

Biotechnologische Wege zur Gewinnung von Flavonoiden

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von
M.Sc. Patrick Jonczyk
geboren am 27. November 1984 in Hannover

2013

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

Korreferent: Prof. Dr. Ursula Rinas
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. Dr. Ralf Günter Berger
Institut für Lebensmittelchemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Tag der Promotion: 21. November 2013

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper danke ich herzlich für die Möglichkeit diese Arbeit in seinem Arbeitskreis anzufertigen. Weiterhin möchte ich mich für das große Vertrauen, das er mir entgegengebracht hat, bedanken.

Für die Übernahme des Korreferats bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Ursula Rinas.

Herrn Dr. Sascha Beutel danke ich dafür, dass er mich während Masterarbeit und Promotion stets unterstützt hat, für sein Interesse an meiner Arbeit und natürlich für die hilfreichen Korrekturen.

Herrn Dr. Jakob Ley, Herrn Egon Gross und den weiteren Mitarbeitern der Firma Symrise AG danke ich für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des Kooperationsprojekts. Der Arbeitsgruppe Prof. Bornscheuer/Uni Greifswald, die ebenfalls am Projekt beteiligt waren, danke ich auch für die anregende und kollegiale Zusammenarbeit.

Ich danke herzlich Cornelia Alic, Ulrike Dreschel, Martin Pähler sowie ganz besonders Martina Weiß, ohne die der betriebliche Alltag im TCI undenkbar wäre.

Astrid Wagner-Scheper danke ich für ihre hilfreichen Tipps, die meinen Schreibstil nachhaltig verbessert haben.

Für ihre interessierte Mitarbeit an meinem Promotionsthema während ihrer Masterarbeiten danke ich Steffen Hartwig, Christian Schwarz und Philipp P. Grünert. Ebenso möchte ich Maik Schwalenberg, Christian Lorek und Kai Wenk für ihre tatkräftige, wissbegierige und hilfreiche Unterstützung bei meinen Laborarbeiten danken.

Christopher Wagner danke ich herzlichst für seine Freundschaft, seinen Beistand und die vielen schönen Erlebnisse zusammen! 5 Jahre Studium und fast 3 Jahre Promotion; es war mir eine Freude und eine Ehre, danke Chrissi!

Besonders möchte ich mich auch bei Michael Meyer und Matthias Krätzig bedanken, ohne euch beide wären Studium & die TCI-Zeit nur halb so schön gewesen!

Den gesamten weiteren Mitarbeitern am TCI danke ich für das tolle Arbeitsklima, die Zeiten auf der Terrasse & im Keller, ihre Hilfsbereitschaft und die vielen weiteren schönen Erlebnisse zusammen!

Meiner Familie danke ich dafür, dass sie während der gesamten Zeit immer hinter mir gestanden hat und für mich da war.

Nicht zuletzt bedanke ich mich herzlichst bei meiner lieben Freundin Rebecca Bongartz. Was sie alles für mich getan hat, lässt sich mit Worten nicht ausdrücken. Danke Rebecca, ich liebe Dich!

Kurzzusammenfassung

Biotechnologische Wege zur Gewinnung von Flavonoiden

In dieser Arbeit sollte aus dem gut verfügbaren Flavonoid Naringenin das nur begrenzt verfügbare Flavonoid Phloretin biokatalytisch gewonnen werden. Hierfür wurde zunächst mit dem anaeroben Darmbakterium *Eubacterium ramulus* gearbeitet, welches die gewünschte Biotransformation potenziell leisten kann. Ein Einweg-Beutelreaktorsystem konnte erfolgreich für die strikt anaerobe Kultivierung im batch- und fed-batch-Verfahren adaptiert werden. Das Enzym, das vermutlich die gewünschte Umsetzung leisten kann, die Chalkon-Isomerase (CHI), konnte nach einer Genomsequenzierung von *E. ramulus* identifiziert und in einen *Pichia pastoris* und einen *Escherichia coli* Stamm kloniert werden. Es konnte mit diesen rekombinanten Stämmen jedoch keine Bildung von Phloretin nachgewiesen werden. Über Hinweise aus der Literatur konnte ein zweites, an der Umsetzung von Naringenin zu Phloretin beteiligtes Enzym, eine Enoatredukatase (ERED) gefunden und zusätzlich zur CHI in *E. coli* kloniert werden. Unter aeroben Kultivierungsbedingungen zeigte sich jedoch keine Aktivität.

Als Lösung der Problematik ist ein besonderer zweiphasiger Bioprozess, mit einer aeroben Wachstums- und einer anaeroben Expressions- und Produktionsphase, entwickelt worden. Mit diesem war es möglich, ganzzellkatalytisch Phloretin herzustellen. Im Folgenden konnte dieser Prozess weiter optimiert werden. Der optimale Zeitpunkt um die anaerobe Phase einzuleiten wurde ebenso determiniert wie die ideale IPTG-Konzentration, die ideale Temperatur in der Produktionsphase und die ideale initiale Substratkonzentration. Dazu wurden verschiedene Optimierungsverfahren (u.a. DoE) verwendet. Der Prozess konnte erfolgreich in verschiedene Skalierungsstufen von 200 mL bis 20 L übertragen werden.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Produktinhibierung durch das Phloretin auftritt und dass der verwendete *E. coli*-Stamm eine stark ausgeprägte Basalexpression, besonders für die CHI, zeigt. Ebenso zeigte sich eine gute Phloretinproduktion im Beutelreaktorsystem, so dass in Zukunft gegebenenfalls auf ein weiteres, alternatives Reaktorsystem zurückgegriffen werden kann. Es konnte nachgewiesen werden, dass die CHI enantioselektiv nur das (+)-Naringenin umsetzt und die Umsätze daher auf ca. 50 – 60% begrenzt sind. Somit konnte der Reaktionsweg der Biotransformation komplett aufgeklärt werden. Zuletzt konnte gezeigt werden, dass eine extraktive in-situ-Produktaufreinigung über Hohlfasermodule gut möglich ist.

Schlagwörter: Flavonoide, *Eubacterium ramulus*, Phloretin, Naringenin, Chalkon-Isomerase, Enoatreduktase

Abstract

Biotechnological Approaches for the Production of Flavonoids

The aim of this work was the biocatalytic production of phloretin from the widely available flavonoid naringenin. The first approach to achieving this purpose, was working with the anaerobic intestinal bacterium *Eubacterium ramulus*, which can perform the desired biotransformation. A disposable bag reactor system was successfully adapted for the strictly anaerobic cultivation of this bacterium in both batch and fed-batch mode. After sequencing the whole genome of *E. ramulus*, the enzyme that probably performs the desired biotransformation, the chalcone isomerase (CHI), was identified and cloned into an *Escherichia coli* and a *Pichia pastoris* strain.

However, no formation of Phloretin could be detected with the recombinant strains. Based on references from the scientific literature, a second enzyme, the enoate reductase (ERED), was selected and cloned into *E. coli*. Nevertheless, under aerobic culture conditions no enzymatic activity was observed. As a solution to this problem, a special two phase bioprocess was developed, which displays an aerobic growth phase and a separate anaerobic expression and production phase. With this technique it was possible to produce phloretin in a whole cell biotransformation.

Further work was invested in optimizing the process. The optimal time to initiate the anaerobic phase was determined, as well as additional factors such as the ideal IPTG concentration for induction, the ideal temperature during the production phase and the ideal initial substrate concentration. For this purpose, different optimization methods (e.g. DoE) were used.

The process was successfully transferred into different scale levels from 200 ml to 20 l. It was shown, that a product inhibition occurs and that the *E. coli* strain had a strong basal expression, especially for the CHI. Good phloretin production was observed in the bag reactor system, so that in the future it could be used as an alternative reactor system to stirred tank reactors. It was demonstrated, that the enantioselective CHI implements only the (+)-naringenin and therefore the transformation rates are limited to approximately 50 - 60%. In this manner, the reaction pathway from naringenin to phloretin was completely elucidated. Recently, it was also shown that an in-situ product extraction by hollow fiber modules is a feasible way to isolate the product.

Keywords: Flavonoids, *Eubacterium ramulus*, Phloretin, Naringenin, Chalcon Isomerase, Enoate Reductase

Publikationen

Artikel in Fachzeitschriften:

P. Jonczyk, A. Schmidt, I. Bice, M. Gall, E. Gross, J.-M. Hilmer, U. Bornscheuer, S. Beutel, T. Scheper, "Strictly Anaerobic Batch Cultivation of *Eubacterium ramulus* in a Novel Disposable Bag Reactor System", 2011, Chemie Ingenieur Technik

P. Jonczyk, M. Takenberg, S. Hartwig, S. Beutel, R.G. Berger, T. Scheper, "Cultivation of Shear Stress Sensitive Microorganisms in Disposable Bag Reactor Systems", 2013, Journal of Biotechnology

M. Gall, M. Thomsen, C. Peters, I. V. Pavlidis, **P. Jonczyk**, P. P. Grünert, S. Beutel, T. Scheper, E. Gross, M. Backes, J. Ley, J.-M. Hilmer, G. Palm, W. Hinrichs U.T. Bornscheuer, "Enzymatic Degradation of Flavonoids using Bacterial Chalcone Isomerase and Enoate Reductase", 2013, Angewandte Chemie International Edition. Status: Peer Review

Internationale Vorträge:

P. Jonczyk, Cultivation of Different Aerobic and Anaerobic Microorganisms in a Disposable Bag Reactor System, European Congress of Applied Biotechnology, 2011, Berlin

Poster:

P. Jonczyk, S. Hartwig, S. Beutel, T. Scheper, „Neue Einsatzbereiche für Einweg-Beutelreaktorsysteme“, Dechema-Jahrestagung, 2012, Karlsruhe

P. Jonczyk, S. Beutel, T. Scheper, „Heterologe Expression von grün fluoreszierendem Protein (GFP) in einem Einweg-Beutelreaktorsystem“, Dechema-Frühjahrstagung, 2013, Frankfurt

P. P. Grünert, **P. Jonczyk**, E. Gross, T. Geissler, S. Beutel, J. Ley, T. Scheper, „Extraction of Flavonoids from a Whole Cell Biotransformation Process“, 11th International Conference on Catalysis in Membrane Reactors, 2013, Porto (Portugal)

Verschiedenes:

Patent (EU 13176159.5 - 1402): „Method for Biotechnological Production of Dihydrochalcones“, E. Gross, M. Gall, **P. Jonczyk**, M. Thomsen, C. Peters, S. Beutel, J. Ley, J.-M. Hilmer, U. T. Bornscheuer, T. Scheper, G. Krammer

Abschlussbericht zum BMBF-Projekt P19 „Biokatalytische Gewinnung von Flavonoiden“ im Cluster BIODIVERSITY2021, E. Gross, **P. Jonczyk**, M. Gall, A. Schmidt, S. Beutel, U.T. Bornscheuer, T. Scheper, J.-M. Hilmer, 2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Zielsetzung.....	2
3	Theoretische Grundlagen	3
3.1	Flavonoide.....	3
3.1.1	Einsatz und Wirkungen von Flavonoiden	4
3.1.2	Naringenin und Phloretin	6
3.1.3	<i>Eubacterium ramulus</i> als Quelle flavonoidtransformierender Enzyme	7
3.2	Expressionssysteme	10
3.2.1	Prokaryotische Expressionssysteme	11
3.2.2	Eukaryotische Expressionssysteme.....	13
4	Experimenteller Teil.....	17
4.1	Arbeiten mit <i>Eubacterium ramulus</i>.....	17
4.1.1	Batch-Kultivierungen von <i>E. ramulus</i>	18
4.1.2	Fed-batch-Kultivierung von <i>E. ramulus</i> im 10 L Beutelreaktorsystem	22
4.1.3	Schlussfolgerungen	24
4.2	Arbeiten mit <i>Pichia pastoris</i>	25
4.2.1	Untersuchungen zum Wachstumsverhalten	26
4.2.2	Kultivierungen von <i>P. pastoris</i> CHI in verschiedenen Reaktorsystemen	28
4.2.3	Flavonoid-Fütterungsversuche.....	31
4.2.4	Induktionsverhalten und Aktivität	32
4.2.5	Schlussfolgerungen	34
4.3	Prozessentwicklung mit <i>E. coli</i> Rosetta.....	35
4.3.1	Expressionsverhalten und CHI-Aktivität im Schüttelkolben von <i>E. coli</i> Rosetta pET28b_CHI.....	36
4.3.2	Bestimmung des isoelektrischen Punkts der Chalkon-Isomerase	37
4.3.3	Weiterentwicklung des Produktionsstamms	39
4.3.4	Expressionsverhalten und Aktivität im Schüttelkolben von <i>E. coli</i> Rosetta pET28b_CHI pET-52b_ERED	40
4.3.5	Kultivierung und Biotransformation von <i>E. coli</i> Rosetta pET28b_CHI pET- 52b_ERED im 2 L Reaktor unter anaeroben Bedingungen	43
4.3.6	Wachstumsverhalten von <i>E. coli</i> Rosetta pET28b_CHI pET-52b_ERED im 2 L Reaktor bei verschiedenen Temperaturen	48
4.3.7	Biotransformation mit <i>E. coli</i> Rosetta pET28b_CHI pET-52b_ERED im 2 L Maßstab während der exponentiellen Wachstumsphase.....	49
4.3.8	Kultivierung von <i>E. coli</i> Rosetta pET28b_CHI pET-52b_ERED im 2 L Maßstab unter aeroben Bedingungen	52
4.3.9	Kultivierung von <i>E. coli</i> Rosetta pET28b_CHI	55
4.3.10	Schlussfolgerungen	56

4.4	Prozessoptimierung	58
4.4.1	Variation der IPTG-Konzentration	58
4.4.2	Variation der Temperatur	60
4.4.3	Optimieren der Substratkonzentration	63
4.4.4	Zusammenfassung der OVAT-Optimierung	66
4.4.5	Testung eines alternativen Nährmediums für die Biotransformation	67
4.4.6	Aufskalierung des Prozesses auf 10 L Volumen	68
4.4.7	Testung eines Beutelreaktorsystems für die Prozessführung	69
4.4.8	Herunterskalierung des Bioprozesses auf 200 mL	71
4.4.9	„Design of Experiments“: Prozessoptimierung im 200 mL Maßstab	73
4.4.10	Untersuchungen zur Induktion in TB-Medium	77
4.4.11	Umsetzungsversuch mit Phloretin anstelle von Naringenin	78
4.4.12	Untersuchungen zu einer Produktinhibierung	79
4.4.13	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	81
4.5	Untersuchungen zur Enantioselektivität	82
4.5.1	Chirale Analysen	82
4.5.2	Untersuchungen zu einer möglichen Racemisierung im laufenden Prozess	86
4.5.3	Schlussfolgerungen	87
4.6	Kultivierungen von <i>E. coli</i> BL21 pET22_CHI_sERED	88
4.6.1	Biotransformation im 2 L Maßstab	89
4.6.2	Biotransformation im 20 L Maßstab	90
4.6.3	Zusammenfassung	92
4.7	Downstreaming	92
4.7.1	Extraktion mit Hohlfasermodule	93
4.7.2	Schlussfolgerungen	95
5	Zusammenfassung und Ausblick	96
6	Anhang	100
6.1	Übersicht der betreuten Masterarbeiten	100
6.2	Zusätzliche experimentelle Daten	100
6.2.1	Anaerobe Inokulationsapparatur und weitere Daten aus anaeroben Kultiverungen	100
6.2.2	Weitere Ergebnisse zu <i>P. pastoris</i>	102
6.2.3	Ergebnisse der Aktivitätstest mit <i>E. coli</i> Rosetta	103
6.2.4	Weitere SDS-Gele	103
6.2.5	Wachstumskurven <i>E. coli</i> CHI_ERED	107
6.2.6	Weitere Erläuterungen zu den DoE-Versuchen	107
6.3	Methoden	113
6.3.1	Allgemeine Techniken	113
6.3.2	Zellaufschluss	114
6.3.3	HPLC Messungen	114
6.3.4	Enzymaktivitätstest	115
6.3.5	Ethylacetatextraktion	115

