

Bioprozessentwicklung zur enzymatischen Herstellung von (-)-Patchoulol und struktur- verwandten Produkten

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Kimia Ekramzadeh, M.Sc.

[2020]

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheper
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Korreferent: PD. Dr. rer. nat. Sascha Beutel
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: 16. Oktober 2020

Was wir wissen, ist ein Tropfen, was wir nicht wissen, ein Ozean.

Sir Isaac Newton (1643 – 1727)

Für meine Familie und Freunde

DANKSAGUNG

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person, somit ist es an der Zeit mich bei all jenen zu bedanken, die durch ihre fachliche wie auch persönliche Unterstützung zur Erstellung dieser Dissertation beigetragen haben.

An erster Stelle bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Scheper für die Möglichkeit in seinem Arbeitskreis zu promovieren und die Bereitstellung dieses spannenden Forschungsthemas. Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Sascha Beutel für die herausragende Betreuung und die konstruktiven Ratschläge und Anregungen während meiner gesamten Zeit am Institut für Technische Chemie. Weiterhin möchte ich mich für das mir entgegen gebrachte Vertrauen und die große Unterstützung in schwierigen Zeiten bedanken.

Herrn PD Dr. Ulrich Krings danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes und die Hilfe durch seine Arbeitsgruppe, insbesondere von Dr. Daniel Sandner, Dr. Miriam Große und Nils Püth, bei den zahlreichen GC/MS-Analysen am Institut für Lebensmittelchemie. Ganz herzlich bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Andreas Kirschning und seiner Arbeitsgruppe, insbesondere Dr. Clara Oberhauser und Vanessa Harms, für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des Kooperationsprojektes.

Ein großer Dank gilt Martina Weiß und Martin Pähler für die Hilfsbereitschaft und die Erleichterung des Laboralltags sowie Ulrike Dreschel für die bürokratische Unterstützung. Dr. Michael Dors und Dr. Ivo Havlik danke ich für die Hilfestellung bei IT-Problemen. Ohne euch wäre die Arbeit am Institut an der einen oder anderen Stelle nicht so einwandfrei verlaufen.

Ich bedanke mich bei allen Bacheloranden und Masteranden, die mich über wissenschaftliche Arbeiten oder Schwerpunktpraktika in Teilprojekten meiner Arbeit tatkräftig unterstützt haben.

Der Weg vom Studienbeginn bis zur Promotion war aufregend und ich bin dankbar für meine Freunde, die mich während dieser Zeit immer motiviert und gefördert haben. Sei es an den langen Lernabenden bei den roten Tischen mit „La Familia“ oder die lustigen Lernsessions mit meinen Kommilitonen.

Die Promotion am Institut für Technische Chemie war einzigartig. In dieser Zeit habe ich neue Facetten der Wissenschaft und Freundschaft kennengelernt. Ich bedanke mich zunächst bei Dr. Thore Frister, ohne den ich die Leidenschaft für die Biotechnologie nicht entdeckt hätte. Ich danke allen Mitarbeitern und Kollegen des TCI für die schöne Zeit und der tollen Arbeitsatmosphäre. Bei Dr. Chantal Brämer bedanke ich mich für die stetige Motivation und das Korrekturlesen meiner Arbeit. Dr. Francisco Aguilar danke ich für die Anregung in Themen wie Mikrobiologie und

Fermentation und die erfolgreiche Zusammenarbeit. Ich möchte vor allem meinen Bürokollegen, insbesondere Dr. Svenja Bolten, Dr. Bastian Quaas und Anton Enders, für die lustigen Bürosprache und langen gemeinsamen Arbeitsstunden bedanken. Im Besonderen danke ich auch meinen Kollegen aus dem Büro 265, sowohl der „alten“ Generation mit Dr. Elsa Friehs, Dr. Jonas Austerjost, Dr. Ingo De Vries und Dr. Lukas Raddatz, als auch der „neuen“ Generation mit Pia Gellermann, Ina Siller, Marline Kirsch, Tobias Steinwedel, Marc Prante und Torsten Schüling für die tolle gemeinsame Zeit, den fröhlichen Abenden und das stets offene Ohr trotz der Arbeitszeiten. Nicht zu vergessen sind die zahlreichen Werkstattabende mit Friedbert Gellermann oder die jährliche Weihnachtsbäckerei bei Dr. Antonina Lavrentieva. Danke für diese unvergessliche Zeit!

Ich bedanke mich auch bei meinen Schwiegereltern Doris und Dr. Tarik El Dsoki, die mich auf meinem Studienweg immer gut beraten und zugeredet haben.

Ein besonders großer Dank geht an meinen Mann Omar El Dsoki. Du begleitest mich schon seit über zehn Jahren auf meinem Lebensweg und ich danke dir für deinen Rückhalt, deine Geduld und deinen Ansporn durch die vielen aufmunternden Worte besonders in schwierigen Zeiten. Du konntest mich immer am meisten inspirieren und motivieren. Wir sind ein tolles Team!

Mein ausdrücklicher Dank geht an meine Familie für ihre bedingungslose Unterstützung im Laufe der Studienjahre und während der Promotion. Ich danke meiner Mutter Schukufeh und meinem Vater Schahab, die mir das Studium ermöglicht haben und mir jederzeit eine große Stütze waren. Ich bedanke mich auch bei meiner Schwester Mahsa und ihrer Familie für die Begleitung und Ermutigung in schwierigen Zeiten. Ihr habt mich in allen Lebenslagen bestärkt und immer an mich geglaubt. Danke!

KURZFASSUNG

Patchouliöl ist ein Gemisch aus Sesquiterpenen und Sesquiterpenoiden mit olfaktorischen sowie pharmakologischen Eigenschaften und wird von der Patchouli-pflanze produziert. Die konventionelle Gewinnung aus Pflanzenmaterial ist mit ökologischen und ökonomischen Hindernissen verbunden. Methoden der Biotechnologie bieten alternative Möglichkeiten zur Herstellung des für die Industrie wichtigen essentiellen Öls sowie zur Erhöhung des Anteils der duftgebenden Komponente (-)-Patchoulol. In der vorliegenden Arbeit wurde die mikrobielle *in vitro* und *in vivo* Produktion von Patchouliöl untersucht und optimiert.

Im ersten Teil der Dissertation wurde das in Vorarbeiten entwickelte biotechnologische Verfahren zur *in vitro* Produktion von Patchouliöl über die Multiprodukt-Patchoulolsynthese optimiert. Das Enzym konnte erfolgreich über eine Tandem-Two-Step-Chromatographiemethode mittels Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie mit einer Reinheit von 96 % isoliert werden. Im Vergleich zur Strategie aus Vorarbeiten wurde die Bioaktivität um das Dreifache erhöht.

Anhand kinetischer Untersuchungen wurden die Reaktionsbedingungen der *in vitro* Biokatalyse mittels der isolierten Patchoulolsynthese im Hinblick auf eine ideale Produktzusammensetzung optimiert. Es wurden Einflussfaktoren, die zur Veränderung der Enzymstruktur und der Produktselektivität der Multiprodukt-Sesquiterpensynthese führen, untersucht. Sowohl durch Veränderung der Reaktionsparameter (Temperatur, pH-Wert) als auch des Reaktionsmediums konnte die Reaktionskaskade in der aktiven Tasche beeinflusst und die Produktzusammensetzung verändert werden. Die Substratflexibilität der vielseitigen Patchoulolsynthese wurde über die Biokonversion sechs nicht natürlicher Substrate evaluiert. Es konnten neue, mit Heteroatomen modifizierte, lineare und makrozyklische Kohlenstoffgerüste produziert werden.

Abschließend war es in einer Ganzzellbiokatalyse möglich, den *E. coli*-eigenen Mevalonat-unabhängigen Stoffwechselweg über Metabolic Engineering so zu modifizieren, dass sowohl die Codon-optimierte Patchoulolsynthese, als auch der natürliche Sesquiterpenvorläufer *E,E*-Farnesylpyrophosphat exprimiert wurden. Nach Analyse der Fermentationsbedingungen wie pH-Wert, Temperatur, IPTG-Konzentration, Medienzusammensetzung und verwendeter Stamm wurde die *in situ* Produktgewinnung optimiert. Mit dem polymeren Adsorber Diaion® HP-20 wurde die höchste (-)-Patchoulolkonzentration gewonnen. Der optimierte Bioprozess wurde auf den Maßstab von 2 L-Bioreaktoren skaliert. In einer fed-batch-Kultivierung konnte das (-)-Patchoulol mit einer Konzentration von 18,9 mg·L⁻¹ und einer Produktivität von 7,2 mg·L⁻¹·d⁻¹ erhalten werden.

Schlüsselwörter: Sesquiterpene, Patchouliöl, (-)-Patchoulol, Patchoulolsynthese, biotechnologische Terpenproduktion, rekombinante Ganzzellkatalyse

ABSTRACT

Patchouli oil is a mixture of sesquiterpenes and sesquiterpenoids with olfactory and pharmacological properties and is produced in the patchouli plant. Production of patchouli oil from plant material is connected to ecological and economical challenges. Methods of biotechnology offer alternative possibilities for the production of the essential oil which is important for industry and for increasing the ratio of the main fragrant component (-)-patchoulol. The present study aims to evaluate and optimize the microbial in vitro and in vivo production of patchouli oil.

In the first part of the dissertation, the biotechnological process for the in vitro production of patchouli oil using the multi-product patchoulol synthase, which was developed in preliminary work, was optimized. The enzyme was successfully isolated by a tandem two-step chromatography method using affinity and size exclusion chromatography with a purity of 96%. Compared to the strategy from previous studies, the bioactivity was increased threefold.

Based on kinetic studies, the reaction conditions of the in vitro biocatalysis using the isolated patchoulol synthase were optimized with regard to an ideal product composition. Influencing factors affecting enzyme structure and product selectivity of the multi-product sesquiterpene synthase were analyzed. By changing reaction parameters (temperature, pH) as well as reaction medium, it was possible to influence the reaction cascade in the active pocket and change the product composition. The substrate flexibility of the versatile Patchoulolsynthase was evaluated by bioconversion of six unnatural substrates. New linear and macrocyclic carbon structures modified with heteroatoms could be produced.

Finally, metabolic engineering was used to modify the non-mevalonate pathway in *E. coli* to enable the expression of the codon optimized patchoulol synthase and the natural sesquiterpene precursor *E,E*-farnesyl pyrophosphate for whole cell biocatalysis. After analysis of the fermentation conditions such as pH, temperature, IPTG concentration, media composition and strain, the in situ product recovery was optimized. With the polymeric adsorber Diaion® HP-20 the highest (-)-patchoulol concentration was recovered. The optimized bioprocess scaled up to 2 L bioreactors. In a fed-batch cultivation the (-)-patchoulol could be produced with a concentration of 19.0 mg·L⁻¹ and a productivity of 7.2 mg·L⁻¹·d⁻¹.

Keywords: sesquiterpenes, patchouli oil, (-)-patchoulol, patchoulol synthase, biotechnological terpene production, recombinant whole cell catalysis

PUBLIKATIONSLISTE

Fachartikel

Aguilar, F. (55 %), **Ekramzadeh, K. (45 %)**, Scheper, T., Beutel, S.: Metabolic engineering and fermentation optimization for the biotechnological production of (-)-patchoulol in *E. coli*, **in progress**.

Ekramzadeh, K. (80 %), Brämer, C. (15 %), Frister (5 %), T., Fohrer, J., Kirschning, A., Scheper, T., Beutel, S.: Optimization of factors influencing enzyme activity and product selectivity and the role of proton transfer in the catalytic mechanism of patchoulol synthase, *Biotechnology Progress*, **2019**, e2935, doi: 10.1002/btpr.2935.

Brämer, C. (80 %), **Ekramzadeh, K. (15 %)**, Lammers, F., Scheper, T., Beutel, S. (5 %): Optimization of continuous purification of recombinant patchoulol synthase from *Escherichia coli* with membrane adsorbers, *Biotechnology Progress*, **2019**, 35 (4), e2812, doi: 10.1002/btpr.2812.

Oberhauser, C. (65 %), Harms, V. (20 %), Seidel, K., Schröder, B., **Ekramzadeh, K. (10 %)**, Beutel, S., Winkler, S., Lauterbach, L., Dickschat, J., Kirschning, A. (5 %): Exploiting the synthetic potential of sesquiterpene cyclases for generating unnatural terpenoids, *Angewandte Chemie*, **2018**, 130 (36), doi: 10.1002/ange.201805526.

Gieseler, G.-M. (90 %), **Ekramzadeh, K. (5 %)**, Nölle, V., Malysheva (5 %), S., Kempf, H., Beutel, S., Zweigerdt, R., Martin, U., Rinas, U., Scheper, T., Pepelanova, I.: Solubilization and renaturation of biologically active human bone morphogenetic protein-4 from inclusion bodies, *Biotechnology Reports*, **2018**, 18 (C), e00249, doi: 10.1016/j.btre.2018.e00249.

Konferenzbeiträge

Ekramzadeh, K., Scheper, T., Beutel, S.: Production and characterization of a recombinant patchoulol synthase for the biocatalytic production of terpenoid structures (Poster), *Bioflavour*, Frankfurt am Main, Deutschland, 2018.

Ekramzadeh, K., Scheper, T., Beutel, S.: Production of novel terpenoid structures via bioconversion of unnatural and synthetic substrates with a recombinant patchoulol synthase (Poster), 9th International Congress on Biocatalysis, Hamburg, Deutschland, 2018.

UNTERSTÜTZENDE ARBEITEN

Mitwirkung bei Forschungsanträgen

Nachhaltige Produktion terpenoider Strukturen durch Biokonversion, Antragstellung: Team Chemie 2, Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), 2017.

Biotechnological production of terpenes originating from endemic plant species of Costa Rica for the control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*, the causal agent of the Panama disease in banana (*Musa* sp.) plantations. Antragstellung: Joint Networking and Research Projects, BMBF – MICITT, 2017.

Betreute Arbeiten

Lukas Koch: Optimierung der Produktion von Patchoulol und (+)-Zizaene in *Escherichia coli*. Bachelorarbeit Bioverfahrenstechnik, Hochschule Aalen, Februar 2019. Ergebnisse in Kapitel 4.3.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

μ_{\max}	Maximale Wachstumsrate
AtoB	Acetoacetyl-CoA-Synthase
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
BFM	Biofeuchtmasse
BTM	Biotrockenmasse
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary Desoxyribonucleic Acid)
CoA	Coenzym A
DA-Medium	Definiertes Aparicio-Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic Acid)
DK-Medium	Definiertes Korz-Medium
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DoE	Statistische Versuchsplanung (Design of Experiments)
DsbC	Disulfide bond C
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FID	Flammenionisationsdetektor
FPLC	Fast-Protein-Flüssigchromatographie (Fast Protein Liquid Chromatography)
FPP	Farnesylpyrophosphat
GC	Gaschromatographie
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GPP	Geranylpyrophosphat
HCDC	Hochzelldichtekultivierung (High Cell Density Cultivation)
HCP	Wirtszellprotein (Host Cell Protein)
HMBPP	4-Hydroxy-3-methyl-but-2-en-1-yl-diphosphat
HMG	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl
HMGR	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoenzymA-Reduktase
HMGS	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoenzymA-Synthase
IDA	Iminodiessigsäure (Iminodiacetic Acid)
Idi	Isopentenylidiphosphatisomerase
IMAC	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography)
IPP	Isopentylpyrophosphat

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IspA	Farnesylpyrophosphat synthase
ISPR	In situ Produktgewinnung (In situ Product Recovery)
k_{cat}	Wechselzahl
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
LB	Lysogeny Broth
MEP	Methylerythritolphosphatweg
MEV	Mevalonat
MK	Mevalonatkinase
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht (Molecular Weight)
MWCO	Molekulargewichtsgrenzwert (Molecular Weight Cut-Off)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NMR	Kernspinresonanz (Nuclear Magnetic Resonance)
NPP	Nerylpyrophosphat
NTA	Nitrilotriessigsäure (Nitrilotriacetic Acid)
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
OTR	Sauerstofftransferrate (Oxygen Transfer Rate)
PES	Polyethersulfon
pK _a	Säurekonstante (acid dissociation constant)
PMD	Phosphomevalonatdecarboxylase
PMK	Phosphomevalonatkinase
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
polyHis-Tag	polyHistidin-Tag
PTS	Patchoulolsynthase
RI	Retentionsindex
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
SEC	Größenausschlusschromatographie (Size Exclusion chromatography)
STS	Sesquiterpensynthase
TB	Terrific Broth
v_{max}	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit

Abkürzungsverzeichnis

vvm	Regelungsrate pro Reaktorvolumen (vessel volume per minute)
WCS	Ganzzellkatalysesystem (Whole Cell System)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)
$Y_{x/s}$	Biomasse-Substrat-Ausbeutekoeffizient

INHALTSVERZEICHNIS

WIDMUNG.....	I
DANKSAGUNG.....	II
KURZFASSUNG.....	IV
ABSTRACT.....	V
PUBLIKATIONSLISTE.....	VI
UNTERSTÜTZENDE ARBEITEN.....	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VIII
1 EINLEITUNG.....	4
2 ZIELSETZUNG.....	6
3 THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....	7
3.1 TERPENE UND TERPENOIDE – ESSENTIELLE ÖLE DER NATUR.....	7
3.2 SESQUITERPENE UND DIE BIOSYNTHESE IN PFLANZEN.....	8
3.3 PATCHOULIÖL – INHALTSSTOFFE, WIRKUNG UND ANWENDUNGSGEBIETE.....	12
3.4 SYNTHETISCHE BIOTECHNOLOGIE ZUR PRODUKTION VON PATCHOULIÖL.....	15
4 EXPERIMENTELLE ARBEITEN.....	20
4.1 REKOMBINANTE PRODUKTION DER PATCHOULOLSYNTHESE IN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	20
4.1.1 Batch-Kultivierung im Bioreaktor.....	20
4.1.2 Isolierung der Patchoulolsynthase.....	23
4.1.3 Fazit.....	34
4.2 UNTERSUCHUNGEN ZUM BIODKATALYTISCHEN MECHANISMUS DER PATCHOULOLSYNTHESE.....	35
4.2.1 Optimierung des Umsetzungspuffers.....	35
4.2.2 Kinetische Untersuchungen zur Umsetzung von <i>E,E</i> -FPP mit der PTS.....	38
4.2.3 Untersuchungen zur Substratflexibilität der PTS.....	45
4.2.4 Fazit.....	49
4.3 IN VIVO PRODUKTION VON (-)-PATCHOULOL IN PATHWAY-OPTIMIERTEM <i>E. COLI</i>	50
4.3.1 Optimierung der in vivo Produktion von (-)-Patchoulol im Schüttelkolben.....	52
4.3.2 Optimierung der in situ Produktgewinnung von (-)-Patchoulol im Schüttelkolben.....	64
4.3.3 In vivo Produktion und in situ Gewinnung von (-)-Patchoulol im Bioreaktor.....	68
4.3.4 Fazit.....	74
5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	75
6 MATERIALIEN.....	81
6.1 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN.....	81

6.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN	83
6.3	GERÄTE UND SOFTWARE	84
6.4	EXPRESSIONSSTÄMME	85
6.5	PLASMIDKARTEN	86
6.6	MEDIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN	86
6.6.1	Kultivierung.....	87
6.6.2	Zellaufschluss	94
6.6.3	Fast-Protein-Flüssigchromatographie.....	94
6.6.4	Enzymatische Umsetzung.....	96
6.6.5	SDS-PAGE.....	97
6.6.6	Bradford-Assay.....	99
7	METHODEN.....	100
7.1	PLASMID-DNA UND ZELLTRANSFORMATION	100
7.1.1	Plasmidpräparation	100
7.1.2	Restriktionsverdau	101
7.1.3	DNA-Agarosegel	101
7.1.4	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	102
7.2	STAMMERHALTUNG	103
7.3	KULTIVIERUNG	103
7.3.1	Batch-Kultivierung von <i>E. coli</i> BL21(DE3) pPTS im Bioreaktor	103
7.3.2	Kultivierung der pathway-optimierten Stämme im Schüttelkolben.....	104
7.3.3	Fed-batch-Kultivierung von <i>E. coli</i> SHuffle T7 pPTS+pMEV im Bioreaktor	105
7.3.4	Probenahme bei Kultivierung von <i>E. coli</i> SHuffle T7 pPTS+pMEV.....	106
7.3.5	Bestimmung der Wachstumsparameter	107
7.4	ZELLAUFSCHLUSS	107
7.4.1	Ultraschall-Lyse.....	107
7.4.2	Microfluidizer.....	108
7.5	ANALYTIK	108
7.5.1	Bestimmung der optischen Dichte	108
7.5.2	Bestimmung der Biotrockenmasse	108
7.5.3	Bestimmung der Glucosekonzentration.....	108
7.5.4	Bestimmung der Acetatkonzentration.....	108
7.5.5	SDS-PAGE	108
7.5.6	Densitometrische Bestimmung der Proteinkonzentration.....	109

Inhaltsverzeichnis

7.5.7	Bradford-Assay	109
7.5.8	Proteinaufreinigung mittels FPLC	110
7.5.9	Gaschromatographie	112
7.5.10	Enzym-Assays	113
8	ERGÄNZENDE DATEN	114
8.1	CHROMATOGRAPHISCHE AUFREINIGUNG DER PTS ÜBER EINE Ni^{2+} -IMAC-SÄULE	114
8.2	GASCHROMATOGRAMME DER UMSETZUNG ALTERNATIVER SUBSTRATE.....	114
LITERATURVERZEICHNIS		116
ABBILDUNGSVERZEICHNIS		128
TABELLENVERZEICHNIS		134
LEBENS LAUF.....		137

1 EINLEITUNG

Holzig-herb und zugleich süß, ein intensiver Duft der sowohl verhasst als auch geliebt sein kann. Ein ätherisches Öl das nicht nur als „Mottenschreck“, sondern auch als Heilmittel seinen Ursprung in Südostasien findet. Die schwere Duftnote und aphrodisierende Wirkung machte das essentielle Öl der Patchoulipflanze interessant für die Duft- und Aromastoffindustrie. Das Patchouliöl ist heutzutage ein Grundbestandteil zahlreicher alltäglicher Produkte wie Pflegeartikel und Parfüms.

Essentielle Öle sind Naturstoffe die größtenteils aus Terpenen und Terpenoiden bestehen. Die vielseitigen Funktionen der bioaktiven und komplexen Kohlenstoffgerüste prägten die Erfolge der heutigen Medizin. Während manche Terpene wie Aconitin aufgrund ihrer gesundheitsfördernden Wirkung in der Naturheilkunde eingesetzt werden, sind Terpene wie das Zytostatikum Paclitaxel (Taxol[®]) oder das Malariamittel Artemisinin in der heutigen Medizin unverzichtbar. Dennoch wird der Großteil, der über 40.000 bekannten Terpene und Terpenoide, in der Duft- und Aromastoffindustrie eingesetzt. Es findet sich kaum ein Produkt im Badezimmer, das die kurz-kettigen Monoterpene Limonen oder Linalool nicht enthält.

Die universell verwendbaren, geruchsintensiven Naturstoffe werden überwiegend mittels destillativen oder extraktiven Verfahren aus pflanzlichen Ressourcen gewonnen. Viele dieser Pflanzen stammen aus tropischen Regionen. Als gute Einnahmequelle werden die essentiellen Öle hauptsächlich durch kleinere Agrarbetriebe bereitgestellt und exportiert. Die meisten Bauern arbeiten jedoch nicht auf Grundlage guter landwirtschaftlicher Praktiken. Brandrodung der Felder bis der Boden ausgelaugt ist und Pflanzenkrankheiten sind keine Seltenheit. Die niedrigen Qualitätsstandards und klimatisch bedingte Missernten sorgen für Preisschwankungen auf dem Weltmarkt. Ein nachhaltiger Anbau dieser Cash Crops in den jeweiligen Entwicklungsländern ist meist nicht gegeben und steht in Konkurrenz zur Nahrungsmittelversorgung der Menschen vor Ort.

Das industrielle Interesse nach alternativen Herstellungsmethoden für eine langfristige Versorgung mit stabilen Preisen ist groß. Zwar ist die chemische Totalsynthese einiger bekannter Terpene wie Menthol, Vitamin A oder β -Carotin weitgehend erforscht und etabliert, jedoch nicht für jede beliebige Terpenstruktur möglich. Angesichts der komplexen Strukturen und stereoselektiven Unterschiede sind die Möglichkeiten der chemischen Synthese schnell erschöpft oder durch den hohen Aufwand nicht mehr rentabel. Daher wird zunehmend auf biotechnologische Produktionsverfahren im Sinne der weißen Biotechnologie zurückgegriffen. Ziel der weißen Biotechnologie ist es industrielle Prozesse ökologischer und ökonomischer zu gestalten. Dies gelingt durch die Nutzung erneuerbarer biologischer Ressourcen wie Mikroorganismen sowie die Reduktion

von Prozessstufen, Materialien und Energie. Terpene und Terpenoide können zum einen über biotechnologische Verfahren in Form einer *in vitro* Biokatalyse hergestellt werden. Dazu werden rekombinant produzierte Enzyme und natürliche Vorläufermoleküle eingesetzt. Die Vorläufermoleküle werden vor der biokatalytischen Reaktion über kurze Syntheseschritte in eine biologisch aktive Form gebracht. Eine weitere Möglichkeit ist die Produktion der komplexen Moleküle *in vivo* über die Rekonstruktion des pflanzlichen Biosynthesewegs im Mikroorganismus. Einfache Zuckermoleküle wie Glucose werden dabei als Vorläufer des biologischen Stoffwechsels im Mikroorganismus verwendet. Die industrielle Biotechnologie bietet aufgrund der nachhaltigen Produktion, bei konstant hoher Qualität und den damit verbundenen stabilen Preisen, eine vielversprechende Alternative zur konventionellen Produktion der Terpene und Terpenoide.

2 ZIELSETZUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit alternativen biotechnologischen Produktionswegen zur Herstellung des Patchouliöls, insbesondere der duftgebenden Komponente (-)-Patchoulol und strukturverwandter Produkte. Die Erkenntnisse sollen von der Grundlagenforschung bis zur angewandten Biotechnologie analysiert werden.

Im ersten Teil soll ein in Vorarbeiten [1, 2] entwickeltes biotechnologisches Verfahren zur Produktion von Patchouliöl optimiert und das Schlüsselenzym Patchoulolsynthase (PTS) im Detail charakterisiert werden. Zur Bereitstellung ausreichender Enzymmengen wird die PTS rekombinant in einem *E. coli* BL21(DE3)-Stamm produziert und über verschiedene Downstream-Verfahren mit einer möglichst hohen Reinheit und hoher Bioaktivität isoliert. Die selbst hergestellte rekombinante komplementäre Desoxyribonukleinsäure-Variante (cDNA-Variante) der pflanzlichen PTS hat einen polyHistidin-Tag (polyHis-Tag) am N-Terminus des Enzyms, der die Aufreinigung über Metallchelate-Affinitätschromatographie ermöglicht.

Darauf aufbauend sollen umfassende Untersuchungen zum biokatalytischen Mechanismus der PTS durchgeführt werden. Für die *in vitro* Biokatalyse wird der natürliche Sesquiterpenvorläufer *E,E*-Farnesylpyrophosphat (*E,E*-FPP) mit der zuvor isolierten PTS-Variante umgesetzt. Veränderungen in der Enzymstruktur können die mechanistischen Reaktionswege zu den Endprodukten beeinflussen. Unter diesem Gesichtspunkt wird die enzymatische Produktbildung über eine systematische Änderung von Einflussfaktoren wie Pufferkomponenten, pH-Bereich und Reaktionstemperatur analysiert. Im Fokus steht der Einfluss von Protonen aus dem Medium auf den Reaktionsmechanismus. Als Multiprodukt-Sesquiterpensynthase ist die PTS mit ihrer großen aktiven Tasche vielseitig. Eine Umsetzung mit nicht natürlichen Substraten soll zudem die Flexibilität des aktiven Zentrums veranschaulichen und einen Weg zur Produktion neuer terpenoider Strukturen ermöglichen.

Im letzten Abschnitt der Arbeit wird die *in vivo* Biosynthese von Patchouliöl durch Koexpression eines heterologen synthetischen Stoffwechselwegs in *E. coli* ermöglicht. Über Methoden des Metabolic Engineerings wird dadurch der FPP-Stoffwechselweg im Wirtsorganismus optimiert. Experimente zu den Kultivierungsbedingungen wie pH-Wert, Expressionstemperatur, Induktorkonzentration oder Medium werden im Schüttelkolbenmaßstab evaluiert und im Hinblick auf die Erhöhung der (-)-Patchoulolkonzentration verbessert. Weiterhin sollen verschiedene Verfahren der *in situ* Produktgewinnung zur Isolierung des Terpenoids aus der Kulturbrühe untersucht werden. Schließlich sollen die optimierten Bedingungen in den 2 L-Bioreaktormaßstab mit integrierter *in situ* Produktgewinnung skaliert werden.

3 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Der Gebrauch von Pflanzenextrakten wird bereits seit Jahrtausenden für die kosmetische Pflege oder in der Alternativmedizin dokumentiert. Der zunehmende Bedarf in den letzten Jahrzehnten führt zu Schwierigkeiten in der Versorgung von essentiellen Ölen. Chemische Prozesse bieten seltener die Möglichkeit diese öligen Extrakte zu ersetzen. Das Zukunftsfeld Biotechnologie steht schon heute in vielen Branchen für Produktionsprozesse dieser Naturstoffe im Mittelpunkt.

3.1 Terpene und Terpenoide – Essentielle Öle der Natur

Naturstoffe wie Terpene und Terpenoide sind Sekundärmetabolite, die seit mehreren 1.000 Jahren aufgrund ihrer wertvollen Eigenschaften in der Medizin, Körperpflege sowie Lebensmittelzubereitung verwendet werden [3]. Die unter anderem in der Pflanzen- und Tierwelt weit verbreiteten meist aromatischen Terpene und Terpenoide sind eine Untergruppe der Isoprenoide. Bis heute sind über 40.000 Terpen- und Terpenoid-Strukturen bekannt [4]. Mit Isopren (C₅-Körper) als Grundbaustein lässt sich die chemische Struktur, ausgehend von den aktivierten Biomolekülen Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) (Hemiterpene) biosynthetisch ableiten. Terpene lassen sich vereinfacht entsprechend der Anzahl ihrer Isopreneinheiten voneinander unterscheiden. Dementsprechend ist die Anzahl der Kohlenstoffatome nach der biogenetischen Isoprenregel von Leopold Ruzicka (1953) durch fünf teilbar. Terpene mit zwei Isopreneinheiten werden Monoterpene (C₁₀-Körper), die mit drei Isopreneinheiten Sesquiterpene (C₁₅-Körper) und solche mit vier Isopreneinheiten Diterpene (C₂₀-Körper) genannt. Eine vereinfachte Darstellung in Abbildung 1 zeigt die Bildung der strukturellen Vorläuferverbindungen für die Vielzahl bekannter Terpene.

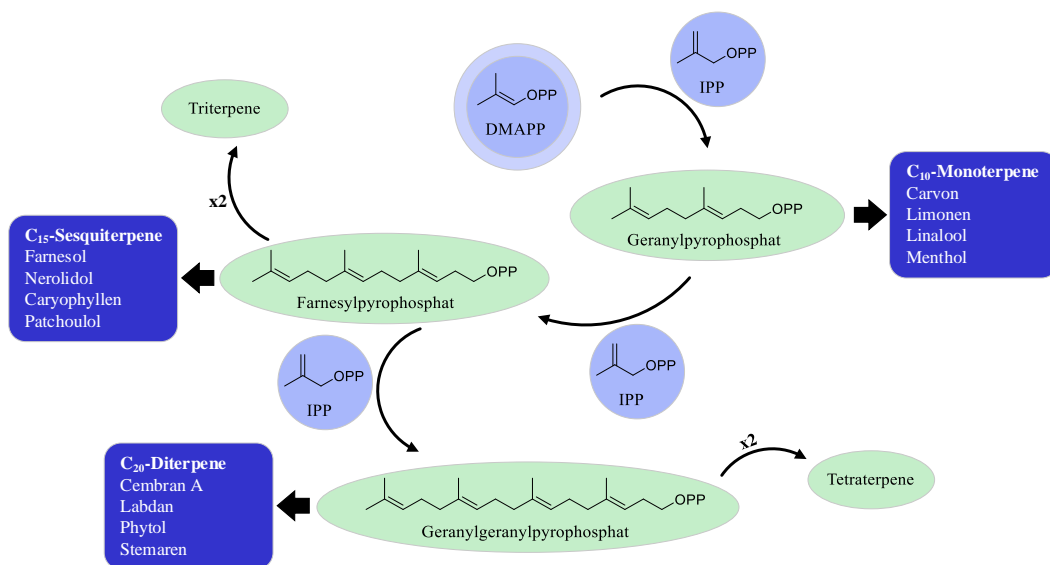


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der Bildung von strukturellen Grundgerüsten verschiedener Terpene.

In der Natur entsteht das Grundgerüst der Terpene über enzymatische Kaskadenreaktionen von Vorläufermolekülen. Grundsätzlich sind acyclische, mono-, bi- und tricyclische Terpene zu unterscheiden. In der Natur sind überwiegend funktionalisierte Terpene, die sogenannten Terpenoide vertreten. Die zumeist komplexen, stereospezifischen Ringstrukturen [5] enthalten eine geringe Anzahl an funktionellen Gruppen und sind über chemische Synthese schwer zugänglich.

Die Naturstoffklasse der Terpene ist vorwiegend pflanzlicher Herkunft und seltener in Tieren oder Mikroorganismen zu finden. Terpene und Terpenoide bilden aufgrund ihres aromatischen Geruchs den Hauptbestandteil der in Pflanzen produzierten ätherischen Öle. Die Gewinnung erfolgt hauptsächlich durch Wasserdampfdestillation oder Extraktion aus den Blättern, Wurzeln oder Blüten der Pflanzen. Viele Terpene, wie unter anderem Aconitin oder Helenalin, die in Baldrian oder Arnika zu finden sind, sind biologisch aktiv und wirken antimikrobiell, neurotoxisch oder gesundheitsfördernd und sind daher von pharmakologischem Interesse [6, 7]. Das Zytostatikum Paclitaxel (Taxol®) hat beispielsweise eine antikarzinogene und antimetastatische Wirkung bei Brust-, Lungen- und Eierstockkrebs [8]. Erwähnenswert sind auch das Sesquiterpenlacton Artemisinin und die davon abgeleiteten stabilen Derivate, wie z.B. Dihydroartemisinin, die von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zur Prophylaxe und Behandlung von Malariaerkrankungen empfohlen werden [9]. Terpene können aber auch als Alternative für synthetische Insektizide eingesetzt werden, indem sie durch ihre natürlichen Aromen als Pheromone Insekten zur Bestäubung anlocken. Ein Beispiel dafür sind die Sesquiterpenoide Nerolidol und Farnesol [10, 11]. Die strukturell einfachsten Mono- und Sesquiterpene und ihre funktionalisierten Derivate sind flüchtig und werden zu einem großen Teil als Geruchs- und Geschmacksstoffe in Produkten der Kosmetik- und Parfümindustrie eingesetzt. Bekannte Vertreter hierfür sind z.B. Menthol, Limonen oder Patchoulol [12].

3.2 Sesquiterpene und die Biosynthese in Pflanzen

Sesquiterpene gehören zur größten Terpenklasse und kommen in unterschiedlichen Strukturtypen vor. Sie sind vor allem in Moosen und höheren Pflanzen, aber auch in lebenden Meeresorganismen und Pilzen vertreten. Obwohl über 2.000 natürlich vorkommende Strukturen bekannt sind, sind nur wenige als Duft- und Aromastoffe relevant. [13] Die natürlichen Sesquiterpene sind meist in oxidierten Form, z.B. als Alkohole, Lactone, Säuren, Aldehyde oder Ketone zu finden [14]. Für die Biosynthese der Sesquiterpene sind die Schlüsselenzyme Sesquiterpensynthasen verantwortlich. Eine vereinfachte schematische Darstellung in Abbildung 2 veranschaulicht die Terpenbiosynthese in Pflanzen.

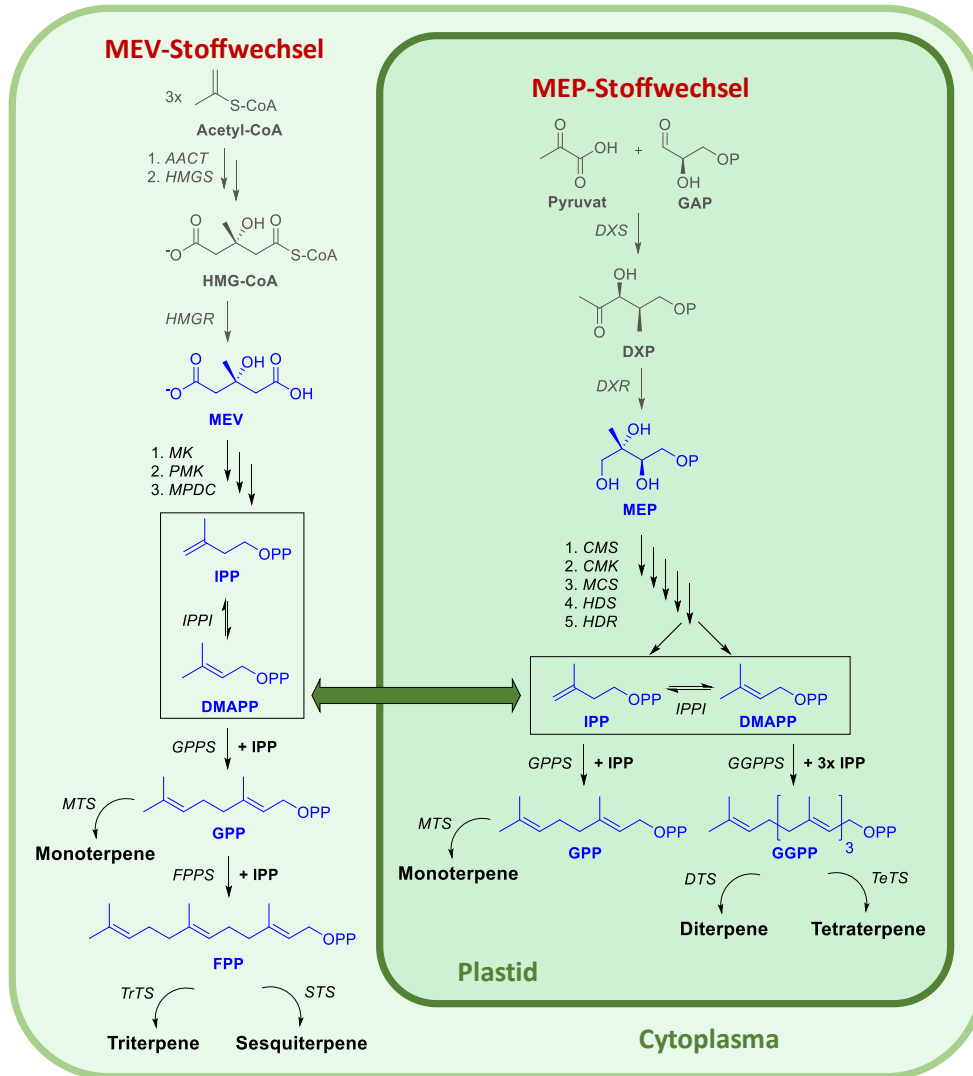


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Sesquiterpenbiosynthese in Pflanzen.

Für den Terpenstoffwechsel sind fünf- oder sechsgliedrige Zuckermoleküle wie Glucose wesentlich. Diese sind ein Teil des Glykolyseprozesses bei dem Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) im Cytoplasma sowie Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) und Pyruvat im Plastid gebildet werden [15]. Diese Zwischenprodukte führen zur Bildung der Terpengrundbausteine IPP und DMAPP. Die über den Mevalonat-(MEV-) und Methylerythritolphosphat-(MEP-)Weg aktivierten Isopreneinheiten IPP und DMAPP bilden in Pflanzen den Startpunkt der Sesquiterpenbiosynthese. Über beide Stoffwechselwege werden die Isopreneinheiten IPP und DMAPP hergestellt. Jedoch findet die Bildung über unterschiedliche Ausgangsstoffe und in verschiedenen Zellkompartimenten statt.

Der klassische MEV-Stoffwechsel erfolgt ausgehend von Acetyl-CoA im Cytosol der Pflanzenzelle. Die Verknüpfung von zwei Acetyl-CoA-Molekülen führt zur Bildung von Acetoacetyl-

CoA. Das Acetoacetyl-CoA wird zunächst durch ein weiteres Acetyl-CoA-Molekül mit Hilfe der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Synthase (HMG-CoA-Synthase) zu HMG-CoA acetyliert. Das im Cytosol befindliche HMG-CoA wird dann in einem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt über das Membranprotein HMG-CoA-Reduktase zu Mevalonat reduziert [16]. Mevalonat wird über zwei folgende Phosphorylierungen und einer Decarboxylierung unter ATP-Verbrauch zu IPP umgesetzt. Das IPP wird anschließend zu DMAPP isomerisiert. Diese wechselseitige Isomerisierung wird von der IPP-Isomerase katalysiert [17–19].

Dagegen findet der MEP-Weg in den Plastiden der Pflanzen statt. Die Sesquiterpenbildung beginnt mit der Verknüpfung von Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat über eine enzymatische Decarboxylierung und einer weiteren Reduktion durch Nicotinamadenindinukleotidphosphat (NADPH) zu MEP. MEP wird über weitere vier Reaktionsschritte, die durch Enzyme katalysiert sind, zu 4-Hydroxy-3-methyl-but-2-en-1-yl-diphosphat (HMBPP) umgesetzt. Dieses Zwischenprodukt reagiert schließlich in einer durch IPP/DMAPP-Synthase katalysierten Reaktion, unter Oxidation von NADPH und Wasserabspaltung in einem Verhältnis von 5:1 zu IPP und DMAPP [19–24]. Zugleich erfolgt ein Transport des über beide Stoffwechselwege gebildeten IPPs und DMAPPs zwischen dem Plastid und Cytosol.

Im weiteren Verlauf reagieren die Isopreneinheiten IPP und DMAPP unter Abspaltung einer Phosphatgruppe zu Geranylpyrophosphat (GPP). Diese Reaktion wird durch die GPP-Synthase katalysiert. GPP ist das zentrale Vorläufermolekül zur Bildung von Monoterpenen über die enzymatische Katalyse durch Monoterpensynthasen [25]. Die Verknüpfung einer weiteren IPP-Einheit mit GPP unter Abspaltung einer Phosphatgruppe führt zu Farnesylpyrophosphat (FPP). In den Plastiden kann durch die enzymatische Verknüpfung eines weiteren IPP-Moleküls Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) entstehen, das als Vorläufermolekül zur Biosynthese von Diterpenen und Tetraterpenen gilt. Ausgehend von zwei FPP-Molekülen können im Cytosol die langkettigen Triterpene entstehen. FPP ist ebenfalls das Schlüsselintermediat für die Biosynthese von Sesquiterpenen.

Die Umsetzung von *E,E*-FPP zu den Sesquiterpenen wird durch die Schlüsselenzyme Sesquiterpensynthasen (STS) katalysiert. In der enzymatischen Reaktion wird die Pyrophosphatgruppe freigesetzt, wobei in den meisten Fällen anschließend eine intramolekulare Zyklisierung der reaktiven carbokationischen Zwischenprodukte erfolgt [26, 27]. Bei der katalytischen Umsetzung interagiert die abgespaltene Phosphatgruppe durch Cofaktoren wie Mg^{2+} -Ionen mit Aspartat-reichen (D-reichen) Motiven der STS [28–30]. Daher sind D-reiche Motive wie RDR-, DDXXD- und NSE-/DTE-Motive in der Nähe des aktiven Zentrums charakteristisch für STS [31]. Viele Sesquiterpensynthasen besitzen die Fähigkeit die Produktion mehrerer Produkte zu katalysieren.

Diese sogenannten Multiproduktenzyme sind durch die Stabilisierung der reaktiven carbokationischen Intermediate in der Lage verschiedene Produktkonformationen zu ermöglichen [32]. Dagegen gibt es Enzyme, die ihre gesamte katalytische Aktivität auf ein einziges Produkt konzentrieren [33, 34]. Damit wird deutlich, dass die Bildung mehrerer Hauptprodukte nicht zufällig stattfindet, sondern vollständig unter der katalytischen Kontrolle des Enzyms abläuft [32, 35]. Dementsprechend spielt die Größe und die strukturelle Zusammensetzung des aktiven Zentrums eine entscheidende Rolle bei der Produktbildung. Ein bekanntes Beispiel für eine Multiprodukt-Sesquiterpensynthese ist die PTS [1, 2, 36, 37]. Die PTS katalysiert die Bildung von mehr als 20 verschiedenen Sesquiterpenen durch die Umsetzung des zentralen Substrats *E,E*-FPP. Die Mechanismen in der Umwandlung von *E,E*-FPP durch die PTS sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Jedoch ist bekannt, dass der Reaktionsmechanismus Ringschlüsse, Hydridverschiebungen und Umlagerungen beinhaltet [37–39]. Ein von Faraldos *et al.* postulierter Bildungsmechanismus einer Auswahl an bekannten Hauptprodukten ist in der Abbildung 3 veranschaulicht.

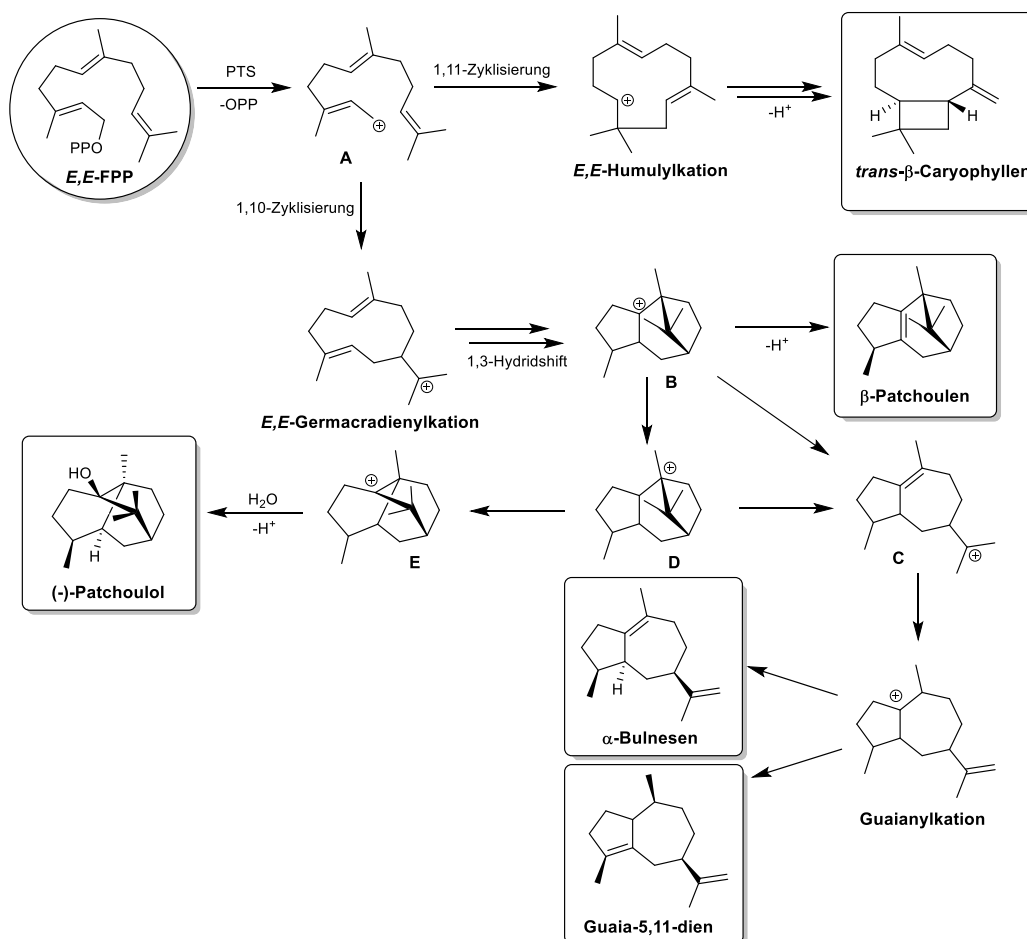


Abbildung 3: Postulierter Mechanismus der Sesquiterpenbildung durch die enzymatische Umsetzung von *E,E*-FPP mit der PTS nach Faraldos *et al.* [2, 37, 38, 40].

Nach der Dephosphorylierung von *E,E*-FPP entsteht ein reaktives primäres Carbeniumion **A**, das den Ausgangspunkt für den Aufbau der komplexen Kohlenstoffgerüste darstellt. Ausgehend von Carbeniumion **A** können zwei unterschiedliche Ringschlussreaktionen stattfinden [2, 38, 40–42]. Durch eine 1,11-Zyklisierung entsteht ein *E,E*-Humulylkation, aus dem das Hauptprodukt *trans*- β -Caryophyllen resultiert. Ein 1,10-Ringschluss führt zum *E,E*-Germacrandierylkation, das nach Faraldos *et al.* über weitere Ringschlussreaktionen und einen 1,3-Hydridshift zum Intermediat **B** führt [2, 38]. In der Literatur wird angenommen, dass die sigmatrope Umlagerung über Hydridshifts in einer hydrophoben Tasche der PTS stattfindet [38]. Diese ist frei von Wassermolekülen oder Protonen aus dem Reaktionsmedium [2]. Die in diesem Reaktionsraum stattfindende Reaktionskaskade wird dabei von der thermodynamischen sowie kinetischen Stabilität der Intermediate in Richtung der Endprodukte getrieben [43]. Eine Deprotonierung des Zwischenproduktes **B** führt zum Hauptprodukt β -Patchoulen. Über das tertiäre Carbeniumion **B** wird in einer intramolekularen Ringöffnung das Intermediat **C** gebildet. Dieses kann nach einer De- und Reprotonierungsreaktion zum Guaianylkation und schließlich zu den Guaien-Isomeren α -Bulnesen und Guaiia-5,11-dien führen. Eine weitere bevorzugt stattfindende Reaktionsroute führt zum Patchoulialkohol. Das Intermediat **B** kann über zwei Wagner-Meerwein-Umlagerungen zum tertiären Carbeniumion **E** reagieren. In einer letzten Reaktion mit Wasser wird schließlich das Hauptprodukt (-)-Patchoulol gebildet.

