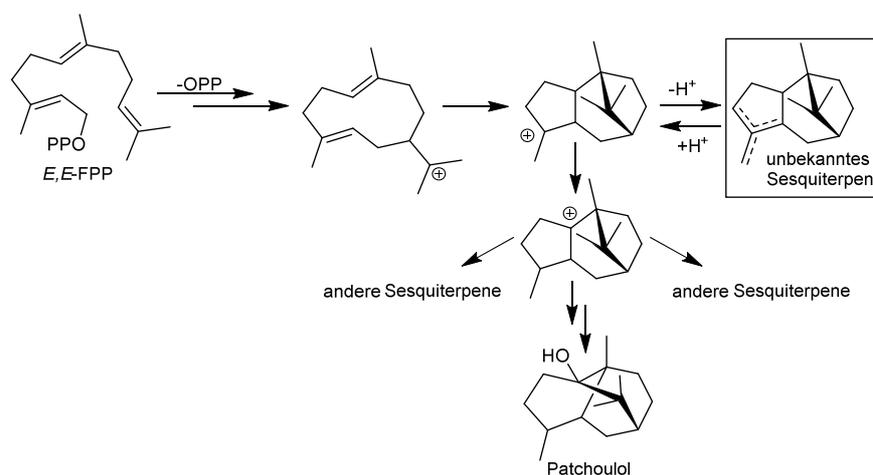


Abbildung 33: Ausschnitt des vereinfachten Reaktionsmechanismus nach Faraldos *et al.* [38].

Die von Faraldos *et al.* beobachtete partielle Doppeldeuterierung kann nur auftreten, wenn das Deuteriumatom eines Substratmoleküls auf ein anderes übertragen werden kann. Zu diesem Zeitpunkt sind dann zwei Substratmoleküle an die PTS gebunden. Das unbekanntes Sesquiterpen in der hydrophoben Tasche ist dann also das zweite Substratmolekül, das den Substrat-Substrat-Enzym-Komplex im Modell der unkompetitiven Substratinhibierung bildet.

4.4.4 Temperatur und pH-Abhängigkeit der Produktselektivität

Bei der PTS handelt es sich um eine Multi-Produkt-Sesquiterpensynthese, die *E,E*-FPP in fünf Hauptprodukte umsetzt: Patchoulol, α -Bulnesen, Guaia-5,11-dien, *trans*- β -Caryophyllen und β -Patchoulen. Der Produktbildungsmechanismus von Sesquiterpensynthesen basiert auf einer Kaskade von carbokationischen Ringschluss-, Umlagerungs- und Abfangreaktionen, die in der aktiven Tasche des Enzyms ablaufen. Am Ende jeder Kaskade wird das Carbeniumion entweder durch die Abstraktion eines Protons oder, wie im Fall von Patchoulol, durch die Reaktion mit Wasser gequenchet. Entscheidend dafür welches Sesquiterpen gebildet wird, ist die chemische und morphologische Beschaffenheit der aktiven Tasche, die den Reaktionsraum dieser Reaktionskaskaden darstellt.

Bei den Versuchen zur Untersuchung des pH- und Temperaturoptimums in Kapitel 4.4.3.1 wurde in jeder GC-Analyse die Peakflächen dieser fünf Hauptprodukte bestimmt und ihre Summe zur Quantifizierung herangezogen. Bei der Durchführung der Versuche fiel auf, dass die Anteile der einzelnen Produkte nicht konstant waren sondern sich in Abhängigkeit der Reaktionsbedingungen veränderten. Um den Einfluss der Temperatur und des pH-Wertes auf die Produktselektivität zu untersuchen, wurden die Anteile jedes der fünf Hauptprodukte bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen ermittelt. Als Datenbasis dienten dabei die GC-Analysen aus Kapitel 4.4.3.1. Die aus der Dreifachbestimmung resultierenden Fehlerbalken, wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Die Resultate für pH-Abhängigkeit der Produktselektivität sind in Abbildung 34 dargestellt.

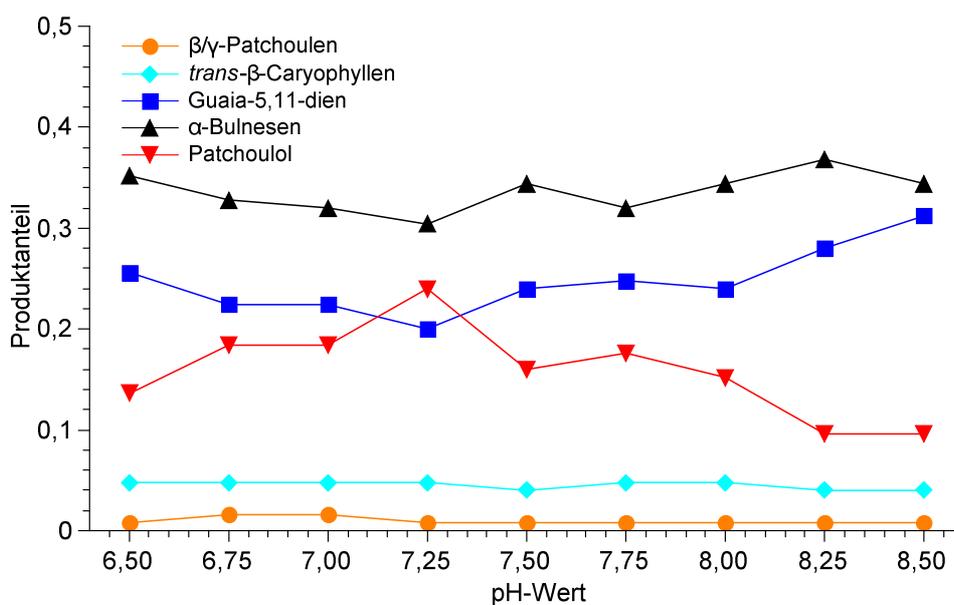


Abbildung 34: Anteil der fünf Hauptprodukte im Patchouliöl der PTS in Abhängigkeit des pH-Wertes des Umsetzungspuffers.

Aus Abbildung 34 geht hervor, dass die Produktselektivität stark durch den pH-Wert während der enzymatischen Umsetzung beeinflusst wird. Es fällt auf, dass der Anteil des Patchoulols bei pH 7,25 mit 26% am höchsten ist und sowohl bei höheren als auch bei niedrigeren pH-Werten signifikant abfällt. Der höchste Patchoulolanteil tritt also exakt am pH-Optimum der PTS auf. Der Patchoulol-Anteil ist insofern von besonderem Interesse, da das Patchoulol der Bestandteil des Patchouliöls ist, der ihm seinen charakteristischen Duft verleiht und damit kommerziell von Bedeutung ist.

Die Anteile der beiden Guaiaen-Isomere α -Bulnesen und Guaia-5,11-dien entwickeln sich weitestgehend parallel zueinander und steigen mit höheren pH-Werten leicht an. Eine wahrscheinliche Erklärung dafür ist, dass bei höheren pH-Werten die Bildung des Guaiaen-Grundgerüsts begünstigt wird. Die Anteile von Patchoulen und *trans*- β -Caryophyllen bleiben bei allen untersuchten pH-Werten praktisch konstant.

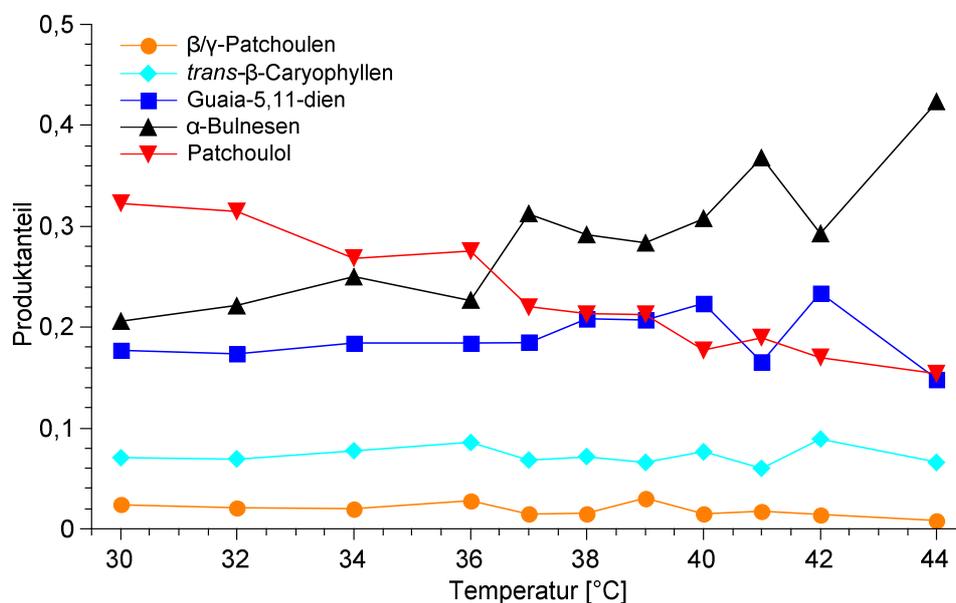


Abbildung 35: Anteil der fünf Hauptprodukte im Patchouliöl der PTS in Abhängigkeit der Temperatur bei der enzymatischen Umsetzung.

Abbildung 35 zeigt die Produktselektivität der PTS in Abhängigkeit der Reaktionstemperatur. Es ist erkennbar, dass auch die Temperatur einen erheblichen Einfluss auf die Produktselektivität hat. Dabei ist ein deutlicher Trend zu erkennen: Mit steigender Temperatur sinkt der Patchoulol-Anteil von 32% bei 30°C bis auf 18% bei 44°C. Gleichzeitig ist ein Anstieg des α -Bulnesen-Anteils von 20,8% auf 43% zu beobachten. Die Anteile der anderen Sesquiterpene bleiben nahezu unverändert.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass die Reaktionsbedingungen einen großen Einfluss auf die Produktselektivität der PTS haben. Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse könnte sein, dass durch die Reaktionsbedingungen sich die Beschaffenheit der aktiven Tasche des Enzyms verändert. Die in der aktiven Tasche ablaufenden Reaktionen können dadurch in Richtung bestimmter Produkte

gelenkt werden. Insbesondere der pH-Wert der Reaktionslösung hat das Potenzial, die Quenching-Reaktionen, wie Deprotonierungen und die Abfangreaktionen mit Wassermolekülen, erheblich zu beeinflussen.

In Anbetracht der kationisch getriebenen Reaktionskaskaden, die bei der Sesquiterpensynthese durchlaufen werden, ist auch der Einfluss der Temperatur ersichtlich. In jeder Kaskade werden bis zur finalen Bildung des Produktes zahlreiche, energetisch sehr ähnliche, kationische Intermediate durchlaufen. Am Anfang der Reaktionskaskade steht dabei noch nicht fest welches Sesquiterpen am Ende gebildet wird. Diese Frage entscheidet sich dadurch welches Intermediat durchlaufen wird [33]. Je nachdem, ob die Reaktion von einem Intermediat zum anderen kinetisch oder thermodynamisch getrieben ist, kann die Temperatur den Reaktionsweg beeinflussen [35]. In der Literatur gibt es keinerlei Erkenntnisse darüber, wie der statistische Mechanismus funktioniert, der schließlich zu einer definierten Zusammensetzung führt.

Im Hinblick auf eine technische Nutzung der PTS sind die gewonnenen Erkenntnisse von großer Bedeutung. Die Zusammensetzung des Patchouliöls, das von der rekombinanten PTS produziert wird, kann somit über die Temperatur und den pH-Wert gesteuert werden. Um beispielsweise den Anteil des wertvollen Patchoulols im Patchouliöl zu steigern, wird daher die enzymatische Umsetzung mit pH 7,25 bei 30°C durchgeführt.

4.4.5 Deuterierungsversuche zur Untersuchung des Reaktionsmechanismus der Patchoulolsynthese

Zuvor konnte gezeigt werden, dass der pH-Wert einen starken Einfluss auf die Produktselektivität der PTS hat. Der Reaktionsmechanismus der Patchoulolbildung durch die PTS ist noch nicht in allen Einzelheiten aufgeklärt [37, 72]. Insbesondere gibt es in der Literatur keine Informationen über weitere Reprotonierungsschritte, wie sie von Faraldos *et al.* postuliert wurden [38].

Da aber die Produktbildung der PTS offensichtlich durch den pH-Wert beeinflusst wird, besteht die Möglichkeit, dass Protonen aus der Reaktionslösung direkt in den Mechanismus der Terpenbildung involviert sind. Um zu untersuchen, ob Protonen aus der Lösung in den Molekülen der gebildeten Sesquiterpene gebunden sind, sollte die enzymatische Umsetzung in einem Umsetzungspuffer auf Basis von deuteriertem Wasser durchgeführt werden. Die Reaktionsprodukte sollten dann mittels GC-MS und mit Hilfe verschiedener NMR-Techniken auf deuterierte Sesquiterpene hin untersucht werden.

4.4.5.1 Massenspektrometrische Untersuchung von deuteriertem Patchouliöl

In diesem Versuch sollte die enzymatische Umsetzung von *E,E*-FPP zu Patchouliöl in einem Puffer aus Deuteriumoxid durchgeführt werden. Das dabei entstehende enzymatische Patchouliöl sollte mit Hilfe einer GC-MS Analyse auf die Deuterierung der Sesquiterpene hin untersucht werden.

Dazu wurde 50 mL eines Umsetzungspuffer (25 mM MOPS, 5 mM MgCl₂·6 H₂O, pH 7,25) mit 99,5%igen D₂O angesetzt. Um eine Verdünnung mit H₂O zu vermindern, wurde der pH-Wert mit einigen Tropfen (~50 µL) 14 M NaOH eingestellt. Für die Durchführung des Umsetzungsversuches wurden 4 mL des Umsetzungspuffers mit 100 µM *E,E*-FPP und 0,5 µM aufgereinigter PTS versetzt. Die Lösung wurde mit 500 µL Pentan überschichtet und bei 38°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Reaktionslösung gründlich durchmischt und danach kurz zentrifugiert. Die organische Phase wurde abgenommen, unter Stickstoff auf 200 µL eingeeengt und mittels GC-FID untersucht (6. B1). Die Probe wurde anschließend mittels GC-MS analysiert (6. B2).

Aus dem Massenspektrum kann anhand der Masse der Molekülionen der gebildeten Produkte ermittelt werden, ob eine Deuterierung der Sesquiterpene vorliegt. Für das in H₂O hergestellte Patchoulol mit der molaren Masse von 222 g/mol wird daher im MS ein Moleküliion mit einem Masse-zu-Ladung-Verhältnis (*m/z*) von 222 erwartet. Da Patchoulol über eine Alkoholgruppe verfügt, die zwangsläufig aus dem Lösemittel stammen muss, wird für das in D₂O hergestellte Patchoulol ein Moleküliion mit der Masse von *m/z* = 223 erwartet. Ein Moleküliion mit einem höheren *m/z* würde auf einen Protonenaustausch mit dem Lösemittel während der Produktbildung hindeuten. Ein Mechanismus, der über den von Faraldos *et al.* postulierten hinausgeht, ist in der Literatur nicht beschrieben [38].

In Abbildung 36 ist ein Ausschnitt des MS von Patchoulol aus einer enzymatischen Umsetzung in H₂O im Vergleich zu dem von Patchoulol aus einer Umsetzung in D₂O (D-Patchoulol) dargestellt.

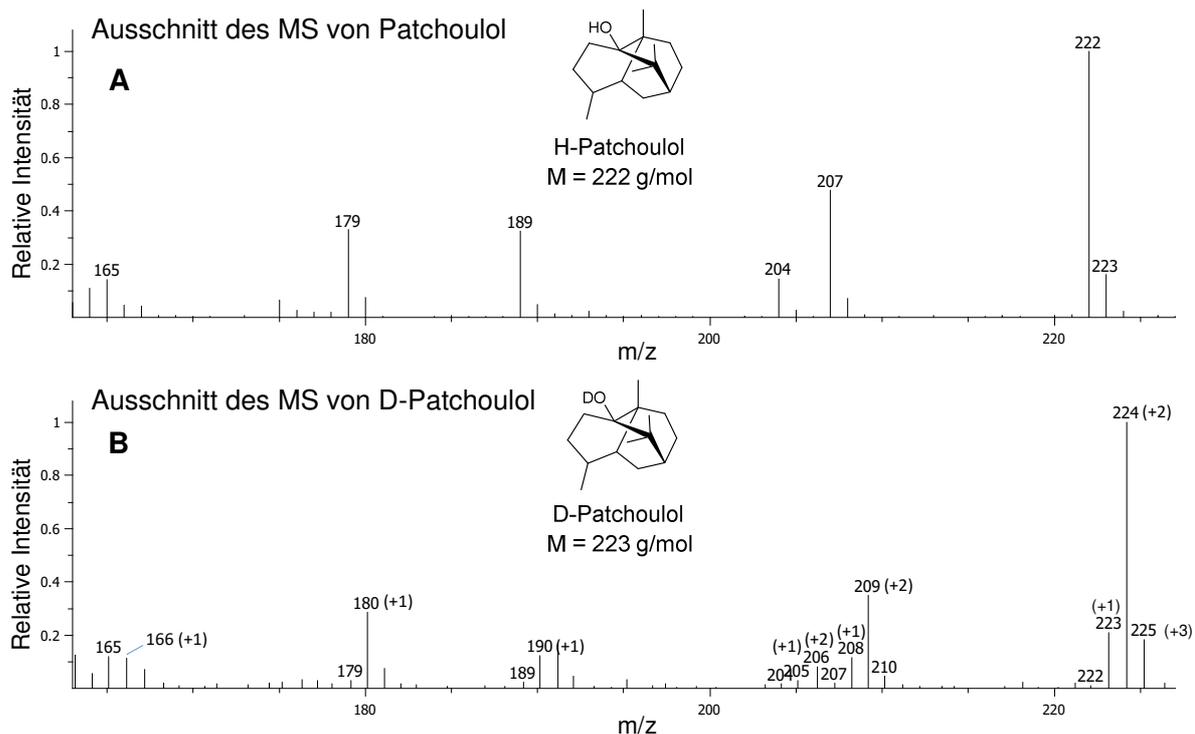


Abbildung 36: Ausschnitt der Massenspektren im Bereich der Molekülonen von Patchoulol aus einer in H_2O durchgeführten Umsetzung mit PTS (A) im Vergleich zu dem D-Patchoulol aus einer Umsetzung mit PTS in D_2O (B). Die Abweichungen des D-Patchoulol vom H-Patchoulol sind in Klammern aufgeführt.

Die Abbildung zeigt, dass sich die beiden Massenspektren deutlich voneinander unterscheiden. Bei dem MS des in H_2O gebildeten Patchoulols weist das Molekülion eine m/z von 222 auf. Im MS des D-Patchoulols ist das m/z des Molekülions hingegen um 2 auf von 224 erhöht. Auch die anderen für Patchoulol charakteristischen Fragmente weisen höhere m/z Werte auf als im H-Patchoulol. Diese Analyse wurde auch für das Molekülion der vier anderen Hauptprodukte der PTS durchgeführt.

Bei den anderen Produkten handelt es sich um unfunctionalisierte Sesquiterpene, weswegen das Molekülion der in H_2O gebildeten Produkte ein m/z von 204 aufweist. Da aber nicht jedes m/z , das größer als das Molekülion ist, automatisch eine deuterierte Spezies darstellt, wurden die Intensitäten der geringfügig größeren m/z aufsummiert und nur der Anteil der einzelnen m/z verglichen. Auf diese Weise kann für jedes der Produkte auf Basis der MS-Ergebnisse ermittelt werden, wie viele Wasserstoffatome im Molekül gegen Deuteriumatome ausgetauscht wurden [38]. Die Resultate sind in Abbildung 37 dargestellt.

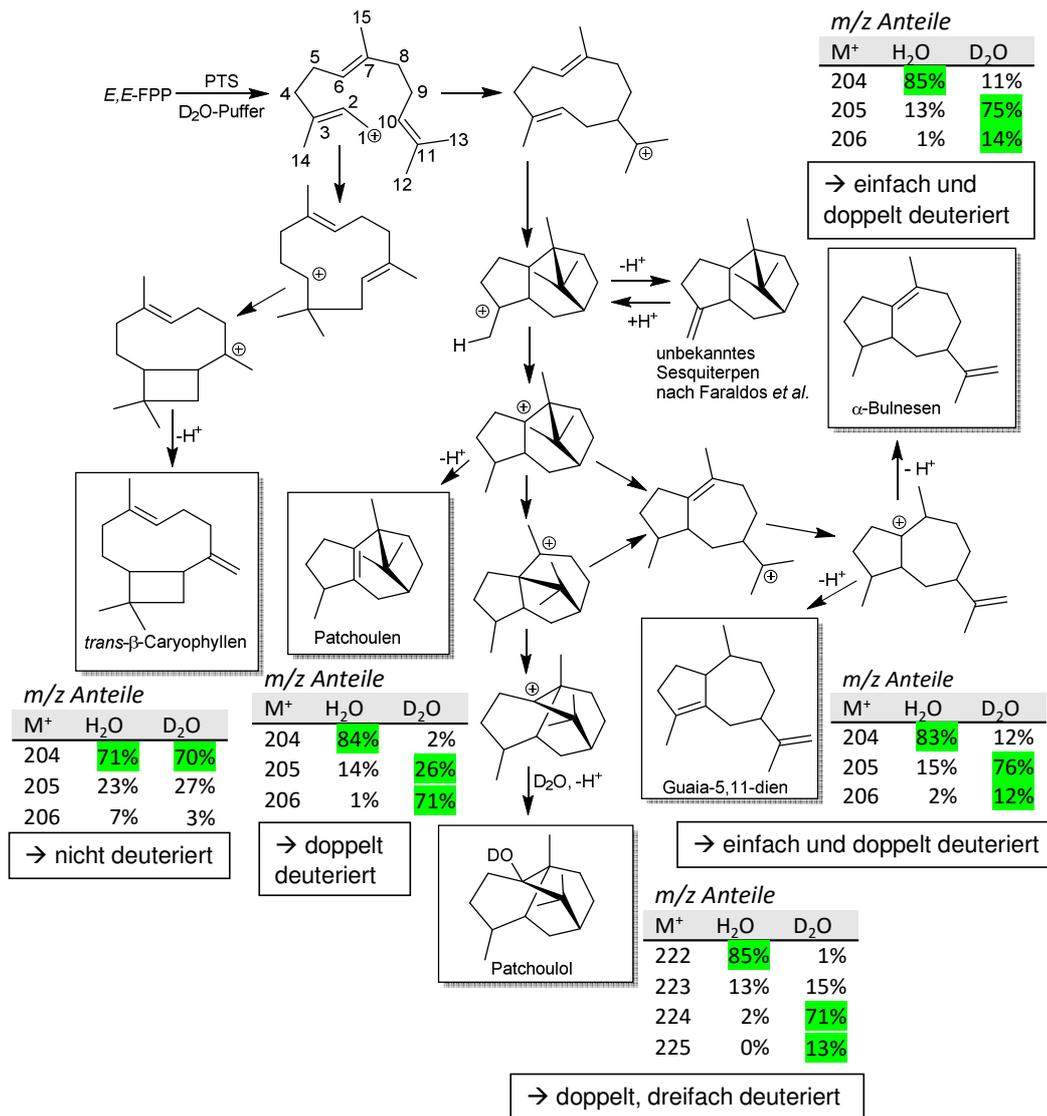


Abbildung 37: Deuterierungsgrad der Hauptprodukte der PTS bei der Verwendung von D₂O-Puffer im Vergleich zu H₂O-Puffer. Nicht alle Reaktionsprodukte weisen die gleiche Anzahl von Deuterierungen auf, der Deuterierungsgrad hängt vom Bildungsmechanismus des einzelnen Sesquiterpens ab.

Aus der Abbildung wird deutlich, dass nicht alle von der PTS gebildeten Sesquiterpene im gleichen Maße deuteriert sind. Während *trans*- β -Caryophyllen überhaupt keine Deuterierung aufweist, treten die Isomere α -Bulnesen und Guaia-5,11-dien einfach und doppelt deuteriert auf. Auch Patchoulen liegt in doppelt deuterierter Form vor. Patchoulol wird in D₂O-Puffer hingegen nur als doppelt und dreifach deuterierte Verbindung gebildet.

Werden diese Ergebnisse vor dem Hintergrund des bisher bekannten Reaktionsmechanismus betrachtet, fällt auf, dass der Deuterierungsgrad vom Reaktionspfad abhängt aus dem das jeweilige Produkt hervorgeht. So ist das *trans*- β -Caryophyllen, das als einziges Hauptprodukt aus dem intermediären Humulylkation entsteht, gar nicht deuteriert, während alle anderen Produkte wenigstens über eine Deuterierung verfügen. Weiterhin weisen die m/z Anteile, die bei den beiden

sehr ähnlichen Verbindungen α -Bulnesen und Guaia-5,11-dien die Einfach- und Doppeldeuterierung anzeigen, fast identische Werte auf.

4.4.5.2 Herstellung und Aufreinigung von deuteriertem Patchoulol zur Untersuchung des Deuterierungsmusters mittels NMR

In Kapitel 4.4.5.1 wurde festgestellt, dass die Durchführung der enzymatischen Reaktion mit der PTS zu einer Deuterierung des Patchoulols und der anderen Bestandteile des Patchouliöls führt. In diesem Versuch sollte daher untersucht werden, an welcher Stelle das Patchoulol deuteriert ist. Daraus können Rückschlüsse gezogen werden, an welcher Stelle des Bildungsmechanismus der für die Deuterierung notwendige Protonierungsschritt erfolgt. Um die exakte Position von Deuteriumatomen im Molekül bestimmen zu können, sind umfangreiche NMR-Analysen erforderlich. Für derartige Analysen sind mindestens 2 mg der Substanz als Reinstoff erforderlich. Daher sollte in diesem Versuch die Herstellung von Patchouliöl in einem ausreichenden Maßstab durchgeführt werden, um daraus Patchoulol als Reinstoff mittels einer präparativen DC zu isolieren.

Dazu wurde die enzymatische Reaktion zur Umsetzung des *E,E*-FPP mit der PTS im 1 L-Maßstab durchgeführt. In einem 2 L Messzylinder wurde 1 L des D₂O-Aktivitätspuffers (25 mM MOPS, 5 mM MgCl₂·6 H₂O, pH 7,25) mit 2 μ M PTS versetzt. Es wurden 150 μ mol des in Kapitel 4.3 hergestellten *E,E*-FPP, gelöst in 1 mL 30 mM NH₄HCO₃-Lösung, in die Reaktionslösung gegeben. Der Messzylinder wurde luftdicht verschlossen und die Lösung in einem Wasserbad unter leichtem Rühren auf 30°C erhitzt. Nach 1 h wurde ein weiteres Aliquot 150 μ mol *E,E*-FPP hinzugegeben und für weitere 17 h inkubiert. Die Reaktionsbedingungen während der Umsetzung wurden auf Basis der Erkenntnisse aus Kapitel 4.4.4 gewählt, um einen maximalen Patchoulol-Anteil zu erzielen.

Nach der Inkubation wurde die Reaktionslösung in einen Schütteltrichter überführt. Dabei war ein intensiver Patchouli-Geruch festzustellen. Zur Extraktion des Patchouliöls wurde die D₂O-Lösung 3 Mal mit 150 mL Pentan extrahiert. Der Extraktionserfolg wurde mittels GC-FID (6. B1) überprüft. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 200 mL gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt, um fein dispergiertes Wasser aus der Pentan-Lösung zu entfernen. Anschließend wurde die organische Phase unter Stickstoff bis auf 1 mL eingengt. Die dabei ausgefallenen NaCl-Rückstände wurde abgetrennt, indem der Überstand vorsichtig dekantiert wurde. Der Überstand wurde vorsichtig unter Stickstoff eingengt, bis ein schwach gelber, öliger Rückstand übrig war. Der Rückstand wurde insgesamt 500 μ L Ethanol aufgenommen und das Patchoulol daraus mittels DC isoliert.

Um das Patchouliöl aufzutrennen, wurde eine modifizierte DC-Methode (6. B6) auf Basis von Faraldos *et al.* verwendet [38]. Die Auftrennung wurde zunächst mit Patchouli-Standard durchgeführt, um die Patchoulol enthaltende Fraktion einwandfrei zu identifizieren. Dazu wurde das Patchouliöl zusammen mit einem Cedrol-Standard auf eine DC-Karte (mit Kieselgel 60 beschichtete Aluminiumplatten, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) aufgetragen. Cedrol wurde als

Vergleichssubstanz verwendet, da Patchoulol als Reinstoff nicht kommerziell erhältlich ist. Cedrol ist ein gutes Modell, da es genauso wie Patchoulol ein tricyclisches Sesquiterpen mit einer tertiären Alkoholgruppe darstellt. Der erste DC-Lauf wurde mit Pentan über eine Laufstrecke von 7,2 cm durchgeführt. Für den zweiten DC-Lauf wurde ein Lösemittelgemisch aus Pentan/Ethylacetat (95:5) verwendet. Anschließend wurde eine spezielle Anisaldehyd-Färbung für Terpene durchgeführt. Die angefärbte DC-Karte ist in Abbildung 38 gezeigt.