6.3.6	SDS-PAGE und Färbungen	116
6.3.7	2D-Gelelektrophorese	117
6.3.8	Anaerobe Beuteltkultivierungen	117
6.3.9	Kultivierungen im 2 L, 10 L und 20 L Maßstab	118
6.3.10	Kultivierungen im 200 mL Maßstab	118
6.4	Materialien.....	119
6.4.1	Verwendete Chemikalien.....	119
6.4.2	Verwendete Verbrauchsmaterialien	120
6.4.3	Verwendete Geräte	121
6.4.4	Verwendete Stämme, Stammhaltung und Vektorkarten	123
6.4.5	Zusammensetzungen der verwendeten Kulturmedien und (Puffer)-Lösungen.....	126
7	Literatur	133

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über die verschiedenen Flavonoidklassen, je Klasse ist ein Beispiel dargestellt.	4
Abbildung 2: Strukturformeln von Phloretin und Naringenin.	6
Abbildung 3: Lichtmikroskopische Aufnahme von <i>E. ramulus</i> (200x).....	8
Abbildung 4: Postulierte Abbauwege von Naringenin durch <i>E. ramulus</i> [3, 59, 60].....	9
Abbildung 5: Verwendetes Einweg-Beutelreaktorsystem. BIOSTAT Cultibag RM optical (links Rocker mit Haube, rechts digitale Prozesssteuereinheit).....	19
Abbildung 6: 20-L-Beutel auf der Rocker-Plattform.1) Abgas (links) und Zuluftschläuche (rechts), 2) Befüllschlauch, 3) Luer-Lock-Zugang für Probenahme und Inokulation, 4) Säure-/Basezufuhr, 5) Einlässe für Chemosensoren (pO ₂ und pH).	19
Abbildung 7: Verläufe der batch-Kultivierungen von <i>E. ramulus</i> in 400 mL Flaschenkultur und 10 L Beutelkultur.....	21
Abbildung 8: Fed-batch Kultivierung von <i>E. ramulus</i> im 10 L Beutelreaktor.....	23
Abbildung 9: Einfluss von YPD- und BMGY-Medium bei der Schüttelkolbenkultivierung von <i>P. pastoris</i> CHI im Vergleich.	27
Abbildung 10: Wachstumsverlauf von <i>P. pastoris</i> CHI im 2 L-Rührkesselreaktor ($\mu_{\max} = 0,25 \text{ h}^{-1}$).....	29
Abbildung 11: <i>P. pastoris</i> Kultivierungen im 10 L-Maßstab. Blau: RPM/KPM, Schwarz: Zelldichte, Orange: pO ₂ -Wert. Oben: STR ($\mu_{\max} = 0,35 \text{ h}^{-1}$), Unten: Beutelreaktor ($\mu_{\max} = 0,22 \text{ h}^{-1}$).....	30
Abbildung 12: Verlauf der Flavonoidkonzentrationen in <i>P. pastoris</i> CHI Schüttelkultivierungen.	32
Abbildung 13: Verlauf der Zelldichte einer <i>P. pastoris</i> CHI Kultivierung nach der Induktion mit Methanol.	33
Abbildung 14: SDS-PAGE des Expressionsversuchs mit <i>P. pastoris</i> CHI, silbergefärbt.....	34
Abbildung 15: SDS-PAGE der Proteinexpression von <i>E. coli</i> Rosetta pET28b_CHI, (gefärbt mit kolloidalem Coomassie (ZP = Zellpellet mit Zelltrümmern, LY = Zelllysate, M = Marker). Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (ZP0 = 0 h, ZP1 = 1 h, LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.).....	37
Abbildung 16: 2D-Gel von <i>E. coli</i> Rosetta pET28b_CHI vor der Induktion mit IPTG. M = Marker, über dem Gel ist der jeweilige pH-Bereich der ersten Dimension angegeben.	38
Abbildung 17: 2D-Gel von <i>E. coli</i> Rosetta pET28b_CHI nach der Induktion (5 h) mit IPTG. M = Marker, über dem Gel ist der jeweilige pH-Bereich der ersten Dimension angegeben.	38
Abbildung 18: SDS-PAGE der Proben einer Kultivierung mit IPTG-Induktion von <i>E. coli</i> CHI_ERED, Zelllysateproben. M = Marker, LY = Zelllysate. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.).....	41
Abbildung 19: SDS-PAGE der Proben einer Kultivierung mit IPTG-Induktion von <i>E. coli</i> CHI_ERED, Zellpelletproben. M = Marker, ZP = Zellpellet. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (ZP0 = 0 h, ZP1 = 1 h usw.).....	42
Abbildung 20: Schematische Skizze der entwickelten zweiphasigen Prozessführung mit aerober Wachstums- und anaerober Produktionsphase.	44
Abbildung 21: SDS-PAGE der anaeroben Produktionsphase einer <i>E. coli</i> CHI_ERED Kultivierung bei 25 °C // 1 mM IPTG-Induktion // 1 mM Naringeninzugabe. ZP = Zellpellet, LY = Zelllysate, M = Marker. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (ZP0 = 0 h, ZP1 = 1 h, LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.).....	46
Abbildung 22: Verlauf der Naringenin- und Phloretinkonzentrationen der anaeroben Produktionsphase einer <i>E. coli</i> CHI_ERED Kultivierung bei 25 °C // 1 mM IPTG-Induktion.	47
Abbildung 23: Wachstumsverhalten von <i>E. coli</i> CHI_ERED im 2 L Glasrührkessel in TB Medium bei verschiedenen Temperaturen.	48
Abbildung 24: SDS-PAGE des Zelllysats <i>E. coli</i> CHI_ERED Kultivierung bei 25 °C // 1 mM IPTG-Induktion // 1 mM Naringeninzugabe // Induktion in der exponentiellen Wachstumsphase.	50

Abbildung 25: Verlauf der Flavonoidkonzentrationen einer <i>E. coli</i> CHI_ERED Kultivierung bei 25 °C // 1 mM IPTG-Induktion // 1 mM Naringenzugabe // Induktion in der exponentiellen Wachstumsphase.....	51
Abbildung 26: SDS-PAGE einer <i>E. coli</i> CHI_ERED Kultivierung bei 25 °C // 1 mM IPTG-Induktion // 1 mM Naringenzugabe // aerobe Bedingungen. LY = Zelllysate, ZP = Zellpellet, M = Marker. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (ZP0 = 0 h, ZP1 = 1 h, LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.).	53
Abbildung 27: Verlauf der Flavonoidkonzentrationen einer <i>E. coli</i> CHI_ERED Kultivierung bei 25 °C // 1 mM IPTG-Induktion // 1 mM Naringenzugabe // aerobe Bedingungen.	54
Abbildung 28: Verlauf der Flavonoidkonzentrationen einer <i>E. coli</i> Rosetta pET28b_CHI Kultivierung bei 25 °C // 1 mM IPTG-Induktion // 1 mM Naringenzugabe.	56
Abbildung 29: Postulierter Umsetzungsweg von Naringenin zu Phloretin und beteiligte Enzyme.....	57
Abbildung 30: Verlauf der Flavonoidkonzentrationen von <i>E. coli</i> CHI_ERED mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen induziert.	59
Abbildung 31: Verlauf der Flavonoidkonzentrationen während verschiedener Temperaturen in der anaeroben Produktionsphase mit <i>E. coli</i> CHI_ERED.	61
Abbildung 32: SDS-Gel der Zelllysate einer Biotransformation mit <i>E. coli</i> CHI_ERED während einer Temperatur von 30 °C in der anaeroben Produktionsphase. LY = Lysat, M = Marker. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.).	62
Abbildung 33: SDS-Gel der Zelllysate einer Biotransformation mit <i>E. coli</i> CHI_ERED während einer Temperatur von 35 °C in der anaeroben Produktionsphase. LY = Lysat, M = Marker. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.).	62
Abbildung 34: Verlauf der Zelldichten von <i>E. coli</i> CHI_ERED Kultivierungen unter Zusatz verschiedener Naringeninkonzentrationen.....	64
Abbildung 35: Verlauf der Flavonoidkonzentrationen bei verschiedenen initialen Substratkonzentrationen.	65
Abbildung 36: SDS-Gele der Kultivierung mit 1 mM Naringenin in der anaeroben Produktionsphase. Links Zelllysate, rechts Zellpellets. M = Marker, LY = Zelllysate, ZP = Zellpellet. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.).	66
Abbildung 37: Verlauf der Flavonoidkonzentrationen einer Biotransformation in LB-Medium.	68
Abbildung 38: Verlauf der Flavonoidkonzentrationen während einer Biotransformation mit <i>E. coli</i> CHI_ERED im 10 L Maßstab.	69
Abbildung 39: Verlauf der Flavonoidkonzentrationen einer Biotransformation mit <i>E. coli</i> CHI_ERED unter Standardbedingungen im Beutelreaktorsystem mit 7,5 L Medium.....	70
Abbildung 40: SDS-Gele einer Biotransformation mit <i>E. coli</i> CHI_ERED unter Standardbedingungen im Beutelreaktorsystem. M = Marker, ZP = Zellpellet, LY = Zelllysate. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (ZP0 = 0 h, ZP1 = 1 h, LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.).	71
Abbildung 41: Verlauf der Flavonoidkonzentrationen während einer Umsetzung mit <i>E. coli</i> CHI_ERED im 200 mL-Maßstab.	72
Abbildung 42: SDS-Gele der Umsetzung im 200 mL Maßstab. Links lösliche Fraktionen, rechts unlösliche Fraktionen. M = Marker, LY = Zelllysate, ZP = Zellpellet. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (ZP0 = 0 h, ZP1 = 1 h, LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.).	73
Abbildung 43: "Response-Surface-Plot" mit der Ausbeute als Zielgröße. Auf der Y-Achse ist die Ausbeute in % aufgetragen (30 - 65%). Auf der X-Achse sind die IPTG-Konzentrationen (0,1 - 1 mM) und auf der Z-Achse die Temperaturen (37 - 25 °C) aufgetragen.	75
Abbildung 44: "Response-Surface-Plot" mit der Reaktionszeit als Zielgröße. Auf der Y-Achse ist die benötigte Reaktionszeit in h bis zum Erreichen einer konstanten Produktkonzentration aufgetragen (2 h - 3 h). Auf der X-Achse sind die IPTG-Konzentrationen (0,1 - 1 mM) und auf der Z-Achse die Temperaturen (37 - 25 °C) aufgetragen.	76

Abbildung 45: SDS-Gele von Biotransformationen im 200 mL Maßstab. Links mit IPTG-, rechts ohne IPTG-Zusatz. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (ZP0 = 0 h, ZP1 = 1 h, LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.)	77
Abbildung 46: Verlauf der Flavonoidkonzentrationen im 200 mL Maßstab. Links mit IPTG-Zugabe, rechts ohne IPTG-Zugabe.	78
Abbildung 47: Biotransformation mit <i>E. coli</i> CHI_ERED im 2 L Rührkessel unter Zugabe von 0,274 g/L Phloretin.	79
Abbildung 48: Verlauf der Flavonoidkonzentrationen einer Biotransformation im 2 L Maßstab mit <i>E. coli</i> CHI_ERED, bei der eine Kombination von Naringenin und Phloretin eingesetzt wurde.	80
Abbildung 49: Verlauf der Flavonoidkonzentrationen in einer Biotransformation im 200 mL Maßstab mit <i>E. coli</i> CHI_ERED und Zusatz von 0,1 g/L Naringenin.	81
Abbildung 50: Konzentrationsverlauf von (+)-Naringenin, (-)-Naringenin, Gesamtnaringenin und Phloretin in einer Biotransformation im 2 L Maßstab mit <i>E. coli</i> CHI_ERED und Zusatz von 0,54 g/L Naringenin.	83
Abbildung 51: Verlauf der (+)-Naringenin- und (-)-Naringeninkonzentrationen in einer anaerob kultivierten <i>E. ramulus</i> Schüttelflaschenkultur	84
Abbildung 52: Reaktionsschema der Biotransformation von Naringenin zu Phloretin durch <i>E. coli</i> CHI_ERED unter Berücksichtigung der Enantioselektivität.	85
Abbildung 53: Contour-Plots der Modelle für (+)-Naringenin (links) und Phloretin (rechts). Auf der X-Achse ist die Reaktionszeit in Minuten, auf der Y-Achse die Temperatur (°C) dargestellt. Rote Flächen symbolisieren hohe Konzentrationen, blaue Flächen geringe Konzentrationen.	87
Abbildung 54: Verlauf der Flavonoidkonzentrationen einer Biotransformation im 2 L Maßstab mit <i>E. coli</i> CHI_sERED unter Standardbedingungen.	89
Abbildung 55: SDS-Gel der 2 L Biotransformation mit <i>E. coli</i> CHI_sERED. M = Marker, ZP = Zellpellet, LY = Zellysat. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (ZP0 = 0 h, ZP1 = 1 h, LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.)	90
Abbildung 56: Verlauf der Flavonoidkonzentrationen einer Biotransformation im 20 L Maßstab mit <i>E. coli</i> CHI_sERED unter Standardbedingungen.	91
Abbildung 57: SDS-Gel der 20 L Biotransformation mit <i>E. coli</i> CHI_sERED. M = Marker, ZP = Zellpellet, LY = Zellysat. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (ZP0 = 0 h, ZP1 = 1 h, LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.)	91
Abbildung 58: Schematische Skizze einer Extraktionsstrategie mit Hohlfasermodulen.....	93
Abbildung 59: Verlauf der Flavonoidkonzentrationen während der Extraktion mit einem Hohlfasermodul. Die Verläufe im Reaktorkreislauf (Schwarze Kreise und rote Quadrate) und im Lösemittelkreislauf (orangefarbene Rauten und blaue Dreiecke) sind dargestellt.	94
Abbildung 60: Darstellung der entwickelten anoxischen Schlauchbrücke zur Inokulation des Beutelreaktors.	100
Abbildung 61: Verlauf von Glucose und Zelldichte einer anaeroben Beutelkultivierung im 50 L Maßstab.	101
Abbildung 62: Verlauf einer <i>P. pastoris</i> Kultivierung in BMGY-Medium mit 2% Glycerin.	102
Abbildung 63: Verlauf der Zelldichten über die Zeit von <i>P. pastoris</i> Kultivierungen unter Zusatz von 0,06 g/L Naringenin, bzw. Phloretin und Kontrolle ohne Zusatz.	102
Abbildung 64: SDS-Gele bei 0,5 mM IPTG / 25 °C / 0,27 g/L Naringenin. LY = Zellysat, ZP = Zellpellet. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.)	104
Abbildung 65: SDS-Gel bei 2 mM IPTG / 25 °C / 0,27 g/L Naringenin. LY = Zellysat, ZP = Zellpellet. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.)	104
Abbildung 66: SDS-Gele bei 1 mM IPTG / 20 °C / 0,27 g/L Naringenin. LY = Zellysat, ZP = Zellpellet. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.)	104
Abbildung 67: SDS-Gele bei 0,5 mM IPTG / 30 °C / 0,54 g/L Naringenin. LY = Zellysat, ZP = Zellpellet. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.)	105