Bis heute sind keine Röntgenkristallstrukturen der PTS publiziert. Die strukturellen Erkenntnisse basieren auf *in silico* Modellierungen [1, 38]. Die PTS enthält mehrere für STS charakteristische aspartatreiche Regionen mit der Sequenz DDXXD um das aktive Zentrum, die Mg^{2+} -Ionen koordinieren und die Bindung von FPP-Molekülen ermöglichen [2, 35, 40]. Ein weiteres NSE/DTE-Motiv, das als zusätzliche Bindungsstelle fungiert, befindet sich in der aktiven Tasche gegenüber des DDXXD-Motivs. Dieses Strukturmotiv könnte der Literatur zufolge für das breite Produktspektrum der PTS und der vielfältigen Zusammensetzung des Patchouliöls relevant sein [2, 44].

3.3 Patchouliöl – Inhaltsstoffe, Wirkung und Anwendungsgebiete

Patchouli ist eine Pflanzengattung in der Familie der Lippenblütler (*Lamiaceae*) mit ätherischen Ölen, die in den subtropischen Regionen Indiens, Chinas und Südasiens, wie z.B. in Indonesien, angebaut wird [45]. Das in der Pflanze vorhandene essentielle Öl besitzt einen holzig-erdigen Geruch. Bekannte Vertreter dieser bis zu 100 cm hohen Pflanze sind der indische Patchouli (*Pogostemon cablin*) und javanische Patchouli (*Pogostemon heyneaus*). In Abbildung 4 ist die Patchouli-pflanze in frischem und getrocknetem Zustand dargestellt.

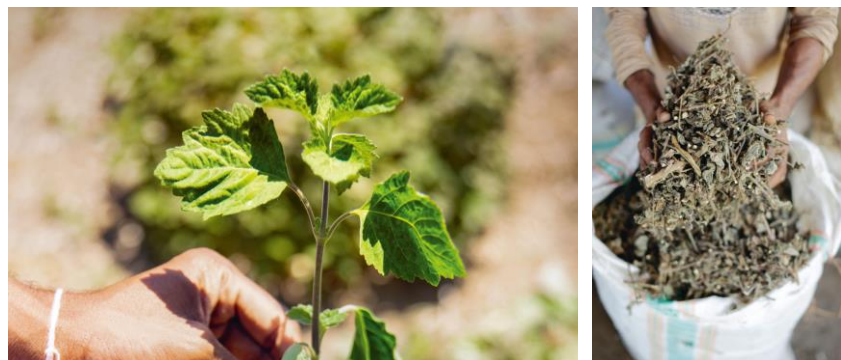


Abbildung 4: Frische (links) und getrocknete (rechts) Blätter der Patchoulipflanze des Anbauprojektes der Symrise AG in Sulawesi [46].

Das intensiv gelbe Patchouliöl ist ein konzentriertes Terpengemisch und besteht bis auf wenige Ausnahmen aus Sesquiterpenoiden. Die für den typisch holzigen Duft des essentiellen Öls verantwortliche Hauptkomponente ist das Sesquiterpenoid (-)-Patchoulol. Die enthaltenen Sesquiterpenoide haben funktionalisierte zyklische Strukturen wie (-)-Patchoulol, die über eine chemische Synthese schwer zu synthetisieren sind [2]. Einige bekannte Strukturen des Patchouliöls aus *Pogostemon cablin* sind in Abbildung 5 dargestellt.

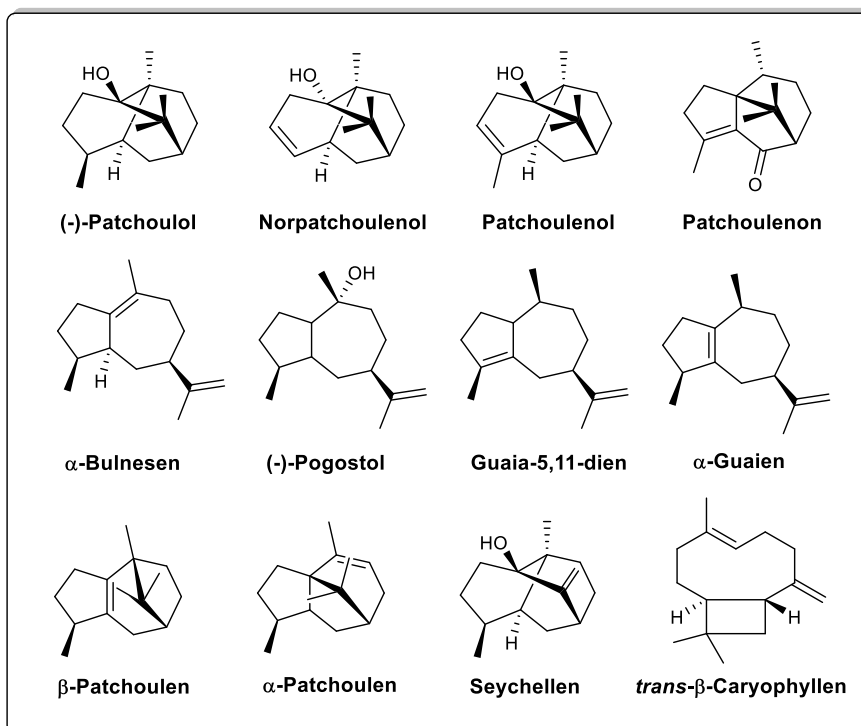


Abbildung 5: Strukturen einer Auswahl an bekannten Sesquiterpenen und Sesquiterpenoiden des Patchouliöls.

Im indischen Patchouli kann der Anteil des dominanten Geruchsträgers (-)-Patchoulol zwischen 30 – 50 % variieren [47–50]. Weitere Hauptbestandteile bilden α -Bulnesen, Guaia-5,11-dien, β -Patchoulen und *trans*- β -Caryophyllen [2, 36]. Das α -Bulnesen ist mit einem Anteil von 8 – 21 % und das Guaia-5,11-dien mit einem Anteil von 8 – 15 % im pflanzlichen Patchouliöl enthalten [49, 50]. Die Hauptprodukte β -Patchoulen und *trans*- β -Caryophyllen haben nur einen geringen Anteil von 4 – 10 % bzw. 2 – 4 % [49, 50]. Doch das essentielle Öl enthält mehr als 20 verschiedene Terpene, die die komplexe Zusammensetzung des Öls bestimmen [48, 51, 52].

In der Literatur wurde bei der Hauptkomponente (-)-Patchoulol zusätzlich zu den olfaktorischen Eigenschaften auch eine pharmakologische Aktivität festgestellt [53, 54]. Darunter wurden unter anderem antioxidative, antimikrobielle, antibakterielle, fungizide und insektizide Eigenschaften nachgewiesen [53, 54]. Die Komponenten Norpatchoulenol, Patchoulenol und Patchoulenon, die das Patchoulolgrundgerüst enthalten, tragen ebenfalls einen geringen Anteil zum erdigen Patchouliduft bei. Alle anderen Inhaltsstoffe sind nahezu geruchslos, können jedoch pharmakologische Vorteile besitzen. Das *trans*- β -Caryophyllen ist z.B. ein CB₂ Rezeptor-selektives Phytocannabinoid und wirkt entzündungshemmend [55].

Das von der Patchouli-pflanze produzierte ätherische Öl trägt zur Insektenabwehr der Pflanze bei und wird daher seit dem 19. Jahrhundert in den asiatischen Ländern auch zum Schutz vor Ungeziefer bei Kleidung oder in Räumen eingesetzt. Während Patchouli Insekten vertreibt, wird dem exotischen ätherischen Öl eine aphrodisierende Wirkung auf Menschen nachgesagt. Das aromatische Patchouliöl weist einen intensiven holzig-erdigen Duft auf und gewann insbesondere Ende der 1960er Jahre in der westlichen Welt an Beliebtheit [56]. Neben Sandelholz und Vetiver, spielt Patchouli aufgrund seiner schweren Duftnote (Basisnote) eine wichtige Rolle in der Aroma- und Duftstoffindustrie. Basisnoten sind im Vergleich zu den Herz- und Kopfnoten schwerer flüchtig und langanhaltend. Durch seinen charakteristischen und einzigartigen Duft wird das Patchouliöl mit seinem relativ hohen Siedepunkt von 287 °C in zahlreichen Parfüms als Hauptduftnote mit einer relativ hohen Konzentration verwendet. Dazu zählt z.B. das Parfüm Patchouli (Réminiscence, 1970) mit 65 % oder Borneo 1834 (Serge Lutens, 2005) mit 57 % des essentiellen Patchouliöls [57]. Genauso ist das Patchouliöl ein integrales Kompositionselement des 1970 durch François Coty kreierten holzigen Chypre-Duftkonzepts [58, 59].

Patchouliöl wird noch heute hauptsächlich durch Wasserdampfdestillation oder Extraktion aus den getrockneten Blüten, Wurzeln oder Blüthen der Pflanze (siehe Abbildung 4) hergestellt. Über diese Methoden können aus 100 kg der getrockneten Pflanzenbestandteile etwa 1,5 – 2 kg Patchouliöl gewonnen werden [46]. Ein Großteil dieser Pflanzen wächst in Entwicklungsländern, sie gehören zu den Cash Crops [60–62]. Das aus der indischen Patchouli-pflanze (*Pogostemon*

cablin) gewonnene Patchouliöl hat aufgrund seiner niedrigen Produktionskosten und der hohen Nachfrage in der Parfüm- und Kosmetikindustrie ein immenses Exportpotential [51, 63]. Die weltweite Produktion liegt jährlich bei 1.000 – 1.500 t Patchouliöl [57]. Die Produktion erfolgt in der Regel in kleinen Agrarunternehmen, deren Anlagen nicht den europäischen Standards entsprechen und in denen es weniger behördliche Überprüfungen gibt. Dementsprechend kann die Qualität des ätherischen Öls variieren. Unabhängig von der ungenügenden Qualität des hochwertigen Öls ist in diesen Ländern keine nachhaltige Landwirtschaft gegeben und die Lebensbedingungen der Bauern sind mangelhaft. Waldrodungen für zusätzliche Anbauflächen sorgen dafür, dass die Kultivierung der Patchouli-pflanze in Konkurrenz zur Nahrungsmittelproduktion steht [57]. Außerdem führen klimatisch bedingte Ernteaussfälle in der Regel zu Schwankungen des Marktpreises [57, 64]. Der Weltmarktpreis des indonesischen Patchouliöls lag 2008 bei 150 €, 2015 bei 40 – 90 € und 2016 wiederum bei 160 € pro kg [52, 57]. Eine aufwändige Totalsynthese des beliebten Terpengemisches ist für die Industrie bisher nicht rentabel [53, 65–67]. Somit kann auf die Gewinnung des essentiellen Öls aus der Pflanze über Wasserdampfdestillation nicht gänzlich verzichtet werden. Jedoch wird aufgrund der ökonomischen und ökologischen Vorteile zunehmend auf die biosynthetische Produktion zurückgegriffen [68–70].

3.4 Synthetische Biotechnologie zur Produktion von Patchouliöl

In der Parfümherstellung stehen etwa 3.000 unterschiedliche Duftstoffe zur Auswahl, wobei ca. 80 % synthetischen Ursprungs sind [57]. Die restlichen Geruchsstoffe werden aus Pflanzen extrahiert. Dazu gehören auch die ätherischen Öle. Die in Kapitel 3.3 aufgeführten Problematiken bei der Gewinnung des pflanzlichen Patchouliöls und der daraus resultierenden schwankenden Weltmarktpreise führen zum zunehmenden industriellen Interesse nach alternativen Herstellungsmethoden. Einige bekannte Produkte, die als synthetischer Ersatz der natürlichen Duftstoffe entwickelt wurden, sind in Abbildung 6 und Abbildung 7 dargestellt.

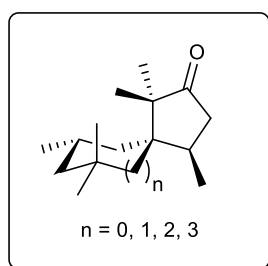


Abbildung 6: Synthetisch hergestelltes spirozyklisches Ketol als Ersatzprodukt zum Patchouliöl [43].

Die synthetische Herstellung des Patchouliöls im Produktionsmaßstab stellt eine große Herausforderung dar. Eine synthetische Alternative mit ähnlichen olfaktorischen Eigenschaften könnte

das vielseitig genutzte Patchouliöl ersetzen. Dafür sollte das in Abbildung 6 dargestellte synthetisch hergestellte spirozyklische Ketol genutzt werden. Jedoch weist diese Verbindung eine sehr geringe Geruchsschwelle von $0,027 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ auf und die industrielle Produktion ist nicht wirtschaftlich [71, 72]. Zu einem chemischen Prozess gehören große Mengen organischer Lösemittel, hohe Temperaturen oder Drücke und der eventuelle Einsatz von Edelmetallkatalysatoren. Demzufolge ist ein Ersatz der chemischen Synthese je nach Zielprodukt durch biotechnologische Prozesse wünschenswert.

Mittels semisynthetischer Verfahren (weiße Biotechnologie) können Produktionsbedingungen durch den Einsatz von Biokatalysatoren umweltfreundlicher gestaltet werden. Biokatalysatoren können bei milderen Reaktionsbedingungen innerhalb kürzester Zeit die Bildung hochkomplexer Strukturen beschleunigen. Die synthetische Biotechnologie nutzt natürliche Biosynthesewege in geeigneten Produktionsorganismen, um die notwendigen Enzyme rekombinant zu produzieren und so eine zuverlässige und steuerbare Produktion zu ermöglichen [73]. Eine vielversprechende Methode zur Herstellung von Patchouliöl ist die Verwendung von Sesquiterpensynthasen. Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden kann die Desoxyribonukleinsäure-Sequenz (DNA-Sequenz) der an der Biosynthese beteiligten Enzyme oder Enzymvarianten aus der Pflanze isoliert, kloniert und in einem ausgewählten Produktionsorganismus exprimiert werden [1, 73]. Nach einer umfangreichen Charakterisierung und Optimierung werden die gewonnenen Enzyme genutzt, um aus dem kostengünstigen Terpenalkohol Farnesol *in vitro* das komplexe Terpengemisch herzustellen. Diese Methoden werden in der Forschung zur Terpensynthese verwendet [1, 2], sind jedoch in der Industrie noch nicht etabliert.

Die industrielle Entwicklung eines dem Patchouliöl ähnlichen Produktes wurde bislang mittels weißer Biotechnologie angestrebt. Bei dieser Schlüsseltechnologie können Produktionsprozesse über die gezielte Nutzung von Mikroorganismen und deren biotechnologischer Optimierung kostengünstiger und ökologischer durchgeführt werden. In einer Kooperation mit dem brasilianischen Biotechnologieunternehmen Amyris konnte der Duftstoffhersteller Firmenich erstmals im Jahr 2014 ClearwoodTM als potentiell alternatives Produkt zum pflanzlichen Patchouliöl auf den Markt bringen. Das Produkt enthält das in Abbildung 7 dargestellte bicyclische Keton, das unter dem Namen Patchwood[®] patentiert wurde.

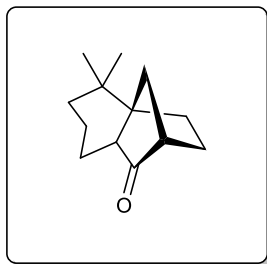


Abbildung 7: Kommerziell erhältliches bicyclisches Keton Patchwood[®] als Ersatzprodukt zum Patchouliöl [43].

Dieses Molekül weist zu den fruchtigen Duftnoten auch den charakteristischen holzigen Geruch des (-)-Patchoulols auf [71]. Jedoch fehlt im Vergleich zum natürlichen Patchouliöl die erdige Duftnote und kann daher das wertvolle essentielle Öl nicht vollständig ersetzen.

Clearwood[™] wurde mittels der rekombinanten Produktion in Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) gewonnen [74]. Über Methoden des Metabolic Engineerings war es möglich sowohl den Ausgangsstoff *E,E*-FPP als auch die benötigten Enzyme zur Produktion der Sesquiterpene im ausgewählten Wirtsorganismus zu exprimieren. Zur Kultivierung des genetisch modifizierten Organismus wurde ein Medium auf Rohrzuckerbasis verwendet. Dieser nachwachsende Rohstoff ist in dem Produktionsland Brasilien in großem Maße und zu günstigen Konditionen erhältlich. Laut van Beek *et al.* war die Produktion von Patchwood[®] im Jahr 2017 um etwa 25 % kostengünstiger als die des pflanzlichen Patchouliöls [49]. Chemisch betrachtet besteht Clearwood[™] aus einigen bekannten Sesquiterpenen des pflanzlichen Patchouliöls wie unter anderem aus Pogostol und (-)-Patchoulol [49]. Allerdings fehlen die für den besonderen erdigen Patchouliduft wichtigen Patchoulolderivate wie Norpatchoulenol oder Patchoulenol. Clearwood[™] kann zwar nicht als Patchouliersatz verwendet werden, dennoch zeigen diverse Patente, dass die Nutzung bei Zugabe wichtiger Inhaltsstoffe des Patchouliöls möglich ist [75]. Seit der Patentierung gibt es zahlreiche kosmetische Produkte und Parfüms, die Clearwood[™] als Basisnote verwenden.

Die Verfahren der Produktion von Patchouliöl aus erneuerbaren Rohstoffen, wie Glucose über metabolisch optimierte Mikroorganismen, wurden in den letzten Jahren vermehrt in der Forschung untersucht. Dieses zuverlässige Produktionssystem bietet im Vergleich zu alternativen Methoden kostenlimitierende und umweltschonende Vorteile [76, 77]. Das vielseitige (-)-Patchoulol konnte von Lauersen *et al.* mit Hilfe von photosynthetischen grünen Mikroalgen, die eine natürliche Produktion des Sesquiterpenvorläufers *E,E*-FPP besitzen, produziert werden [78]. Durch die heterologe Expression der PTS in *Chlamydomonas reinhardtii* konnte im Schüttelkolbenmaßstab eine (-)-Patchoulolproduktion von bis zu 1,03 mg·L⁻¹ erzielt werden. Zu Beginn des 21. Jahrhunderts gelang der Arbeitsgruppe von J. D. Keasling, über die Konstruktion des

MEV-Stoffwechselwegs über Gene aus *E. coli* und *Saccharomyces cerevisiae* in zwei Operons (MevT und MBIS), die Terpensynthese in Mikroorganismen [79, 80]. Dieses Konstrukt wurde bisher zur biotechnologischen Synthese von (+)-Zizaen oder α -Humulen eingesetzt [33, 81, 82]. Weiterhin konnte die Arbeitsgruppe von J. D. Keasling den für die Parfümindustrie wichtigen Naturstoff (-)-Patchoulol über Metabolic Engineering im *Corynebacterium glutamicum* produzieren [63]. Zusätzlich zum Einsatz des zuvor entwickelten *E,E*-FPP-produzierende Expressionskonstrukts wurden weitere Optimierungen, wie z.B. die Verhinderung der Bildung carotinoid-ähnlicher Nebenprodukte oder die Überproduktion limitierender Enzyme des MEP-Stoffwechselwegs zur Erhöhung der *E,E*-FPP-Zufuhr, durchgeführt, um die Produktausbeute zu erhöhen. Dabei konnten im Bioreaktormaßstab (-)-Patchoulolkonzentrationen von bis zu $18 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ erreicht werden.

Einer der wichtigsten Schritte in der Optimierung der ganzzellkatalytischen (-)-Patchoulolproduktion ist die Produktgewinnung. Dieser Bioprozess stellt aufgrund der für Terpene charakteristischen physikalisch-chemischen Eigenschaften, wie Hydrophobie und Flüchtigkeit, eine große Herausforderung dar [82, 83]. Die Produktivität des Bioprozesses kann von der Zelltoxizität durch den Einsatz organischer Lösemittel oder Produktverflüchtigung und damit der Hemmung der Produktbildung beeinflusst werden [82, 84]. Die in situ Extraktion bietet die Möglichkeit Terpene im Reaktor während der Produktbildung über flüssige, feste oder gasförmige Extraktionsmittel zu extrahieren.

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion ist eine der am häufigsten verwendeten in situ Extraktionsmethoden. In einer sogenannten Zweiphasen-Kultivierung wird die Kultur mit 10 % (v/v) eines organischen Lösemittels überschichtet, wobei die hydrophoben Terpene durch das stetige Rühren an der Phasengrenze in die organische Phase übergehen (siehe Abbildung 15).

Dabei sollte das Extraktionsmittel eine möglichst geringe Toxizität gegenüber dem verwendeten Organismus aufweisen. In der Literatur erwies sich Isooctan aufgrund der geringen Toxizität gegenüber *E. coli* als geeignetes Lösemittel zur PTS-Isolierung [1, 2, 85]. Angesichts des relativ hohen Siedepunktes von $99 \text{ }^\circ\text{C}$ ist ein Produktverlust mit Isooctan als Extraktionsmittel bei einer Kultivierungstemperatur von $20 \text{ }^\circ\text{C}$ minimiert. Weiterhin ist die Löslichkeit von Isooctan bei Raumtemperatur mit $0,56 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ relativ gering. Durch diese hydrophobe Eigenschaft ist eine effektive Extraktion durchführbar. Diese Methode wurde bislang unter anderem zur Produktgewinnung der Terpene Limonen oder Taxadien verwendet [86, 87].

Die in situ Extraktion umfasst weiterhin die Festphasen-Extraktion der Terpene aus der Lösung durch den Einsatz von Adsorberpartikeln. Dafür können beispielsweise Adsorberpolymere, Harze

sowie Zeolithe oder modifizierte Aktivkohle verwendet werden [88]. Die Extraktion erfolgt über die hydrophobe Wechselwirkung zwischen dem Adsorptionsmaterial und den Terpenen an der Adsorberoberfläche. Diese Extraktionsmethode wurde bislang unter anderem zur Gewinnung von Epicedrol oder (+)-Zizaen eingesetzt [82, 89].

4 EXPERIMENTELLE ARBEITEN

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die biotechnologische Produktion von Patchouliöl, insbesondere der duftgebenden Komponente (-)-Patchoulol, unter Verwendung von Mikroorganismen untersucht. Zum einen sollte die *in vitro* Produktion über die enzymatische Umsetzung des Sesquiterpenvorläufers *E,E*-FPP mit der biotechnologisch hergestellten PTS untersucht und optimiert werden. Dabei erfolgte eine ausführliche Charakterisierung des katalytischen Potentials der isolierten PTS. Zum anderen sollte eine *in vivo* Produktion des (-)-Patchoulols und der Gewinnung aus der Kulturbrühe etabliert und optimiert werden.

4.1 Rekombinante Produktion der Patchoulsynthase in *Escherichia coli*

Die Vielfalt der Sesquiterpene in der Patchouli-pflanze ist mit einer Anzahl von Sesquiterpensynthesen verknüpft, die ein breites Produktspektrum aufweisen [37]. Dazu gehört auch die Patchoulsynthase, die zur Bildung des holzig-erdig riechenden Patchouliöls führt. Im Rahmen der Untersuchungen von Hartwig *et al.* [85] erfolgte die Gensequenzierung der in dieser Arbeit verwendeten PTS aus dem Strauch des indischen Patchoulis (*Pogostemon cablin*) [1]. Die Codonoptimierte DNA-Sequenz wurde in *Escherichia coli* (*E. coli*) transferiert und für die Proteinexpression zur Verfügung gestellt. Dafür wurde der Expressionsstamm BL21(DE3) mit einem pET16b-Vektor (pET16b::his-FXa-PTS_i, Kapitel 6.5) konstruiert. Der für die Proteinexpression etablierte *E. coli* BL21-Stamm trägt den modifizierten λ -Phagen DE3, der für die T7-Ribonukleinsäure-Polymerase (RNA-Polymerase) codiert ist [90]. Dieser ermöglichte eine effiziente und selektive Expression der rekombinanten PTS. Der pET16b-Vektor unterliegt der Kontrolle des mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induzierbaren *lacUV5*-Promotors. Der Vektor enthält als Selektionsmarker eine Ampicillin-Resistenz. Für eine höhere Stabilität des Antibiotikums während der Expression wurde jedoch das strukturell verwandte Carbenicillin eingesetzt. Die N-terminale Fusion mit einem polyHis-Tag führte zur vereinfachten chromatographischen Aufreinigung des rekombinanten Proteins mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie. Dieser Produktionsstamm wurde im weiteren Verlauf der Arbeit als *E. coli* BL21(DE3) pPTS bezeichnet.

4.1.1 Batch-Kultivierung im Bioreaktor

Die rekombinante PTS konnte nach der Methode von Hartwig *et al.* [1] im Schüttelkolbenmaßstab hergestellt werden. Einen möglichst großen Anteil an bioaktivem und löslichem Protein zu produzieren, stellte sich dabei als eine Herausforderung heraus. Bei der heterologen Expression der PTS mit der molekularen Größe von 64,4 kDa, ist die Bildung von unlöslichem, aggregiertem

Protein, den sogenannten inclusion bodies, nicht auszuschließen. Zur Bereitstellung ausreichender Mengen an bioaktiver, löslicher PTS für die weiteren Experimente in dieser Arbeit wurde der *E. coli* BL21(DE3) pPTS-Stamm in den 2 L-Bioreaktormaßstab übertragen. In einem Bioreaktor können insbesondere die dynamischen Einflussfaktoren wie Sauerstoffsättigung, Temperatur oder der pH-Wert über eine spezialisierte Software gesteuert und geregelt werden. Der Kultivierungsverlauf kann durch die Automatisierung optimiert und möglicherweise eine höhere Ausbeute des Zielproteins erzielt werden.

Die batch-Kultivierung erfolgte in einem 2 L-Bioreaktor (Biostat[®] A, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) in 1,8 L Terrific Broth-Medium (TB-Medium; Kapitel 7.3.1). Dafür wurde eine erste Vorkultur in Lysogeny Broth-Medium (LB-Medium) und eine zweite Vorkultur in TB-Medium angesetzt. Der Bioreaktor wurde mit der Luft-Durchflussrate pro Reaktorvolumen (vvm) von eins begast. Die Regelung des Sauerstoffpartialdruckes (pO_2) von 30 % erfolgte über die Rührergeschwindigkeit. Der pH-Wert der Kultur wurde konstant auf pH 7,25 gehalten. In den verwendeten Medien wurde Carbenicillin ($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) als Selektionsmarker eingesetzt. Die optimale Wachstumstemperatur des *E. coli* BL21(DE3)-Stammes liegt laut Herstellerangaben (New England Biolabs, USA) bei 37 °C. Bei dieser Temperatur wird während der Proteinexpression jedoch ein höherer Anteil an inclusion bodies produziert [85]. Die gezielte Optimierung des *E. coli* pPTS-Stammes zeigte in Vorarbeiten eine höhere Produktion an löslichem Protein bei Erniedrigung der Temperatur ab dem Zeitpunkt der Induktion. Für die Kultivierung im Rührkesselreaktor wurden daher eine Wachstumstemperatur von 30 °C zu Beginn und eine Temperatur von 20 °C während der Proteinexpression eingestellt. Die Hauptkultur wurde mit der zweiten Vorkultur auf eine optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,1 rel. AU inokuliert und bei 30 °C inkubiert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte bei einer OD_{600} von etwa 0,8 rel AU durch Zugabe von IPTG (0,5 mM). Ab dem Zeitpunkt der Induktion wurde die Temperatur auf 20 °C gesenkt. Nach 24 h wurde die Kultivierung beendet und eine Biofeuchtmasse (BFM) von 43,6 g erhalten. Während der Kultivierung wurden Proben zur analytischen Untersuchung der OD_{600} , Biotrockenmasse (BTM) und Glycerinkonzentration entnommen. Abbildung 8 zeigt den Verlauf der batch-Kultivierung.

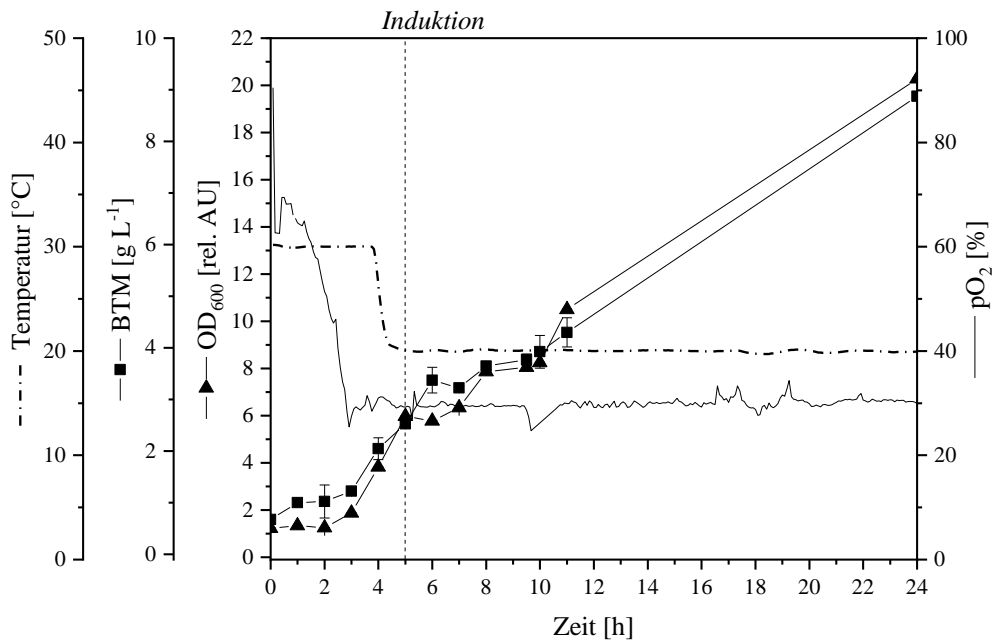


Abbildung 8: Batch-Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3) pPTS im TB-Komplexmedium in einem 2 L-Bioreaktor. Die BTM, OD₆₀₀, Temperatur und der pO₂ sind in Abhängigkeit der Zeit dargestellt. Der Induktionszeitpunkt ist über eine senkrechte, gestrichelte Linie zu erkennen.

Anhand der optischen Dichte und der Biotrockenmasse ist nach einer kurzen lag-Phase ein exponentielles Wachstum zu erkennen. Es wurde eine BTM von $8,9 \text{ g L}^{-1}$ nach 24 h erreicht. Basierend auf der gemessenen BTM, in Abhängigkeit von der Zeit, wurde in der exponentiellen Phase eine maximale Wachstumsrate (μ_{\max}) von $0,28 \text{ h}^{-1}$ berechnet (Formel siehe Kapitel 7.3.5). Zudem wurde ein Biomasse-Substrat-Ausbeutekoeffizient ($Y_{X/S}$) von 0,54 ermittelt (Formel siehe Kapitel 7.3.5). Dieser beschreibt die gebildete Biomasse pro verbrauchter Glucosemenge. Die Sauerstoffsättigung wurde im Verlauf der Kultivierung durch die automatische Regelung der Rührergeschwindigkeit konstant gehalten. Im Vergleich zu einer Kultivierung im Schüttelkolben konnte im Bioreaktor durch die erhöhte Rührergeschwindigkeit eine höhere Sauerstofftransferrate (OTR) gewährleistet werden. Die Kultivierung wurde nach vollständigem Glycerinverbrauch beendet. Zur Bestimmung der produzierten PTS-Konzentration wurde der Überstand nach dem Zellaufschluss mit einem Hochdruckhomogenisator (siehe Kapitel 7.4.2) über Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert. Zur Vergleichbarkeit der Proteinkonzentrationen wurden die auf dem SDS-PAGE (siehe Abbildung 9) aufgetragenen Proben hinsichtlich der jeweiligen Zelldichte normiert (siehe Kapitel 7.3.1).

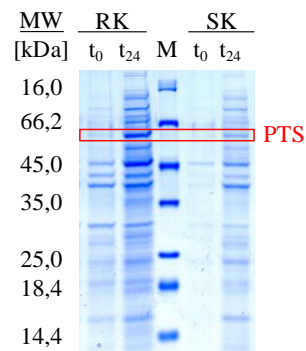


Abbildung 9: SDS-PAGE-Analyse der löslichen Zellfraktion der batch-Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3) pPTS in TB-Medium im Bioreaktor (RK). 6%iges Sammelgel und 12%iges Trenngel mit Coomassiefärbung; M = Größenstandard, t₀ = Probe zum Zeitpunkt Null, t₅ = Probe nach 5 h Kultivierung (Induktion mit IPTG), t₂₄ = Probe nach 24 h Kultivierung. Die Laufhöhe der PTS-Bande ist umrandet.

Bei der löslichen Zellfraktion war nach 24 h Kultivierung eine Bande bei etwa 64,4 kDa zu erkennen, die auf eine Produktion der PTS hindeutet. Aus der densitometrischen Untersuchung, mit bovine serum albumin (BSA) als Standardreihe, ging hervor, dass die PTS mit einer Konzentration von 26,0 mg·L⁻¹ und einer Ausbeute von 3,0 mg·g⁻¹ BTM produziert wurde.

In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die Kultivierung des *E. coli* pPTS-Stammes im Bioreaktor in TB-Medium möglich ist. Die ermittelten Parameter wie μ_{max} , $Y_{X/S}$ und BTM lagen im Bereich von Literaturwerten vergleichbarer batch-Kultivierungen [43]. Die im Bioreaktor produzierte PTS sollte im weiteren Verlauf der Arbeit zur in vitro Produktion von Patchouliöl chromatographisch aufgereinigt werden.

4.1.2 Isolierung der Patchouliolsynthese

Die lösliche Zellfraktion des Kulturüberstandes weist zur PTS-Bande bei etwa 64,4 kDa auch eine Vielzahl an Verunreinigungen mit Wirtszellproteinen (HCPs) auf (siehe Abbildung 9). Für die Charakterisierung der enzymatischen Umsetzung ist es jedoch wichtig, dass die PTS in bioaktiver Form vorliegt. Dementsprechend sollte die PTS aus dem Zellüberstand mit einer möglichst hohen Reinheit isoliert werden. Hierfür wurden in diesem Abschnitt, ergänzend zu den Vorarbeiten von Frister *et al.* [2, 43], einige Strategien zur chromatographischen Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie getestet.

Die Affinitätschromatographie beruht auf der spezifischen Wechselwirkung eines Moleküls oder einer Molekülgruppe in der mobilen Phase an einen matrixgebundenen Bindungspartner, dem immobilisierten Liganden. Sie dient meist als effiziente Reinigungsmethode zur Isolierung von Biomolekülen. Die immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) basiert auf der Bioaffinität von histidinhaltigen Biomolekülen zu matrixgebundenen zweiwertigen Metall-

ionen. Imidazol ist das charakteristische Strukturelement in der Seitenkette von Histidin. Zur kompetitiven Verdrängung des Proteins aus diesem Chelatkomplex kann ein Puffer mit Imidazol verwendet werden. So können in *E. coli* rekombinant hergestellte Proteine mit einem Histidin-Tag aufgereinigt werden. Zur Isolierung der PTS aus dem Zelllysate ist die IMAC aufgrund des N-terminalen polyHis-Tags eine effektive Aufreinigungsmethode.

Die Aufreinigungsstrategien in dieser Arbeit wurden mit der Chromatographiesäule Hi-Trap® IMAC FF 5 mL (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Schweden) an der Fast-Protein-Liquid-Chromatography-(FPLC-)Anlage ÄKTA™ pure Protein Purification System (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Schweden) durchgeführt. Durch Stabilitätstests aus der Literatur ist bekannt, dass die enzymatische Aktivität der PTS bei Temperaturen über 4 °C mit der Zeit abnimmt [43, 91]. Die Versuche wurden aus diesem Grund bei 4 °C durchgeführt. Die Aufreinigung wurde nach einer programmierten Methode, die auf Herstellerangaben der Chromatographiesäule sowie Vorarbeiten von Frister *et al.* [2] basierte, durchgeführt (Methoden siehe Kapitel 7.5.8).

4.1.2.1 Einfluss der Metallspezies auf die chromatographische Aufreinigung

Das stationäre Trägermaterial der Chromatographiesäule besteht aus hochvernetzter Agarose (Sephacrose), an der kovalent immobilisierte Chelatliganden, meist Nitrilotriessigsäure (NTA) oder Iminodiessigsäure (IDA), gebunden sind. Diese chelatbildenden Gruppen können mit geeigneten Metallionen, die für eine spezifische Bindung zum Zielprotein (mit polyHis-Resten) relevant sind, beladen werden. Die Stabilität der Chelatkomplexe basiert auf dem sogenannten Pearson-Konzept und hat eine Auswirkung auf die Bindungsspezifität und -affinität zum Zielprotein [85, 92–94] (siehe Abbildung 10).

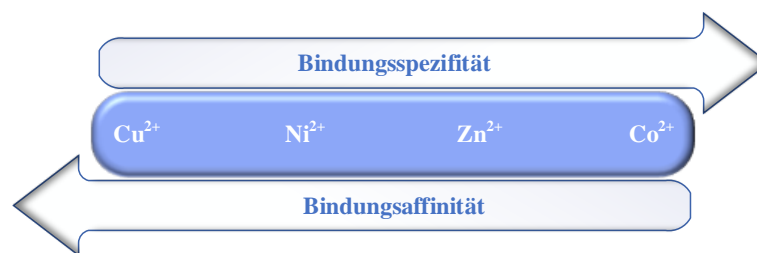


Abbildung 10: Verhältnis der Bindungsaffinität zur Bindungsspezifität unterschiedlicher Metallspezies zu polyHis-Gruppen [93].

In Vorarbeiten [2, 43] wurde die Aufreinigung der PTS über eine Ni^{2+} -IMAC durchgeführt. Mit Co^{2+} -Ionen als Liganden sollte demnach die selektive Anreicherung der biologisch aktiven PTS höher sein. Unter diesem Gesichtspunkt wurde in diesem Abschnitt die Isolierung der PTS mit einer Ni^{2+} - und Co^{2+} -beladenen Säule miteinander verglichen.

Für die chromatographische Aufreinigung wurde die zuvor erwähnte Chromatographiesäule jeweils mit Co^{2+} - und Ni^{2+} -Ionen beladen. Es wurde der in Vorarbeiten verwendete MOPS-Puffer [2, 43] verwendet. Nach dem Zellaufschluss der aus Kapitel 4.1.1 erhaltenen BFM mittels eines Hochdruckhomogenisators, wurde die lösliche Zellfraktion mit dem Bindungspuffer (50 mM MOPS, 10 mM MgCl_2 , 150 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerin, 10 mM Imidazol; siehe Tabelle 30) im Verhältnis 1:10 verdünnt. Daraus wurden 40 mL bei einer Flussrate von $1,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ auf die Säule appliziert. Der Bindungspuffer beinhaltete 10 mM Imidazol. Mit dieser geringen Imidazolkonzentration können HCPs mit einer schwachen Bindung zur stationären Phase schon vor der Elution des Zielproteins von der Säule eluiert werden. Das an der Säule gebundene Protein wurde mit dem Elutionspuffer (50 mM MOPS, 10 mM MgCl_2 , 150 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerin, 500 mM Imidazol) und einer Flussrate von $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ über einen zweistufigen Gradienten mit 50 mM und 500 mM Imidazol eluiert (Chromatogramm siehe Abbildung 11). Diese Methode wurde schon in Vorarbeiten [43] etabliert. Die erste Stufe diente dazu unspezifisch gebundene HCPs zu entfernen. Die PTS wurde in der zweiten Stufe mit 500 mM Imidazol eluiert. Um die Reinheit der PTS vergleichen zu können, wurden Fraktionen des verwendeten Zellysats, des Durchflusses und der Elution der zweiten Elutionsstufe über eine SDS-PAGE-Analyse überprüft (siehe Abbildung 11).

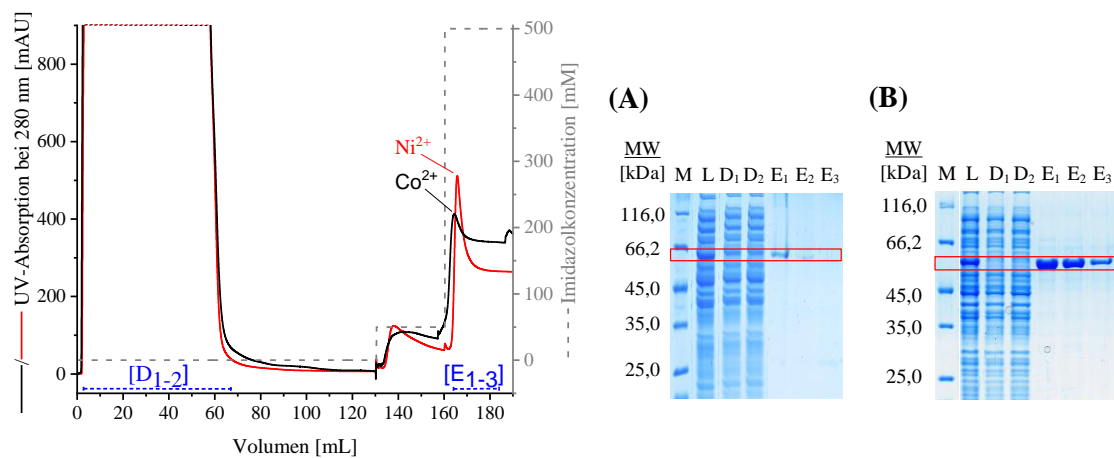


Abbildung 11: Links: FPLC-Chromatogramm der PTS-Aufreinigung mittels einer Ni^{2+} - und Co^{2+} -IMAC-Säule über einen Stufengradienten. Die Detektion der Proteine wurde über die UV-Absorption bei 280 nm gemessen. Rechts: SDS-PAGE-Analyse der PTS-Aufreinigung über Ni^{2+} -IMAC (A) und Co^{2+} -IMAC (B). 6%iges Sammelgel und 12%iges Trenngel mit Coomassiefärbung; MW = Molekulargewicht in kDa, M = Größenstandard, L = Zellysat; D₁ – D₂ = Durchflussfraktionen; E₁ – E₃ = Elutionsfraktionen. Die Laufhöhe der PTS-Bande ist umrandet. Zur übersichtlichen Darstellung wurden die Banden zusammengeschnitten.

Mit beiden Übergangsmetallen war eine Bindung der PTS an der Säule zu erkennen. Über die densitometrische Bestimmung der Reinheit und der PTS-Konzentration mittels einer BSA-Standardreihe wurde ersichtlich, dass die spezifische Bindung an die Co^{2+} -IMAC minimal höher war. Mit der Co^{2+} -IMAC wurde die PTS mit einer Reinheit von 96 % erhalten. Die Reinheit der PTS bei der Ni^{2+} -IMAC war lediglich um 2 % niedriger. Die Bindungsaffinität zur Ni^{2+} -IMAC war jedoch höher als zur Co^{2+} -IMAC. Mit Co^{2+} als Übergangsmetallion ist im Durchfluss ein deutlicher Verlust des Zielproteins zu sehen. Die densitometrisch bestimmte PTS-Konzentration ist um etwa 50 % geringer. Die erzielten Ergebnisse bestätigen die niedrige Bindungsaffinität des Zielproteins zu Co^{2+} -Ionen als chelatisiertes Übergangsmetallion an der Säule. Ni^{2+} -IMAC konnte einen guten Ausgleich von Spezifität und Affinität bieten. Somit wurden die weiteren Optimierungsschritte mit der Ni^{2+} -IMAC durchgeführt.

4.1.2.2 Optimierung der chromatographischen Aufreinigung der bioaktiven PTS

Für die Versuche zur enzymatischen Umsetzung war es besonders wichtig, dass die Bioaktivität der PTS während der Downstream-Prozessschritte nicht verloren geht. Die Bioaktivität der PTS kann unter anderem durch lange Prozessschritte und hohe Imidazolkonzentrationen negativ beeinflusst werden [2, 91]. In Kapitel 4.1.2.1 wurde zur Elution der PTS, wie in den Vorarbeiten, eine Konzentration von 500 mM Imidazol verwendet. In diesem Abschnitt sollte überprüft werden, ob die PTS mit einer niedrigeren Imidazolkonzentration eluiert werden kann, um der Reduktion der PTS-Bioaktivität entgegenzuwirken. Zur quantitativen Aufreinigung von bioaktiver PTS war es erforderlich das Elutionsverhalten der PTS näher zu betrachten. Dafür wurde die PTS zunächst mittels der mit Ni^{2+} -beladenen HiTrap™ IMAC FF-Säule über einen linearen Gradienten zwischen einer Imidazolkonzentration von 50 – 500 mM eluiert (Daten siehe Kapitel 8.1). Dabei konnte die PTS mit 250 mM Imidazol vollständig eluiert werden. Im Folgenden wurde zur gezielten Trennung der unselektiv an der Säule gebundenen Proteine ein Stufenprogramm entwickelt.

Die chromatographische Aufreinigung der PTS erfolgte mittels der Ni^{2+} -IMAC-Säule über zwei Stufen. Dabei wurden 60 mL Probenvolumen bei einer Flussrate von $1,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ auf die Säule appliziert. Die PTS wurde mit einer Flussrate von $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ mit dem Elutionspuffer (50 mM MOPS, 10 mM MgCl_2 , 150 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerin, 250 mM Imidazol, Tabelle 31) eluiert. In einer ersten Elutionsstufe wurden die HCPs mit 50 mM Imidazol entfernt und in der zweiten Elutionsstufe die PTS mit 250 mM Imidazol eluiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt.

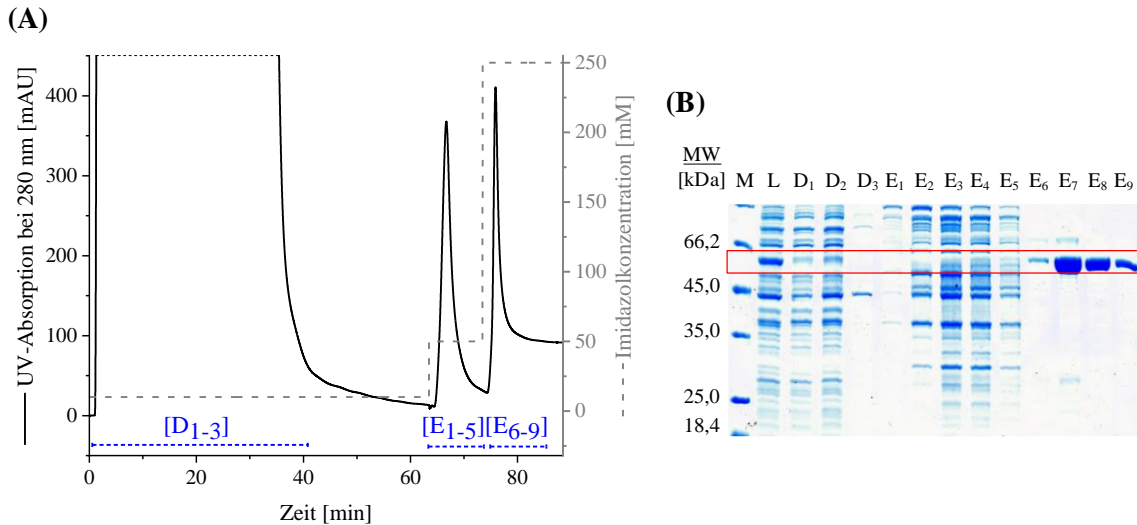


Abbildung 12: (A) FPLC-Chromatogramm der PTS-Aufreinigung mit einer Ni^{2+} -IMAC-Säule über einen Stufengradienten. Die Detektion der Proteine wurde über die UV-Absorption bei 280 nm gemessen. (B) SDS-PAGE-Analyse der PTS-Aufreinigung mittels einer Ni^{2+} -IMAC-Säule. 6%iges Sammelgel und 12%iges Trenngel mit Coomassiefärbung; MW = Molekulargewicht in kDa, M = Größenstandard, L = Zelllysate; D₁ – D₃ = Durchflussfraktionen; E₁ – E₅ = Elutionsfraktionen der ersten Stufe mit 50 mM Imidazol; E₆ – E₉ = Elutionsfraktionen der zweiten Stufe mit 250 mM Imidazol. Die Laufhöhe der PTS-Bande ist umrandet.

Mit Hilfe der gesammelten Fraktionen und der Analyse über SDS-PAGE lassen sich die Peaks des FPLC-Chromatogramm interpretieren. Es ist zu erkennen, dass während der ersten Elutionsstufe mit 50 mM die an der Säule unselektiv gebundenen Proteine eluiert wurden. Ab der zweiten Elutionsstufe mit 250 mM Imidazol war eine Bande auf der Laufhöhe der PTS zu verzeichnen. Die PTS konnte mit einer densitometrisch bestimmten Reinheit von 96 % isoliert werden.

Ein unmittelbarer Pufferaustausch nach der chromatographischen Aufreinigung ist zur Minimierung des Aktivitätsverlusts notwendig. Dazu wurden die Elutionsfraktionen der zweiten Elutionsstufe (E₆ – E₉) vereinigt, in eine Vivaspin[®] 20 Ultrafiltrationseinheit (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) mit einem Cut-Off von 30 kDa überführt und bei 4 °C in den Lagerungspuffer (50 mM MOPS, 10 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerin; siehe Tabelle 29) umgepuffert. Über einen NanoDrop Spektralphotometer (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) konnte eine Gesamtproteinkonzentration von 1,6 mg·mL⁻¹ ermittelt werden. Im Weiteren wurde die Evaluierung unterschiedlicher Methoden für den Pufferaustausch angestrebt.

4.1.2.3 Optimierung des Pufferaustauschs

Die Ultrafiltration ist eine einfache, aber auch schnelle Methode zur Trennung von niedermolekularen Substanzen sowie zur Aufkonzentrierung von Proteinlösungen. Jedoch kann die Ultrafiltration mit einem Proteinverlust an der Kunststoffwand des Probebehälters sowie durch Adsorption an der Membran (Polyethersulfon (PES)) der Ultrafiltrationseinheit verbunden sein. In diesem Abschnitt sollte eine alternative Methode zur Umpufferung der aufgereinigten Proteinlösung ermittelt werden.

Die Größenausschlusschromatographie (SEC) beruht auf der Trennung von gelösten Komponenten entsprechend ihrer Molekülgröße. Die Chromatographiesäule ist mit hochporösen Polymerperlen gepackt. Die gelösten Moleküle werden im Gegensatz zu anderen Chromatographieverfahren nicht an die Säule gebunden. Somit ist die Trennung von der Pufferzusammensetzung unabhängig. Kleinere Moleküle können in die poröse stationäre Phase hineindiffundieren, wohingegen größere Moleküle durch das Chromatographiematerial hindurchfließen. Je größer das Diffusionsvolumen, umso mehr wird die Retentionszeit verlängert, sodass die größeren Moleküle zuerst eluiert werden.