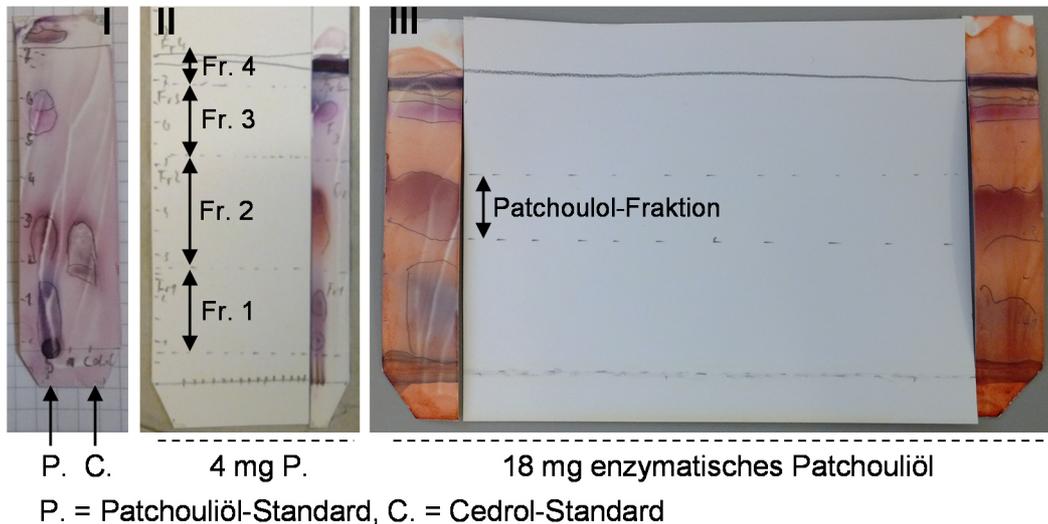


Abbildung 38: DC zur Isolierung von Patchoulol aus Patchouliöl. Dazu wurde mit DC I der Patchoulol-Spot identifiziert. In DC II wurde die Karte in Fraktionen unterteilt, um die aufgetrennten Inhaltsstoffe mittels GC-FID zu analysieren. DC-Karte III zeigt die präparative Auftrennung des deuterierten Patchouliöls, um Patchoulol für eine NMR-Untersuchung zu isolieren.

Mit der DC-Karte (I) kann der Patchoulol-Spot anhand des Cedrol-Spots zugeordnet werden. Zusätzlich sollte das Patchoulol auch mittels GC-FID identifiziert werden. Da die Anisaldehyd-Färbung die Analyten zerstört, musste das Patchoulol ohne Färbung von der DC-Karte isoliert werden. Dazu wurde der Patchouliöl-Standard in einer Linie aufgetragen und die DC durchgeführt. Danach wurde ein schmaler Streifen von der DC-Karte abgeschnitten und dieser angefärbt (DC-Karte II). Gemäß der angefärbten Bereiche wurde der Teil der nicht gefärbten DC-Karte in 4 Fraktionen unterteilt. Die Fraktionen wurden ausgeschnitten, das Kieselgel abgekratzt und mit 1 mL Pentan über Nacht extrahiert. Für die Isolierung des deuterierten Patchoulols aus dem enzymatischen Patchouliöl wurde analog vorgegangen (DC-Karte III). Die Extrakte wurden vom Kieselgel getrennt und mittels GC-FID (6. B1) analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 39 dargestellt.

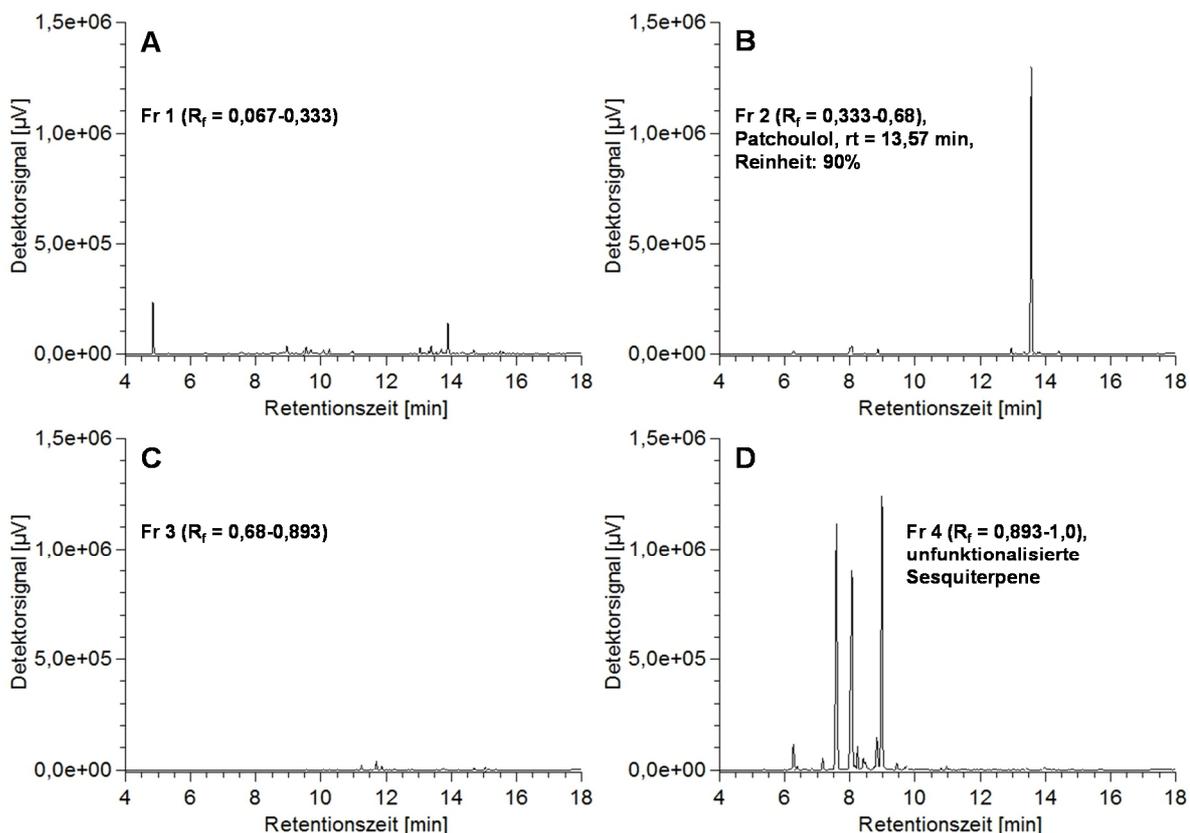


Abbildung 39: Ergebnisse der GC-FID Analysen der Fraktionen aus der DC-Auftrennung von Patchouliöl. Nur die Chromatogramme B und D zeigen die charakteristischen Signale des Patchouliöls.

Die Gaschromatogramme der Fraktionen der Auftrennung von Patchouliöl zeigen, welche Fraktionen signifikante Mengen Sesquiterpene enthalten. Aus Chromatogramm B wird deutlich, dass Patchoulol mit einer Retentionszeit von 13,54 min ausschließlich in Fraktion 2 vorhanden ist und eine Reinheit von 90% aufweist. In Fraktion 4 (Chromatogramm D) sind die anderen Sesquiterpene des Patchouliöls enthalten, die auf Grund der fehlenden Funktionalisierung keine Wechselwirkungen mit der stationären Phase aufbauen können.

Für die NMR-Untersuchung des deuterierten Patchoulols wurde das Lösemittel des Extrakts unter Stickstoff entfernt. Der Rückstand wurde in 0,7 mL $CDCl_3$ aufgenommen und in ein NMR-Röhrchen überführt. Zum Vergleich wurde auch eine Probe von nicht deuteriertem Patchoulol vermessen, das aus dem analytischen Standard wie oben beschrieben isoliert wurde.

Von beiden Verbindungen wurden 1H - und ^{13}C -Spektren aufgenommen (6. B7). Zusätzlich wurden ^{13}C -HMQC (heteronuclear multiple quantum coherence) und ^{13}C -HMBC (heteronuclear multiple bond correlation) aufgenommen, um sowohl die direkte Kopplung zwischen 1H - und ^{13}C -Kernen, als auch eine Korrelation koppelnder Kerne über mehrere Bindungen zu untersuchen (6. C4). Die NMR-Messungen wurden freundlicherweise vom Institut für Organische Chemie der Leibniz Universität

Hannover durchgeführt. Das Resultat ist anhand der Breitband-entkoppelten ^{13}C -Spektren in Abbildung 40 dargestellt.

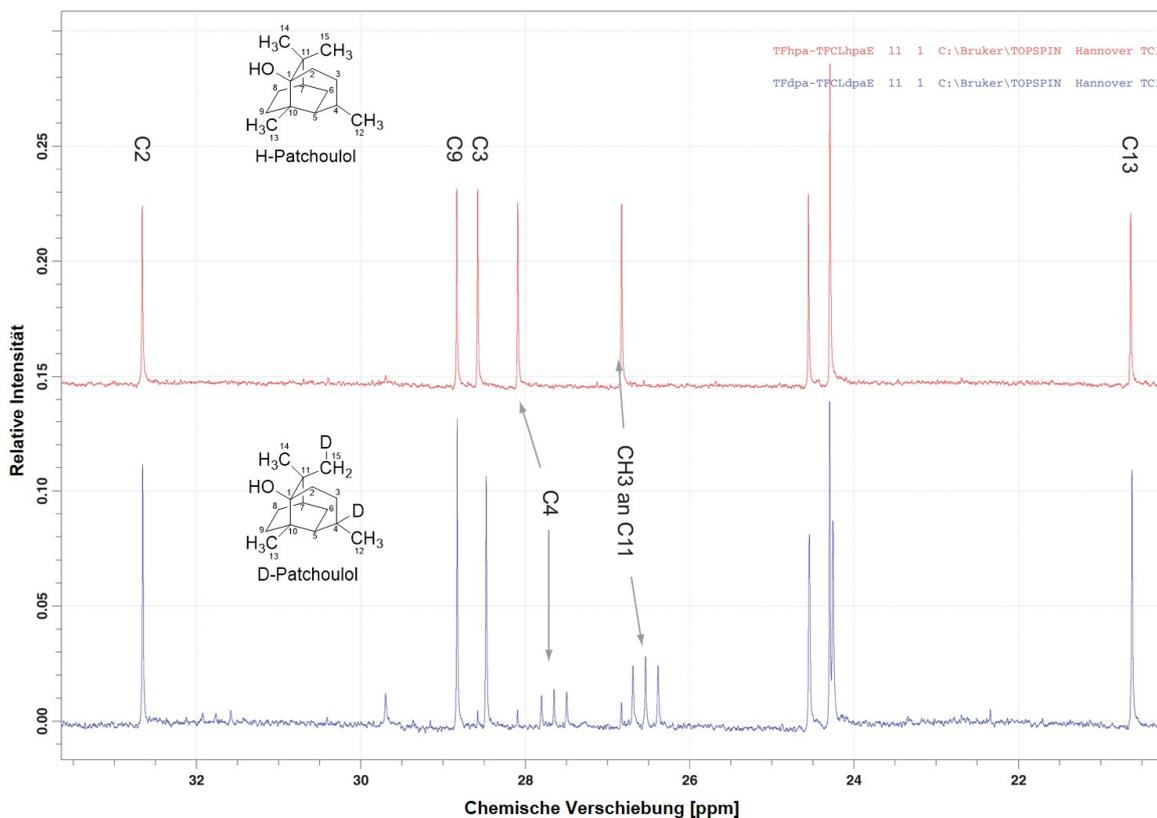


Abbildung 40: Breitband-entkoppelte ^{13}C -NMR Spektren von Patchoulol (oben) im Vergleich zum Patchoulol aus dem Deuterierungsversuch (unten). Es ist erkennbar, dass die Signale der Kerne von C4 und C11 im Spektrum des D-Patchoulol zu einem Tripletts aufgespalten sind.

In der Abbildung wird das Breitband-entkoppelte ^{13}C -Spektrum des aus dem Standard isolierten Patchoulols mit dem des Patchoulol aus der enzymatischen Umsetzung in D_2O -Puffer verglichen. Dabei wird deutlich, dass zwei Singulets im H-Patchoulol Spektrum im D-Patchoulol Spektrum zu Triplets aufgespalten sind. Die Aufspaltung ist auf die Kopplung eines ^{13}C -Kerns mit einem Spin 1 Kern wie Deuterium zurückzuführen. Die aufgespaltenen Signale können dem C4-Kern und einem Kern an C11 zugeordnet werden. Das bedeutet, dass im Molekül an zwei Stellen ein ^1H - gegen ein ^2D -Atom ausgetauscht wurde. Dabei handelt es sich einmal um die Position am C4 und um eine der beiden CH_3 -Gruppen, die am C11 gebunden sind, also C14 oder C15. Welche der beiden Gruppen deuteriert ist, konnte auf Grund der ähnlichen chemischen Umgebung nicht geklärt werden.

Die Ergebnisse der NMR-Untersuchungen zeigen, dass das Kohlenstoffgerüst des Patchoulols an zwei Stellen deuteriert ist. Die Deuterierung an C4 bestätigt das von Faraldos *et al.* postulierte intermediäre Sesquiterpen und steht nicht im Widerspruch zum publizierten Mechanismus der Patchoulol-Bildung [9, 38]. Die Deuterierung an einer der beiden Methylgruppen am C11 ist jedoch mit keinem veröffentlichten Mechanismus erklärbar.

4.4.5.3 Zusammenfassung und Diskussion der Deuterierungsversuche

In diesem Abschnitt sollte der Reaktionsmechanismus der PTS untersucht werden. Insbesondere sollte geklärt werden, ob ein Protonenaustausch mit dem Lösemittel stattfindet. Dazu wurde die enzymatische Umsetzung in D₂O-Puffer durchgeführt, um auf diese Weise deuterierte Reaktionsprodukte zu erhalten. Die daraus gebildeten Sesquiterpene wurden zunächst mittels GC-MS analysiert. Es wurde festgestellt, dass die Kohlenstoffgerüste der Reaktionsprodukte unterschiedlich stark deuteriert sind und die Anzahl der Deuterierungen abhängig vom Bildungsmechanismus der einzelnen Verbindung ist. Da die MS-Analysen nur Hinweise auf das Ausmaß der Deuterierung geben können und keine Informationen über die exakte Position des Deuteriumatoms im Molekül liefern können, wurden daher zusätzlich NMR-Untersuchungen durchgeführt. Von besonderen Interesse war dabei das Deuterierungsmuster des Patchoulols, da es von allen Produkten der PTS die komplexeste Struktur aufweist.

Da für eine NMR-Analyse mehrere Milligramm des Reinstoffes erforderlich sind, wurde die enzymatische Umsetzung im 1 L Maßstab durchgeführt und das Patchoulol anschließend mittels DC isoliert. Die Resultate der NMR-Untersuchungen ergab, dass das Kohlenstoffgerüst an zwei Stellen deuteriert ist, was die auf Basis der MS-Daten vermutete Mehrfachdeuterierung des Patchoulols und der anderen Hauptprodukte der PTS teilweise erklärt. Während die Deuterierung am tertiären Kohlenstoffatom C4 noch durch den von Faraldos *et al.* postulierten Mechanismus unter Annahme eines intermediären Sesquiterpens erklärbar ist, gibt es in der Literatur für die andere Deuterierung an C14 oder C15 keine Grundlage [38]. Daher wurde auf Basis der gewonnenen Erkenntnisse aus den NMR-Daten ein neuer Vorschlag für die Patchoulol-Biosynthese postuliert. Die mechanistischen Überlegungen sind in Abbildung 41 dargestellt.

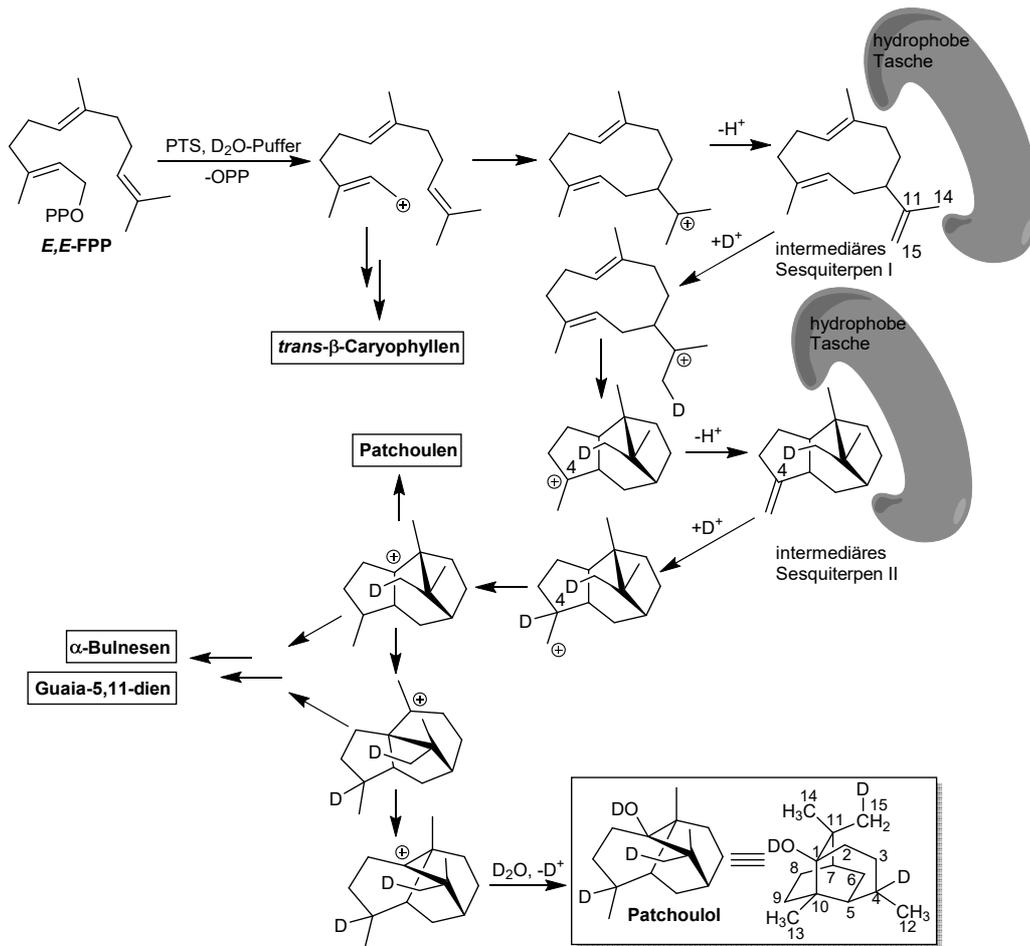


Abbildung 41: Auf Basis der NMR-Daten postulierter Reaktionsmechanismus der durch die PTS katalysierten Patchoulol-Bildung.

Der Unterschied dieses postulierten Mechanismus im Vergleich zu den in der Literatur verfügbaren Vorschlägen ist das Auftreten von zwei intermediären Sesquiterpenen. Dabei wird angenommen, dass es zunächst durch einen Deprotonierung zur Bildung einer neutralen Verbindung in einer hydrophoben Tasche der PTS kommt. Dieses neutrale Molekül könnte dann in einem Reprotonierungsschritt deuteriert werden, um danach wieder zurück in die Reaktionskaskade zu gelangen. Nur auf diese Weise ist die mittels NMR nachgewiesenen Deuterierungen am Kohlenstoffgerüst zu erklären.

4.4.6 Versuche zur Substrat-Flexibilität (substrate scope)

In diesem Kapitel sollte die Substratflexibilität der PTS untersucht werden indem mit verschiedenen Substraten enzymatischen Umsetzungen durchgeführt wurden. Für eine mögliche Verwendung der PTS als ein *in vitro* Katalysator für die Synthese von terpenoiden Kohlenstoffgerüsten sind diese Erkenntnisse wichtig, um das katalytische Potential der PTS richtig einschätzen zu können.

4.4.6.1 Umsetzungsversuche mit den Monoterpenvorläufern Geranyl- und Nerylpyrophosphat

Es sollte zunächst untersucht werden, ob die PTS kleinere Substratmoleküle (C_{10}) als das *E,E*-FPP (C_{15}) umsetzt. Dazu wurden die Kapitel 4.3 hergestellte Monoterpenvorläufer Geranylpyrophosphat (GPP) und Nerylpyrophosphat (NPP) untersucht. Während GPP in der Natur den Ausgangsstoff für die Biosynthese von Monoterpenen darstellt, ist das *Z*-Isomer NPP ein nicht-natürlicher Monoterpenvorläufer. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 42 dargestellt.

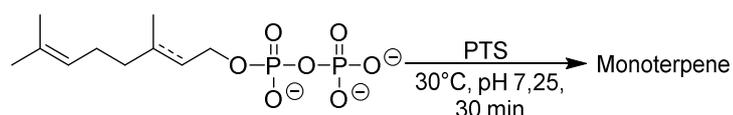


Abbildung 42: Reaktionsschema zur Umsetzung der Monoterpenvorläufer NPP und GPP.

Für die Durchführung der Umsetzungsversuche wurden 4 mL Umsetzungspuffer (50 mM MOPS, 10 mM MgCl_2 , pH 7,25) in einem verschließbaren 5 mL Reaktionsgefäß mit 100 μM des Monoterpenvorläufers und 2 μM aufgereinigter PTS versetzt. Die Lösung wurde mit 500 μL Pentan überschichtet und anschließend bei 30°C für 30 min in einem Wasserbad inkubiert. Um die terpenoiden Reaktionsprodukte aus der wässrigen Lösung zu isolieren, wurde die Lösung kräftig geschüttelt und anschließend kurz zentrifugiert. Die organische Phase wurde abgenommen, auf ein Volumen von 200 μL eingengt und mittels GC-MS analysiert. Die GC-MS Messungen wurden freundlicherweise vom Institut für Lebensmittelchemie der Leibniz Universität Hannover durchgeführt.

Die Reaktionsprodukte wurden durch den Vergleich der erhaltenen Massenspektren mit der digitalen Spektrenbibliothek sowie mit Spektren aus der Literatur charakterisiert. Die Auswertung wurde dabei mit der Software Xcalibur 1.2 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) durchgeführt. Zusätzlich wurden die Kovats Indizes (RI) zur Identifizierung der Substanzen herangezogen. Die Resultate sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Reaktionsprodukte der Umsetzungen von GPP und NPP mit der PTS.

| Substrat | RI ^a | Rel. [%] | MS-Peaks ^b | Substanz | CAS | Nachweis |
|------------|-----------------|----------|--|---------------|------------|---------------------|
| GPP | | | | | | |
| | 1.179 | 9,6 | 41 ^c , 69, 93, 53, 136 ^d | β-Myrcen | 123-35-3 | ^e , [73] |
| | 1.206 | 17,2 | 39 ^c , 67, 93, 79, 136 ^d | Limonen | 138-86-3 | ^e , [74] |
| | 1.281 | 1,5 | 93 ^c , 41, 79, 53, 136 ^d | Sabinen | 3387-41-5 | ^e |
| | 1.690 | 22,5 | 59 ^c , 93, 121, 136, 154 ^d | α-Terpineol | 98-55-5 | ^e , [74] |
| | 1.844 | 49,1 | 41 ^c , 69, 53, 93, 154 ^d | Geraniol | 106-24-1 | ^e , [75] |
| NPP | | | | | | |
| | 1.155 | 4,7 | 93 ^c , 69, 41, 79, 136 ^d | β-Myrcen | 123-35-3 | ^e , [73] |
| | 1.165 | 1,3 | 40 ^c , 121, 44, 93, 136 ^d | Z-Ocimen | 29714-87-2 | ^e |
| | 1.185 | 39,3 | 39 ^c , 67, 93, 79, 136 ^d | Limonen | 138-86-3 | ^e , [74] |
| | 1.270 | 10,3 | 93 ^c , 121, 136 ^d , 91, 40 | α-Terpinolen | 586-62-9 | ^e , [76] |
| | 1.452 | 3,4 | 40 ^c , 71, 93, 81, 154 ^d | Sabinenhydrat | 17699-16-0 | ^e , [77] |
| | 1.539 | 3,7 | 71 ^c , 40, 93, 55, 154 ^d | Linalool | 78-70-6 | ^e , [78] |
| | 1.690 | 32,6 | 59 ^c , 93, 121, 136, 154 ^d | α-Terpineol | 98-55-5 | ^e , [74] |
| | 1.787 | 4,6 | 69 ^c , 41, 93, 53, 154 ^d | Nerol | 106-25-2 | ^e , [79] |

^aKovats Indizes bestimmt mit Hilfe einer n-Alkan Standardreihe (C₈-C₂₅) auf einer Zebron-WAX Säule (30 m, 0,25 mm I.D., 0,25 µm Filmdicke) mit Wasserstoff als Trägergas; ^bMS Peaks, Hauptfragmentationen in abnehmender Reihenfolge der relativen Intensität; ^cBasis-Peak; ^dMolekülion (M⁺); ^edigitale MS-Spektren Bibliothek (Wiley08/NIST08, 2008).

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass sowohl GPP als auch NPP von der PTS erfolgreich umgesetzt wurden. Dabei wurden aus beiden Substraten strukturell sehr unterschiedliche Produkte gebildet. Das Produktspektrum umfasst acyclische, monocyclische und bicyclische Monoterpene, von denen einige hydroxyliert sind. Das Hauptprodukt der Umsetzung von GPP ist mit einem Anteil von 49,1% der Terpenalkohol Geraniol, der entsteht, wenn das nach der Dephosphorylierung gebildete Geranylkation umgehend von Wasser abgefangen wird. Bei der Umsetzung von NPP kommt es ebenfalls zur Bildung des korrespondierenden Alkohols, allerdings beträgt der Anteil des Nerols nur 4,6% am Produktgemisch. Die Hauptprodukte der NPP-Umsetzung sind Limonen mit einem Anteil von 39,3%, α-Terpineol mit 32,6% und α-Terpinolen mit 10,3%.

Bemerkenswert ist, dass alle drei Substanzen das gleiche Kohlenstoffgerüst aufweisen. Der Grund dafür liegt im kationischen Reaktionsmechanismus, der bei allen Terpensynthesen für die Umwandlung der aktivierten Terpenalkohole verantwortlich ist. Die von Croteau *et al.* postulierten Reaktionsmechanismen einiger ausgewählter Reaktionsprodukte sind in Abbildung 43 dargestellt [80].

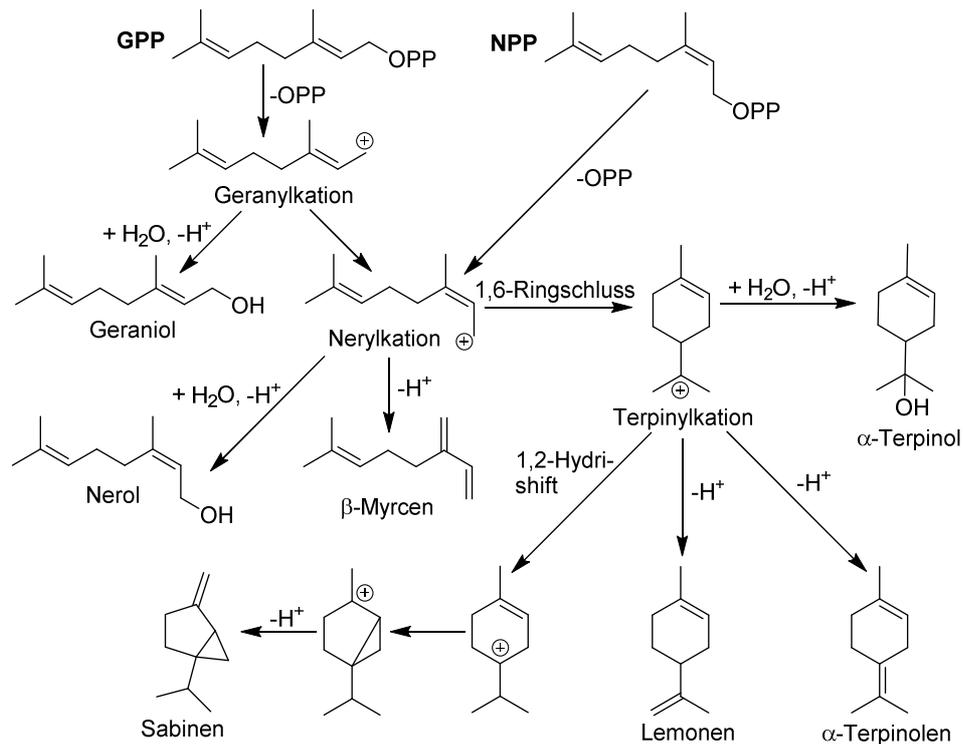


Abbildung 43: Produktbildungsmechanismus für die einige der Hauptprodukte der Umsetzung von GPP und NPP.

Aus Abbildung 43 wird deutlich, warum bei der Umsetzung von NPP vor allem Limonen, α -Terpineol und α -Terpinolen gebildet werden: Das für diese drei Produkte wichtige Nerylkation stellt mit seiner Z-konfigurierten Doppelbindung sterisch das bessere Intermediat für den 1,6-Ringschluss zum zentralen Terpinylkation dar als das Geranylkation mit seiner E-Doppelbindung. Ausgehend vom Geranylkation ist hingegen zunächst eine Isomerisierung der Doppelbindung notwendig, um zu den drei Verbindungen zu gelangen. Da die Isomerisierung in Konkurrenz zu anderen Reaktionen, wie z.B. dem Quenching durch Wasser, steht, ist der Anteil von Limonen, α -Terpineol und α -Terpinolen im Produktspektrum der GPP-Umsetzung deutlich geringer.

Die Versuche haben gezeigt, dass die PTS in der Lage ist, auch die Monoterprenvorläufer GPP und NPP umzusetzen. Dass einige Sesquiterpensynthesen kleinere Substrate akzeptieren, ist in der Literatur bekannt [62, 81–83]. Die Substratflexibilität der PTS wurde allerdings bisher noch nicht untersucht, so dass keine Daten zum Vergleich des Produktspektrums vorliegen.