Abbildung 68: SDS-Gele bei 0,5 mM IPTG / 30 °C / 0,81 g/L Naringenin. LY = Zelllysate, ZP = Zellpellet. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.)	105
Abbildung 69: SDS-Gele bei 0,5 mM IPTG / 30 °C / 1,08 g/L Naringenin. LY = Zelllysate, ZP = Zellpellet. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.)	105
Abbildung 70: SDS-Gel bei 0,5 mM IPTG / 30 °C / 0,54 g/L Naringenin in LB-Medium. LY = Zelllysate, ZP = Zellpellet. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.)	105
Abbildung 71: SDS-Gele bei 0,5 mM IPTG / 30 °C / 0,54 g/L Naringenin im 10 L Maßstab. LY = Zelllysate, ZP = Zellpellet. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.) ..	106
Abbildung 72: SDS-Gele aus den DoE Versuchen (Kapitel 4.4.9).	106
Abbildung 73: Wachstumsverlauf von <i>E. coli</i> CHI_ERED im 10 L Reaktor bei 37 °C.	107
Abbildung 74: Wachstumsverlauf von <i>E. coli</i> CHI_ERED im Schüttelkolben bei 30 °C. $\mu_{\max} = 0,63 \text{ h}^{-1}$	107
Abbildung 75: pPICZ-Vektor, der in <i>P. pastoris</i> CHI verwendet wurde.	124
Abbildung 76: Vektorkarte pET-28a der in <i>E. coli</i> CHI und <i>E. coli</i> CHI_ERED verwendet wurde.	124
Abbildung 77: Vektorkarte pET-28a der in <i>E. coli</i> CHI_ERED verwendet wurde.....	125
Abbildung 78: Vektorkarte pET-22sERED_CHI, der in <i>E. coli</i> CHI_sERED verwendet wurde.	125
Abbildung 79: Aminosäuresequenz der CHI aus <i>E. ramulus</i>	125

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Überblick über verschiedene Expressionssysteme.....	11
Tabelle 2: Faktoren und variierte Bereich im DoE im 200 mL Maßstab.	74
Tabelle 3: Faktoren und Wertebereiche für das DoE zur Racemisierung und Phloretinstabilität.....	86
Tabelle 4: Aktivitätstest mit <i>P. pastoris</i> CHI. HPP konnte nicht detektiert werden.	103
Tabelle 5: Aktivitätstest: Positivkontrolle mit <i>E. ramulus</i> Zelllysat.	103
Tabelle 6: Ergebnisse Aktivitätstest für <i>E. coli</i> Rosetta CHI_ERED.	103
Tabelle 7: Positivkontrolle des Aktivitätstest mit <i>E. ramulus</i>	103
Tabelle 8: Verwendetes HPLC-Gradientprogramm [3].	115
Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Chemikalien.	119
Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten Mikroorganismen.	123
Tabelle 11: Zusammensetzung ST-Medium für <i>E. ramulus</i>	126
Tabelle 12: Zusammensetzung Resazurin-Lösung.	127
Tabelle 13: Zusammensetzung Salzlösung B für ST-Medium.....	127
Tabelle 14: Zusammensetzung YPD-Medium.	127
Tabelle 15: Zusammensetzung BMGY und BMMY-Medium.....	128
Tabelle 16: Zusammensetzung LB-Medium.	128
Tabelle 17: Zusammensetzung TB-Medium.	129
Tabelle 18: Antibiotika-Stammlösungen.....	129
Tabelle 19: Zusammensetzung Zellaufschlusspuffer.	130
Tabelle 20: Zusammensetzung SDS-Laufpuffer.	130
Tabelle 21: Zusammensetzung Laemmli-Puffer.	130
Tabelle 22: Zusammensetzung der kolloidalen Coomassie-Lösung.	130
Tabelle 23: Bestandteile Entfärberlösung für kolloidale Coomassie-Färbung.....	131
Tabelle 24: Zusammensetzung Entfärberlösung für Silberfärbung.....	131
Tabelle 25: Rezept für Trenngele und Sammelgele (SDS-PAGE).	131

Abkürzungsverzeichnis

2D/3D	Zwei-/Dreidimensional
BTM	Biotrockenmasse
ca.	<i>lat. circa</i>
CHI	Chalkon-Isomerase aus <i>E. ramulus</i>
DMS	Dimethylsulfid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
et al.	<i>lat. et alii</i>
E⁰	Redoxpotential bezogen auf pH 7
ERED	Enoatreduktase aus <i>E. ramulus</i>
ECS	<i>engl.:</i> extracapillary space
FDA	US Food and Drug Administration
ggf.	gegebenenfalls
GVO	Gentechnisch veränderter Organismus
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
k_{La}	volumenbezogener Sauerstoffübergangskoeffizient
KpM	Kippbewegungen pro Minute
LB	<i>engl. lysogeny broth</i>
ICS	<i>engl. intracapillary space</i>
M	Proteinmarker
MeOH	Methanol
MO	Mikroorganismus
OD₆₀₀	Optische Dichte, bei $\lambda = 600$ nm
pH	<i>lat. Potentia Hydrogenii</i>
pO₂	Sauerstoffpartialdruck
rel. AU	Relative Absorptionseinheiten
reinstH₂O	Wasser aus der Arium 911 ProVF
RNA	Ribonukleinsäure
RPM	<i>engl. rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur (~23 °C)
sERED	Codonoptimierte Enoatreduktase aus <i>E. ramulus</i>
Ssp.	<i>lat. Subspecies</i>
TU	Technische Universität
TB	<i>engl. terrific broth</i>
u.a.	unter anderem
VE-Wasser	voll entsalztes Wasser

1 Einleitung

Lebensmittel begegnen uns Menschen alltäglich und sind auch als Genussmittel wichtige kulturelle Bestandteile einer Gesellschaft. Der Trend geht dabei weg von fetthaltigen, überzuckerten Fertiggerichten und Fast-Food hin zu einer möglichst natürlichen, gesundheitsbewussten Ernährung. Heutzutage sollen Lebensmittel nicht mehr nur einfach den Hunger stillen, sie sollen noch mehr leisten: Sie müssen lecker schmecken, sich positiv auf die Gesundheit auswirken und dabei noch ansprechend aussehen.

Immer populärer für die Konsumenten sind ökologisch hergestellte Produkte und Nahrungsmittel, die über zugesetzte Stoffe positive Effekte auf die Gesundheit haben sollen, sogenannte Functional Foods. Joghurt und andere Milchprodukte, die aktive verdauungsfördernde Bakterienkulturen enthalten, sind wohl das bekannteste Beispiel. Dass sich diese Produkte so großer Beliebtheit erfreuen zeigt, dass die Menschen zusätzlich zur Nahrungsaufnahme auch noch jede Möglichkeit nutzen wollen, ihre Lebensqualität zu steigern und auch im Alter gesund zu bleiben.

Tatsächlich legen Beispiele wie das „Französische Paradoxon“ nahe, dass die Ernährung unsere Gesundheit entscheidend beeinflussen kann. Obwohl in Frankreich mehr Alkohol getrunken wird, liegt die Lebenserwartung über der der nord- und mitteleuropäischen Bevölkerung. Da die Franzosen hauptsächlich Rotwein trinken, wird inzwischen davon ausgegangen, dass Tannine und Protoanthocyanidine, die in den roten Pflanzenfarbstoffen im Wein enthalten sind, hier eine gesundheitsfördernde Rolle spielen [1].

Chemisch betrachtet gehören diese Pflanzenfarbstoffe zu der Stoffgruppe der Flavonoide. Flavonoide sind in den Schalen vieler Früchte enthalten. In zahlreichen medizinischen Studien zeigte sich, dass sich Flavonoide positiv auf die Gesundheit auswirken. Unter anderem können sie das Krebsrisiko und das Ausmaß von Leberschäden verringern [2]. Daher wäre der Zusatz zu Lebensmitteln wünschenswert und sinnvoll. Leider sind manche Flavonoide nur in geringen Mengen in den Pflanzen enthalten, und müssen mit großen Mengen an umweltgefährdenden Lösemitteln gewonnen werden. Darum wird versucht, die Flavonoide auch auf alternative Weise mit den Möglichkeiten der modernen Biotechnologie zu produzieren.

Wissenschaftler haben entdeckt, dass bestimmte Bakterien, die im menschlichen Darmtrakt leben, Flavonoide ab- und umbauen können. Dies geschieht über spezielle Eiweiße, sogenannte Enzyme, die von den Bakterien gebildet werden. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, diese Enzyme zu nutzen, um Flavonoide nach Wunsch zu verändern. So können aus nachhaltig gewonnenen, günstig verfügbaren Flavonoiden mit biotechnologischen Methoden hochwertige, seltene Flavonoide erhalten werden.

2 Zielsetzung

In dieser Arbeit soll aus dem preislich günstigen, gut verfügbaren Flavonoid Naringenin das seltene Flavonoid Phloretin biokatalytisch gewonnen werden. Phloretin zeigt besonders im Lebensmittelbereich als Zusatzstoff mit süßkraftverstärkenden oder geschmacksmaskierenden Eigenschaften ein großes Potenzial für eine industrielle Anwendung.

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das strikt-anaerobe Darmbakterium *Eubacterium ramulus* Naringenin enzymatisch abbauen kann [3]. Der Abbau des Naringenins verläuft dabei über das Phloretin, so dass potenziell auch Phloretin hergestellt werden könnte, wenn der weitere Abbauweg unterbunden würde.

Im Rahmen dieser Arbeit soll daher zunächst, aufbauend auf den bisherigen Arbeiten, versucht werden, eine Biokatalyse zu Phloretin mit *E. ramulus* durchzuführen. Dies hätte im Hinblick auf einen industriellen Prozess den Vorteil, dass die Biotransformation mit einem genetisch nicht veränderten Organismus durchgeführt werden könnte und dementsprechend nicht als „mit gentechnischen Methoden hergestellt“ gekennzeichnet werden müsste. Durch die negative öffentliche Meinung zur Gentechnik in Deutschland ist dieser Faktor nicht zu unterschätzen.

Das biokatalytisch gewonnene Phloretin könnte allerdings nach geltenden gesetzlichen Vorgaben auch kennzeichnungsfrei verwendet werden, wenn im Endprodukt weder DNA noch die beteiligten (heterologen) Enzyme zu finden sind. Über eine geeignete Aufreinigung des Produkts könnte diese Bedingung erfüllt werden. So könnten trotzdem heterolog exprimierte Enzyme zur Biotransformation eingesetzt werden.

Daher sollen ebenfalls molekularbiologische Arbeiten zum Einsatz kommen, um Enzyme aus *E. ramulus* heterolog zu produzieren und eine Biotransformation mit einem rekombinanten Organismus durchzuführen.

Die hier dargestellten Arbeiten fanden im Rahmen des vom BMBF geförderten Projekts „Biokatalytische Gewinnung von Flavonoiden“ (FKZ 0315365) im Cluster BIODIVERSITY2021 statt. Dabei wurde eng mit den Partnern, der Symrise AG und der Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald (Institut für Biochemie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Bornscheuer) zusammengearbeitet. Die molekularbiologischen Arbeiten wurden bei den Partnern in Greifswald, spezielle Analysen durch den Industriepartner Symrise AG durchgeführt.

3 Theoretische Grundlagen

In den folgenden Abschnitten wird die theoretische Basis zum Verständnis der in dieser Arbeit dargestellten Experimente dargestellt.

Zunächst wird auf die Flavonoide im Allgemeinen eingegangen, um einen Überblick über diese Stoffklasse zu ermöglichen. Anschließend wird dargestellt, welche Wirkungen Flavonoide zeigen und wo sie bisher industriell eingesetzt werden. Auf Naringenin und Phloretin wird detailliert eingegangen, um den Nutzen der eingangs angesprochenen, gewünschten Biotransformation aufzuzeigen. Die bisher bekannten, an der biokatalytischen Reaktion beteiligten Enzyme und deren Herkunft werden benannt und näher beleuchtet. Da eine heterologe Expression der Enzyme möglicherweise für den Prozess notwendig ist, werden schließlich verschiedene Expressionssysteme und deren Vor- und Nachteile vorgestellt.

3.1 Flavonoide

Neben den Produkten des Primärstoffwechsels (z. B. Lipide, Kohlenhydrate und Proteine), die von essentieller Bedeutung für das Wachstum (Anabolismus) und den Stoffwechsel (Katabolismus) sind, produzieren Pflanzen viele weitere Stoffe. Diese werden sekundäre Pflanzenstoffe oder auch Sekundärmetabolite genannt [4]. Sie übernehmen oft ökologische Aufgaben in der Pflanzenwelt. Dazu gehört z. B. die chemische Abwehr von Fraßfeinden über Toxine oder Bitterstoffe; Duft- und Farbstoffe werden gebildet, um bestäubende Insekten anzulocken, und auch schützende Funktionen vor starker UV-Strahlung sind bekannt [5-8].

Zu den sekundären Pflanzenstoffen zählen u.a. Terpene, Alkaloide und auch die Flavonoide. Flavonoide sind polyphenolische Pflanzenfarbstoffe, die nur schlecht wasserlöslich sind. Da die meisten Vertreter dieser Stoffklasse in Reinform eine gelbliche Form haben, leitet sich hiervon auch der Name ab [lat.: *flavus* = gelb][9]. Oft ist die unterschiedliche Färbung von Blüten oder Früchten auf Flavonoide zurückzuführen. Sie sind daher auch meist in den äußeren Rändern der Pflanze verstärkt konzentriert [10, 11]. Die Vielfalt der Flavonoide ist mit ca. 9.000 verschiedenen gegenwärtig bekannten Strukturen sehr groß [12]. Chemisch gehört diese Verbindungsklasse zu den Polyphenolen. Die Grundstruktur der Flavonoide leitet sich vom Flavanmolekül (2-Phenylchroman) ab (siehe Abbildung 1, Mitte). Dieses ist aus zwei aromatischen C₆-Körpern (A, B), die über einen O-heterozyklischen C-Ring (C) miteinander verbunden sind, aufgebaut. Über die Oxidationsstufe des zentralen C-Rings und Modifikationen definieren sich nun die einzelnen Flavonoidklassen.