Alternativ zur Ultrafiltration der Proteinlösung wurde eine Tandem-Two-Step-Aufreinigung (Methode siehe Kapitel 7.5.8.2) über die Kopplung der mit Ni^{2+} -Ionen beladenen HiTrap™ IMAC FF-Säule mit einer präparativen SEC-Säule untersucht. Die HiPrep™ 26/10 Desalting-Säule (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Schweden) ist eine mit Sephadex G-25 gepackte Säule mit 53 mL Säulenvolumen. Die IMAC- sowie Desalting-Säule wurden an der FPLC-Anlage hintereinander geschaltet. Die PTS wurde zuerst über die Ni^{2+} -IMAC-Säule aufgereinigt und die aufgereinigte Proteinlösung dann über die Desalting-Säule in den Lagerungspuffer umgepuffert. 100 mL Probenvolumen wurden bei einer Flussrate von $1,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ auf die Säule appliziert. Über ein Zwei-Stufen-Programm wurde die PTS mit dem in Kapitel 4.1.2.2 optimierten Elutionspuffer eluiert. Die eluierte Fraktion wurde über die Desalting-Säule mit einer Flussrate von $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ in den Lagerungspuffer umgepuffert. Die Chromatogramme sind in Abbildung 13 dargestellt.

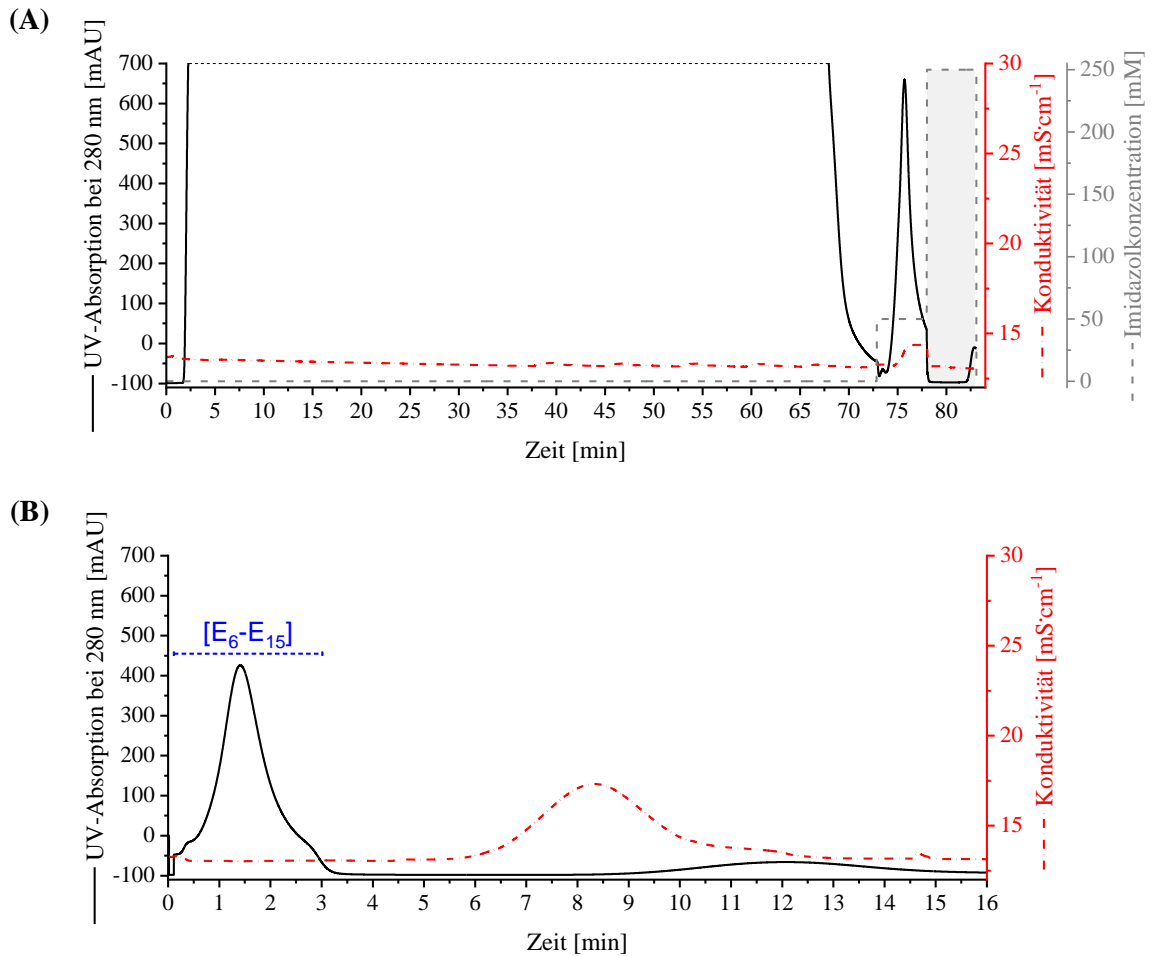


Abbildung 13: Tandem-Two-Step-Aufreinigung der PTS. (A) FPLC-Chromatogramm der PTS-Aufreinigung über eine Ni²⁺-IMAC-Säule und einer zweistufigen Elution mit Imidazol. Das Eluat der zweiten Stufe (grau hinterlegter Bereich) wurde automatisch auf die Desalting-Säule gespült. (B) FPLC-Chromatogramm der Umpufferung des Eluats über die Desalting-Säule; E₆ – E₁₅ = Elutionsfraktionen 6 bis 15 . Detektion der Proteine bei 280 nm.

Auf dem ersten Chromatogramm (A) ist der erste Schritt der Aufreinigung über die Ni²⁺-IMAC-Säule zu sehen. Nach der Beladung der Säule mit dem Zelllysate folgte die erste Elutionsstufe mit 50 mM Imidazol, bei der die schwach gebundenen Proteine eluiert wurden. Bei der zweiten Elutionsstufe mit 250 mM Imidazol wurde kein Peak detektiert. Der Grund dafür ist, dass das Eluat im FPLC-System zurückgehalten und in der darauffolgenden Methode auf die Desalting-Säule gespült wurde. Der detektierte Peak des Zielproteins war daher erst im zweiten Chromatogramm (B) zwischen 0,5 und 2,5 min zu verzeichnen. Nach der Elution der PTS stieg die Konduktivität. Dabei wurden die kleineren Imidazolmoleküle aus der Säule rausgespült. In Abbildung 14 ist die SDS-PAGE-Analyse der Fraktionen während der Elution des Zielproteins über die Desalting-Säule dargestellt.

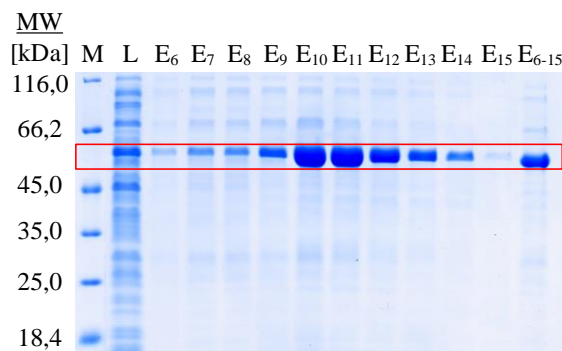


Abbildung 14: SDS-PAGE-Analyse der Umpufferung über eine Desalting-Säule (B). 6%iges Sammelgel und 12%iges Trenngel mit Coomassiefärbung; MW = Molekulargewicht in kDa, M = Größenstandard, L = Zellysat; E₆ – E₁₅ = Elutionsfraktionen der zweiten Stufe mit 250 mM Imidazol nach der Umpufferung; E₆₋₁₅ = Vereinte Elutionsfraktionen nach der Umpufferung. Die Laufhöhe der PTS-Bande ist rot umrandet. Zur übersichtlichen Darstellung wurden die Banden zusammengeschnitten.

Alle Elutionsfraktionen enthalten eine PTS-Bande auf der Höhe von etwa 64,4 kDa. Die Elutionsfraktionen nach der Umpufferung wurden vereint (E₆₋₁₅, 12 mL Gesamtvolumen) und die Reinheit densitometrisch bestimmt. Die PTS konnte über die Tandem-Two-Step-Aufreinigung mit einer Reinheit von 96 % isoliert werden. Zum Vergleich des Proteinverlustes wurde die PTS unter gleichen Bedingungen über eine Ni²⁺-IMAC-Säule aufgereinigt und über eine Vivaspin® 20 Ultrafiltrationseinheit (Molekulargewichtsgrenzwert (MWCO) = 30 kDa) in 3,5 mL des Lagerpuffers umgepuffert.

Die Proteinkonzentration beider Lösungen wurde über den Nanodrop Spektralphotometer ermittelt. Dabei wurde nach der Umpufferung über die Desalting-Säule eine Proteinkonzentration von 0,47 mg·mL⁻¹ erhalten. Die Proteinkonzentration nach der Umpufferung über die Ultrafiltrationseinheit betrug 0,8 mg·mL⁻¹. Die Ausbeute an PTS wurde bezogen auf die eingesetzte BFM berechnet. Nach der Umpufferung über die Ultrafiltrationseinheit wurden etwa 0,28 mg·g⁻¹ BFM isoliert. Dagegen wurde nach der Umpufferung über die Desalting-Säule mit 0,57 mg·g⁻¹ BFM etwa die zweifache Menge an Protein erhalten. Bei gleicher Menge an BFM konnte die isolierte Proteinmenge über die Umpufferung mittels Größenausschlusschromatographie um etwa 100 % erhöht werden.

Zur Ermittlung der Bioaktivität der isolierten PTS über beide Umpufferungsmethoden wurde ein in Vorarbeiten etabliertes Enzymassay mittels Gaschromatographie [1, 2] verwendet. Die Bioaktivität des Enzyms wurde über die *in vitro* Biokonversion des natürlichen Sesquiterpenvorläufers *E,E*-FPP durchgeführt.

Dazu wurden 30 μM *E,E*-FPP im Umsetzungspuffer (50 mM MOPS, 10 mM MgCl_2 , 150 mM NaCl, 5 mM DTT, 10 % (v/v) Glycerin), mit 0,5 μM der Enzymlösung versetzt (Gesamtvolumen 500 μL) und mit 150 μL Isooctan (GC-FID) bzw. Pentan (GC-MS) überschichtet (Methode siehe Kapitel 4.1.2.3). Die enzymatische Reaktion erfolgte in einem verschließbaren Glasgefäß (siehe Abbildung 15).

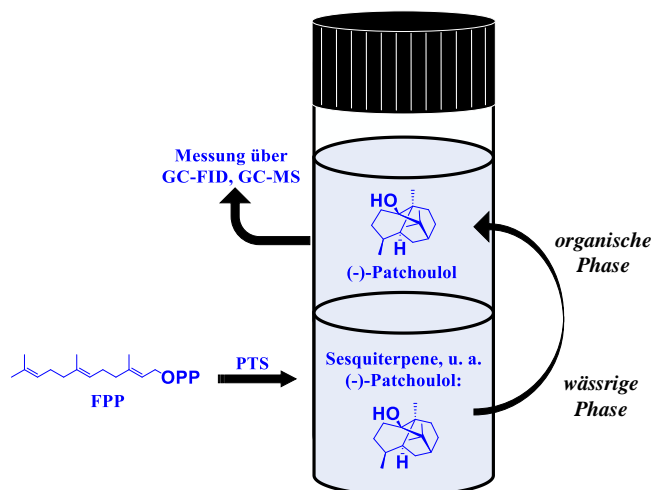


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Lösemittelextraktion der Sesquiterpene wie z.B. (-)-Patchoulol in einem Reaktionsgefäß.

Das Gemisch wurde für 15 min bei 38 °C im Wasserbad inkubiert, dann für 30 s kräftig geschüttelt und zentrifugiert. Durch Messung von Nullkontrollen wurden falschpositive Ergebnisse ausgeschlossen. Dafür wurden wie beschrieben eine Probe mit 0,5 μM der Enzymlösung sowie eine Probe mit 30 μM *E,E*-FPP angesetzt.

Durch das heftige Schütteln wurde die Reaktion gestoppt und die gebildeten Terpene konnten von der wässrigen Phase in die organische Phase übergehen. Durch die Zentrifugation erfolgte eine Phasentrennung. Für die Analysen wurden 80 μL der organischen Phase entnommen. Ein kommerziell erhältliches, pflanzliches Patchouliöl wurde als Referenz verwendet. Die organische Phase der *in vitro* Biotransformation sowie das verdünnte kommerziell erhältliche Patchouliöl wurden mittels Gaschromatographie mit einem Flammenionisationsdetektor (GC-FID; Shimadzu GC-2010 plus Gaschromatograph, Zebron ZB-WAXplus Kapillarsäule) sowie einer mit einem Massenspektrometer verknüpften Gaschromatographie (GC-MS; Agilent 7890B Gaschromatograph und 5977 Massenionisationsdetektor, Agilent VF-WAXms Kapillarsäule) gemessen (Methode siehe Kapitel 7.5.9) und umfassend charakterisiert. Das Gaschromatogramm der *in vitro* Biotransformation über die isolierte PTS aus der Tandem-Two-Step-Aufreinigung sowie des pflanzlichen Patchouliöls sind in Abbildung 16 im Vergleich dargestellt.

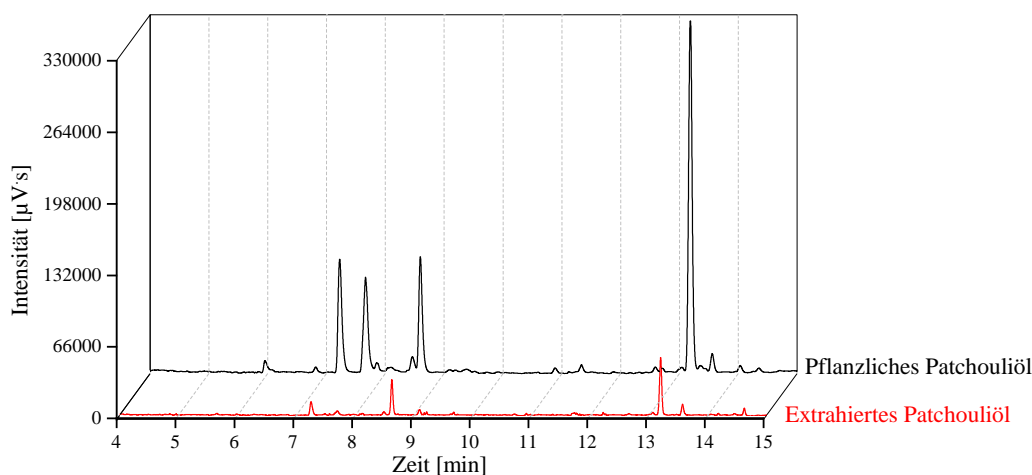


Abbildung 16: Gaschromatogramm der GC-FID-Messung der enzymatischen Umsetzung von *E,E*-FPP mit der isolierten PTS sowie der GC-FID-Messung von kommerziell erhältlichem Patchouliöl.

Im Gaschromatogramm der enzymatischen Umsetzung mit der rekombinanten PTS waren die charakteristischen Peaks des kommerziell erhältlichen, pflanzlichen Patchouliöls (Chromatogramm B) enthalten. Die identifizierten Produkte mit den Hauptfragmentationen im MS-Spektrum (MS-Peaks) sowie die über eine *n*-Alkan Standardreihe (C10-C30) bestimmten Retentionsindices (RI) sind in der folgenden Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Produkte der enzymatischen Umsetzung von *E,E*-FPP durch eine heterolog in *E. coli* produzierte PTS; Retentionsindices über die in Kapitel 7.5.9 angegebene Formel berechnet.

Substanz	Retentionszeit [min]	Retentionsindex (RI)	MS-Peaks	Rel. Anteil ^a [%]	Rel. Anteil ^a Referenz [%]
Guaia-5,11-dien	~7,2	1.743	41 ^b , 55, 67, 81, 93, 105, 121, 133, 147, 161, 175, 189, 204 ^c	20,2	19,5
<i>trans</i> - β -Caryophyllen	~7,7	2.346	41 ^b , 55, 69, 79, 93, 105, 120, 133, 147, 161, 175, 189, 204 ^c	8,1	14,6
β -Patchoulen	~8,4	1.692	41 ^b , 55, 67, 81, 91, 107, 121, 133, 147, 161, 175, 189, 204 ^c	3,7	3,0
α -Bulnesen	~8,6	1.653	41 ^b , 55, 67, 79, 93, 107, 119, 133, 147, 161, 175, 189, 204 ^c	32,3	21,5

Substanz	Retentionszeit [min]	Retentionsindex (RI)	MS-Peaks	Rel. Anteil ^a [%]	Rel. Anteil ^a Referenz [%]
(-)-Patchoulol	~13,2	2.186	41 ^b , 55, 67, 83, 95, 98, 107, 125, 138, 147, 161, 175, 179, 189, 207, 222 ^c	35,7	41,4

^aRelativer Anteil aus den fünf identifizierten Hauptprodukten, ^bBasis-Peak, ^cMolekülion (M⁺)

Aus der Literatur [2, 36] ist bekannt, dass (-)-Patchoulol, α -Bulnesen, Guaia-5,11-dien, *trans*- β -Caryophyllen und β -Patchoulen zu den Hauptprodukten des Patchouliöls gehören. Die unterschiedlichen Produktverhältnisse zwischen des in dieser Arbeit produzierten und des pflanzlichen Patchouliöls sind unter anderem auf die Abweichungen in der Aminosäuresequenz der verwendeten PTS-Variante und der unterschiedlichen Produktionswege sowie -bedingungen zurückzuführen [43].

In diesem Abschnitt konnte die rekombinante PTS in bioaktiver Form isoliert werden. Zum Vergleich der Bioaktivität wurde der Sesquiterpenvorläufer *E,E*-FPP sowohl mit der über eine Ultrafiltrationseinheit, als auch mit der über eine Desalting-Säule umgepufferten PTS unter gleichen Reaktionsbedingungen umgesetzt. Die Bioaktivität wurde über die gemessene Konzentration von Patchouliöl miteinander verglichen. Die Menge des gewonnenen Patchouliöls wurde aus der Konzentration der oben genannten fünf Hauptprodukte bestimmt. Die über die Desalting-Säule umgepufferte PTS wies dabei eine dreifach höhere Enzymaktivität auf.

4.1.3 Fazit

In diesem Abschnitt wurde die in Kapitel 4.1.1 produzierte native PTS ergänzend zu den Ergebnissen der Vorarbeiten [43] über immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie erfolgreich aufgereinigt. Über die Untersuchung der Affinitätschromatographie mittels Co^{2+} - und Ni^{2+} -IMAC konnte der Einfluss verschiedener Metallspezies auf die PTS-Ausbeute und -Reinheit gezeigt werden. Mit dem chelatisierten Übergangsmetallion Co^{2+} konnte die PTS zwar spezifisch an der Säule binden, jedoch war die ermittelte PTS-Konzentration um etwa 50 % geringer als mit Ni^{2+} -Ionen.

Da Imidazol die Bioaktivität der PTS minimieren kann, wurde die zur Elution der bioaktiven PTS notwendige Imidazolkonzentration ermittelt. Die PTS konnte mittels eines Zwei-Stufen-Programms mit 50% der bislang in Vorarbeiten [2] verwendeten Imidazolkonzentration über die Ni^{2+} -IMAC-Säule eluiert werden. Nach der chromatographischen Aufreinigung war durch das noch vorhandene Imidazol im Elutionspuffer ein unmittelbarer Pufferaustausch notwendig.

In bisher publizierten Arbeiten [2, 43] wurden für den Pufferaustausch Vivaspin[®] 20 Ultrafiltrationseinheiten verwendet. Diese führten allerdings aufgrund der möglichen Adsorption des Zielproteins an der Membran zu einem relativ hohen Proteinverlust. Über eine Tandem-Two-Step-Aufreinigung konnte die PTS mit einer Reinheit von 96 % aufgereinigt werden. Die Proteinausbeute wurde durch den Einsatz einer Desalting-Säule um 100 % gesteigert. Mittels der aufgereinigten bioaktiven PTS konnte der Sesquiterpenvorläufer *E,E*-FPP umgesetzt werden. Mit Hilfe von gaschromatographischen und massenspektrometrischen Methoden konnten die für Patchouliöl typischen Hauptkomponenten (-)-Patchoulol, α -Bulnesen, Guaia-5,11-dien, *trans*- β -Caryophyllen und β -Patchoulen identifiziert werden. Dabei wurde im Vergleich zur Umpufferung mittels Ultrafiltration eine dreifach höhere Enzymaktivität bei der über die Desalting-Säule umpufferten PTS beobachtet.

Die über die Tandem-Two-Step-Aufreinigung isolierte aktive PTS wurde im weiteren Verlauf der Arbeit hinsichtlich der Reaktionsbedingungen bei der Umsetzung mit *E,E*-FPP untersucht. Der Fokus lag insbesondere auf der sich daraus ergebenden Produktselektivität und der Erhöhung des (-)-Patchoulolanteils sowie der Umsetzung mit synthetischen Sesquiterpenvorläufern.

4.2 Untersuchungen zum biokatalytischen Mechanismus der Patchoulolsynthese

Die PTS ist eine vielseitige Sesquiterpensynthase und produziert mehr als 20 wertvolle Sesquiterpene durch die Umsetzung des natürlichen Substrates *E,E*-FPP. Das Hauptprodukt dieser biokatalytischen Reaktion ist das Sesquiterpen (-)-Patchoulol. In dieser Arbeit [36] wurde eine effiziente *in vitro* Biotransformation entwickelt, um den biokatalytischen Mechanismus der PTS [2] detaillierter zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurde die zuvor isolierte rekombinante PTS in bioaktiver Form mit einer Reinheit von 96 % verwendet. Die Biotransformation der PTS wurde hinsichtlich der Pufferzusammensetzung, des pH-Wertes und der Temperatur sowie der funktionellen und kinetischen Eigenschaften zur Verbesserung der Produktivität optimiert. In einer weiteren Untersuchung [95] wurde schließlich die enzymatische Umsetzung mit strukturell ähnlichen Substraten wie *E,E*-FPP untersucht, um die Substratflexibilität der PTS zu untersuchen.

4.2.1 Optimierung des Umsetzungspuffers

Enzymatische Reaktionen können durch Protonen aus dem Reaktionsmedium beeinflusst werden [2]. Zur Ergänzung von bereits publizierten Arbeiten [2, 38], sollte eine strukturierte Analyse der Reaktionskomponenten und -bedingungen zur Optimierung der biokatalytischen Reaktion durchgeführt werden. Da Enzyme empfindlich auf pH-Änderungen reagieren, sollte zur Erhaltung eines konstanten pH-Wertes während der Reaktion eine Pufferlösung verwendet werden. Die chemische Komponente des Puffers spielt bei der enzymatischen Reaktion eine entscheidende Rolle. Die Evaluierung des Puffersystems ist zur Erhöhung der Produktbildung sinnvoll. Um die gesamte Pufferkapazität zu erreichen, wurde eine Vielzahl an biologischen Puffern mit einem pH-Wert nahe ihrer Säurekonstante (pK_a) gewählt. Gleichzeitig konnte die Wirkung der Pufferkomponente auf die enzymatische Reaktion der PTS untersucht werden.

Für das Puffer-Screening wurden biologische Puffersysteme in einem pH-Bereich von pH 3 – 10 gewählt. Biologische Puffer sind Lösungen, die die Anforderungen von biologischen Systemen, wie z.B. geringe Wechselwirkung mit Proteinen, hohe Löslichkeit und metabolische sowie chemische Stabilität, erfüllen [96, 97]. Als chemische Pufferkomponenten wurden Zitronensäure (pH 3,2), Natriumcitrat (pH 4,0), Natriumacetat (pH 4,9), 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) (pH 6,1), 3-(*N*-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS) (pH 7,0), Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) (pH 7,4), 4-(2-Hydroxyethyl)1-Piperazinethansulfonsäure (HEPES) (pH 8,0), Triethanolamin (TEA) (pH 8,4) und Glycin (pH 9,8) verwendet. Die Puffer wurden aus 50 mM Puffersalz, 10 mM $MgCl_2$ und 10 % (v/v) Glycerin zusammengesetzt. Um zu vergleichen wie verschiedene Puffer die Enzymaktivität beeinflussen, wurden die fünf Hauptprodukte des

Patchouliöls (-)-Patchoulol, α -Bulnesen, Guaia-5,11-dien, β -Patchoulen, *trans*- β -Caryophyllen betrachtet. (-)-Patchoulol ist für den charakteristischen Duft des Patchouliöls verantwortlich. Zur Quantifizierung der gebildeten (-)-Patchoulolmenge wurde die Summe der GC-FID-Peakflächen der fünf Hauptprodukte mit der Konzentration der fünf Hauptprodukte eines Patchouliöl-Standards korreliert. Dafür wurde eine Patchouliöl-Standardreihe mittels GC-FID gemessen. Die daraus berechnete Konzentration in $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ wurde in eine molare Konzentration (μM) umgerechnet. Zur Berechnung der Konzentration der fünf Hauptprodukte wurde eine mittlere molare Masse von $210,69\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ und zur Bestimmung der Konzentration von (-)-Patchoulol eine molare Masse von $222,36\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ sowie eine α -Cedrol-Standardreihe verwendet. Die berechnete molare Konzentration der fünf Hauptkomponenten, sowie die molare (-)-Patchoulolkonzentration aus der Umsetzungsreaktion in den ausgewählten Puffersystemen sind in Abbildung 17 dargestellt.

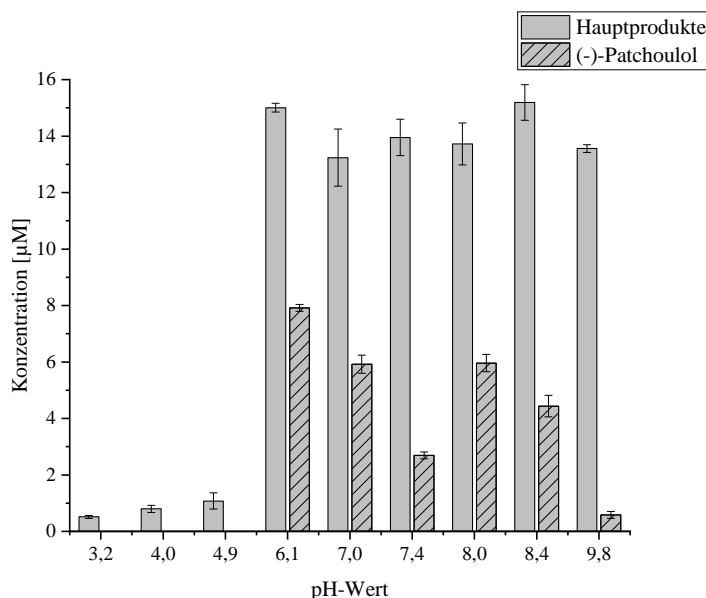


Abbildung 17: Ergebnisse des Screenings der Enzymaktivität und (-)-Patchoulolproduktion mit biologischen Puffern bei pH 3,2 - 9,8.

Die fünf Hauptprodukte machen etwa 80 % der Gesamtzusammensetzung des Patchouliöls aus. laut Literatur trägt (-)-Patchoulol einen Anteil von etwa 30-50 % dazu bei [2, 98]. Wird die Gesamtkonzentration der fünf Hauptprodukte betrachtet, so lassen sich zwei Optima mit dem MES-Puffer (pH 6,1) und dem TEA-Puffer (pH 8,4) erkennen. Wird jedoch die (-)-Patchoulolkonzentration dieser beiden Puffer betrachtet, ist die Konzentration von reinem (-)-Patchoulol im TEA-Puffer um 45 % niedriger. Dieses Ergebnis zeigt, dass sich die Produktselektivität in Abhängigkeit von der Pufferkomponente ändern kann. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag jedoch auf der Optimierung der (-)-Patchoulolproduktion. Daher wurde der Puffer mit der höchsten Ausbeute an

(-)-Patchoulol für die weiteren Optimierungen verwendet. Der höchste (-)-Patchoulolanteil wurde im MES-Puffer mit pH 6,1 beobachtet.

Der hier verwendete MES-Puffer ähnelt dem von Munck *et al.* verwendeten Umsetzungspuffer und die Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen von Brämer *et al.* überein [40, 91]. Dadurch wurde das für Terpensynthese typische pH-Optimum zwischen pH 6,5 und 7,5 bestätigt [1, 2, 40, 91]. Im Besonderen wurde der Effekt von biologischen Puffern auf die enzymatische Umsetzung durch die PTS beobachtet. Im Weiteren soll der Effekt von Pufferzusätzen, die in Vorarbeiten [1, 2] verwendet wurden, auf die Enzymaktivität überprüft werden.

4.2.1.1 Einfluss von Pufferadditiven

Biologische Puffer bestehen aus mehreren Komponenten, die verschiedene Funktionen erfüllen können. Pufferadditive wie NaCl können unter anderem dazu beitragen den osmotischen Wert der Lösung zu erhöhen. Der osmotische Wert kann einen Einfluss auf die Faltung und Löslichkeit des Proteins haben. So kann z.B. ein hoher osmotischer Wert zur Proteinfällung genutzt werden. Mit Salzen wie Natriumchlorid (NaCl) kann zudem die Ionenstärke der Lösung eingestellt werden, die ebenfalls Einfluss auf die Proteinfaltung und -aktivität haben kann. Reduktionsmittel wie Dithiothreitol (DTT) tragen in biologischen Puffern dazu bei, dass Puffersubstanzen reduziert werden oder im reduzierten Zustand verbleiben. Zudem können diese auf bestimmte Proteine wie Proteasen denaturierend wirken, indem die Disulfidbrücken aufgebrochen werden [99]. Laut Literatur können reduzierende Komponenten die Bioaktivität der PTS negativ beeinflussen [91]. In diesem Abschnitt der Arbeit sollte die Wirkung von Pufferzusätzen wie DTT und NaCl auf die Bioaktivität der PTS geprüft werden. Der Einfluss dieser Pufferkomponenten auf die Produktbildung wurde getestet, indem die Produktverhältnisse der fünf Hauptprodukte nach der Biotransformation verglichen wurden. Für diese Experimente wurde der MES-Puffer mit der höchsten (-)-Patchoulolkonzentration aus Kapitel 4.2.1 verwendet.

Für eine hohe Enzymaktivität sollte die Proteinaggregation nach Möglichkeit unterdrückt werden. DTT besitzt die Eigenschaft Proteine durch die Verhinderung von inter- und intramolekularen Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen zu stabilisieren und so die Proteinaggregation zu verringern [97, 99]. Das Reduktionsmittel DTT und der Pufferzusatz NaCl wurden in der Literatur und in früheren Untersuchungen [2, 37, 91, 100] eingesetzt und sollten auf ihre Notwendigkeit im Umsetzungspuffer getestet werden. Die sich aus den verschiedenen Pufferzusammensetzungen ergebenden relativen (-)-Patchoulolanteile im produzierten Patchouliöl sind in Abbildung 18 dargestellt.

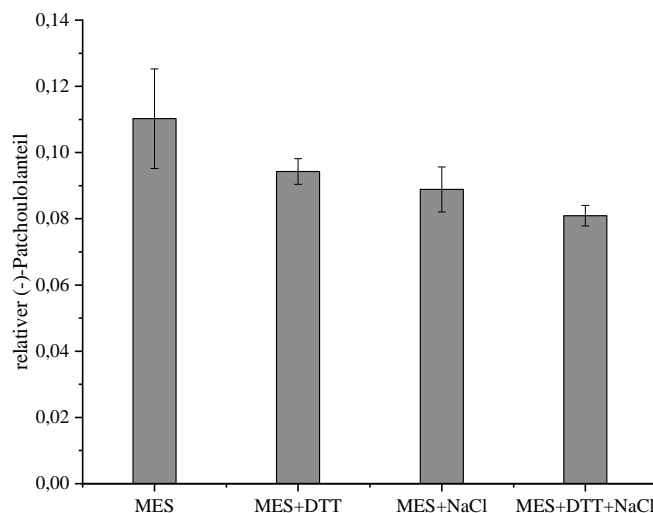


Abbildung 18: Ergebnisse der Auswirkung der Pufferkomponenten DTT und NaCl auf die (-)-Patchoulolproduktion. Die Reaktion wurde in einem MES-Puffer bei pH 6,4 und 34 °C durchgeführt.

Die in der Abbildung 18 zusammengefassten Experimente zeigten einen negativen Effekt von NaCl (150 mM) und DTT (5 mM) auf die (-)-Patchoulolbildung. Da die Patchoulolsynthase nur wenige Disulfidbrücken aufweist und DTT die Bioaktivität der PTS negativ beeinflusst, ist DTT als Reduktionsmittel nicht notwendig [1]. Bei dem MES-Puffer ohne diese beiden Komponenten war die Enzymaktivität höher und es wurde ein optimales Produktverhältnis der fünf Hauptprodukte ermittelt. Daher wurden die Additive DTT und NaCl in den weiteren *in vitro* Biotransformationsuntersuchungen nicht verwendet.

4.2.2 Kinetische Untersuchungen zur Umsetzung von *E,E*-FPP mit der PTS

Die Produktbildung der PTS als Multiprodukt-Sesquiterpensynthase basiert auf einer Kaskade von karbokationischen Ringschluss-, Umlagerungs- und Abfangreaktionen in der aktiven Tasche [2, 38]. Die strukturelle Zusammensetzung der aktiven Tasche, die den Reaktionsraum dieser Reaktionskaskaden darstellt, ist entscheidend dafür welches Sesquiterpen gebildet wird. Die dreidimensionale Struktur des aktiven Zentrums von Enzymen kann durch Faktoren wie den pH-Wert und der Temperatur leicht verändert werden, sodass unterschiedliche Reaktionsverläufe entweder begünstigt oder verhindert werden.

Das Puffer-Screening zeigte deutlich, dass nicht nur der pH-Wert für die Enzymaktivität und Produktselektivität wichtig ist, sondern auch die Pufferkomponenten. In diesem Fall wurde die Enzymaktivität der Patchoulolsynthase ab pH 6 merklich erhöht. Werden die untersuchten biologischen Puffer, bei denen der für das Puffersystem stabilste pH-Wert nahe des jeweiligen pK_a -Wertes verwendet wurde, betrachtet, so hatte der MES-Puffer im Gegensatz zum MOPS-Puffer von

Frister *et al.* einen signifikanten positiven Einfluss auf die (-)-Patchouloolproduktion. Mit dem MES-Puffer konnte im Vergleich zum MOPS-Puffer etwa 25 % mehr (-)-Patchoulool produziert werden. Dieser Unterschied spiegelte sich auch in der Gesamtkonzentration aller fünf Hauptprodukte wider. Mit dem MES-Puffer erhöhte sich die Gesamtkonzentration um etwa 12 %. Nach Bestimmung der Pufferkomponente mit der höchsten (-)-Patchouloolkonzentration wurde der pH-Effekt im pH-Bereich des ausgewählten Puffers (pH 5,6 – 6,6) genauer untersucht. Zudem wurden Untersuchungen zur optimalen Reaktionstemperatur in einem Temperaturbereich von 30 – 44 °C durchgeführt.

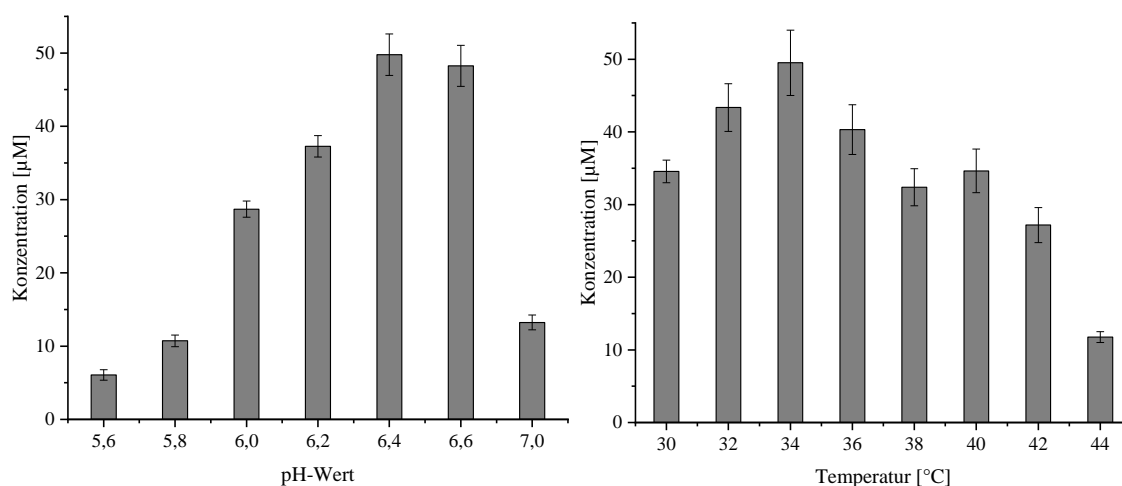


Abbildung 19: Ergebnisse der Prüfung des optimalen pH-Wertes bei 38 °C und der optimalen Temperatur bei pH 6,4 bezogen auf die Enzymaktivität und insbesondere auf die (-)-Patchouloolproduktion. Die Reaktion wurde im MES-Puffer durchgeführt.

Bei dieser Untersuchung wurde im verwendeten MES-Puffer ein optimaler pH-Wert von pH 6,4 sowie eine optimale Temperatur von 34 °C für die Patchouliölproduktion ermittelt. Bei diesen Reaktionsbedingungen wurde eine Gesamtkonzentration der fünf Hauptkomponenten des Patchouliöls von 49,5 µM erreicht. Diese Parameter wurden für weitere kinetische Experimente verwendet.

4.2.2.1 Einfluss der Temperatur und des pH-Wertes auf die Produktselektivität

In diesem Kapitel wurde die Produktselektivität der fünf Hauptprodukte im pH-Bereich des MES-Puffers (pH 5,6 – 6,6) sowie im gewählten Temperaturbereich von 30 – 44 °C untersucht. Bei diesen Experimenten wurde beobachtet, dass sich die Konzentration der fünf Hauptprodukte jeweils in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen ändert. Wird die Bildung der Hauptprodukte im pH-Bereich des MES-Puffers und dem gewählten Temperaturbereich im Detail betrachtet, so wird deutlich, dass sowohl der pH-Wert als auch die Temperatur einen Einfluss auf die Produktselektivität haben.

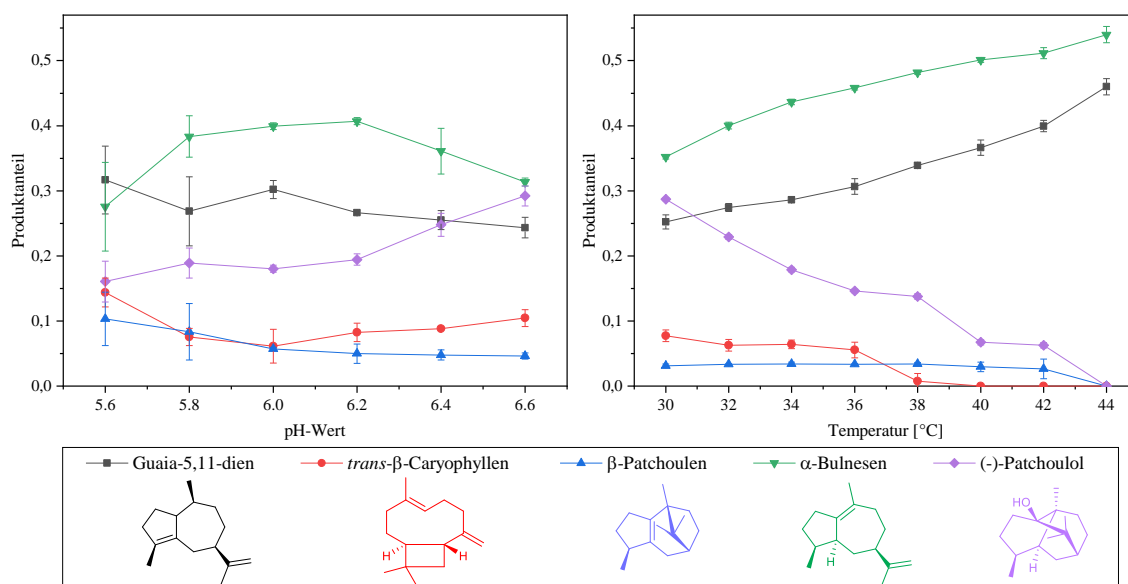


Abbildung 20: Ergebnisse der pH- und Temperaturabhängigkeit der Produktselektivität bezogen auf die fünf Hauptprodukte des Patchouliöls im MES-Puffer.

Mit steigendem pH-Wert und sinkender Temperatur nimmt die Bildung der drei Hauptprodukte β -Patchoulen, *trans*- β -Caryophyllen und (-)-Patchoulol zu. Im Gegensatz dazu verlaufen die Verhältnisse von Guaia-5,11-dien und α -Bulnesen weitgehend parallel zueinander. Dabei steigt deren Produktanteil im unteren Pufferbereich des MES-Puffers leicht an und sinkt im oberen Pufferbereich leicht ab. Wird die Reaktionskaskade nach Faraldos *et al.* [38] betrachtet, so haben *trans*- β -Caryophyllen und (-)-Patchoulol einen anderen Reaktionsweg als die beiden Guaien-Isomere Guaia-5,11-dien und α -Bulnesen [38]. Mit steigender Temperatur findet in der aktiven Tasche des Enzyms eine Konformationsänderung statt, sodass die 1,11-Zyklisierung aus der das *trans*- β -Caryophyllen entsteht, nicht mehr stattfinden kann. Genauso erfolgt kein Protonentransfer, der nach der 1,10-Zyklisierung zur Bildung von (-)-Patchoulol führt. Die Produktion von β -Patchoulen ist mit einem Produktanteil von etwa 3 % relativ temperaturunabhängig, wobei bei sehr hohen Temperaturen wie 44 °C kein β -Patchoulen mehr gebildet wird. Dieser Effekt stimmt mit den Ergebnissen überein, die Frister *et al.* [2] zuvor im MOPS-Puffer erzielt haben. Das *trans*- β -Caryophyllen wird mit einem durchschnittlichen Produktanteil von etwa 6 % ab 40 °C nicht mehr gebildet. Die Konzentration der Guaien-Isomere nimmt jedoch mit der Temperatur kontinuierlich zu. Im Bereich von 30 – 44 °C wachsen die Produktanteile von Guaia-5,11-dien und α -Bulnesen um ca. 20 %. (-)-Patchoulol bildete als Hauptkomponente des Duftstoffes etwa 28,7 % des über die rekombinante PTS produzierten Patchouliöls. Der Produktanteil des (-)-Patchoulols nahm mit steigender Temperatur von 30 – 44 °C um etwa 22 % ab. Im Vergleich

zu den Experimenten im MOPS-Puffer bei pH 7,25 [2], ist die PTS im MES-Puffer temperaturempfindlicher. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sich das Produktgleichgewicht im MES-Puffer je nach Reaktionstemperatur leichter verändern lässt.

Die pH-Abhängigkeit der Produktselektivität verlief für alle fünf Hauptprodukte analog zur Temperaturabhängigkeit. Die Selektivität von β -Patchoulen und *trans*- β -Caryophyllen ist im Vergleich zu den anderen Produkten mehr oder weniger konstant. Während der Produktanteil von (-)-Patchoulol im gemessenen pH-Bereich mit steigendem pH um etwa 13 % zunimmt, sinkt der Produktanteil der Guaien-Isomere um etwa 8 %. Letzteres hat jedoch keine so starke Auswirkung auf den Geruch des Patchouliöls, da die Guaien-Isomere nur wenig zum Geruch beitragen. Da (-)-Patchoulol die wichtigste Duftkomponente im Patchouliöl ist [91], ist ein höherer Anteil von (-)-Patchoulol wünschenswert.

In Veröffentlichungen über die Patchoulolsynthese wurden bislang ein pH-Wert zwischen pH 7 – 7,5 und eine Reaktionstemperatur von 38 °C als optimale Reaktionsparameter angegeben [2, 40]. In dieser Arbeit wurde die höchste PTS-Aktivität mit einem optimalen Verhältnis aller fünf Hauptprodukte, bei Verwendung eines 50 mM MES-Puffers mit 10 % (v/v) Glycerin und 5 mM MgCl₂ mit pH 6,4 bei 34 °C beobachtet.

4.2.2.2 Bestimmung der kinetischen Parameter

Für die kinetische Bestimmung der relevanten Parameter, wie die Michaelis-Menten-Konstante (K_M), die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (v_{max}), der charakteristischen Wechselzahl (k_{cat}) und die katalytische Effizienz k_{cat}/K_M , wurde die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration bestimmt.

Die kinetischen Parameter wurden bei den ermittelten optimalen Reaktionsbedingungen (siehe Kapitel 4.2.2.1) bestimmt. Hierfür wurden Enzym-Assays mit unterschiedlichen *E,E*-FPP-Konzentrationen zwischen 1 – 200 μ M durchgeführt. Die Enzym-Assays wurden angesetzt indem 0,5 μ M der aufgereinigten PTS und die jeweilige *E,E*-FPP-Konzentration zum Reaktionspuffer dazugegeben wurde (Vorschrift siehe Kapitel 7.5.10.3). Aus der Literatur ist bekannt, dass bei der enzymatischen Umsetzung mit der PTS eine Substrathemmung vorliegt [43]. Die Substratkonzentration wurde gegen die molare Konzentration der fünf Hauptprodukte pro Minute aufgetragen und eine Kurve mit dem Substratinhibitionsmodell der Software OriginPro® 2010 (Origin-Lab Corporation, USA) erstellt.

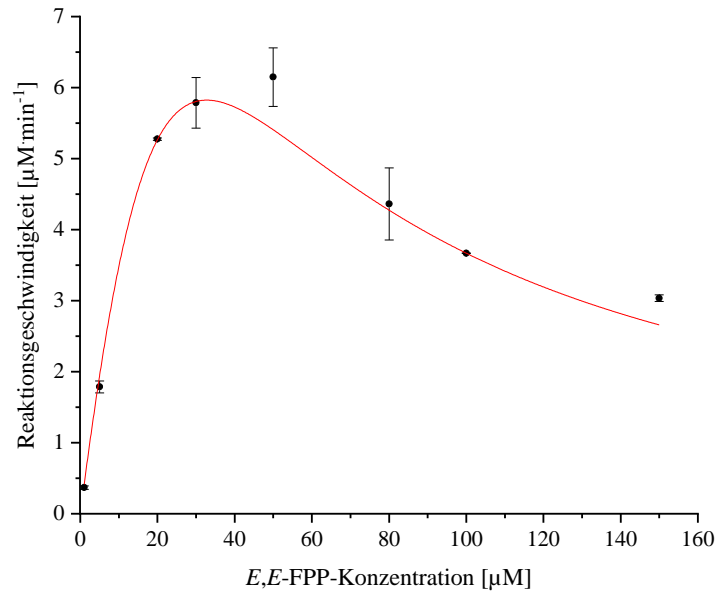


Abbildung 21: Auftragung der experimentell ermittelten Reaktionsgeschwindigkeit der rekombinanten PTS in Abhängigkeit von der Substratkonzentration.

Basierend auf einer Michaelis-Menten-Kinetik wurden für die in dieser Arbeit isolierten PTS eine Michaelis-Menten-Konstante von $K_M = 8,28 \pm 0,7 \mu\text{M}$ und eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von $v_{\text{max}} = 5,81 \pm 0,5 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ bestimmt. Für die molekulare Aktivität wurde ein Wert von $k_{\text{cat}} = 0,0776 \text{ s}^{-1}$ berechnet. Die Wechselzahl k_{cat} beschreibt das Maximum des enzymatischen Umsatzes pro Sekunde. Diese Werte wurden zur Berechnung der Spezifitätskonstante k_{cat}/K_M des Enzymmoleküls eingesetzt. Bei Enzymen des sekundären Metabolismus liegt die katalytische Effizienz in der Regel in einer Größenordnung von $10^3 - 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [101, 102]. Die hier bestimmte $k_{\text{cat}}/K_M = 9.373,4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ liegt im typischen Bereich der katalytischen Effizienz für Enzyme des sekundären Metabolismus. In Tabelle 2 wurden die ermittelten kinetischen Daten mit Literaturwerten verglichen.

Tabelle 2: Vergleich der kinetischen Parameter der in dieser Arbeit produzierten PTS (Ekramzadeh *et al.*) mit den Angabe der bisher veröffentlichten Literatur.

Literatur	K_M [µM]	v_{max} [µM·min ⁻¹]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [L·mol ⁻¹ ·s ⁻¹]
Ekramzadeh <i>et al.</i> (2019) [36]	$8,28 \pm 0,7$	$5,81 \pm 0,5$	0,0776	9.373,4
Frister <i>et al.</i> (2015) [2]	$8,0 \pm 6,5$	$6,93 \pm 1,33$	0,072	9.000,0
Deguerry <i>et al.</i> (2006) [37]	$4,45 \pm 0,6$	-	0,00043	97,0
Munck <i>et al.</i> (1990) [40]	$6,8 \pm 0,5$	-	0,03	4.412,0

Die Werte aus Tabelle 2 zeigen, dass sich der K_M -Wert und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit in der gleichen Größenordnung wie bei der rekombinanten PTS von Frister *et al.* [2] befinden. Bei der hier produzierten rekombinanten PTS konnte im Vergleich eine um etwa 4 % höhere katalytische Effizienz bestimmt werden. Möglicherweise unterscheiden sich die Werte deshalb so stark von den bisher veröffentlichten Werten von Deguerry *et al.* und Munck *et al.*, da diese Publikationen keine Substratinhibierung voraussetzen [43]. Jedoch konnte durch Deuterierungsexperimenten in Vorarbeiten [43] nachgewiesen werden, dass die PTS über eine zweite Substratbindestelle verfügt. Durch eine zweite Substratbindestelle kann eine sogenannte Substratüberschusshemmung auftreten. Dabei bindet ein zweites Substratmolekül an das Enzym-Substrat-Komplex und kann so als Inhibitor wirken. Durch die Bildung des Enzym-Substrat-Substrat-Komplexes kann die Produktbildung verlangsamt werden [103–105].

Der Reaktionsmechanismus der Bildung von (-)-Patchoulol durch die PTS ist noch nicht im Detail geklärt [106]. Insbesondere gibt es in der Literatur keinen Nachweis für weitere Reprotonierungsschritte, wie sie von Faraldos *et al.* [38] postuliert wurden. Da die Bildung von PTS-Produkten offensichtlich durch den pH-Wert beeinflusst wird, ist es möglich, dass Protonen aus der Reaktionslösung direkt am Mechanismus der Terpenbildung beteiligt sind. Darüber hinaus zeigte die PTS eine für Sesquiterpensynthesen ungewöhnliche Substrathemmung. Dieses Verhalten könnte laut Literatur [2, 38] durch intermediäre ungeladene Sesquiterpene erklärt werden, die in dem Mechanismus der Produktbildung vorhanden sind. Faraldos *et al.* verwendeten deuteriertes *E,E*-FPP für die Experimente, um den Reaktionsmechanismus zu etablieren. Die Verwendung von deuteriertem Wasser für den Reaktionspuffer erlaubte es stattdessen den Einfluss von Protonen aus dem Reaktionsmedium auf den Reaktionsmechanismus zu untersuchen [2, 43]. Deuterierungsexperimente zum Reaktionsmechanismus der PTS zeigten, dass die Kohlenstoffgerüste der Reaktionsprodukte unterschiedlich deuteriert wurden und die Anzahl der Deuterierungen der Produktmoleküle vom Reaktionsweg abhängt. Das Deuterierungsmuster von (-)-Patchoulol zeigte, dass das Kohlenstoffgerüst an zwei Stellen deuteriert ist. Der Unterschied zwischen diesem und dem von Faraldos *et al.* veröffentlichten Mechanismus ist das Vorhandensein von zwei intermediären ungeladenen Sesquiterpenen. Es wird angenommen, dass eine Deprotonierung zur Bildung einer neutralen Verbindung in einer hydrophoben Tasche der PTS führt. Dieses neutrale Molekül könnte dann in einem Reprotonierungsschritt deuteriert werden, bevor es in die Reaktionskaskade zurückkehrt [36]. Ein auf deuteriertes Substrat [38] sowie deuteriertes Reaktionsmedium [36, 43] basierender Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 22 dargestellt.