Bei allen der gebildeten Produkte handelt sich um Substanzen, die als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe auch in ätherischen Ölen vorkommen [84–87]. Verbindungen wie α -Terpineol, Limonen und β -Myrcen finden dabei in der Herstellung von Parfüms und Körperpflegeprodukten Verwendung [88]. Bei Sabinen und Terpinolen handelt es sich um biologisch potente Stoffe. Während Terpinolen ein Alarmpheromon ist [89], weist Sabinen eine stark nekrotische Wirkung auf, so dass es früher zur Behandlung von Hautinfektionen verwendet wurde [90].

4.4.6.2 Umsetzungsversuche mit alternativen Sesquiterpenvorläufern

Da gezeigt werden konnte, dass die PTS auch kleinere Substrate (GPP, NPP) umsetzen kann, sollte daher die Substratflexibilität mit alternativen Sesquiterpenvorläufern untersucht werden. Dazu wurden die in Kapitel 4.3 synthetisierten *E,Z*-Isomere *2Z,6E*-FPP und *2E,6Z*-FPP verwendet. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 44 dargestellt.

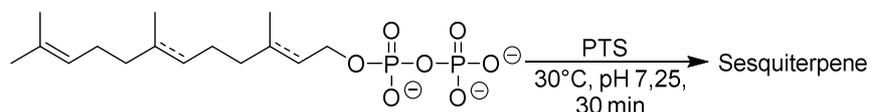


Abbildung 44: Reaktionsschema der Umsetzung der *EZ*-Isomere von FPP mit der PTS.

Die Umsetzungsversuche wurde durchgeführt, indem 4 mL Umsetzungspuffer (50 mM MOPS, 10 mM MgCl₂, pH 7,25) in einem verschließbaren 5 mL Reaktionsgefäß mit 100 μM des Monoterpenvorläufers und 2 μM aufgereinigter PTS wurden. Die Reaktionslösung wurde mit 500 μL Pentan überschichtet und anschließend bei 30°C für 30 min in einem Wasserbad inkubiert. Zur Isolierung der Produkte wurde die Lösung gründlich durchmischt und anschließend zentrifugiert. Die organische Phase wurde abgetrennt und unter Stickstoff auf ein Volumen von 200 μL reduziert. Die Probe wurde anschließend mittels GC-MS analysiert (6. B2).

Um die Produkte der enzymatischen Umsetzung zu charakterisieren, wurden die erhaltenen Massenspektren mit denen einer digitalen Spektrenbibliothek sowie mit Spektren aus der Literatur verglichen. Die Auswertung erfolgte dabei mit der Software Xcalibur 1.2 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA). Zusätzlich wurden die normierten Retentionszeiten (RI) zur Identifizierung der Substanzen herangezogen. Die Resultate sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Produkte der Umsetzung der *E,Z*-Isomere von FPP mit der PTS.

| Substrat | RI ^a | Rel. [%] | MS Peaks ^b | Substanz | CAS | Nachweis |
|--------------------------------|-----------------|----------|--|---|------------|-------------------------|
| 2<i>Z</i>,6<i>E</i>-FPP | | | | | | |
| | 1.473 | 6,0 | 105 ^c , 119, 93, 161, 204 ^d | Ylangen | 14912-44-8 | ^e , [91] |
| | 1.539 | 26,2 | 161 ^c , 105, 133, 91, 204 ^d | α -Gurjunen | 489-40-7 | ^e , [92] |
| | 1.662 | 24,5 | 105 ^c , 91, 161, 105, 204 ^d | γ -Gurjunen | 22567-17-5 | ^e , [92] |
| | 1.679 | 1,8 | 105 ^c , 93, 133, 204 ^d | Longifolen | 475-20-7 | ^e |
| | 1.686 | 0,7 | 40 ^c , 189, 93, 105, 204 ^d | α -Chamigren | 18431-82-8 | ^e , [93] |
| | 1.706 | 4,0 | 161 ^c , 119, 105, 134, 204 ^d | δ -Cadinen | 483-76-1 | ^e |
| | 1.715 | 2,2 | 105 ^c , 161, 93, 40, 204 ^d | α -Muurolen | 31983-22-9 | ^e |
| | 1.738 | 3,9 | 67 ^c , 93, 107, 81, 204 ^d | <i>Z</i> -Germacren A | 75023-40-4 | ^e |
| | 1.748 | 1,8 | 161 ^c , 119, 105, 134, 204 ^d | Cadina-1,4-dien | 483-76-1 | ^e , [94] |
| | 1.789 | 19,0 | 121 ^c , 93, 105, 41, 204 ^d | unbekannt, vermutlich <i>Z</i> -Germacren B | 15423-57-1 | ^e , [95] |
| | 1.982 | 1,3 | 43 ^c , 161, 105, 121, 222 ^d | Germacren-D-4-ol | 72120-50-4 | ^e |
| | 2.070 | 2,9 | 43 ^c , 161, 105, 81, 222 ^d | Epiglobulol | 552-02-3 | ^e , [74] |
| | 2.301 | 5,6 | 69 ^c , 41, 81, 93, 222 ^d | 2 <i>Z</i> ,6 <i>E</i> -Farnesol | 3790-71-4 | ^e , [96] |
| 2<i>E</i>,6<i>Z</i>-FPP | | | | | | |
| | 1.670 | 3,1 | | β -Elemen | 30824-67-0 | ^e [97], [73] |
| | 1.715 | 39,9 | | unbekannt, vermutlich 5 <i>Z</i> -Germacren B | | |
| | 1.720 | 52,2 | 67 ^c , 93, 107, 53, 205 ^d | unbekannt, vermutlich 5 <i>Z</i> -Germacren A | 75023-40-4 | [97] |
| | 2.322 | 4,9 | 69 ^c , 41, 81, 93, 222 ^d | 2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> -Farnesol | 3879-60-5 | ^e , [98] |

^aKovats Indizes bestimmt mit Hilfe einer *n*-Alkan Standardreihe (C₈-C₂₅) auf einer Zebron-WAX Säule (30 m, 0,25 mm I.D., 0,25 μ m Filmdicke) mit Wasserstoff als Trägergas; ^bMS Peaks, Hauptfragmentionen in abnehmender Reihenfolge der relativen Intensität; ^cBasis-Peak; ^dMolekülion (M⁺); ^edigitale MS-Spektren Bibliothek (Wiley08/NIST08, 2008).

Sowohl das 2*Z*,6*E*-FPP also auch das 2*E*,6*Z*-FPP wurden von der PTS als Substrat akzeptiert. Die Umsetzung des 2*Z*,6*E*-FPP führte dabei zu insgesamt 13 strukturell sehr unterschiedlichen Produkten, wobei die Hydrolyse des Substrates zum korrespondierenden Alkohol 2*Z*,6*E*-Farnesol nur in untergeordnetem Maße erfolgte. Bei allen darüber hinaus gebildeten Produkten handelte es sich um mono-, bi-, oder tricyclische Sesquiterpene. Dabei fällt auf, dass mit Ausnahme des in geringen Mengen gebildeten Germacren-D-4-ol und Epiglobulol, keine hydroxylierten Reaktionsprodukte gebildet wurden. Die Strukturformeln der Hauptprodukte sind in Abbildung 45 dargestellt.

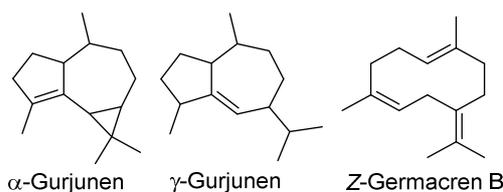


Abbildung 45: Unter den Hauptprodukten der Umsetzung von $2Z,6E$ -FPP befinden sich ein monocyclisches, ein bicyclisches und ein tricyclisches Sesquiterpen.

Die drei Hauptprodukte der enzymatischen Umsetzung sind α -Gurjunen mit einem Anteil von 26,2%, γ -Gurjunen mit 24,5% und eine unbekannte, sesquiterpenoide Substanz mit einem Anteil im Produktgemisch von 19,0%. Diese Substanz konnte zwar nicht eindeutig identifiziert werden, aber das Massenspektrum und der RI-Wert weisen darauf hin, dass es ein Germacren-Kohlenstoffgerüst aufweist, in dem eine Doppelbindung Z- anstatt E-konfiguriert ist. Darüber hinaus wurden Verbindungen wie Ylangen, Cadinen und Longifolen identifiziert, die als Duftstoffe in Parfüms und Kosmetikprodukten verwendet werden [99–101].

Während sich bei der Umsetzung des $2Z,6E$ -FPP eine Vielzahl von Sesquiterpenen bildeten, wurde das $2E,6Z$ -FPP-Isomer nur zu vier Substanzen umgesetzt. Die beiden Hauptprodukte, die zusammen über 90% der gebildeten Produkte ausmachen, konnten nicht anhand ihrer Massenspektren über einen Abgleich mit Vergleichsspektren identifiziert werden. Das Fragmentierungsmuster und die RI-Werte der beiden Substanzen weisen darauf hin, dass es sich bei den beiden Verbindungen um Germacren-Derivate handeln könnte, bei denen die Z-konfigurierte Doppelbindung aus dem Substrat konserviert ist.

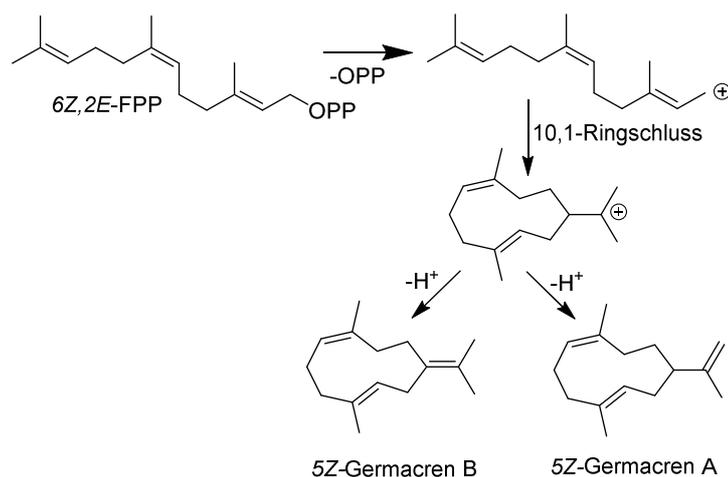


Abbildung 46: Postulierte Reaktionsprodukte der Umsetzung von $2E,6Z$ -FPP mit der PTS.

Die Bildung der in Abbildung 46 dargestellten Verbindungen ist insofern plausibel, als das Germacren-Gerüst die Folge einer vergleichsweise simplen Cyclisierung ist. Dieser 10,1-Ringschluss ist nach der Dephosphorylierung der Ausgangspunkt der kationischen

Reaktionskaskade für die meisten Sesquiterpene. Die *Z*-konfigurierte Doppelbindung des *2Z,6E*-FPP stellt dabei eine sterische Erleichterung dar.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die PTS eine hohe Substratflexibilität aufweist und beide nicht-natürlichen Sesquiterpenvorläufer zu vielen unterschiedlichen Verbindungen umgesetzt hat. Bei der Umsetzung des *2E,6Z*-FPP, das dem *E,E*-FPP strukturell ähnlicher ist, wurden deutlich mehr Produkte gebildet als bei der Umsetzung des *2Z,6E*-FPP. Beide Substrate wurden fast ausschließlich in natürliche und nicht-natürliche cyclische Sesquiterpene überführt. Die mechanistisch einfachste Reaktion, die Hydrolyse zum korrespondieren Terpenalkohol, fand nur im geringen Ausmaß (4-5%) statt.

4.4.6.3 Umsetzungsversuche mit Farnesylmonophosphat und Farnesyltriphosphat

Bei den bislang erprobten Substraten zur Untersuchung der Substratflexibilität der PTS handelte es sich ausschließlich um Diphosphatester (Pyrophosphate). In diesem Kapitel sollte geprüft werden, ob auch Mono- und Triphosphatester von der PTS umgesetzt werden können. Bei der in Kapitel 4.3 angewendeten Methode zur Substratsynthese nach Keller *et al.* entstehen als Nebenprodukte auch das Mono- und Triphosphat. Sollte eines oder beide Verbindungen von der PTS umgesetzt werden können, würde dies die für die Terpensynthese relevante Substratausbeute erheblich steigern.

Für die Umsetzungsversuche wurde das in Kapitel 4.3 isolierte FMP und FTP verwendet. Zum Vergleich wurde zudem eine Umsetzung mit *E,E*-FPP durchgeführt. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 47 dargestellt.

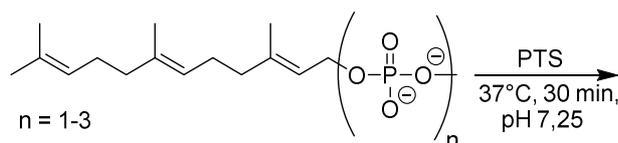


Abbildung 47: Reaktionsschema zur Umsetzung der Mono-, Di- und Triphosphoester FMP, FPP und FTP mit der PTS.

Zur Durchführung der Umsetzungsversuche, wurden 1 mL Umsetzungspuffer (50 mM MOPS, 10 mM MgCl_2 , pH 7,25) in einem 2 mL Reaktionsgefäß mit 100 μM Substrat und 2 μM aufgereinigter PTS versetzt und mit 200 μL iso-Oktan überschichtet. Die Lösung wurde für 30 min bei 38°C inkubiert. Die Isolierung der Produkte erfolgte durch kräftiges Schütteln und anschließende Zentrifugation des Reaktionsgemisches. Die organische Phase wurde abgenommen und mittels GC-FID (6. B1) analysiert. Die Resultate der drei Umsetzungsversuche sind in Abbildung 48 dargestellt.

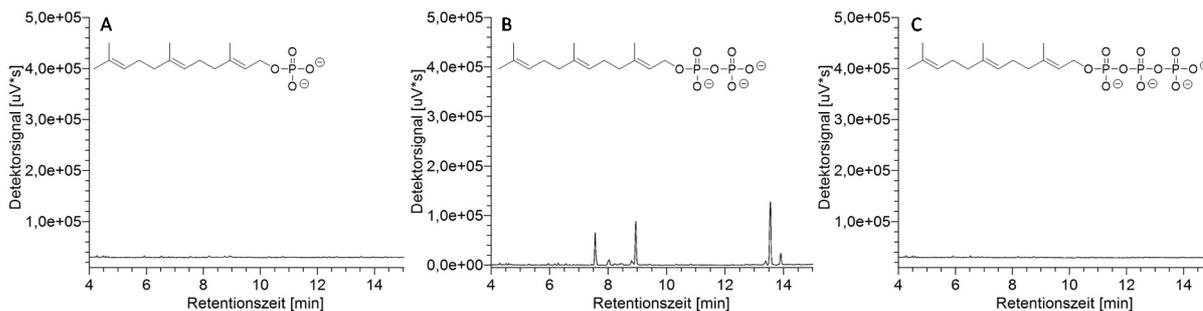


Abbildung 48: Chromatogramme der GC-FID (6. B1) Analyse der enzymatischen Umsetzungen von FMP (A), FPP (B) und FTP (C).

Nur bei der Umsetzung von FPP sind im Chromatogramm Signale zu erkennen. Bei den Umsetzungsversuchen von FMP und FTP ist keine Produktbildung zu erkennen.

In der Natur dienen nur Diphosphatester als Substrate für Terpensynthasen und auch in der Literatur wird berichtet, dass Monophosphatester nicht umgesetzt werden können. Der Grund dafür ist wahrscheinlich, dass Monophosphat-Gruppen eine geringere Polarisierbarkeit als die Diphosphate aufweisen. Für den initialen Schritt, die Dephosphorylierung des Substrates, spielt die Polarisierbarkeit der Kopfgruppe aber eine entscheidende Rolle [37]. Beim FMP ist es daher vermutlich gar nicht erst zur Abspaltung der Phosphatgruppe gekommen, sodass die kationische Reaktionskaskade nicht gestartet werden konnte. Im Vergleich zum FMP weist das FTP eine deutlich höhere Polarisierbarkeit auf. Möglicherweise verhindern sterische Gründe, dass das relative große FTP in das aktive Zentrum der PTS gelangt.

4.4.6.4 Umsetzungsversuch mit einem Oxy-funktionalisierten Substratanalogon

In diesem Versuch sollte ein synthetisches, oxy-funktionalisiertes Substratanalogon des *E,E*-FPP mit der PTS umgesetzt werden. Bei der Substanz handelt es sich wie bei FPP um einen C_{15} -Körper, dessen Kette jedoch durch eine Ether-Gruppe verlängert wurde. Die Verbindung wurde am Institut für Organische Chemie der Gottfried Leibniz Universität Hannover im Arbeitskreis von Prof. Andreas Kirschning von Katja Seidel synthetisiert [102]. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 49 abgebildet.

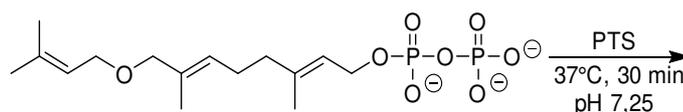


Abbildung 49: Reaktionsschema für die Umsetzung des oxy-funktionalisierten Substratanalogon.

Für die Durchführung des Umsetzungsversuches, wurden in einem 1 L Messkolben 25 mg des Substrates in 500 mL Umsetzungspuffer (50 mM MOPS, 10 mM MgCl₂, pH 7,25) gelöst und mit 0,25 µmol aufgereinigter PTS versetzt. Die Reaktionslösung wurde in einem Wasserbad auf 30°C erwärmt und für 18 h unter leichtem Rühren inkubiert. Parallel dazu wurde 1 mL Umsetzungspuffer mit 100 µM des Substrates und 1 mL Umsetzungspuffer mit 0,5 µM PTS versetzt. Beide Ansätze wurden bei 30°C für 18 h inkubiert und anschließend mit 250 µL Pentan extrahiert.

Die Reaktionslösung der enzymatischen Umsetzung wurde in einem Schütteltrichter dreimal mit 100 mL Pentan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Die Lösung wurde zusammen mit den Extrakten der Vergleichsansätze mittels GC-FID (6. B1) analysiert. Zusätzlich wurde der korrespondierende Alkohol des Substrates vermessen, der als Ausgangsstoff für die Synthese des Pyrophosphates verwendet wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 50 dargestellt.

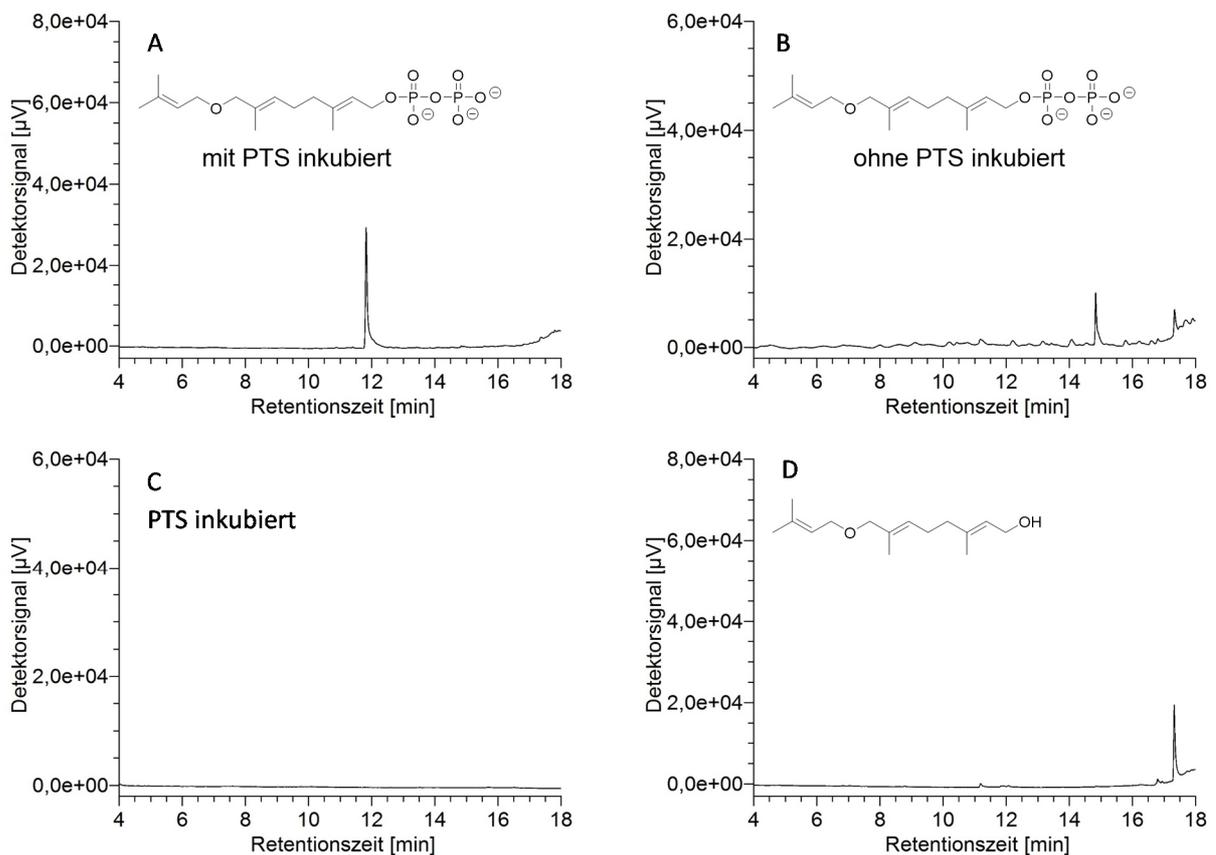


Abbildung 50: Resultate der GC-FID (6. B1) Analysen. In den Chromatogrammen A und B sind Reaktionsprodukte zu erkennen, während bei der Vergleichsprobe bei der nur die PTS im Umsetzungspuffer inkubiert wurde (C), keine Peaks auftreten. Chromatogramm D zeigt den Peak des korrespondierenden Alkohols des Substrates.

Es ist zu erkennen, dass das Substratanalogon von der PTS erfolgreich zu einem Produkt mit einer Retentionszeit von 11,9 min umgesetzt wurde (Chromatogramm A). Bei dem Reaktionsprodukt kann es sich nicht um den korrespondierenden Alkohol handeln, da dieser eine Retentionszeit von

17,4 min aufweist (Chromatogramm D). Weiterhin ist festzustellen, dass sich auch bei der Inkubation des Substrates ohne die PTS zwei Produkt gebildet wurden (Chromatogramm B) mit einer Retentionszeit von 14,8 min, bzw. mit der gleichen Retentionszeit wie der korrespondierende Alkohol. Bei der Inkubation des Substrates ohne die PTS kam es somit zur Hydrolyse des Esters und zusätzlich zur Bildung eines unbekanntes Produktes, das sich auf Grund der Retentionszeit jedoch vom Reaktionsprodukt der PTS-Umsetzung unterscheiden muss. Da bei GC-FID (6. B1) Analysen eine Zuordnung der Analyten nur über den Vergleich mit Standardsubstanzen möglich ist, können die zwei unbekanntes Produkte nicht identifiziert werden.

Dieser Versuch zeigte, dass die PTS auch größere Substrate als das *E,E*-FPP erfolgreich umsetzen kann. Auch die im Substratanalogon vorhandene Ether-Gruppe, die nicht nur die sterischen, sondern auch die elektronischen Eigenschaften des Substratmoleküls, prägt, führte nicht zu einem Abbruch der enzymatischen Umsetzung. Im diesem Versuch wurde also erneut die hohe Substratflexibilität der PTS unter Beweis gestellt.

4.4.6.5 Zusammenfassung der Versuche zur Substratflexibilität

In den Versuchen wurde die Substratflexibilität der PTS mit verschiedenen Substraten untersucht. Dabei konnten alle eingesetzten Diphosphate erfolgreich zu einer Vielzahl an Produkten umgesetzt werden. Von besonderer Bedeutung sind dabei die Umsetzungsversuche der *E,Z*-Isomeren des FPPs. Wie in Kapitel 4.3 ausgeführt, könnte ein Gemisch aus den drei FPP-Isomeren als kostengünstiger Ausgangsstoff für die Herstellung eines enzymatischen Patchouliöls dienen. Interessant ist daher, dass die größte Produktvielfalt bei der Umsetzung von *2Z,6E*-FPP erhalten wurde, was vermutlich auf die strukturelle Ähnlichkeit zum *E,E*-Isomer zurückzuführen ist. Bei den Verbindungen handelt es sich überwiegend um Sesquiterpene, die auch in der Natur vorkommen. Unter den gebildeten Produkten finden sich neben Substanzen mit pharmazeutischen Potential wie dem Germacren B Derivat [103] auch Duftstoffe wie Ylängen, Cadinen und Longifolen. In Ausnahmen wurden jedoch auch nicht natürliche Verbindungen erhalten, was auf die im Molekül konservierten *Z*-Doppelbindungen zurückzuführen ist.

Auch die Umsetzungen mit den Monoterpenvorläufern GPP und NPP verliefen erfolgreich, womit demonstriert werden konnte, dass die PTS auch deutlich kleinere Substrate als die C_{15} -Prenyldiphosphate umsetzen kann. Schließlich wurde auch ein synthetisch erzeugtes, mit einer oxy-Funktion, verlängertes FPP-Analogon von der PTS erfolgreich zu einem Produkt umgesetzt. Eine weitere bei der Reaktion detektierte Verbindung konnte auf den Zerfall des Substrates zurückgeführt werden. Für eine eindeutige Charakterisierung des Reaktionsproduktes ist eine NMR-Analyse erforderlich. Die einzigen Substrate, die nicht umgesetzt wurden, waren FMP und FTP, was vermutlich auf die elektronischen Eigenschaften der Stoffe zurückzuführen ist.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die PTS über eine hohe Substratflexibilität verfügt und daher gut für Umsetzungsversuche mit nicht natürlichen Substraten geeignet ist.

4.4.7 Zusammenfassung und Diskussion der Charakterisierung der Patchoulolsynthese

In diesem Abschnitt der Arbeit wurde die rekombinante PTS umfassend charakterisiert. Dabei wurde das Enzym zunächst mittels MALDI-MS eindeutig als eine Variante der pflanzlichen Patchoulolsynthese aus *P. cablin* identifiziert. Weiterhin wurde das Produktspektrum der PTS analysiert und mit der Zusammensetzung eines extraktiv gewonnenen ätherischen Öls aus der Patchouli-Pflanze verglichen. Dabei zeigte sich, dass das Produktspektrum der rekombinanten PTS weitestgehend mit der des pflanzlichen Enzyms übereinstimmt.

Anschließend wurde die Kinetik des Enzyms untersucht. Dazu wurden zunächst das Temperatur und pH-Optimum bestimmt und auf Basis dieser Daten damit begonnen, die Aktivität der PTS in Abhängigkeit der Substrat-Konzentration zu untersuchen. Es wurden wichtige kinetische Parameter wie der K_M - und k_{cat} -Wert sowie die spezifische Aktivität bestimmt. Der prozesstechnisch relevante k_{cat} -Wert ist mit $0,072 \text{ s}^{-1}$ zwar im für Sesquiterpensynthesen typischen Bereich [61, 69], wirkt aber verglichen mit anderen Enzyme sehr gering. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass es sich bei der PTS um ein Enzym des Sekundärmetabolismus handelt. Statistische Auswertungen der kinetischen Parameter der ca. 36.000 in der Enzym-Datenbank BRENDA (TU Braunschweig, Deutschland) publizierten Enzyme haben ergeben, dass ein niedriger k_{cat} -Wert, für Enzyme die nicht Teil des Primärmetabolismus sind, nicht ungewöhnlich ist [67]. Dennoch muss ein niedriger k_{cat} -Wert im Hinblick auf eine technische Nutzung als Herausforderung betrachtet werden.

Bei den kinetischen Untersuchungen wurde außerdem eine für die Sesquiterpensynthesen ungewöhnliche unkompetitive Substratinhibierung festgestellt. Der für diese Inhibierung notwendige Mechanismus erfordert die gleichzeitige Bindung von zwei Substratmolekülen an das Enzym. Obwohl bereits Angaben aus der Literatur Hinweise dafür lieferten, dass die PTS mehr als ein Substratmolekül binden kann, wurden Deuterierungsversuche durchgeführt, um den Reaktionsmechanismus des Enzyms näher zu untersuchen.

Grundlage der Deuterierungsversuche war die Erkenntnis, dass das Produktspektrum der PTS durch die Temperatur und vor allem den pH-Wert beeinflusst werden kann. Auf diese Weise war es möglich die Ausbeute an Patchoulol durch die Wahl der Reaktionsbedingungen gezielt zu steigern. Vor allem aber zeigte der Versuch, dass der pH-Wert eine wichtige Rolle im Bildungsmechanismus der Sesquiterpene spielt. Daher wurde die enzymatische Reaktion in einem D_2O -Puffer durchgeführt und die Reaktionsprodukte mittels GC-MS und NMR analysiert. Dabei sollte der Bildungsmechanismus

von Patchoulol in der PTS untersucht werden, um damit Belege für das kinetische Modell der unkompetitiven Substratinhibierung zu sammeln.

Die Analysen ergaben, dass die gebildeten Sesquiterpene in Abhängigkeit ihres Bildungsmechanismus einen unterschiedlichen Deuterierungsgrad aufweisen. Damit konnte belegt werden, dass einen Protonenaustausch zwischen den sesquiterpenoiden Zwischenprodukten und dem Lösemittel erfolgt. Mit Hilfe von NMR-Experimenten konnte außerdem die Position der Deuteriumatome im Patchoulol-Molekül exakt bestimmt werden. Da dieses Deuterierungsmuster durch keinen in der Literatur publizierten Mechanismus erklärbar ist, wurde ein neuer Bildungsmechanismus für Patchoulol postuliert. Dieser basiert auf zwei intermediär gebildeten Sesquiterpenen, die durch Reprotonierungsschritte mit Deuteriumatomen versehen werden. Auf diese Weise kann nicht nur das mittels NMR nachgewiesene Deuterierungsmuster, sondern auch die unkompetitive Substratinhibierung, erklärt werden.