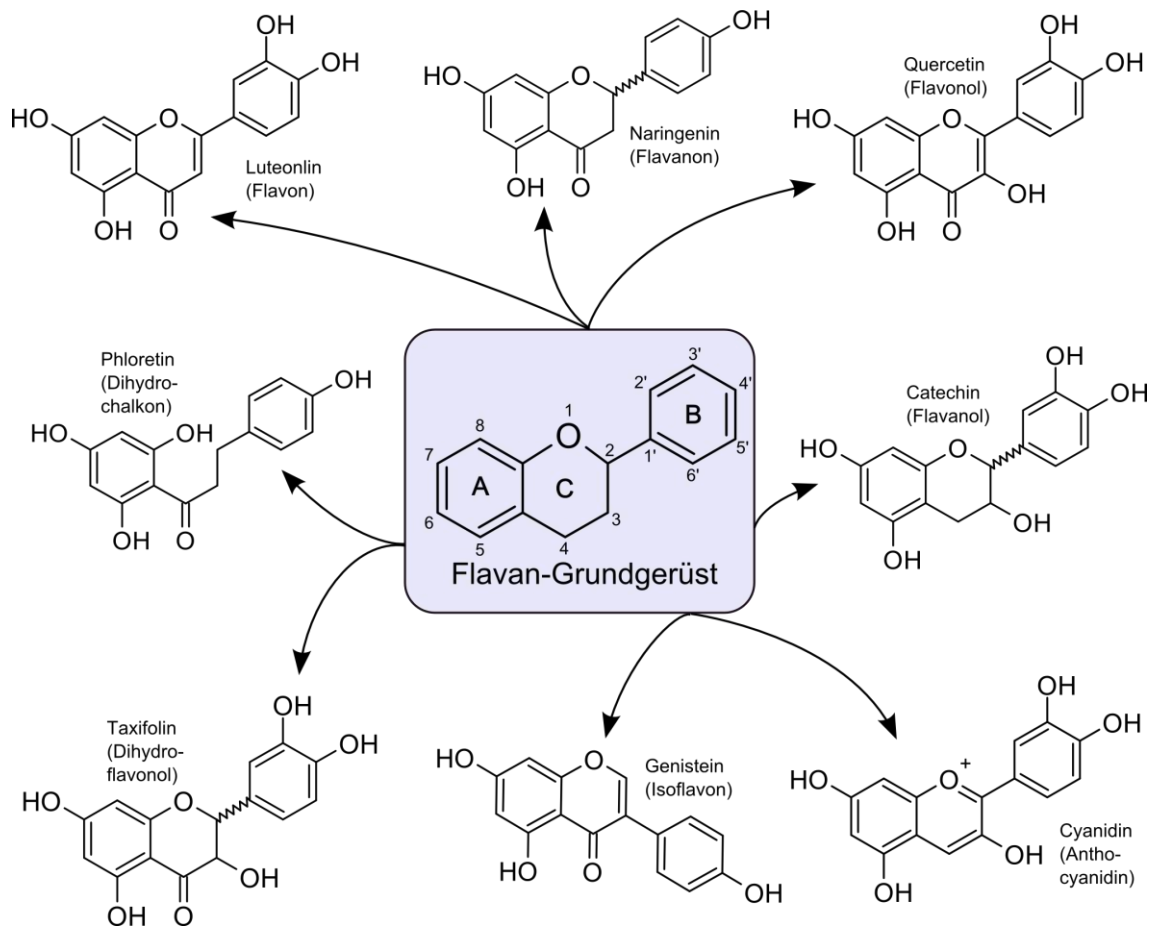


Abbildung 1: Übersicht über die verschiedenen Flavonoidklassen, je Klasse ist ein Beispiel dargestellt.

In Abbildung 1 sind die einzelnen Klassen mit jeweils einer Beispielsubstanz dargestellt. Naringenin ist bspw. ein bekannter Vertreter der Flavanone.

Betrachtet man die möglichen Modifikationen, wie z. B. Methylierungen, Glycosilierungen, Acetylierungen, Hydroxylierungen und mögliche Chiralitäten, erklärt sich die große Vielzahl verschiedener Flavonoide [8]. Wenn chirale Kohlenstoffatome, die linear polarisiertes Licht drehen, vorliegen, kommt die Messung des Drehwinkels als effektive Analysemöglichkeit in Frage [13]. Die meisten Flavonoide kommen in glykosilierter Form vor. Bisher sind über 80 verschiedene Glycosid-Anteile beschrieben, von denen D-Glucose, Glucorhamnose, D-Galactose, L-Rhamnose und L-Arabinose die häufigsten sind [14]. Allein für Quercetin sind 179 verschiedene Glycoside beschrieben worden [11].

3.1.1 Einsatz und Wirkungen von Flavonoiden

Flavonoide werden vor allem im medizinischen Bereich zur unterstützenden Therapie von Krankheiten eingesetzt. Dies ist vor allem auf ihre nachgewiesene antioxidative, vor freien Radikalen schützende Wirkung zurückzuführen [15, 16]. Die antioxidative Wirkung hängt dabei unmittelbar mit dem chemischen Aufbau der Flavonoide

zusammen. Die zahlreichen Hydroxylgruppen der Flavonoide binden die für den Organismus schädlichen reaktiven Moleküle und überführen sie in eine weniger aggressive Form, so dass eine Oxidation von Lipiden und Proteinen verhindert wird [17-19].

Bei der Behandlung von Venenleiden zeigen Flavonoidpräparate unterstützend zu Kompressionstherapien eine positive, unterstützende Wirkung [20]. Mehrere Präparate, die meist Troxerutin oder pflanzliche Extrakte (z. B. aus roten Weinrebenblättern) als Wirkstoff enthalten, sind bereits auf dem Markt [21, 22]. Konkret medizinisch angewandt werden Flavonoide auch unterstützend bei Leberleiden. Hier werden Extrakte aus den Früchten der Mariendistel *Silybum marianum* verwendet. Diese enthalten als Wirkstoff das Flavanol Silybin. Im Fall von Krankheiten, die Leberzellen schädigen oder zerstören, wie Leberzirrhose und chronischen Entzündungen, werden die Leberzellen durch Silybin stabilisiert. Zum einen werden entzündungsfördernde und giftige Stoffe schon vor ihrem Eintritt ins Lebergewebe durch die antioxidativen und radikalreduzierenden Eigenschaften neutralisiert, bzw. in geringerem Umfang gebildet. Zum anderen werden bestimmte, regenerierend wirkende Proteine vermehrt gebildet [2, 8, 23, 24]. Geforscht wird zurzeit an vielfältigen weiteren Möglichkeiten, Flavonoide als Arzneimittel einzusetzen. Rheuma, Diabetes Mellitus, Depressionen oder auch Thrombosen und Herz-Kreislaufkrankungen sind nur einige Beispiele für weitere Einsatzgebiete [25-29].

Abseits des medizinischen Bereichs werden Flavonoide in Nahrungsergänzungs- und Lebensmitteln verwendet. Sie werden bspw. als Anti-Aging-Präparate beworben und vertrieben. Vor allem Quercetinkapseln sind verbreitet [2]. Prinzipiell soll mit der Einnahme dem sogenannten oxidativem Stress vorgebeugt und entgegengewirkt werden. Man geht dabei davon aus, dass sogenannte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) die DNA und die mitochondriale DNA oxidativ schädigen. Dies führt dazu, dass die betroffenen Zellen absterben oder beschleunigt altern [16, 30]. Studien indizieren Zusammenhänge zwischen dem oxidativen Stress und Krankheiten wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Herz-Kreislaufkrankungen [31-33]. Flavonoide sollen dem oxidativen Stress durch Bindung der ROS entgegenwirken.

In Lebensmitteln werden Flavonoide vor allem verwendet, um den Geschmack zu beeinflussen [34, 35]. Besonders die empfundene Süße, aber auch die Intensität von Umami kann stark durch zugesetzte Flavonoide verändert werden [36, 37]. Außerdem sind Flavonoide in der Lage, bittere Geschmacksnuancen zu maskieren [34, 35].

Zukünftig könnten Flavonoide auch als Antibiotika angewendet werden. Insbesondere Quercetin zeigt ein breites Wirkspektrum gegen verschiedenste Mikroorganismen, insbesondere auch gegen die pathogenen Listerien und Salmonellen [38, 39]. Das Wachstum von *Staphylococcus aureus* wird durch Quercetin komplett inhibiert. *S. aureus* ist vor allem als gefährlicher Krankenhauskeim bekannt, der oft Multiresistenzen entwickelt, wodurch Infektionen mit herkömmlichen Antibiotika nur

schwer therapierbar sind [28]. Sogar antivirale und fungizide Aktivitäten von Flavonoiden sind beobachtet worden [40].

3.1.2 Naringenin und Phloretin

In Abbildung 2 sind die beiden Flavonoide dargestellt, die für die vorliegende Arbeit bedeutsam sind. Das Phloretin als gewünschtes Produkt und das Naringenin als Ausgangsstoff der Biotransformation. Phloretin gehört zu den Dihydrochalkonen, während Naringenin ein bekannter Vertreter der Flavanone ist. Naringenin liegt dabei als Racemat aus (-)-Naringenin und (+)-Naringenin vor.

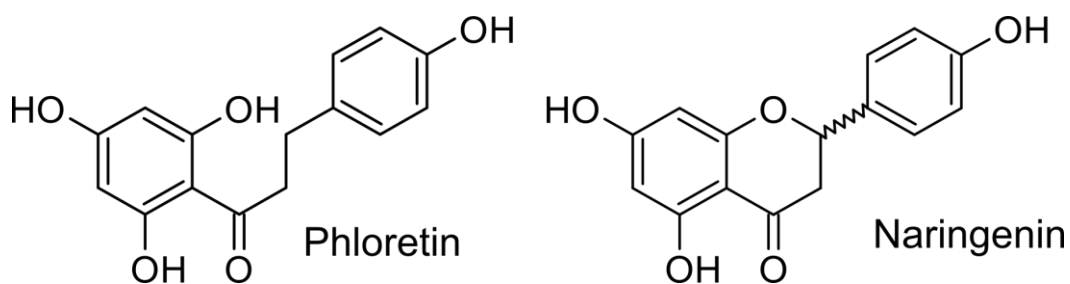


Abbildung 2: Strukturformeln von Phloretin und Naringenin.

Wie für viele andere Flavonoide finden sich zahlreiche Studien, die die gesundheitsfördernden Eigenschaften, besonders von Phloretin, aber auch von Naringenin (und dem Glycosid Naringin) beschreiben.

Unter anderem zeigt Naringenin antimutagene Wirkung und soll sogar das Risiko senken, an Krebs zu erkranken [41]. Ebenfalls wird die Glucoseversorgung von Erythrozyten beeinflusst, woraus positive Auswirkungen auf die Gesundheit resultieren [42]. Auch in Bezug auf Herz-Kreislaufkrankungen konnten positive Effekte beobachtet werden [43]. Allerdings sind auch Wechselwirkungen mit eingenommenen Medikamenten nachgewiesen. Die Wirkung eingenommener Arzneimittel kann dabei verstärkt oder verringert werden [44, 45].

Phloretin und das O-Glycosid Phloridzin zeigen ähnliche Effekte auf die Gesundheit. Ein verringertes Herzinfarktisiko [43], positive Auswirkungen auf die Knochensubstanz bei Osteoporose [46] und ein verringertes Risiko für Lungen- und Darmkrebs sind in der Literatur beschrieben [47-49].

Während bei vielen Flavonoiden nur von einer sehr geringen Verfügbarkeit, bzw. Resorption ausgegangen werden kann, finden sich Naringenin und Phloretin (bzw. deren Glycoside) in hohen Konzentrationen in Nahrungsmitteln des täglichen Lebens. Grapefruitsaft z. B. erreicht Konzentrationen von 377 mg/L Naringenin [50, 51]. Aus Grapefruits wird extraktiv auch der größte Teil des am Markt verfügbaren Naringenins gewonnen. Das hat zur Folge, dass sich ein hoher Weltmarktpreis für Grapefruits auch auf den Preis für Naringenin auswirkt [52].

Phloretin und Phloridzin werden hauptsächlich über Äpfel und Apfelsäfte aufgenommen. Einzelne Sorten enthalten bis zu 190 mg/L [51]. Gewonnen wird Phloretin ebenfalls extraktiv. Als Rohmaterial dient hierfür aufgrund der sehr hohen enthaltenden Konzentrationen oft Obstbaumrinde (Familie *Rosaceae*). Diese ist nur bedingt verfügbar, damit ist der Preis für Phloretin gegenüber Naringenin um ein Vielfaches teurer [52-54].

In der Praxis wird Phloretin, u.a. aufgrund der oben beschriebenen Wechselwirkungen von Naringenin bei gleichzeitiger Arzneimittelaufnahme, deutlich häufiger angewendet. Kosmetische Cremes (UV-Schutz, Anti-Aging für die Haut), nicht verschreibungspflichtige Pharmapräparate und der potentielle Einsatz in Lebensmitteln sind beschrieben [55, 56]. Phloretin kann z. B. als Süßkraftverstärker zugesetzt werden. So kann die zugesetzte Zuckermenge in Nahrungsmitteln deutlich reduziert werden und dem Trend, möglichst kalorienarme Lebensmittel anzubieten, mit einem natürlichen Zusatzstoff entsprochen werden. Auch kann Phloretin bittere Geschmackswahrnehmungen (z. B. durch Koffein verursacht) effizient vermindern oder komplett maskieren [35, 52].

Im nächsten Abschnitt werden die Herkunft und die bisher bekannten Mechanismen der Enzyme dargestellt, mit denen sich eine biokatalytische Gewinnung von Phloretin durchführen lässt.

3.1.3 *Eubacterium ramulus* als Quelle flavonoidtransformierender Enzyme

Eubacterium ramulus ist neben vielen anderen Bakterien ein Bewohner der menschlichen Darmflora. Wie die meisten der geschätzt 10^{13} - 10^{14} Bakterien, die dieses Ökosystem bevölkern, ist auch *E. ramulus* auf strikt anaerobe, d.h. sauerstofffreie Bedingungen angewiesen [57]. Erstmals erwähnt wurde *E. ramulus* von Moore et. al im Jahr 1976 [58]. Dort wird *E. ramulus* beschrieben als ein gram-positives, nicht sporulierendes, obligat anaerobes und flagellenloses Stabbakterium. Besonders während der Zellteilung bildet *E. ramulus* typischerweise Paare und lange Ketten, was sich gut im Lichtmikroskop beobachten lässt (siehe Abbildung 3).

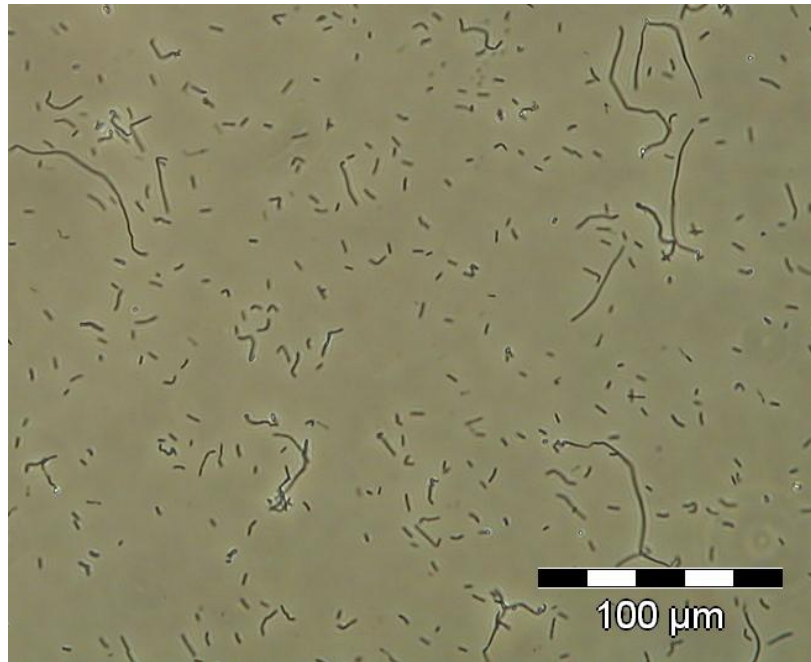


Abbildung 3: Lichtmikroskopische Aufnahme von *E. ramulus* (200x).

Die höchsten Wachstumsraten werden bei 37 °C mit Glucose als Kohlenstoffquelle erreicht. Ein Wachstum ist prinzipiell im Temperaturbereich von 30 – 45 °C möglich, auch kann Galactose als alternative C-Quelle verstoffwechselt werden. Als Sekundärmetabolite werden diverse kurzkettige organische Säuren, vor allem Butyrat, Methansäure und Acetat gebildet. Daher sinkt der pH-Wert im Verlauf einer Kultivierung [58, 59]. In vorherigen Arbeiten zeigte sich *E. ramulus* außerdem sehr sensibel gegen Scherstress. Bereits bei nur gering bewegten Kulturen wurde ein verlangsamtes Wachstum, bis hin zum Absterben der Kulturen beobachtet [3].