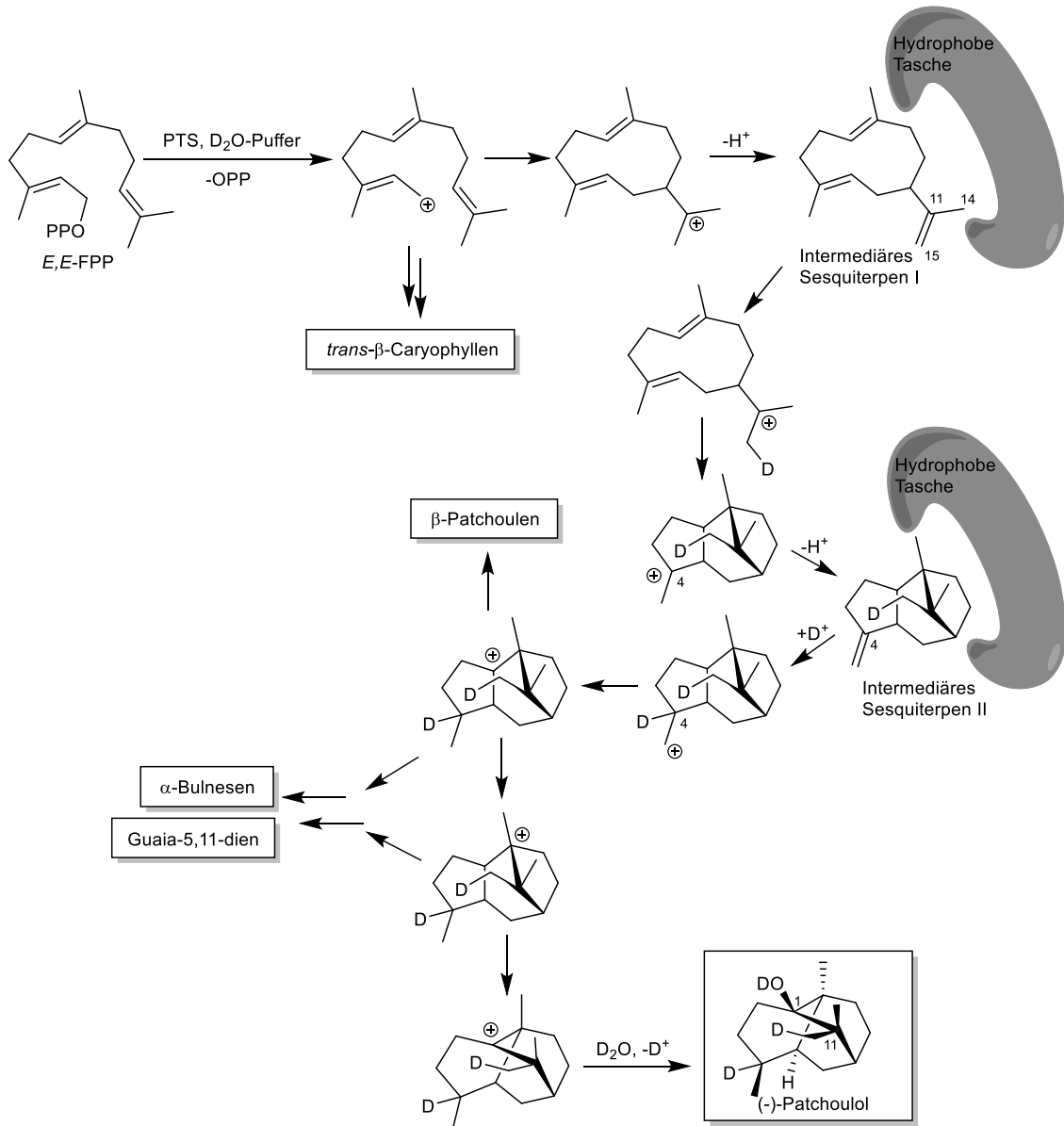


Abbildung 22: Postulierter Reaktionsmechanismus der PTS, basierend auf [43] und [36].

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Annahme, dass die Enzymaktivität und die Produktverhältnisse des Patchouliöls vom Protonentransfer im katalytischen Mechanismus der PTS abhängig sind. Die Temperatur und der pH-Wert spielen eine große Rolle bei der Enzymaktivität. Verschiedene Puffersysteme und der pH-Wert tragen einen großen Teil zum Protonentransfer im Bildungsmechanismus der Produkte bei.

Die Erkenntnisse der Reaktionsrouten in der aktiven Tasche der PTS aus der Literatur zeigten, dass die Produktbildung von den Reaktionsbedingungen und den Protonen im Reaktionsmedium

beeinflussbar ist. Im nächsten Abschnitt soll diese strukturelle Flexibilität der PTS genutzt werden, um durch die Umsetzung mit synthetischen Substraten unbekannte Strukturen zu produzieren.

4.2.3 Untersuchungen zur Substratflexibilität der PTS

Die PTS ist eine strukturell vielfältige Sesquiterpensynthase, die über die Reaktion mit dem Vorläufermolekül *E,E*-FPP mehr als 20 Sesquiterpene bilden kann. Demnach ist die Wahrscheinlichkeit, dass diese Multiprodukt-Sesquiterpensynthase mit strukturell ähnlichen Vorläufermolekülen reagieren kann, relativ hoch. So könnte die PTS als Biokatalysator zur Herstellung von komplexen Strukturen für organische Totalsynthesen verwendet werden. Diese Methode hat den Vorteil, dass die benötigten Strukturen unter milden Reaktionsbedingungen und mit einer hohen Reinheit hergestellt werden könnten. Der Einsatz von Enzymen als Teil organischer Synthesen zur schnelleren Produktion von Zielmolekülen trägt zudem zur Nachhaltigkeit von chemischen Prozessen bei (grüne Chemie).

Das katalytische Potential wurde in zuvor durchgeführten Experimenten [43] mit den *E,Z*-Isomeren des FPPs sowie natürlichen Monoterpenvorläufern untersucht. Mit den *E,Z*-Isomeren ließen sich verschiedene, unter anderem natürlich vorkommende Sesquiterpene herstellen. Der Anteil an hydroxylierten Produkten war dabei gering. Es wurde außerdem gezeigt, dass die PTS auch kurzkettige Terpenvorläufer wie das GPP oder Nerylpyrophosphat (NPP) umsetzen kann. Die Umsetzung mit beiden Substraten führte zur Bildung von verschiedenen Monoterpenen [43]. In diesem Abschnitt wurden diese katalytischen Eigenschaften mit weiteren synthetisch hergestellten Vorläufermolekülen bewertet.

4.2.3.1 Enzymatische Umsetzung mit funktionalisierten Sesquiterpenvorläufern

In diesem Abschnitt wurde die Substratflexibilität der rekombinanten PTS, im Hinblick auf das Potential sauerstoff-, stickstoff- und schwefelhaltige Vorläufermoleküle umzuwandeln, untersucht. Der intramolekulare Ringschluss bei der biokatalytischen Reaktion von *E,E*-FPP und der PTS erfolgt an den Positionen 10 und 11 (siehe Abbildung 23).

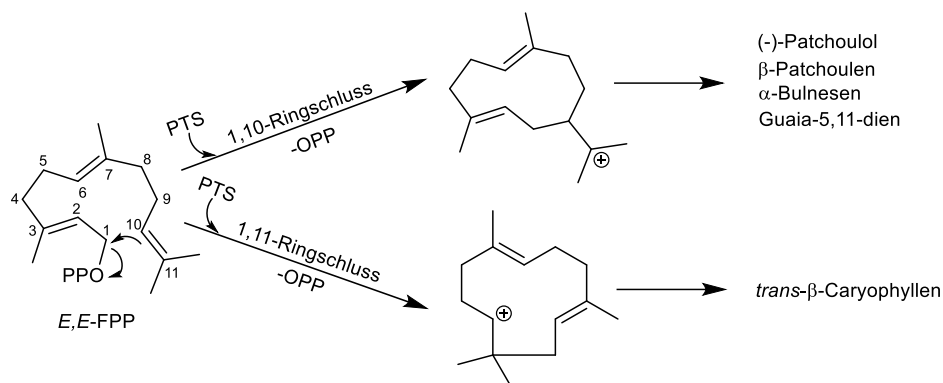


Abbildung 23: Intramolekulare Ringschlussreaktion von *E,E*-FPP bei Umsetzung mit der PTS.

Aus der 1,10-Ringschlussreaktion werden dann die Hauptprodukte (-)-Patchoulol, β -Patchoulen, α -Bulnesen und Guaia-5,11-dien gebildet. Das *trans*- β -Caryophyllen entsteht dagegen über den 1,11-Ringschluss.

Zur Untersuchung der Substratflexibilität wurden sechs heteroatom-funktionalisierte *E,E*-FPP-Analoga vom Institut für Organische Chemie (Leibniz Universität Hannover) synthetisiert und für die Experimente mit der PTS zur Verfügung gestellt (siehe Abbildung 24).

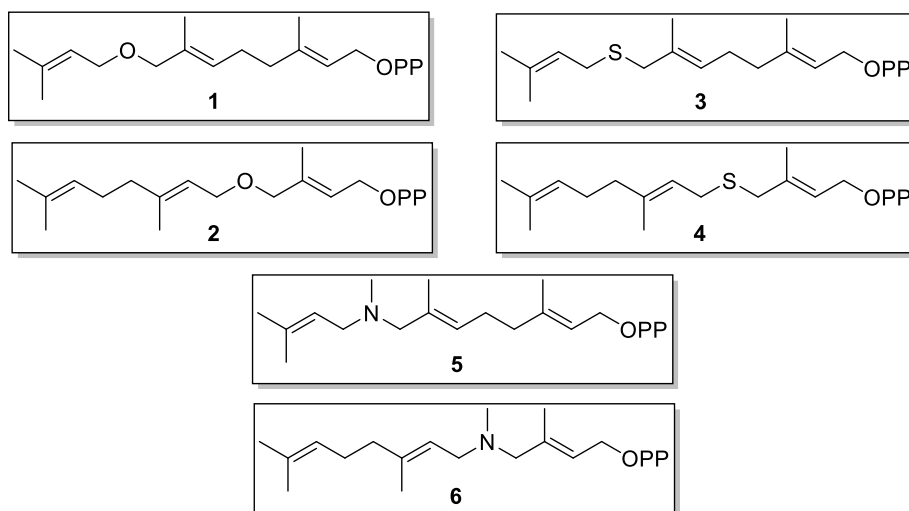


Abbildung 24: Mit Sauerstoff, Stickstoff und Methylamin funktionalisierte FPP-Analoga, vom Institut für Organische Chemie der Leibniz Universität Hannover zur Verfügung gestellt.

Die FPP-Derivate **1** – **4** wurden ausgehend von Geraniol und einer Isopreneinheit über die Williamson-Ethersynthese hergestellt. Die Amine **5** und **6** wurden ebenfalls ausgehend von Geraniol synthetisiert. Der entscheidende Schritt in der Synthese war die nukleophile Substitution der metallisierten *tert*-Butyloxycarbonyl-geschützten Amine durch geeignete Bromide. Die Pyrophosphatgruppe (-OPP) wurde durch die Appel-Chlorierung der terminalen Allylalkohole, gefolgt von der Substitution durch Tris(tetra-*n*-butylammonium)-Hydrogenpyrophosphat, eingeführt. [95]

Zur Umsetzung der funktionalisierten Sesquiterpenvorläufer (siehe Abbildung 24) mit der PTS wurde der in Kapitel 4.2.2.1 optimierte Umsetzungspuffer (siehe Tabelle 32) verwendet. In einem verschließbaren Reaktionsgefäß wurden 50 μM Substrat sowie 0,75 μM PTS mit dem Umsetzungspuffer auf 3 mL Gesamtvolumen aufgefüllt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 200 mL Isooctan für die GC-FID- bzw. 200 mL Pentan für die GC-MS-Untersuchungen überschichtet. Der *in vitro* Assay wurde für 15 min bei 34 °C im Wasserbad inkubiert und die Reaktion anschließend durch Schütteln gestoppt (Vorschrift siehe Kapitel 7.5.10.1). Über Zentrifugation wurden die Phasen getrennt. Für die Analysen wurden 80 μL der organischen Phase entnommen und über GC-FID und GC-MS (Methode siehe Kapitel 7.5.9) untersucht (Gaschromatogramme siehe Kapitel 8.2). Die bei diesen Reaktionen gebildeten Produkte sind unbekannte Strukturen und daher in der digitalen Spektren-Datenbank nicht zu finden. Im Institut für Organische Chemie der Leibniz Universität Hannover wurden Umsetzungen der zu untersuchenden nicht natürlichen Substrate aus Abbildung 24 durch unterschiedliche Enzyme getestet. Nach Kernspinresonanzspektroskopie-Analysen (NMR-Analysen) der aus diesen Reaktionen resultierten Produkte konnte eine interne Datenbank erstellt werden. Der Strukturnachweis der durch die rekombinante PTS gebildeten Produkte erfolgte deshalb durch Koinjektion mit den Produkten anderer Enzyme über die GC-MS. Zum Nachweis der aus dem Sesquiterpenvorläufer **1** und **2** resultierenden Produkte wurde das Produkt der Umsetzung mit dem Enzym Viridiflorensynthase aus *Solanum lycopersicum* koinjiziert [95]. Das Produkt des *E,E*-FPP-Substratanalogons **3** wurde mit dem Produkt aus der Umsetzung mit dem Enzym Presilphiperfolan-8- β -ol-Synthase aus *Botrytis cinerea*, nachgewiesen [95]. Eine Übersicht der resultierenden Produkte aus der Biotransformation der funktionalisierten Substrate durch die PTS ist in der Abbildung 25 gezeigt.

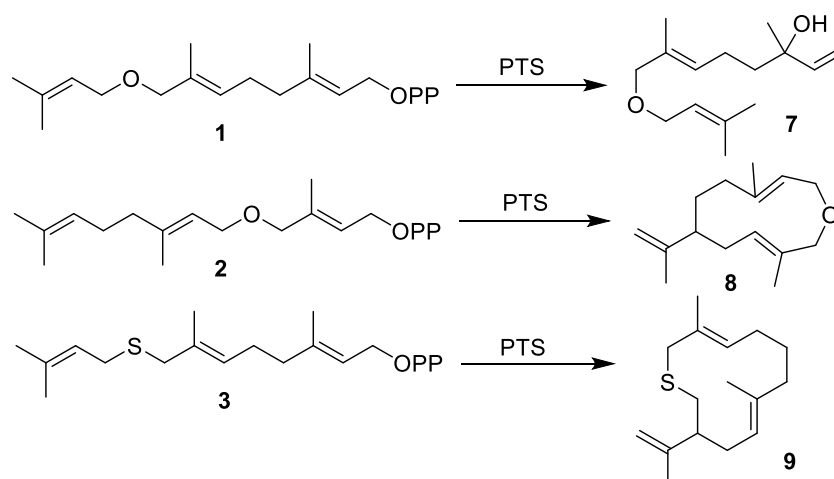


Abbildung 25: Produkte der Biotransformation von funktionalisierten Substraten mit der PTS.

Aus den Ergebnissen lässt sich zusammenfassen, dass die mit Stickstoff funktionalisierten *E,E*-FPP-Derivate **5** und **6**, sowie der Thioether **4**, keine geeigneten Substrate für die Umsetzung mit der PTS sind. Mit diesen Vorläufermolekülen konnte keine katalytische Umsetzung durch die PTS erfolgen. In den Untersuchungen von Oberhauser *et al.* [95] konnten die beiden Stickstoff-Derivate durch keins der untersuchten Enzyme umgesetzt werden. Möglicherweise liegt dabei eine große sterische Hinderung durch das tertiäre Amin vor und das Molekül ist deshalb zu groß für die aktive Tasche der untersuchten Enzyme. Um diese These zu stützen, sind weitere Untersuchungen zur Proteinstruktur durch Homologiemodellierung notwendig. Dagegen sind die beiden Ether **1** und **2** sowie das Thioether **3** geeignete Sesquiterpenvorläufer für die Biotransformation durch die PTS. Aus dem Vorläufermolekül **1** konnte durch Umlagerungsreaktionen der tertiäre Alkohol **7** gebildet werden. Die Bildung der Produkte **8** und **9** findet über die für die PTS typische 1,10-Zyklisierung statt. Ein möglicher Vorschlag zum Bildungsmechanismus der Produkte **8** und **9** ist in Abbildung 26 gezeigt.

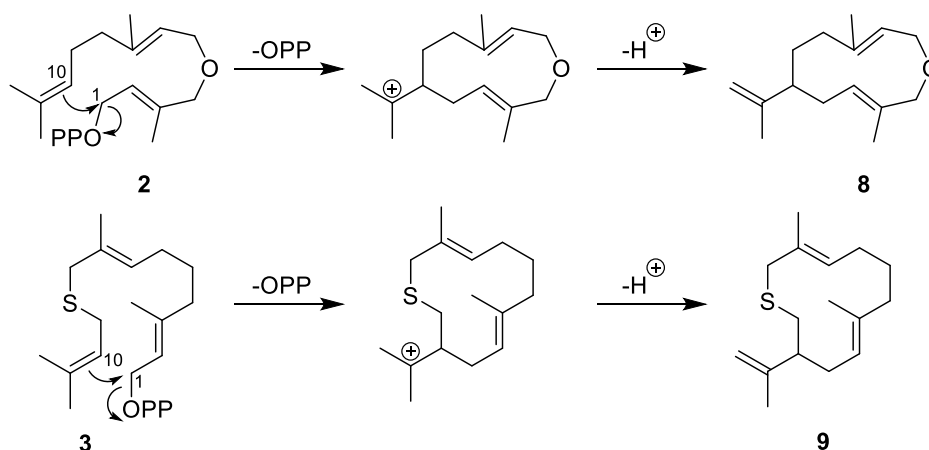


Abbildung 26: Postulierter Mechanismus von Oberhauser *et al.* [95] zur Bildung der Produkte **8** und **9** aus dem Ether **2** und dem Thioether **3**.

Nach Abspaltung der Pyrophosphatgruppe bildet sich durch den 1,10-Ringschluss ein kationisches Zwischenprodukt. Nach einer Deprotonierung entstehen die heteroatomhaltigen Makrozyklen **8** und **9**. Der genaue Mechanismus des Deprotonierungsschrittes vom positiv geladenen Intermediat zu den 1,1-disubstituierten Alkenen **8** und **9** ist noch unklar.

Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass die PTS durch die große aktive Tasche die Möglichkeit bietet neue terpenoide Strukturen herzustellen. Diese können unter anderem als Ausgangsstoffe zur Herstellung neuer komplexer Strukturen dienen.

4.2.4 Fazit

In diesem Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde die Biotransformation der in Kapitel 4.1.2 isolierten PTS hinsichtlich der Reaktionsbedingungen untersucht. Die enzymatische Reaktion wurde mit unterschiedlichen Pufferkomponenten in einem pH-Bereich von pH 3 – 10 durchgeführt. In einem MES-Puffer mit pH 6,1 wurde die höchste (-)-Patchoulolkonzentration ermittelt. In dieser Versuchsreihe konnte insbesondere der Einfluss von Pufferkomponenten auf die Produktselektivität beobachtet werden. Es wurde zudem ermittelt, dass die enzymatische Aktivität der PTS bei Abwesenheit der in Vorarbeiten [1, 2] verwendeten Pufferzusätzen NaCl und DTT im MES-Puffer am höchsten war.

Zur Charakterisierung der PTS wurden der Einfluss von Reaktionsbedingungen wie pH-Wert und Reaktionstemperatur auf die Produktselektivität analysiert und in dem optimierten Puffer die kinetischen Parameter bestimmt. Wie die Untersuchung gezeigt hat, war die Konzentration der fünf Hauptkomponenten des Patchouliöls im MES-Puffer mit 49,5 μM bei pH 6,4 und 34 °C am höchsten. Ein Blick auf die Produktselektivität zeigte, dass die Produktverhältnisse vom pH-Wert des Puffers, wie auch von der Reaktionstemperatur beeinflussbar sind. Jedoch verschiebt sich die Produktselektivität weitgehend durch Erhöhung der Temperatur. Dabei finden Reaktionsrouten wie die zur Bildung der Guaien-Isomere bevorzugt statt. Über die enzymatische Umsetzung wurden die kinetischen Parameter $K_M = 8,28 \pm 0,7 \mu\text{M}$, $v_{\text{max}} = 5,81 \pm 0,5 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$, $k_{\text{cat}} = 0,0776 \text{ s}^{-1}$ und $k_{\text{cat}}/K_M = 9.373,4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ermittelt. Diese Ergebnisse stimmten mit den Untersuchungen von Frister *et al.* überein und zeigten durch den Einfluss des pH-Wertes auf die Produktselektivität, dass Protonen aus der Reaktionslösung direkt am Mechanismus der Terpenbildung beteiligt sind. Über die *in vitro* Produktion konnte bei den optimierten Reaktionsbedingungen eine maximale (-)-Patchoulolkonzentration von 1,86 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ erreicht werden.

Die PTS ist eine strukturell vielfältige Sesquiterpensynthase, die über die Reaktion mit dem Vorläufermolekül *E,E*-FPP mehr als 20 Sesquiterpene bilden kann. Die erlangten Erkenntnisse wurden genutzt, um synthetische, mit Heteroatomen funktionalisierte Substrate mit der PTS umzusetzen. Die *E,E*-FPP-Derivate, die zwischen C9 und C10 mit einem Sauerstoff- bzw. Schwefelatom, sowie zwischen C4 und C5 mit einem Sauerstoffatom funktionalisiert waren, konnten erfolgreich umgesetzt werden (siehe Abbildung 25). Dadurch wurde gezeigt, dass die PTS ein hohes katalytisches Potential zur Umsetzung nicht natürlicher Substrate besitzt, das dazu genutzt werden kann, komplexe terpenoide Strukturen herzustellen.

4.3 In vivo Produktion von (-)-Patchoulol in pathway-optimiertem *E. coli*

Das Patchouliöl ist eine für die Duft- und Aromastoffindustrie wichtige Komponente. Die Extraktion aus Pflanzen und der Import des essentiellen Öls aus den jeweiligen Schwellenländern stellen eine ökologische, aber auch ökonomische Herausforderung dar. Die biotechnologische Produktion des essentiellen Öls über ein metabolisch optimiertes Ganzzellkatalysesystem (WCS) und die in situ Extraktion aus der Kulturbrühe ist ein großer Fortschritt in Richtung Nachhaltigkeit. Bislang war die Etablierung von Bioprozessen zur Produktion zahlreicher Terpene über metabolisch optimierte Zellen in der Industrie möglich [94, 107–109]. Mikrobiell hergestellte Terpene, wie beispielsweise Artemisinin oder Valencen, sind auf dem Markt erwerbbar [82].

Die ganzzellkatalytische Produktion des Patchouliöls bietet, im Vergleich zur zuvor entwickelten in vitro Katalyse mittels der biotechnologisch hergestellten PTS, einige Vorteile für den industriellen Herstellungsprozess. Der Downstream Prozess ist der kostenintensivste Schritt in der Herstellung von Enzymen. Bei der in vivo Produktion und der anschließenden in situ Extraktion des Patchouliöls aus der Kulturbrühe sind diese Schritte nicht notwendig. Dadurch werden die Kosten für den industriellen Herstellungsprozess minimiert. In diesem Abschnitt der Arbeit sollte daher über Methoden des Pathwaydesigns ein geeigneter Prozess zur ganzzellkatalytischen Produktion von Patchouliöl entwickelt und optimiert werden. Dabei lag der Fokus der Experimente auf den ermittelten Anteil der duftgebenden Hauptkomponente (-)-Patchoulol.

Der in Eukaryoten vorhandene MEV-Weg ist ein wesentlicher Bestandteil des Zellstoffwechsels, der die Zellen mit einer ausreichenden Menge an Terpenvorläufern versorgt. Die rekombinante Expression von zelleigenen Terpenvorläufern über den endogenen MEP-Stoffwechsel findet in dem bisher verwendeten *E. coli*-Plasmid nur in geringem Maße statt. Eine erfolgreiche Produktion des Patchouliöls in der Wirtszelle ist nur dann möglich, wenn ein Gleichgewicht zwischen der Expression der PTS und des Sesquiterpenvorläufers *E,E*-FPP besteht.

Mittels Metabolic Engineering können Stoffwechselwege in Organismen gezielt beeinflusst, in eine bestimmte Richtung gelenkt und optimiert werden. Eine Möglichkeit die Expression von *E,E*-FPP zu gewährleisten, wäre die Modifizierung des *E. coli*-eigenen MEV-unabhängigen MEP-Stoffwechselwegs. Alternativ kann die Produktion des Sesquiterpenvorläufers erfolgen, indem ein Zwei-Plasmid-System konstruiert wird. In diesem sogenannten Ganzzellkatalysesystem (WCS) befinden sich zwei verschiedene Plasmide, die in der Lage sind, sowohl die notwendigen isoprenoiden Strukturen wie *E,E*-FPP, als auch die zur (-)-Patchoulolbildung notwendige PTS zu exprimieren. Die Sesquiterpenbiosynthese kann somit innerhalb der Wirtszelle stattfinden.

Zur Verbesserung der Substratversorgung in der Wirtszelle wurde in dieser Arbeit ein von J. Keasling und T. S. Lee optimiertes Plasmidkonstrukt (Addgene Plasmid Nr. 35152) verwendet. Die Plasmidkarte des pBbA5c-MevT-MBIS (pMEV) Plasmids ist in der Abbildung 44 zu finden. Dieses codiert die acht Enzyme des pflanzlichen MEV-Stoffwechselwegs [94] (siehe Abbildung 27).

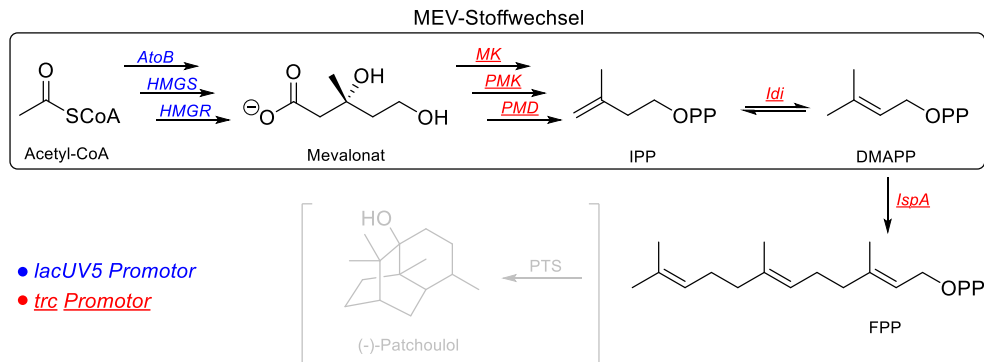


Abbildung 27: Vereinfachte Darstellung vom MEV-Stoffwechselweg und der Produktion von *E,E*-FPP des Plasmids pBbA5c-MevT-MBIS [85, 94].

Die Transformation von Acetyl-CoA zu Mevalonat findet unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors über die Enzyme Acetoacetyl-CoA-Synthase (AtoB), HMG-CoA-Synthase (HMGS) und HMG-CoA-Reduktase (HMGR) statt. Die weiteren enzymatischen Reaktionen erfolgen unter der Kontrolle des synthetischen *trc*-Promotors. Aus Mevalonat wird über die Enzyme Mevalonatkinase (MK), Phosphomevalonatkinase (PMK), Phosphomevalonat-Decarboxylase (PMD) IPP gebildet. Die IPP-Isomerase (Idi) katalysiert die Gleichgewichtsreaktion zu DMAPP. Aus DMAPP wird dann über die FPP-Synthase (IspA) der Sesquiterpenvorläufer *E,E*-FPP produziert [85, 94].

In dieser Dissertation wurde die Konstruktion eines WCSs mit den Plasmiden pPTS und pMEV und damit die *in vivo* Produktion von (-)-Patchoulol untersucht. In Schüttelkolbenexperimenten wurden Tendenzen der Produktivitätssteigerung durch die Änderung der Kultivierungsparameter beobachtet. Zur Erhöhung der (-)-Patchoulolproduktion wurden der verwendete *E. coli* Stamm sowie Kultivierungsbedingungen, wie pH-Wert, Expressionstemperatur, Konzentration des Induktors IPTG und Medium, im Schüttelkolbenmaßstab optimiert. Ein für den optimalen Prozess entscheidender Parameter war die Produktisolierung des gebildeten essentiellen Öls aus der Fermentation. Diese Problematik wurde durch den Einsatz unterschiedlicher Extraktionsmittel untersucht. Die optimierte Methode zur mikrobiellen Produktion von (-)-Patchoulol wurde als Basis für einen Scale-Up in den Bioreaktormaßstab verwendet. Zur Erhöhung der Produktivität sowie der (-)-Patchoulolausbeute wurde die Kultivierung in einem 2 L-Bioreaktor über einen fed-batch-Prozess durchgeführt.

4.3.1 Optimierung der *in vivo* Produktion von (-)-Patchoulol im Schüttelkolben

Die Kotransformation der chemisch kompetenten *E. coli* BL21(DE3) Zellen erfolgte mit den Plasmiden pPTS und pMEV über die Hitzeschock-Methode (Vorschrift siehe Kapitel 7.1.1). Durch den kurzen Hitzeschock wurde die freie rekombinante DNA von den *E. coli* Zellen aufgenommen. Diese Klonierung war insofern zielführend, da die Plasmide pPTS und pMEV unterschiedliche Selektionsmarker beinhalten, die den Zellen so einen Überlebensvorteil in der Kultur verschafften. Das Plasmidkonstrukt pPTS verfügt über eine Ampicillin-/ Carbenicillin-Resistenz, während pMEV eine Chloramphenicol-Resistenz aufweist.

Die Überprüfung der erfolgreichen Kotransformation erfolgte durch Kultivierung des pathway-optimierten *E. coli* Stammes BL21(DE3) pPTS+pMEV im Schüttelkolben (Vorschrift siehe Kapitel 7.3.2). Zur Negativkontrolle wurde der zuvor in Kapitel 4.1 verwendete *E. coli* Stamm BL21(DE3) pPTS unter gleichen Bedingungen kultiviert. Da die Plasmide unterschiedliche Selektionsmarker beinhalten, wurde für den BL21(DE3) pPTS-Stamm das Antibiotikum Carbenicillin ($50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) und für den BL21(DE3) pPTS+pMEV-Stamm die Antibiotika Carbenicillin ($50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) und Chloramphenicol ($34 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) verwendet. Die Vorkultur wurde in LB-Medium und die Hauptkultur im definierten M9-Minimal-Medium (M9-Medium, siehe Tabelle 19) durchgeführt. Das M9-Medium wird häufig für die Kultivierung von Bakterien genutzt und beinhaltet eine minimale Konzentration an Nährstoffen, keine Spurenelemente sowie Glycerin als Kohlenstoffquelle [110]. Die Hauptkultur wurde mit der Vorkultur auf eine OD_{600} von 0,1 rel. AU inokuliert und bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 180 rpm bis zur Induktion inkubiert. Durch die Schüttelgeschwindigkeit von 180 rpm sollte ein ausreichender Sauerstoffeintrag gewährleistet sein. Die Induktion erfolgte bei einer OD_{600} von 0,5 – 0,8 rel. AU durch Zugabe der IPTG-Stammlösung (siehe Tabelle 12) auf eine Endkonzentration von 0,5 mM. Die während der Fermentation gebildeten Sesquiterpene wurden über eine *in situ* Flüssig-Flüssig-Extraktion aus der Kultur extrahiert. Dafür wurde die Kultur unmittelbar nach der Induktion mit 10 % (v/v) Isooctan überschichtet. Die hydrophoben Terpene konnten durch die kontinuierliche Durchmischung der Kultur an der Phasengrenze in die organische Phase übergehen. Bei dieser Extraktionsmethode ist ein Terpenverlust über Verdunstung im Laufe der Kultivierung nicht zu vermeiden. Auf diesen Aspekt wird in Kapitel 4.3.2 näher eingegangen. Die Proteinexpression erfolgte bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ und 180 rpm über 48 h. Zwecks analytischer Untersuchungen der OD_{600} , der BTM und der Terpenbildung wurden zu Beginn der Induktion sowie nach 24 und 48 h Proben entnommen. Die Proben zur Analyse der Terpenbildung wurden von der Oberfläche der Kultur abpipettiert, um ein möglichst hohes Volumen an organischer Phase zu erhalten. Über Zentrifugation wurden die Phasen in der Probe getrennt und die organische Phase für die GC-FID-Messungen (Methode siehe Kapitel 7.5.9) verwendet. Das zur

Extraktion eingesetzte Isooctan ist leicht flüchtig. Dementsprechend ist das Lösemittel während der Kultivierung zum Teil verdunstet. Die Menge an verdunstetem Isooctan wurde bei der Probenahme dokumentiert. Die (-)-Patchouloalkonzentration wurde auf die zu Beginn eingesetzten 10 % (v/v) Isooctan normiert und daraus die Ausbeute berechnet.

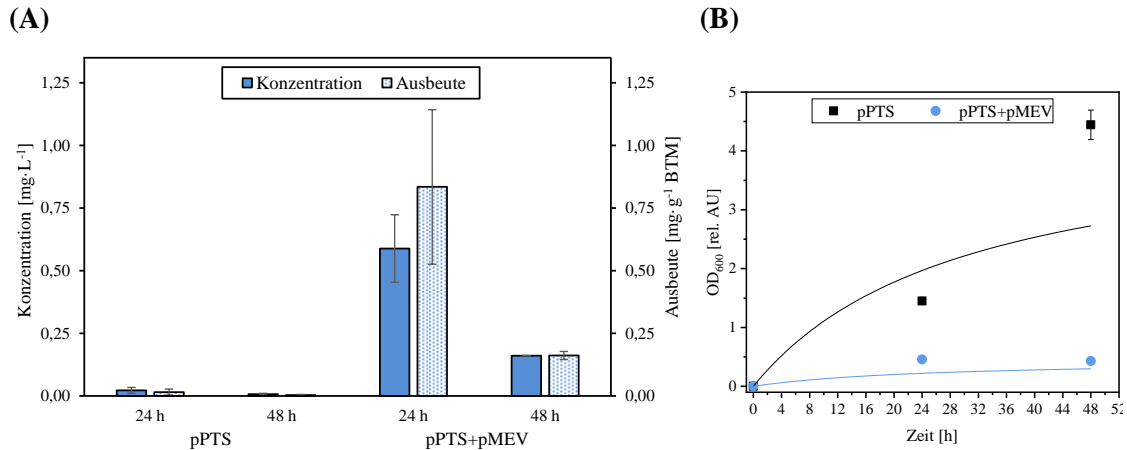


Abbildung 28: (A) Ermittelte (-)-Patchouloalkonzentration und –Ausbeute, sowie (B) gemessene OD₆₀₀-Werte bei Kultivierung der *E. coli* Stämme BL21(DE3) pPTS sowie BL21(DE3) pPTS+pMEV nach 24 und 48 h.

Wie erwartet wurde durch die Negativkontrolle, unter Verwendung der nativen *E,E*-FPP aus dem endogenen MEP-Stoffwechsel, nur eine geringe Menge (-)-Patchoulool gebildet. Mit dem pathway-optimierten *E. coli* BL21(DE3) pPTS+pMEV-Stamm wurde die Sesquiterpenproduktion erheblich erhöht. Die (-)-Patchouloalkonzentration bei dem *E. coli* pPTS+pMEV-Stamm war nach 24 h und 48 h um etwa 96 % höher. Auf dem Gaschromatogramm wurde unter anderem Farnesol detektiert. Farnesol ist das Resultat der zelleigenen Hydrolyse des über den rekombinanten MEV-Stoffwechsel in Überschuss produzierten *E,E*-FPPs durch endogene Phosphatasen [111]. Über die heterologe Produktion des Patchouliöls im pathway-optimierten *E. coli* Stamm wurde nach 24 h eine (-)-Patchouloalkonzentration von 0,59 mg·L⁻¹ ermittelt. Bezogen auf die produzierte Biomasse entspricht das einer Ausbeute von 0,83 mg·g⁻¹ BTM. Bei Betrachtung des Zellwachstums über die gemessene OD₆₀₀ (siehe Abbildung 28 (B)) wird deutlich, dass die Zelldichte aufgrund der metabolischen Belastung durch die Überexpression mehrerer heterologer Gene negativ beeinflusst wird. Eine solche Wachstumshemmung wurde in der Literatur schon in anderen pathway-optimierten *E. coli* Stämmen wie z.B. zur Produktion von (+)-Zizaen [81] beobachtet. Zudem kann das verwendete Lösemittel Isooctan eine toxische Wirkung auf die Zellen haben. In Abbildung 29 ist die SDS-PAGE-Analyse dargestellt.

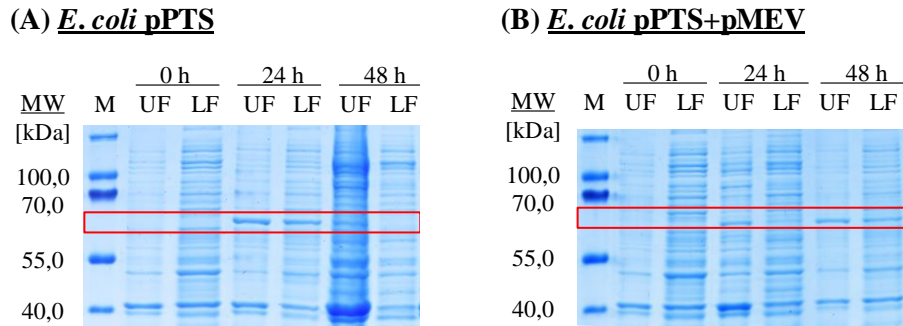


Abbildung 29: SDS-PAGE-Analyse der Kultivierung mit dem (A) *E. coli* pPTS-Stamm als Negativkontrolle und dem (B) pathway-optimierten *E. coli* pPTS+pMEV-Stamm nach 0 h, 24 h und 48 h; 6%iges Sammelgel und 12%iges Trenngel mit Coomassiefärbung; MW = Molekulargewicht in kDa, M = Größenstandard, UF = Unlösliche Fraktion, LF = Lösliche Fraktion. Die Laufhöhe der PTS-Bande ist umrandet.

Bei der Negativkontrolle (*E. coli* pPTS) konnte eine größere Menge an PTS produziert werden als bei dem *E. coli* pPTS+pMEV-Stamm. Dies kann damit begründet werden, dass bei dem *E. coli* pPTS-Stamm ein Ungleichgewicht zwischen der zelleigenen PTS- und *E,E*-FPP-Produktion vorliegt. Dabei ist die *E,E*-FPP-Konzentration in der Zelle der limitierende Faktor. Zur Identifizierung des *in vivo* produzierten Patchouliöls wurde das kommerziell erhältliche, pflanzliche Patchouliöl als Standard mitgemessen.

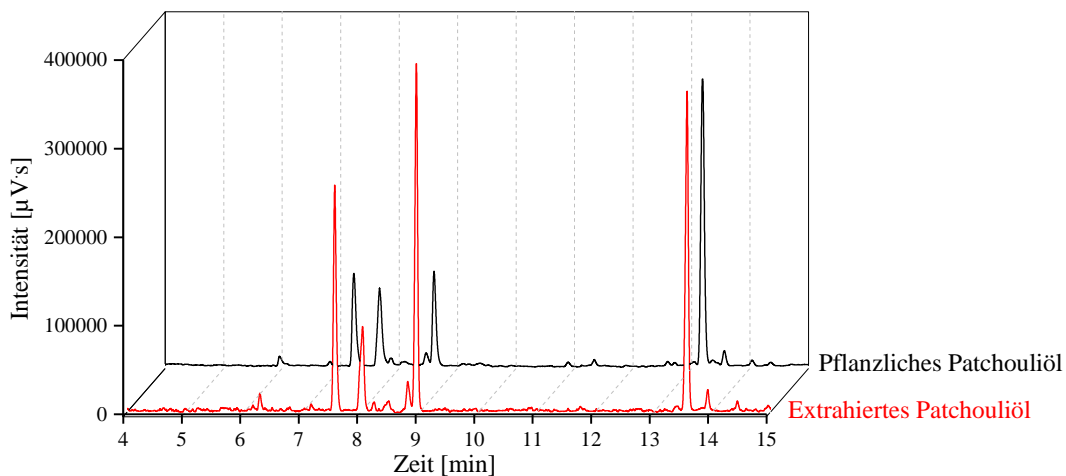


Abbildung 30: Gaschromatogramme des kommerziellen sowie des über Ganzzellkatalyse durch Kultivierung des BL21(DE3) pPTS+pMEV-Stammes über 24 h produzierten Patchouliöls.

Das über den *E. coli* pPTS+pMEV erzeugte Patchouliöl zeigte ein ähnliches Terpenprofil wie das kommerziell erhältliche Patchouliöl aus der indischen Patchoulipflanze. Über die Gaschromatogramme konnten die charakteristischen Peaks des Patchouliöls (siehe Tabelle 1) identifiziert werden. Im Vergleich wurde jedoch bei dem aus *E. coli* pPTS+pMEV stammenden Guaia-5,11-dien

und α -Bulnesen eine Verschiebung des Produktverhältnisses in Richtung Guaia-5,11-dien beobachtet. Wird der Reaktionsmechanismus in Abbildung 22 betrachtet, so wird klar, dass die Produktbildung durch den metabolisch optimierten *E. coli* pPTS+pMEV Stamm in Richtung (-)-Patchoulol verschoben werden konnte. Offenbar wurde die Hydroxylierungsreaktion zu (-)-Patchoulol bei der in vivo Produktion begünstigt. Zur Aufklärung des Mechanismus sind weitere Untersuchungen notwendig.

Die höchste (-)-Patchoulolausbeute konnte bis zu 24 h Kultivierung beobachtet werden. Daher wurden folgende Kultivierungen zur Optimierung des Stammes und der Kultivierungsparameter nach 24 h gestoppt. Über dieses Experiment wurde nachgewiesen, dass mit dem pathway-optimierten Stamm eine deutlich höhere Konzentration an (-)-Patchoulol gebildet werden konnte. Die erhöhte Substratkonzentration in der Wirtszelle führte somit zur Steigerung der Produktivität.

4.3.1.1 Einfluss verschiedener Stämme

Zur weiteren Optimierung des Ganzzellkatalysesystems wurden vier *E. coli* Expressionsstämme evaluiert, um ihre Auswirkung auf die in vivo (-)-Patchoulolproduktion zu bewerten. Für die Kointegration mit den Plasmiden pPTS und pMEV wurden die *E. coli* Stämme BL21(DE3), SHuffle T7 Express, SHuffle T7 Express lysY und Tuner(DE3) verwendet (Methoden siehe Kapitel 7.1). Die Spezifikationen der verwendeten Stämme sind in Tabelle 9 zu finden. Die SHuffle-basierten Stämme besitzen durch das vorhandene Oxidoreduktase-Chaperon DsbC die Eigenschaft Proteine mit Disulfidbrücken in hohen Ausbeuten zu exprimieren [112]. Mit der SHuffle T7 lysY Variante sollte laut Herstellerangaben die basale Expression toxischer Gene durch Lysozym verringert werden.

Die gewählten *E. coli* Stämme wurden unter gleichen Bedingungen im Schüttelkolben kultiviert (Vorschrift siehe Kapitel 7.3.2). Die Vorkultur wurde im LB-Medium und die Hauptkultur im M9-Medium durchgeführt. Die Sesquiterpene wurden über die Flüssigphasen-Extraktion durch Überschichtung der Kultur mit 10 % (v/v) Isooctan isoliert. Die Proteinexpression erfolgte bei 20 °C und 180 rpm über 24 h. Mittels GC-FID-Analysen (Methode siehe Kapitel 7.5.9) und den ermittelten BTM wurden die erreichten (-)-Patchoulolkonzentrationen und -ausbeuten der unterschiedlichen Expressionsstämme miteinander verglichen.

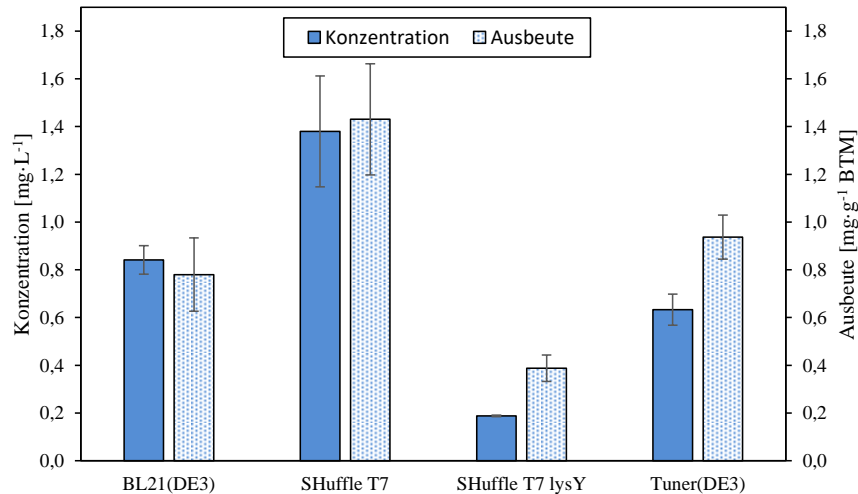


Abbildung 31: (-)-Patchoulolekonzentration und -ausbeute der *E. coli* Stämme BL21(DE3) pPTS+pMEV, SHuffle T7 pPTS+pMEV, SHuffle T7 lysY pPTS+pMEV und Tuner(DE3) pPTS+pMEV nach 24 h Kultivierung im DA-Medium unter optimierten Kultivierungsbedingungen.

Zwischen dem BL21- und den SHuffle-basierten Stämmen wurde ein großer Unterschied in den (-)-Patchouloleausbeuten festgestellt. Die höchste (-)-Patchoulolekonzentration und -ausbeute wurde mit dem SHuffle T7 Stamm erreicht. Mit $1,38 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ war die (-)-Patchoulolekonzentration des SHuffle T7 Stammes um etwa 39 % höher als beim BL21(DE3)-Stamm. Dagegen wurde etwa 78 % weniger (-)-Patchoulole mit dem SHuffle T7 lysY produziert als mit dem BL21-basierten Stamm. Ähnliche Ergebnisse wurden bei den Ausbeuten ermittelt. Die (-)-Patchouloleausbeute bei dem BL21(DE3) und dem Tuner(DE3) unterschieden sich nur um etwa 17 %. Diese Ergebnisse veranschaulichen, dass mit den Stämmen, bei denen das Zellwachstum am höchsten war, weniger rekombinantes, lösliches Protein zur Terpenbildung exprimiert wurde. Bei dem SHuffle T7 Stamm konnte ein positiver Effekt der disulfidbindenden Chaperone beobachtet werden. Mit dem SHuffle T7 Stamm konnte die (-)-Patchouloleausbeute im Vergleich zum zuvor verwendeten BL21(DE3)-Stamm um etwa das Zweifache erhöht werden. Für die nächsten Optimierungsversuche wurde daher der *E. coli* SHuffle T7 Stamm mit den Plasmiden pPTS und pMEV verwendet.

4.3.1.2 Einfluss des pH-Wertes und der Temperatur

Die heterologe Expression von nativen Proteinen kann durch kritische Faktoren wie die Proteinaggregation oder die Proteolyse beeinflusst werden. Diese Faktoren sind unter anderem durch die Wachstumstemperatur beeinflussbar [113]. Zudem ist das katalytische Potential von Enzymen, wie bereits in Kapitel 4.2.2.1 behandelt, temperatur- und pH-abhängig. Zur weiteren Optimierung der Kultivierungsbedingungen wurden die Temperatur während der Expression und der pH-Wert des definierten M9-Mediums über eine mehrfaktorielle statistische Versuchsplanung

(DoE) untersucht. Mittels eines DoEs können viele Zusammenhänge zwischen Einflussparametern eines Prozesses mit einem möglichst geringen Versuchsaufwand getestet werden. Dafür wurde ein 2^2 faktorielles Design mit zwei Einflussfaktoren, jeweils zwei Stufen und einem zentralen Punkt verwendet (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: DoE der Temperatur und des pH-Wertes des Mediums während der Expression mit $T = 20\text{ °C}$ und $\text{pH } 6,75$ als zentraler Punkt (drei Wiederholungen).

Experiment	Temperatur [°C]	pH-Wert
E1	16	6,0
E2	16	7,5
E3	20	6,75
E4	24	6,0
E5	24	7,5

In der Testreihe wurde die (-)-Patchoulokonkonzentration und -ausbeute in einem Temperaturbereich zwischen $16 - 24\text{ °C}$ ab der Induktion sowie in einem pH-Bereich zwischen $\text{pH } 6 - \text{pH } 7,5$ des M9-Mediums untersucht. Die Kultivierung des *E. coli* SHuffle T7 pPTS+pMEV-Stammes erfolgte im Schüttelkolbenmaßstab im definierten M9-Medium (Vorschrift siehe Kapitel 7.3.2). Die Kultur wurde mit IPTG auf eine Endkonzentration von $0,5\text{ mM}$ induziert und unmittelbar nach der Induktion mit 10% (v/v) Isooctan überschichtet. Die Kulturen wurden jeweils für 24 h bei 180 rpm inkubiert.

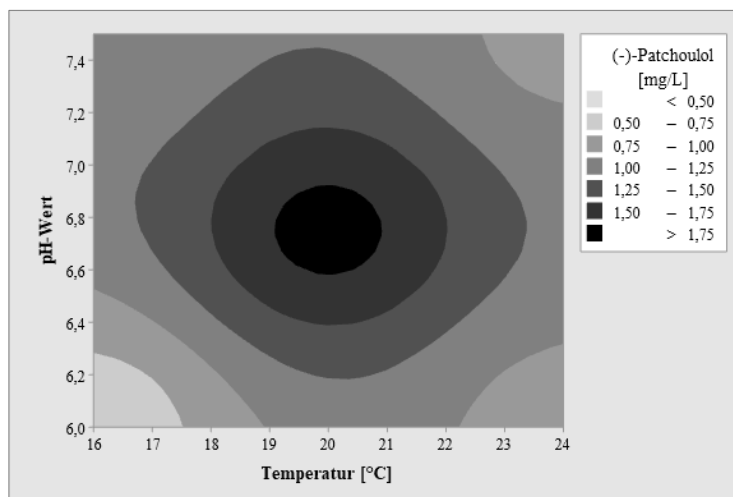


Abbildung 32: DoE der Optimierung der Temperatur während der Expression und des pH-Wertes des Mediums.