Schließlich wurde in diesem Abschnitt der Arbeit die Substratflexibilität der PTS untersucht. Mit Hilfe dieser Versuche sollte das katalytische Potenzial der PTS für die Herstellung kommerziell relevanter Stoffe untersucht werden. Dabei wurden zunächst Experimente mit den Monoterprenvorläufern GPP und NPP durchgeführt und dabei zahlreiche Monoterpene erhalten. Obwohl einige der gebildeten Substanzen als Duftstoffe Verwendung finden, ist eine enzymatische Herstellung dieser auf Grund der Verfügbarkeit kostengünstiger synthetischer und ganzzellkatalytischer Verfahren wirtschaftlich nicht sinnvoll.

Daher wurde der Fokus auf die Umsetzung der *E,Z*-Isomere des FPPs gelegt, da ein Isomeren-Gemisch dieser Substrate bei einer enzymatischen Herstellung von Patchouliöl eine kostengünstige Alternative zum isomerenreinen *E,E*-FPP sind. Da ein solches Isomeren-Gemisch neben 67% des *E,E*-Isomers 23% des *2Z,6E*- und 10% des *2E,6Z*-Isomers enthält, liegt der Anteil der neuen, für Patchouliöl untypischen Produkte, bei 33%. Die Umsetzungsversuche mit den FFP-Isomeren zeigten, dass es sich bei vielen der aus *2Z,6E*-FPP gewonnenen Produkte um geruchsaktive Substanzen handelt, die in der Natur in unterschiedlichen ätherischen Ölen vorkommen. Im Vergleich dazu wurde das *2E,6Z*-Isomer fast ausschließlich zu Germacren-Derivaten umgesetzt.

Zusätzlich wurde ein Umsetzungsversuch mit einem synthetisch erzeugten FFP-Analogon durchgeführt, dessen Kohlenstoffkette durch eine Ether-Funktion verlängert wurde. Auch dieses Substrat wurde von der PTS erfolgreich umgesetzt. Durch GC-FID Analysen, konnte eine einfache Dephosphorylierung der Diphosphat-Gruppe ausgeschlossen werden und auf Grund der Retentionszeit des Produktes als vermutlich cyclische Verbindung identifiziert werden. Für die Charakterisierung des Produktes ist am Institut für Organische der Leibniz Universität Hannover eine NMR-Analyse geplant.

Durch die Versuche zur Charakterisierung der PTS kann in dieser Arbeit eine detaillierte und umfassende Einschätzung der PTS als ein potentieller Biokatalysator vorgenommen werden.

Demnach handelt es sich bei der PTS um ein Enzym mit einzigartigen katalytischen Eigenschaften bezüglich des Aufbaus sehr unterschiedlicher, hochkomplexer Kohlenstoffgerüste. Da für viele auf diesen Strukturen basierenden Substanzen keine wirtschaftlich durchführbaren synthetischen oder biotechnologischen Verfahren existieren, kann die *in vitro* Verwendung der PTS eine attraktive Alternative zur Isolierung der von der PTS gebildeten Substanzen aus Pflanzenmaterial darstellen. Die Möglichkeit das Produktspektrum der PTS über die Reaktionsbedingungen zu beeinflussen ist dabei ein wertvolles Instrument, um die enzymatische Reaktion in die gewünschte Richtung zu steuern.

4.5 Untersuchung integrierter Verfahren zur Herstellung und *in situ* Isolierung von Sesquiterpenen in wässrigen Lösungen

In diesem Abschnitt sollte untersucht werden, wie sich eine technische Nutzung der PTS als Biokatalysator für die Herstellung von Sesquiterpenen aus aktivierten Terpenalkoholen realisieren lässt. Im Fokus stand dabei die Gewinnung von Patchoulol, da es sich bei dieser Substanz um die Komponente handelt, die dem Patchouliöl ihren charakteristischen Duft verleiht und von kommerzieller Bedeutung ist.

Die Rahmenbedingungen für einen Prozess werden dabei sowohl durch die physiko-chemischen Eigenschaften der Substrate und Produkte als auch durch die kinetischen Eigenschaften und die Stabilität der PTS gesetzt. In Vorversuchen zeigte sich, dass sich die PTS nicht zufriedenstellend mit den gängigen Methoden immobilisieren lässt [30, 104, 105]. Da eine Abtrennung des Enzyms daher nicht möglich ist, muss ein Weg gefunden werden, um die Sesquiterpene schon während der Reaktion aus der Lösung zu isolieren. Eine besondere Bedeutung kommt dabei der Löslichkeit der beteiligten Komponenten zu. Während die PTS nur in wässrigen Lösungen aktiv ist [104] und die Substrate in Wasser und kurzkettigen Alkoholen löslich sind, handelt es sich bei den Reaktionsprodukten um hydrophobe und teilweise flüchtige Substanzen. Für einen integrierten Produktionsprozess ergibt sich daraus die Notwendigkeit ein Mehrphasensystem zu konzipieren. Dieses System muss aus einer wässrigen Phase bestehen, in der das Substrat vorgelegt wird und die enzymatische Umsetzung stattfinden kann und einer zweiten Phase, die der Isolation der Terpene dient.

In Vorarbeiten wurde bereits das Ausstrippen der Sesquiterpene in einem Blasensäulenreaktor sowie die Extraktion mit überkritischen Kohlenstoffdioxid erprobt [105]. Da mit beiden Verfahren keine zufriedenstellende Isolierung der Sesquiterpene erreicht werden konnte, sollte in diesem Abschnitt die Isolierung mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion und Adsorption untersucht werden. Die Entwicklung eines Verfahrens zur Herstellung und *in situ* Isolierung von Sesquiterpenen sollte dabei

in zwei Schritten erfolgen. Im ersten Schritt sollten dazu Techniken zur Isolierung der Produkte untersucht und im zweiten Schritt mit der enzymatischen Umsetzung kombiniert werden.

4.5.1 Verfahren zur Isolierung von Sesquiterpenen aus wässrigen Lösungen

In diesem Kapitel sollten Verfahren geprüft werden, um enzymatisch gebildete Sesquiterpene schon während der Umsetzung aus der wässrigen Reaktionslösung zu isolieren. Dabei sollte die Extraktion mit einem 2-Phasensystem, bei dem die wässrige Phase mit einer organischen Phase überschichtet wird, mit der Adsorption der Sesquiterpene an ein hydrophobes Adsorbens verglichen werden.

4.5.1.1 Extraktion mit organischen Lösemitteln

Es sollte untersucht werden, mit welchem Lösemittel Sesquiterpene am besten aus einer wässrigen Lösung extrahiert werden können. Dazu wurden Lösemittel und Lösemittel-Gemische ausgewählt, die in der Literatur für die Durchführung von Enzym-Assays mit Terpensynthasen verwendet werden [61, 61, 62, 69, 69, 83]. Zusätzlich wurden iso-Oktan und Hexamethyldisiloxan (HMDSO) geprüft. Diese Lösemittel wurden ausgewählt, weil sie ähnlich unpolar wie Pentan, aber auf Grund ihres hohen Siedepunktes einfacher zu handhaben, sind. HMDSO ist außerdem vergleichsweise ungiftig und umweltfreundlich und wird in der Pharmaindustrie zur Formulierung von Wirkstoffen verwendet [106]. Da Patchouliöl als komplexes Gemisch aus Sesquiterpenen für die Extraktionsversuche ein ungeeignetes Modell darstellt, wurden stattdessen α -Cedren als Modellsubstanz verwendet.

Für die Extraktionsversuche wurden 990 μL Wasser in einem verschließbaren 2 mL Reaktionsgefäß mit 10 μL einer 10 mg/mL α -Cedren Lösung in Aceton hinzugefügt und gründlich durchmischt. Auf diese Weise wurde eine Lösung mit einer α -Cedren-Konzentration von 100 $\mu\text{g/mL}$ erhalten, die als Extraktionsgut verwendet wurde. Zur Durchführung der Extraktionen wurde die Lösung mit 500 μL des Extraktionsmittels überschichtet, für 60 s kräftig geschüttelt und anschließend bei 14,8 $^{\circ}\text{C}$ für 10 s zentrifugiert. Die organische Phase wurde abgenommen und die extrahierte Menge von α -Cedren mittels GC-FID (6. B1) bestimmt. Die Resultate der Extraktionsversuche sind in Abbildung 51 dargestellt.

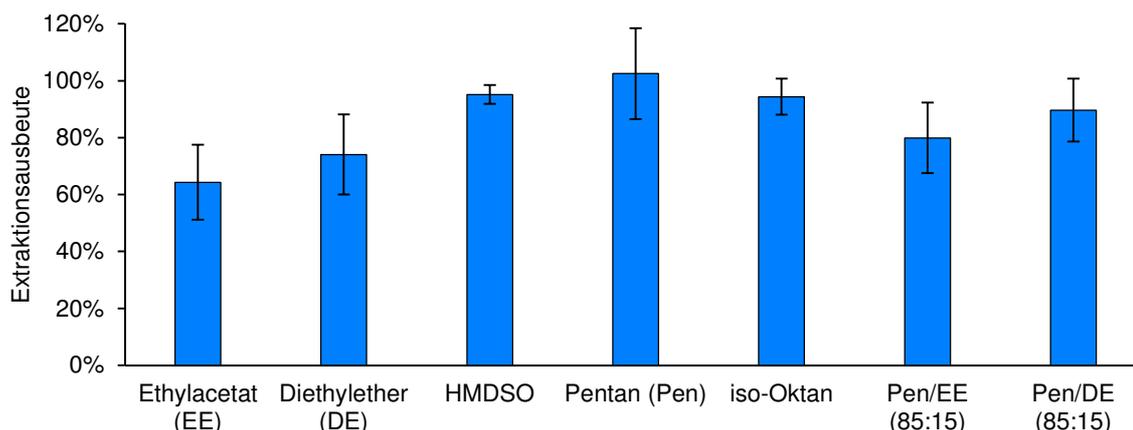


Abbildung 51: Ergebnisse der Extraktionsversuche zur Isolierung von α -Cedren mit verschiedenen Lösemitteln.

Die Ergebnisse der Extraktionsversuche zeigen, dass vor allem die besonders unpolare Lösemittel Pentan, iso-Oktan und HMDSO zur Isolierung des α -Cedrens geeignet sind. Das für die Extraktion mit Pentan teilweise Ausbeuten von über 100% bestimmt wurden, ist auf die hohe Flüchtigkeit von Pentan (Sdp. 36°C) zurückzuführen, wodurch es zu einer Aufkonzentrierung des α -Cedren kam. Mit den etwas polareren Lösemitteln wie Ethylacetat und Diethylether sowie den sie enthaltenden Gemische konnte α -Cedren nach einem Extraktionsschritt nicht vollständig extrahiert werden.

In diesem Versuch konnten mehrere Lösemittel identifiziert werden, die zur quantitativen Extraktion von Sesquiterpenen verwendet werden können. Neben Pentan handelt es sich dabei um HMDSO und iso-Oktan. Für weitere verfahrenstechnische Versuche ist Pentan jedoch ungeeignet, da die hohe Flüchtigkeit ein exaktes Pipettieren erschwert und das zügige Verdampfen die Konzentration des extrahierten Stoffes verfälscht.

4.5.1.2 Isolierung von Sesquiterpenen mit Hilfe eines hydrophoben Adsorbens

Es sollte untersucht werden, ob Sesquiterpene durch die Verwendung eines hydrophoben Adsorbentmaterials aus wässrigen Lösungen isoliert werden können. Dazu müssen die Sesquiterpene nach der Adsorption mit Hilfe eines Lösemittels vom Polymer eluiert werden. Daher sollte in diesem Kapitel die Elution der zwei Modellsesquiterpene α -Cedren und Cedrol mit verschiedenen Lösemitteln untersucht werden. Die Strukturformeln sind in Abbildung 52 dargestellt.

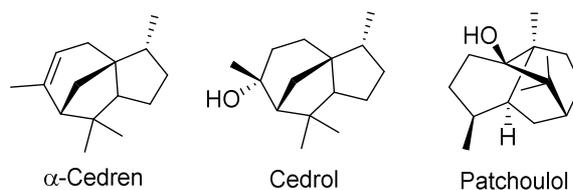


Abbildung 52: Strukturformeln der beiden Modellverbindungen α -Cedren und Cedrol im Vergleich zum wertvollen Patchoulol.

Die beiden Sesquiterpene wurden als Modellsubstanzen gewählt da sie ein ähnliches, Kohlenstoffgerüst wie Patchoulol aufweisen und sich an ihnen außerdem der Einfluss einer Hydroxy-Funktionalisierung auf die Adsorption und Elution untersuchen lässt.

Bei dem verwendeten Adsorber handelte es sich um ein poröses Copolymer aus quervernetztem Styren-Divinylbenzen (Amberlite®XAD4, Dow Chemicals, Midland, USA) mit einer Porengröße von 100 Å und einer Korngröße von 250-850 µm. Die konstitutionelle Repetiereinheit des Polymers ist in Abbildung 53 dargestellt.

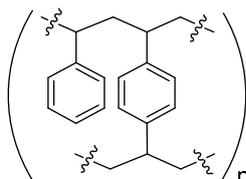


Abbildung 53: Strukturformel der konstitutionellen Repetiereinheit des verwendeten Copolymers.

Aus der Strukturformel wird deutlich, dass es sich um ein sehr unpolares Polymer handelt. Dadurch wird durch die Ausbildung von van-der-Waals Wechselwirkungen eine gute Adsorption von Sesquiterpenen gewährleistet.

Vor dem Beginn der Adsorptions-Elutions-Versuche musste zunächst der Adsorber vor jedem Versuch konditioniert werden. Das Konditionierungsverfahren wurde in Vorarbeiten [107] optimiert. Dabei wurden 100 mg des Adsorbers zuerst mit 1 mL des Lösemittels, das später zur Elution verwendet werden sollte und danach zweimal mit 1 mL Wasser gewaschen.

Für die Durchführung der Adsorptions-Elution-Versuche wurden 990 µL Puffer (25 mM MOPS, 10 mM MgCl₂, pH 7,25) in einem verschließbaren 4 mL Glasgefäß mit 10 µL einer 20 mg/mL Lösung des Modellsesquiterpens in Aceton hinzugefügt und anschließend gründlich durchmischt. Die Adsorption des Sesquiterpens wurde durchgeführt, indem der zuvor konditionierte Adsorber in die Sesquiterpen-Lösung gegeben und die resultierende Suspension bei Raumtemperatur für 30 min bei 850 rpm geschüttelt wurde. Um zu untersuchen, ob die Adsorption erfolgreich war, wurde der Adsorber abgetrennt und die Lösung mit 200 µL iso-Oktan extrahiert. Der Extrakt wurde mittels GC-FID (6. B1) analysiert und so die Menge des nicht adsorbierten Sesquiterpens bestimmt.

Der Adsorber wurde mit 1 µL Puffer gewaschen und danach die Elution durchgeführt. Dazu wurde der Adsorber in 500 µL des organischen Lösemittels aufgeschwemmt und die Suspension für 10 min bei Raumtemperatur und 850 rpm geschüttelt. Das Lösemittel wurde abgenommen und die Elution noch zweimal wiederholt. Die Sesquiterpenkonzentration in den Elutionsfraktionen wurden anschließend mittels GC-FID (6. B1) bestimmt und aufsummiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 54 und Abbildung 55 dargestellt.

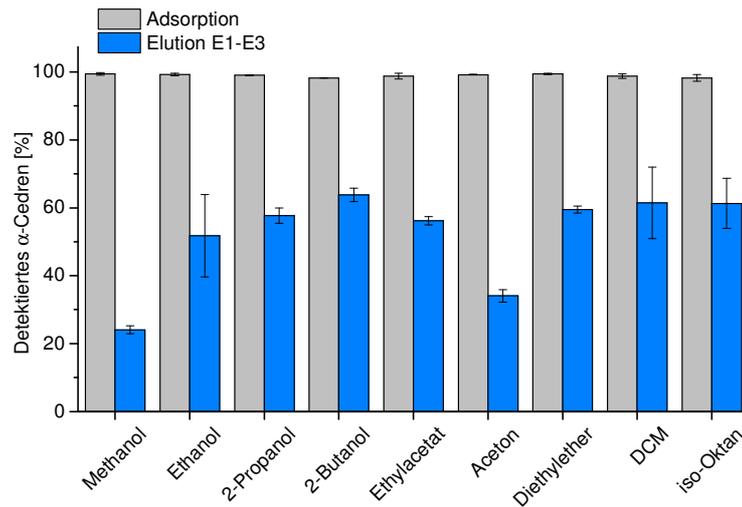


Abbildung 54: Isolation von α -Cedren aus einer wässrigen Lösung mit einem hydrophoben Adsorber.

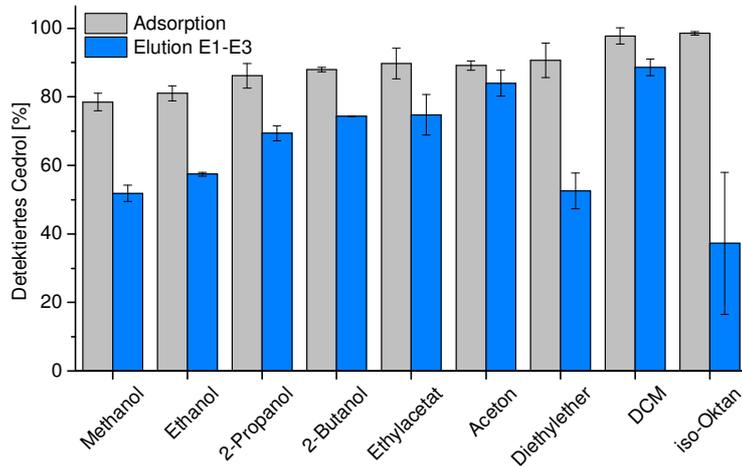


Abbildung 55: Isolation von Cedrol aus einer wässrigen Lösung mit einem hydrophoben Adsorber.

Aus den Abbildungen geht hervor, dass sowohl α -Cedren als auch Cedrol mit Hilfe des Adsorbers aus einer wässrigen Lösung isoliert werden kann. Es wird deutlich, dass eine quantitative Adsorption an das Polymer für beide Substanzen realisiert werden kann. Dabei ist die Adsorption beim α -Cedren unabhängig von dem für die Konditionierung verwendeten Lösemittel während beim Cedrol Unterschiede zu erkennen sind. Bei der Elution werden die Unterschiede zwischen den beiden Modellverbindungen noch deutlicher sichtbar. Während selbst unter optimalen Bedingungen nur 62% des ursprünglich eingesetzten α -Cedrens vom Adsorber eluiert werden können, werden bei der Verwendung von DCM 84% des Cedrols eluiert.

In diesem Versuch wurde die Isolierung der beiden Modellverbindungen α -Cedren und Cedrol mittels eines hydrophoben Adsorbers untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass beide Verbindungen quantitativ adsorbiert werden können. Allerdings konnten in der anschließenden

Elution nur 62% des α -Cedren und 84% des Cedrols isoliert werden. Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass auch zusätzliche Elutionsschritte die Ausbeute nicht signifikant steigern können [107]. Der Grund dafür ist vermutlich, dass die Sesquiterpene von der Oberfläche des Adsorbers ins Innere des Polymers diffundiert sind und dort eingelagert werden. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass das unpolare α -Cedren zu einem geringeren Anteil eluiert wurde als Cedrol, das durch die Hydroxy-Funktion weniger Wechselwirkungen zum Polymer aufbauen kann. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Cedrol gut mit Hilfe eines Adsorbers isoliert wird, während α -Cedren nur mit signifikanten Ausbeuteverlusten gewonnen werden kann.

4.5.1.3 Zusammenfassung und Diskussion der Versuche zur Isolierung von Sesquiterpenen

In diesem Kapitel wurden verschiedene Verfahren zur Isolierung von Sesquiterpenen aus wässrigen Lösungen untersucht. Dazu wurde zunächst die Extraktion mit verschiedenen organischen Lösemitteln untersucht und mit der Adsorption an ein hydrophobes Polymer verglichen.

Insgesamt ist festzustellen, dass mit nur einen Extraktionsschritt die Sesquiterpene vollständig aus der wässrigen Lösung isoliert werden können. Dazu sind unpolare Lösemittel wie Pentan, iso-Oktan und HMDSO besonders geeignet.

Die Ausbeute bei der Isolierung von Sesquiterpenen mittels hydrophoben Adsorbentien hängt stark von der Zielsubstanz und von dem für die Elution verwendeten Lösemittel ab. Während das Patchoulol-Analogon Cedrol mit DCM in hohe Ausbeuten vom Adsorber eluiert werden kann, bleibt bei Isolierung von α -Cedren ein Teil im Adsorber gebunden. Für eine Isolierung von Patchouliöl mit Hilfe des Adsorbers, wäre daher DCM das am besten geeignete Lösemittel für die Elution. Allerdings muss bei Patchouliöl mit einer Veränderung der Zusammensetzung gerechnet werden.

4.5.2 Integrierte Verfahren zur enzymatischen Herstellung von Patchouliöl

Die in Kapitel 4.5.1 gewonnen Erkenntnisse sollten in diesem Abschnitt mit der enzymatische Umsetzung mit der PTS zur Herstellung von Patchouliöl kombiniert werden. Dazu sollte die Reaktion in einem wässrigen Puffer durchgeführt werden. Um die Produkte *in situ* aus der Reaktionslösung zu isolieren, sollten die beiden zuvor untersuchten Verfahren eingesetzt werden. Da bekannt ist, dass Sesquiterpensynthesen durch eine intensive Durchmischung mit organischen Lösemitteln denaturiert werden können, stand bei den Versuchen die Frage im Mittelpunkt, ob bzw. wie schnell die Enzymaktivität durch die Verwendung einer organischen Phase oder durch den Kontakt mit dem Adsorber beeinträchtigt wird.

4.5.2.1 Umsetzung im 2-Phasen Reaktor

Auf Basis der in Kapitel 4.5.1.1 gewonnenen Erkenntnisse sollte die enzymatische Reaktion in einem 2-Phasenreaktor in einer wässrigen Pufferlösung durchgeführt werden, die mit einer organischen Phase überschichtet wird. Da die PTS eine, wie in Kapitel 4.4.3 gezeigt, Substratinhibierung aufweist, sollte in regelmäßigen Zeitabständen *E,E*-FPP in den Reaktor gegeben werden, um die Reaktion aufrecht zu erhalten. Um die Produktbildung verfolgen zu können, sollten während der Reaktion Proben aus der organischen Phase gezogen werden. Als organische Phase sollte dabei iso-Oktan, als eines der drei Lösemittel mit den besten Extraktionsresultaten, verwendet werden.

Der Versuch wurde in einem 200 mL Rührkesselreaktor aus Edelstahl durchgeführt. Die wässrige Phase bestand aus 100 mL eines Aktivitätspuffers (50 mM MOPS, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10% (v/v) Glycerin, pH 7,4) der mit 0,5 µM PTS und 50 µM *E,E*-FPP versetzt war. Als organische Phase für die Überschichtung wurden 20 mL iso-Oktan verwendet. Die enzymatische Umsetzung wurde bei 37°C unter leichtem Rühren durchgeführt. Im Abstand von 15 min wurden insgesamt 4 Portionen *E,E*-FPP hinzugegeben. Um die Entwicklung der Produktbildung zu verfolgen, wurden regelmäßig Proben aus der iso-Oktan Phase gezogen und die Sesquiterpen-Konzentration mittels GC-FID (6. B1) bestimmt. Nach Ende der Reaktion wurden die Phase in einem 250 mL Schütteltrichter getrennt, die wässrige Phase mit 20 mL iso-Oktan extrahiert und der Extrakt gaschromatographisch untersucht. Auf diese Weise konnte die Menge des in der wässrigen Phase verbliebenen Patchoulols auf 14,6 µg, die der anderen Sesquiterpene auf 29,8 µg bestimmt werden. Der Enzymreaktor und die Resultate der GC-FID Analysen der organischen Phase sind in Abbildung 56 dargestellt.

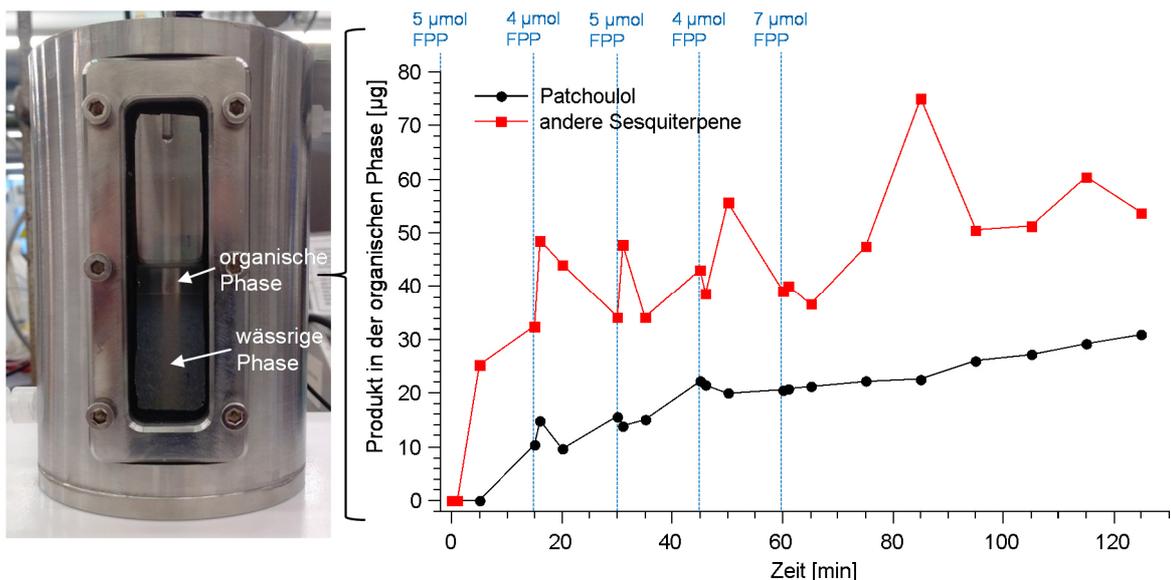


Abbildung 56: Resultate der enzymatischen Umsetzung im 2-Phasenreaktor.

Die Abbildung zeigt eine kontinuierliche Zunahme der Produktmenge in der iso-Oktan Phase. Dabei ist zu beobachten, dass die Produktmenge auch noch nach Beendigung der regelmäßigen Substratzugabe ansteigt. Der Grund dafür ist vermutlich, dass die Produkte aus der gerührten wässrigen Phase nur langsam in die organische Phase übergehen. Nach 125 min hatten sich 31,2 µg Patchoulol und 54,3 µg der unfunktionalisierten Sesquiterpene aus Patchouliöl im iso-Oktan angereichert. Zusammen mit den 44,4 µg Produkt aus der wässrigen Phase, wurden insgesamt 129,9 µg Patchouliöl erhalten. Unter Verwendung der kombinierten molaren Masse von Patchouliöl von 210,7 g/mol und der insgesamt eingesetzten Substratmenge von 25 µmol ergibt sich eine Patchouliöl-Ausbeute von 2,5%. Die Literatúrausbeute für ein nicht durchmisches, aber hinsichtlich des Maßstabs und der Reaktionsbedingungen vergleichbares System, beträgt 12% [38]. Die in diesem Versuch erzielte geringere Ausbeute ist vermutlich auf die verstärkte Denaturierung der PTS zurückzuführen, die durch das Rühren des 2-Phasensystems und der damit verbundenen größeren Kontaktfläche zwischen den beiden Phasen verursacht wird. Wie in Abbildung 56 zu erkennen, hat sich in der wässrigen Phase ein weißer Niederschlag gebildet. Eine SDS-PAGE des Niederschlags ergab, dass es sich dabei um die PTS handelt.

Dieser Versuch zeigte, dass die Herstellung von enzymatischen Patchouliöl in einem 2-Phasen-Reaktor möglich ist, aber nur geringe Ausbeuten liefert. Das Hauptproblem besteht dabei in der Denaturierung des Enzyms durch den Kontakt mit der organischen Phase. Gleichzeitig erfolgt der Phasenübergang der bei der Reaktion gebildeten Sesquiterpene nur langsam, so dass nach Ende der enzymatischen Umsetzung die wässrige Phase extrahiert werden muss, um das Produkt vollständig isolieren zu können. Der Phasenübergang könnte optimiert werden, indem der Reaktorinhalt besser durchmischt wird, was allerdings zu einer beschleunigten Denaturierung der PTS führen würde.

4.5.2.2 Isolierung von enzymatischem Patchouliöl mit Hilfe eines Adsorbers

Auf Grundlage der Ergebnisse aus Kapitel 4.5.1.2 soll ein Umsetzungsversuch zur Herstellung von Patchouliöl in Gegenwart des hydrophoben Adsorbers Amberlite®XAD4 (Dow Chemicals, Midland, USA) durchgeführt werden. Dabei soll untersucht werden, ob der Adsorber auf Grund seiner hydrophoben Oberfläche die Aktivität der PTS in ähnlicher Weise beeinträchtigt wie die Phase eines organischen Lösemittels. Außerdem sollte untersucht werden, ob die Adsorption und Elution zu einer veränderten Zusammensetzung des Patchouliöls führt. Schließlich wurde am Beispiel von α -Cedren und Cedrol gezeigt, dass die Elution vom Adsorber von der Hydroxy-Funktionalisierung der Verbindung abhängt.