1999 wurde *E. ramulus* von Schneider et. al aus humanem Fäzes isoliert und näher untersucht [57]. Dabei konnten vielfältige metabolische Fähigkeiten bei der Biotransformation von Flavonoiden beobachtet werden. So kann das Bakterium unter anderem Quercetin, Naringenin, Phloretin, Eriodictyol, Luteolin, Taxifolin und weitere Flavonoide zu Phenolsäuren degradieren [60]. Sogar ein Wachstum auf Quercetin-3-Glucosid als Kohlenstoffquelle konnte beobachtet werden [57]. In Bezug auf Phloretin und die vorliegende Arbeit ist von Bedeutung, dass der enzymatische Abbau des Naringenins über Phloretin als Intermediat verläuft (siehe Abbildung 4).

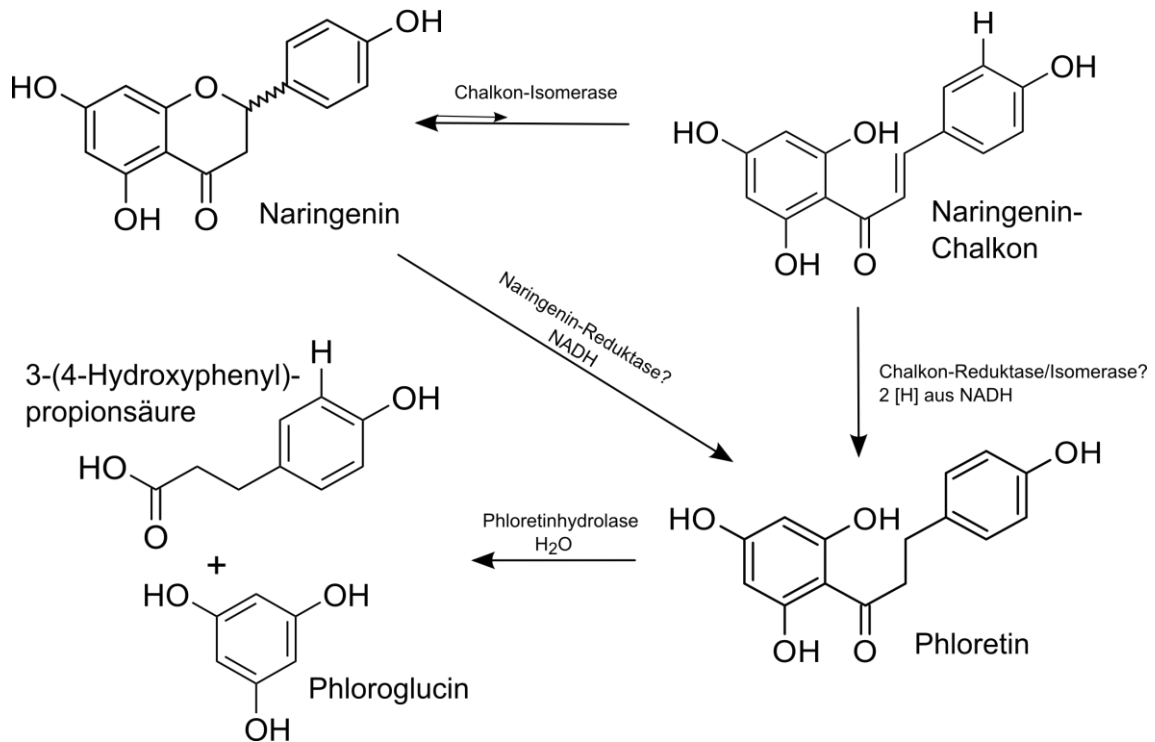


Abbildung 4: Postulierte Abbauwege von Naringenin durch *E. ramulus* [3, 59, 60].

Der exakte Mechanismus und alle beteiligten Enzyme sind nicht bis ins Detail bekannt [3]. Bekannt ist, dass zunächst das Naringenin in einer Gleichgewichtsreaktion durch die Öffnung des zentralen Heterozyklus zum Chalkon isomerisiert wird. Das Chalkon wird dann an der entstandenen 2,3-Doppelbindung in einer NADH-abhängigen Reaktion zum Phloretin reduziert. Abschließend wird Phloretin zu den Endprodukten Phloroglucin und 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure (HPP) hydrolysiert. Bisher sind zwei der an der Umsetzung beteiligten Enzyme identifiziert: die Chalkon-Isomerase (CHI) und die Phloretinhydrolase (PhH) [3, 59-61].

Gesichert ist, dass die CHI das Naringenin zum Naringenin-Chalkon in einer Gleichgewichtsreaktion isomerisiert. Das Reaktionsgleichgewicht liegt hier vermutlich auf Seiten des Naringenins. Es ist nicht bekannt, ob direkt eine (NADH-abhängige) Isomerisierung zum Phloretin durch die CHI möglich ist (siehe Abbildung 4). Möglicherweise sind noch weitere Enzyme an der Reaktion von Naringenin zu Phloretin beteiligt, oder die CHI ist Teil eines Multienzymkomplexes. Die Abbaureaktion von Phloretin zu den Endprodukten wird von der PhH katalysiert.

Chalkon-Isomerasen kommen natürlicherweise in großer Anzahl in Pflanzen vor. In der Literatur sind zahlreiche pflanzliche Chalkon-Isomerasen (EC-Nummer 5.5.1.6.) hinsichtlich Struktur, Substratspezifität, Reaktionsbedingungen und Mechanismen beschrieben. Beispielsweise sind Chalkon-Isomerasen aus Sojabohnen (*Glycin max*) und Schneckenklee (*Medicago sativa*) gut untersucht. Pflanzliche Chalkon-Isomerasen zeichnen sich durch hohe Homologien zueinander aus und sind aus einer Protein-Untereinheit von 24 – 28 kDa aufgebaut [62, 63].

Besonders an der CHI aus *E. ramulus* ist, dass sie die erste beschriebene nicht pflanzliche Chalkon-Isomerase ist. Mit einem Molekulargewicht von ca. 129 kDa, aufgebaut als Homotetramer aus 4 identischen Untereinheiten (ca. 30 kDa), unterscheidet sie sich grundlegend in Größe und Struktur von pflanzlichen Chalkon-Isomerasen. Die Sequenz des N-Terminus der CHI konnte 2003 identifiziert werden, zeigt jedoch keinerlei Homologien zu anderen Enzymen in bioinformatischen Datenbanken. Die Substratspezifität ist nicht auf Naringenin begrenzt, auch Taxifolin wird bspw. isomerisiert [59, 64].

Die Phloretinhydrolase (PhH) wurde bereits 2004 vollständig charakterisiert, aufgereinigt und in *Escherichia coli* kloniert. Sie ist vermutlich als Homodimer aufgebaut und besitzt ein natives Molekulargewicht von ca. 55 kDa [65]. Für die vorliegende Arbeit ist die Aktivität von PhH hinderlich, da das gewünschte Produkt Phloretin von der PhH hydrolysiert wird. Daher wurden in vergangenen Arbeiten verschiedene Möglichkeiten untersucht, die PhH zu inhibieren. Vielversprechende Ergebnisse konnten mit EDTA-Dinatriumsalz erzielt werden. Ein deutlich langsamerer Phloretinabbau konnte beobachtet werden [3].

Für einen erfolgreichen Produktionsprozess müsste allerdings die Aktivität vollständig unterbunden werden. Möglichkeiten dies zu erreichen wären z. B. eine Deletion des für die PhH codierenden Gens oder die Klonierung der CHI als Transgen in einen Wirt, der Phloretin nicht metabolisieren kann. Im nächsten Abschnitt sollen daher verschiedene Expressionssysteme und deren jeweilige Vor- und Nachteile beschrieben werden.

3.2 Expressionssysteme

Um ein Protein heterolog in einem Wirtsorganismus exprimieren zu können, muss das codierende Gen in den Wirt eingebracht werden. Dafür wird ein sogenannter Vektor benötigt. Häufig werden Plasmide benutzt, das Transgen kann aber auch über Viren und Phagen eingeschleust werden. Dies ist abhängig vom jeweiligen Organismus. Eine große Bandbreite verschiedenster Expressionssysteme in diversen Lebewesen ist etabliert und wird bereits zur heterologen Proteinexpression verwendet. Vor allem Enzyme zur technischen Anwendung und biopharmazeutische Produkte im Wert von mehreren Milliarden US-\$ werden mit diesen Systemen biotechnologisch hergestellt.

In Tabelle 1 ist ein Überblick gebräuchlicher Expressionssysteme gegeben. In der Regel wird zwischen prokaryotischen und eukaryotischen Systemen unterschieden. Die Unterschiede und ihre jeweiligen Vor- und Nachteile werden im folgenden Kapitel dargestellt.

Tabelle 1: Überblick über verschiedene Expressionssysteme.

Art	Beispiele
Bakterien	⇒ <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i>
Hefen	⇒ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia pastoris</i>
Filamentöse Pilze	⇒ <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus oryzae</i>
Insektenzelllinien	⇒ Sf-9-Zellen (<i>Spodoptera frugiperda</i> , Motte)
Tierische Zelllinien	⇒ CHO (<i>Chinese Hamster Ovary</i>), Hybridoma
Transgene Tiere	⇒ Mäuse, Kaninchen, Amphibien
Transgene Pflanzen	⇒ Maispflanzen, Tabakpflanzen, <i>Arabidopsis thaliana</i>

3.2.1 Prokaryotische Expressionssysteme

Zu den Prokaryoten gehören Bakterien und Archaeen. Während Archaeen aufgrund ihrer teilweise extremophilen Lebensräume als Quelle für potenziell einsetzbare Proteine interessant sind, werden Bakterien oft als Wirt verwendet, in dem die heterologen Produkte produziert werden. Bakterien haben gegenüber anderen Expressionssystemen einige Vorteile. So wachsen sie außerordentlich schnell, erreichen hohe Biomassen, sehr hohe Produktausbeuten (Überexpression) und können in preislich günstigen Wachstumsmedien kultiviert werden. Viele Produktionsstämme sind sehr gut untersucht und oft vollständig sequenziert worden, so dass häufig alle Promotoren zur Genregulation bekannt sind und genutzt werden können. Der größte Nachteil ist die fehlende Fähigkeit posttranslationale Modifikationen durchführen zu können. Vor allem Proteine menschlichen oder tierischen Ursprungs müssen in der Regel posttranslational glykosiliert werden, um aktiv und löslich zu sein [66, 67].

Das mit Abstand meist verwendete Expressionssystem zur mikrobiellen Herstellung rekombinanter Proteine ist das gram-negative, stäbchenförmige Darmbakterium *Escherichia coli*. Das Genom wurde bereits 1997 totalsequenziert und das Bakterium ist hinsichtlich seiner Biologie fundamental verstanden [68]. Genetische Arbeiten sind durch das genaue Verständnis der Abläufe von Transkription, Translation und Proteinfaltung in *E. coli* sehr einfach, schnell und präzise möglich. Die Ausbeute an rekombinantem Protein in *E. coli* ist enorm; sie kann bis zu 80% der Trockenmasse ausmachen [67].

Es existieren diverse Derivate (modifizierte Stämme), welche oft hinsichtlich des gewünschten Produkts optimiert sind. So ist z. B. der bekannte Stamm *E. coli* Rosetta mit einem erweiterten Satz an tRNAs ausgestattet. Die tRNA Konzentration im Cytoplasma ähnelt dadurch der von eukaryotischen Zellen, so dass Proteine die ursprünglich aus Eukaryoten stammen, besser gebildet werden können [69].

Weitere Vorteile von *E. coli* sind die gut kontrollierbaren und effizienten Promotoren und ein großer Pool genetischer Werkzeuge, um die Proteinausbeute weiter zu optimieren. Um die Faltung der rekombinanten Produkte zu unterstützen, war z.B. eine Co-Expression von Chaperonen in vielen Fällen erfolgreich [67]. Die Löslichkeit der

Produkte kann verbessert werden, wenn das Transgen mit dem Thioredoxin-Gen aus *E. coli* verknüpft wird [70].

Nachteilig ist, neben der bereits erwähnten fehlenden Glykosilierung der Produkte, auch eine mögliche Belastung mit Endotoxinen. Rekombinante Produkte müssen vor dem kommerziellen Einsatz von den Behörden (EU: European Food Safety Authority EFSA, USA: Food and Drug Administration FDA) zugelassen werden. Die Zulassung kann scheitern, wenn eine Gefahr durch Endotoxine nicht ausgeschlossen werden kann [66]. Werden schnell sehr hohe Zelldichten erreicht, steigt auch die Acetatbildung durch *E. coli* stark an. Dies führt dazu, dass die Kultur sich mit der Zeit selbst vergiftet und keine Proteinproduktion mehr möglich ist. Besondere Kultivierungsstrategien, um die spezifische Wachstumsrate niedrig zu halten, können dem entgegenwirken [71]. Problematisch kann auch die Bildung von Inclusion bodies sein. Die Proteine liegen dann unlöslich, aggregiert und meist nicht aktiv vor. Eine nachträgliche Renaturierung während des Downstream-Prozesses wird dann erforderlich. Dies steigert die Kosten und ist nicht immer möglich. Besonders Proteine mit vielen Disulfidbrücken können in *E. coli* oft nicht löslich exprimiert werden [67].

Neben *E. coli* ist die Produktion von rekombinanten Proteinen mithilfe von Stämmen des gram-positiven *Bacillus spp.*, insbesondere *B. subtilis*, weit verbreitet. Besonders industriell relevante Proteine wie z. B. Proteasen (Waschmittelindustrie) und Amylasen (Stärkeverzuckerung, Backprozesse) werden häufig mit *B. subtilis* hergestellt. Wie auch *E. coli* ist *B. subtilis* biochemisch sehr gut untersucht, kann einfach genetisch modifiziert werden und es können sehr hohe Zelldichten erreicht werden. *B. subtilis* hat außerdem den Vorteil, dass Produkte natürlicherweise sehr effizient ins Medium sekretiert werden und keine Inclusion bodies gebildet werden. Dies reduziert den Aufwand und die Kosten im Downstream-Prozess erheblich, da ein Zellaufschluss komplett entfallen kann. Des Weiteren bilden *Bacillus spp.* keine Endotoxine und haben deswegen durch die FDA den Status GRAS (engl.: „generally regarded as safe“) verliehen bekommen [72].

Ein großer Nachteil von *B. subtilis* ist die Bildung diverser Proteasen, so dass die rekombinanten Produkte degradiert werden können. Es existieren jedoch auch Produktionsstämme, in denen die entsprechenden Gene deletiert wurden, um dieses Problem zu umgehen [73].

Ergänzend soll im nächsten Abschnitt beschrieben werden, wie *E. coli* unter sauerstoffarmen und -freien Umgebungsbedingungen überleben kann. Da die Enzyme für die in dieser Arbeit gewünschte Biotransformation ursprünglich aus einem anaeroben Bakterium (*E. ramulus*) kommen, kann es sinnvoll sein, einen Produktionsorganismus nach der Klonierung der entsprechenden Gene unter anaeroben Bedingungen zu kultivieren. *E. coli* als bekannter fakultativ anaerober Organismus käme dafür gut in Frage.

3.2.1.1 Anaerobe Atmungswege in *E. coli*

E. coli kann auch unter schwierigen Rahmenbedingungen (bspw. Temperatur und pH-Wert nicht im optimalen Bereich) überleben. Als fakultativ anaerobes Bakterium überlebt es auch unter Sauerstoffmangel. In der Literatur finden sich Beispiele, in denen Proteine aus Anaerobiern heterolog in *E. coli* exprimiert wurden. Dabei musste die Bildung der Proteine teilweise auch unter anaeroben Bedingungen erfolgen, da sonst keine Aktivität nachweisbar war [74, 75]. Da in dieser Arbeit die heterologe Expression von Proteinen aus einem Anaerobier (*E. ramulus*) in *E. coli* als mögliche Lösung der dargestellten Problematik, der biokatalytischen Phloretinherstellung, untersucht werden soll, wird hier kurz auf die anaeroben Stoffwechselwege in *E. coli* eingegangen.