Die Auswertung der ermittelten DoE-Werte über Minitab Statistical Software (Minitab, Inc., USA) ergab eine optimale (-)-Patchouloolkonzentration zwischen 19 und 21 °C sowie zwischen pH 6,6 und pH 6,9. Die DoE-Experimente zeigten, dass die (-)-Patchouloolbildung von der Temperatur und dem pH-Wert des Mediums nahezu gleichermaßen beeinflusst werden. In dieser Versuchsreihe konnte eine maximale (-)-Patchouloolkonzentration von 1,84 mg·L⁻¹ und die höchste (-)-Patchouloolausbeute von 1,99 mg·g⁻¹ BTM bei 20 °C und pH 6,75 erzielt werden. Zur Untersuchung der Proteinproduktion wurden normierte Proben vor und nach 24 h Kultivierung entnommen (Vorschrift siehe Kapitel 7.3.2) und über SDS-PAGE analysiert (siehe Abbildung 33).

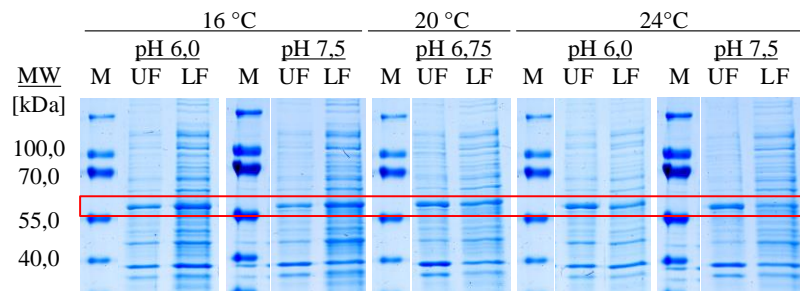


Abbildung 33: SDS-PAGE-Analyse des DoEs zur Optimierung der Wachstumstemperatur und des pH-Wertes des Mediums; 6%iges Sammelgel und 12%iges Trenngel mit Coomassiefärbung; MW = Molekulargewicht in kDa, M = Größenstandard, UF = Unlösliche Fraktion, LF = Lösliche Fraktion. Die Laufhöhe der PTS-Bande ist umrandet. Zur übersichtlichen Darstellung wurden die Banden zusammengeschnitten.

Bei den Kulturen mit einer Induktionstemperatur von 20 °C konnte etwa die doppelte Menge an (-)-Patchoulool produziert werden. Bei Betrachtung der SDS-PAGE-Analyse wird ersichtlich, dass die Temperatur einen größeren Einfluss auf das Verhältnis der Bildung von Proteinaggregaten und der bioaktiven löslichen PTS hat. Bei niedrigen Temperaturen wie 16 °C wurde verhältnismäßig mehr lösliches Protein gebildet als bei 24 °C. Die vergleichsweise größere Menge an löslicher PTS bei 16 °C und die geringere Ausbeute im Bereich von 0,72 – 1,26 mg·g⁻¹, deutet möglicherweise auf einen gehemmten Metabolismus oder eine gehemmte Enzymaktivität hin. In Kapitel 4.2.2 zeigte die PTS die höchste Enzymaktivität bei 34 °C. Dabei stieg die (-)-Patchouloolkonzentration mit der Senkung der Temperatur. Das Gleichgewicht der Überexpression der PTS, der enzymatischen Aktivität und des Zellwachstums liegt dementsprechend bei 20 °C. Beide Ergebnisse zeigen, dass die Bildung von (-)-Patchoulool bei niedrigen Temperaturen am höchsten ist. Ähnliche Erkenntnisse konnten bei der in vivo Produktion von α -Humulen [33] und (+)-Zizaen [82] in *E. coli* ermittelt werden. Darüber hinaus wird die Wahrscheinlichkeit der Volatilisierung der gebildeten Terpene während der Kultivierung in Bioreaktoren verringert.

Das DoE veranschaulicht, dass niedrigere pH-Werte die (-)-Patchouloolproduktion beeinträchtigen können. Die Aminosäuredecarboxylasen in *E. coli* bilden Amine, die einer Versauerung entgegenwirken [114]. Dementsprechend kann die heterologe Expression von Proteinen in *E. coli* durch niedrige pH-Werte gehemmt werden. Der in vivo optimierte pH-Wert von pH 6,75 entspricht annähernd des in vitro ermittelten pH-Wertes von pH 6,4 (Vergleiche Kapitel 4.2.2). Die weiteren Optimierungsexperimente wurden bei einer Wachstumstemperatur von 20 °C und pH 6,75 durchgeführt.

4.3.1.3 Einfluss der IPTG-Konzentration

Die (-)-Patchouloolproduktion beginnt ab der Induktion der Proteinexpression mit IPTG. Laut Herstellerangaben des *E. coli* SHuffle T7-Stammes (New England Biolabs, USA) sollte bei Erreichen einer optischen Dichte von 0,4 – 0,8 rel. AU induziert werden. Zu diesem Zeitpunkt beginnt die exponentielle Wachstumsphase der *E. coli* Kultur, in der ein relativ hoher Anteil gesunder produktiver Zellen vorhanden ist. Eine zu hohe IPTG-Konzentration kann zur starken Überproduktion des rekombinanten Proteins führen. Die Ressourcen des Zellstoffwechsels für die Zellteilung sind dadurch beschränkt. So wirken hohe Induktorkonzentrationen meist inhibierend auf das Zellwachstum. In diesem Abschnitt sollte die Überexpression optimiert werden, um einen möglichst stabilen Prozess mit einer hohen Produktivität und (-)-Patchouloolkonzentration zu erhalten. Dazu wurden in einer Testreihe unterschiedliche Mengen an IPTG zum Induktionszeitpunkt zur Hauptkultur hinzugegeben.

Dafür wurde der *E. coli* Stamm SHuffle T7 pPTS+pMEV im Schüttelkolben mit Carbenicillin ($50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) und Chloramphenicol ($34 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) zur Selektion kultiviert. Es wurden die in Kapitel 4.3.1.2 optimierten Parameter verwendet. Die optimale Induktorkonzentration wurde ermittelt, indem die Hauptkulturen bei einer OD_{600} von 0,5 - 0,8 rel AU mit jeweils unterschiedlichen IPTG-Endkonzentrationen zwischen 0,1 – 1,0 mM induziert wurden. Nach der Induktion wurde die Kultur mit 10 % (v/v) Isooctan überschichtet, die Temperatur auf 20 °C gesenkt und bei 180 rpm für 24 h inkubiert (siehe Kapitel 7.3.2). Es wurden zu Beginn der Induktion sowie nach 24 h Kultivierung Proben zur Analyse der OD_{600} , BTM und der Terpenbildung entnommen. Die entnommenen Terpenproben wurden über GC-FID (Methode siehe Kapitel 7.5.9) gemessen und die (-)-Patchouloolkonzentration bestimmt. Die Ausbeute wurde hinsichtlich der ermittelten BTM berechnet. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Abbildung 34 dargestellt.

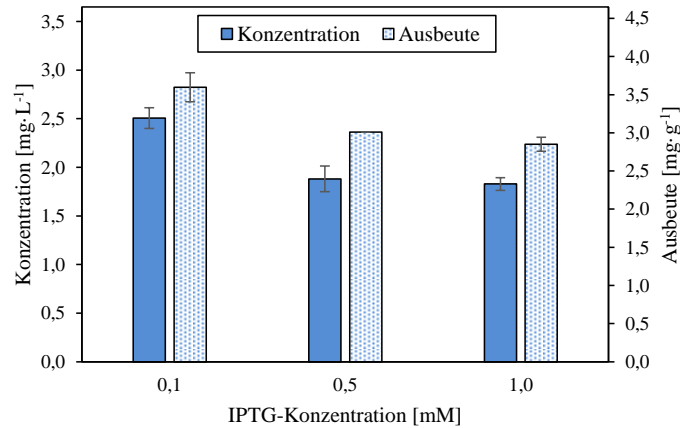


Abbildung 34: (-)-Patchoulolekonzentration und -ausbeute des *E. coli* Stamms BL21(DE3) pPTS+pMEV nach 24 h Kultivierung in Abhängigkeit von der IPTG-Konzentration.

Generell konnte ein Zusammenhang zwischen der gebildeten (-)-Patchoulolemenge und der IPTG-Konzentration festgestellt werden. Die (-)-Patchoulolekonzentration und -ausbeute sinken mit Erhöhung der IPTG-Konzentration. Bei Induktion mit 0,1 mM IPTG war die höchste (-)-Patchoulolekonzentration und -ausbeute mit $2,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ bzw. $3,6 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ zu verzeichnen. Dabei konnte mit einer IPTG-Konzentration von 0,1 mM etwa 25 – 27 % mehr (-)-Patchoulole produziert werden als mit den IPTG-Konzentrationen 0,5 mM und 1,0 mM.

Das Zellwachstum nach 24 h Kultivierung war wie in vorherigen Versuchen mit einer maximalen Wachstumsrate von $\mu_{\text{max}} = 0,09 \text{ h}^{-1}$ vergleichsweise langsam. Nach 24 h konnte in den Kulturen, die mit 0,1 mM IPTG induziert wurden, die höchste BTM mit $0,47 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ und eine OD_{600} von 0,74 rel. AU erreicht werden. Trotz des geringen Zellwachstums aufgrund der metabolischen Belastung wurden nach der Induktion mit 0,1 mM IPTG bis zu $2,51 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (-)-Patchoulole gebildet. Für die weiteren Optimierungsschritte wurden die Kulturen daher mit 0,1 mM IPTG induziert. Im Weiteren sollte der Einfluss des Nährstoffgehaltes des Mediums auf das Zellwachstum sowie auf die (-)-Patchouloleproduktion ermittelt werden.

4.3.1.4 Einfluss verschiedener Medien

Grundsätzlich enthalten Kultivierungsmedien gelöste Nährstoffe und Energiequellen, wie z.B. organische oder anorganische Kohlenstoff-, Stickstoff-, Schwefel- oder Phosphatquellen, die für den jeweiligen Organismus essentiell sind. Die Nährmedien lassen sich je nach Substratgehalt und -zusammensetzung voneinander unterscheiden. In diesem Optimierungsschritt wurden drei unterschiedliche definierte Medien eingesetzt, um den Einfluss der darin enthaltenen Substrate

auf die Produktivität der Zellen und auf die (-)-Patchoulolproduktion zu betrachten. Die entscheidenden Eigenschaften der verwendeten Medien wurden im Verhältnis zueinander in der folgenden Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Eigenschaften der getesteten Medien für die ganzzellkatalytische (-)-Patchoulolproduktion.

Eigenschaft	DA-Medium	M9-Medium	DK-Medium	TB-Medium
Nährstoffgehalt	Hoch	Gering	Hoch	Sehr hoch
Spurenelemente	Gering	-	Hoch	Gering
Magnesiumgehalt	Gering	Gering	Hoch	-

Das definierte Aparicio-Medium (DA-Medium, siehe Tabelle 17) ist ein an Rodríguez-Aparicio *et al.* [115] angelehntes nährstoffreiches Medium mit Glucose als Kohlenstoffquelle, einer vergleichsweise geringeren Menge an Spurenelementen und $0,15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$ -Ionen. Weiterhin wurde im nährstoffarmen M9-Medium (siehe Tabelle 19) und im modifizierten nährstoffreichen, definierten Korz-Medium (DK-Medium, siehe Tabelle 21) nach Korz *et al.* [116] kultiviert. Die getesteten Medien waren in der Literatur [81, 82] insbesondere aufgrund ihrer Kohlenstoffquelle zum kontrollierten Zellwachstum über eine fed-batch-Kultivierung und zum Erreichen einer relativ hohen Zelldichte geeignet. Zum Vergleich mit einem Komplexmedium wurde die Kultivierung parallel im TB-Medium durchgeführt.

Dafür wurde der *E. coli* Stamm SHuffle T7 pPTS+pMEV im Schüttelkolben kultiviert (Vorschrift siehe Kapitel 7.3.2). Die Vorkultur wurde im LB-Medium und die Hauptkultur jeweils im DA-, M9- und DK-Medium sowie im TB-Komplexmedium (pH 6,75) angesetzt. Bei einer OD_{600} von 0,5 – 0,8 rel. AU wurde die Hauptkultur mit IPTG auf eine Endkonzentration von 0,1 mM induziert und die Kultur mit 10 % (v/v) Isooctan überschichtet. Die Kulturen wurden bei 20 °C und 180 rpm über 24 h inkubiert. Die Ergebnisse der Testung verschiedener Medien sind in Abbildung 35 dargestellt.

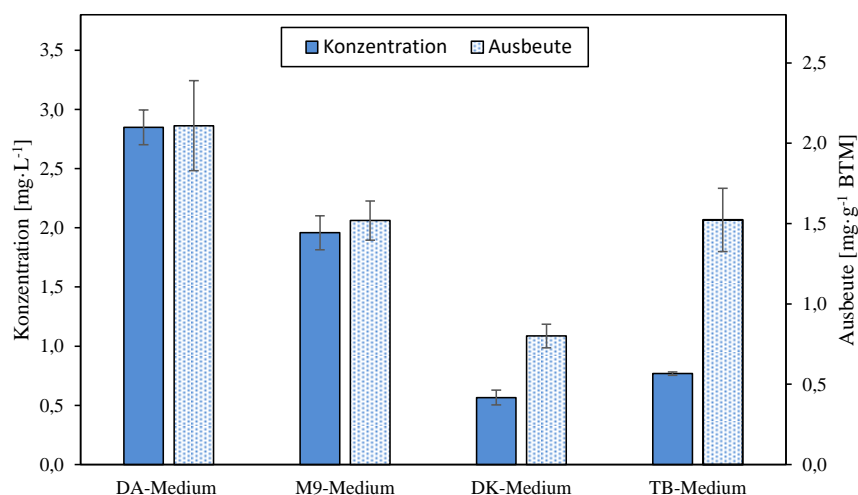


Abbildung 35: (-)-Patchouloolkonzentration und -ausbeute des *E. coli* Stamms BL21(DE3) pPTS+pMEV nach 24 h Kultivierung in den definierten Medien DA, M9 und DK, sowie in TB-Komplexmedium.

Es konnten deutliche Unterschiede zwischen den definierten Medien beobachtet werden. Die höchste (-)-Patchouloolkonzentration wurde im DA-Medium mit $2,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, gefolgt vom M9-Medium mit $1,96 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ und DK-Medium mit $0,57 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ erreicht. Demzufolge wurden im DA-Medium etwa 31 % mehr (-)-Patchoulool produziert als im M9-Medium. Diese Tendenz spiegelt sich in der (-)-Patchouloolausbeute wider. Im Vergleich zum M9-Medium wurde im DA-Medium eine 28 % höhere (-)-Patchouloolausbeute erzielt. Die (-)-Patchouloolausbeute im M9- und TB-Medium sind vergleichbar. Jedoch konnte im M9-Medium über 24 h etwa 61 % mehr (-)-Patchoulool produziert werden. Mit dem M9-Medium wurde erwartungsgemäß das geringste Zellwachstum beobachtet. Das M9-Medium ist ein Minimal-Medium mit den notwendigsten Nährstoffen für das Zellwachstum und wurde zuvor ebenfalls für die *in vivo* Produktion von (+)- δ -Cadinen, 5-*epi*-Aristolochen und Vetispiradien [79] verwendet. Das DK-Medium dagegen ist ein nährstoffreiches Medium mit einer Vielzahl an Spurenelementen. Das DA-Medium wurde in der Literatur für die Produktion von Kolominsäure in *E. coli* verwendet [115] und enthält im Vergleich zu dem zuvor verwendeten M9-Medium die 20-fache Stickstoffmenge. Das DA-Medium stellt bezogen auf das Nährstoffangebot ein Mittelmaß dieser beiden Medien dar. Aus den ermittelten Daten geht hervor, dass der Mevalonat-Metabolismus im DA-Medium vergleichsweise besser funktioniert. Im Folgenden ist die SDS-PAGE-Analyse der getesteten Medien in Abbildung 36 dargestellt. In allen verwendeten Medien wurde sowohl die unlösliche, als auch die lösliche Zellfraktion auf die nach 24 h vorhandene PTS-Menge überprüft.

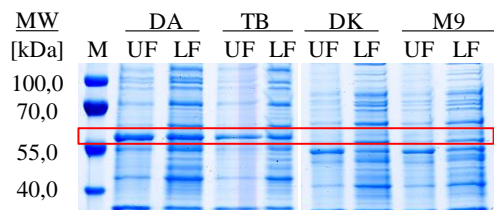


Abbildung 36: SDS-PAGE-Analyse der der Optimierung des Kulturmediums nach 24 h Kultivierung; 6%iges Sammelgel und 12%iges Trenngel mit Coomassiefärbung; MW = Molekulargewicht in kDa, Da = DA-Medium, TB = TB-Medium, DK = DK-Medium, M9 = M9-Medium, M = Größenstandard, UF = Unlösliche Fraktion, LF = Lösliche Fraktion. Die Laufhöhe der PTS-Bande ist rot umrandet. Zur übersichtlichen Darstellung wurden die Banden zusammengeschnitten.

Die Kultivierung im DA-Medium führte zu einem gleichmäßigen Verhältnis zwischen nativer und aggregierter PTS (siehe Abbildung 36). Im DA-Medium wurde etwa 20 % mehr lösliche PTS gebildet. Im Vergleich zur Kultivierung im M9-Medium war die Bandenintensität in der löslichen Fraktion um etwa 40 % höher. Im DK-Medium wurden 42 % mehr Proteinaggregate produziert. Der Grund dafür ist der mögliche Nährstoffüberschuss, der zu einer erhöhten Proteinproduktion und damit zu einer erhöhten Proteinaggregation führte. Das gleichmäßige Verhältnis der löslichen zur unlöslichen PTS war beim M9- und TB-Medium ähnlich zum DA-Medium. Es wurde etwa 20 % mehr native PTS gebildet. Jedoch konnte im DA-Medium eine um etwa 30 % höhere (-)-Patchouloalkonzentration und -ausbeute erzielt werden.

Die (-)-Patchouloalkonzentration konnte von anfangs $0,59 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ durch die Änderung der Kultivierungsbedingungen und des *E. coli* Stammes schrittweise bis auf $2,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ erhöht werden. Für eine hohe (-)-Patchouloalkonzentration sollte der *E. coli* SHuffle T7 Stamm mit den Plasmiden pPTS und pMEV im DA-Medium bei pH 6,75 und einer Wachstumstemperatur von $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ab dem Induktionszeitpunkt kultiviert werden. In den Schüttelkolbenexperimenten wurde generell, im Vergleich zu Kultivierungen mit dem BL21(DE3) pPTS Stamm, eine geringere Zellproduktivität festgestellt. Terpene mit einem Verteilungskoeffizienten *n*-Oktan/Wasser ($\log P_{O/W}$) bis zu 4 können bei *E. coli* Zellen toxisch wirken, da diese in die Zellmembran eindringen und strukturelle Veränderungen verursachen können [128]. Das (-)-Patchoulool besitzt einen $\log P_{O/W}$ von 4,4 und könnte dementsprechend eine toxische Wirkung auf die Zellproduktion haben. Ebenso ist ein zytotoxischer Effekt im Zweiphasensystem aufgrund des verwendeten Lösemittels möglich. Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte die Produktgewinnung im Schüttelkolbenmaßstab hinsichtlich der Erhöhung der (-)-Patchoulolausbeute optimiert werden. Über die in situ Extraktion mittels Adsorbentien sollte zusätzlich der Einfluss der gebildeten Terpene und des Lösemittels auf die Viabilität der Zellen überprüft werden.

4.3.2 Optimierung der in situ Produktgewinnung von (-)-Patchoulol im Schüttelkolben

Die Produktgewinnung von (-)-Patchoulol in einem ganzzellkatalytischen Bioprozess stellt aufgrund der für Terpene charakteristischen hydrophoben Eigenschaften eine große Herausforderung dar. Der Scale-Up auf Rührkesselreaktoren erfordert daher ein effizientes Downstreaming-Verfahren zur Produktgewinnung. Terpene, die eine inhibierende Wirkung auf die im Reaktor produzierenden Zellen haben oder von diesen abgebaut werden, können über die in situ Produktentfernung (ISPR) isoliert werden. Die ISPR umfasst zu der bisher verwendeten Extraktion im Zweiphasensystem auch die adsorptive Produktgewinnung. Die Flüssigphasen-Extraktion im industriellen Maßstab ist mit einigen Schwierigkeiten, wie z.B. die Flüchtigkeit des Lösemittels, verbunden [82, 117]. Dagegen bietet die Festphasen-Extraktion für den Scale-Up in Bioreaktoren einige Vorteile, wie die Wiederverwendbarkeit und Biokompatibilität der Adsorbentien. Langzeitkultivierungen stellen kein Problem dar und die Verwendung großer Mengen organischer Lösemittel sowie die Wahrscheinlichkeit der Emulsionsbildung werden verringert [82, 83, 118, 119]. Eine entscheidende Rolle für die adsorptive Gewinnung von Terpenen spielt die Auswahl des Adsorbers, der eine hohe Affinität zum gebildeten Produkt aufweisen sollte.

In diesem Abschnitt der Arbeit wurden verschiedene Methoden zur Produktgewinnung im Schüttelkolbenmaßstab miteinander verglichen. Die in situ (-)-Patchoulolgewinnung erfolgte mittels drei verschiedener Adsorbentmaterialien sowie über die Extraktion mit Isooctan zum Vergleich. Aus der Literatur ist bekannt, dass sich Adsorber mit einer Polystyrolharz-Matrix aufgrund ihrer hohen Kapazität, der guten kinetischen Leistung, Stabilität und Wiederverwendbarkeit besonders zur Adsorption von Aromastoffen eignen [120]. Der Adsorber Amberlite® 200C Na ist ein makroporöses, stark saures Kationenaustauscherharz auf einer Polystyrolmatrix. Die beiden anderen gewählten polymeren und unpolaren Adsorber Amberlite® XAD4 sowie Diaion® HP-20 wurden aufgrund ihrer Adsorptionsaffinität gegenüber hydrophober Moleküle in früheren Untersuchungen verwendet [82, 85, 94, 121].

Zur Untersuchung einer geeigneten Extraktionsmethode für (-)-Patchoulol wurde der *E. coli* Stamm SHuffle T7 pPTS+pMEV in Gegenwart von 10 % (w/v) des jeweiligen Adsorbers bzw. 10 % (v/v) Isooctan im Schüttelkolben kultiviert. Die Kultivierungen erfolgten unter den zuvor optimierten Kultivierungsbedingungen parallel zueinander. Zur Festphasen-Extraktion wurden die vorbereiteten Adsorber (siehe Kapitel 7.3.2) zuvor in den 500 mL-Schüttelkolben autoklaviert. Die Polymerharze sind bei hohen Temperaturen von bis zu 130 °C sowie hohen Drücken stabil. Für die Flüssigphasen-Extraktion wurde das Isooctan wie in den Vorversuchen erst ab dem

Zeitpunkt der Induktion hinzugegeben. Die Hauptkultur wurde in dem definierten DA-Medium (pH 6,75) auf eine OD₆₀₀ von 0,1 rel. AU inokuliert und bei 37 °C sowie 180 rpm bis zur Induktion inkubiert. Nach Induktion wurde die Temperatur der Kultur auf 20 °C gesenkt und bei 180 rpm inkubiert. Es wurden nach 24 h Kultivierung Proben zur Analyse der OD₆₀₀, BTM und Terpenbildung entnommen. Aus den Proben zur Untersuchung der Terpenbildung wurde das ISPR sowohl im jeweiligen Adsorbentmaterial bzw. Isooctan, als auch in den Zellen sowie im zellfreien Medium untersucht. Die Proben wurden über GC-FID (wie in Kapitel 7.5.9) analysiert. Die erhaltene (-)-Patchoulolmenge wurde im Verhältnis zueinander, mit Diaion® HP-20 als Referenz, prozentual berechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 37 dargestellt.

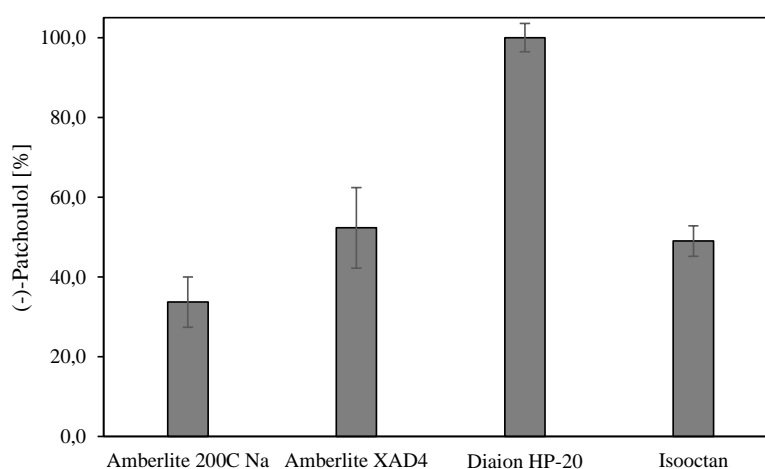


Abbildung 37: Gewonnene (-)-Patchoulolmenge mittels ISPR mit den Adsorbentmaterialien Amberlite® 200C Na, Amberlite® XAD4 und Diaion® HP-20 sowie über die Flüssigphasen-Extraktion mit Isooctan nach 24 h Kultivierung des Stammes SHuffle T7 pPTS+pMEV im prozentualen Verhältnis zueinander; die Adsorption mit Diaion® HP-20 wurde als Referenzwert verwendet.

Das ISPR mit den getesteten Adsorbentmaterialien zeigte deutliche Unterschiede in der Menge an gewonnenem (-)-Patchoulol. Über die Adsorption von (-)-Patchoulol mit dem Diaion® HP-20 wurde die höchste Menge an (-)-Patchoulol erreicht. Mit dem makroporösen Kationenaustauscherharz Amberlite® 200C Na wurde dann im Vergleich die geringste (-)-Patchoulolmenge erzielt. Diese war etwa 66,3 % geringer als bei Diaion® HP-20. Im Vergleich zur Extraktion mit Isooctan konnte mit dem Diaion® HP-20 nahezu die zweifache Menge an (-)-Patchoulol isoliert werden. Zwischen der Adsorption mit Amberlite® XAD4 und der Zweiphasen-Extraktion mit Isooctan waren keine großen Unterschiede erkennbar. Bei der Adsorption mit Amberlite® XAD4 konnten etwa 48 % weniger (-)-Patchoulol gewonnen werden als mit Diaion® HP-20. Die Kultur bei der mit Isooctan

extrahiert wurde, erreichte mit 0,57 mg die geringste BTM, was auf eine gehemmte Zellproduktion hindeutet. Dieser Effekt wurde in der Literatur auch bei anderen Lösemitteln festgestellt [78]. Zudem könnte das gebildete Produkt inhibierend auf die produzierenden Zellen wirken.

Zur Veranschaulichung der Verteilung von (-)-Patchoulol in der Kultur wurden jeweils zusätzlich zur den Proben der ISPR-Analyse, weitere Proben aus der unlöslichen Fraktion (nach Zellaufschluss (siehe Kapitel 6.6.2) und Zentrifugation) sowie dem zellfreien Medium entnommen. Mittels GC-FID (Methode siehe Kapitel 7.5.9) konnte die (-)-Patchoulolmenge für jede entnommene Probe prozentual bestimmt werden. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 38 zu finden.

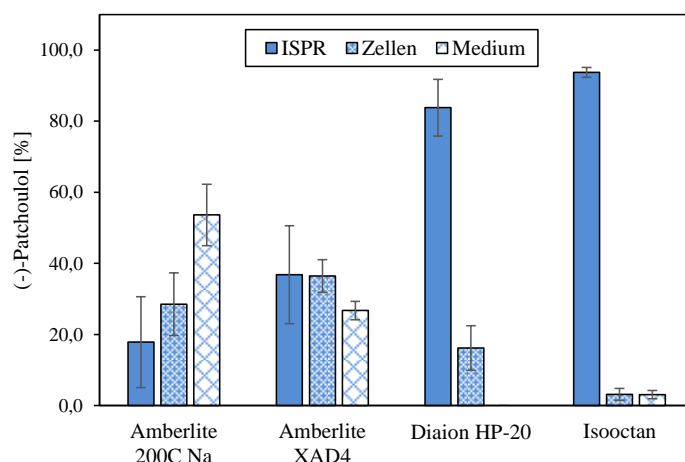


Abbildung 38: Erzielte prozentuale (-)-Patchoulolmenge aus den Adsorbentien Amberlite® 200C Na, Amberlite® XAD4 und Diaion® HP-20 bzw. Isooctan (ISPR), aus den Zellen sowie dem zellfreien Medium (Medium) nach 24 h Kultivierung des Stammes SHuffle T7 pPTS+pMEV.

Bei der Extraktion mit Isooctan befanden sich etwa 6 % des (-)-Patchoulols noch in den Zellen und im zellfreien Medium. Bei dieser Methode ist infolge des kontinuierlichen Rührens und des direkten Kontakts des Lösemittels und der gebildeten Terpene mit den Zellen die Wahrscheinlichkeit eines zytotoxischen Effekts und damit der Hemmung der Produktivität am höchsten. Bei der Kultivierung mit den Adsorbentien befanden sich die Adsorbentpartikel meist auf der Kulturoberfläche. Somit konnten auch mögliche flüchtige (-)-Patchoulolmoleküle direkt an der Kulturoberfläche adsorbiert werden. Bei der Kultivierung in Anwesenheit von Diaion® HP-20 wurde das gesamte (-)-Patchoulol aus dem Medium adsorbiert. In den Zellen ist noch etwa 16 % (-)-Patchoulol enthalten. Ein Teil des gebildeten Sesquiterpenoids akkumuliert also in den Zellen und wird nicht ins Medium abgegeben. Bei der Kultivierung in Gegenwart des Adsorbentien Amberlite® XAD4 befanden sich etwa 27 % des zu adsorbierenden (-)-Patchoulols noch im Medium. Mit dem Amberlite® 200C Na befanden sich noch etwa 54 % des zu adsorbierenden (-)-Patchoulols im Medium.

Adsorptionsmittel besitzen unterschiedliche Eigenschaften, die den Sorptionsmechanismus beeinflussen können. Die Kapazität der Adsorber wird durch die Vielzahl gelöster Stoffe in einer Kultur beeinflusst. Die gelösten Stoffe konkurrieren um die Sorptionsstellen an der Oberfläche des Adsorbers [122, 123]. Weiterhin kann eine große Oberfläche von makroporösen Harzen zur Bildung eines Biofilms und zum Zellbewuchs führen [122–125]. Das Amberlite® XAD4 ist ein unpolares Adsorptionsmittel, bestehend aus einem nicht-ionischen makroretikulären Styrol-Divinylbenzol-Harz. Das Diaion® HP-20 besteht ebenfalls aus dem unpolaren Copolymer Styrol-Divinylbenzol-Adsorptionsharz. Jedoch unterscheiden sich die Adsorber sowohl in der Porengröße als auch in der Oberfläche. Das Amberlite® XAD4 besitzt eine mittlere Porengröße von etwa 100 Å mit einer Oberfläche von 750 m²·g⁻¹ Adsorber. Dagegen hat das Diaion® HP-20 eine mittlere Porengröße von etwa 260 Å und eine Oberfläche von 500 m²·g⁻¹ Adsorber. Demnach wird aufgrund der kleineren Poren von Amberlite® XAD4 insgesamt weniger (-)-Patchoulol in den Poren aufgenommen. Die These wird durch andere Untersuchungen aus der Literatur wie z. B. der Adsorption von (+)-Zizaen [82] unterstützt. Die Poren des Adsorbers sind nach einer bestimmten Kultivierungszeit gesättigt und die Porenwände mit der maximalen Anzahl an Terpenmolekülen belegt. Anhand dieser Versuchsreihe wurde eine effektive Isolierung von (-)-Patchoulol mittels der Festphasen-Extraktion über den Adsorber Diaion® HP-20 mit einer Ausbeute von 83,8 % ermittelt.

4.3.3 In vivo Produktion und in situ Gewinnung von (-)-Patchoulol im Bioreaktor

Eine Kultivierung im Bioreaktor bietet den Vorteil, dass bestimmte Faktoren, die beim Zellwachstum eine wesentliche Rolle spielen, steuerbar oder kontrollierbar sind. Dazu gehören unter anderem die Temperatur, der pH-Wert oder die Sauerstoffzufuhr. Der in den Kapiteln 4.3.1 und 4.3.2 optimierte Bioprozess zur in vivo Produktion und in situ Isolierung von (-)-Patchoulol wurde auf den Maßstab von 2 L-Rührkesselreaktoren skaliert.

Eine in situ Produktgewinnung über Flüssigphasen-Extraktion ist nach Henke *et al.* nur über 5 h Kultivierungszeit sinnvoll [63]. Das Zellwachstum ist durch den direkten Kontakt des Lösemittels mit den Zellen gehemmt. Weiterhin stellt die Flüssigphasen-Extraktion angesichts der Flüchtigkeit des Lösemittels im industriellen Maßstab eine große Herausforderung dar [82, 83, 126]. Eine Alternative dazu ist die direkte Adsorption der gebildeten Terpene mittels eines geeigneten Adsorbers. Bei der in situ Gewinnung von (-)-Patchoulol im Schüttelkolbenmaßstab (Vorschrift siehe Kapitel 4.3.2) wurden mit dem Adsorber Diaion® HP-20 optimale Ergebnisse erzielt.

In einer fed-batch-Kultivierung, bei der Glucose kontinuierlich zugeführt wurde, konnte das (-)-Patchoulol im 2 L-Bioreaktor mittels Diaion® HP-20 in situ adsorbiert und extrahiert werden. Die fed-batch-Kultivierung ermöglicht eine Hochzelldichtekultivierung (HCDC), bei der in einem kleinen Kulturvolumen eine hohe Zellproduktion erzeugt wird [127]. Diese Kultivierungsmethode wird insbesondere für anspruchsvolle industrielle Bioprozesse eingesetzt.

4.3.3.1 Fed-batch-Kultivierung im 2 L-Bioreaktor

Der in Kapitel 4.3.1 entwickelte und optimierte Bioprozess zur in vivo Produktion sowie die in Kapitel 4.3.2 optimierte in situ Isolierung von (-)-Patchoulol wurde im Bioreaktormaßstab durchgeführt (Vorschrift siehe Kapitel 7.3.3). Der *E. coli* SHuffle T7 pPTS+pMEV-Stamm wurde über einen fed-batch-Prozess kultiviert. Das Ziel dieses Upscalings war unter anderem die Erhöhung der Zellproduktion und damit die Steigerung der (-)-Patchoulolproduktion.

Für die fed-batch-Kultivierung im 2 L-Bioreaktor (Biostat® A, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) wurden 1,5 L DA-Medium verwendet. In den Vorversuchen wurde bei pH 6,75 die höchste (-)-Patchoulolkonzentration ermittelt. Dementsprechend wurde der pH-Wert konstant auf pH 6,75 eingestellt. Der Bioreaktor wurde mit 1 vvm Druckluft begast und durch die erhöhte Rührergeschwindigkeit ein minimaler pO_2 von 30 % eingestellt. Für die in situ Produktgewinnung wurde der Adsorber Diaion® HP-20 verwendet. Die vorbereiteten Adsorberpartikel wurden mit dem DA-Medium im Bioreaktor autoklaviert. Es wurde eine Adsorberkonzentration von

50 g·L⁻¹ Kulturmedium verwendet. Höhere Konzentrationen führten in Vorversuchen zu Durchmischungsproblemen und Messstörungen. Eine schematische Darstellung der fed-batch-Kultivierung ist in Abbildung 39 dargestellt.

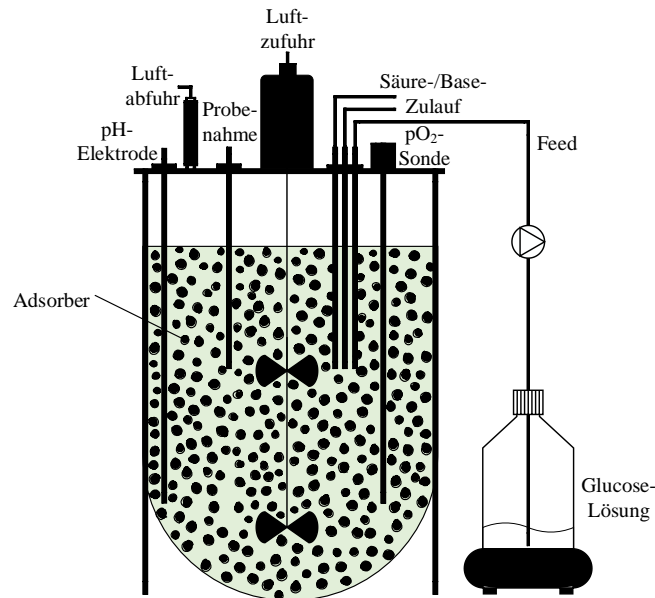


Abbildung 39: Schematische Darstellung der Bioreaktor-Konfiguration zur in situ Gewinnung von (-)-Patchoulol über Adsorberpartikel.

Dabei sind die Adsorber während der Kultivierung in direktem Kontakt zu den Zellen und den gebildeten Terpenen. Mit der internen (-)-Patchouloladsorption sollte somit eine erhöhte Adsorptionsgeschwindigkeit möglich sein. Weiterhin kann die Wahrscheinlichkeit einer möglichen mikrobiologischen Produktdegradierung minimiert werden.

Die Hauptkultur wurde mit der zweiten Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 rel. AU inokuliert. Die für den *E. coli* SHuffle T7 Stamm optimale Wachstumstemperatur beträgt 32 °C. Somit wurde die Hauptkultur bis zur Induktion bei 32 °C inkubiert. Bei eingesetztem Glucoseverbrauch nach etwa 12 h wurde die fed-batch-Phase eingeleitet. Dabei wurde die Temperatur auf 20 °C erniedrigt und eine Feedlösung (siehe Tabelle 24) kontinuierlich zugeführt. Die Proteinexpression wurde nach Erreichen von 20 °C bei einer OD₆₀₀ von etwa 4,0 – 5,0 rel AU durch Zugabe von 0,1 mM IPTG gestartet. Aufgrund der niedrigen Wachstumstemperatur von 20 °C wurde die Wahrscheinlichkeit der Terpenverflüchtigung sowie die Bildung von inclusion bodies verringert. Während der Kultivierung wurden Proben zur analytischen Untersuchung der OD₆₀₀, BTM, Glycerin-Konzentration sowie der Terpenbildung entnommen. Der Verlauf der Kultivierung ist in Abbildung 40 dargestellt.

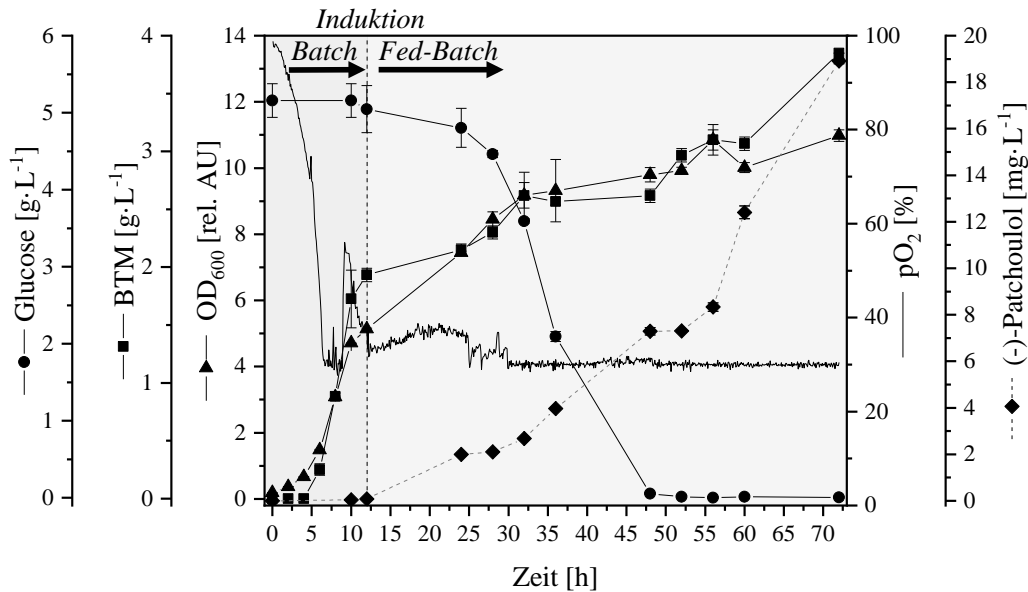


Abbildung 40: Fed-batch-Kultivierung von *E. coli* SHuffle T7 pPTS+pMEV im DA-Medium in einem 2 L-Bioreaktor und die ISPR über Adsorption mittels Diaion® HP-20. Die Glucosekonzentration, BTM, optische Dichte, PatchouloleKonzentration sowie der pO₂ sind in Abhängigkeit der Zeit dargestellt. Der Induktionszeitpunkt ist über eine senkrechte, gestrichelte Linie zu erkennen.

Im gesamten Verlauf konnte ein Anstieg des Zellwachstums sowie der (-)-PatchouloleKonzentration beobachtet werden. Anhand der Pearson-Korrelation konnte mit einem positiven Korrelationskoeffizienten von 0,94 ein Zusammenhang zwischen beiden Größen beobachtet werden. Das Zellwachstum im Bioreaktor war, verglichen zur ISPR mittels Diaion® HP-20 im Schüttelkolbenmaßstab (siehe Kapitel 4.3.2), nach 24 h um das 3,8-fache höher. Jedoch wurde ab dem Zeitpunkt der Induktion ein verlangsamtes Zellwachstum beobachtet. Die Zelldichte wurde ab der Induktion bis zur Beendigung der Kultivierung nach 72 h nur um das 2,3-fache erhöht. Dieser Effekt wurde schon bei den Kultivierungen im Schüttelkolbenmaßstab beobachtet. Die Ursache der gehemmten Produktivität liegt möglicherweise in der metabolischen Belastung durch die kombinierte Überexpression von *E,E*-FPP und PTS. Eine Produktdegradierung konnte nicht beobachtet werden. Durch die unmittelbare Adsorption der Sesquiterpene aus den Zellen wurde ein mikrobiologischer Produktabbau verhindert. Nach 72 h wurde eine maximale (-)-PatchouloleKonzentration von 18,9 mg·L⁻¹ bei einer OD₆₀₀ von 11,0 rel. AU sowie einer BTM von 3,8 g·L⁻¹ erreicht.

Zur Bestimmung der Gesamtkonzentration wurde sowohl die an den Adsorberpartikeln gebundene (-)-Patchoulolemenge, als auch die in den Zellen (nach Zellaufschluss über Ultraschalllyse (siehe Kapitel 7.4.1) und Zentrifugation) sowie in dem zellfreien Medium befindliche (-)-Patchoulolemenge bestimmt. Die Proben wurden nach dreifacher Extraktion mit Isooctan über

GC-FID (Methode siehe Kapitel 7.5.9) gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 41 dargestellt.

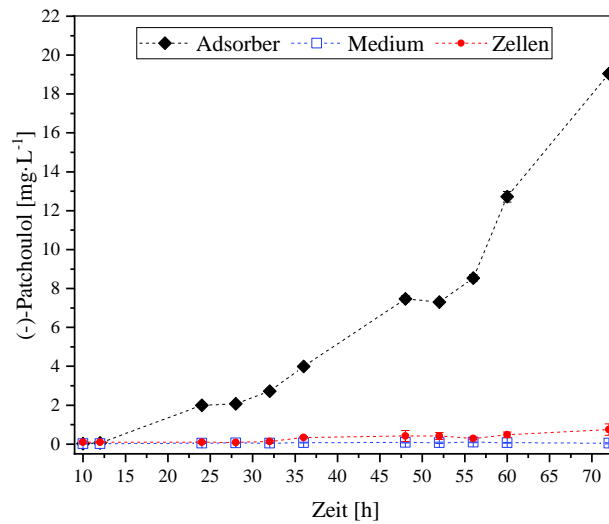


Abbildung 41: Erzielte (-)-Patchouloalkonzentration, aus einer 2 L fed-batch-Kultivierung des Stammes SHuffle T7 pPTS+pMEV über 72 h Kultivierung, durch Adsorption mittels Diaion® HP-20 (ISPR), aus den Zellen sowie dem zellfreien Medium (Medium).

Eine Analyse der (-)-Patchouloalkonzentration in den Zellen und im zellfreien Medium (siehe Abbildung 41) zeigte, dass annähernd 96 % des gebildeten (-)-Patchoulools nach 72 h Kultivierung mittels Adsorption gewonnen werden konnten. Die (-)-Patchoulolausbeute im Medium lag bei 2,2 % und in den Zellen bei 3,8 %. Verglichen zur Kultivierung im Schüttelkolben konnte nach 24 h etwa 15 % mehr (-)-Patchoulool gewonnen werden. Ein möglicher Grund dafür könnte die stärkere und somit homogene Durchmischung im Bioreaktor, im Vergleich zur Orbitalrührung im Schüttelkolben, sein.

Die aus den Adsorberpartikeln extrahierten Produkte wurden gaschromatographisch und massenspektrometrisch (GC-FID und GC-MS) analysiert. Die GC-MS-Messung wurde an einem 7890B Gaschromatographen, mit einem daran gekoppelten 5977 Massenionisationsdetektor, der Firma Agilent Technologies durchgeführt. Dafür wurde die Agilent VF-WAXms Kapillarsäule mit der Filmdicke von 0,25 μm , der Länge von 30 m und der Breite von 0,25 mm verwendet. Als Trägergas wurde Helium mit einer Flussrate von 1,2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ verwendet. In Abbildung 42 sind die Gaschromatogramme sowie MS-Analysen des in vivo produzierten und des kommerziell erhältlichen Patchouliöls zu sehen.

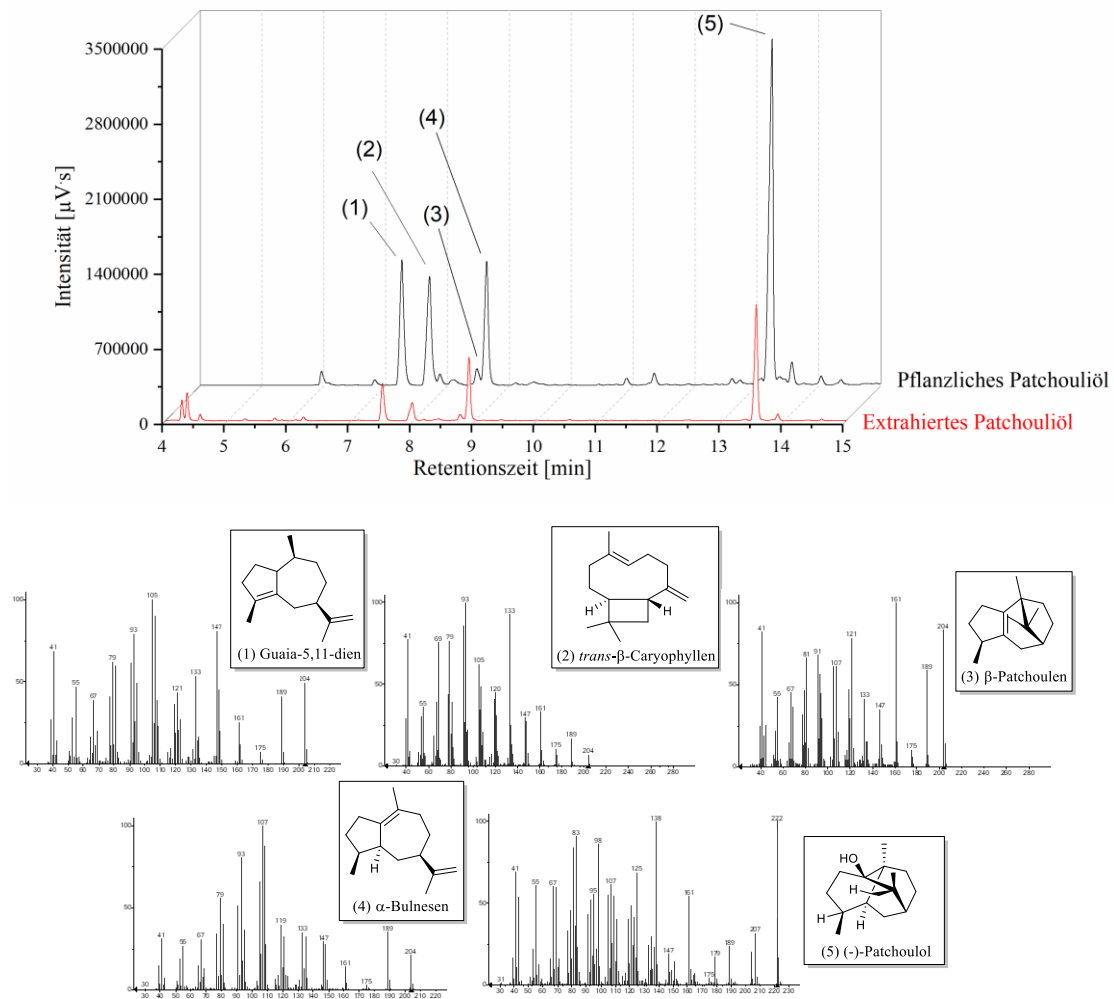


Abbildung 42: Gaschromatogramme des (A) über ISPR extrahierten Patchouliöls und (B) kommerziell erhältlichen Patchouliöls; MS-Analysen der Hauptprodukte 1-5 von Patchouliöl.

Beide Gaschromatogramme zeigen die fünf Hauptkomponenten des Patchouliöls. Diese bestehen aus (-)-Patchouliol (RI = 1546), α -Bulnesen (RI = 1392), Guaia-5,11-dien (RI = 1370), *trans*- β -Caryophyllen (RI = 1395) und β -Patchoulen (RI = 1422). Beim extrahierten Patchouliöl konnte schon während der Kultivierung sowie nach der Extraktion der charakteristische Patchouliogeruch wahrgenommen werden. Dieser olfaktorische Faktor ist nur bei dem (-)-Enantiomer des Patchoulialkohols zu finden [43, 98]. Somit kann davon ausgegangen werden, dass (-)-Patchouliol produziert wurde.