Für den Versuch wurden parallel drei Reaktionsansätze durchgeführt. Für jeden Ansatz wurde 1 mL Umsetzungspuffer (35 mM MOPS, 10 mM MgCl₂, pH 7,25) mit 50 µM *E,E*-FPP und 0,5 µM PTS versetzt.

Der erste Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 30°C inkubiert und anschließend mit 100 mg des mit DCM konditionierten Adsorbers versetzt. Im zweiten Ansatz wurden 100 mg des mit DCM konditionierten Adsorbers in die Lösung gegeben und die Suspension danach für 30 min bei 30°C inkubiert. Für den dritten Reaktionsansatz wurde kein Adsorber verwendet, stattdessen wurde die Lösung mit 200 µL iso-Oktan überschichtet und danach ebenfalls für 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch kräftig durchmischt, die organische Phase abgenommen und in der GC-FID untersucht. Bei den beiden anderen Reaktionsansätzen wurde der Adsorber abgetrennt, mit 1 mL Puffer gewaschen, 3 Mal mit 500 µL DCM eluiert und die Elutionsfraktionen anschließend mittels GC-FID (6. B1) analysiert.

Zum Vergleich wurde ein Adsorptions-Elutions-Versuch mit einem Patchouliöl-Standard durchgeführt. Dazu wurden 990 µL Puffer mit 10 µL einer 20 mg/mL Patchouliöl-Lösung in Aceton versetzt und anschließend gründlich durchmischt. Danach wurden 100 mg Adsorber hinzugegeben, die Suspension für 30 min bei 850 rpm geschüttelt und dreimal mit 500 µL DCM eluiert. Die Ergebnisse der GC-FID Untersuchungen sind in Abbildung 57 dargestellt.

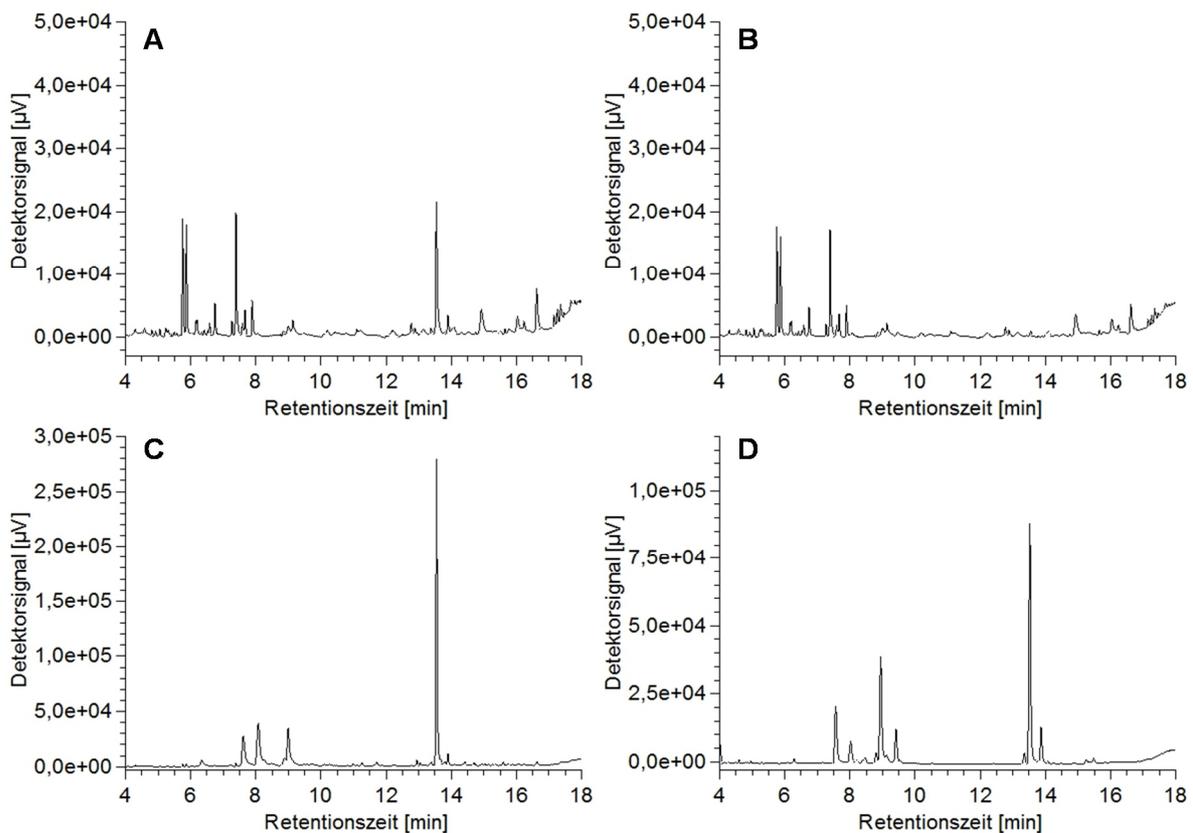


Abbildung 57: Chromatogramme der jeweils ersten Elutionsfraktion der Versuche zur Herstellung und Isolierung von Patchouliöl mit einem hydrophoben Adsorbens. **A:** Adsorption nach der PTS-Umsetzung, **B:** Adsorption während der PTS-Umsetzung, **C:** mittels Adsorber isolierter Patchouliöl-Standard, **D:** PTS-Umsetzung mit anschließender Extraktion mit iso-Oktan.

Die Gaschromatogramme A und B zeigen, dass zwar Sesquiterpene des Patchouliöls aus der Pufferlösung isoliert werden können, dass aber in Gegenwart des hydrophoben Adsorbers keine enzymatische Reaktion stattfindet. Das wird durch das Fehlen des charakteristischen Patchoulol-Peaks bei 13,54 min deutlich. Bei den Peaks im Bereich von 6-8 min handelt es sich nicht um Sesquiterpene sondern vermutlich um Verunreinigungen aus dem Polymer. Aus den Chromatogrammen C und D wird die unterschiedliche Zusammensetzung des mit dem Adsorber isolierten Patchouliöls und des mittels Flüssig-Extraktion gewonnenen Öls (D) deutlich. Während das extrahierte Patchouliöl (C) eine typische Zusammensetzung aufweist (4.4.2, [9]), enthält das mit dem Adsorber gewonnene Öl (D) einen deutlich erhöhten Patchoulol-Anteil.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Verwendung von hydrophoben Adsorbentien in der Reaktionslösung zum Verlust der Enzymaktivität führt und daher für *in situ* Isolation von terpenoiden Produkten während der enzymatischen Umsetzung ungeeignet ist. Wahrscheinlich hat die Oberfläche des Polymers den gleichen denaturierenden Effekt auf die PTS wie die Phasengrenze zu einem organischen Lösemittel. Unabhängig von der Enzymreaktion konnte jedoch die Isolierung von Patchouliöl aus einer wässrigen Lösung demonstriert werden.

4.5.2.3 Zusammenfassung und Diskussion

In diesem Abschnitt wurden zwei Verfahren zur integrierten Herstellung und Isolierung von enzymatischen Patchouliöl untersucht. Dazu wurde ein 2-Phasenreaktor und die Verwendung eines in der Reaktionslösung suspendierten Adsorbers in Kombination mit der Umsetzung von *E,E*-FPP zu Patchouliöl untersucht. Dabei sollte eine *in situ* Isolierung der Sesquiterpene unmittelbar nach Bildung erreicht werden.

Bei der enzymatischen Umsetzung im 2-Phasenreaktor konnte dieses Ziel zwar erreicht werden, allerdings war die Ausbeute mit 2,5% gering. Der Grund dafür war die Denaturierung der PTS durch den Kontakt mit der organischen Phase. Mit der Verwendung des hydrophoben Adsorbers in der Reaktionslösung konnte keine Enzymaktivität festgestellt werden. Es ist denkbar, dass das Enzym über hydrophobe Abschnitte auf seiner Oberfläche verfügt und so an das Polymer adsorbiert und auf diese Weise inaktiviert wird. Dennoch konnte gezeigt werden, dass Patchouliöl prinzipiell durch die Verwendung eines hydrophoben Adsorbers isolierbar ist. In der Literatur finden sich ebenfalls zahlreiche Beispiele für die Isolierung von Terpenen und anderer unpolarer Naturstoffe aus wässrigen Lösungen [108].

4.5.3 Zusammenfassung und Diskussion der Versuche zur Herstellung und Isolierung von Sesquiterpenen

In diesem Abschnitt wurden verschiedene Verfahren zur Isolierung von Sesquiterpenen aus wässrigen Lösungen evaluiert, optimiert und angewendet. Es wurde zunächst die Flüssig-Flüssig-Extraktion des Modellsesquiterpens α -Cedren mit verschiedenen Extraktionsmitteln untersucht. Dabei wurden die unpolaren Lösemittel Pentan, iso-Oktan und HMDSO als die Extraktionsmittel identifiziert, mit denen die höchsten Ausbeuten erreicht werden können. Vor dem Hintergrund der Entwicklung eines Verfahrens zur integrierten Herstellung von Patchouliöl, ist iso-Oktan das am besten geeignete Lösemittel, da Pentan auf Grund der hohen Flüchtigkeit schwierig zu handhaben ist. HMDSO stellt auf Grund seiner chemisch-physikalischen Eigenschaften zwar eine gute Alternative zu iso-Oktan dar, ist aber vergleichsweise kostenintensiv.

Die Erkenntnisse aus den Extraktionsversuchen wurden in einem 2-Phasenreaktor zur Herstellung von enzymatischen Patchouliöl zur Anwendung gebracht. Obwohl die enzymatische Reaktion erfolgreich durchgeführt werden konnte, wurde nur eine Ausbeute von 2,5% erzielt. Als Grund dafür konnte die Denaturierung der PTS identifiziert werden, die vermutlich durch den Kontakt zur organischen Phase ausgelöst wurde.

Parallel zur Untersuchung von Verfahren zur Flüssig-Flüssig-Extraktion, wurden auch Versuche zur Isolierung von Sesquiterpene mit Hilfe eines hydrophoben Adsorbers durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Adsorption der Modellsesquiterpene α -Cedren und Cedrol an das Polymer quantitativ erfolgt. Anschließend wurde die Elution der Sesquiterpene von der Adsorberoberfläche optimiert, indem ein umfangreiches Lösemittel-Screening durchgeführt wurde. Dabei zeigte sich, dass die beiden Modellverbindungen ein unterschiedliches Elutionsverhalten aufweisen, so dass unfunktionalisierte und Hydroxy-funktionalisierte Sesquiterpene nicht in gleichen Maßen isoliert werden können. Für die Elution des Patchoulol-Modells Cedrol wurde DCM als optimales Lösemittel identifiziert.

Auf Basis dessen wurde versucht die Isolierung von enzymatischen Patchouliöl direkt aus der Reaktionslösung zu realisieren. Es zeigte sich jedoch, dass in Gegenwart des Polymers die PTS nicht aktiv ist. Möglicherweise führt der Kontakt der PTS mit der Polymeroberfläche zu einer Veränderung der Tertiärstruktur des Proteins, was den Verlust der Enzymaktivität zur Folge hat.

Ein Adsorption-Elutions-Versuch mit einem Patchouliöl-Standard, bei dem DCM zur Elution verwendet wurde, ergab, dass das so isolierte Patchouliöl eine veränderte Zusammensetzung aufweist. Das Resultat ist ein Gemisch aus Sesquiterpenen, in dem Patchoulol angereichert ist. Dieses Ergebnis erscheint zunächst problematisch, da das ätherische Öl schließlich nicht mehr in seinem ursprünglichen Zustand vorliegt, in dem es als Duftstoff für Parfüms verwendet wird. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass das Patchoulol die eigentlich wertvolle Verbindung darstellt, die für die Verwendung von Patchouliöl in der Parfümerie von Bedeutung ist. Vor diesem Hintergrund

ist das entwickelte Adsorber-Verfahren zwar keine geeignete Methode zur *in situ* Isolierung von Sesquiterpenen, aber dafür ein effektives Instrument zur Anreicherung des kommerziell relevanten Patchoulols.

5. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden zunächst Verfahren zur Herstellung und Aufreinigung einer rekombinanten PTS entwickelt. Anschließend wurde das aufgereinigte Enzym umfassend hinsichtlich seiner kinetischen und funktionalen Eigenschaften charakterisiert. Ein Schwerpunkt bestand dabei in der Durchführung von Versuchen zur Substratflexibilität (substrate scope). Dazu wurden mehrere alternative Substrate synthetisiert und mit der PTS umgesetzt, um das katalytische Potential der PTS hinsichtlich des Aufbaus komplexer Kohlenstoffgerüste zu untersuchen. Im Hinblick auf eine mögliche Verwendung der PTS als Biokatalysator in technischen Prozessen wurden verschiedene Verfahren zur integrierten Herstellung von Sesquiterpenen evaluiert. Abbildung 58 bietet einen Überblick über die experimentellen Arbeiten.

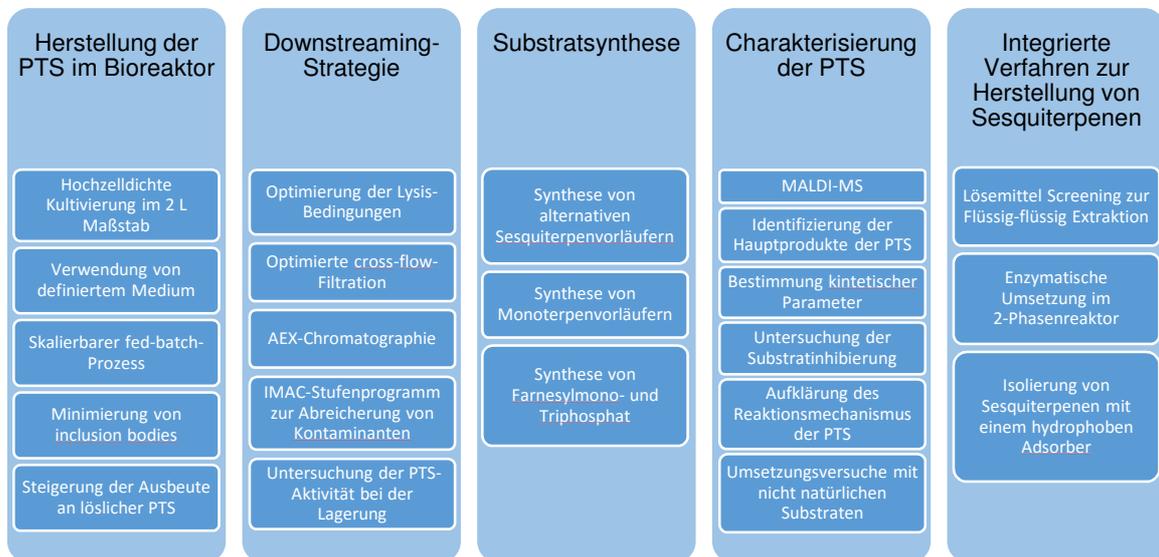


Abbildung 58: Übersicht der durchgeführten experimentellen Arbeiten.

Bei der Herstellung der rekombinanten PTS wurde der Fokus auf die Entwicklung eines robusten Verfahrens gelegt, mit dem die PTS in großen Mengen bereitgestellt werden kann. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde zunächst das Wachstumsverhalten von *E. coli* PTS im definierten ZYP-Medium untersucht. Auf Basis dieser Erkenntnisse konnte Schritt für Schritt ein fed-batch-Prozess aufgebaut werden, mit dem Hochzelldichtekultivierungen des *E. coli* PTS Stamms realisiert werden konnten. Dabei wurden Maßnahmen ergriffen, um die Ausbeute an löslicher PTS zu steigern und die Bildung von inclusion bodies zu begrenzen. Dazu zählten die Vermeidung einer Überfütterung und die gezielte Verlangsamung des Metabolismus während der Induktionsphase. Als Kohlenstoffquelle kam Glycerin anstatt der häufig verwendeten Glucose zum Einsatz, weil auf diese Weise die für die Proteinproduktion schädliche Acetat-Bildung durch die Unterdrückung des Crabtree-Effektes verhindert werden kann. Um die Proteinproduktion während der Induktion zu bremsen und so die

Bildung von inclusion bodies zu reduzieren, wurde die Temperatur auf 20°C gesenkt und über die Optimierung des feed-Profiles sichergestellt, dass sich die Bakterien in einer Substratlimitierung befinden. Auf diese Weise konnte schließlich ein Prozess im 2 L-Maßstab entwickelt werden, bei dem mit dem *E. coli* PTS Stamm eine finale BTM von 55 g/L mit einem Produkttiter von 4 g/L erreicht werden kann. Das einfachste Mittel mehr PTS produzieren zu können, besteht darin, die Induktion bei einer höheren BTM zu starten, um dadurch mehr Zellen für die Protein-Produktion zur Verfügung zu haben. Darüber hinaus bietet der entwickelte Prozess die Möglichkeit eines einfachen scale-ups, da die Kultivierung gut charakterisiert ist und alle relevanten Komponenten wie das Medium, die feed-Lösung aber auch die verwendete Steuerungs- und Regelungselektronik kostengünstig und mit wenig Aufwand maßstabsvergrößert werden können.

Auf Basis der in den Kultivierungsversuchen gewonnenen Biomasse wurden umfangreiche Versuche zur Entwicklung einer Aufarbeitungs-Strategie durchgeführt. Dazu wurden vom Zellaufschluss bis zur Formulierung des Produkts alle Aspekte der Aufreinigung eines rekombinanten Proteins aus der Biofeuchtmasse bearbeitet. Im Vordergrund stand dabei das Ziel, die PTS in einer möglichst hohen Reinheit zu isolieren, um das Enzyme anschließend zuverlässig charakterisieren zu können. Entscheidend war dabei die Abreicherung von Phosphatasen, da diese mit der PTS um das Diphosphat-Substrat konkurrieren. Als erster Schritt der Aufreinigung wurde die Verwendung von Detergenzien beim Zellaufschluss überprüft, da auf diese Weise die Ausbeute an löslicher PTS gesteigert werden könnte. Dabei zeigte sich jedoch, dass keines der getesteten Detergenzien den Zellaufschluss verbessern konnte. Es zeigte sich, dass Triton X-100® sogar zu einer Deaktivierung der PTS führt.

Da unabhängig davon, wie die Aufreinigung der PTS nach dem Zellaufschluss weiter abläuft, ein Pufferwechsel notwendig ist, um den Glycerin-haltigen Lysis-Puffer zu entfernen, wurde eine cross-flow-Filtration mit einem cutoff von 10 kDa für die lösliche Fraktion des *E. coli* PTS Lysats optimiert. Dazu wurde ein TMP-scouting mit zwei geeigneten Modell-Lösungen durchgeführt.

Im Anschluss daran wurden verschiedene Chromatographietechniken zur Aufreinigung geprüft. Zunächst wurde eine Aufreinigung mittels Ionenaustauschchromatographie untersucht, da es sich bei dieser Methode um ein in der Industrie weitverbreitetes Verfahren handelt, das mit kostengünstigen Puffern durchgeführt werden kann. Dabei konnte die PTS erfolgreich an einen starken Anionenaustauscher gebunden und danach über einen Salzgradienten wieder eluiert werden. Weil die PTS dabei nur langsam eluiert wurde und dadurch in vielen der gesammelten Elutionsfraktionen vorhanden war, konnte nur eine geringfügige Aufreinigung erzielt werden. Problematisch ist dabei, dass die PTS einen pI von 5,3 besitzt und viele host cell Proteine von *E. coli* ähnliche pI-Werte aufweisen, wodurch eine selektive Elution der PTS erschwert wird. Um mit diesem gut skalierbaren Chromatographieverfahren einen signifikanten Aufreinigungseffekt zu erzielen, müssen jedoch die Elutionsbedingungen noch weiter optimiert werden.

Um eine zuverlässige Isolierung der PTS realisieren zu können, wurden Versuche zur Aufreinigung mittels IMAC mit Ni²⁺-Ionen durchgeführt. Diese Chromatographiemethode bot sich an, da die rekombinante PTS über einen His-tag verfügt. Es wurden verschiedene Elutionsverfahren untersucht, indem sowohl ein Imidazol-Gradient als auch eine stufenweise Erhöhung der Imidazol-Konzentration bei der Elution der PTS angewendet wurde. Auf Basis der dabei gewonnenen Ergebnisse wurde ein Elutionsprogramm bestehend aus zwei Stufen entwickelt. Mit der ersten Stufe können selbst Proteine abgereichert werden, die trotz fehlendem His-tag an die IMAC-Säule binden. Die zweite Imidazol-Stufe dient schließlich der Elution der PTS, die dadurch in einer hohen Reinheit von 94% isoliert werden kann. Umsetzungsversuche mit dem so aufgereinigten Enzym ergaben, dass auf diese Weise eine vollständige Abreicherung störender Phosphatasen erreicht werden konnte. Um die Reinheit noch zu erhöhen, könnten anstatt Nickel andere zweiwertige Übergangsmetallionen, wie z.B. Cobalt oder Eisen verwendet werden [109].

Problematisch bei einer Aufreinigung der PTS mittels IMAC ist, dass es sich bei Imidazol um eine relativ kostenintensive und umweltschädliche Verbindung handelt, die bei der Elution in großen Mengen benötigt wird. Für eine Aufreinigung der PTS im großen Maßstab für technische Anwendungen, stellen die in dieser Arbeit generierten Daten zur Optimierung der cross-flow-Filtration und der Durchführung der Ionenaustauschchromatographie gute Grundlage dar. Allerdings müsste für die IMAC eine kostengünstigere Alternative gefunden werden. Dabei könnte neben einer optimierten Ionenaustauschchromatographie, eine weitere Ultrafiltration zum Einsatz kommen, die die PTS auf Basis ihres vergleichbar hohen molaren Masse aufgereinigt. Darüber hinaus ist in Betracht zu ziehen, dass die PTS für eine technische Anwendung nicht unbedingt in reiner Form vorliegen muss. Eine Aufreinigungsstrategie muss nur die zuverlässige Abreicherung von Phosphatasen und Proteasen gewährleisten, um die PTS als Katalysator verwenden zu könne.

Der nächste Schritt bestand in der Synthese von Substraten für die PTS. Neben dem natürlichen Substrat *E,E*-FPP wurden auch die Monoterpenvorläufer GPP und NPP sowie die alternativen Sesquiterpenvorläufer *2Z*, *6E*- und *2E*, *6Z*-FPP erfolgreich hergestellt. Die erfolgreiche Synthese der beiden *E,Z*-Isomere des FPP ist dabei besonders hervorzuheben, da weder die korrespondierenden Alkohole noch die Diphosphate kommerziell erhältlich sind. Gleichzeitig stellen die *E,Z*-Isomere die Grundlage für Umsetzungsversuche dar, mit der die Zusammensetzung eines neuen, dem pflanzlichen Patchouliöl ähnlichen, ätherischen Öls untersucht werden kann.

Bei der Charakterisierung der PTS wurden zunächst grundlegende Versuche zur Untersuchung des Produktspektrums, der Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen sowie kinetischer Parameter durchgeführt. Dabei wurde eine große Ähnlichkeit der rekombinanten PTS mit den Daten der aus der Pflanze isolierten PTS festgestellt. Bei den Versuchen zur Bestimmung des pH- und Temperaturoptimum zeigte sich, dass die Produktselektivität des Enzyms durch die Reaktionsbedingungen beeinflusst werden kann. Auf diese Weise kann die Produktion des

kommerziell relevanten Patchoulols gesteigert werden, indem die Reaktion bei pH 7,25 und einer Temperatur von 30°C durchgeführt wird.

Bei der Bestimmung der kinetischen Parameter wurde ein k_{cat} -Wert von $0,072 \text{ s}^{-1}$ berechnet. Ein so niedriger k_{cat} -Wert ist für Sesquiterpensynthasen zwar typisch, aber für eine technische Anwendung sehr gering. Weiterhin ist problematisch, dass bei den kinetischen Studien eine Substratinhibierung festgestellt wurde, was die Verwendung der PTS in einem Prozess zur Herstellung von Sesquiterpenen erschwert. Eine Substratinhibierung ist für Sesquiterpensynthasen ungewöhnlich, wurde aber in der Literatur für die PTS bislang nicht untersucht. Konkret wurde zur Beschreibung der Reaktionsgeschwindigkeit das Modell einer unkompetitiven Substratinhibierung angenommen. Dabei wird vorausgesetzt, dass zwei Substratmoleküle gleichzeitig an das Enzym binden können. In der Literatur wird jedoch bei keiner Sesquiterpensynthase von einer zweiten Bindestelle für ein Substratmolekül berichtet.

Daher wurden in dieser Arbeit eigene mechanistische Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurde die enzymatische Reaktion in D_2O durchgeführt und auf diese Weise deuterierte Reaktionsprodukte erhalten. Aus diesem enzymatischen Patchouliöl wurde Patchoulol als Reinstoff isoliert und mittels NMR die exakte Position der Deuteriumatome im Molekül bestimmt. Auf dieser Basis wurde ein neuer Bildungsmechanismus für Patchoulol postuliert. Entscheidender Bestandteil des Mechanismus ist die Bildung intermediärer Sesquiterpene, die in hydrophoben Taschen im Inneren des Enzyms vorliegen und durch eine Reprotonierung wieder zurück in die kationische Reaktionskaskade geschleust werden können. Der neue Mechanismus erklärt also nicht nur das Deuterierungsmuster des Patchoulols, sondern zeigt auch, dass mehr als nur ein Substratmolekül zeitgleich an die PTS gebunden sein kann. Daher stützten sich das kinetische Modell und der neue Reaktionsmechanismus gegenseitig auf eindrucksvolle Weise.

Der Schwerpunkt der funktionalen Charakterisierung der PTS bestand in der Untersuchung der Substratflexibilität. Dabei wurden die zuvor synthetisierten Substrate sowie ein oxyfunktionalisiertes FPP-Analogon umgesetzt und die resultierenden Produkte analysiert. Dabei konnten alle getesteten Prenyldiphosphate erfolgreich umgesetzt werden. Von besonderer Bedeutung waren dabei die Umsetzungsversuche mit den *E,Z*-Isomeren des FPP. Denn auf diese Weise konnte die Zusammensetzung eines Patchouliöls untersucht werden, das aus kostengünstigem synthetischen Farnesol hergestellt werden kann. Neben den Sesquiterpenen, die im pflanzlichen Patchouliöl enthalten sind, würde ein solches Öl auf Basis des Isomeren-Gemisches auch die Produkte einer Umsetzung von *2Z,6E*-FPP und *2E,6E*-FPP enthalten. Die Versuche zur Substratflexibilität ergaben, dass speziell das *2Z,6E*-FPP von der PTS zu Sesquiterpenen wie Ylangen, Longifolen und Cadinen umgesetzt wird, die in Parfüms als Duftstoffe zum Einsatz kommen. Auf Grund des Isomeren-Verhältnis von synthetischen Farnesol würde sich ein solches Öl

zu 67% aus den normalen Patchouliöl-Bestandteilen und zu 33% aus anderen Sesquiterpenen zusammensetzten.

Das Resultat wäre also ein Patchouli-ähnliches Öl, das neben dem charakteristischen Patchouli-Geruch weitere Duft-Facetten zeigt. Vor dem Hintergrund das Patchouliöl das wichtigste ätherische Öl in der Parfümherstellung ist und die Branche ständig auf der Suche nach neuen Düften ist, wäre dieses abgewandelte Patchouliöl ein interessanter Duftstoff mit erheblichem kommerziellen Potenzial. Um das Öl zu produzieren, führt jedoch kein Weg an einer *in vitro* Katalyse mit der PTS vorbei. Syntheschemisch ist die Produktion der vielen komplexen Verbindungen ohnehin nicht zu realisieren. Auch ganzzellkatalytische Verfahren, wie z.B. die auf pathway optimierten Mikroorganismen basierende Herstellung des biotechnologischen Patchouliöls Clearwood®, stellen nach heutigen Stand der Technik keine Alternative dar, da die benötigten *E,Z*-Isomere in der Natur praktisch nicht gebildet werden.

Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit erste Versuche zur Entwicklung eines enzymatischen Verfahrens zur Herstellung von Sesquiterpenen durchgeführt. Die Eigenschaften der PTS sowie der unpolare Charakter der Reaktionsprodukte machen es dabei notwendig, die Sesquiterpene direkt aus der wässrigen Reaktionslösung abzureichern. Bei den beiden untersuchten Verfahren handelte es sich um eine Flüssig-Flüssig-Extraktion und um eine Adsorption an einen hydrophoben Adsorber. Beide Methoden wurden zunächst mit Hilfe von Modellsubstanzen hinsichtlich der Isolierung von Sesquiterpenen optimiert. Anschließend wurden die Verfahren mit einem Umsetzungsversuch kombiniert. Dabei zeigte sich, dass sowohl der Kontakt mit einem organischen Lösemittel oder einem hydrophoben Adsorber zur Denaturierung der PTS führen. Prozesstechnisch bedeutet das, dass das Enzym zwingend immobilisiert werden sollte, um einen Kontakt mit hydrophoben Phasengrenzen zu vermeiden.