Unter anaeroben Bedingungen muss Sauerstoff (Redoxpotential bezogen auf pH 7: $E^0 = +820$ mV) durch alternative terminale Elektronenakzeptoren substituiert werden. *E. coli* kann, um die benötigten Reduktionsäquivalente (z. B. NADH_2) bereit zu stellen, hierzu Nitrat ($E^0 = +433$ mV), Nitrit ($E^0 = +340$ mV), Dimethylsulfoxid ($E^0 = +160$ mV), Triethylamin-N-oxid ($E^0 = +130$ mV) und Fumarat ($E^0 = +33$ mV) verwenden. Dadurch wird der Protonengradient über die Cytoplasmamembran aufrechterhalten, der die Regeneration von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat durch die membrangebundene ATP-Synthase ermöglicht. Die verschiedenen Atmungstypen unterscheiden sich durch die ATP-Ausbeute pro Mol Substrat. Für die unterschiedlichen Stoffwechselwege werden zum Teil spezifische Enzyme benötigt [76, 77]. Stehen keine externen Elektronenakzeptoren für die Oxidation des organischen Substrats zur Verfügung, greift *E. coli* auf Gärungsprozesse zurück, um den Metabolismus aufrecht zu erhalten. In *E. coli* tritt dann die sogenannte gemischte Säuregärung auf. Aus Phosphoenolpyruvat entsteht dabei Acetat, Lactat, Succinat, Formiat, Ethanol, Wasser und Kohlenstoffdioxid [78]. Neue Erkenntnisse zeigen, dass *E. coli* mit Glycerin als Kohlenstoffquelle unter anaeroben Bedingungen über Methylglyoxal und Hydroxyaceton 1,2-Propandiol bilden kann. Als möglicher Stoffwechselweg wird die 1,2-Propandiol-Gärung vorgeschlagen [79].

3.2.2 Eukaryotische Expressionssysteme

Bezogen auf die rekombinante Expression von Proteinen, ist der größte Unterschied von Eukaryoten gegenüber den Bakterien die Glykosilierung der Produkte. Die posttranslational angehängten Zuckerreste sind häufig für die Stabilität, die korrekte Faltung und die Aktivität wichtig. Auch die in Bakterien problematisch zu exprimierenden Proteine mit vielen Disulfidbrücken werden korrekt gebildet. Die Disulfidbrücken sind häufig für die korrekte Ausbildung der 3D-Struktur und damit die Aktivität absolut notwendig. Eukaryoten besitzen sogenannte Proteindisulfid-

isomerasen im endoplasmatischen Retikulum, welche die Ausbildung der Brücken unterstützen; in Bakterien sind diese Isomerasen nicht zu finden [80].

Hefen, die einzelligen eukaryotischen Pilze, sind oft die nächste Wahl, wenn ein Protein in Bakterien nicht in ausreichender Menge und Aktivität produziert werden kann. Sie vereinen die Vorteile von Bakterien, wie schnelles Wachstum auf preisgünstigen Medien, hohe Zelldichten und eine einfache genetische Manipulation, mit den Eigenschaften eukaryotischer Systeme. So werden heterologe Proteine in der Regel auch mit einer Glykosylierung versehen. Auch Produkte mit vielen Disulfidbrücken können unproblematisch in Hefen gebildet werden. Eine Sekretion ins Medium ist in der Regel möglich, wenn ein entsprechendes Signalpeptid verwendet wird [67]. Die meistgenutzten Hefen sind die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und die methylotrophe Hefe *Pichia pastoris*.

S. cerevisiae wird bereits seit Tausenden von Jahren zur Herstellung von alkoholischen Getränken (Vergärung) und Backwaren genutzt [81]. Abgesehen von *E. coli* ist wohl kein Mikroorganismus so umfassend untersucht. Daher existiert eine große Bandbreite von genetischen Werkzeugen und Stämmen. Kommerziell werden mit *S. cerevisiae* z. B. Insulin, Hepatitis B Oberflächen-Antigen, Hirudin und verschiedene Wachstumsfaktoren produziert [66, 67]. Teilweise wurden komplette Stoffwechselwege über *metabolic engineering* in *S. cerevisiae* inkloniert, was das Potenzial der Hefe und das gute Verständnis, das man von dem Organismus besitzt, eindrucksvoll demonstriert. Beispielsweise wurden 13 Gene zur Hydrocortisonsynthese aus höheren Eukaryoten kloniert, so dass *S. cerevisiae* danach in der Lage war, einen völlig neuen Metaboliten zu bilden, der nicht natürlicherweise gebildet wird [82, 83].

P. pastoris bietet ähnliche Vorteile wie *S. cerevisiae*. Die Besonderheit ist, dass *P. pastoris* in der Lage ist, auf Methanol als alleiniger C-Quelle zu wachsen. Für die meisten anderen Organismen stellt Methanol ein starkes Zellgift dar. Ermöglicht wird dies über einen gesonderten Stoffwechselweg mit spezifischen Enzymen [84]. Über die Alkoholoxidase (AOX) wird zunächst das Methanol zu Wasserstoffperoxid und Formaldehyd oxidiert. Das Wasserstoffperoxid wird dann rasch von einer Katalase zu Wasser und Sauerstoff abgebaut. Das Formaldehyd wird parallel zu Methansäure und Kohlenstoffdioxid oxidiert, woraus die Hefe Energie gewinnt. Die Gene des Methanolmetabolismus sind durch die Promotoren AOX1 und AOX2 reguliert. Diese gehören zu den am stärksten regulierten und induzierbaren Promotoren die bekannt sind. Glucose wirkt hier als äußerst starker Repressor, während Methanol als sehr starker Induktor fungiert. Heterologe Gene werden daher immer hinter einen AOX-Promotor, in der Regel AOX1, kloniert. Die Induktion erfolgt dann über die Zugabe von Methanol. Oft ist ein Produktionsprozess in eine Wachstumsphase auf Glycerin oder Glucose, und eine anschließende, langsame Umstellung auf Methanol eingeteilt. Um eine höhere Biomasse vor der Induktion zu erreichen, kann auch eine fed-batch-Phase zwischengestellt sein. Biotrockenmassen von mehr als 150 g/L (entspricht $OD_{600} > 500$)

können so erreicht werden [85, 86]. *P. pastoris* Stämme werden in Mut⁺- und Mut^S-Stämme eingeteilt. Mut^S stellt dabei einen modifizierten Wildtyp (Mut⁺) dar, bei dem einige AOX1 Gene entfernt worden sind. Dadurch ist das Wachstum auf Methanol verlangsamt, die Menge an gebildetem Protein bei gleicher Substratmenge jedoch mehr als doppelt so hoch. Eine weitere Besonderheit ist die sehr effiziente Ausscheidung von heterologen Proteinen bei einer gleichzeitig sehr geringen Sekretion hefeeigener Proteine. Produkte können so leichter aufgereinigt werden. Über 500 verschiedene rekombinante Produkte werden mit *P. pastoris* erzeugt. Die FDA hat *P. pastoris* auch den GRAS-Status verliehen [84, 86, 87].

Obwohl Hefen rekombinante Produkte glykosilieren, ist beobachtet worden, dass diese keine Aktivität zeigen oder Immunreaktionen hervorrufen. Oft ist das Glykosilierungsmuster nicht korrekt, oder es liegt eine Hyperglykosilierung vor. Hefen fügen Mannosereste (*S. cerevisiae* > 200 Mannoseeinheiten, *P. pastoris* ca. 8 – 14 Mannoseeinheiten) an. Die Glykosilierungsmuster von Proteinen menschlichen oder tierischen Ursprungs sind meist deutlich komplexer und beinhalten verschiedene weitere Zucker und Verknüpfungen.

Insekten- und Säugetierzelllinien können diese komplexeren Glykosilierungsmuster ausbilden und stellen weitere Systeme zur heterologen Expression dar. Unter den Insektzelllinien werden besonders Sf-21 und ihre Derivate genutzt. Dabei handelt es sich um Zellen, die aus dem Ovargewebe einer Mottenart (*Spodoptera frugiperda*) isoliert worden sind. Sie werden in Suspension kultiviert. Betrachtet man die Wachstumsgeschwindigkeit, wachsen die SF-Zellen zwar langsamer als Hefen und Bakterien, aber deutlich schneller als Säugetierzellen. Ein weiterer Vorteil gegenüber Säugerzellen sind preisgünstigere, serumfreie Medien [67, 88].

Das Transgen wird in der Regel über Baculoviren (doppelsträngige DNA-Viren, vor allem *Autographa californica*) in die Zellen gebracht. Dabei liegt es unter der Kontrolle des viralen Polyhedrin-Promotors. Polyhedrin ist ein Protein, das normalerweise in großen Mengen exprimiert wird und nicht für die Replikation der Viren notwendig ist. Durch die Infektion werden die Zellen dazu angeregt, das rekombinante Protein zu exprimieren. Die Expressionsrate übertrifft die von Säugetierzellen in der Regel. Weil Baculoviren ausschließlich Wirbellose befallen können, kann unter vergleichsweise einfachen Sicherheitsbedingungen gearbeitet werden [89]. Da sich die Baculoviren jedoch über den lytischen Weg, d.h. die Zerstörung der Wirtszelle, vermehren, können proteolytische Enzyme aus der Wirtszelle freigesetzt werden und das Produkt schädigen. Außerdem werden, insbesondere bei humanen Proteinen, die N-Glykan-Strukturen falsch oder gar nicht ausgebildet. Die Enzyme, die solche N-Glykosilierungen bilden können, fehlen in Insektzellen [90].

Biopharmazeutika für die medizinische Anwendung werden daher i.d.R. rekombinant in Säugetierzelllinien exprimiert. Besonders CHO-Zellen (engl.: „chinese hamster ovary“) finden breite Anwendung. Die Produkte sind in der Regel richtig gefaltet,

humanidentisch glykosiliert und gut löslich. Auch eine serumfreie Kultivierung von CHO ist möglich, was Immunreaktionen bei der Anwendung minimiert und eine wichtige Voraussetzung für die Zulassung durch die FDA ist. Große (>100 kDa), aus mehreren Untereinheiten aufgebaute Proteine (z.B. Antikörper), welche in anderen Systemen oft nicht korrekt gebildet werden, werden meist gut und aktiv exprimiert. Nachteile des CHO-Systems sind verhältnismäßig hohe Kosten aufgrund teurer Medien und langer Kultivierungsdauer (vergleichsweise langsames Wachstum). Das liegt unter anderem daran, dass CHO-Zellen ursprünglich adhärente Zellen sind, die entsprechend modifiziert wurden, um auch in Suspension wachsen zu können. Außerdem muss mit hohen Sicherheitsmaßnahmen gearbeitet werden, damit eine Produktkontamination bspw. mit pathogenen Viren oder DNA-Fragmenten vermieden wird. Problematisch kann sein, dass sich das Glykosilierungsmuster von Kultivierung zu Kultivierung leicht unterscheiden kann und nicht mehr humanidentisch ist [66, 67, 91]. Vor allem im Forschungsbereich haben sich daher alternative Zelllinien humanen Ursprungs herauskristallisiert, die in den letzten Jahren immer häufiger eingesetzt werden. Hier sind vor allem PER.C6 und HEK293 (engl.: „human embryonic kidney“) zu nennen. Bei PER.C6 handelt es sich eine designte Zelllinie der Firma Crucell.

Die Vorteile im Vergleich zu CHO sind vor allem eine vollkommen exakte, reproduzierbare Glykosilierung und höhere erreichbare Zellzahlen und Produktausbeuten, sowie ein schnelleres Wachstum [92].

Weitere eukaryotische Expressionssysteme, auf die an dieser Stelle nicht eingegangen wird, sind filamentöse Pilze (z.B. *Aspergillus ssp.*) und transgene Pflanzen.

4 Experimenteller Teil

Im Folgenden werden die Ergebnisse der praktischen Arbeiten vorgestellt, die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt wurden. Der experimentelle Teil ist in sieben Unterkapitel gegliedert. Im ersten Abschnitt (4.1) werden die Ergebnisse der Arbeiten unter strikt anaeroben Bedingungen mit *E. ramulus* vorgestellt. Im zweiten Abschnitt wird das Potenzial von *Pichia pastoris* als mögliches Expressionssystem für die gewünschte Biotransformation erläutert und die Ergebnisse der dazu durchgeführten Experimente werden gezeigt.

Im dritten Kapitel (4.3) wird dargestellt, wie unter Nutzung eines transgenen *E. coli* Stammes eine Prozessführung entwickelt wurde, mit der sich Phloretin biokatalytisch gewinnen lässt. Hier wird auch ausführlich die Durchführung des entwickelten Prozesses dargestellt, die im Wesentlichen während der folgenden Versuche so beibehalten wurde.

Die Experimente zur weiteren Optimierung der entwickelten Biotransformation sind Gegenstand des vierten Abschnitts (4.4). Hier finden sich auch Versuche zur Skalierbarkeit des Prozesses in größere und kleinere Volumina.

Chirale Analysen der Biotransformation sind der wesentliche Bestandteil des fünften Abschnitts. Im sechsten, vorletzten Kapitel der Arbeit werden Experimente mit einem weiteren, verbessertem transgenen *E. coli* Produktionsstamm gezeigt und mit den Ergebnissen des vierten Abschnitts verglichen.

Im letzten Abschnitt (4.7) werden schließlich erste Versuche zur Produktaufreinigung beschrieben. Hier wurden sogenannte Hohlfasermodule zur extraktiven Gewinnung des Produkts eingesetzt.

Die folgenden Abschnitte enthalten einzelne Ergebnisse, die im Rahmen von durch den Autor betreuten Studienabschlussarbeiten entstanden. Im Anhang unter 6.1 ist eine Auflistung zu finden.

Teilweise sind die folgenden Ergebnisse in Fachzeitschriften veröffentlicht worden [93, 94].

4.1 Arbeiten mit *Eubacterium ramulus*

Das anaerobe Darmbakterium *E. ramulus* zeigt eine große Bandbreite an Flavonoidabbau- und Transformationsaktivitäten (siehe 3.1.3). Besonders die für diese Arbeit interessanten Flavonoide, das Naringenin und das Phloretin, werden mit sehr hohen Aktivitäten metabolisiert. So zeigte sich in vorangegangenen Arbeiten, dass einer *E. ramulus* Kultur zugesetztes Naringenin (250 μM) bereits nach 3 h nahezu vollständig abgebaut ist. Im Konzentrationsbereich 100 – 500 μM konnten Abbau-

geschwindigkeiten von 162,2 $\mu\text{M/h}$ für Naringenin gemessen werden [3, 95]. Um dieses Potenzial ausnutzen zu können, sind große Mengen an Biomasse für weitere Untersuchungen notwendig. Die hohe Scherstressempfindlichkeit von *E. ramulus* und die notwendigen, strikt anaeroben Kultivierungsbedingungen erfordern hierbei, verglichen mit bspw. einer *E. coli* Kultivierung, eine besondere Handhabung. Im folgenden Kapitel werden Arbeiten dargestellt, die das Ziel hatten, die produzierte *E. ramulus* Biomasse zu steigern, um eine mögliche Biotransformation mit dem Wildtyp zu etablieren. Auch eine mögliche Aufreinigung der Chalkon-Isomerase (CHI), die in *E. ramulus* nur in, verglichen mit rekombinanten Produkten, sehr kleinen Mengen gebildet wird, wird deutlich erleichtert, wenn genügend Biomasse verfügbar ist. Falls die Biotransformation auf Basis von *E. ramulus* etabliert werden könnte, wäre dies außerdem vorteilhaft für die industrielle Produktion, was die Zulassung und Deklaration betrifft. So könnte das Phloretin aus dieser Biotransformation als natürlich beworben werden, der Hinweis auf die Nutzung von GVO (gentechnisch veränderte Organismen) würde entfallen. Im folgenden Abschnitt werden zunächst batch-Kultivierungen in einem besonderen Einweg-Beutelreaktorsystem gezeigt und das System näher beschrieben. Anschließend wird ein fed-batch-Ansatz unter den anaeroben Prozessbedingungen dargestellt.