Werden die Gaschromatogramme in Abbildung 42 miteinander verglichen, können unterschiedliche Produktverhältnisse festgestellt werden. Diese Variation ist vor allem bei den Produkten α -Bulnesen und *trans*- β -Caryophyllen zu sehen. In dem biotechnologisch produzierten Patchouliöl (Chromatogramm A) ist α -Bulnesen mit einem Anteil von 25,7 % und *trans*- β -Caryophyllen

mit einem Anteil von etwa 9,4 % enthalten. Dagegen enthält das kommerziell erhältliche Patchouliöl etwa 16,9 % α -Bulnesen und 17 % *trans*- β -Caryophyllen. Bei der Optimierung der Kultivierungsbedingungen wurde der Fokus auf die Produktion von (-)-Patchoulol gelegt. Wie aus Abbildung 23 entnommen werden kann, wird *trans*- β -Caryophyllen über eine 1,11-Ringschlussreaktion gebildet. Die Bildung der anderen Hauptprodukte erfolgt durch eine 1,10-Ringschlussreaktion. Somit kann durch Veränderung der Kultivierungsbedingungen eine Variation der Sesquiterpenverhältnisse stattfinden.

Ein Vergleich der Gaschromatogramme in Abbildung 30 und Abbildung 42 zeigt, dass zu Beginn der Optimierungsexperimente im Schüttelkolben der Anteil an α -Bulnesen höher als der des (-)-Patchoulols war. So war in dem extrahierten Patchouliöl zu Beginn der Optimierung etwa 32,6 % α -Bulnesen und 31,1 % (-)-Patchoulol enthalten. Dieses Verhältnis konnte durch die Optimierungsschritte und einer Kultivierung im Bioreaktor in Richtung (-)-Patchoulol verschoben werden. Somit wurde im Bioreaktor ein Patchouliöl mit einem Anteil von 25,7 % α -Bulnesen und 45,5 % (-)-Patchoulol erhalten. Demnach konnte über die Optimierungsschritte ein höherer (-)-Patchoulolanteil erreicht und um etwa 14,4 % gesteigert werden.

4.3.4 Fazit

Im Fokus der Untersuchungen in Kapitel 4.3 stand die ganzzellkatalytische Produktion von Patchouliöl mit einem erhöhten Anteil an der duftgebenden Hauptkomponente des Patchouliöls, dem (-)-Patchoulol, in einem pathway-optimierten *E. coli* Stamm.

Die in vivo Produktbildung wurde schrittweise im Schüttelkolbenmaßstab optimiert. Anhand einer Vektoranalyse wurde gezeigt, dass die in vivo Produktion von (-)-Patchoulol mit dem BL21(DE3) pPTS+pMEV Stamm möglich ist. Durch Expression in unterschiedlichen Stämmen wurde herausgefunden, dass die (-)-Patchoulolausbeute im SHuffle T7 Stamm im Vergleich zum BL21(DE3)-Stamm um das Zweifache erhöht wurde. Weitere Optimierungen der Kultivierung hinsichtlich des pH-Wertes, der Temperatur, IPTG-Konzentration sowie des Kultivierungsmediums führten zur Erhöhung der (-)-Patchoulolkonzentration um etwa 51 %. Mit dem *E. coli* SHuffle T7 pPTS+pMEV Stamm konnte im DA-Medium bei pH 6,75 und einer Expressionstemperatur von 20 °C über Induktion mit 0,1 mM IPTG die höchste (-)-Patchoulolkonzentration mit 2,8 mg·L⁻¹ erreicht werden.

Die in situ Produktgewinnung stellte aufgrund der charakteristischen hydrophoben Eigenschaften eine große Herausforderung dar. Mit Hilfe des Adsorbers Diaion[®] HP-20 konnte (-)-Patchoulol mit einer Ausbeute von 83,8 % erhalten werden.

Ein Scale-Up der in vivo (-)-Patchoulolproduktion und Gewinnung im 2 L-Bioreaktor war erfolgreich. Über eine fed-batch-Kultivierung im DA-Medium bei 20 °C und pH 6,75 konnte über 72 h mittels Diaion[®] HP-20 eine maximale (-)-Patchoulolkonzentration von 18,9 mg·L⁻¹ erreicht werden. Dabei war die Zellproduktion aufgrund der metabolischen Belastung relativ gering. Es konnte eine maximale (-)-Patchoulolausbeute von 4,97 mg·g⁻¹ BTM ermittelt werden. Die (-)-Patchoulolausbeute wurde durch den integrierten Prozess auf 96 % erhöht. Weiterhin konnte der (-)-Patchoulolanteil im gewonnenen Patchouliöl durch die Optimierung des Produktionsstammes und der Kultivierungsbedingungen um 14,4 % erhöht werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche biotechnologische Strategien zur Produktion von Patchouliöl, mit besonderem Augenmerk auf die Hauptkomponente (-)-Patchoulol, verfolgt. Zum einen wurde ein in Vorarbeiten [1, 2] etabliertes biotechnologisches Verfahren zur in vitro Produktion von (-)-Patchoulol untersucht. Zum anderen erfolgte die Entwicklung, Optimierung und Etablierung eines mikrobiellen Produktionssystems zur in vivo Biosynthese von (-)-Patchoulol.

Für das biotechnologische Verfahren wurde zunächst das Schlüsselenzym PTS rekombinant in *E. coli* in einem 2 L-Bioreaktor im TB-Medium hergestellt. Die PTS ist eine promiskuitive Sesquiterpensynthase, die in einer Reaktion mit dem natürlichen Sesquiterpenvorläufer *E,E*-FPP mehr als 20 Produkte bilden kann. Die kultivierte PTS verfügte über einen intramolekularen polyHis-Tag und konnte über immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Das Ziel war es die PTS für die in vitro Untersuchungen mit einer möglichst hohen Reinheit und Bioaktivität zu erhalten. Dazu wurde eine HiTrapTM IMAC FF-Säule (5 mL Säulenvolumen; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Schweden) verwendet. In einer Untersuchung der Metallspezies wurden mit den Metallionen Ni²⁺ und Co²⁺ unterschiedliche Affinitäten und Selektivitäten zu dem polyHis-getagtem Enzym veranschaulicht. Die Beladung der Co²⁺-IMAC-Säule resultierte mit einer densitometrisch bestimmten Reinheit von etwa 96 %. Mit der Ni²⁺-IMAC-Säule wurde eine Reinheit von 94 % ermittelt. Jedoch zeigte die PTS eine zweifach höhere Affinität zur Ni²⁺-IMAC-Säule. Bei der Aufreinigung über eine Ni²⁺-IMAC-Säule war somit ein optimales Verhältnis zwischen Selektivität und Affinität gegeben. Das zur Elution verwendete Imidazol kann schon während der Aufreinigung eine negative Auswirkung auf die Bioaktivität haben. Weiterhin handelt es sich bei Imidazol um ein teures und umweltschädliches Material. Über einen linearen Gradienten wurde ermittelt welche maximale Imidazolkonzentration für die Elution des Zielproteins notwendig ist. Die PTS konnte schließlich über eine Zwei-Stufen-Elution aufgereinigt werden. In der ersten Stufe wurden unspezifisch gebundene Proteine mit 50 mM Imidazol abgetrennt. In einer zweiten Stufe wurde die PTS mit 250 mM Imidazol und einer Reinheit von etwa 96 % gewonnen. Im Vergleich zu den Vorarbeiten [43] wurde die Imidazolkonzentration zur Elution der PTS um 50 % verringert. Eine Lagerung des isolierten Enzyms in einem Puffer mit Imidazol kann zum Aktivitätsverlust führen. Daher war ein unmittelbarer Pufferaustausch notwendig. Dieser wurde in Vorarbeiten [43] mit Hilfe eines Zentrifugalkonzentrators über Ultrafiltration durchgeführt. Jedoch kann bei dieser Methode ein hoher Proteinverlust an der Membranwand auftreten. Mit Hilfe einer Tandem-Two-Step-Aufreinigung, über die Kopplung einer Ni²⁺-IMAC-Säule mit einer Desalting-Säule, konnte die native PTS mit 0,57 mg·g⁻¹ BFM isoliert

werden. Die isolierte PTS-Menge war im Vergleich zum Pufferaustausch mit der Ultrafiltrationseinheit doppelt so hoch. Die enzymatische Aktivität wurde über die *in vitro* Biokatalyse des natürlichen Sesquiterpenvorläufers *E,E*-FPP mit der isolierten PTS überprüft. Das dabei gebildete Terpengemisch wurde mit Isooctan extrahiert und mittels GC-FID und GC-MS analysiert. Daraus konnten die fünf Hauptkomponenten des Patchouliöls, (-)-Patchoulol, α -Bulnesen, Guaiia-5,11-dien, *trans*- β -Caryophyllen und β -Patchoulen, identifiziert werden.

Nach erfolgreicher Produktion und Isolierung der PTS wurde die Multiprodukt-Sesquiterpensynthese hinsichtlich des biokatalytischen Mechanismus umfassend charakterisiert. Dazu wurden zunächst die Reaktionsbedingungen, wie Pufferkomponenten, pH-Wert und Temperatur, für die *in vitro* Biotransformation von *E,E*-FPP durch die PTS schrittweise optimiert. Die enzymatische Umsetzung wurde in neun unterschiedlichen Puffern in einem pH-Bereich von pH 3 – 10 durchgeführt. Die dabei gebildete Patchouliölmenge wurde anhand der Konzentration der oben genannten fünf Hauptkomponenten berechnet. Bei diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Pufferkomponenten eine wesentliche Rolle bei der Produktselektivität spielen. Die Produktanteile unterschieden sich je nach Pufferkomponente. Sowohl in einem MES-Puffer mit pH 6,1, als auch in einem TEA-Puffer mit pH 8,4 wurde die höchste Menge an Patchouliöl gebildet. Die Konzentration der duftgebenden Hauptkomponente (-)-Patchoulol war im MES-Puffer am höchsten, sodass dieser Puffer für die weiteren *in vitro* Biosynthesen verwendet wurde. In Vorarbeiten [43] wurden zur Stabilität des Proteins in Lösung Pufferadditive wie NaCl und DTT verwendet. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Bioaktivität bei Abwesenheit beider Pufferadditive am höchsten ist. In einer Optimierung im Pufferbereich des MES-Puffers von pH 5,6 – 6,6 sowie im Temperaturbereich von 30 – 44 °C war die Konzentration der Hauptprodukte des Patchouliöls mit 49,5 μM bei pH 6,4 und 34 °C am höchsten. Dabei wurde eine maximale (-)-Patchoulolkonzentration von 1,86 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ erreicht. Der pH-Wert und die Temperatur hatten einen erheblichen Einfluss auf die Produktbildung. Hohe Temperaturen ab 44 °C führten z.B. dazu, dass gar kein (-)-Patchoulol mehr gebildet wurde. Dagegen wurden die Guaien-Isomere α -Bulnesen und Guaiia-5,11-dien bevorzugt gebildet. Die ermittelten kinetischen Daten, wie $K_M = 8,28 \pm 0,7 \mu\text{M}$, $v_{\text{max}} = 5,81 \pm 0,5 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$, $k_{\text{cat}} = 0,0776 \text{ s}^{-1}$ und $k_{\text{cat}}/K_M = 9.373,4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, lagen im Bereich von Literaturwerten [2]. Mit Hilfe dieser Untersuchung wurde die These aus Vorarbeiten [2, 43], dass Protonen aus dem Reaktionsmedium am biokatalytischen Mechanismus in der aktiven Tasche beteiligt sind, gestützt. Die optimierten Reaktionsbedingungen wurden genutzt, um die Substratflexibilität des vielseitigen Enzyms in einer PTS-katalysierten Umsetzung synthetisch hergestellter Sesquiterpenvorläufer zu evaluieren. Die *E,E*-FPP-Derivate waren jeweils zwischen dem

C4- und C5- bzw. C9- und C10-Atom mit Sauerstoff, Schwefel oder einem tertiären Amin funktionalisiert. Drei Vorläufermoleküle konnten in der *in vitro* Biotransformation erfolgreich umgesetzt werden. Es wurden drei neue, zum Teil komplexe Terpenstrukturen hergestellt. Anhand dieser Experimente wurde das vielseitig nutzbare katalytische Potential der PTS gezeigt. Die PTS könnte zur Synthese komplexer Intermediate für die organische Totalsynthese oder neuer terpenoider Strukturen mit potentiellen olfaktorischen Eigenschaften verwendet werden.

Im Fokus des letzten Abschnitts der vorliegenden Arbeit stand die *in vivo* Produktion von Patchouliöl bzw. des holzig riechenden (-)-Patchoulols in einem pathway-optimierten *E. coli* Stamm, sowie die *in situ* Produktgewinnung aus der Kulturbrühe. Die intrazelluläre Produktion von *E,E*-FPP wurde erhöht, indem das zuvor verwendete Plasmid pPTS (pET16b::his-FXa-PTS_i), das zur heterologen Expression der PTS genutzt wurde, mit einem weiteren IPTG-induzierbaren Plasmid pMEV (pBbA5c-MevT-MBIS), zur Codierung des synthetischen, heterologen MEV-Weges, cotransformiert wurde. Die *in vivo* Produktbildung und *in situ* Produktgewinnung wurden zunächst im Schüttelkolbenmaßstab optimiert. Eine schematische Vorgehensweise der Optimierungsversuche im Schüttelkolbenmaßstab ist in Abbildung 43 dargestellt.

	Vektor	Stamm	T, pH	IPTG	Medium	Höchste (-)-Patchoulol-konzentration
Vektor	a) pPTS b) pPTS + pMEV	BL21(DE3)	20 °C, pH 7,5	1 mM	M9-Medium	0,59 mg·L ⁻¹ 1,38 mg·L ⁻¹ 1,84 mg·L ⁻¹ 2,5 mg·L ⁻¹ 2,8 mg·L ⁻¹
Stamm	b) pPTS + pMEV	a) SHuffle T7 Expr. lysY b) Tuner c) BL21(DE3) d) SHuffle T7	20 °C, pH 7,5	1 mM	M9-Medium	
T, pH	pPTS + pMEV	SHuffle T7	a) 16 °C, pH 6,0 b) 16 °C, pH 7,5 c) 20 °C, pH 6,75 d) 24 °C, pH 6,0 e) 24 °C, pH 7,5	1 mM	M9-Medium	
IPTG	pPTS + pMEV	SHuffle T7	20 °C, pH 6,75	a) 0,1 mM b) 0,5 mM c) 1,0 mM	M9-Medium	
Medium	pPTS + pMEV	SHuffle T7	20 °C, pH 6,75	0,1 mM	a) DA-Medium b) M9-Medium c) DK-Medium d) TB-Medium	
Optimierte Bedingungen	pPTS + pMEV	SHuffle T7	20 °C, pH 6,75	0,1 mM	DA-Medium	

Abbildung 43: Optimierungsmatrix der *in vivo* Kultivierung und Produktion von (-)-Patchoulol im Schüttelkolbenmaßstab.

Der pathway-optimierte *E. coli* SHuffle T7 pPTS + pMEV Stamm wurde unter verschiedenen Bedingungen kultiviert und die (-)-Patchoulolkonzentration schrittweise bis auf $2,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ erhöht. Eine optimale (-)-Patchoulolkonzentration wurde im DA-Medium bei pH 6,75, einer Expressionstemperatur von $20 \text{ }^\circ\text{C}$ und $0,1 \text{ mM}$ IPTG zur Induktion erreicht. Die höchste erreichte (-)-Patchoulolausbeute aus einer in vivo Kultivierung in Mikroalgen (*Chlamydomonas reinhardtii*) von Lauersen *et al.* [78] lag bei $0,922 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ BTM. In *E. coli* wurde dagegen eine Ausbeute von $1,99 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ BTM ermittelt. Die Expression in dem optimierten *E. coli* Stamm war somit um 64 % produktiver als in Mikroalgen.

Die Hydrophobizität der Sesquiterpene stellten sich für die Produktgewinnung als problematisch heraus. Dafür wurden im Schüttelkolbenmaßstab unterschiedliche in situ Produktabtrennungsverfahren analysiert. Die Extraktionsmethode mittels Isooctan wurde mit der Adsorption der Sesquiterpene über Adsorbermaterialien mit unterschiedlichen Eigenschaften verglichen. Bei allen Methoden wurde festgestellt, dass ein Teil der gebildeten Sesquiterpene in den Zellen akkumuliert und nicht ins Medium abgegeben wird. Diese Effekte wurden bislang auch in der Literatur bei der in situ Gewinnung anderer Terpene wie α -Humulen [33] oder (+)-Zizaen [82] festgestellt. Möglicherweise verfügt *E. coli* über kein geeignetes Transportsystem, um die Terpene ins Medium zu transportieren. Dies kann nach einer gewissen Zeit zwangsläufig zu zytotoxischen Effekten und Produktivitätsverlust führen. Mit dem hydrophoben Adsorber Diaion[®] HP-20 konnte die höchste (-)-Patchoulolausbeute von 83 % erreicht werden. Dabei konnte das (-)-Patchoulol vollständig aus dem Medium entfernt werden. Im Vergleich zu den anderen getesteten Adsorbermaterialien hat das Diaion[®] HP-20 größere Poren. Der Effekt einer Porensättigung und Belegung der Porenwände mit den gebildeten Terpenen tritt demnach erst später auf als bei den anderen getesteten Adsorbentien.

Die Erkenntnisse aus den Optimierungsexperimenten wurden genutzt, um einen integrierten Bioproduktionsprozess zur Produktion von (-)-Patchoulol zu etablieren. Dazu wurde der pathway-optimierte SHuffle T7 pPTS + pMEV Stamm im 2 L-Bioreaktor über 72 h kultiviert. In den vorherigen Optimierungsexperimenten zeigte das Adsorbermaterial keinen negativen Einfluss auf die Viabilität und Produktivität des entwickelten Produktionsstammes. Daher wurde das Diaion[®] HP-20 mit in die Kultur gegeben, um eine möglichst große Menge der gebildeten Produkte zu adsorbieren. Mit dem Scale-Up der in vivo (-)-Patchoulolproduktion konnte die (-)-Patchoulolkonzentration auf $18,9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ erhöht werden. Die Kombination beider Genkonstrukte in einem Stamm, zur Überexpression von *E,E*-FPP und der PTS, führte zu einer metabolischen Belastung, die sich in der Hemmung der Zellproduktion äußerte. Dadurch konnte letztlich eine (-)-Patchoulolausbeute von

4,97 mg·g⁻¹ BTM über 60 h ab Induktionszeitpunkt erreicht werden. Henke *et al.* erreichten mittels Ganzzellkatalyse im *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*) durch die metabolische Optimierung des PAT3-Stammes etwa 60 mg·L⁻¹ (-)-Patchoulol über 142 h ab Induktionszeitpunkt. Die Kultivierung von Henke *et al.* erfolgte somit mehr als doppelt so lang und die Sesquiterpene wurden über ein Zweiphasensystem mittels Dodecan extrahiert. Dodecan ist ein schwer flüchtiges organisches Lösemittel und eignet sich daher zur Sesquiterpenextraktion. Im Vergleich konnte in *E. coli*, in 42 % der Kultivierungszeit von Henke *et al.*, etwa 31,5 % der Ausbeute des aus *C. glutamicum* resultierenden (-)-Patchoulols hergestellt werden. Im Bioreaktormaßstab konnte die Ausbeute von (-)-Patchoulol durch die integrierte Adsorption auf 96 % erhöht werden. Es wurde nur eine geringe Akkumulation des Sesquiterpenoids in den Zellen beobachtet. Ein Vergleich der Produktanteile des produzierten Patchouliöls vor und nach der Optimierung des Produktionsstammes zeigte, dass der (-)-Patchoulolanteil um 14,4 % erhöht werden konnte. Zudem nahm der Anteil an α -Bulnesen um 6,7 % ab. Schließlich konnte über die mikrobielle Biosynthese in *E. coli* als Produktionsstamm, ein Patchouliöl mit einem Produktanteil von 45,5 % (-)-Patchoulol erfolgreich gewonnen werden.

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Aspekte der biotechnologischen Darstellung von Sesquiterpenen sowie Sesquiterpensynthesen veranschaulicht. Die mikrobiell produzierte Patchoulolsynthese eignete sich mit seiner strukturellen Variabilität sowohl zur Produktion von Patchouliöl als auch als Biokatalysator zur Produktion anderer komplexer terpenoider Strukturen. Dementsprechend wären Umsetzungen weiterer synthetisch hergestellter Vorläufermoleküle, wie sie von Oberhauser *et al.* [95] durchgeführt wurden, zur Produktion unbekannter Terpene mit möglichen olfaktorischen Eigenschaften interessant. Weiterhin könnten verschiedene Einflussfaktoren, wie Pufferkomponenten, pH-Wert und Temperatur, einen positiven Effekt auf die enzymatische Reaktion mit den alternativen Substraten haben. Zur Vervollständigung der NMR-basierten Vorarbeiten [43] sind zudem eine Homologiemodellierung der PTS sowie weitere Deuterierungsversuche zu den Reaktionsmechanismen der anderen Hauptprodukte unerlässlich. Vorwiegend wurden jedoch alternative biotechnologische Methoden zur konventionellen Herstellung von Patchouliöl aufgezeigt. Die mikrobielle *in vivo* Produktion von Patchouliöl über des in dieser Arbeit konstruierten Multiplasmid-Stammes bedarf weiterer Optimierungen im Bioreaktormaßstab. Kultivierungen über verschiedene Bioreaktorkonfigurationen und *in situ* Extraktionsmethoden könnten zur Erhöhung der (-)-Patchoulolgewinnung führen. Dabei wäre unter anderem eine externe Adsorption oder eine interne Adsorption mit Gas-Stripping wie bei Aguilar *et al.* [82] zu evaluieren. Eine weitere Steigerung der Produktivität könnte über die gezielte Veränderung der

PTS-Struktur durch Punktmutationen erreicht werden. Jedoch übersteigen diese molekularbiologischen Arbeiten den Rahmen dieser Dissertation.

Die in dieser sowie in vorangegangenen Untersuchungen etablierten Strategien zur Verwendung erneuerbarer biologischer Ressourcen für die Sesquiterpenproduktion können dazu genutzt werden, um den negativen Einfluss des Patchoulianbaus auf die Umwelt zu verringern und die Wirtschaftlichkeit des essentiellen Öls zu steigern. Die Vorteile biotechnologischer Verfahren ermöglichen nicht nur die Produktion des vielseitig genutzten Patchouliöls, sondern zeigen auch die Reichweite der einfachen Produktion vieler neuer terpenartiger Strukturen auf.

6 MATERIALIEN

6.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.

Chemikalie	Hersteller, Land
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich Corporation, USA
2-Morpholinoethansulfonsäure (MES)	Sigma-Aldrich Corporation, USA
3-(<i>N</i> -Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Aceton	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Acetonitril	Merck KGaA, Deutschland
Agar	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Agarose	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Amberlite® 200 Na ⁺ form	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Amberlite® XAD4	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Ammoniumhydroxid (30%ig)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Ammoniumsulfat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Bromphenolblau	Merck KGaA, Deutschland
bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Carbenicillin	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Chloroform	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Cobalt(II)-chlorid-Hexahydrat	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Coomassie-Brilliant.Blau G250	Merck KGaA, Deutschland
Desmophen 3900	Bayer AG, Deutschland
Diaion® HP-20	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
EDTA-Dinatriumsalz	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Essigsäure	AppliChem GmbH, Deutschland
Ethanol (96%ig)	VWR International, LLC, Deutschland
Farnesylpyrophosphat (Ammonium-Salz)	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Formaldehyd	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland

Materialien

Chemikalie	Hersteller, Land
Geranylpyrophosphat (Ammonium-Salz)	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Glucose	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Glycin	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Hefeextrakt	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Imidazol	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Isooctan	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
iso-Propanol	Merck KGaA, Deutschland
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
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Methanol	Merck KGaA, Deutschland
Natriumacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Natriumcarbonat	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Natriumchlorid	Merck KGaA, Deutschland
Natriumcitrat-Dihydrat	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Natriumhydroxid	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Natriumsulfit	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Nickel(II)-sulfat-Hexahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
PageRuler™ Unstained Protein MW Marker	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
PageRuler™ Prestained Protein MW Marker	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Patchouliöl	Symrise aG, Deutschland
Pentan	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Polyacrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) 40%ig	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Salzsäure (37%ig)	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Schwefelsäure (96%ig)	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Silbernitrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Triethylammoniumchlorid	Sigma-Aldrich Corporation, USA

Chemikalie	Hersteller, Land
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethanhydrochlorid (TRIS-HCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Trypton	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Zitronensäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
α -Cedren	Sigma-Aldrich Corporation, USA
α -Cedrol	Sigma-Aldrich Corporation, USA
β -Mercaptoethanol	Merck KGaA, Deutschland

6.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller, Land
Einwegspritzen (1 mL – 50 mL)	Omnifix B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Falcon™ konische Zentrifugenröhrchen (50 mL) für Kultivierung	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
GC-Probengefäße (braun)	VWR International, USA
Halb-Mikro-Küvette	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
HPLC-Probengefäße	VWR International, USA
Kryoröhrchen 1,5 mL	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Nitrilhandschuhe	Ansell Healthcare LLC, USA
Pipettenspitzen (versch. Größen)	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Probenfläschchen (4 mL – 7 mL)	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Mikroreaktionsgefäße (1,5 mL und 2 mL)	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Sterile Druckfilter Sartolab® P20 0,2 μ m	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Sterile Spritzenvorfilter Minisart® 0,22 μ m	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Vivaspin® 20 (MWCO = 30 kDa)	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 mL und 50 mL)	Corning, Inc., USA

6.3 Geräte und Software

Tabelle 7: Verwendete Geräte.

Gerätebezeichnung	Hersteller, Land
Analysewaage Analytik AC 210S	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Autoklav Systec V-150	Systec GmbH, Deutschland
Bioreaktor Biostat® A Plus	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Chromatographiesäule HiPrep™ 26/10 Desalting 20 mL	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Schweden
(Chromatographiekühlschrank UNICHROMAT 900	Uniequip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH, Deutschland
Chromatographiesäule HiTrap® IMAC FF 5 mL	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Schweden
FPLC ÄKTA™ pure Protein Purification System	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Schweden
Gaschromatograph GC-2010 plus mit AS (150)	Shimadzu, Japan
GC-Trennsäule ZB-WAX plus	Phenomenex, USA
HPLC System	Merck-Hitachi, Japan
HPLC Trennsäule Aminex HPX-87H	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Inkubator	Memmert GmbH & Co. KG, Deutschland
Magnet Rührer mit Kontaktthermometer C-MAG HS7	IKA Werke GmbH & Co. KG, Deutschland
Membranadsorber Sartobind® IDA75	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Microfluidizer® Hochdruckhomogenisator M-110P	Microfluidics, USA
Mikroliterpipetten (10 µL-1.000 µL)	Brand GmbH & Co. KG, Deutschland
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
pH-Elektrode	Leighton Buzzard, Großbritannien
Photometer Multiskan Spectrum	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Photometer Multiskan Go	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Reinstwassersystem arium® pro VF-B	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland
Schüttelinkubator Certomat BS-1	B. Braun Biotech International GmbH, Deutschland
SDS-PAGE Gelsystem Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Ultraschallsonde LABSonic®	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Deutschland

Gerätebezeichnung	Hersteller, Land
Vortex Mixer VM-300	Vortexer GEMMY INDUSTRIAL CORP., Taiwan
YSI 2700 SELECT™ Biochemistry Analyzer	YSI Incorporated, USA
Zentrifuge Heraeus® Fresco 17	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Zentrifuge Heraeus® Megafuge® 1.0 RS	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Zentrifuge Heraeus® Multifuge X3FR	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Zentrifuge Heraeus® Biofuge Pico 17	Thermo Fisher Scientific Inc., USA

Tabelle 8: Verwendete Software.

Software	Entwickler
ChemDraw	CambridgeSoft, USA
ImageJ	National Institute of Health, USA
GNU Image Manipulation Program	The GIMP Team, USA
Microsoft Office	Microsoft Corporation, USA
Minitab Statistical Software	Minitab, Inc., USA
OriginPro® 2019	OriginLab Corporation, USA
UNICORN software	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Schweden

6.4 Expressionsstämme

Tabelle 9: Verwendete *E. coli* Expressionsstämme.

Stamm	Genotyp	Hersteller, Land
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	$F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm$ (DE3)	Merck KGaA, Deutschland
<i>E. coli</i> SHuffle T7	<i>fhuA2 lacZ::T7 gene1</i> [lon] <i>ompT ahpC gal</i> $\lambda att::pNEB3-r1-cDsbC$ (Spec ^R , <i>lacI^q</i>) $\Delta trxB sulA11 R(mcr-73::miniTn10-Tet^S)2$ [dcm] $R(zgb-210::Tn10-Tet^S)$ <i>endA1</i> $\Delta gor \Delta(mcrC-mrr)114::IS10$	New England Biolabs, USA
<i>E. coli</i> SHuffle T7 lysY	MiniF <i>lysY</i> (Cam ^R)/ <i>fhuA2 lacZ::T7 gene1</i> [lon] <i>ompT ahpC gal</i> $\lambda att::pNEB3-r1-cDsbC$ (Spec ^R , <i>lacI^q</i>) $\Delta trxB sulA11 R(mcr-73::miniTn10-Tet^S)2$ [dcm] $R(zgb-210::Tn10-Tet^S)$ <i>endA1</i> $\Delta gor \Delta(mcrC-mrr)114::IS10$	New England Biolabs, USA

Stamm	Genotyp	Hersteller, Land
Tuner (DE3)	$F^- ompT hsdSB(r_B^- m_B^-) gal dcm lacY1$ (DE3)	Merck KGaA, Deutschland

6.5 Plasmidkarten

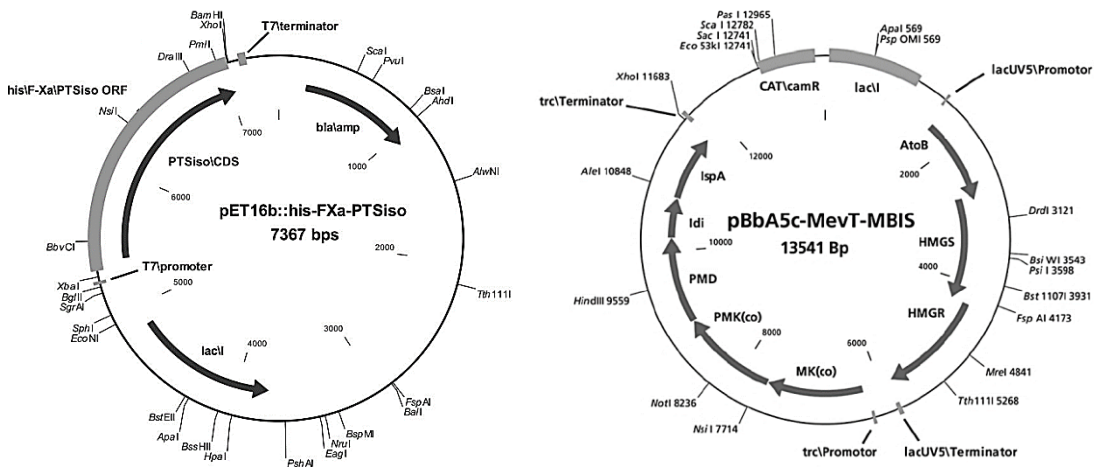


Abbildung 44: Plasmidkarten der im *E. coli* PTS-Stamm verwendeten Vektoren pET16b::his-FXa-PTSi und pBbA5c-MevT-MBIS [43, 85].

Tabelle 10: Abkürzung der verwendeten Vektoren.

Vektor	Abkürzung	Antibiotika-Resistenz
pET16b::his-FXa-PTSi	pPTS	Carbenicillin
pBbA5c-MevT-MBIS	pMEV	Chloramphenicol
pET16b::his-FXa-PTSi + pBbA5c-MevT-MBIS	pPTS+pMEV	Carbenicillin und Chloramphenicol

6.6 Medien, Puffer und Lösungen

Für das Ansetzen aller Medien, Puffer und Lösungen wurde demineralisiertes Wasser (ddH₂O) mit einer Leitfähigkeit von 0,055 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, entsprechend einem Widerstand von 18,2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$, aus einer Reinstwasseranlage verwendet. Die Einstellung der pH-Werte erfolgte durch Zugabe von einer 1 M HCl- oder 1 M NaOH-Lösung. Das Sterilisieren der Medien und Puffer erfolgte durch Autoklavieren mit dem Standardprogramm für Flüssigkeiten über 20 min bei 121 °C. Lösungen,

die nicht autoklaviert werden konnten, wurde mit einem Sterilfilter mit der Porengröße von 0,2 µM sterilisiert.

6.6.1 Kultivierung

Tabelle 11: Verwendete Antibiotika-Stammlösungen (1.000 x).

Bestandteil	Komponente	Konzentration	Menge	Vorbereitung
Carbenicillin-Stammlösung	Carbenicillin Dinatriumsalz	50 g·L ⁻¹	2,5 g	Sterilfiltrieren
	ddH ₂ O		ad 50 mL	
Chloramphenicol-Stammlösung	Chloramphenicol	34 g·L ⁻¹	1,7 g	Sterilfiltrieren
	EtOH		50 mL	

Antibiotika-Stammlösungen sterilfiltrieren und in 1 mL Aliquots bei -20 °C aufbewahren.

Tabelle 12: Verwendete IPTG-Stammlösung (1 M).

Bestandteil	Komponente	Konzentration	Menge	Vorbereitung
IPTG-Stammlösung	IPTG	238,4 g·L ⁻¹	11,92 g	Sterilfiltrieren
	ddH ₂ O		ad 50 mL	

Die IPTG-Stammlösung sterilfiltrieren und in 1 mL Aliquots bei -20 °C aufbewahren.

6.6.1.1 Medien für Vorkulturen und die Kultivierung im Schüttelkolben

Tabelle 13: Zusammensetzung des LB-Mediums.

Bestandteil	Konzentration	Menge
Hefeextrakt	5 g·L ⁻¹	5 g
Natriumchlorid	10 g·L ⁻¹	10 g
Trypton	10 g·L ⁻¹	10 g
Agar	15 g·L ⁻¹	15 g
ddH ₂ O		ad 1.000 mL

Die Medienbestandteile in 1 L ddH₂O lösen. Für Agarplatten zusätzlich noch 15 g Agar hinzugeben. Das Medium autoklavieren und nach Abkühlen unter sterilen Bedingungen 1 mL der Antibiotika-Stammlösung dazugeben.

Tabelle 14: Zusammensetzung des TB-Mediums.

Bestandteil	Konzentration	Menge
Hefeextrakt	24 g·L ⁻¹	24 g
Trypton	12 g·L ⁻¹	12 g
Glycerin	5 g·L ⁻¹	5 g
ddH ₂ O		ad 900 mL

Tabelle 15: Zusammensetzung des 10 x Phosphat-Puffers für das TB-Medium.

Bestandteil	Konzentration	Menge
K ₂ HPO ₄	125,4 g·L ⁻¹	12,54 g
KH ₂ PO ₄	23,1 g·L ⁻¹	2,31 g
ddH ₂ O		ad 100 mL

Die Medienbestandteile aus Tabelle 14 in 900 mL ddH₂O und die Puffer-Bestandteile aus Tabelle 15 in 100 mL ddH₂O lösen. Das Medium und den Puffer autoklavieren. Nach Abkühlen unter sterilen Bedingungen den 10 x Phosphat-Puffer zum TB-Medium hinzufügen und 1 mL der Antibiotika-Stammlösung dazugeben.

Tabelle 16: Zusammensetzung der Stammlösungen für das definierte DA-Medium für die Kultivierung im Schüttelkolben.

Bestandteil	Komponente	Konzentration	Menge	Vorbereitung
Basallösung	(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g·L ⁻¹	62,5 g	pH einstellen, Autoklavieren
	CaCl ₂	0,013 g·L ⁻¹	0,045 g	
	K ₂ SO ₄	1,1 g·L ⁻¹	6,875 g	
	NaCl	1,2 g·L ⁻¹	7,5 g	
	ddH ₂ O		ad 250 mL	
Phosphatpuffer	K ₂ HPO ₄	9,3 g·L ⁻¹	58,125 g	Autoklavieren
	KH ₂ PO ₄	2,03 g·L ⁻¹	12,688 g	
	ddH ₂ O		ad 250 mL	
Glucoselösung	Glucose	500 g·L ⁻¹	25 g	Sterilfiltrieren, 4 °C
	ddH ₂ O		ad 50 mL	
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,15 g·L ⁻¹	7,5 g	Sterilfiltrieren,

Materialien

Bestandteil	Komponente	Konzentration	Menge	Vorbereitung
Spurenelemente- lösung	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,001 g·L ⁻¹	0,05 g	-20 °C
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,001 g·L ⁻¹	0,05 g	
	ddH ₂ O		50 mL	

Tabelle 17: Zusammensetzung des definierten DA-Mediums (nach Rodríguez-Aparicio *et al.*) für die Kultivierung im Schüttelkolben.

Bestandteil	Menge
Basallösung	40 mL
Phosphatpuffer	40 mL
Glucoselösung	20 mL
Spurenelementelösung	1 mL
Carbenicillin-Stammlösung	1 mL
Chloramphenicol-Stammlösung	1 mL
ddH ₂ O	ad 1.000 mL

In einer 1 L-Schottflasche 897 mL ddH₂O autoklavieren. Nach Abkühlen, die Medienbestandteile aus Tabelle 17 unter sterilen Bedingungen zum autoklavierten ddH₂O dazugeben.

Tabelle 18: Zusammensetzung der Stammlösungen für das definierte M9-Medium für die Kultivierung im Schüttelkolben.

Bestandteil	Komponente	Konzentration	Menge	Vorbereitung
Basallösung	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	6 g·L ⁻¹	30,0 g	pH einstellen, Autoklavieren
	K ₂ HPO ₄	3 g·L ⁻¹	6,0 g	
	NH ₄ Cl	1 g·L ⁻¹	2,0 g	
	NaCl	0,5 g·L ⁻¹	1,0 g	
	ddH ₂ O		ad 200 mL	
Calciumlösung	CaCl ₂	3 mg·L ⁻¹	198,7 mg	Sterilfiltrieren, -20 °C
	ddH ₂ O		ad 50 mL	
Magnesiumlö- sung	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,12 g·L ⁻¹	12,32 g	Sterilfiltrieren, -20 °C
	ddH ₂ O		ad 50 mL	

Materialien

Bestandteil	Komponente	Konzentration	Menge	Vorbereitung
Basallösung	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	6 g · L ⁻¹	30,0 g	pH einstellen, Autoklavieren
	K ₂ HPO ₄	3 g · L ⁻¹	6,0 g	
	NH ₄ Cl	1 g · L ⁻¹	2,0 g	
	NaCl	0,5 g · L ⁻¹	1,0 g	
	ddH ₂ O		ad 200 mL	
Vitamin B1-Lösung	Thiamin HCl	0,5 mg · L ⁻¹	317 mg	Sterilfiltrieren, -20 °C
	ddH ₂ O		ad 50 mL	
Glucoselösung	Glucose	500 g · L ⁻¹	25 g	Sterilfiltrieren, 4 °C
	ddH ₂ O		ad 50 mL	

Tabelle 19: Zusammensetzung des definierten M9-Mediums (M9-Minimal-Medium) für die Kultivierung im Schüttelkolben.

Bestandteil	Menge
Basallösung	100 mL
Calciumlösung	1 mL
Magnesiumlösung	1 mL
Vitamin B1-Lösung	0,1 mL
Glucoselösung	20 mL
Carbenicillin-Stammlösung	1 mL
Chloramphenicol-Stammlösung	1 mL
ddH ₂ O	ad 1.000 mL

In einer 1 L-Schottflasche 876 mL ddH₂O autoklavieren. Nach Abkühlen, die Medienbestandteile aus Tabelle 19 unter sterilen Bedingungen zum autoklavierten ddH₂O dazugeben.

Tabelle 20: Zusammensetzung der Stammlösungen für das definierte DK-Medium für die Kultivierung im Schüttelkolben.

Bestandteil	Komponente	Konzentration	Menge	Vorbereitung
Basallösung	(NH ₄) ₂ HPO ₄	4 g · L ⁻¹	4 g	pH einstellen, Autoklavieren
	Citronensäure	1,7 g · L ⁻¹	1,7 g	
	Fe(III)-Citrat	100,8 mg · L ⁻¹	100,8 mg	

Materialien

Bestandteil	Komponente	Konzentration	Menge	Vorbereitung
	KH ₂ PO ₄	13,3 g·L ⁻¹	13,3 g	
	Molybdänlösung		0,22 mL	
	ddH ₂ O		ad 900 mL	
Glucoselösung	Glucose	500 g·L ⁻¹	25 g	Sterilfiltrieren, 4 °C
	ddH ₂ O		ad 50 mL	
Magnesiumlösung	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,2 g·L ⁻¹	0,756 g	Sterilfiltrieren, -20 °C
	ddH ₂ O		ad 50 mL	
Molybdänlösung	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	2,1 mg·L ⁻¹	262,5 mg	-20 °C
	ddH ₂ O		ad 25 mL	
Spurenelemente- lösung	CoCl ₂ ·6H ₂ O	1,4 mg·L ⁻¹	0,513 g	Sterilfiltrieren, -20 °C
	CuCl ₂	1,2 mg·L ⁻¹	0,24 g	
	H ₃ BO ₃	3 mg·L ⁻¹	0,6 g	
	MnCl ₂ ·2H ₂ O	12,3 mg·L ⁻¹	2,46 g	
	Titriplex III (EDTA-Na ₂)	14,1 mg·L ⁻¹	2,82 g	
	Zn(CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O	33,8 mg·L ⁻¹	6,76 g	
	ddH ₂ O		ad 100 mL	

Tabelle 21: Zusammensetzung des definierten DK-Mediums (nach Korz *et al.*) für die Kultivierung im Schüttelkolben.

Bestandteil	Menge
Basallösung	900 mL
Glucoselösung	20 mL
Magnesiumlösung	79 mL
Spurenelementelösung	0,5 mL
Carbenicillin-Stammlösung	1 mL
Chloramphenicol-Stammlösung	1 mL
ddH ₂ O	ad 1.000 mL

In einer 1 L-Schottflasche die Bestandteile der Basallösung aus Tabelle 20 in 900 mL ddH₂O lösen, die Molybdänlösung hinzugeben und autoklavieren. Die Medienbestandteile aus Tabelle 21 unter sterilen Bedingungen zur abgekühlten, autoklavierten Basallösung dazugeben.

6.6.1.2 Medien für die Kultivierung im Bioreaktor

Tabelle 22: Zusammensetzung der Stammlösungen für das definierte DA-Medium für die Kultivierung im Bioreaktor.

Bestandteil	Komponente	Konzentration	Menge	Vorbereitung
Glucoselösung	Glucose	500 g·L ⁻¹	25 g	Sterilfiltrieren, 4 °C
	ddH ₂ O		ad 50 mL	
Spurenelemente- lösung	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,15 g·L ⁻¹	7,5 g	Sterilfiltrieren, -20 °C
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,001 g·L ⁻¹	0,05 g	
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,001 g·L ⁻¹	0,05 g	
	ddH ₂ O		50 mL	

Tabelle 23: Zusammensetzung des definierten DA-Mediums (Aparicio-Medium; nach Rodríguez-Aparicio *et al.* [115]) für die Kultivierung im Bioreaktor.

Bestandteil	Komponente	Konzentration	Menge	Vorbereitung
Basallösung	(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g·L ⁻¹	15 g	Bioreaktor, Au- toklavieren
	CaCl ₂	0,013 g·L ⁻¹	0,0195 g	
	K ₂ SO ₄	1,1 g·L ⁻¹	1,65 g	
	NaCl	1,2 g·L ⁻¹	1,8 g	
	Antischaum	0,2 g·L ⁻¹	300 µL	
	ddH ₂ O		ad 1400 mL	
Phosphat-Puffer	K ₂ HPO ₄	9,3 g·L ⁻¹	13,95 g	Vorlageflasche, Autoklavieren
	KH ₂ PO ₄	2,03 g·L ⁻¹	3,045 g	
	ddH ₂ O		ad 100 mL	
Glucoselösung	Glucose	5 g·L ⁻¹	15 mL	Steril in die Vorlageflasche
Spurenelemente- lösung		1 mL·L ⁻¹	1.500 µL	Mit Spritze in den Bioreaktor

Materialien

Bestandteil	Komponente	Konzentration	Menge	Vorbereitung
Carbenicillin-Stammlösung		50 mg·L ⁻¹	1.000 µL	Mit Spritze in den Bioreaktor
Chloramphenicol-Stammlösung		34 mg·L ⁻¹	1.000 µL	Mit Spritze in den Bioreaktor

Die Medienbestandteile der Basallösung aus Tabelle 23 in 1400 mL ddH₂O lösen, in den Bioreaktor geben und den Bioreaktor autoklavieren. Die Phosphatpuffer-Bestandteile in 100 mL ddH₂O lösen, in eine Vorlageflasche geben und autoklavieren. Die sterilfiltrierte Glucoselösung unter sterilen Bedingungen in die Vorlageflasche mit Phosphat-Puffer geben. Die Spurenelementlösung und die Antibiotikalösungen mit Carbenicillin und Chloramphenicol mit einer Spritze in den abgekühlten, sterilen Bioreaktor geben.

Tabelle 24: Zusammensetzung der Feedlösung für das DA-Medium für die Kultivierung im Bioreaktor.

Bestandteil	Komponente	Konzentration	Menge	Vorbereitung
Basallösung	CaCl ₂	0,013 g·L ⁻¹	0,0195 g	Autoklavieren
	NaCl	1,2 g·L ⁻¹	1,8 g	
	ddH ₂ O		ad 800 mL	
Glucoselösung	Glucose	100 g·L ⁻¹	100 g	Steril in die Feedflasche
	ddH ₂ O		200 mL	
Spurenelementlösung		1 µL·L ⁻¹	1.000 µL	Steril in die Feedflasche
Carbenicillin-Stammlösung		50 mg·L ⁻¹	1.000 µL	Steril in die Feedflasche
Chloramphenicol-Stammlösung		34 mg·L ⁻¹	1.000 µL	Steril in die Feedflasche

Für die fed-batch-Kultivierung werden die Bestandteile der Basallösung aus Tabelle 24 in einer 1 L-Schottflasche in 800 mL ddH₂O gelöst und autoklaviert. Nach Abkühlen wurden die restlichen Bestandteile der Feedlösung unter sterilen Bedingungen zur Basallösung hinzugegeben.

6.6.2 Zellaufschluss

Tabelle 25: Zusammensetzung des PBS-Puffers.

Bestandteil	Konzentration	Menge
KH ₂ PO ₄	2 mM	0,27 g
Na ₂ HPO ₄	10 mM	1,42 g
KCl	2,7 mM	0,2 g
NaCl	137 mM	8,0 g
ddH ₂ O		ad 1.000 mL

Tabelle 26: Zusammensetzung des Aufschlusspuffers.

Bestandteil	Konzentration	Menge
MOPS	50 mM	10,46 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	10 mM	2,033 g
NaCl	150 mM	8,766 g
Glycerin	10 % (v/v)	100 mL
ddH ₂ O		ad 1.000 mL

Der Aufschlusspuffer wurde auf pH 7,25 eingestellt.

6.6.3 Fast-Protein-Flüssigchromatographie

Tabelle 27: Zusammensetzung der Nickellösung für die Chromatographiesäule HiTrap® IMAC FF 5 mL.

Bestandteil	Konzentration	Menge
NiSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 M	1,404 g
ddH ₂ O		ad 50 mL

Tabelle 28: Zusammensetzung der Cobaltlösung für die Chromatographiesäule HiTrap® IMAC FF 5 mL.

Bestandteil	Konzentration	Menge
CoCl ₂ ·3H ₂ O	0,1 M	0,919 g
ddH ₂ O		ad 50 mL

Tabelle 29: Zusammensetzung des Equilibrierungs- und Lagerungspuffers.

Bestandteil	Konzentration	Menge
MOPS	50 mM	10,46 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	10 mM	2,033 g
NaCl	150 mM	8,766 g
Glycerin	10 % (v/v)	100 mL
ddH ₂ O		ad 1.000 mL

Der Equilibrierungs- und Lagerungspuffer wurde auf pH 7,25 eingestellt, sterilfiltriert und entgast.

Tabelle 30: Zusammensetzung des Bindungspuffers.

Bestandteil	Konzentration	Menge
MOPS	50 mM	10,46 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	10 mM	2,033 g
NaCl	150 mM	8,766 g
Glycerin	10 % (v/v)	100 mL
Imidazol	10 mM	0,681 g
ddH ₂ O		ad 1.000 mL

Der Bindungspuffer wurde auf pH 7,25 eingestellt, sterilfiltriert und entgast.

Tabelle 31: Zusammensetzung des Elutionspuffers.

Bestandteil	Konzentration	Menge
MOPS	50 mM	10,46 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	10 mM	2,033 g
NaCl	150 mM	8,766 g
Glycerin	10 % (v/v)	100 mL
Imidazol	250 mM	17,02 g
ddH ₂ O		ad 1.000 mL

Der Elutionspuffer wurde auf pH 7,25 eingestellt, sterilfiltriert und entgast.

6.6.4 Enzymatische Umsetzung

Tabelle 32: Zusammensetzung des Umsetzungspuffers.

Bestandteil	Konzentration	Menge
MES	50 mM	9,76 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	10 mM	2,033 g
Glycerin	10 % (v/v)	100 mL
ddH ₂ O		ad 1.000 mL

Der Umsetzungspuffer wurde auf pH 6,4 eingestellt.

Tabelle 33: Zusammensetzung der Patchouliöl-Standardreihe aus einer Stammlösung mit 9,63 µg·mL⁻¹.

Konzentration	Menge Stammlösung	Isooctan
1,926 µg·mL ⁻¹	50 µL	ad 250 µL
0,963 µg·mL ⁻¹	50 µL	ad 500 µL
0,1926 µg·mL ⁻¹	10 µL	ad 500 µL
0,0963 µg·mL ⁻¹	5 µL	ad 500 µL

Tabelle 34: Zusammensetzung der α-Cedrol-Standardreihe aus einer Stammlösung mit 10 g·L⁻¹.

Konzentration	Menge Stammlösung	Isooctan
1 g·L ⁻¹	20 µL	ad 200 µL
0,1 g·L ⁻¹	10 µL	ad 1.000 µL
0,05 g·L ⁻¹	5 µL	ad 1.000 µL
0,01 g·L ⁻¹	10 µL	ad 10 mL
0,005 g·L ⁻¹	5 µL	ad 10 mL
0,001 g·L ⁻¹	10 µL	ad 100 mL
0,0005 g·L ⁻¹	5 µL	ad 100 mL

Tabelle 35: Zusammensetzung der *E,E*-FPP-Substratlösungen zur Messung der Reaktionskinetik der PTS aus einer *E,E*-FPP-Stammlösung mit 1 g·L⁻¹.