In Vorversuchen wurde bereits die Immobilisierung durch kovalente Bindung, den Einschluss in eine Alginat-Matrix sowie die Bindung über den His-tag erprobt. In allen Fällen resultierte die Immobilisierung in einer erheblichen Reduzierung bzw. dem vollständigen Verlust der Aktivität. Eine Möglichkeit, die enzymatische Umsetzung in Form einer homogenen Katalyse durchführen zu können und gleichzeitig den Kontakt zu einer hydrophoben Phasengrenze zu vermeiden, wäre die Verwendung einer Membran im Reaktor. Die Membran müsste dazu durchlässig für die Substrat- und Produktmoleküle, aber undurchlässig für die PTS, sein. Auf diese Weise könnte auf der einen Seite der Membran die Reaktion ablaufen und auf der anderen Seite die Sesquiterpene aus der Lösung extrahiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Produktionsverfahren zur Herstellung einer rekombinanten PTS entwickelt. Die Basis dieses Verfahrens stellt dabei eine robuste und gut skalierbare Hochzelldichtekultivierung in Kombination mit einer effektiven Aufarbeitungsstrategie-Strategie dar. Das produzierte Enzym wurde hinsichtlich seiner funktionalen und kinetischen Eigenschaften umfassend

charakterisiert. Mit Deuterierungsversuchen konnten mechanistische Studien durchgeführt werden, die zur Aufklärung der Patchoulol-Biosynthese beitragen. In Versuchen zur Substratflexibilität wurde das katalytische Potenzial der PTS untersucht und die Grundlage für die Herstellung eines neuen Duftstoffs für die Parfümerie gelegt.

6. Anhang

A Material

A1 Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.

| Chemikalie | Hersteller, Land |
|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Acetonitril | Merck KGaA, Deutschland |
| Adsorber Amberlite XAD4 | Sigma-Aldrich Corporation, USA |
| Agar | Sigma-Aldrich Corporation, USA |
| <i>p</i> -Anisaldehyd | Sigma-Aldrich Corporation, USA |
| Ammoniumhydrogencarbonat | Merck KGaA, Deutschland |
| Ammoniumhydroxid (25%) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland |
| Ammoniumsulfat | Fluka (Sigma-Aldrich), USA |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland |
| Ampicillin | Sigma-Aldrich Corporation, USA |
| Borsäure | Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland |
| Bromphenolblau | Merck KGaA, Deutschland |
| β -Mercaptoethanol | Merck KGaA, Deutschland |
| Carbenicillin | Sigma-Aldrich Corporation, USA |
| D-Chloroform | Sigma-Aldrich Corporation, USA |
| Cobaltchlorid | Sigma-Aldrich Corporation, USA |
| Coomassie-Brilliant.Blau G250 | Merck KGaA, Deutschland |
| Deuteriumoxid (99,0%) | Cortecnet, USA |
| Dichlormethan | Merck KGaA, Deutschland |
| Diethylether | Merck KGaA, Deutschland |
| Dinatriumdihydrogendiphosphat | Sigma-Aldrich Corporation, USA |
| Dimethylsulfid | Sigma-Aldrich Corporation, USA |
| Dithiothreitol (DTT) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland |
| EDTA-Dinatriumsalz | Fluka (Sigma-Aldrich), USA |
| Eisen(III)chlorid | Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland |
| Eisen(II)sulfat | Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland |
| Essigsäure | AppliChem GmbH, Deutschland |
| Ethanol (96 %) | VWR International, LLC, Deutschland |
| Ethylacetat | Sigma-Aldrich Corporation, USA |
| <i>E,E</i> -Farnesol | Symrise AG, Deutschland |
| Farnesol, Isomeren-Gemisch | Symrise AG, Deutschland |
| Farnesylpyrophosphat (Ammonium-Salz) | Mobitec GmbH, Deutschland |
| Formaldehyd | Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland |
| Geraniol | Sigma-Aldrich Corporation, USA |
| Geranylgeraniol | Sigma-Aldrich Corporation, USA |
| Glycerin | Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland |
| Glycin | Fluka (Sigma-Aldrich), USA |
| Hefeextrakt | Fluka (Sigma-Aldrich), USA |
| Hexamethyldisiloxan | Sigma-Aldrich Corporation, USA |

| | |
|---|--------------------------------------|
| Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid | Sigma-Aldrich Corporation, USA |
| Kaliumchlorid | Fluka (Sigma-Aldrich), USA |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Merck KGaA, Deutschland |
| Kaliumhexacyanidoferrat(III) | Riedel de-Haen (Sigma-Aldrich), USA |
| Kupfersulfat | Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland |
| Magnesiumsulfat Heptahydrat | Fluka (Sigma-Aldrich), USA |
| Magnesiumchlorid Hexahydrat | Sigma-Aldrich Corporation, USA |
| Mangan(II)chlorid | Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland |
| Methanol | Merck KGaA, Deutschland |
| 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS) | Sigma-Aldrich Corporation, USA |
| Natriumchlorid | Merck KGaA, Deutschland |
| Natriumhydroxid | Fluka (Sigma-Aldrich), USA |
| Natriummolybdat | Sigma-Aldrich Corporation, USA |
| Natriumphosphat | Fluka (Sigma-Aldrich), USA |
| Nerol | Sigma-Aldrich Corporation, USA |
| Nickelsulfat | Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland |
| Octoxinol-9 (Triton X-100) | Sigma-Aldrich Corporation, USA |
| iso-Oktan | Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland |
| PageRuler™ Protein Ladder | Fermentas GmbH, Deutschland |
| Pentan | Fluka (Sigma-Aldrich), USA |
| Perchlorsäure (25%) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland |
| Phosphorsäure (85 %) | Merck KGaA, Deutschland |
| Polyacrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) 40%ig | Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland |
| iso-Propanol | Merck KGaA, Deutschland |
| Salzsäure (37 %) | Fluka (Sigma-Aldrich), USA |
| Schwefelsäure (96%) | Fluka (Sigma-Aldrich), USA |
| Silbernitrat | Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland |
| Sodium Dodecylsulfat (SDS) | Sigma-Aldrich Corporation, USA |
| Tetrabutylammoniumhydroxid | Sigma-Aldrich Corporation, USA |
| Tetramethylethylendiamin (TEMED) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland |
| Trichloroacetonitril | Sigma-Aldrich Corporation, USA |
| Triethylamin | Sigma-Aldrich Corporation, USA |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland |
| Trypton | Sigma-Aldrich Corporation, USA |
| Zinkchlorid | Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland |

A2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

| Verbrauchsmaterial | Hersteller, Land |
|--|--|
| Dünnschichtchromatographie-Platten (Alu mit Kieselgel beschichtet) | Merck KGaA, Deutschland |
| Nitrilhandschuhe | Ansell Healthcare LLC, USA |
| Einwegspritzen (1 mL – 100 mL) | Omnifix B. Braun Melsungen AG, Deutschland |
| GC-Probengefäße (getöntes Glas) | VWR International, USA |
| Halb-Mikro-Küvette | Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland |
| HPLC-Probengefäße | VWR International, USA |

| | |
|--|--------------------------------------|
| Kieselgel 60 (20-45 µm) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland |
| Kieselgel (60-85 µm) | Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland |
| Pasteurpipetten | Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland |
| Pipettenspitzen (versch. Größen) | Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland |
| Reaktionsgefäße (1,5, 2 und 5 mL) | Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland |
| Reaktionsgefäße (5 mL) | Ochs GmbH, Deutschland |
| Sterilfilter (Luer-Lock) Minisart 0,25µm | Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland |

A3 Geräte

Tabelle 7: Verwendete Geräte.

| Gerät | Bezeichnung | Hersteller, Land |
|---|---|--|
| Analysenwaage | Analytik AC 210S | Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland |
| Autoklav | System V-150 | System GmbH, Deutschland |
| Bioreaktor | Biostat® A Plus | Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland |
| Cross-flow-Filtrationsanlage | Sartocon sclice Halter mit Hydrosart Cassette 3021860706W-SG) | Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland |
| FPLC | BioLogic DuoFlow | Bio-Rad Laboratories, Inc., USA |
| FPLC-PDA Detektor | BioLogic QuadTec UV/Vis | Bio-Rad Laboratories, Inc., USA |
| FPLC IMAC Trennsäule | HiPrep IMAC FF (5 mL) | GE Healthcare, USA |
| FPLC IEX Membranadsorber | Sartobind Q75 | Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland |
| Gasflusssteuereinheit | EL-FLOW select | Bronkhorst High-Tech B.V. |
| Gaschromatograph | GC-2010 plus mit AS (150) | Shimadzu, Japan |
| GC Trennsäule | ZB-Wax plus | Phenomenex, USA |
| HPLC | HPLC System | Merck-Hitachi, Japan |
| HPLC Autosampler | L-7200 | Merck-Hitachi, Japan |
| HPLC DAD | L-7455 | Merck-Hitachi, Japan |
| HPLC Interface | D-7000 | Merck-Hitachi, Japan |
| HPLC Pumpe Merck-Hitachi, Japan | L-7100 | Merck-Hitachi, Japan |
| HPLC Säulenofen Merck-Hitachi, Japan | L-7350 | Merck-Hitachi, Japan |
| HPLC Trennsäule | Jupiter Proteo (C12) | Phenomenex, USA |
| HPLC Trennsäule | Aminex HPX-87H | Bio-Rad Laboratories, Inc., USA |
| Kolbenhubpipetten | Eppendorf® Research | Eppendorf AG, Deutschland |
| Kolbenpumpe für die cross-flow-Filtration | SartoJet MSE | Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland |
| French press | ML-11 | Microfluidics, USA |
| Magnet Rührer mit Kontaktthermometer | C-MAG HS7 | IKA Werke GmbH & Co. KG, Deutschland |

| | | |
|---------------------|--------------------------|--|
| Nanodrop Photometer | Nanodrop 1000 | PEYLAB Biotechnologie GmbH, Deutschland |
| NMR | DPX 500 MHz | Bruker Corporation, USA |
| Peristaltikpumpe | ISMATEC IPC | IDEX Health & Science GmbH, Deutschland |
| Photometer | Cary 50 | Varian Inc., USA |
| Photometer | Multiscan GO | Thermo Fisher Inc., USA |
| Reinstwassersystem | arium® pro VF-B | Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland |
| Rotationsverdampfer | RV 10 control V-C | IKA Werke GmbH & Co. KG, Deutschland |
| SDS-PAGE Gelsystem | Mini-PROTEAN® Tetra Cell | Bio-Rad Laboratories, Inc., USA |
| Trockenschrank | | Memmert GmbH & Co. KG, Deutschland |
| Thermostat | LAUDA ECO RE 415 | LAUDA Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG |
| Ultraschallsonde | LABSonic | Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland |
| Vortexer | Vortex Mixer VM-300 | Gemmy Industrial Corporation, Taiwan |
| Vortexer | MS3 basic | IKA Werke GmbH & Co. KG, Deutschland |
| Zentrifuge | Heraeus Multifuge X3FR | Thermo Fisher Scientific Inc., USA |
| Zentrifuge | Heraeus Fresco 17 | Thermo Fisher Scientific Inc., USA |
| Zentrifuge | Heraeus Biofuge Pico 17 | Thermo Fisher Scientific Inc., USA |

A4 LB-Medium

Tabelle 8: Übersicht der Materialien für die Herstellung von LB-Medium bzw. LB-Agarplatten.

| Bestandteil | Menge |
|--------------------|-------|
| Trypton | 10 g |
| Natriumchlorid | 10 g |
| Hefeextrakt | 5 g |
| <i>für Platten</i> | |
| Agar | +15 g |

Die Medienbestandteile in 1 L ddH₂O lösen. Den pH-Wert auf 7,0 einstellen. Zum Gießen von Platten noch 15 g Agar hinzugeben. Das Medium autoklavieren und nach dem Abkühlen auf 60 °C steril jeweils 1 ml der 1000 x Antibiotikastammlösungen hinzugeben und gegebenenfalls in Platten gießen.

A5 ZYP-Medium

Tabelle 9: Zusammensetzung des ZYP-Mediums.

| Bestandteil | Vorbehandlung | Menge |
|-----------------------------------|---------------------------------|----------------|
| Pufferlösung | autoklaviert | 950 mL |
| Glycerin-Lösung (40% v/v) | autoklaviert sterilfiltriert | 50 mL 10 mL |
| MgSO ₄ (0,4 M) | | |
| FeCl ₃ (0,2 M) | sterilfiltriert | 0,5 mL |
| Spurenelemente-Lsg. (1000 x) | sterilfiltriert | 1 mL |
| Carbenicillin-Lsg. (100 mg/mL) | sterilfiltriert | 1 mL |

Tabelle 10: Zusammensetzung der Pufferlösung des ZYP-Mediums.

| Bestandteil | Menge |
|---|--------|
| KH ₂ PO ₄ | 6,8 g |
| Na ₂ HPO ₄ 2 H ₂ O | 8,9 g |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 3,3 g |
| Antischaum | 500 µL |

Ad 950 mL ddH₂O. Auf pH 7,0 einstellen.

Tabelle 11: Zusammensetzung der Glycerin-Lösung für die Herstellung des ZYP-Mediums.

| Bestandteil | Menge |
|---------------------|----------|
| Glycerin-Lsg. (86%) | 465,2 mL |
| ddH ₂ O | 534,8 mL |
| Antischaum | 500 µL |

Tabelle 12: Zusammensetzung der Spurenelemente-Lösung (1000x) für das ZYP-Medium.

| Bestandteil | Menge |
|--------------------------------------|---------|
| ZnCl ₂ | 6,54 mg |
| H ₃ BO ₃ | 2 mg |
| MnCl ₂ 4 H ₂ O | 8,9 mg |
| FeSO ₄ 7 H ₂ O | 400 mg |
| CoCl ₂ 6 H ₂ O | 5 mg |
| CuSO ₄ 5 H ₂ O | 10 mg |
| Na ₂ MoO ₄ | 218 mg |
| NiSO ₄ 6 H ₂ O | 10 mg |

Ad 100 mL ddH₂O.

A6 Feed-Lösung

Tabelle 13: Zusammensetzung der feed-Lösung für die fed-batch-Kultivierung in ZYP-Medium.

| Bestandteil | Vorbehandlung | Menge |
|-----------------------------------|---------------------------------|------------------|
| Glycerin-Lösung (40% v/v) | autoklaviert sterilfiltriert | 1000 mL 10 mL |
| MgSO ₄ (0,4 M) | | |
| FeCl ₃ (0,2 M) | sterilfiltriert | 0,5 mL |
| Spurenelemente-Lsg. (1000 x) | sterilfiltriert | 1 mL |
| Carbenicillin-Lsg. (100 mg/mL) | sterilfiltriert | 950 µL |

A7 Puffer für den Zellaufschluss

Tabelle 14: Zusammensetzung des Aufschlusspuffers.

| Bestandteil | Konzentration |
|-------------|---------------|
| MOPS | 50 mM |
| NaCl | 150 mM |
| Glycerin | 10 % (v/v) |

Auf pH 7,25 einstellen.

A8 Aktivitätspuffer

Tabelle 15: Zusammensetzung des Umsetzungspuffers.

| Bestandteil | Konzentration |
|-------------------|---------------|
| MOPS | 50 mM |
| MgCl ₂ | 10 mM |
| NaCl | 150 mM |
| Glycerin | 10 % (v/v) |

Auf pH 7,25 einstellen.

Tabelle 16: Zusammensetzung des Minimalumsetzungspuffers.

| Bestandteil | Konzentration |
|-------------------|---------------|
| MOPS | 25 mM |
| MgCl ₂ | 10 mM |

Auf pH 7,25 einstellen.

A9 Lagerungspuffer

Tabelle 17: Zusammensetzung des Lagerungspuffers.

| Bestandteil | Konzentration |
|-------------------|---------------|
| MOPS | 50 mM |
| MgCl ₂ | 10 mM |
| DTT | 5 mM |
| NaCl | 150 mM |
| Glycerin | 10 % (v/v) |

Auf pH 7,25 einstellen.

A10 Vektorkarte

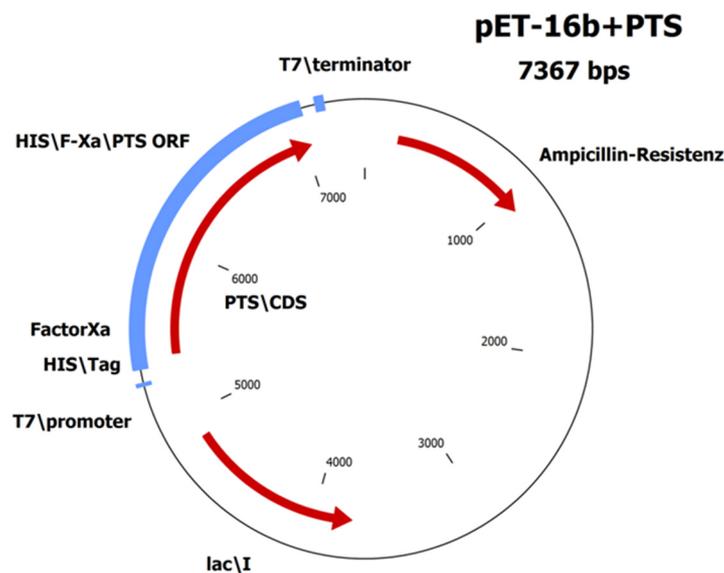


Abbildung 59: Plasmidkarte des in dem *E. coli* PTS Stamm verwendeten genetischen Konstrukts.

A11 Stämme und Stammhaltung

Escherichia coli BL21(DE3), Bestellnr.: 69450 (Merck KGaA, Deutschland)

Der Stamm wird auf LB-Agarplatten (6. A4, mit Carbenicillin) bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und monatlich auf frische Platten überimpft. Die ausgestrichenen Platten wurden für einen Tag bei 37 °C inkubiert. Zur Kontrolle auf mögliche Kontaminationen wurde bei jeder Überimpfung eine Probe lichtmikroskopisch untersucht.

A12 TEAP-Lösung

Tabelle 18: Herstellung von TEAP-Lösung.

| Bestandteil | Menge |
|----------------------|--------|
| Acetonitril | 150 mL |
| Phosphorsäure (85 %) | 25 mL |
| Triethylamin | 54 mL |

Eine Lösung aus Triethylamin (54 mL) und Acetonitril (50 mL) wird in einem 250 mL Rundkolben mit einer Lösung aus Phosphorsäure (25 mL) in Acetonitril (100 mL) vorsichtig und unter starkem Rühren vermischt.

B Methoden

B1 GC-FID Analysen

Zur Analyse der Sesquiterpenkonzentration in der organischen Phase wurde eine GC-2010 Plus (Shimadzu, Japan) mit einer Zebron-WAXplus Säule (30 m Länge, Innendurchmesser 0,25 mm, 0,25 µm Filmdicke, Phenomenex, Torrance, USA) verwendet. 2 µL Probe wurden im Splittless-Modus auf die Säule gegeben (Temperatur am Injektor: 240 °C) und durch einen H₂-Strom als Trägergas (6,49 mL/min) aufgetrennt. Die Analytik am Säulenausgang erfolgte durch einen Flammenionisationsdetektor (Temperatur am Detektor: 300 °C).

Tabelle 19: Temperaturprogramm zur gaschromatographischen (GC-FID) Untersuchung von Terpenen.

| Aufheizgeschwindigkeit [°C/min] | Temperatur [°C] | Haltedauer [min] |
|------------------------------------|--------------------|---------------------|
| - | 40 | 0,2 |
| 10 | 210 | 1,0 |
| 30 | 230 | 3,0 |

B2 GC-MS Analysen

Die Messungen wurden am Institut für Lebensmittelchemie der Leibniz Universität Hannover durchgeführt. Es wurde ein Fisons GC 8000 Gaschromatograph (CE Instruments, Hindley Green, Großbritannien) verwendet, der mit einer Zebron-WAX Säule (30 m Länge, 0,25 mm Innendurchmesser, 0,25 µm Filmdicke, Phenomenex, Torrance, USA) ausgestattet war. 1 µL Probe wurden im on-column Injektionsmodus mit Helium als Trägergas untersucht.

Tabelle 20: Temperaturprogramm zur massenspektrometrischen (GC-MS) Untersuchung von Terpenen.

| Aufheizgeschwindigkeit [°C/min] | Temperatur [°C] | Haltedauer [min] |
|------------------------------------|--------------------|---------------------|
| - | 40 | 3 |
| 3 | 230 | 0 |

Als Detektor kam ein Fisions MD800 MS (interface 230_C; ion source 200_C: quadropo11 100_C; EI-Ionisation mit 70 eV; scan range 33-330 amu) zum Einsatz. Die Massenspektren wurden mit digitalen MS-Bibliotheken oder mit Spektren von Standardsubstanzen verglichen.

B3 Offline-Analytik zur Bestimmung der Glycerin- und Acetat-Konzentration mittels HPLC

2 mL Kulturbrühe werden für 5 min bei 9,4 xg zentrifugiert und 1 mL des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für die Proteinfällung wurden je 100 µL Carrez-I und -II-Lösung hinzugegeben und gut durchmischt. Nach 10 min Einwirkzeit erfolgte erneut eine Zentrifugation für 10 min bei 9,4 xg. Der Überstand wurde sterilfiltriert und in ein Probengefäß für die HPLC-Messung überführt.

Tabelle 21: Zusammensetzung der Carrez I- und Carrez II-Lösung.

| Bestandteil | Menge |
|----------------------------|--------|
| <i>Carrez I Lösung</i> | |
| Kaliumhexacyanoferrat(III) | 3,6 mg |
| <i>Carrez II Lösung</i> | |
| Zinksulfat Heptahydrat | 7,2 mg |

Für die chromatographische Auftrennung wurde eine Aminex HPX-87H Säule (300 x 7,2 mm, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) verwendet. Die Elution erfolgte isokratisch mit 0,5 mM H₂SO₄ bei einer Flussrate von 0,7 mL/min bei 60°C. Als Detektor wurden ein Chromaster 5430 DA-Detektor und ein Lachrom RI Detektor I-7490“ verwendet.

B4 HPLC-Analytik von Prenylphosphaten

Die Quantifizierung der Prenylphosphaten erfolgte über RP-HPLC mittels einer VWR Hitachi Chromaster (Hitachi, Tokyo, Japan) Anlage. Als Säule kam eine Jupiter Proteo (90 A, 205 x 4.6 mm, Phenomenex, Torrance, USA) zum Einsatz. Die Auftrennung erfolgte mit einem Gradientenprogramm bestehend aus 30 mM NH₄HCO₃-Lösung (Eluent A) und MeCN/ddH₂O (95:5) bei einer Flussrate von 1 mL/min und 25°C.

Tabelle 22: Gradientenprogramm zur Auftrennung der Prenylphosphaten mittels HPLC.

| Zeit [min] | Eluent A [%] | Eluent B [%] |
|------------|--------------|--------------|
| 0 | 70 | 30 |
| 10 | 36 | 64 |
| 11 | 10 | 90 |
| 15 | 10 | 90 |
| 16 | 70 | 30 |
| 23 | 70 | 30 |

B5 DC-Auftrennung von Prenyldiphosphaten

Für die Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel beschichtete DC-Aluminiumplatten Kieselgel 60 (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Als Laufmittel wurde i-PrOH/NH₄OH-Lsg. (25% m/v)/H₂O (6:3:0,5) verwendet. Die Analyse der Dünnschichtchromatogramme erfolgte mit Hilfe von Anisaldehyd-Färbereagenz. Die Färbung wurde mit einem Heißluftfön entwickelt.

Tabelle 23: Herstellung des Anisaldehyd-Färbereagens.

| Bestandteil | Menge |
|-----------------------|--------|
| Ethanol (96 %) | 135 mL |
| Schwefelsäure (96%) | 5,0 mL |
| Essigsäure | 1,5 mL |
| <i>p</i> -Anisaldehyd | 3,7 mL |

B6 DC-Auftrennung von Patchouliöl

Für die Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel beschichtete DC-Aluminiumplatten Kieselgel 60 von der Firma Merck KGaA, Deutschland verwendet. Als Laufmittel im ersten Lauf wurde Pentan und im zweiten Lauf Pentan/Ethylacetat (95:5) verwendet. Die Analyse der Dünnschichtchromatogramme erfolgte mit Hilfe eines speziellen Anisaldehyd-Färbereagens für Terpene. Die Färbung wurde mit einem Heißluftfön entwickelt.

Tabelle 24: Herstellung des speziellen Anisaldehyd-Färbereagens für Terpene.

| Bestandteil | Menge |
|-----------------------|--------|
| ddH ₂ O | 144 mL |
| Aceton | 36 mL |
| Perchlorsäure (70%) | 18 mL |
| <i>p</i> -Anisaldehyd | 1,8 mL |

B7 Durchführung der NMR-Experimente

Für die Probenvorbereitung wurden ca. 2 mg Substanz in 0,7 mL CDCl₃ gelöst und in einem im Trockenschrank getrockneten Proberöhrchen überführt. Die NMR-Experimente wurden von Dr. Jörg Fohrer am Institut für Organische Chemie der Leibniz Universität Hannover.

B8 SDS-PAGE und Coomassie-Färbung**Tabelle 25: Laemmli-Puffer zur Vorbereitung der Proteinproben (1:1 mit Probe versetzen).**

| Bestandteil | Menge |
|---|-------|
| 2 x SDS-Probenpuffer | 80 % |
| β -Mercaptoethanol | 10 % |
| 55%ige Glycerin/ddH ₂ O-Lösung | 10 % |

Tabelle 26: Vorschrift zum Gießen eines 15%igen Trenngels für die SDS-PAGE.

| Bestandteil | Volumen |
|--|---------|
| Rotisphor Polyacrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) 40 %ig | 4,0 mL |
| Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8) | 2,8 mL |
| ddH ₂ O | 2,2 mL |
| SDS (1 %ig) | 1,0 mL |
| TEMED | 20 µL |
| APS (25 %ig) | 20 µL |

Tabelle 27: Vorschrift zum Gießen eines 6 %igen Sammelgels für die SDS-PAGE.

| Bestandteil | Volumen |
|---|---------|
| Rotisphor Polyacrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) 40%ig | 750 µL |
| Tris-HCl (1,5 M, pH 6,8) | 630 µL |
| ddH ₂ O | 3,77 mL |
| SDS (1%ig) | 300 µL |
| TEMED | 10 µL |
| APS | 10 µL |

Tabelle 28: Zusammensetzung des TGS-Laufpuffers.

| Bestandteil | Menge |
|-------------|-----------|
| Tris-Base | 3,03 g/L |
| Glycin | 14,41 g/L |
| SDS | 1 g/L |

Puffer auf pH 8,3 einstellen.

Nach Auspolymerisieren des Polyacrylamidgels werden die Proben im Verhältnis 1:1 mit Laemmli-Puffer versetzt und für 10 min bei 95 °C erhitzt. Die Proben werden in die Taschen pipettiert (7 µL Probe und 3 µL des PageRuler™ Proteinmarkers) und das Gel in die mit SDS-Laufpuffer (1 x TGS-Puffer) gefüllte Probenkammer eingesetzt. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgt bei 100 V für 30 min. Anschließend wird die Spannung auf 150 V erhöht. Der Gellauf wird beendet, wenn die blaue Bromphenolblau Bande die untere Begrenzung des Gels erreicht hat.

Für die kolloidale Coomassie-Färbung wurde das Gel zunächst zweimal für 10 min mit H₂O gewaschen. Die Coomassie-Färbelösung wird anschließend hinzugefügt und das Gel über Nacht inkubiert. Die Entfärbung erfolgt durch mehrere Waschstschritte mit H₂O, bis der Hintergrund des Gels wieder farblos ist.

B9 Zellaufschluss mittels Ultraschall

Die abzentrifugierte Biofeuchtmasse wird in 0,5 mL des jeweiligen Aufschlusspuffers resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgt mittels einer Ultraschallsonde (Amplitude = 100%, Zyklus = 0,6 s). Während

des Aufschlusses werden die Proben mit Eis gekühlt. Der Aufschluss erfolgt für 5 x für 20 s. Zwischen jeder Probenbeschallung wird die Suspension für 1 min auf Eis ruhen gelassen.

B10 Zellaufschluss mittels french-press

100 g Feuchtbiomasse wurden in 1 L Aufschlusspuffer resuspendiert und durch einen Microfluidizer Processor (M-11L, Microfluidics, Westwood, USA) aufgeschlossen. Dazu wurden 8 Durchläufe bei einem Druck von 9.000 psi durchgeführt. Anschließend erfolgte Die unlösliche Proteinfraction wurde anschließend durch eine Zentrifugation für 1 h bei 8,0 xg und 4 °C abgetrennt.

B11 Bradford Assay

| Bestandteil | Menge |
|--------------------------------|--------|
| Coomassie-brilliant-blue G 250 | 0,1 g |
| Ethanol | 50 mL |
| Phosphorsäure (85%) | 100 mL |

Ad 1000 mL ddH₂O.

10 µL Probe wurden in 300 µL der Coomassie-Stammlösung gegeben, gründlich durchmischt und für 5 min bei 25°C inkubiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch durch Messung der Adsorption bei 595 nm mit einem Multiscan Spectrum Photometer (Thermo LabSystem, USA). Die Kalibrationsreihe für die Quantifizierung wurde mit BSA erstellt.

B12 Bestimmung der optischen Dichte und der BTM

Die Messung der mit Saline (0,9% (m/m) Natriumchlorid-Lösung) verdünnten Proben erfolgt bei 600 nm im Photometer. Sobald eine optische Dichte von über 0,8 gemessen wurde, muss weiter verdünnt werden, da der lineare Messbereich verlassen wurde.

Jeweils 1,5 ml der Kulturbrühe werden in getrocknete Reaktionsgefäße überführt und für 10 min bei 13.000 xg abzentrifugiert. Das erhaltene Pellet wird bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und ausgewogen.

B13 Densitometrische Konzentrationsbestimmung der PTS

Für die Densitometrie-Messung wurde eine SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung durchgeführt. Neben den Proben wurde zusätzlich eine BSA-Kalibrationsreihe mit folgenden Konzentrationen aufgetragen: 50, 100, 150, 200 und 300 µg/mL. Für die Auswertung der Banden mittels einer Farbraumanalyse wurde die Software ImageJ (NIH, Bethesda, USA) verwendet.

B14 Durchführung des Enzym-Assays zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit von Sesquiterpensynthasen.