4.1.1 Batch-Kultivierungen von *E. ramulus*

In vorherigen Arbeiten konnte *E. ramulus* erfolgreich und reproduzierbar im batch-Verfahren kultiviert werden [3, 93, 95]. Um die etablierte Flaschenkultivierung (400 mL Maßstab) mit dem Ziel einer höheren produzierten Biomasse aufskalieren zu können, wurde mit dem sogenannten Einweg-Beutelreaktor (BIOSTAT Cultibag RM optical, Sartorius AG) ein geeignetes System gefunden (siehe Abbildung 5).

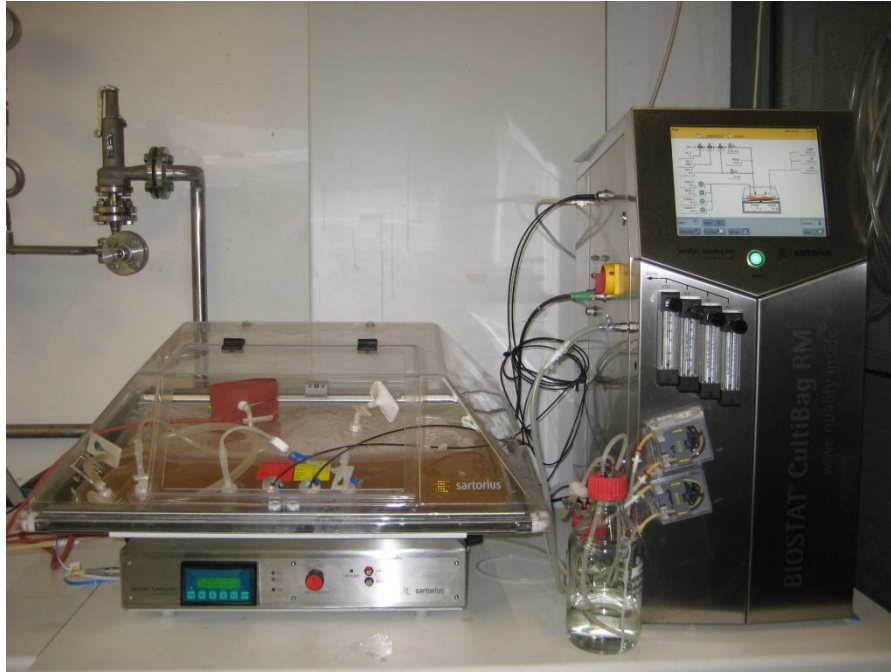


Abbildung 5: Verwendetes Einweg-Beutelreaktorsystem. BIOSTAT Cultibag RM optical (links Rocker mit Haube, rechts digitale Prozesssteuerungseinheit).

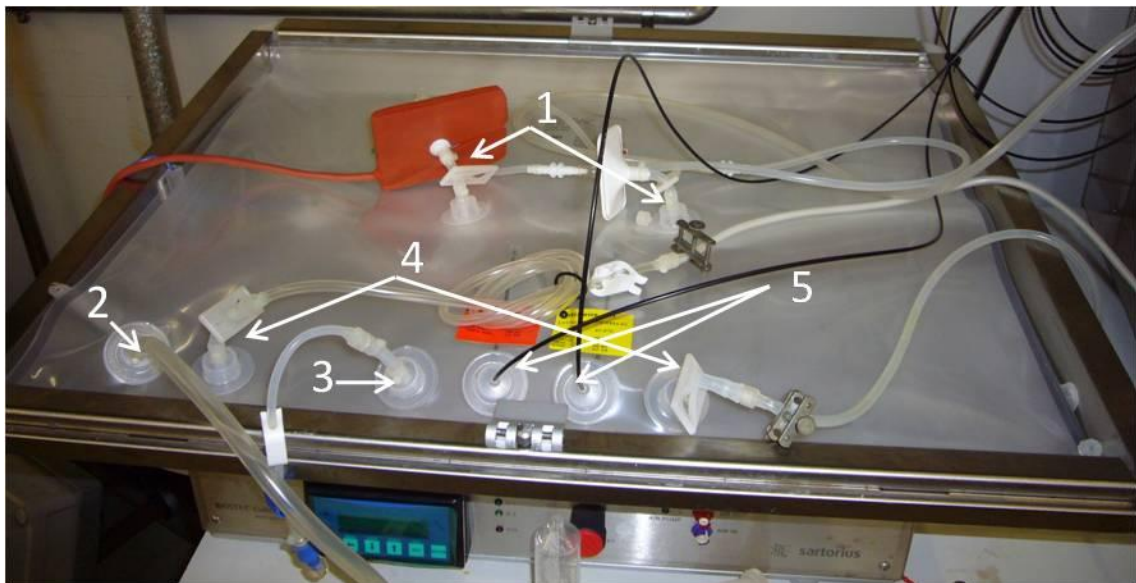


Abbildung 6: 20-L-Beutel auf der Rocker-Plattform. 1) Abgas (links) und Zuluftschläuche (rechts), 2) Befüllschlauch, 3) Luer-Lock-Zugang für Probenentnahme und Inokulation, 4) Säure-/Basezufuhr, 5) Einlässe für Chemosensoren (pO_2 und pH).

Die Besonderheit des Beutelreaktors ist die welleninduzierte Durchmischung. Im Gegensatz zu einem Edelstahlrührkessel werden keine mechanischen Rührwerke zur Durchmischung verwendet, welche oft einen hohen Scherstress auf Mikroorganismen ausüben. Stattdessen wird diese über eine bewegliche Rocker-Plattform erzeugt (Abbildung 6). Hierzu wird der Beutel auf der Plattform befestigt. Kippbewegungen (engl.: „rocks“) der Plattform lassen eine Welle entstehen, wodurch das Medium durchmischt wird und auch der Gaseintrag aus dem Kopfraum des Beutels gewährleistet ist. Die Intensität kann dabei über den Kippwinkel der Plattform und über die Anzahl

der Kippbewegungen pro Minute (KpM) geregelt werden. Beachtet werden muss das maximale Füllvolumen der Beutel, da sonst keine Welle entstehen kann. Die Füllmenge darf maximal die Hälfte des Beutelvolumens betragen; so kann z. B. ein 20 L Beutel mit maximal 10 L Kulturvolumen betrieben werden. Die Temperatur wird online über ein in die Rocker-Plattform integriertes Thermoelement gemessen. Die in-situ-Überwachung von pO_2 - und pH-Wert erfolgt über vorkalibrierte, optische Chemosensoren, die auf Fluoreszenz-Patches basieren [96].

Der Nachteil der welleninduzierten Durchmischung ist der im Vergleich mit einem Rührkessel schlechtere Sauerstoffeintrag. Der volumenbezogene Sauerstoffübergangskoeffizient (k_{La}) beträgt je nach Volumen des verwendeten Beutels zwischen 18 h^{-1} und 47 h^{-1} und ist damit ca. achtmal niedriger als in einem 10 L Edelstahlrührkessel (392 h^{-1}) [97]. Dies ist für Bakterien wie z. B. *E. coli* i.d.R. nicht ausreichend und wachstumslimitierend. Daher werden Beutelreaktorsysteme vornehmlich für langsam wachsende, scherstress-sensitive Tier- und Pflanzenzellen verwendet [98, 99]. Da *E. ramulus* äußerst scherstress-sensitiv ist und strikt anaerob kultiviert werden muss (siehe 3.1.3), stellt der Nachteil des geringen Sauerstoffeintrags hier gemeinsam mit dem geringen ausgeübten Scherstress einen wesentlichen Vorteil dar. Außerdem ist die Schutzgas-Atmosphäre im Beutel für die anaerobe Kultivierung oder eine anschließende Lagerung der Kulturbrühe ebenfalls vorteilhaft. Daher eignen sich Einweg-Beutelreaktoren prinzipiell sehr gut für die strikt anaerobe Kultivierung.

Zum Vergleich wurde *E. ramulus* parallel in anoxisch präparierten Flaschen kultiviert. In allen Kultivierungen wurde mit anoxischem ST-Medium, einem Komplexmedium mit Mikrosalzen und -nährstoffen gearbeitet (siehe Anhang 6.3.8 und 6.4.5).

Aufgrund der sehr empfindlichen Reaktion auf Schüttelbewegungen von *E. ramulus* wurden die Flaschen unbewegt kultiviert [3]. In der Beutelkultivierung wurden die minimal möglichen Prozessvariablen gewählt; eine Kippfrequenz von 8 KpM und ein Kippwinkel von $3,9^\circ$. So konnte der Scherstress minimiert werden und trotzdem die Durchmischung, welche aufgrund der pH-Regelung (1 M HCl, 6 M NaOH) notwendig ist, gewährleistet werden. Offline wurden regelmäßig photometrisch die Zelldichte und enzymatisch der Glucosegehalt gemessen. Die Inokulation erfolgte über 100 mL Spritzen. Es wurden 800 mL Vorkultur verwendet.

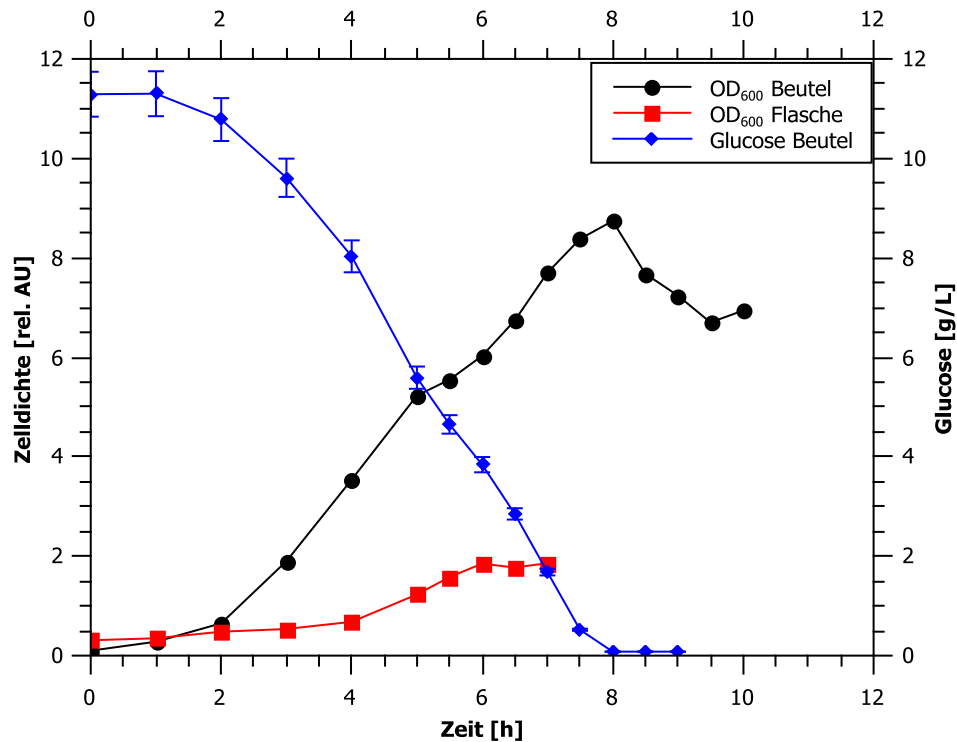


Abbildung 7: Verläufe der batch-Kultivierungen von *E. ramulus* in 400 mL Flaschenkultur und 10 L Beutelkultur.

In Abbildung 7 sind exemplarisch die Verläufe einer 400 mL Flaschen- und einer 10 L Beutelkultivierung dargestellt. Es war in beiden Fällen nur eine sehr kurze lag-Phase von 1 h zu beobachten. Die 400 mL Kultivierung war bereits nach 7 h ($\mu_{\max} = 0,26 \text{ h}^{-1}$) in der stationären Wachstumsphase und erreichte eine maximale Zelldichte von 1,86 rel. AU. Hier wurde ein Glucosewert von 11,5 g/L gemessen. Danach war der pH-Wert durch die starke Produktion von kurzkettigen organischen Säuren durch *E. ramulus* von anfänglich pH 7,1 auf einen pH von 5,1 gefallen, so dass kein weiteres Wachstum möglich gewesen ist, obwohl noch Glucose vorhanden war [58, 95]. Aufgrund der pH-Regelung im Beutelreaktor war das Wachstum im Gegensatz hierzu nicht durch eine pH-Änderung limitiert. Es wurden insgesamt 196 mL 6 M NaOH zugegeben, was auf eine sehr starke Säureproduktion durch *E. ramulus* hindeutet.

Die erreichte Zelldichte betrug im Beutelreaktor ein Vielfaches der Flaschenkultur. Mit einer OD₆₀₀ von 8,74 rel. AU nach 8 h ($\mu_{\max} = 0,56 \text{ h}^{-1}$) lag sie rund fünfmal höher. Zu diesem Zeitpunkt trat die Kultur auch in die stationäre Phase. Auffallend ist, dass parallel auch die Glucose nach 8 h komplett verbraucht war. Es ist naheliegend, dass das Wachstum hier durch einen Glucosemangel limitiert wurde. Ergebnisse aus vorherigen Arbeiten und Publikationen mit einem sehr ähnlichen Wachstums- und Glucoseverlauf unterstützen diese Hypothese [3, 93, 95]. Die maximal erreichte Biotrockenmasse im Beutelreaktor betrug 2,4 g/L.

Um die produzierte Biomasse weiter zu steigern, wurde zunächst versucht, den Prozess aufzuskalieren. Hierfür wurde die Rocker-Plattform gegen eine größere getauscht,

wodurch nun ein 50 L Beutel (entspricht bei maximaler Füllung 25 L Kulturvolumen) verwendet werden konnte. Dadurch, dass das anoxische Medium in mehreren Chargen präpariert werden musste (siehe 6.3.8), verdoppelte sich die Rüstzeit im Vergleich zur vorher gezeigten 10 L Kultivierung. Das Vorkulturvolumen stieg auf 1,6 L. Die Inokulation des Beutels wie im Fall der 10 L Kultur über große Spritzen (100 mL) durchzuführen, war hier nicht mehr in einem angemessenen Zeitraum möglich. Als alternatives Verfahren konnte eine Apparatur entwickelt werden, mit der die Überführung der Vorkultur rund fünfmal schneller möglich war. Dabei handelte es sich um eine anoxische Schlauchbrücke. Mit dieser war es möglich, direkt aus den Vorkulturflaschen zu inokulieren. Diese Inokulations-Methode brachte neben der Zeitersparnis weitere Vorteile mit sich. So kühlte die Vorkultur während der Überführung nicht so stark ab. Der Scherstress war außerdem geringer, weil die Kultur nicht mehr mehrfach, wie mit der vorherigen Methode, sondern nur noch einmal durch die Kanülen gepresst werden musste. Eine ausführliche Beschreibung der Apparatur ist im Anhang 6.2.1 gezeigt.

Obwohl die Kultivierung im 25 L-Maßstab mehrfach wiederholt und optimiert wurde und mögliche Fehlerquellen ausgeschlossen werden konnten, zeigte sich nur ein sehr geringes Wachstum in der Kultivierung. Im besten Fall wurde eine Zelldichte von 2,3 rel. AU nach einer für *E. ramulus* untypisch langen lag-Phase von 18 h erreicht. Die Daten und weitere Informationen sind unter 6.2.1 im Anhang zu finden.