Konzentration	Menge Stammlösung	Umsetzungspuffer
1 µM	1,17 µL	ad 2,7 mL
5 µM	5,88 µL	ad 2,7 mL
20 µM	11,78 µL	ad 2,7 mL

Konzentration	Menge Stammlösung	Umsetzungspuffer
30 μM	23,55 μL	ad 2,7 mL
50 μM	35,32 μL	ad 2,7 mL
80 μM	58,88 μL	ad 2,7 mL
100 μM	94,2 μL	ad 2,7 mL
150 μM	117,2 μL	ad 2,7 mL

6.6.5 SDS-PAGE

Tabelle 36: Zusammensetzung des 12%igen Trenngels (für 2 Gele).

Bestandteil	Menge
Rotiphorese 40 (37,5:1)	3 mL
SDS (1%ig)	1 mL
Tris/HCl (pH 8,8)	2,8 mL
dd H ₂ O	3,2 mL
TEMED	20 μL
APS	20 μL

Tabelle 37: Zusammensetzung des 6%igen Sammelgels (für 2 Gele).

Bestandteil	Menge
Rotiphorese 40 (37,5:1)	1 mL
SDS (1%ig)	300 μL
Tris/HCl (pH 6,8)	630 μL
ddH ₂ O	3,77 mL
TEMED	10 μL
APS	10 μL

Tabelle 38: Zusammensetzung des 10 x TGS-Puffers (pH 8,3).

Bestandteil	Konzentration	Menge
Tris	3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	3 g
Glycin	140 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	140 g
SDS	10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	10 g
ddH ₂ O		ad 1.000 mL

Tabelle 39: Zusammensetzung des 2 x SDS-Probenpuffers.

Bestandteil	Konzentration	Menge
Bromphenolblau	0,25 g·L ⁻¹	20 mg
EDTA-Natriumsalz	0,73 g·L ⁻¹	58 mg
SDS	62,5 g·L ⁻¹	5 g
Tris-HCl	3,94 g·L ⁻¹	315 mg
ddH ₂ O		ad 80 mL

Tabelle 40: Zusammensetzung des Laemmli-Puffers.

Bestandteil	Menge
2 x SDS-Probenpuffer	800 µL
Glycerin (55%ig)	100 µL
β-Mercaptoethanol	100 µL

Tabelle 41: Zusammensetzung der kolloidalen Coomassiefärbelösung (nach Candido *et al.* 2004).

Bestandteil	Menge
Coomassie Brilliant Blue G-250	490 mg
Ammoniumsulfat	40,8 g
Phosphorsäure (85%ig)	48 mL
Methanol	82 mL
ddH ₂ O	367 mL

Für die kolloidale Coomassiefärbelösung werden in einer 500 mL-Schottflasche, 40 mL Wasser vorgelegt und langsam die Phosphorsäure dazugegeben. Ammoniumsulfat und Coomassie Brilliant Blue G-250 unter Rühren zugeben. Zunächst das restliche ddH₂O und dann langsam unter Rühren Methanol zugeben. Lichtgeschützt und bei 4 °C lagern.

Tabelle 42: Zusammensetzung der Entfärber/Fixierlösung für die kolloidale Coomassiefärbung.

Bestandteil	Menge
Ethanol (96%ig)	500 mL
Phosphorsäure (85%ig)	200 mL
ddH ₂ O	300 mL

6.6.6 Bradford-Assay

Zusammensetzung der Bradford-Reagenz.

Bestandteil	Menge
Coomassie Brilliant Blue G-250	10 mg
Ethanol (96%ig)	5 mL
Phosphorsäure (85%ig)	10 mL
ddH ₂ O	100 mL

Zur Herstellung der Bradford-Reagenz wird das Coomassie Brilliant Blue G-250 in 96%igem Ethanol gelöst. Anschließend wird langsam die 85%ige Phosphorsäure hinzugegeben. Unter Rühren wird die Lösung mit ddH₂O versetzt und schließlich filtriert und bei 4 °C gelagert.

7 METHODEN

7.1 Plasmid-DNA und Zelltransformation

7.1.1 Plasmidpräparation

Für die Plasmidisolierung zur Transformation kompetenter Bakterienzellen wird das QIAprep[®] Spin Miniprep Kit verwendet und falls nicht anders angegeben, bei RT durchgeführt.

1. 5 mL LB-Medium in einem 50 mL-Zentrifugenröhrchen mit einer einzelnen Kolonie transformierter *E. coli* BL21 (von einer LB-Agarplatte) inokulieren und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubieren.
2. Die Übernachtskultur stoppen, indem diese für 4 min auf Eis gekühlt wird. Die Bakterienkultur zentrifugieren (4.000 x g, RT, 5 min), den Überstand verwerfen und das Zellpellet in 250 µL zuvor gekühltem Resuspensionspuffer P1 (50 mM TRIS-HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA·Na₂·2H₂O; 100 µg·mL⁻¹ RNaseA) lösen.
3. Die Suspension in einen 2 mL-Mikroreaktionsgefäß transferieren, 250 µL Lysispuffer P2 (200 mM NaOH; 1 % (w/v) SDS) dazugeben und leicht vermischen (das verschlossene Mikroreaktionsgefäß 4 – 6 mal hin- und herkippen) bis die Suspension viskos und leicht milchig ist. Die Lyse-Reaktion sollte maximal 5 min dauern.
4. Die alkalische Lösung wird neutralisiert, indem 350 µL Neutralisationspuffer N3 (4,2 M Guanidiniumhydrochlorid; 0,9 M Kaliumacetat; pH 4,8) hinzugegeben und die Suspension unmittelbar danach leicht durchgemischt wird, bis ein trüb-flockiges Präzipitat entsteht.
5. Die Suspension wird zentrifugiert (13.000 x g, RT, 10 min) und der klare Überstand (800 µL) vorsichtig auf eine Silica-Säule (QIAprep spin column) pipettiert. Die Säule wird in einem 2 mL-Mikroreaktionsgefäß zentrifugiert (13.000 x g, RT, 1 min), dann nochmal mit 750 µL Waschpuffer PE durch erneute Zentrifugation (13.000 x g, RT, 1 min) getrocknet. Den Durchlauf verwerfen und für eine weitere Minute zentrifugieren, um alle Reste aus der Säule zu entfernen.
6. Nach 3 – 5 min die Säule in ein sauberes 1,5 mL-Mikroreaktionsgefäß platzieren und 40 µL des auf 50 °C aufgewärmten Puffers EB (10 mM TRIS-HCl; pH 8,5) auf die Säule pipettieren. Nach einer kurzen Inkubationszeit (1 min) wird die gereinigte Plasmid-DNA durch Zentrifugation (13.000 x g, RT, 1 min) in das Reaktionsgefäß eluiert. Die gelöste Plasmid-DNA bei -80 °C lagern.

Durch dieses Verfahren können bis zu 20 µg Plasmid-DNA aus 5 mL Bakterienkultur aufgereinigt werden.

7.1.2 Restriktionsverdau

Zum Restriktionsverdau von Plasmid-DNA werden FastDigest Enzyme eingesetzt.

Tabelle 43: Restriktionsverdau von Plasmid-DNA.

Bestandteil	Menge
ddH ₂ O	17 µL
10 x FastDigest Puffer	2 µL
Plasmid-DNA	10 µL
FastDigest Enzym	1 µL
Endvolumen	30 µL

Dabei werden zum Plasmid-Verdau maximal 1 µL FastDigest Enzym eingesetzt. Der Probenansatz wird bei 37 °C für 1 h im Thermocycler inkubiert. Die Endonukleasen werden (falls durch Hitze) bei 80 °C für 5 min inaktiviert.

Zur Verhinderung der Religation von linearisierter Vektor-DNA werden die 5'-Enden vor der Ligation dephosphoryliert, indem 1 µL Calf-Intestinal-Alkaline-Phosphatase (CIAP, 1 u µL⁻¹) direkt nach Verdau in die Lösung gegeben wird. Die Lösung wird bei 50 °C für 5 min inkubiert. Die CIAP kann dann durch Hitze bei 65 °C für 15 min inaktiviert werden.

7.1.3 DNA-Agarosegel

Die erfolgreiche PCR-Amplifikation wird durch Agarose-Gele kontrolliert. Dazu werden 1 – 1,5 g Agarose in 100 mL 1 x TAE-Puffer gelöst. Die Lösung wird 120 s bei 800 W in der Mikrowelle erhitzt, auf etwa 45 °C abgekühlt und 5 µL Roti[®]-Safe GelStain hinzugegeben. Nach Gießen des Gels wird ein Kamm zur Ausformung der Probenaschen eingesetzt. Zu den PCR-Proben wird 6 x DNA Loading Dye (mit Glycerin) gegeben und die Probenaschen gefüllt.

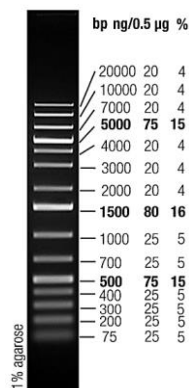


Abbildung 45: Der zu verwendende DNA-Größenstandard GeneRulerTM 1 kb DNA Ladder für Agarosegele.

Der GeneRuler™ 1 kB DNA Ladder dient als Größenstandard. Die Agarosegel-Kammer wird mit 1 x TAE-Puffer befüllt und die Proben für 45 min bei 100 V aufgetrennt. Die DNA-Banden können über eine UV-Geldokumentationsanlage angezeigt und ausgewertet werden.

7.1.4 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Die Transformation und Kotransformation der chemisch kompetenten *E. coli* Zellen wird nach folgender Vorschrift durchgeführt.

1. Die bei -80 °C gelagerten 40 µL der jeweiligen kompetenten Zellen wenige Minuten auf Eis auftauen.
2. Auf Eis, 1 – 10 µL gelöstes Plasmid je nach Konzentration (1 µL Plasmid $\approx 10 - 100 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) in RNase-freiem Wasser lösen (Endkonzentration des Plasmids $\approx 1 - 10 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$).
3. Auf Eis, 1 µL der verdünnten Plasmid-Suspension zu 20 µL des entsprechenden Expressionsstamms pipettieren und vorsichtig durch Klopfen mit dem Finger vermischen. Die Zellsuspension für 5 min auf Eis inkubieren, damit sich die Plasmide an der Zellwand anlagern.
4. Unmittelbar danach erfolgt ein Hitzeschock für exakt 45 s bei 42 °C im vortemperierten Wasserbad. Dann wird die Zellsuspension für 2 min auf Eis inkubiert.
5. 80 µL auf Eis gekühltes SOC-Medium zugeben und für etwa 1 h bei 37 °C im Thermomixer bei 350 rpm schütteln.
6. Dann wird die Zellsuspension ($\approx 100 \mu\text{L}$) auf eine vorgewärmte LB-Agarplatte (siehe Tabelle 13, mit den entsprechenden Antibiotika als Selektionsmarker) verteilt.
7. Die LB-Agarplatten werden kopfüber über Nacht bei 37 °C inkubiert.

7.2 Stammerhaltung

Zur Reproduzierbarkeit der Expression, werden von den transformierten Stämmen Kryokulturen vorbereitet. Dazu wird eine Vorkultur mit LB-Medium von der LB-Agarplatte mit einer Einzelkolonie beimpft und für etwa 3 – 4 h bei 37 °C und 150 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 rel. AU (exponentielle Wachstumsphase) inkubiert. Dann werden 750 µL der Kultur in vorbereitete 2 mL Kryokulturgefäße pipettiert, mit 250 µL sterilem Glycerin (80%ig) versetzt und durch Kippen der verschlossenen Gefäße vermischt. Die Kryokulturen werden bei -80 °C gelagert.

Der Stamm wird auf LB-Agarplatten (siehe Tabelle 13, mit den entsprechenden Antibiotika als Selektionsmarker) bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und monatlich auf frische LB-Agarplatten überimpft. Zur Kultivierung werden die ausgestrichenen Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert.

7.3 Kultivierung

Für die Kultivierung werden ausschließlich autoklavierte Gefäße, Medien, Puffer und sterilfiltrierte Lösungen verwendet. Die Arbeiten sind unter sterilen Bedingungen durchzuführen. Die Antibiotikazusätze erfolgen in einem Verhältnis von 1:1.000 zum Gesamtvolumen der Kultur. Dabei wird eine Carbenicillinlösung mit einer Konzentration von 50 g·L⁻¹ und eine Chloramphenicolösung mit einer Konzentration von 34 g·L⁻¹ verwendet. Zur Sauerstoffversorgung während der Kultivierung werden Schraubverschlüsse mit einer sauerstoffdurchlässigen Membran verwendet.

7.3.1 Batch-Kultivierung von *E. coli* BL21(DE3) pPTS im Bioreaktor

Für die erste Vorkultur werden in einem 100mL-Schüttelkolben mit vier Schikanen, 20 mL LB-Medium mit Carbenicillin (100 µM) als Selektionsmarker, mit 1 mL der Kryokultur des Stammes inokuliert und über 6 h bei 37 °C und 150 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 – 0,8 rel. AU inkubiert. Die zweite Vorkultur in 100 mL TB-Medium mit Carbenicillin (100 µM) als Selektionsmarker in einem 500mL-Schüttelkolben mit vier Schikanen, wird mit 5 mL der ersten Vorkultur auf einen OD₆₀₀ von 0,1 rel. AU inokuliert. Diese wird über Nacht bei 37 °C und 150 rpm inkubiert.

Die Hauptkultur wird in 1,8 L TB-Medium in einem 2 L-Rührkesselreaktor diskontinuierlich durchgeführt. Die Einstellung von pH 7,2 erfolgt durch Zugabe von 1 M HCl und 25%iger Ammoniaklösung. Die Begasung wird mit 1 vvm Druckluft durchgeführt. Die Rührergeschwindigkeit erfolgt kaskadierend (400 – 700 rpm), sodass in der Kultur ein Sauerstoffpartialdruck von 30 % nicht unterschritten wird.

Der Bioreaktor wird mit der Vorkultur auf eine OD_{600} von 0,1 rel. AU inokuliert und bei 30 °C inkubiert. Bei einer OD_{600} von etwa 0,8 rel. AU wird die Proteinexpression mit IPTG auf eine Konzentration von 0,5 mM induziert und die Kultur für 24 h bei 20 °C inkubiert. Zu bestimmten Zeiten werden Proben zur Analyse der optischen Dichte, Biotrockenmasse, Glycerinkonzentration und für eine SDS-PAGE-Analyse entnommen. Für die analytischen Untersuchungen (SDS-PAGE) wird ein normiertes Probenvolumen ($V_{\text{Probe}} = \frac{2}{OD_{600}}$) aus der Kultur entnommen. Die SDS-PAGE-Proben werden durch Ultraschallbehandlung (siehe Kapitel 6.6.2) aufgeschlossen. Über eine SDS-PAGE-Analyse (siehe Kapitel 7.5.5) werden die lösliche und unlösliche Fraktion quantifiziert.

Nach 24 h wird die Kulturbrühe zentrifugiert (4700 x g, 4 °C, 20 min), der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird zum Waschen in 450 – 500 mL 1 x PBS-Puffer resuspendiert, erneut zentrifugiert (4700 x g, 4 °C, 20 min) und der Überstand verworfen.

Das Zellpellet wird in 20 mL 1 x PBS-Puffer gelöst, in ein vorher ausgewogenes Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (4700 x g, 4 °C, 20 min). Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet ausgewogen und bei -20 °C gelagert.

7.3.2 Kultivierung der pathway-optimierten Stämme im Schüttelkolben

Zur Optimierung der Kultivierungsbedingungen wird der jeweilige *E. coli*-Stamm mit den Vektoren pPTS und pMEV im Schüttelkolben nach folgender Vorschrift kultiviert.

Für die Vorkultur werden in einem 50 mL-Zentrifugenröhrchen 5 mL LB-Medium mit Carbenicillin ($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) und Chloramphenicol ($34 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) als Selektionsmarker mit einer einzelnen Kolonie des Stammes von einer LB-Agarplatte inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD_{600} von 4 – 5 rel. AU inkubiert.

Für eine Festphasen-Extraktion werden die Adsorberpartikel erst mit H₂O gespült, dann mit Isooctan konditioniert und erneut mit H₂O gespült. Die vorbereiteten Adsorber werden zuvor in dem für die Hauptkultur zu verwendenden 500 mL-Schüttelkolben autoklaviert und das Kulturmedium unter sterilen Bedingungen hinzugegeben. In einem 500 mL-Schüttelkolben aus Glas mit vier Schikanen wird die Hauptkultur mit 50 mL DA-Medium (siehe Tabelle 17) auf eine OD_{600} von 0,1 rel. AU mit der Vorkultur inokuliert und bei 37 °C und 180 rpm bis zur Induktion inkubiert.

Bei einer OD_{600} von 0,5 – 0,8 rel. AU wird die Proteinexpression mit der IPTG-Stammlösung (siehe Tabelle 12) auf eine Konzentration von 0,5 mM induziert. Für eine Flüssigphasen-Extraktion werden nach der Induktion 5 mL Isooctan zur Kultur hinzugegeben. Die Kultur wird bei 20 °C und 180 rpm inkubiert.

Es werden zu Beginn der Induktion sowie nach 24 und 48 h Proben zur Analyse der optischen Dichte, Biotrockenmasse und der Terpenbildung entnommen. Die Proben zur Analyse der Terpenbildung werden von der Oberfläche der Kultur entnommen. Die Probe wird zentrifugiert (14.000 x g, RT, 5 min), 80 µL der organischen Phase in ein 1,5 mL GC-Fläschchen mit einem kleinen Einsatz (200 µL) überführt und über GC-FID gemessen. Zusätzlich werden wie in Kapitel 7.3.1 beschrieben Proben für eine SDS-PAGE-Analyse entnommen, um die lösliche und unlösliche Zellfraktion zu untersuchen.

7.3.3 Fed-batch-Kultivierung von *E. coli* SHuffle T7 pPTS+pMEV im Bioreaktor

Der *E. coli* SHuffle T7 pPTS+pMEV wird im Bioreaktor nach folgender Vorschrift kultiviert. Für die erste Vorkultur werden in einem 50 mL-Zentrifugenröhrchen 20 mL LB-Medium und Carbenicillin ($50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) und Chloramphenicol ($34 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) als Selektionsmarker mit einem Kryo-Stock des Stammes inokuliert für etwa 8 h bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD_{600} von 4 – 5 rel. AU inkubiert.

In einem 500mL-Schüttelkolben mit vier Schikanen wird die zweite Vorkultur in 100 mL DA-Medium (siehe Tabelle 17) und Carbenicillin ($50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) und Chloramphenicol ($34 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) als Selektionsmarker, mit der ersten Vorkultur auf eine OD_{600} von 0,1 rel. AU inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert.

Für eine Festphasen-Extraktion werden die Adsorberpartikel erst mit H_2O gespült, dann mit Isooctan konditioniert und erneut mit H_2O gespült. Die Hauptkultur wird in 1,8 L DA-Medium in einem 2 L-Rührkesselreaktor durchgeführt. Zur in situ Isolierung der gebildeten Terpene wird der Kultur $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Diaion® HP-20 hinzugegeben. Die Einstellung des pH-Wertes auf pH 6,75 erfolgt durch Zugabe von 1 M HCl und 25%iger Ammoniaklösung. Die Begasung wird mit 1 vvm Druckluft durchgeführt. Die Rührergeschwindigkeit erfolgt kaskadierend (400 – 700 rpm), sodass ein Sauerstoffpartialdruck von 30 % nicht unterschritten wird.

Der Bioreaktor wird mit der Vorkultur auf eine OD_{600} von 0,1 rel. AU inokuliert und bei 37 °C inkubiert. Bei einer OD_{600} von etwa 0,8 rel. AU wird die Proteinexpression mit 3 mL der IPTG-Stammlösung (siehe Tabelle 12) induziert. Die batch-Phase beginnt mit der Inokulation bis zu einer anfänglichen OD_{600} von 4,0 – 5,0 rel. AU. Bei Glucoseverbrauch wird die fed-batch-Phase begonnen indem die Temperatur auf 20 °C gesenkt und eine Feedlösung des DA-Mediums (siehe

Tabelle 24) mit $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Glucose kontinuierlich zugeführt wird. Nach Erreichen von $20 \text{ }^\circ\text{C}$, wird die Proteinexpression durch Induktion mit der IPTG-Stammlösung auf eine Konzentration von $0,5 \text{ mM}$ gestartet. Die Kultur wird für 72 h bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert.

Es werden zu bestimmten Zeiten, Proben zur Analyse der optischen Dichte, Biotrockenmasse, Glucose- und Acetatkonzentration und der Terpenbildung (GC-FID und GC-MS) entnommen. Zusätzlich werden, wie in Kapitel 7.3.1 beschrieben, Proben für eine SDS-PAGE-Analyse entnommen, um die lösliche und unlösliche Zellfraktion zu untersuchen. Zur Analyse der Terpenbildung werden Proben mit Adsorber entnommen. Die Adsorber werden dreimal mit ddH_2O gewaschen. Die Sesquiterpene werden anschließend dreimal mit Isooctan für GC-FID-Messungen durch 60 s heftiges Schütteln extrahiert. Dabei ist das Verhältnis von Gewicht der entnommenen Adsorber 1:1 zum Volumen des eingesetzten Extraktionsmittels. Die gesammelten Extraktionsfraktionen werden für 60 s stehengelassen und anschließend wird $80 \text{ }\mu\text{L}$ der organischen Phase in ein $1,5 \text{ mL}$ GC-Fläschchen mit einem kleinen Einsatz ($200 \text{ }\mu\text{L}$) überführt und über GC-FID gemessen. Nach 48 h Kultivierung werden die Adsorber aus der Kulturbühe entfernt und dreimal mit Lösemittel extrahiert. Die organische Phase wird dann in ein $1,5 \text{ mL}$ GC-Fläschchen mit einem kleinen Einsatz ($200 \text{ }\mu\text{L}$) überführt und über GC-FID und GC-MS gemessen. Für GC-FID-Messungen wird Isooctan und für die GC-MS-Messungen Pentan als Extraktionsmittel verwendet.

7.3.4 Probenahme bei Kultivierung von *E. coli* SHuffle T7 pPTS+pMEV

Für die analytischen Untersuchungen werden Proben aus der Kultur zum Zeitpunkt Null (Induktion), 24 , 48 und 72 h entnommen. Die Reihenfolge der Probenahme ist im Folgenden erläutert:

1. OD_{600} : 1 mL Probe zur Messung der optischen Dichte
2. Zellen: normiertes Probenvolumen ($V_{\text{Probe}} = \frac{2}{\text{OD}_{600}}$) entnehmen, zentrifugieren, Zellpellet in $300 \mu\text{L}$ Lagerungspuffer resuspendieren, dreimal mit Isooctan für Untersuchungen im GC-FID extrahieren
3. Medium: 1 mL Probe zentrifugieren und Überstand dreimal mit Isooctan für Untersuchungen im GC-FID extrahieren
4. Glucose: 1 mL Probe zentrifugieren und Überstand am YSI messen
5. Acetat: 1 mL Probe zentrifugieren und Überstand am HPLC messen
6. Biotrockenmasse: 1 mL Probe im zuvor ausgewogenen $1,5$ -Mikroreaktionsgefäß zentrifugieren, Zellpellet nach 48 h Trocknung bei $70 \text{ }^\circ\text{C}$ auswiegen
7. Terpen: 1 mL Probe von der Kulturoberfläche (Lösemittelschicht oder Adsorber) entnehmen

- *Probe mit Lösemittel*: Probe zentrifugieren, obere Lösemittelschicht für Untersuchungen im GC-FID und GC-MS verwenden
- *Probe mit Adsorber*: Die Adsorber mit ddH₂O waschen, dreimal mit Lösemittel für Untersuchungen im GC-FID extrahieren

7.3.5 Bestimmung der Wachstumsparameter

In einer Kultivierung ist das Wachstum einer Komponente, üblicherweise der Kohlenstoffquelle (Substrat), begrenzt. Das Monod-Modell beschreibt einen formalen Zusammenhang zwischen der spezifischen Wachstumsrate μ und dem wachstumslimitierenden Substrat c_S in Form einer Sättigungsfunktion [129, 130]:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{c_S}{c_S + K_S} \quad (1)$$

mit μ : spezifische Wachstumsrate (h^{-1})

μ_{\max} : maximale Wachstumsrate (h^{-1})

c_S : Substratkonzentration (Glycerol/ Glucose) ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

K_S : Sättigungskonstante des limitierenden Substrats ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

Die Substratkonzentration c_S aus dem empirischen Monod-Modell lässt sich mit der Biomasse c_X über den Biomasse-Substrat-Ausbeutekoeffizienten $Y_{X/S}$ verknüpfen:

$$Y_{X/S} = \frac{dc_X}{dc_S} \quad (2)$$

mit $Y_{X/S}$: Biomasse-Substrat-Ausbeutekoeffizient ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

7.4 Zellaufschluss

Für den Zellaufschluss wird die abzentrifugierte Feuchtzellbiomasse im Verhältnis 1:10 im Aufschlusspuffer (siehe Tabelle 26) resuspendiert. Die normierten Proben der Kultivierung werden für den Zellaufschluss mittels Ultraschall-Lyse in 300 μL Aufschlusspuffer resuspendiert.

7.4.1 Ultraschall-Lyse

Für kleinere Volumina (<50 mL) erfolgt der Zellaufschluss durch Ultraschall-Lyse. Die resuspendierten Zellen werden mittels der Ultraschallsonde (Amplitude = 100 %, Zyklus = 0,6 s) lyisiert, während die Probe auf Eis gekühlt wird. Dabei erfolgt die Beschallung 8 x für 30 s mit jeweils 30 s Pause. Danach wird die Probe zentrifugiert und der Überstand für weitere Untersuchungen verwendet.

7.4.2 Microfluidizer

Für größere Volumina (>50 mL) wird ein Microfluidizer zur Zellyse verwendet. Dabei erfolgt der Zellaufschluss über 7 Zyklen bei einem Druck von 9.000 psi. Die Zellsuspension wird dann zentrifugiert und der Überstand für weitere Untersuchungen verwendet.

7.5 Analytik

7.5.1 Bestimmung der optischen Dichte

Die optische Dichte wird bei 600 nm mit Saline (0,9%ige NaCl-Lösung) als Referenz und zur Verdünnung der Proben in einem Photometer gemessen. Der lineare Messbereich liegt unter einem OD₆₀₀-Wert von 0,8.

7.5.2 Bestimmung der Biotrockenmasse

Die Biotrockenmasse wird bestimmt, indem 1 mL der Kulturbrühe in einem zuvor ausgewogenen 1,5 mL-Mikroreaktionsgefäß zentrifugiert und das Zellpellet bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (nach 48 h bei 70 °C) ausgewogen wird.

7.5.3 Bestimmung der Glucosekonzentration

Um den Glucoseverbrauch während der Kultivierung zu bestimmen, wird 1 mL der Kulturbrühe zentrifugiert und die Glucosekonzentration im zellfreien Überstand in einem Glucose Analysator Messgerät gemessen. Dabei sollte die Probe bei einer Glucosekonzentration von über 10 g·L⁻¹ mit ddH₂O verdünnt werden.

7.5.4 Bestimmung der Acetatkonzentration

Die Bestimmung der Acetatkonzentration erfolgt mittels einer HPLC-Methode mit einer Natriumacetat-Standardreihe im Bereich 0 – 10 g·L⁻¹ als Referenz. Dazu wird 1 mL der Kulturbrühe zentrifugiert. Nachdem die Polymersäule (Aminex HPX-87H, Bio-Rad Laboratories, Inc.) im Säulenofen auf 55 °C vortemperiert ist, wird der zellfreie Überstand mit 5 mM Schwefelsäure (H₂SO₄) bei einer Flussrate von 0,6 mL·min⁻¹ isokratisch eluiert. Die Detektion erfolgt mittels Brechungsindexdetektor (LaChrom RI-Detector L-7490, Merck KGaA).

7.5.5 SDS-PAGE

Es werden SDS-PAGE-Gele bestehend aus einem 12%igen Trenngel (siehe Tabelle 36) und einem 6%igen Sammelgel (siehe Tabelle 37) vorbereitet. Die Proben werden vorbereitet, indem sie im Verhältnis von 1:1 mit Laemmli-Puffer (siehe Tabelle 40) vermischt und für 10 min bei 95 °C erhitzt werden. Nach Anzentrifugation werden die Proben in die Taschen pipettiert (Probe = 7 µL

und Größenstandard = 3 μL). Es wird der PageRuler™ Unstained 26614 (10 – 200 kDa) oder der Unstained 26610 (10 – 180 kDa) Größenstandard verwendet.

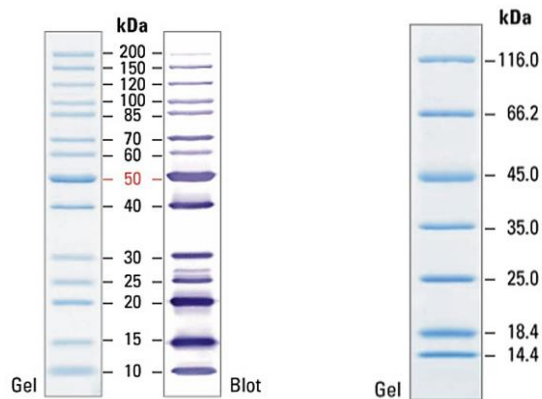


Abbildung 46: Die zu verwendenden Größenstandards für SDS-PAGE-Gele; links: PageRuler™ Unstained 26614 (10 – 200 kDa) Proteinmarker; rechts: PageRuler™ Unstained 26610 (10 – 180 kDa) Proteinmarker.

Das Gel wird in die Probenkammer eingesetzt und mit dem Laufpuffer (1 x TGS-Puffer, nach Tabelle 38) befüllt. Die Proben werden bei einer Spannung von 100 V für 30 min vorfokussiert und durch die Erhöhung der Spannung auf 150 V gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der Lauf ist beendet, sobald die Bromphenolblau-Bande die untere Begrenzung des Gels erreicht hat.

Danach wird das Gel mit ddH₂O gewaschen, 10 min in eine Fixierlösung (siehe Tabelle 42) gelegt und über Nacht in einer kolloidaler Coomassiefärbelösung (siehe Tabelle 41) gelagert. Die Entfärbung erfolgt durch das Waschen mit ddH₂O, bis das Gel wieder klar ist.

7.5.6 Densitometrische Bestimmung der Proteinkonzentration

Die densitometrische Konzentrationsbestimmung wurde über SDS-PAGE mit einer Coomassiefärbung durchgeführt. Dazu wurde auf dem SDS-PAGE-Gel zusätzlich zur Probe, eine BSA-Kalibrationsreihe im Konzentrationsbereich von 0 – 750 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ gemessen. Die Farbraumanalyse erfolgte mit der Software ImageJ.

7.5.7 Bradford-Assay

Die Konzentrationsbestimmung über den Bradford-Assay erfolgt, indem in einer 96-well Mikrotiterplatte jeweils 10 μL Probe und 300 μL der Bradford-Reagenz vermischt werden. Die Platte wird dann für 30 s geschüttelt, für 10 min bei RT inkubiert und die Absorption der Probe bei 595 nm gemessen. Die Konzentration wird bestimmt, indem die Absorption der Proben mit der Absorption einer BSA-Standardreihe verglichen wird.

7.5.8 Proteinaufreinigung mittels FPLC

Die chromatographische Aufreinigung des Histidin-getaggtten Proteins erfolgte mit Hilfe des Proteinaufreinigungssystems ÄKTA™ pure (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Schweden).

7.5.8.1 Metallchelatchromatographie mit Ni²⁺-IMAC-Säule

Die Aufreinigung der PTS erfolgt mithilfe einer mit Ni²⁺ beladenen HiTrap® IMAC FF Chromatographiesäule (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Schweden).

Das Beladen der Säule mit Ni²⁺-Ionen wird nach Herstellerangaben durchgeführt (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Schweden). Die Temperatur des Kühlschranks, indem sich die FPLC-Anlage befindet, wird auf 4 °C eingestellt. Die Pufferlösungen und das zu aufreinigende Zelllysate werden sterilfiltriert (0,2 µm Sterilfilter) und die Pufferlösungen im Ultraschallbad entgast. Die Säule und die zu verwendenden Puffer werden an die FPLC-Anlage angeschlossen. Das Zelllysate (maximal 100 mL) werden in den 150 mL-Superloop geladen. Die FPLC-Anlage und die angeschlossene Säule werden mit Equilibrierungspuffer durchgespült. Anschließend wird die zuvor programmierte Methode (isocratic flow) zur Enzymisolierung gestartet:

Proteinaufreinigung über die IMAC-Säule:

1. Equilibrierung mit Bindungspuffer über 5 min, 3 mL·min⁻¹
2. Beladung mit Zelllysate über 100 mL, 1,5 mL·min⁻¹
3. Waschen mit Bindungspuffer über 30 min, 3 mL·min⁻¹
4. Elutionsstufe 1 mit 90 % Bindungspuffer/10 % Elutionsspuffer über 10 min, 3 mL·min⁻¹
5. Elutionsstufe 2 mit 100 % Elutionsspuffer) über 10 min, 3 mL·min⁻¹
6. Equilibrierung mit Bindungspuffer über 15 min, 2,5 mL·min⁻¹
7. Waschen mit ddH₂O über 5 min, 3 mL·min⁻¹
8. Equilibrierung mit 20%igem Ethanol über 5 min, 3 mL·min⁻¹.

Es werden 50 mL-Proben vom Durchlauf und 2 mL-Proben von den eluierten Fraktionen im Fraktionssammler aufgefangen. Für die SDS-PAGE-Analyse werden von den gesammelten Fraktionen 50 µL-Proben entnommen. Die eluierten Fraktionen werden vereint und in einer Vivaspin® 20 (MWCO 30 kDa) Ultrafiltrationseinheit der Firma Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen überführt. Nach Zentrifugation (4.000 x g, 4 °C, bis zum Dead-Stop-Volumen) wird die Probe weitere zweimal mit 20 mL Lagerungspuffer zentrifugiert. Die restliche Probe wird in ein 2 mL Mikroreaktionsgefäß überführt und die Ultrafiltrationseinheit nochmal mit Lagerungspuffer nachgespült. Die isolierte Enzymlösung wird in 500 µL Aliquots bei -20 °C gelagert.

7.5.8.2 Tandem-Two-Step-Aufreinigung

Für die Tandem-Two-Step-Aufreinigung werden eine mit Ni²⁺ beladene HiTrap[®] IMAC FF Chromatographiesäule (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Schweden) und eine HiPrep[™] 26/10 Desalting Säule (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Schweden) verwendet.

Die Temperatur des Kühlschranks, indem sich die FPLC-Anlage befindet, wird auf 4 °C eingestellt. Die Pufferlösungen und das zu aufreinigende Zelllysate werden sterilfiltriert (0,2 µm Sterilfilter) und die Pufferlösungen im Ultraschallbad entgast. Die Säule und die zu verwendenden Puffer werden an die FPLC-Anlage angeschlossen. Das Zelllysate (maximal 100 mL) werden in den 150 mL-Superloop geladen. Die FPLC-Anlage und die angeschlossene IMAC-Säule werden mit Equilibrierungspuffer durchgespült. Anschließend wird die zuvor programmierte Methode für jeden Reinigungsschritt (IMAC, isocratic flow) mit anschließender Umpufferung über die Größenausschlusschromatographie (SEC) gestartet. Durch eine Methodenwarteschlange (method queue) ist die vollständige Automatisierung gegeben.

Equilibrierung der Desalting-Säule:

1. Equilibrierung der Desalting-Säule mit Bindungspuffer mit 3 CV, 5 mL·min⁻¹

Proteinaufreinigung über die IMAC-Säule:

1. Equilibrierung der IMAC mit Bindungspuffer mit 5 CV, 3 mL·min⁻¹
2. Beladung mit Zelllysate über 100 mL, 1,5 mL·min⁻¹
3. Waschen mit Bindungspuffer mit 15 CV, 2,5 mL·min⁻¹
4. Elutionsstufe 1 mit 90 % Bindungspuffer/10 % Elutionspuffer mit 5 CV, 2,5 mL·min⁻¹
5. Elutionsstufe 2 mit 100 % Elutionspuffer mit 5 CV, 2,5 mL·min⁻¹
6. Equilibrierung mit Bindungspuffer mit 5 CV, 2,5 mL·min⁻¹

Umpufferung über die Desalting-Säule:

1. Elution mit Lagerungspuffer mit 2 CV, 5 mL·min⁻¹

Es werden 50 mL-Proben vom Durchlauf und 2 mL-Proben von den eluierten Fraktionen im Fraktionssammler aufgefangen. Für die SDS-PAGE-Analyse werden von den gesammelten Fraktionen 50 µL-Proben entnommen. Anschließend werden die eluierten Fraktionen vereint. Die isolierte Enzymlösung wird in 500 µL Aliquots bei -20 °C gelagert.

7.5.9 Gaschromatographie

Die GC-FID-Messungen erfolgen an einem Shimadzu GC-2010 plus Gaschromatographen. Dazu wird eine Zebron ZB-WAXplus Kapillarsäule von Phenomenex mit der Filmdicke von 0,25 µm, der Länge von 30 m und der Breite von 0,25 mm verwendet. Für die Messung wird Wasserstoff als Trägergas und ein Flammenionisationsdetektor (300 °C) als Detektor verwendet. Über ein Autosampler werden 2 µL der Probe auf die Säule injiziert (splitless, 240 °C). Die Starttemperatur von 40 °C werden über 20 s beibehalten. Dann wird zunächst mit der Heizrate von 10 °C pro min auf 200 °C aufgeheizt und 30 s auf 200 °C gehalten. Zum Schluss wird weiter auf 230 °C geheizt und über 2 min bei dieser Temperatur gehalten und gemessen.

Die GC-MS-Messungen erfolgen an einem 7890B Gaschromatographen mit einem daran gekoppelten 5977 Massenspektrometer der Firma Agilent Technologies. Dafür wird eine Agilent VF-WAXms Kapillarsäule (polare Säule) oder eine Agilent DB-5MS UI Kapillarsäule (unpolare Säule) eingesetzt. Die Agilent VF-WAXms Kapillarsäule hat eine Filmdicke von 0,25 µm, eine Länge von 30 m und eine Breite von 0,25 mm. Die Agilent DB-5MS UI Kapillarsäule hat eine Filmdicke von 0,25 µm, eine Länge von 30 m und eine Breite von 0,25 mm. Als Trägergas wird Helium mit einer Flussrate von 1,2 mL·min⁻¹ verwendet. Für die Messung werden 2 µL der Probe über einen Autosampler auf die Säule injiziert. Die Starttemperatur von 40 °C werden über 3 min beibehalten. Dann wird mit der Heizrate von 3 °C pro min auf 230 °C aufgeheizt und 10 min auf 230 °C gehalten. Das Quadrupol-Massenspektrometer wird bei 150 °C betrieben. Die Ionenquelle wird dabei auf 230 °C geheizt, um zu gewährleisten, dass die Probe gasförmig ist. Gemessen wird durch die Elektronenionisation bei 70 eV in einem Massenbereich von 33 – 300 amu. Die Massenspektren werden dann über die Software MassHunter Qualitative Analysis (Agilent Technologies, USA) und über die NIST-Spektrendatenbank ausgewertet.

Zur Berechnung der Retentionsindices wird eine Alkanreihe mitgemessen. Die Retentionsindices, auch Kováts-Indices (KI) genannt, werden für die isotherme Gaschromatographie über die folgende Gleichung nach van den Dool und Kratz [131] berechnet:

$$KI = 100 \cdot n + \frac{100 \cdot (t_R^{Analyt} - t_R^n)}{(t_R^N - t_R^n)}$$

Dabei ist n die Anzahl der C-Atome des vor dem Analyten eluierenden Alkans und N die Anzahl der C-Atome des danach eluierenden Alkans. Die Bezeichnung t_R^{Analyt} steht für die Nettoretentionszeit des Analyten, t_R^n für die Nettoretentionszeit des vor dem Analyten eluierenden Alkans sowie t_R^N für die Nettoretentionszeit des danach eluierenden Alkans.

7.5.10 Enzym-Assays

7.5.10.1 Messung der Bioaktivität über GC-FID- und GC-MS-Analysen

Die Biotransformation der gereinigten PTS wird durch die Herstellung einer Mischung aus Umsetzungspuffer, 30 μM *E,E*-FPP und 0,5 μM Enzym (entspricht 0,13 μg PTS) in einem Glasfläschchen mit einem Gesamtvolumen von 500 μL durchgeführt. Die Assays werden mit 150 μL Isooctan (GC-FID) oder Pentan (GC-MS) überschichtet und für 15 min bei 34 °C im Wasserbad inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wird das Gemisch 30 s lang geschüttelt und dann zentrifugiert (14.000 x g, RT, 5 min). Nach der Zentrifugation werden 80 μL der organischen Phase in ein 1,5 mL GC-Fläschchen mit einem kleinen Einsatz (200 μL) überführt. Die Proben werden über GC-FID oder GC-MS gemessen.

7.5.10.2 Temperatur- und pH-Optimierung

Die Optimierung des pH-Wertes für die enzymatische Umsetzungsreaktion wird über die Messung der Produktverhältnisse mit dem optimierten Umsetzungspuffer (siehe Tabelle 32) bei pH 5,6, 5,8, 6,0, 6,4 und 6,6 und 38 °C getestet. Nach der Auswertung des optimalen pH-Wertes wird die Biotransformation auf die optimale Temperatur mit dem Umsetzungspuffer (siehe Tabelle 32) bei 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 °C analysiert. Für jeden Messpunkt wird ein Glasfläschchen mit Umsetzungspuffer, Substrat (*E,E*-FPP = 30 μM) und 0,5 μM Enzym auf ein Gesamtvolumen von 500 μL gefüllt, mit 150 μL Isooctan überschichtet und für 10 min in einem Wasserbad inkubiert. Nachdem die Reaktion durch Schütteln für 30 s gestoppt wurde, wird das Reaktionsvolumen zentrifugiert (14.000 x g, RT, 5 min), 80 μL der organischen Phase in ein GC-Fläschchen übertragen und über GC-FID gemessen (siehe Kapitel 7.5.10.1).

7.5.10.3 Enzymkinetik

Zur Ermittlung der kinetischen Parameter der isolierten PTS, werden Mastermixes von 2,5 mL Gesamtvolumen mit dem Umsetzungspuffer (siehe Tabelle 32) und 0,5 μM Enzym hergestellt. Die Mastermixes werden in Glasfläschchen mit je 500 μL Reaktionsvolumen aufgeteilt. Um die Reaktion zu starten, werden verschiedene Substratkonzentrationen (1, 5, 20, 30, 50, 80, 100, 150 μM) hinzugefügt. Die Reaktionsgemische werden mit 150 μL Isooctan überlagert und bei 34 °C für 2, 4, 6, 8 und 10 min im Wasserbad inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wird das Gemisch 30 s geschüttelt und zentrifugiert (14.000 x g, RT, 5 min). Nach Zentrifugation werden 80 μL der organischen Phase in ein 1,5 mL GC-Fläschchen mit einem kleinen Einsatz (200 μL) überführt. Die Proben werden mittels GC-FID gemessen.

8 ERGÄNZENDE DATEN

8.1 Chromatographische Aufreinigung der PTS über eine Ni²⁺-IMAC-Säule

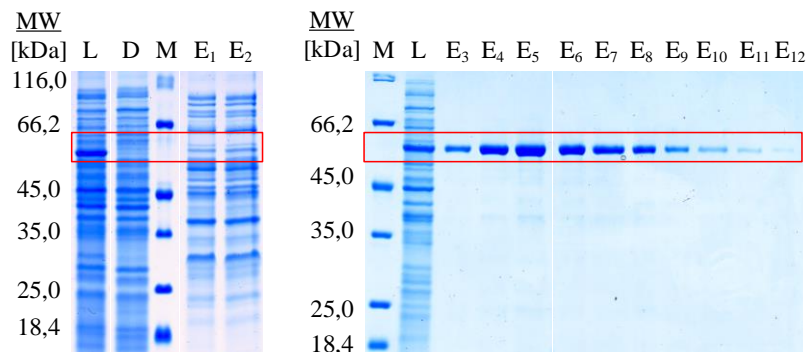


Abbildung 47: SDS-PAGE-Analyse der PTS-Aufreinigung mittels einer Ni²⁺-IMAC-Säule über einen linearen Gradienten (50 – 500 mM Imidazol). 6%iges Sammelgel und 12%iges Trenngel mit Coomassiefärbung; MW = Molekulargewicht in kDa, M = Größenstandard, L = Zellysate; D = Durchflussfraktionen; E₁ – E₂ = Elutionsfraktionen mit 10 – 50 mM Imidazol; E₃ – E₁₂ = Elutionsfraktionen mit 50 – 250 mM Imidazol. Die Laufhöhe der PTS-Bande ist umrandet. Zur übersichtlichen Darstellung wurden die Banden zusammengeschnitten.

8.2 Gaschromatogramme der Umsetzung alternativer Substrate

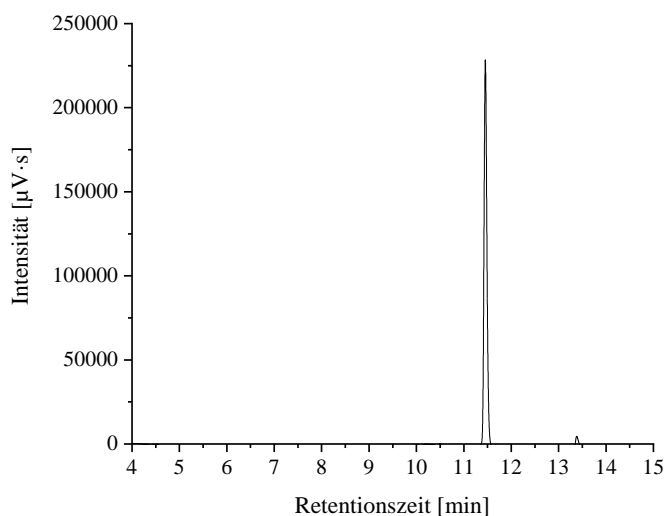


Abbildung 48: Gaschromatogramm des Produktes aus der Umsetzung der Struktur 1 aus Abbildung 24 mit der PTS.

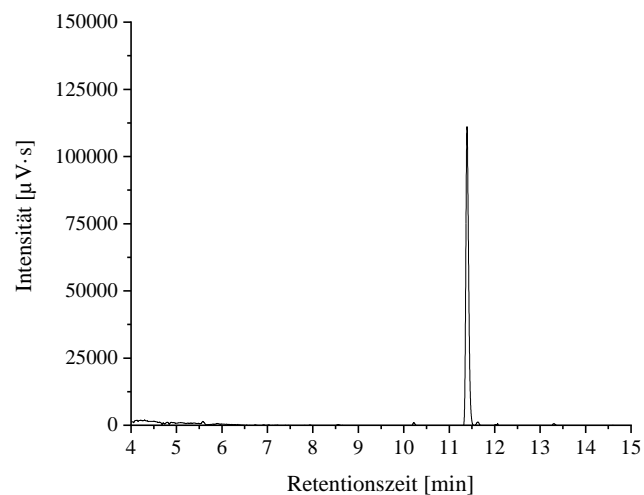


Abbildung 49: Gaschromatogramm des Produktes aus der Umsetzung der Struktur 2 aus Abbildung 24 mit der PTS.

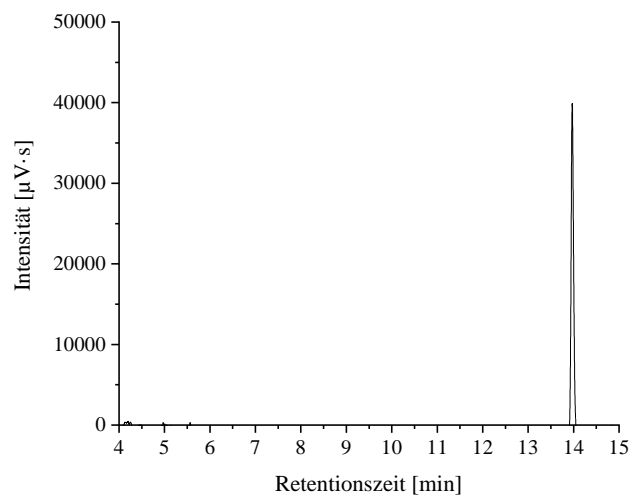


Abbildung 50: Gaschromatogramm des Produktes aus der Umsetzung der Struktur 3 aus Abbildung 24 mit der PTS.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] S. Hartwig *et al.*, “Expression, purification and activity assay of a patchoulol synthase cDNA variant fused to thioredoxin in *Escherichia coli*,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 97, pp. 61–71, May 2014, doi: 10.1016/j.pep.2014.02.003.
- [2] T. Frister *et al.*, “Characterisation of a Recombinant Patchoulol Synthase Variant for Biocatalytic Production of Terpenes,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 176, no. 8, pp. 2185–2201, Aug. 2015, doi: 10.1007/s12010-015-1707-y.
- [3] T. Brocksom, K. de Oliveira, and A. Desiderá, “The Chemistry of the Sesquiterpene Alkaloids,” *J. Braz. Chem. Soc.*, 2017, doi: 10.21577/0103-5053.20170049.
- [4] R. G. Berger, Ed., *Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability*. Springer Science & Business Media, 2007.
- [5] P. M. Dewick, *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach: Third Edition*, vol. 5. 2009.
- [6] A. Chodoeva, J.-J. Bosc, and J. Robert, “Aconitum Alkaloids and Biological Activities,” in *Natural Products*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013, pp. 1503–1523.
- [7] G. Lyss, T. J. Schmidt, I. Merfort, and H. L. Pahl, “Helenalin, an Anti-Inflammatory Sesquiterpene Lactone from Arnica, Selectively Inhibits Transcription Factor NF- κ B,” *Biol. Chem.*, vol. 378, no. 9, Jan. 1997, doi: 10.1515/bchm.1997.378.9.951.
- [8] R. Croteau, R. E. B. Ketchum, R. M. Long, R. Kaspera, and M. R. Wildung, “Taxol biosynthesis and molecular genetics,” *Phytochemistry Reviews*, vol. 5, no. 1. pp. 75–97, Feb. 2006, doi: 10.1007/s11101-005-3748-2.
- [9] V. Hale, J. D. Keasling, N. Renninger, and T. T. Diagana, “Microbially derived artemisinin: A biotechnology solution to the global problem of access to affordable antimalarial drugs,” *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 77, no. SUPPL. 6, pp. 198–202, Dec. 2007, doi: 10.4269/ajtmh.2007.77.198.
- [10] W.-K. Chan, L. Tan, K.-G. Chan, L.-H. Lee, and B.-H. Goh, “Nerolidol: A Sesquiterpene Alcohol with Multi-Faceted Pharmacological and Biological Activities,” *Molecules*, vol. 21, no. 5, p. 529, Apr. 2016, doi: 10.3390/molecules21050529.
- [11] A. Wróblewska-Kurdyk, K. Danciewicz, A. Gliszczynska, and B. Gabrys, “New insight into the behaviour modifying activity of two natural sesquiterpenoids farnesol and

- nerolidol towards *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae),” *Bull. Entomol. Res.*, vol. 110, no. 2, pp. 249–258, Apr. 2020, doi: 10.1017/S0007485319000609.
- [12] B. M. Lange, “Biosynthesis and Biotechnology of High-Value p-Menthane Monoterpenes, Including Menthol, Carvone, and Limonene,” 2015, pp. 319–353.
- [13] B. Ivanescu, A. Miron, and A. Corciova, “Sesquiterpene Lactones from *Artemisia* Genus: Biological Activities and Methods of Analysis,” *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, vol. 2015. Hindawi Publishing Corporation, 2015, doi: 10.1155/2015/247685.
- [14] M. D. Awouafack, P. Tane, V. Kuete, and J. N. Eloff, “Sesquiterpenes from the Medicinal Plants of Africa,” in *Medicinal Plant Research in Africa*, Elsevier, 2013, pp. 33–103.
- [15] D. Tholl, “Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants,” 2015, pp. 63–106.
- [16] J. A. Friesen and V. W. Rodwell, “The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases,” *Genome Biol.*, vol. 5, no. 11, 2004, doi: 10.1186/gb-2004-5-11-248.
- [17] J. D. Newman and J. Chappell, “Isoprenoid biosynthesis in plants: Carbon partitioning within the cytoplasmic pathway,” *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 34, no. 2. pp. 95–106, 1999, doi: 10.1080/10409239991209228.
- [18] D. J. McGarvey and R. Croteau, “Terpenoid metabolism,” *Plant Cell*, vol. 7, no. 7. pp. 1015–1026, Jul. 1995, doi: 10.1105/tpc.7.7.1015.
- [19] T. Kuzuyama, “Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units,” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 66, no. 8, pp. 1619–1627, Jan. 2002, doi: 10.1271/bbb.66.1619.
- [20] E. Cordoba, M. Salmi, and P. León, “Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants,” in *Journal of Experimental Botany*, Jul. 2009, vol. 60, no. 10, pp. 2933–2943, doi: 10.1093/jxb/erp190.
- [21] F. Rohdich *et al.*, “Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: Metabolic role of IspH (LytB) protein,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 3, pp. 1158–1163, Feb. 2002, doi: 10.1073/pnas.032658999.
- [22] F. Rohdich, K. Kis, A. Bacher, and W. Eisenreich, “The non-mevalonate pathway of isoprenoids: Genes, enzymes and intermediates,” *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 5, no. 5. Elsevier Ltd, pp. 535–540, Oct. 01, 2001, doi: 10.1016/S1367-5931(00)00240-4.