Für die kinetischen Untersuchungen der PTS wurde in einem 2,5 mL Ansatz 0,5 µM PTS und eine FPP-Konzentration von 1 bis 100 µM in Umsetzungspuffer eingesetzt. Nach Reaktionsstart wurde der

Ansatz auf fünf gleich große Aliquots aufgeteilt, mit jeweils 200 μL iso-Oktan überschichtet und im Wasserbad bei 38 °C inkubiert. Nach 2 bis 10 Minuten wurde jeweils ein Aliquot entnommen, die Reaktion durch kräftiges Durchmischen von 30 s gestoppt und die Phasen nach kurzem zentrifugieren getrennt. Die organische Phase wurde entnommen und die Sesquiterpenkonzentration mittels GC-FID bestimmt.

B15 Optimierte Batch-Adsorption zur Isolierung von der Modelsubstanz Cedrol wässrigen Lösungen

50 mg des Adsorbers wurden 3 Mal mit 500 μL ddH₂O gewaschen und danach mit DCM konditioniert. Das Lösemittel wurde abgenommen und der Adsorber zu 1 mL der wässrigen Sesquiterpen-Lösung hinzugefügt. Die Adsorption erfolgte für 30 min bei RT und unter kräftigen Schütteln bei 850 rpm. Für die Elution wurde die wässrige Pufferlösung entfernt und der Adsorber in 500 μL DCM aufgeschwemmt. Die Suspension wurde für 1 min in ein Ultraschallbad getaucht und anschließend für 4 min bei 850 rpm geschüttelt. Um eine optimale Elution (89%) des Cedrols zu gewährleisten, wurde dieser Vorgang 3 Mal wiederholt.

C Zusätzliche experimentelle Daten

C1 Patchouliöl-Kalibrationsgerade mit einem analytischen Standard

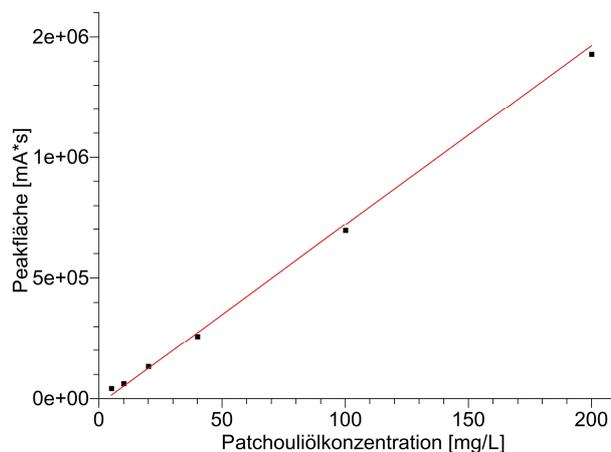


Abbildung 60: Kalibrationsgerade der Patchouliöl-Peakfläche eines Patchouliöl-Standards; $R^2 = 0,9995$.

C2 Gele der Reaktorkultivierungen

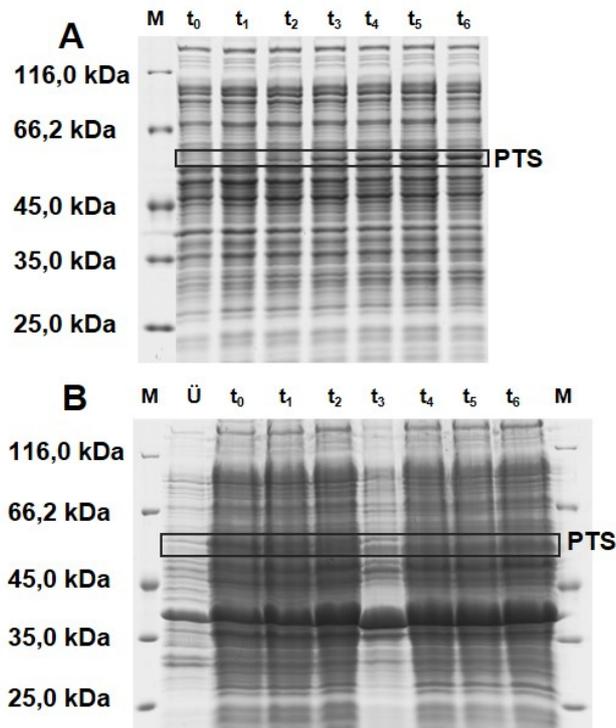


Abbildung 61: SDS-PAGE der Proben des Lysats (A) und des Pellets (B) der Reaktorkultivierung mit exponentiellem feed und Temperaturabsenkung während der Induktion (12 %ige Trenngele mit Coomassie-Färbung, M = Marker, Ü = Überstand, t₀ = Zeitpunkt der Induktion, t₁ = 1 h, t₂ = 2 h, t₃ = 4 h, t₄ = 6 h, t₅ = 8 h, t₆ = 10 h).

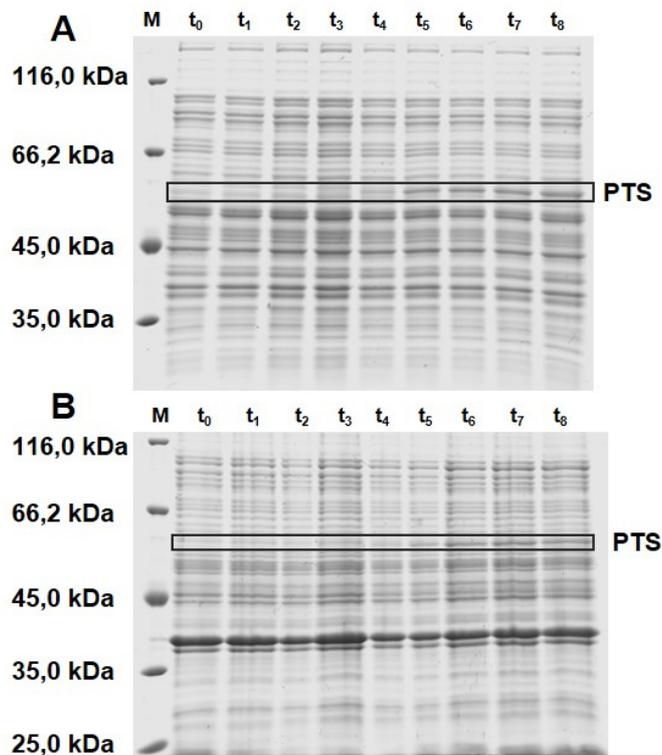


Abbildung 62: SDS-PAGE der Proben des Lysats (A) und des Pellets (B) der Reaktorkultivierung mit konstantem feed und Temperaturabsenkung während der Induktion (12 %ige Trenngele mit Coomassie-Färbung, M = Marker, t₀ = Zeitpunkt der Induktion, t₁ = 0,5 h, t₂ = 1 h, t₃ = 2 h, t₄ = 4 h, t₅ = 6 h, t₆ = 8 h, t₇ = 10 h, t₈ = 10,5 h).

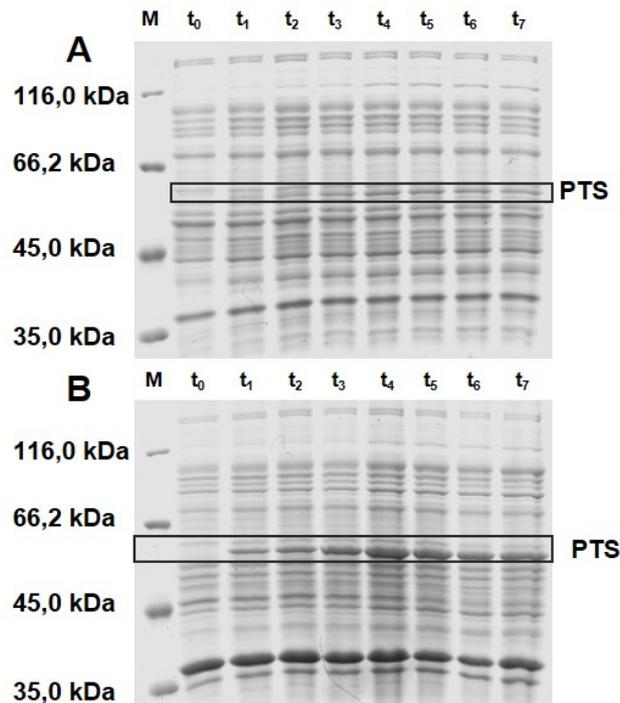


Abbildung 63: SDS-PAGE der Proben des Lysats (A) und des Pellets (B) der Reaktorkultivierung mit konstantem feed und Temperaturabsenkung während der Induktion (12 %ige Trenngele mit Coomassie-Färbung, M = Marker, t_0 = Zeitpunkt der Induktion, $t_1 = 0,25$ h, $t_2 = 1$ h, $t_3 = 2$ h, $t_4 = 4$ h, $t_5 = 6$ h, $t_6 = 8$ h, $t_7 = 10$ h).

C3 DCs der Substratsynthese

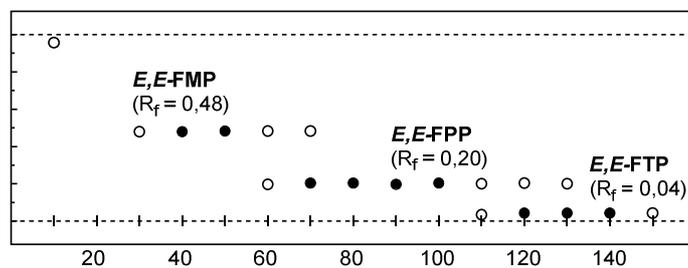


Abbildung 64: Analyse mittels DC der bei der Säulenchromatographie gesammelten Fraktionen der *E,E*-FPP Synthese (10 x 0,6 μ L Probe pro Punkt, Entwicklung mit Anisaldehyd-Färbereagenz).

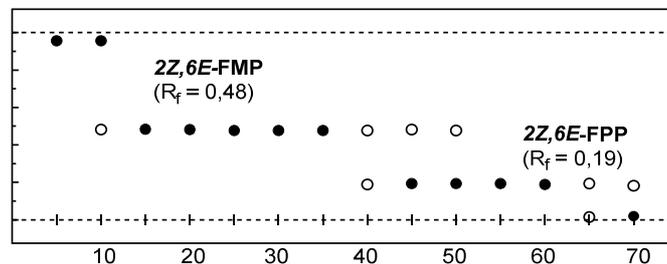


Abbildung 65: Analyse mittels DC der bei der Säulenchromatographie gesammelten Fraktionen der *Z,Z,6E*-FPP Synthese (10 x 0,6 μ L Probe pro Punkt, Entwicklung mit Anisaldehyd-Färbereagenz).

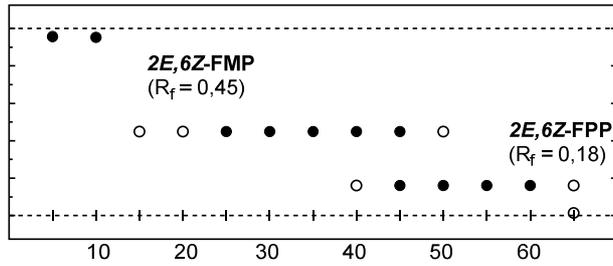


Abbildung 66: Analyse mittels DC der bei der Säulenchromatographie gesammelten Fraktionen der 2E,6Z-FPP Synthese (10 x 0,6 μ L Probe pro Punkt, Entwicklung mit Anisaldehyd-Färbereagenz).

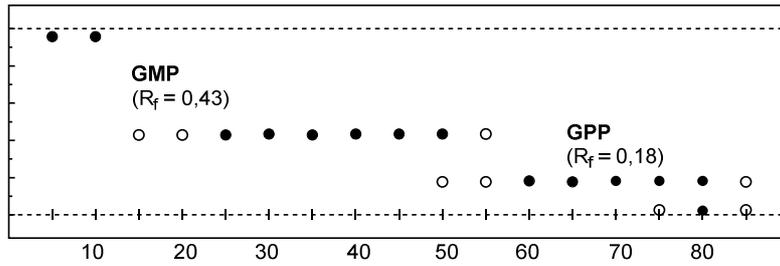


Abbildung 67: Analyse mittels DC der bei der Säulenchromatographie gesammelten Fraktionen der GPP-Synthese (10 x 0,6 μ L Probe pro Punkt, Entwicklung mit Anisaldehyd-Färbereagenz).

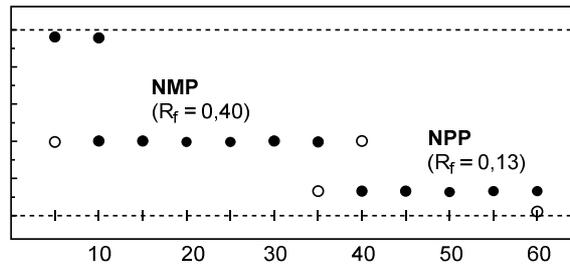


Abbildung 68: Analyse mittels DC der bei der Säulenchromatographie gesammelten Fraktionen der NPP-Synthese (10 x 0,6 μ L Probe pro Punkt, Entwicklung mit Anisaldehyd-Färbereagenz).

C4 Zusätzliche NMR-Spektren

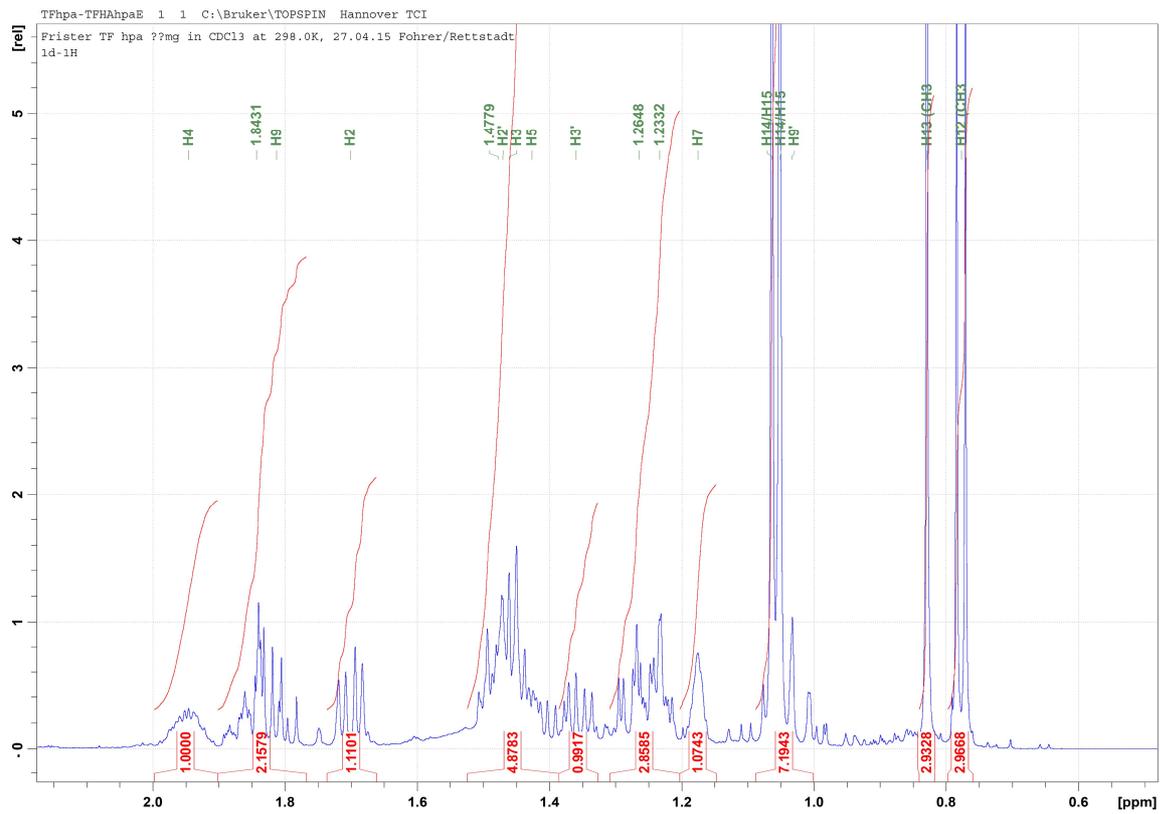


Abbildung 69: ¹H-NMR Spektrum von H-Patchouliol.

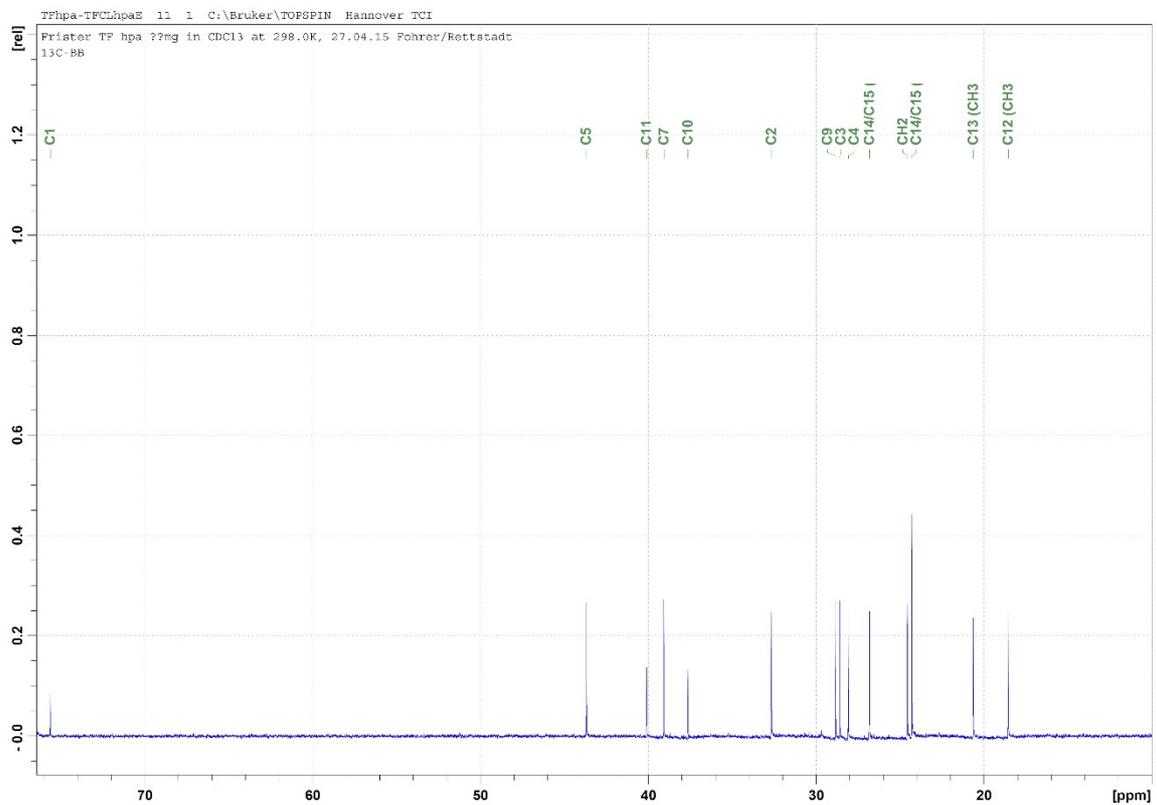


Abbildung 70: Breitband-entkoppeltes ¹³C-NMR Spektrum von H-Patchouliol.

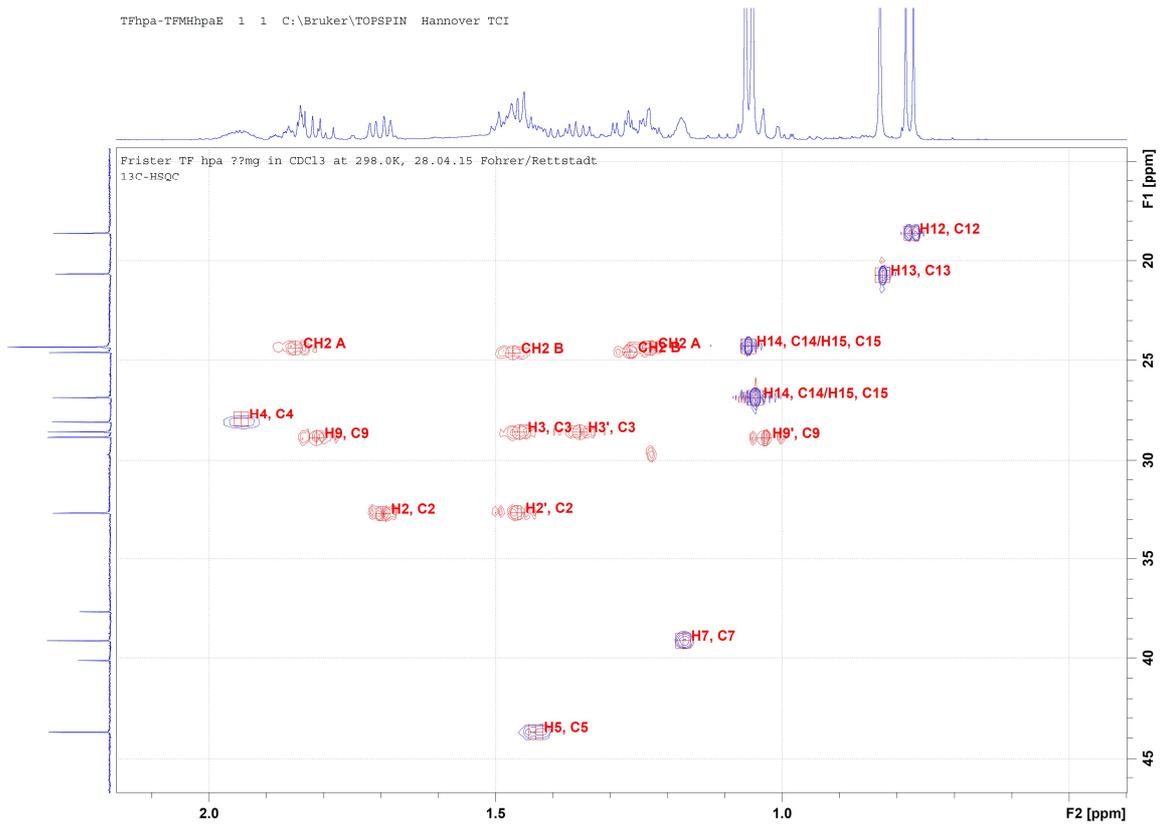


Abbildung 71: ^{13}C -HSQC-NMR Spektrum von H-Patchoulol.

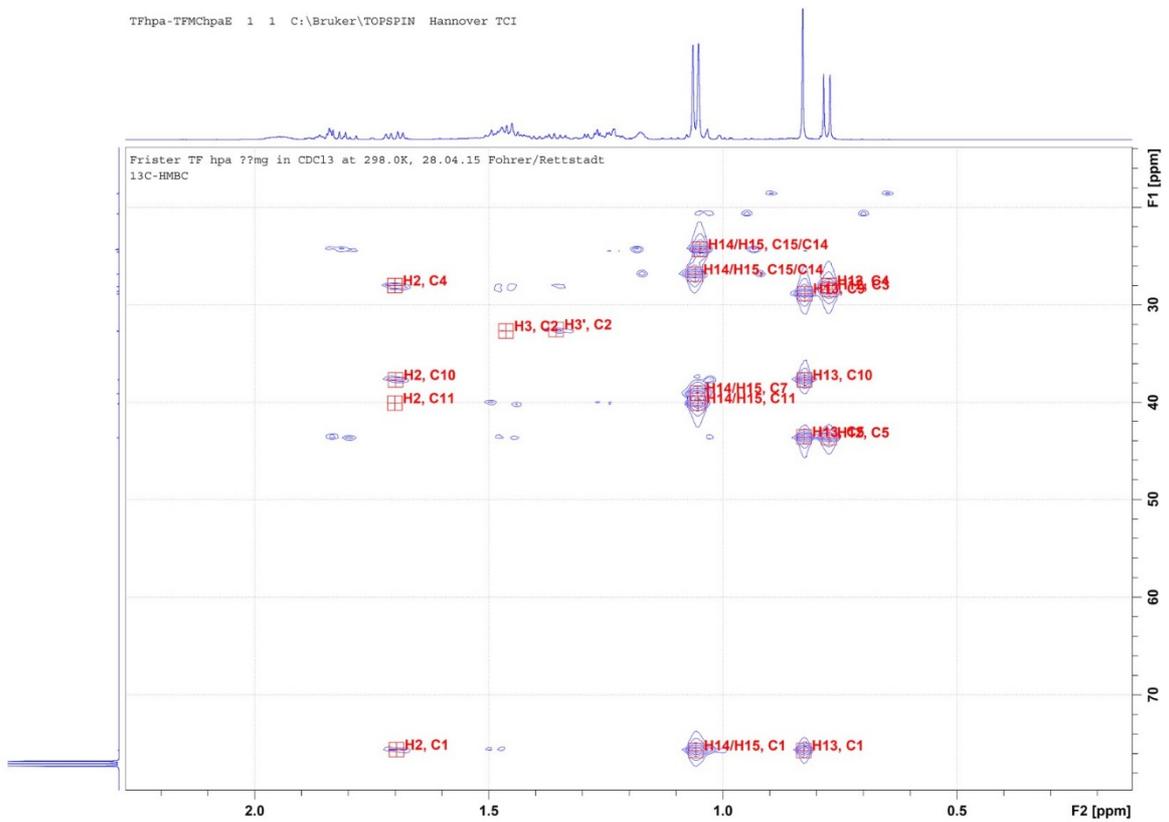


Abbildung 72: ^{13}C -HMBC-NMR Spektrum von H-Patchoulol.

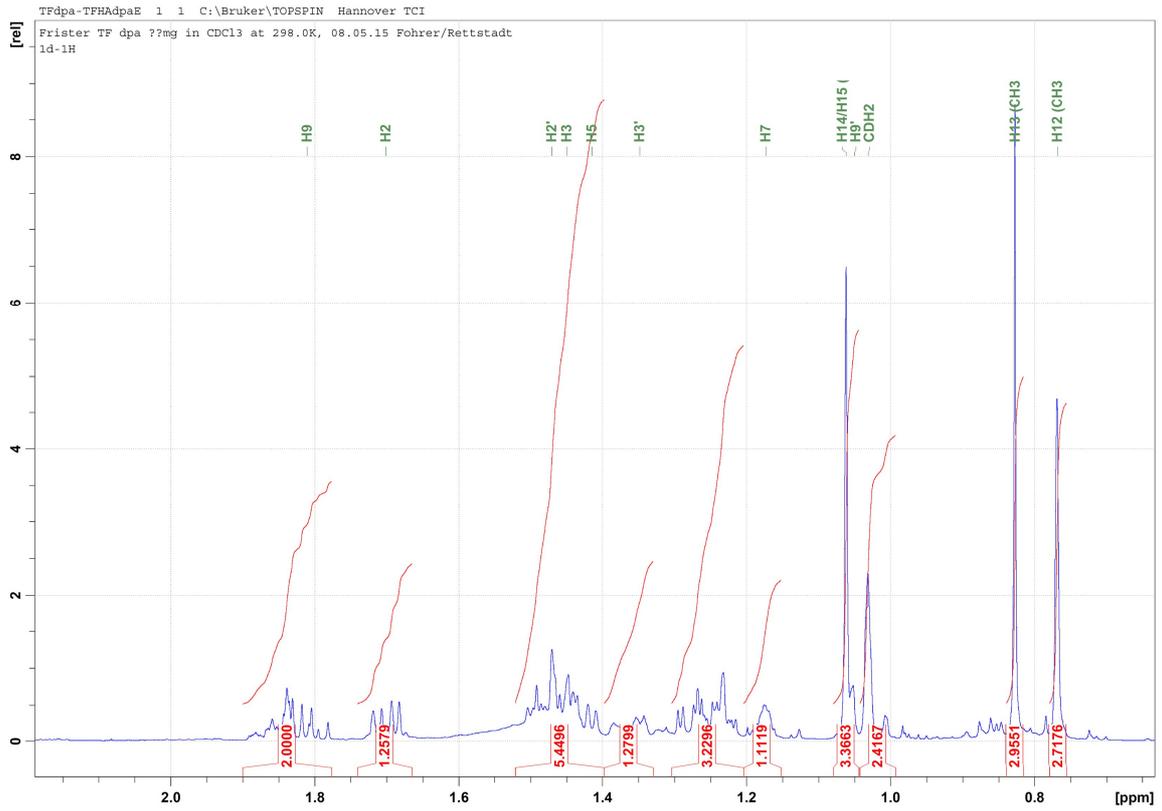


Abbildung 73: ¹H-NMR Spektrum von D-Patchoulol.

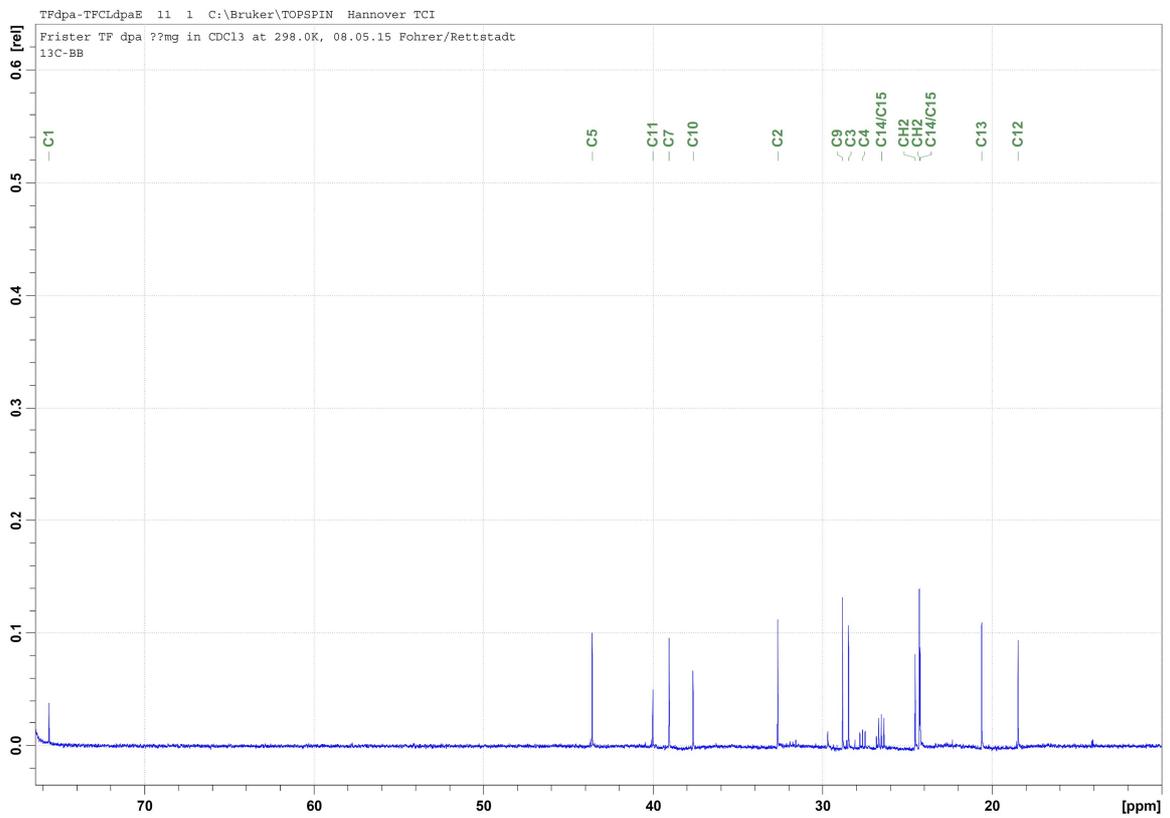


Abbildung 74: Breitband-entkoppeltes ¹³C-NMR Spektrum von D-Patchoulol.

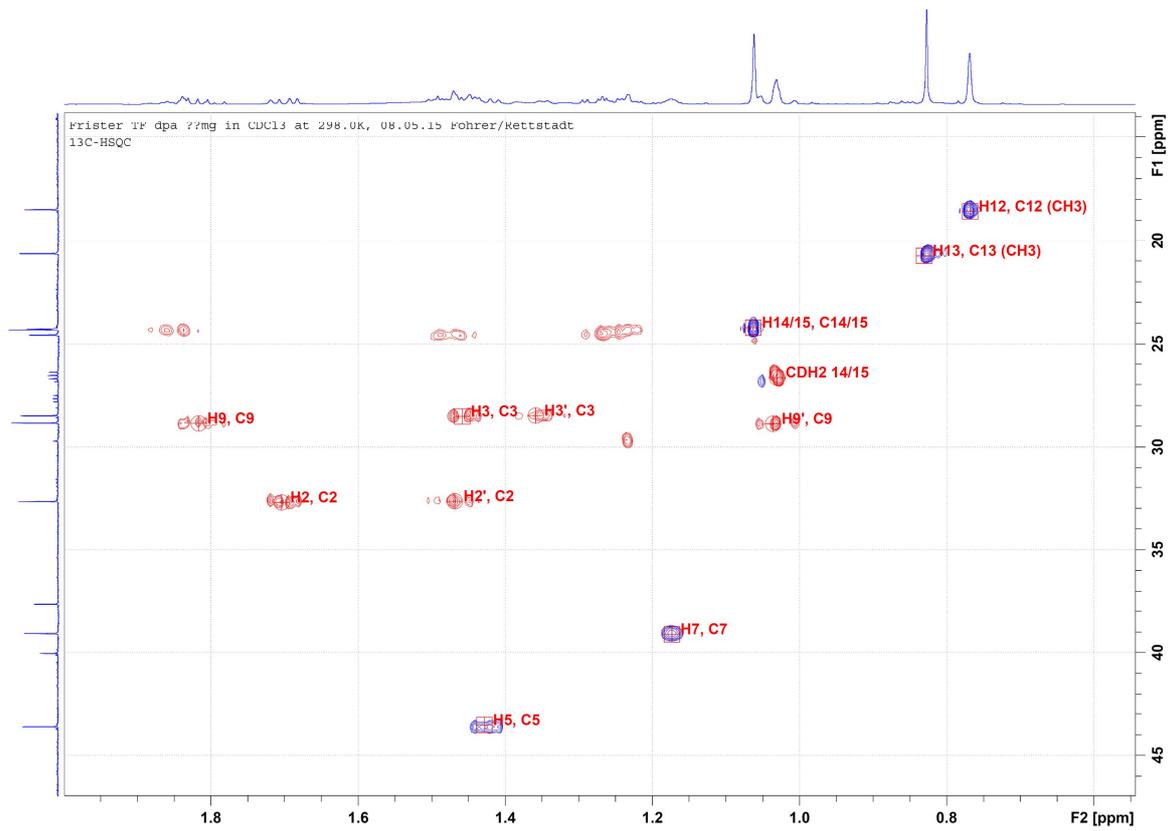


Abbildung 75: ^{13}C -HSQC-NMR Spektrum von D-Patchoulol.

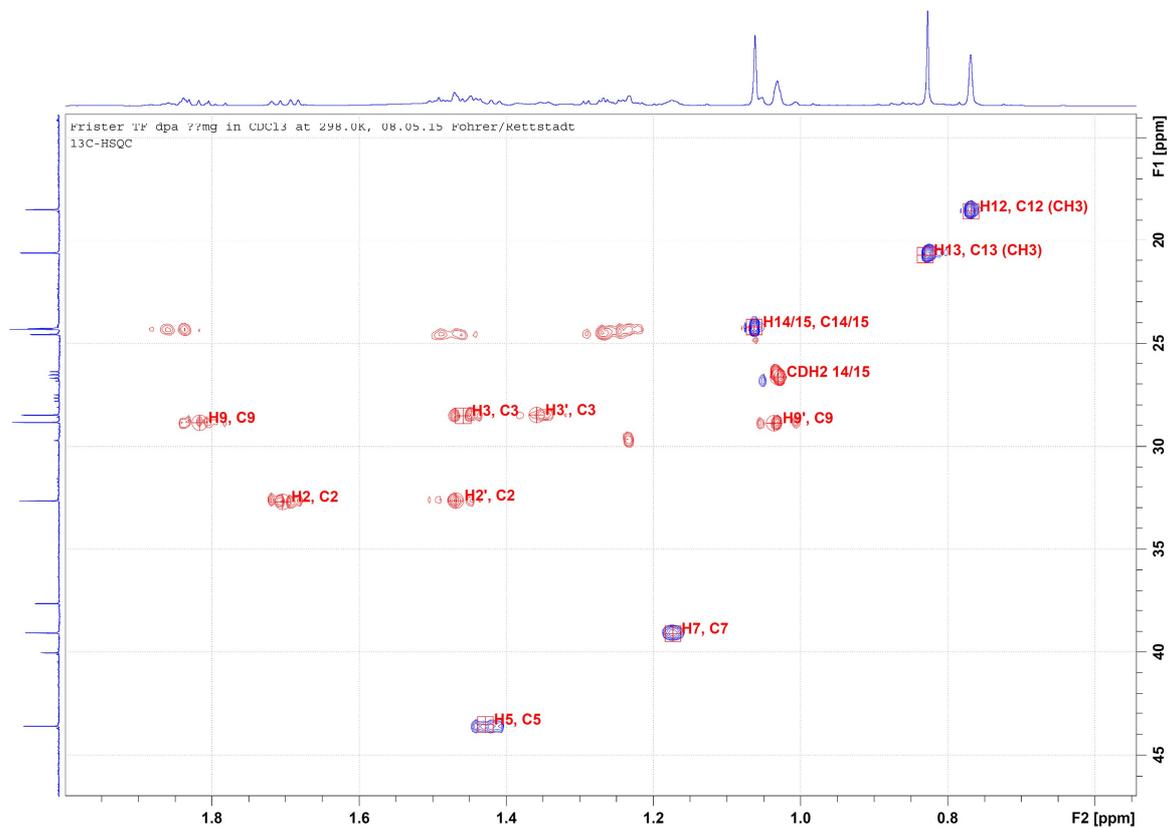


Abbildung 76: ^{13}C -HMBC-NMR Spektrum von D-Patchoulol.

7. Literaturverzeichnis

- [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 Expr. Purif.* **2014**, 97, 61.
- [2] Bild: O. Frister, Alter Botanischer Garten, Georg- August-Universität Göttingen **2014**.
- [3] T. Frister, S. Beutel, Moschusduft und Patchouliöl, *Chemie in unserer Zeit* **2015**, veröffentlicht online im April.
- [4] Weltbank, World Development Report 2008: Agriculture for Development **2007**.
- [5] Bild: Blog at Wordpress.com, *From around (t)here*:
<https://aroundthere.wordpress.com/2011/10/28/export-crops/> (05.06.2013).
- [6] Bild: Givaudan, *The journey of patchouli*, <http://patchouli.givaudan.com>.
- [7] S. Maxwell, A. Fernando, Cash crops in developing countries: The issues, the facts, the policies, *World Development* **1989**, 17, 1677.
- [8] Firmenich, *Marketing Sheet: CLEARWOOD*,
<http://www.firmenich.com/uploads/files/ingredients/marketing-sheet/perfumery/clearwood-970953.pdf> (05.06.2013).
- [9] F. Deguerry, L. Pastore, S. Wu, A. Clark, J. Chappell, M. Schalk, The diverse sesquiterpene profile of patchouli, *Pogostemon cablin*, is correlated with a limited number of sesquiterpene synthases, *Arch. Biochem. Biophys.* **2006**, 454, 123.
- [10] G. Buchi, W. D. MacLeod, J. Padilla, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 4438.
- [11] G. Ohloff, W. Pickenhagen, P. Kraft, *Scent and Chemistry: Molecular World of Odors*, 1st ed., Helvetica Chimica Acta, Wiley-VCH **2011**.
- [12] W. Kölle, Wasseranalysen - richtig beurteilt: Grundlagen, Parameter, Wassertypen, Inhaltsstoffe, Grenzwerte nach Trinkwasserverordnung und EU-Trinkwasserrichtlinie, 2. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim **2003**.
- [13] G. Krammer, Eintrag: Patchouliöl, *Römpp online* (05.06.2013).
- [14] V. Hale, J. D. Keasling, N. Renninger, T. T. Diagana, Microbially derived artemisinin: a biotechnology solution to the global problem of access to affordable antimalarial drugs, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2007**, 77, 198.
- [15] E. J. Corey, H. A. Kirst, J. A. Katzenellenbogen, A Stereospecific Total Synthesis of α -Santalol, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 6314.
- [16] E. J. Corey, R. B. Mitra, H. Uda, Total Synthesis of D,L -Caryophyllene and D,L - Isocaryophyllene, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 485.
- [17] F. Näf, R. Decorzant, W. Giersch, G. Ohloff, A Stereocontrolled Access to (\pm)-, (-)-, and (+)- Patchouli Alcohol, *Helv. Chim. Acta* **1981**, 64, 1387.
- [18] R. L. Snowden, P. Sonnay, G. Ohloff, Stereoselective Syntheses of (\pm)-epi- β -Santalene and (\pm)-epi- β -Santalol, *Helv. Chim. Acta* **1981**, 64, 25.
- [19] A. Srikrishna, G. Satyanarayana, An enantiospecific total synthesis of (-)-patchouli alcohol, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, 16, 3992.
- [20] J. Bergin, *BIO066B - Synthetic Biology: Emerging Global Markets*,
<http://www.bccresearch.com/report/global-synthetic-biology-markets-bio066b.html> (27.09.2012).
- [21] J. Kirby, J. D. Keasling, Metabolic engineering of microorganisms for isoprenoid production, *Nat. Prod. Rep.* **2008**, 25, 656.
- [22] NEST High-Level Expert Group, Synthetic Biology - Applying Engineering to Biology,
ftp://ftp.cordis.europa.eu/pub/nest/docs/syntheticbiology_b5_eur21796_en.pdf (13.09.2012).
- [23] J. D. Keasling, Synthetic biology and the development of tools for metabolic engineering, *Metabolic Engineering* **2012**, 14, 189.
- [24] J. Zhou, G. Du, J. Chen, Novel fermentation processes for manufacturing plant natural products, *Current Opinion in Biotechnology* **2014**, 25, 17.
- [25] D. J. McGarvey, R. Croteau, Terpenoid metabolism, *The Plant cell* **1995**, 7, 1015.
- [26] J. D. Newman, J. Chappell, Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon partitioning within the cytoplasmic pathway, *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **1999**, 34, 95.

- [27] E. Cordoba, M. Salmi, P. León, Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants, *Journal of experimental botany* **2009**, *60*, 2933.
- [28] F. Rohdich, S. Hecht, K. Gärtner, P. Adam, C. Krieger, S. Amslinger, D. Arigoni, A. Bacher, W. Eisenreich, Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: metabolic role of IspH (LytB) protein, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 1158.
- [29] J. Degenhardt, T. G. Köllner, J. Gershenzon, Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants, *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1621.
- [30] S. L. Munck, R. Croteau, Purification and characterization of the sesquiterpene cyclase patchoulol synthase from *Pogostemon cablin*, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1990**, *282*, 58.
- [31] G. Scalcinati, C. Knuf, S. Partow, Y. Chen, J. Maury, M. Schalk, L. Daviet, J. Nielsen, V. Siewers, Dynamic control of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* engineered for the production of plant sesquiterpene α -santalene in a fed-batch mode, *Metabolic Engineering* **2012**, *14*, 91.
- [32] C. A. Lesburg, J. M. Caruthers, C. M. Paschall, D. W. Christianson, Managing and manipulating carbocations in biology: terpenoid cyclase structure and mechanism, *Current Opinion in Structural Biology* **1998**, *8*, 695.
- [33] D. E. Cane, Enzymic formation of sesquiterpenes, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 1089.
- [34] L. A. Wessjohann, J. Keim, B. Weigel, M. Dippe, Alkylating enzymes, *Current Opinion in Chemical Biology* **2013**, *17*, 229.
- [35] D. T. Major, Y. Freud, M. Weitman, Catalytic control in terpenoid cyclases: multiscale modeling of thermodynamic, kinetic, and dynamic effects, *Current Opinion in Chemical Biology* **2014**, *21*, 25.
- [36] D. J. Miller, R. K. Allemann, Sesquiterpene synthases: passive catalysts or active players?, *Natural product reports* **2012**, *29*, 60.
- [37] K. Zhou, R. J. Peters, Electrostatic effects on (di)terpene synthase product outcome, *Chemical communications* **2011**, *47*, 4074.
- [38] J. A. Faraldos, S. Wu, J. Chappell, R. M. Coates, 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.
- [39] S. Irvine, *Perfume: The Creation and Allure of Classic Fragrances*, 1st ed., Haldane Mason **1995**.
- [40] G. Ohloff, *Irdische Düfte - himmlische Lust: Eine Kulturgeschichte der Wohlgerüche Wohlgerüche*, 1st ed., Birkhäuser, Basel **1992**.
- [41] N. Groom, *The new perfume handbook*, 2nd ed., Blackie Academic & Professional, London u.a. **1997**.
- [42] MyParfum, *Die Sprache des Parfüms*, <http://www.myparfum.de/parfumsprache> (03.06.2015).
- [43] A. Weber-Mußmann, Fixateure, *Römp online* (05.06.2013).
- [44] Philip Kraft, *US7632791 B2*.
- [45] G. L. Rosano, E. A. Ceccarelli, Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges, *Frontiers in microbiology* **2014**, *5*, 172.
- [46] Z. Yang et al., Highly efficient production of soluble proteins from insoluble inclusion bodies by a two-step-denaturing and refolding method, *PloS one* **2011**, *6*, 22981.
- [47] F. Hoffmann, Heuvel, Joop van den, N. Zidek, U. Rinas, Minimizing inclusion body formation during recombinant protein production in *Escherichia coli* at bench and pilot plant scale, *Enzyme and Microbial Technology* **2004**, *34*, 235.
- [48] F. W. Studier, Protein production by auto-induction in high density shaking cultures, *Protein expression and purification* **2005**, *41*, 207.
- [49] S. Y. Lee, High cell-density culture of *Escherichia coli*, *Trends in Biotechnology* **1996**, *14*, 98.
- [50] E. B. Jensen, S. Carlsen, Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate, and salts, *Biotechnology and bioengineering* **1990**, *36*, 1.
- [51] S. W. Brown, H.-P. Meyer, A. Fiechter, Continuous production of human leukocyte interferon with *Escherichia coli* and continuous cell lysis in a two stage chemostat, *Appl Microbiol Biotechnol* **1985**, *23*, 5.

- [52] P. Grünert, Dissertation (unveröffentlichte Ergebnisse), Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover **2015**.
- [53] J. Shiloach, R. Fass, Growing *E. coli* to high cell density—a historical perspective on method development, *Biotechnology advances* **2005**, 23, 345.
- [54] L. A. Palomares, S. Estrada-Mondaca, O. T. Ramírez, Production of recombinant proteins: challenges and solutions, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2004**, 267, 15.
- [55] C. P. Papaneophytou, G. Kontopidis, Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: a general review, *Protein expression and purification* **2014**, 94, 22.
- [56] K. Tsumoto, R. Abe, D. Ejima, T. Arakawa, Non-denaturing solubilization of inclusion bodies, *Current pharmaceutical biotechnology* **2010**, 11, 309.
- [57] Clark, Eliana De Bernardez, Protein refolding for industrial processes, *Current Opinion in Biotechnology* **2001**, 12, 202.
- [58] KAIST, *2D Page maps E. coli Protein Database*, <http://eecoli.kaist.ac.kr/theoretical.html> (12.02.2014).
- [59] R. Keller, R. Thompson, Rapid synthesis of isoprenoid diphosphates and their isolation in one step using either thin layer or flash chromatography, *Journal of Chromatography A* **1993**, 645, 161.
- [60] G. Ohloff, W. Pickenhagen, P. Kraft, *Scent and chemistry: The molecular world of odors*, Helvetica Chimica Acta; Wiley-VCH, Zürich, Weinheim **2012**.
- [61] P. E. O'Maille, J. Chappell, J. P. Noel, A single-vial analytical and quantitative gas chromatography-mass spectrometry assay for terpene synthases, *Anal. Biochem.* **2004**, 335, 210.
- [62] P. Mercke, J. Crock, R. Croteau, P. E. Brodelius, Cloning, expression, and characterization of epi-cedrol synthase, a sesquiterpene cyclase from *Artemisia annua L.*, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1999**, 369, 213.
- [63] N. Bülow, W. A. König, The role of germacrene D as a precursor in sesquiterpene biosynthesis: investigations of acid catalyzed, photochemically and thermally induced rearrangements, *Phytochemistry* **2000**, 55, 141.
- [64] J. Chappell, Cloning and Bacterial Expression of a Sesquiterpene Cyclase from *Hyoscyamus muticus* and Its Molecular Comparison to Related Terpene Cyclases, *Journal of Biological Chemistry* **1995**, 270, 7375.
- [65] S. M. Colby, J. Crock, B. Dowdle-Rizzo, P. G. Lemaux, R. Croteau, Germacrene C synthase from *L. ycopersicon esculentum* cv. VFNT Cherry tomato: cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of the multiple product sesquiterpene cyclase, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**, 95, 2216.
- [66] ACD/Labs, Berechnet mit Hilfe der Software Advanced Chemistry Development V11.02 (ACD/Labs, Toronto, Kanada).
- [67] A. Bar-Even, E. Noor, Y. Savir, W. Liebermeister, D. Davidi, D. S. Tawfik, R. Milo, The moderately efficient enzyme: evolutionary and physicochemical trends shaping enzyme parameters, *Biochemistry* **2011**, 50, 4402.
- [68] F. Karp, Y. Zhao, B. Santhamma, B. Assink, R. M. Coates, R. B. Croteau, Inhibition of monoterpene cyclases by inert analogues of geranyl diphosphate and linalyl diphosphate, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2007**, 468, 140.
- [69] M. Vardakou, M. Salmon, J. A. Faraldos, P. E. O'Maille, Comparative analysis and validation of the malachite green assay for the high throughput biochemical characterization of terpene synthases, *MethodsX* **2014**, 1, 187.
- [70] L. Michaelis, M. L. Menten, K. A. Johnson, R. S. Goody, The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper, *Biochemistry* **2011**, 50, 8264.
- [71] H. Bisswanger, *Enzymkinetik: Theorie und Methoden*, 3rd ed., Wiley-VCH, Weinheim **2000**.
- [72] E. Y. Shishova, L. Di Costanzo, D. E. Cane, D. W. Christianson, X-ray crystal structure of aristolochene synthase from *Aspergillus terreus* and evolution of templates for the cyclization of farnesyl diphosphate, *Biochemistry* **2007**, 46, 1941.
- [73] T. Feng, J.-j. Cui, Z.-b. Xiao, H.-x. Tian, F.-p. Yi, X. Ma, Chemical Composition of Essential Oil from the Peel of Chinese *Torreya grandis* Fort, *Organic Chemistry International* **2011**, 2011, 1.

- [74] C. Cavaleiro, E. Pinto, M. J. Gonçalves, L. Salgueiro, Antifungal activity of Juniperus essential oils against dermatophyte, Aspergillus and Candida strains, *Journal of applied microbiology* **2006**, *100*, 1333.
- [75] S. Vichi, M. Riu-Aumatell, M. Mora-Pons, S. Buxaderas, E. López-Tamames, Characterization of volatiles in different dry gins, *Journal of agricultural and food chemistry* **2005**, *53*, 10154.
- [76] Franco, Maria Regina B., T. Shibamoto, 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.
- [77] K. Umano, Y. Hagi, T. Shibamoto, Volatile Chemicals Identified in Extracts from Newly Hybrid Citrus, Dekopon (Shiranuhi mandarin Suppl. J.), *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 5355.
- [78] A. Wei, T. Shibamoto, Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils, *Journal of agricultural and food chemistry* **2007**, *55*, 1737.
- [79] Y. Zhao, Y. Xu, J. Li, W. Fan, W. Jiang, 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.
- [80] *Biosynthesis*, Topics in Current Chemistry, Springer Berlin/Heidelberg **2000**.
- [81] C. G. Jones, J. Moniodis, K. G. Zulak, A. Scaffidi, J. A. Plummer, E. L. Ghisalberti, E. L. Barbour, J. Bohlmann, Sandalwood fragrance biosynthesis involves sesquiterpene synthases of both the terpene synthase (TPS)-a and TPS-b subfamilies, including santalene synthases, *The Journal of biological chemistry* **2011**, *286*, 17445.
- [82] T. G. Köllner, C. Schnee, J. Gershenzon, J. Degenhardt, The variability of sesquiterpenes emitted from two *Zea mays* cultivars is controlled by allelic variation of two terpene synthase genes encoding stereoselective multiple product enzymes, *The Plant cell* **2004**, *16*, 1115.
- [83] C. Landmann, B. Fink, M. Festner, M. Dregus, K.-H. Engel, W. Schwab, Cloning and functional characterization of three terpene synthases from lavender (*Lavandula angustifolia*), *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2007**, *465*, 417.
- [84] R. Li, Z.-T. Jiang, Chemical composition of the essential oil of *Cuminum cyminum* L. from China, *Flavour Fragr. J.* **2004**, *19*, 311.
- [85] A. T. Shulgin, T. Sargent, C. Naranjo, The chemistry and psychopharmacology of nutmeg and of several related phenylisopropylamines, *Psychopharmacology bulletin* **1967**, *4*, 13.
- [86] C.-C. Chyau, J.-L. Mau, C.-M. Wu, Characteristics of the Steam-Distilled Oil and Carbon Dioxide Extract of *Zanthoxylum simulans* Fruits †, *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 1096.
- [87] R. Ciriminna, M. Lomeli-Rodriguez, P. Demma Carà, J. A. Lopez-Sanchez, M. Pagliaro, Limonene: a versatile chemical of the bioeconomy, *Chemical communications (Cambridge, England)* **2014**, *50*, 15288.
- [88] *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany **2000** (05.06.2013).
- [89] J. H. Borden, D. S. Pureswaran, J. P. Lafontaine, Synergistic blends of monoterpenes for aggregation pheromones of the mountain pine beetle (*Coleoptera: Curculionidae*), *Journal of economic entomology* **2008**, *101*, 1266.
- [90] E. Teuscher, *Biogene Arzneimittel: Mit 16 Tabellen*, 5th ed., Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart **1997**.
- [91] E. E. Stashenko, W. Torres, Morales, Jairo René Martínez, 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.
- [92] A. Hymete, J. Rohloff, T.-H. Iversen, Essential oil from seeds and husks of *Aframomum corrorima* from Ethiopia, *Flavour Fragr. J.* **2006**, *21*, 642.
- [93] J. Rohloff, A. M. Bones, Volatile profiling of *Arabidopsis thaliana* - putative olfactory compounds in plant communication, *Phytochemistry* **2005**, *66*, 1941.
- [94] J. Cai, P. Lin, X. Zhu, Q. Su, Comparative analysis of clary sage (*S. sclarea* L.) oil volatiles by GC-FTIR and GC-MS, *Food Chemistry* **2006**, *99*, 401.
- [95] A. E. Kabouss, Z. Charrouf, M. Faid, F.-X. Garneau, G. Collin, Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Leaf Essential Oil of *Argania spinosa* L. Skeels, *Journal of Essential Oil Research* **2002**, *14*, 147.
- [96] M. Miyazawa, N. Tamura, Components of the essential oil from sprouts of *Polygonum hydropiper* L. ('Benitade'), *Flavour Fragr. J.* **2007**, *22*, 188.

- [97] H. Y. Zhang, C. X. Hu, C. P. Liu, H. F. Li, J. S. Wang, K. L. Yuan, J. W. Tang, G. W. Xu, 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.
- [98] D. Lesueur, N. K. Ban, A. Bighelli, A. Muselli, J. Casanova, 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.
- [99] F. Pellati, F. P. Prencipe, S. Benvenuti, Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry characterization of propolis volatile compounds, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **2013**, *84*, 103.
- [100] *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany **2000** (05.06.2013).
- [101] Römpf-Autor, Eintrag: Longifolen, *Römpp online* (05.06.2013).
- [102] K. Seidel, Dissertation (unveröffentlichte Ergebnisse), Institut für Organische Chemie, Leibniz Universität Hannover **2015**.
- [103] S.-L. Hong, G.-S. Lee, Syed Abdul Rahman, Syarifah Nur, Ahmed Hamdi, Omer Abdalla, K. Awang, N. Aznam Nugroho, Abd Malek, Sri Nurestri, Essential oil content of the rhizome of *Curcuma purpurascens* Bl. (Temu Tis) and its antiproliferative effect on selected human carcinoma cell lines, *TheScientificWorldJournal* **2014**, *2014*, 397430.
- [104] K. Schnatz, Masterarbeit: Charakterisierung einer Patchoulolsynthese in Hinblick auf die biokatalytische Herstellung von Sesquiterpenen, 10/2013 – 04/2014, Fach Biochemie an der Medizinischen Hochschule Hannover.
- [105] L. Thöns, Masterarbeit: Biokatalytische Herstellung von Sesquiterpenen, 05/2014 – 10/2014, Fach Life Science an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover.
- [106] *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany **2000**.
- [107] S. Irmscher, Entwicklung von Verfahren zur in situ-Isolierung von Sesquiterpenen aus wässrigen Reaktionslösungen, 01/2015 – 06/2015, Fach Life Science an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover.
- [108] van den Berg, Corjan, N. Wierckx, J. Vente, P. Bussmann, J. de Bont, van der Wielen, Luuk, Solvent-impregnated resins as an in situ product recovery tool for phenol recovery from *Pseudomonas putida* S12TPL fermentations, *Biotechnology and bioengineering* **2008**, *100*, 466.
- [109] S. Alemdar, Dissertation (unveröffentlichte Ergebnisse), Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover **2014**.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name Thore Hermann Wilhelm Frister,
geboren am 10.04.1986 in Kiel

Staatsangehörigkeit deutsch

Akademische Ausbildung

12/2012 – 10/2015 Anfertigung der Promotion zum Dr. rer. nat. am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover
Thema: vorliegende Arbeit

11/2009 – 07/2011 Masterstudiengang Wirk- und Naturstoffchemie an der Leibniz Universität Hannover

09/2011 – 02/2012 Auslandssemester an der Stockholm University, Department of Organic Chemistry, Stockholm, Schweden

10/2006 – 06/2010 Bachelorstudium Chemie an der Leibniz Universität Hannover

Berufliche Erfahrungen

12/2012 – 07/2015 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover

07/2009 – 09/2009 Praktikum, Continental Reifen Deutschland GmbH, Material & Simulative Evaluation, Hannover

09/2008 – 01/2009 Praktikum, Continental Automotive GmbH, Global IT Application Solutions, Hannover, Frankfurt a. M.

Zivildienst

09/2005 – 05/2006 Paul-Moor-Schule, Förderschule für geistige Entwicklung, Wunstorf

Schulbildung

2002 – 2005 Wilhelm-Busch-Gymnasium in Stadthagen

*He always runs while others walk,
He acts while other men just talk,
He looks at this world and wants it all,
So he strikes like Thunderball.*

*He knows the meaning of success,
His needs are more so he gives less,
They call him the winner who takes all,
And he strikes like Thunderball.*

*Any woman he wants he'll get
He will break any heart without regret.*

*His days of asking are all gone,
His fight goes on and on and on,
But he thinks that the fight is worth it all,
So he strikes like Thunderball.*

John Barry, Titelsong des Films 007 James Bond "Thunderball"