- [23] W. Eisenreich, A. Bacher, D. Arigoni, and F. Rohdich, "Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 61, no. 12. Birkhauser Verlag Basel, pp. 1401–1426, 2004, doi: 10.1007/s00018-004-3381-z.
- [24] V. Shanker Dubey, R. Bhalla, and R. Luthra, "An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants," 2003.
- [25] H. W. Heldt and B. Piechulla, *Pflanzenbiochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015.
- [26] J. Hattan *et al.*, "Identification of novel sesquiterpene synthase genes that mediate the biosynthesis of valerianol, which was an unknown ingredient of tea," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, p. 12474, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-30653-w.
- [27] N. Misawa, "Pathway engineering for functional isoprenoids," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 22, no. 5, pp. 627–633, Oct. 2011, doi: 10.1016/j.copbio.2011.01.002.
- [28] D. M. Martin *et al.*, "Functional Annotation, Genome Organization and Phylogeny of the Grapevine (*Vitis vinifera*) Terpene Synthase Gene Family Based on Genome Assembly, FLcDNA Cloning, and Enzyme Assays," *BMC Plant Biol.*, vol. 10, no. 1, p. 226, 2010, doi: 10.1186/1471-2229-10-226.
- [29] H. A. Gennadios *et al.*, "Crystal Structure of (+)- δ -Cadinene Synthase from *Gossypium arboreum* and Evolutionary Divergence of Metal Binding Motifs for Catalysis," *Biochemistry*, vol. 48, no. 26, pp. 6175–6183, Jul. 2009, doi: 10.1021/bi900483b.
- [30] C. M. Starks, "Structural Basis for Cyclic Terpene Biosynthesis by Tobacco 5-Epi-Aristolochene Synthase," *Science (80-.)*, vol. 277, no. 5333, pp. 1815–1820, Sep. 1997, doi: 10.1126/science.277.5333.1815.
- [31] C. L. Steele, J. Crock, J. Bohlmann, and R. Croteau, "Sesquiterpene Synthases from Grand Fir (*Abies grandis*)," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 4, pp. 2078–2089, Jan. 1998, doi: 10.1074/jbc.273.4.2078.
- [32] A. Vattekkatte, S. Garms, W. Brandt, and W. Boland, "Enhanced structural diversity in terpenoid biosynthesis: enzymes, substrates and cofactors," *Org. Biomol. Chem.*, vol. 16, no. 3, pp. 348–362, 2018, doi: 10.1039/C7OB02040F.
- [33] S. Alemdar, J. C. König, S. Hartwig, T. Frister, T. Scheper, and S. Beutel, "Bioproduction of α -humulene in metabolically engineered *Escherichia coli* and application in zerumbone synthesis," *Eng. Life Sci.*, vol. 17, no. 8, pp. 900–907, 2017, doi: 10.1002/elsc.201700043.

- [34] F. Aguilar, S. Hartwig, T. Scheper, and S. Beutel, “Catalytical Specificity, Reaction Mechanisms, and Conformational Changes during Catalysis of the Recombinant SUMO (+)-Zizaene Synthase from *Chrysopogon zizanioides*,” *ACS Omega*, vol. 4, no. 4, pp. 6199–6209, Apr. 2019, doi: 10.1021/acsomega.9b00242.
- [35] J. Degenhardt, T. G. Köllner, and J. Gershenzon, “Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants,” *Phytochemistry*, vol. 70, no. 15–16, pp. 1621–1637, 2009, doi: 10.1016/j.phytochem.2009.07.030.
- [36] K. Ekramzadeh *et al.*, “Optimization of factors influencing enzyme activity and product selectivity and the role of proton transfer in the catalytic mechanism of patchoulol synthase,” *Biotechnol. Prog.*, no. October, pp. 1–11, 2019, doi: 10.1002/btpr.2935.
- [37] F. Deguerry, L. Pastore, S. Wu, A. Clark, J. Chappell, and M. Schalk, “The diverse sesquiterpene profile of patchouli, *Pogostemon cablin*, is correlated with a limited number of sesquiterpene synthases,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 454, no. 2, pp. 123–136, 2006, doi: 10.1016/j.abb.2006.08.006.
- [38] J. A. Faraldos, S. Wu, J. Chappell, and R. M. Coates, “Doubly deuterium-labeled patchouli alcohol from cyclization of singly labeled [2-2H 1]farnesyl diphosphate catalyzed by recombinant patchoulol synthase,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, no. 9, pp. 2998–3008, 2010, doi: 10.1021/ja909251r.
- [39] W. M. C. da Silva *et al.*, “Exploring Plant Sesquiterpene Diversity by Generating Chemical Networks,” *Processes*, vol. 7, no. 4, p. 240, 2019, doi: 10.3390/pr7040240.
- [40] S. L. Munck and R. Croteau, “Purification and characterization of the sesquiterpene cyclase patchoulol synthase from *Pogostemon cablin*,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 282, no. 1, pp. 58–64, 1990, doi: 10.1016/0003-9861(90)90086-E.
- [41] C. A. Lesburg, J. M. Caruthers, C. M. Paschall, and D. W. Christianson, “Managing and manipulating carbocations in biology : terpenoid cyclase structure and mechanism Charles A Lesburg *, Jonathan M Carutherst , Chiana M Paschallt and,” *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 8, pp. 695–703, 1998.
- [42] L. A. Wessjohann, J. Keim, B. Weigel, and M. Dippe, “Alkylating enzymes,” *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 17, no. 2, pp. 229–235, 2013, doi: 10.1016/j.cbpa.2013.02.016.
- [43] T. H. W. Frister, “Herstellung , Charakterisierung und Anwendung einer rekombinanten Patchoulolsynthase zur biokatalytischen Herstellung von Sesquiterpenen,” 2015.

- [44] G. Scalcinati *et al.*, “Dynamic control of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* engineered for the production of plant sesquiterpene α -santalene in a fed-batch mode,” *Metab. Eng.*, vol. 14, no. 2, pp. 91–103, 2012, doi: 10.1016/j.ymben.2012.01.007.
- [45] V. Sundaresan *et al.*, “Composition and Comparison of Essential Oils of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. (Patchouli) and *Pogostemon travancoricus* Bedd. var. *travancoricus*,” *J. Essent. Oil Res.*, vol. 21, no. 3, pp. 220–222, May 2009, doi: 10.1080/10412905.2009.9700152.
- [46] S. AG, “Die Anbauspezialisten - Symrise Geschäftsbericht 2017/18,” 2018. [Online]. Available: <https://ub2018.symrise.de/magazin/die-anbauspezialisten>.
- [47] F. Adam, A. B. Siti Hana, M. M. Yusoff, and S. N. Tajuddin, “Molecular dynamic simulation of the patchouli oil extraction process,” *J. Chem. Eng. Data*, vol. 59, no. 2, pp. 183–188, 2014, doi: 10.1021/je3013292.
- [48] M. K. Swamy and U. R. Sinniah, “A comprehensive review on the phytochemical constituents and pharmacological activities of *Pogostemon cablin* Benth.: An aromatic medicinal plant of industrial importance,” *Molecules*, vol. 20, no. 5, pp. 8521–8547, 2015, doi: 10.3390/molecules20058521.
- [49] T. A. van Beek and D. Joulain, “The essential oil of patchouli, *Pogostemon cablin*: A review,” *Flavour Fragr. J.*, vol. 33, no. 1, pp. 6–51, 2018, doi: 10.1002/ffj.3418.
- [50] R. Y. Robert Tisserand, *Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals*. Churchill Livingstone, 2013.
- [51] D. Rahmayanti, R. A. Hadiguna, S. Santosa, and N. Nazir, “Determining The Profit Margin In ‘Patchouli Oil’ Supply Chain: A Case Study In Indonesia,” *Int. J. Adv. Sci. Eng. Inf. Technol.*, vol. 8, no. 2, p. 483, 2018, doi: 10.18517/ijaseit.8.2.3485.
- [52] S. Caiger, “Essential Oils And Oleoresins,” 2016.
- [53] G. Hu, C. Peng, X. Xie, S. Zhang, and X. Cao, “Availability, Pharmaceutics, Security, Pharmacokinetics, and Pharmacological Activities of Patchouli Alcohol,” *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2017. Hindawi Limited, 2017, doi: 10.1155/2017/4850612.
- [54] Henkel AG & Co. KGaA, “Mittel gegen Mikroorganismen enthaltend Patchouliöl, Patchoulialkohol und/oder dessen Derivate,” 2004.
- [55] T. Alberti, W. Barbosa, J. Vieira, N. Raposo, and R. Dutra, “(–)- β -Caryophyllene, a CB2

- Receptor-Selective Phytocannabinoid, Suppresses Motor Paralysis and Neuroinflammation in a Murine Model of Multiple Sclerosis,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 4, p. 691, Apr. 2017, doi: 10.3390/ijms18040691.
- [56] Susan A. Irvine, *Perfume: The Creation & Allure of Classic Fragrances*. Haldone mason Ltd, 1995.
- [57] T. Frister and S. Beutel, “Moschusduft und Patchouliöl,” *Chemie unserer Zeit*, vol. 49, no. 5, pp. 294–301, Oct. 2015, doi: 10.1002/ciuz.201500676.
- [58] Haarman and Reimer, Ed., *H&R Fragrance Guide/Duftatlas/Atlas Olfactif*. Quensen & Oudras Verlag, 2000.
- [59] N. Groom, *The New Perfume Handbook*. Blackie Academic & Professional, 1997.
- [60] World Bank, “Agriculture for Development,” 2008. doi: 10.1596/978-0-8213-7233-3.
- [61] P. Kaushik, “Pogostemon cablin : Research Perspectives for Authentication , Productivity Enhancement and Value Addition,” no. April, 2002, doi: 10.13140/2.1.4437.2809.
- [62] S. Maxwell and A. Fernando, “Cash crops in developing countries,” vol. 17, no. 11, pp. 1677–1708, 1989.
- [63] N. A. Henke *et al.*, “Patchoulol production with metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*,” *Genes (Basel)*, vol. 9, no. 4, pp. 1–15, 2018, doi: 10.3390/genes9040219.
- [64] M. Hunter, *Essential Oils: Art, Agriculture, Science, Industry and Entrepreneurship: a Focus on the Asia-pacific Region*. Nova Scientific Publishers, 2009.
- [65] A. Srikrishna and G. Satyanarayana, “An enantiospecific total synthesis of (-)-patchouli alcohol,” *Tetrahedron Asymmetry*, vol. 16, no. 24, pp. 3992–3997, Dec. 2005, doi: 10.1016/j.tetasy.2005.11.012.
- [66] F. Näf and G. Ohloff, “A Short Stereoselective Total Synthesis of Racemic Patchouli Alcohol. Preliminary communication,” *Helv. Chim. Acta*, vol. 57, no. 6, pp. 1868–1870, 1974, doi: 10.1002/hlca.19740570637.
- [67] T. V. Magee, G. Stork, and P. Fludzinski, “A total synthesis of rac-patchouli alcohol,” *Tetrahedron Lett.*, vol. 36, no. 42, pp. 7607–7610, Oct. 1995, doi: 10.1016/0040-4039(95)01634-T.
- [68] J. Kirby and J. D. Keasling, “Metabolic engineering of microorganisms for isoprenoid

- production,” *Natural Product Reports*, vol. 25, no. 4. pp. 656–661, 2008, doi: 10.1039/b802939c.
- [69] J. D. Keasling, “Synthetic biology and the development of tools for metabolic engineering,” *Metab. Eng.*, vol. 14, no. 3, pp. 189–195, May 2012, doi: 10.1016/j.ymben.2012.01.004.
- [70] J. Zhou, G. Du, and J. Chen, “Novel fermentation processes for manufacturing plant natural products,” *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 25. pp. 17–23, 2014, doi: 10.1016/j.copbio.2013.08.009.
- [71] P. K. G. Ohloff, W. Pickenhagen, *Scent and chemistry: the molecular world of odors*, 1st. ed. Helvetica Chimica Acta, Wiley-VCH, 2011.
- [72] P. Kraft, “Spirocyclicketols and their use,” US7632791B2, 2009.
- [73] S. Beutel, “Aspekte der synthetischen Biotechnologie,” 2017.
- [74] L. Daviet and M. Schalk, “Biotechnology in plant essential oil production: progress and perspective in metabolic engineering of the terpene pathway,” *Flavour Fragr. J.*, vol. 25, no. 3, pp. 123–127, May 2010, doi: 10.1002/ffj.1981.
- [75] B. S. R. Clery, S. Dossenbach, D. Lelievre, “Perfume compositions,” WO 2017/050971 A1, 2017.
- [76] W. Wu, F. Liu, and R. W. Davis, “Engineering *Escherichia coli* for the production of terpene mixture enriched in caryophyllene and caryophyllene alcohol as potential aviation fuel compounds,” *Metab. Eng. Commun.*, vol. 6, pp. 13–21, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.meteno.2018.01.001.
- [77] P. P. Peralta-Yahya, M. Ouellet, R. Chan, A. Mukhopadhyay, J. D. Keasling, and T. S. Lee, “Identification and microbial production of a terpene-based advanced biofuel,” *Nat. Commun.*, vol. 2, no. 1, p. 483, Sep. 2011, doi: 10.1038/ncomms1494.
- [78] K. J. Lauersen *et al.*, “Efficient phototrophic production of a high-value sesquiterpenoid from the eukaryotic microalga *Chlamydomonas reinhardtii*,” *Metab. Eng.*, vol. 38, pp. 331–343, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.ymben.2016.07.013.
- [79] V. J. J. Martin, Y. Yoshikuni, and J. D. Keasling, “The in vivo synthesis of plant sesquiterpenes by *Escherichia coli*,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 75, no. 5, pp. 497–503, Dec. 2001, doi: 10.1002/bit.10037.
- [80] F. A. Cascante, “Development of the biotechnological production of (+) -zizaene :

- Enzymology , metabolic engineering and in situ product recovery,” 2019.
- [81] F. Aguilar, T. Scheper, and S. Beutel, “Modulating the Precursor and Terpene Synthase Supply for the Whole-Cell Biocatalytic Production of the Sesquiterpene (+)-Zizaene in a Pathway Engineered *E. coli*,” *Genes (Basel)*, vol. 10, no. 6, p. 478, Jun. 2019, doi: 10.3390/genes10060478.
- [82] F. Aguilar, T. Scheper, and S. Beutel, “Improved Production and In Situ Recovery of Sesquiterpene (+)-Zizaene from Metabolically-Engineered *E. coli*,” *Molecules*, vol. 24, no. 18, p. 3356, Sep. 2019, doi: 10.3390/molecules24183356.
- [83] H. Schewe, M. A. Mirata, and J. Schrader, “Bioprocess Engineering for Microbial Synthesis and Conversion of Isoprenoids,” 2015, pp. 251–286.
- [84] K. Schügerl and J. Hubbuch, “Integrated bioprocesses,” *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 8, no. 3, pp. 294–300, Jun. 2005, doi: 10.1016/j.mib.2005.01.002.
- [85] S. Hartwig, “Biokatalytische Wege zur Darstellung funktioneller Sesquiterpene,” 2006.
- [86] C. Willrodt, C. David, S. Cornelissen, B. Bühler, M. K. Julsing, and A. Schmid, “Engineering the productivity of recombinant *Escherichia coli* for limonene formation from glycerol in minimal media,” *Biotechnol. J.*, vol. 9, no. 8, pp. 1000–1012, Aug. 2014, doi: 10.1002/biot.201400023.
- [87] B. A. Boghigian, M. Myint, J. Wu, and B. A. Pfeifer, “Simultaneous production and partitioning of heterologous polyketide and isoprenoid natural products in an *Escherichia coli* two-phase bioprocess,” *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 38, no. 11, pp. 1809–1820, Nov. 2011, doi: 10.1007/s10295-011-0969-9.
- [88] U. Krings, M. Kelch, and R. G. Berger, “Adsorbents for the recovery of aroma compounds in fermentation processes,” *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 58, no. 3, pp. 293–299, Apr. 2007, doi: 10.1002/jctb.280580314.
- [89] B. E. Jackson, E. A. Hart-Wells, and S. P. T. Matsuda, “Metabolic Engineering to Produce Sesquiterpenes in Yeast,” *Org. Lett.*, vol. 5, no. 10, pp. 1629–1632, May 2003, doi: 10.1021/ol034231x.
- [90] S. Noll *et al.*, “Gezielte Optimierung von *Escherichia coli* BL21(DE3),” *BioSpektrum*, vol. 19, no. 2, pp. 211–213, 2013, doi: 10.1007/s12268-013-0292-2.
- [91] C. Brämer, K. Ekramzadeh, F. Lammers, T. Scheper, and S. Beutel, “Optimization of continuous purification of recombinant patchoulol synthase from *Escherichia coli* with

- membrane adsorbers,” *Biotechnol. Prog.*, vol. 35, no. 4, Jul. 2019, doi: 10.1002/btpr.2812.
- [92] J. Porath, “Immobilized metal ion affinity chromatography,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 3, no. 4, pp. 263–281, Aug. 1992, doi: 10.1016/1046-5928(92)90001-D.
- [93] E. K. . Ueda, P. . Gout, and L. Morganti, “Current and prospective applications of metal ion–protein binding,” *J. Chromatogr. A*, vol. 988, no. 1, pp. 1–23, Feb. 2003, doi: 10.1016/S0021-9673(02)02057-5.
- [94] S. Alemdar, “Entwicklung einer biotechnologischen Produktionsstrategie für das Sesquiterpenoid Zerumbon,” 2018.
- [95] C. Oberhauser *et al.*, “Exploiting the Synthetic Potential of Sesquiterpene Cyclases for Generating Unnatural Terpenoids,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 57, no. 36, pp. 11802–11806, 2018, doi: 10.1002/anie.201805526.
- [96] N. E. Good, G. D. Winget, W. Winter, T. N. Connolly, S. Izawa, and R. M. M. Singh, “Hydrogen Ion Buffers for Biological Research *,” *Biochemistry*, vol. 5, no. 2, pp. 467–477, Feb. 1966, doi: 10.1021/bi00866a011.
- [97] S. Lindman, W. F. Xue, O. Szczepankiewicz, M. C. Bauer, H. Nilsson, and S. Linse, “Salting the charged surface: pH and salt dependence of protein G B1 stability,” *Biophys. J.*, vol. 90, no. 8, pp. 2911–2921, 2006, doi: 10.1529/biophysj.105.071050.
- [98] G. Buchi and W. D. Macleod, “Synthesis of Patchouli Alcohol,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 84, no. 16, pp. 3205–3206, Aug. 1962, doi: 10.1021/ja00875a047.
- [99] M. V Trivedi, J. S. Laurence, and T. J. Siahaan, “The role of thiols and disulfides on protein stability.,” *Curr. Protein Pept. Sci.*, vol. 10, no. 6, pp. 614–25, Dec. 2009, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19538140>.
- [100] N. A. Rusdi, H. H. Goh, S. Sabri, A. B. Ramzi, N. M. Noor, and S. N. Baharum, “Functional characterisation of new sesquiterpene synthase from the Malaysian herbal plant, *polygonum minus*,” *Molecules*, vol. 23, no. 6, p. 1370, 2018, doi: 10.3390/molecules23061370.
- [101] A. Bar-Even *et al.*, “The Moderately Efficient Enzyme: Evolutionary and Physicochemical Trends Shaping Enzyme Parameters,” *Biochemistry*, vol. 50, no. 21, pp. 4402–4410, May 2011, doi: 10.1021/bi2002289.
- [102] A. Bar-Even, R. Milo, E. Noor, and D. S. Tawfik, “The Moderately Efficient Enzyme: Futile Encounters and Enzyme Floppiness,” *Biochemistry*, vol. 54, no. 32, pp. 4969–4977,

- Aug. 2015, doi: 10.1021/acs.biochem.5b00621.
- [103] A. Liese, L. Hilterhaus, M. Howaldt, and H. Chmiel, “Enzymkinetik,” in *Bioprozessstechnik*, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2011, pp. 67–97.
- [104] R. Krull, D. C. Hempel, and T. Wucherpennig, “Bioverfahrenstechnik,” in *Dubbel*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2018, pp. 990–1012.
- [105] M. Kraume, “Grundlagen der Transportprozesse,” in *Transportvorgänge in der Verfahrenstechnik*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012, pp. 3–53.
- [106] Y. Tang, L. Zhong, X. Wang, H. Zheng, and L. Chen, “Molecular identification and expression of sesquiterpene pathway genes responsible for patchoulol biosynthesis and regulation in *Pogostemon cablin*,” *Bot. Stud.*, vol. 60, no. 1, p. 11, Dec. 2019, doi: 10.1186/s40529-019-0259-9.
- [107] C. J. Paddon and J. D. Keasling, “Semi-synthetic artemisinin: a model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 12, no. 5, pp. 355–367, May 2014, doi: 10.1038/nrmicro3240.
- [108] M. Schalk, “Method for producing beta-santalene,” 2017.
- [109] F. Tange, Thomas; Klein, Jens; Brianza, “Production of terpenes, terpenoids, and derivatives thereof in recombinant hosts,” 2007.
- [110] Jeffrey H. Miller, *Experiments in Molecular Genetics*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972.
- [111] C. Wang *et al.*, “Farnesol production from *Escherichia coli* by harnessing the exogenous mevalonate pathway,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 107, no. 3, pp. 421–429, Oct. 2010, doi: 10.1002/bit.22831.
- [112] J. Lobstein, C. A. Emrich, C. Jeans, M. Faulkner, P. Riggs, and M. Berkmen, “SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm,” *Microb. Cell Fact.*, vol. 11, no. 1, p. 753, Dec. 2012, doi: 10.1186/1475-2859-11-56.
- [113] C. H. Schein and M. H. M. Noteborn, “Formation of Soluble Recombinant Proteins in *Escherichia Coli* is Favored by Lower Growth Temperature,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 6, no. 3, pp. 291–294, Mar. 1988, doi: 10.1038/nbt0388-291.
- [114] L. M. Stancik, D. M. Stancik, B. Schmidt, D. M. Barnhart, Y. N. Yoncheva, and J. L. Slonczewski, “pH-Dependent Expression of Periplasmic Proteins and Amino Acid

- Catabolism in *Escherichia coli*,” *J. Bacteriol.*, vol. 184, no. 15, pp. 4246–4258, Aug. 2002, doi: 10.1128/JB.184.15.4246-4258.2002.
- [115] L. B. Rodríguez-Aparicio, A. Reglero, A. I. Ortiz, and J. M. Luengo, “Effect of physical and chemical conditions on the production of colominic acid by *Escherichia coli* in a defined medium,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 27, no. 5–6, pp. 474–483, Feb. 1988, doi: 10.1007/BF00451616.
- [116] D. J. Korz, U. Rinas, K. Hellmuth, E. A. Sanders, and W.-D. Deckwer, “Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*,” *J. Biotechnol.*, vol. 39, no. 1, pp. 59–65, Feb. 1995, doi: 10.1016/0168-1656(94)00143-Z.
- [117] P. J. Westfall and T. S. Gardner, “Industrial fermentation of renewable diesel fuels,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 22, no. 3, pp. 344–350, Jun. 2011, doi: 10.1016/j.copbio.2011.04.023.
- [118] J. L. E. Morrish and A. J. Daugulis, “Improved reactor performance and operability in the biotransformation of carveol to carvone using a solid-liquid two-phase partitioning bioreactor,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 101, no. 5, pp. 946–956, Dec. 2008, doi: 10.1002/bit.21957.
- [119] M. C. Cuellar and A. J. J. Straathof, “Improving Fermentation by Product Removal,” in *Intensification of Biobased Processes*, 2018, pp. 86–108.
- [120] M. Gehrke, U. Krings, and R. G. Berger, “Selective recovery of volatile flavour compounds using reversed-phase polystyrene adsorbents,” *Flavour Fragr. J.*, vol. 15, no. 2, pp. 108–114, 2000, doi: 10.1002/(SICI)1099-1026(200003/04)15:2<108::AID-FFJ876>3.0.CO;2-4.
- [121] J. Alonso-Gutierrez *et al.*, “Metabolic engineering of *Escherichia coli* for limonene and perillyl alcohol production,” *Metab. Eng.*, vol. 19, pp. 33–41, Sep. 2013, doi: 10.1016/j.ymben.2013.05.004.
- [122] M. A. Mirata, D. Heerd, and J. Schrader, “Integrated bioprocess for the oxidation of limonene to perillic acid with *Pseudomonas putida* DSM 12264,” *Process Biochem.*, vol. 44, no. 7, pp. 764–771, Jul. 2009, doi: 10.1016/j.procbio.2009.03.013.
- [123] R. Ranjan *et al.*, “Adsorption of fermentation inhibitors from lignocellulosic biomass hydrolyzates for improved ethanol yield and value-added product recovery,” *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 122, no. 1–3, pp. 143–148, Jun. 2009, doi: 10.1016/j.micromeso.2009.02.025.

- [124] J. Wei *et al.*, “Influence of surface wettability on competitive protein adsorption and initial attachment of osteoblasts,” *Biomed. Mater.*, vol. 4, no. 4, p. 045002, Aug. 2009, doi: 10.1088/1748-6041/4/4/045002.
- [125] J. Wang, A. Heerwig, M. R. Lohe, M. Oschatz, L. Borchardt, and S. Kaskel, “Fungi-based porous carbons for CO₂ adsorption and separation,” *J. Mater. Chem.*, vol. 22, no. 28, p. 13911, 2012, doi: 10.1039/c2jm32139d.
- [126] A. Freeman, J. M. Woodley, and M. D. Lilly, “In Situ Product Removal as a Tool for Bioprocessing,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 11, no. 9, pp. 1007–1012, Sep. 1993, doi: 10.1038/nbt0993-1007.
- [127] D. Riesenber *et al.*, “High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate,” *J. Biotechnol.*, vol. 20, no. 1, pp. 17–27, Aug. 1991, doi: 10.1016/0168-1656(91)90032-Q.
- [128] J. Sikkema, J. A. M. De Bont, and B. Poolman, “Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes,” *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 11, pp. 8022–8028, 1994.
- [129] J. Monod, “The Growth of Bacterial Cultures,” *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 3, no. 1, pp. 371–394, Oct. 1949, doi: 10.1146/annurev.mi.03.100149.002103.
- [130] G. Faust, “Reaktionstechnische Untersuchungen zur Herstellung eines hydrophoben Spinnenseidenproteins mit *Escherichia coli*,” 2014.
- [131] H. van Den Dool and P. Dec. Kratz, “A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 11, pp. 463–471, 1963, doi: 10.1016/S0021-9673(01)80947-X.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der Bildung von strukturellen Grundgerüsten verschiedener Terpene.....	7
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Sesquiterpenbiosynthese in Pflanzen.	9
Abbildung 3: Postulierter Mechanismus der Sesquiterpenbildung durch die enzymatische Umsetzung von <i>E,E</i> -FPP mit der PTS nach Faraldos <i>et al.</i> [2, 37, 38, 40].	11
Abbildung 4: Frische (links) und getrocknete (rechts) Blätter der Patchoulipflanze des Anbauprojektes der Symrise AG in Sulawesi [46].	13
Abbildung 5: Strukturen einer Auswahl an bekannten Sesquiterpenen und Sesquiterpenoiden des Patchouliöls.	13
Abbildung 6: Synthetisch hergestelltes spirozyklisches Ketol als Ersatzprodukt zum Patchouliöl [43].	15
Abbildung 7: Kommerziell erhältliches bicyclisches Keton Patchwood [®] als Ersatzprodukt zum Patchouliöl [43].	17
Abbildung 8: Batch-Kultivierung von <i>E. coli</i> BL21(DE3) pPTS im TB-Komplexmedium in einem 2 L-Bioreaktor. Die BTM, OD ₆₀₀ , Temperatur und der pO ₂ sind in Abhängigkeit der Zeit dargestellt. Der Induktionszeitpunkt ist über eine senkrechte, gestrichelte Linie zu erkennen.	22
Abbildung 9: SDS-PAGE-Analyse der löslichen Zellfraktion der batch-Kultivierung von <i>E.</i> <i>coli</i> BL21(DE3) pPTS in TB-Medium im Bioreaktor (RK). 6%iges Sammelgel und 12%iges Trenngel mit Coomassiefärbung; M = Größenstandard, t ₀ = Probe zum Zeitpunkt Null, t ₅ = Probe nach 5 h Kultivierung (Induktion mit IPTG), t ₂₄ = Probe nach 24 h Kultivierung. Die Laufhöhe der PTS-Bande ist umrandet.	23
Abbildung 10: Verhältnis der Bindungsaffinität zur Bindungsspezifität unterschiedlicher Metallspezies zu polyHis-Gruppen [93].	24
Abbildung 11: Links: FPLC-Chromatogramm der PTS-Aufreinigung mittels einer Ni ²⁺ - und Co ²⁺ -IMAC-Säule über einen Stufengradienten. Die Detektion der Proteine wurde über die UV-Absorption bei 280 nm gemessen. Rechts: SDS-PAGE-Analyse der PTS-Aufreinigung über Ni ²⁺ -IMAC (A) und Co ²⁺ -IMAC (B). 6%iges Sammelgel und 12%iges Trenngel mit Coomassiefärbung; MW = Molekulargewicht in kDa, M = Größenstandard, L = Zellysat; D ₁ – D ₂ = Durchflussfraktionen;	

E ₁ – E ₃ = Elutionsfraktionen. Die Laufhöhe der PTS-Bande ist umrandet. Zur übersichtlichen Darstellung wurden die Banden zusammengeschnitten.	25
Abbildung 12: (A) FPLC-Chromatogramm der PTS-Aufreinigung mit einer Ni ²⁺ -IMAC-Säule über einen Stufengradienten. Die Detektion der Proteine wurde über die UV-Absorption bei 280 nm gemessen. (B) SDS-PAGE-Analyse der PTS-Aufreinigung mittels einer Ni ²⁺ -IMAC-Säule. 6%iges Sammelgel und 12%iges Trenngel mit Coomassiefärbung; MW = Molekulargewicht in kDa, M = Größenstandard, L = Zelllysate; D ₁ – D ₃ = Durchflussfraktionen; E ₁ – E ₅ = Elutionsfraktionen der ersten Stufe mit 50 mM Imidazol; E ₆ – E ₉ = Elutionsfraktionen der zweiten Stufe mit 250 mM Imidazol. Die Laufhöhe der PTS-Bande ist umrandet.	27
Abbildung 13: Tandem-Two-Step-Aufreinigung der PTS. (A) FPLC-Chromatogramm der PTS-Aufreinigung über eine Ni ²⁺ -IMAC-Säule und einer zweistufigen Elution mit Imidazol. Das Eluat der zweiten Stufe (grau hinterlegter Bereich) wurde automatisch auf die Desalting-Säule gespült. (B) FPLC-Chromatogramm der Umpufferung des Eluats über die Desalting-Säule; E ₆ – E ₁₅ = Elutionsfraktionen 6 bis 15. Detektion der Proteine bei 280 nm.	29
Abbildung 14: SDS-PAGE-Analyse der Umpufferung über eine Desalting-Säule (B). 6%iges Sammelgel und 12%iges Trenngel mit Coomassiefärbung; MW = Molekulargewicht in kDa, M = Größenstandard, L = Zelllysate; E ₆ – E ₁₅ = Elutionsfraktionen der zweiten Stufe mit 250 mM Imidazol nach der Umpufferung; E ₆₋₁₅ = Vereinte Elutionsfraktionen nach der Umpufferung. Die Laufhöhe der PTS-Bande ist rot umrandet. Zur übersichtlichen Darstellung wurden die Banden zusammengeschnitten.	30
Abbildung 15: Schematische Darstellung der Lösemittelextraktion der Sesquiterpene wie z.B. (-)-Patchoulol in einem Reaktionsgefäß.	31
Abbildung 16: Gaschromatogramm der GC-FID-Messung der enzymatischen Umsetzung von <i>E,E</i> -FPP mit der isolierten PTS sowie der GC-FID-Messung von kommerziell erhältlichem Patchouliöl.	32
Abbildung 17: Ergebnisse des Screenings der Enzymaktivität und (-)-Patchoulolproduktion mit biologischen Puffern bei pH 3,2 - 9,8.	36

Abbildung 18: Ergebnisse der Auswirkung der Pufferkomponenten DTT und NaCl auf die (-)-Patchoulolproduktion. Die Reaktion wurde in einem MES-Puffer bei pH 6,4 und 34 °C durchgeführt.	38
Abbildung 19: Ergebnisse der Prüfung des optimalen pH-Wertes bei 38 °C und der optimalen Temperatur bei pH 6,4 bezogen auf die Enzymaktivität und insbesondere auf die (-)-Patchoulolproduktion. Die Reaktion wurde im MES-Puffer durchgeführt.	39
Abbildung 20: Ergebnisse der pH- und Temperaturabhängigkeit der Produktselektivität bezogen auf die fünf Hauptprodukte des Patchouliöls im MES-Puffer.....	40
Abbildung 21: Auftragung der experimentell ermittelten Reaktionsgeschwindigkeit der rekombinanten PTS in Abhängigkeit von der Substratkonzentration.	42
Abbildung 22: Postulierter Reaktionsmechanismus der PTS, basierend auf [43] und [36].	44
Abbildung 23: Intramolekulare Ringschlussreaktion von <i>E,E</i> -FPP bei Umsetzung mit der PTS.....	46
Abbildung 24: Mit Sauerstoff, Stickstoff und Methylamin funktionalisierte FPP-Analoga, vom Institut für Organische Chemie der Leibniz Universität Hannover zur Verfügung gestellt.....	46
Abbildung 25: Produkte der Biotransformation von funktionalisierten Substraten mit der PTS.....	47
Abbildung 26: Postulierter Mechanismus von Oberhauser <i>et al.</i> [95] zur Bildung der Produkte 8 und 9 aus dem Ether 2 und dem Thioether 3.....	48
Abbildung 27: Vereinfachte Darstellung vom MEV-Stoffwechselweg und der Produktion von <i>E,E</i> -FPP des Plasmids pBbA5c-MevT-MBIS [85, 94].....	51
Abbildung 28: (A) Ermittelte (-)-Patchoulolkonzentration und –Ausbeute, sowie (B) gemessene OD ₆₀₀ -Werte bei Kultivierung der <i>E. coli</i> Stämme BL21(DE3) pPTS sowie BL21(DE3) pPTS+pMEV nach 24 und 48 h.	53
Abbildung 29: SDS-PAGE-Analyse der Kultivierung mit dem (A) <i>E. coli</i> pPTS-Stamm als Negativkontrolle und dem (B) pathway-optimierten <i>E. coli</i> pPTS+pMEV-Stamm nach 0 h, 24 h und 48 h; 6%iges Sammelgel und 12%iges Trenngel mit Coomassiefärbung; MW = Molekulargewicht in kDa, M = Größenstandard,	

UF = Unlösliche Fraktion, LF = Lösliche Fraktion. Die Laufhöhe der PTS-Bande ist umrandet.	54
Abbildung 30: Gaschromatogramme des kommerziellen sowie des über Ganzzellkatalyse durch Kultivierung des BL21(DE3) pPTS+pMEV-Stammes über 24 h produzierten Patchouliöls.	54
Abbildung 31: (-)-Patchoulolkonzentration und -ausbeute der <i>E. coli</i> Stämme BL21(DE3) pPTS+pMEV, SHuffle T7 pPTS+pMEV, SHuffle T7 lysY pPTS+pMEV und Tuner(DE3) pPTS+pMEV nach 24 h Kultivierung im DA-Medium unter optimierten Kultivierungsbedingungen.	56
Abbildung 32: DoE der Optimierung der Temperatur während der Expression und des pH-Wertes des Mediums.	57
Abbildung 33: SDS-PAGE-Analyse des DoEs zur Optimierung der Wachstumstemperatur und des pH-Wertes des Mediums; 6%iges Sammelgel und 12%iges Trenngel mit Coomassiefärbung; MW = Molekulargewicht in kDa, M = Größenstandard, UF = Unlösliche Fraktion, LF = Lösliche Fraktion. Die Laufhöhe der PTS-Bande ist umrandet. Zur übersichtlichen Darstellung wurden die Banden zusammengeschnitten.	58
Abbildung 34: (-)-Patchoulolkonzentration und -ausbeute des <i>E. coli</i> Stamms BL21(DE3) pPTS+pMEV nach 24 h Kultivierung in Abhängigkeit von der IPTG-Konzentration.	60
Abbildung 35: (-)-Patchoulolkonzentration und -ausbeute des <i>E. coli</i> Stamms BL21(DE3) pPTS+pMEV nach 24 h Kultivierung in den definierten Medien DA, M9 und DK, sowie in TB-Komplexmedium.	62
Abbildung 36: SDS-PAGE-Analyse der der Optimierung des Kulturmediums nach 24 h Kultivierung; 6%iges Sammelgel und 12%iges Trenngel mit Coomassiefärbung; MW = Molekulargewicht in kDa, Da = DA-Medium, TB = TB-Medium, DK = DK-Medium, M9 = M9-Medium, M = Größenstandard, UF = Unlösliche Fraktion, LF = Lösliche Fraktion. Die Laufhöhe der PTS-Bande ist rot umrandet. Zur übersichtlichen Darstellung wurden die Banden zusammengeschnitten.	63
Abbildung 37: Gewonnene (-)-Patchoulolmenge mittels ISPR mit den Adsorbentien Amberlite® 200C Na, Amberlite® XAD4 und Diaion® HP-20 sowie über die Flüssigphasen-Extraktion mit Isooctan nach 24 h Kultivierung des Stammes	

SHuffle T7 pPTS+pMEV im prozentualen Verhältnis zueinander; die Adsorption mit Diaion [®] HP-20 wurde als Referenzwert verwendet.	65
Abbildung 38: Erzielte prozentuale (-)-Patchoulolmenge aus den Adsorbentien Amberlite [®] 200C Na, Amberlite [®] XAD4 und Diaion [®] HP-20 bzw. Isooctan (ISPR), aus den Zellen sowie dem zellfreien Medium (Medium) nach 24 h Kultivierung des Stammes SHuffle T7 pPTS+pMEV.....	66
Abbildung 39: Schematische Darstellung der Bioreaktor-Konfiguration zur in situ Gewinnung von (-)-Patchoulol über Adsorbentienpartikel.	69
Abbildung 40: Fed-batch-Kultivierung von <i>E. coli</i> SHuffle T7 pPTS+pMEV im DA-Medium in einem 2 L-Bioreaktor und die ISPR über Adsorption mittels Diaion [®] HP-20. Die Glucosekonzentration, BTM, optische Dichte, Patchoulolkonzentration sowie der pO ₂ sind in Abhängigkeit der Zeit dargestellt. Der Induktionszeitpunkt ist über eine senkrechte, gestrichelte Linie zu erkennen. ...	70
Abbildung 41: Erzielte (-)-Patchoulolkonzentration, aus einer 2 L fed-batch-Kultivierung des Stammes SHuffle T7 pPTS+pMEV über 72 h Kultivierung, durch Adsorption mittels Diaion [®] HP-20 (ISPR), aus den Zellen sowie dem zellfreien Medium (Medium).....	71
Abbildung 42: Gaschromatogramme des (A) über ISPR extrahierten Patchouliöls und (B) kommerziell erhältlichen Patchouliöls; MS-Analysen der Hauptprodukte 1-5 von Patchouliöl.....	72
Abbildung 43: Optimierungsmatrix der in vivo Kultivierung und Produktion von (-)-Patchoulol im Schüttelkolbenmaßstab.	77
Abbildung 44: Plasmidkarten der im <i>E. coli</i> PTS-Stamm verwendeten Vektoren pET16b::his-FXa-PTS _i und pBbA5c-MevT-MBIS [43, 85].	86
Abbildung 45: Der zu verwendende DNA-Größenstandard GeneRuler [™] 1 kB DNA Ladder für Agarosegele.....	101
Abbildung 46: Die zu verwendenden Größenstandards für SDS-PAGE-Gele; links: PageRuler [™] Unstained 26614 (10 - 200 kDa) Proteinmarker; rechts: PageRuler [™] Unstained 26610 (10 - 180 kDa) Proteinmarker.	109
Abbildung 47: SDS-PAGE-Analyse der PTS-Aufreinigung mittels einer Ni ²⁺ -IMAC-Säule über einen linearen Gradienten (50 – 500 mM Imidazol). 6%iges Sammelgel und	

12%iges Trenngel mit Coomassiefärbung; MW = Molekulargewicht in kDa,
M = Größenstandard, L = Zelllysate; D = Durchflussfraktionen;
E₁-E₂ = Elutionsfraktionen mit 10 – 50 mM Imidazol; E₃-E₁₂ = Elutionsfraktionen
mit 50 – 250 mM Imidazol. Die Laufhöhe der PTS-Bande ist umrandet. Zur
übersichtlichen Darstellung wurden die Banden zusammengeschnitten. 114

Abbildung 48: Gaschromatogramm des Produktes aus der Umsetzung der Struktur 1 aus
Abbildung 24 mit der PTS. 114

Abbildung 49: Gaschromatogramm des Produktes aus der Umsetzung der Struktur 2 aus
Abbildung 24 mit der PTS. 115

Abbildung 50: Gaschromatogramm des Produktes aus der Umsetzung der Struktur 3 aus
Abbildung 24 mit der PTS. 115

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Produkte der enzymatischen Umsetzung von <i>E,E</i> -FPP durch eine heterolog in <i>E. coli</i> produzierte PTS; Retentionsindices über die in Kapitel 7.5.9 angegebene Formel berechnet.....	32
Tabelle 2: Vergleich der kinetischen Parameter der in dieser Arbeit produzierten PTS (Ekramzadeh <i>et al.</i>) mit den Angabe der bisher veröffentlichten Literatur.	42
Tabelle 3: DoE der Temperatur und des pH-Wertes des Mediums während der Expression mit T = 20 °C und pH 6,75 als zentraler Punkt (drei Wiederholungen).....	57
Tabelle 4: Eigenschaften der getesteten Medien für die ganzzellkatalytische (-)-Patchoulolproduktion.	61
Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.	81
Tabelle 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	83
Tabelle 7: Verwendete Geräte.	84
Tabelle 8: Verwendete Software.....	85
Tabelle 9: Verwendete <i>E. coli</i> Expressionsstämme.	85
Tabelle 10: Abkürzung der verwendeten Vektoren.	86
Tabelle 11: Verwendete Antibiotika-Stammlösungen (1.000 x).	87
Tabelle 12: Verwendete IPTG-Stammlösung (1 M).....	87
Tabelle 13: Zusammensetzung des LB-Mediums.....	87
Tabelle 14: Zusammensetzung des TB-Mediums.....	88
Tabelle 15: Zusammensetzung des 10 x Phosphat-Puffers für das TB-Medium.....	88
Tabelle 16: Zusammensetzung der Stammlösungen für das definierte DA-Medium für die Kultivierung im Schüttelkolben.	88
Tabelle 17: Zusammensetzung des definierten DA-Mediums (nach Rodríguez-Aparicio <i>et al.</i>) für die Kultivierung im Schüttelkolben.....	89
Tabelle 18: Zusammensetzung der Stammlösungen für das definierte M9-Medium für die Kultivierung im Schüttelkolben.....	89

Tabelle 19: Zusammensetzung des definierten M9-Mediums (M9-Minimal-Medium) für die Kultivierung im Schüttelkolben.	90
Tabelle 20: Zusammensetzung der Stammlösungen für das definierte DK-Medium für die Kultivierung im Schüttelkolben.	90
Tabelle 21: Zusammensetzung des definierten DK-Mediums (nach Korz <i>et al.</i>) für die Kultivierung im Schüttelkolben.	91
Tabelle 22: Zusammensetzung der Stammlösungen für das definierte DA-Medium für die Kultivierung im Bioreaktor.	92
Tabelle 23: Zusammensetzung des definierten DA-Mediums (Aparicio-Medium; nach Rodríguez-Aparicio <i>et al.</i> [115]) für die Kultivierung im Bioreaktor.	92
Tabelle 24: Zusammensetzung der Feedlösung für das DA-Medium für die Kultivierung im Bioreaktor.	93
Tabelle 25: Zusammensetzung des PBS-Puffers.	94
Tabelle 26: Zusammensetzung des Aufschlusspuffers.	94
Tabelle 27: Zusammensetzung der Nickellösung für die Chromatographiesäule HiTrap® IMAC FF 5 mL.	94
Tabelle 28: Zusammensetzung der Cobaltilösung für die Chromatographiesäule HiTrap® IMAC FF 5 mL.	94
Tabelle 29: Zusammensetzung des Equilibrierungs- und Lagerungspuffers.	95
Tabelle 30: Zusammensetzung des Bindungspuffers.	95
Tabelle 31: Zusammensetzung des Elutionspuffers.	95
Tabelle 32: Zusammensetzung des Umsetzungspuffers.	96
Tabelle 33: Zusammensetzung der Patchouliöl-Standardreihe aus einer Stammlösung mit 9,63 µg·mL ⁻¹	96
Tabelle 34: Zusammensetzung der α-Cedrol-Standardreihe aus einer Stammlösung mit 10 g·L ⁻¹	96
Tabelle 35: Zusammensetzung der <i>E,E</i> -FPP-Substratlösungen zur Messung der Reaktionskinetik der PTS aus einer <i>E,E</i> -FPP-Stammlösung mit 1 g·L ⁻¹	96
Tabelle 36: Zusammensetzung des 12%igen Trenngels (für 2 Gele).	97

Tabellenverzeichnis

Tabelle 37: Zusammensetzung des 6%igen Sammelgels (für 2 Gele).....	97
Tabelle 38: Zusammensetzung des 10 x TGS-Puffers (pH 8,3).....	97
Tabelle 39: Zusammensetzung des 2 x SDS-Probenpuffers.....	98
Tabelle 40: Zusammensetzung des Laemmli-Puffers.	98
Tabelle 41: Zusammensetzung der kolloidalen Coomassiefärbelösung (nach Candido <i>et al.</i> 2004).	98
Tabelle 42: Zusammensetzung der Entfärber/Fixierlösung für die kolloidale Coomassiefärbung.	98
Tabelle 43: Restriktionsverdau von Plasmid-DNA.....	101

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Kimia Ekramzadeh
Geburtsdatum/ -ort: 16. Juli 1989/ Schiraz
Nationalität: Deutsch

Schulische und akademische Ausbildung

09/2016 – heute Promotion zum Dr. rer. nat. in Chemie
Leibniz Universität Hannover, Institut für Technische Chemie
Promotionsthema: Bioprozessentwicklung zur enzymatischen Herstellung
von (-)-Patchoulol und strukturverwandten Produkten

10/2013 – 06/2016 Masterstudium zum M. Sc. in Wirk- und Naturstoffchemie
Leibniz Universität Hannover, Institut für Technische Chemie
Thema der Masterarbeit: Die Aufreinigung von bioaktivem BMP-4

10/2009 – 10/2013 Bachelorstudium zum B. Sc. in Chemie
Leibniz Universität Hannover, Institut für Technische Chemie
Thema der Bachelorarbeit: Studien zu sauren Ionenaustauschern auf Basis
von superparamagnetischen Eigenschaften

08/1995 – 08/2009 Allgemeine Hochschulreife
Gymnasium Lutherschule in Hannover

Berufliche Erfahrung

09/2016 – 09/2019 Wissenschaftliche Mitarbeiterin
Leibniz Universität Hannover, Institut für Technische Chemie

02/2019 – 02/2019 Studentische Hilfskraft
Leibniz Universität Hannover, Institut für Technische Chemie

03/2015 – 05/2015 Forschungspraktikum
Sartorius Stedim Biotech GmbH in Göttingen

05/2011 – 02/2015 Studentische Hilfskraft
Leibniz Universität Hannover, Studiendekanat der Naturwissensch. Fak.

02/2014 – 04/2014 Studentische Hilfskraft
Leibniz Universität Hannover, Institut für Anorganische Chemie

08/2012 – 11/2012 Studentische Hilfskraft
Leibniz Universität Hannover, Institut für Organische Chemie