4.1.2 Fed-batch-Kultivierung von *E. ramulus* im 10 L Beutelreaktorsystem

Ein Scale-up im Beutelreaktor auf größere Maßstäbe als 10 L mit *E. ramulus* ist hinsichtlich der Durchführung aufwändig und scheint nicht ohne weiteres möglich zu sein (siehe 4.1.1). Deswegen mussten andere Wege gefunden werden, um die Biomasse zu steigern.

Da in einer 10 L batch-Kultivierung die Glucose wahrscheinlich den wachstums-limitierenden Faktor darstellt (siehe 4.1.1), ist hier ein Punkt, an dem weiter optimiert werden kann. Vorherige Arbeiten haben gezeigt, dass eine weitere Steigerung der Glucosekonzentration, die am Anfang vorgelegt wird, nicht zielführend ist. Bei der bisher verwendeten Startkonzentration von 12 g/L Glucose ist bereits das Maximum erreicht. Wird die zu Beginn vorgelegte Glucosekonzentration höher gewählt, zeigt *E. ramulus* kein Wachstum [3]. Deswegen wurde ein Glucose-Feed mit stufenweiser Zugabe näher untersucht, um eine höhere Biomasseausbeute zu ermöglichen.

Um einen möglichen Sauerstoffeintrag über den Feed zu verhindern, wurde die Glucoselösung unter Begasung (N₂:CO₂ 80:20) anoxisch präpariert. Außerdem wurde die Feed-Lösung hochkonzentriert (600 g/L), um das Feedvolumen möglichst klein zu halten und das Risiko weiter zu minimieren. Über Spritzen konnte die Feed-Lösung zugegeben werden.

Problematisch hierbei war die verhältnismäßig schlechte Durchmischung. Diese war durch die, um den Scherstress zu minimierende, zwingend notwendige langsame Kippfrequenz und den geringen Kippwinkel bedingt [100].

Als Folge konnte sich die zugegebene Glucose nicht schnell genug im Reaktor verteilen und verweilte stattdessen in der Nähe des Zugabeports, was dort einen sehr hohen osmotischen Stress auslöste. Als Kompromiss zwischen einer schnellen Glucoseverteilung und geringem Scherstress, wurde daher direkt nach einem Feed die Kippfrequenz für ca. 60 s von 8 KpM auf 20 KpM erhöht.

Die Glucosekonzentration wurde während des Prozesses regelmäßig offline enzymatisch bestimmt. Sobald eine Glucosekonzentration von <4 g/L gemessen wurde, wurden 25 mL der Feed-Lösung (entspricht 15 g Glucose absolut bzw. ca. 1,5 g/L Konzentrationssteigerung pro Feed, bezogen auf das Kulturvolumen) zugegeben. Die Inokulation erfolgte über die neu entwickelte Schlauchbrücke.

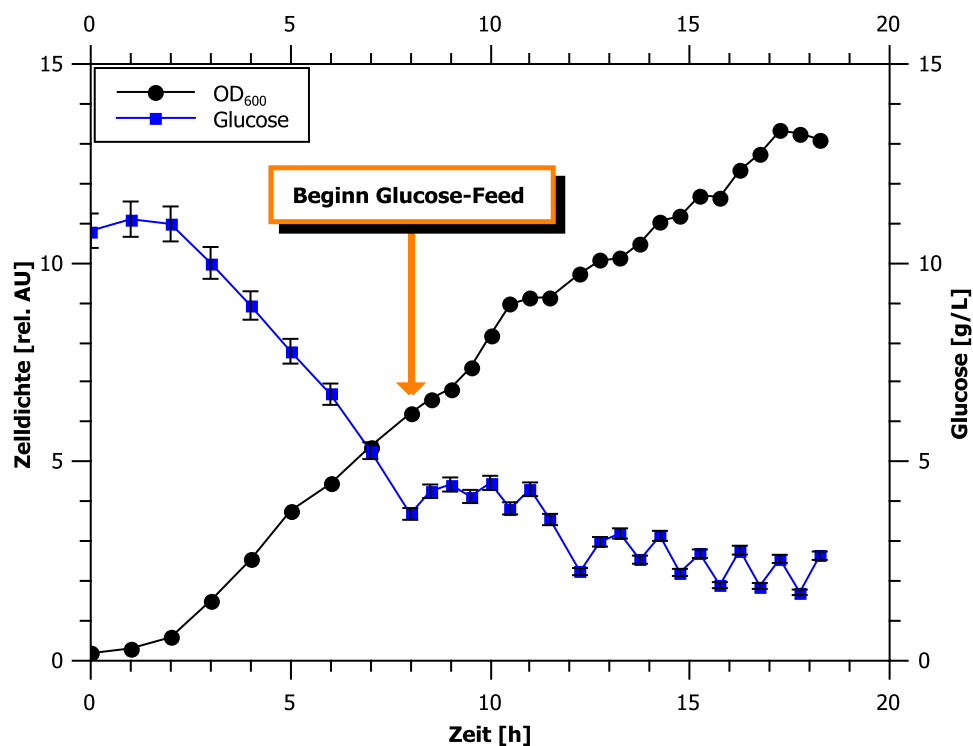


Abbildung 8: Fed-batch Kultivierung von *E. ramulus* im 10 L Beutelreaktor.

Der Verlauf einer fed-batch-Kultivierung über 18 h von *E. ramulus* ist in Abbildung 8 zu sehen. Direkt nach der Inokulation mit 800 mL Vorkultur wurde eine OD_{600} von 0,2 rel. AU und eine Glucosekonzentration von ca. 11 g/L gemessen. Nach 8,5 h fiel die Glucosekonzentration unter 4 g/L und es wurde zum ersten Mal Glucose zugegeben. Danach wurde nahezu stündlich Glucose zugegeben. Die Konzentration schwankte dabei zwischen 4 und 1,5 g/L Glucose, was einem Sägezahnmodell entsprach. Nach ca. 17 h wurde die maximale Zelldichte von 13,3 rel. AU erreicht, danach ging die Kultur in die stationäre Phase über, obwohl noch genügend Glucose im Medium vorhanden war. Möglicherweise war hier ein anderes Substrat limitierend. Betrachtet man den

Verlauf der Zelldichte nach dem ersten Feed (8,5 h), stagnierte nach nahezu jeder Zugabe das Wachstum für einen kurzen Zeitraum. Anhand der kleinen Plateaus in der Wachstumskurve jeweils nach den Feeds ist dies gut zu erkennen. Wahrscheinlich wurden diese kurzen Stagnationsphasen durch den kurzzeitig erhöhten Scherstress (Steigerung der KpM zur schnellen Glucoseverteilung) ausgelöst. Trotzdem wurde die Kultur nicht zu empfindlich gestört. Über den betrachteten Zeitraum von 18 h zeigte sich ein konstantes Wachstum mit einer Wachstumsrate von $\mu_{\max} = 0,25 \text{ h}^{-1}$. Das Ziel die Biomasse weiter zu steigern, konnte erfolgreich über die fed-batch-Strategie realisiert werden. Die erreichte Zelldichte von 13,3 rel. AU (Biotrockenmasse von ca. 4 g/L) entspricht einer ca. 1,5-fachen Steigerung verglichen zur 10 L-batch-Kultivierung.

4.1.3 Schlussfolgerungen

Es ist im Rahmen dieser Arbeit gelungen, die in vorangegangenen Arbeiten durchgeführten batch-Kultivierungen zu reproduzieren und die Handhabung zu optimieren. Hierfür wurden die anaeroben Kultivierungstechniken zur anoxischen Präparation verbessert und eine neuartige Animpftechnik zur schnelleren und schonenderen Inokulation entwickelt (siehe 6.2.1). Trotz der optimierten Anwendung und mehrerer Versuche zeigte ein Scale-up auf 25 L Kulturvolumen keine verbesserte Biomasseproduktion. Dennoch konnte über einen fed-batch-Ansatz die produzierte Biomasse im Vergleich zur batch-Kultivierung erfolgreich um ca. das 1,5-fache gesteigert werden. Hierfür konnte erfolgreich eine Zufütterungs-Technik entwickelt werden. So konnte zum einen die zugefütterte Glucose schnell und gleichmäßig im Medium verteilt werden und zum anderen der ausgeübte Scherstress begrenzt werden. Für eine Produktion von Phloretin aus Naringenin mit dem Wildtyp *E. ramulus* wären allerdings noch weitere Probleme zu lösen gewesen. Das größte Hindernis stellt hierbei der schnelle Abbau des Phloretins über die Phloretinhydrolase dar, welcher trotz erster Erfolge mit selektiven Inhibitoren in vorangegangenen Arbeiten nie vollständig unterbunden werden konnte [3, 59]. Auch ist die Handhabung aufgrund der Scherstress-Sensitivität und der notwendigen strikt anaeroben Bedingungen im Vergleich zu anderen Produktionssystemen (siehe 3.2) vergleichsweise kompliziert. Daher wurde parallel zu den hier vorgestellten, am Institut für Technische Chemie durchgeführten Experimenten, von den Projektpartnern der Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald (Institut für Biochemie, Arbeitsgruppe Prof. Bornscheuer) an einer rekombinanten Lösung geforscht.

Möglich geworden war dies durch eine Totalsequenzierung des Genoms von *E. ramulus*. Diese erfolgte im Rahmen des Biokatalyse2021-Clusters durch die zentrale Technologieplattform (Z-Projekt im Cluster) an der TU Hamburg-Harburg (Institut für Technische Mikrobiologie). Über den bekannten C-Terminus der CHI [59] konnte so

die vollständige Sequenz des Proteins im Genom von *E. ramulus* eindeutig identifiziert werden. Die Gensequenz der CHI war damit für eine Klonierung in einen Wirtsorganismus verfügbar. Ein Vergleich mit Sequenzen in bioinformatischen Datenbanken zeigte dabei keine Homologien zu bekannten pflanzlichen Chalkon-Isomerasen [101]. Die Arbeiten mit den nunmehr rekombinanten Mikroorganismen (GVO) werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

4.2 Arbeiten mit *Pichia pastoris*

Im Rahmen des Projekts wurde zunächst *Pichia pastoris* als Produktionsorganismus für die rekombinante CHI ausgewählt. *P. pastoris* bietet den großen Vorteil, dass die Zugabe der Flavonoide in den Kultivierungsprozess wesentlich erleichtert ist. Flavonoide sind schwer in Wasser löslich, aber sehr gut löslich in Methanol. Methanol dient bei *P. pastoris* als Induktor, so dass die Induktion der heterologen Expression mit der Substratzugabe in einem Schritt zusammengefasst werden kann. Weitere Vorteile von *P. pastoris* sind die einfache Kultivierbarkeit, sehr hohe erreichbare Zelldichten, eine unkomplizierte Integration heterologer Gene und die effiziente Sekretion der heterologen Proteine ins Medium. Außerdem werden natürlicherweise nur sehr wenige hefeeigene Proteine sekretiert (siehe 3.2.2). Das kann von großem Vorteil sein, da bei einer Ganzzellkatalyse das Naringenin, falls die CHI intrazellulär vorliegen sollte, erst in die Zellen diffundieren, bzw. in die Zellen transportiert werden müsste. Ebenso müsste das Produkt Phloretin hinaus diffundieren bzw. transportiert werden. Es ist nicht bekannt, ob *P. pastoris* über aktive Transportmöglichkeiten für Flavonoide verfügt. Des Weiteren wäre eine Aufreinigung von heterologer CHI erleichtert, falls diese extrazellulär vorliegen sollte. Der Zellaufschluss würde in dem Fall komplett entfallen und die Zellen könnten einfach über Zentrifugation abgetrennt werden.

Für die in den folgenden Kapiteln beschriebenen Versuche wurde von den Projektpartnern (Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald, Institut für Biochemie, Arbeitsgruppe Prof. Bornscheuer) der Stamm *P. pastoris* CHI zur Verfügung gestellt [101]. Dabei handelt es sich um den Stamm *P. pastoris* X-33 EasySelect™ (Invitrogen Corporation, USA), welcher das Plasmid pPICZ B mit dem klonierten CHI Gen aus *E. ramulus* trägt. Auf pPICZ B befindet sich ein Resistenzgen für das Glykopeptidantibiotikum Phleomycin D1 (Handelsname: Zeocin™). Phleomycin D1 wirkt gegen Hefen und Bakterien. Die Resistenz diente hier unter anderem zur Selektion von Rekombinanten. Für die Stammhaltung wurde Phleomycin D1 immer zugesetzt, im eigentlichen Kultivierungsprozess war es nicht zwingend notwendig, da die Plasmidstabilität auch ohne Selektionsdruck hinreichend gewährleistet war [102]. Der verwendete *P. pastoris* X-33 ist ein Mut⁺-Stamm, d.h. die Gene für den AOX1-

Promotor sind noch vorhanden, und es sollte kein verlangsamtes Wachstum auf Methanol zu beobachten sein (siehe 3.2.2).

In den folgenden Abschnitten wird zunächst das Wachstumsverhalten von *P. pastoris* CHI in verschiedenen Medien im Schüttelkolben betrachtet. Es folgen Untersuchungen zum Wachstumsverhalten in verschiedenen Systemen und Skalierungsstufen, die über den Schüttelkolbenmaßstab hinaus gehen. Anschließend werden Flavonoidfütterungs-Versuche ohne Induktion gezeigt. Im letzten Teil wird schließlich das Induktionsverhalten untersucht.

4.2.1 Untersuchungen zum Wachstumsverhalten

Zunächst wurde das Wachstumsverhalten von *P. pastoris* charakterisiert und ein geeignetes Medium gesucht. In der Regel wird in einem Prozess mit *P. pastoris* zunächst eine möglichst hohe Biomasse angezogen, bevor die Produktionsphase eingeleitet wird. Methanol kann nicht zur Anzucht verwendet werden, da der Metabolismus dann sofort auf Proteinproduktion umgestellt werden würde und nur noch ein sehr langsames Wachstum erfolgen würde.

Normalerweise werden Glucose oder Glycerin als Kohlenstoffquelle in der Wachstumsphase verwendet. Daher wurde zunächst das Wachstum auf zwei weitverbreiteten, komplexen Standardmedien untersucht: YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) und BMGY (Buffered Glycerol-complex Medium). YPD enthält Glucose als C-Quelle, BMGY stattdessen Glycerin. Außerdem enthält BMGY noch definierte Mengen an (Puffer-)Salzen, Vitaminen und Spurenelementen, welche nach dem Autoklavieren sterilfiltriert zugegeben werden müssen (genaue Zusammensetzungen siehe Anhang 6.4.5).

Der große Vorteil von YPD ist, dass es preislich sehr günstig und simpel handhabbar ist. Allerdings reprimiert Glucose den AOX1 Promotor sehr effizient, auch wenn Methanol ebenfalls vorliegt. Daher muss sichergestellt sein, dass zum Induktionszeitpunkt keine Glucose mehr vorhanden ist. Eine Glucoseanalytik ist daher notwendig, wenn YPD verwendet wird.

BMGY ist zwar preislich teurer und aufwändiger zu präparieren (s.o.), hat aber den Vorteil, dass es gepuffert ist und garantiert, dass alle notwendigen Mikronährstoffe in ausreichenden Mengen vorhanden sind. Außerdem ist eine laufende Überwachung der primären Kohlenstoffquelle (Glycerin) nicht zwingend notwendig. Sobald die gewünschte Zelldichte erreicht ist, kann mit der Induktion begonnen werden. Sollte noch Glycerin vorhanden sein, kann trotzdem induziert werden, da die Induktion nicht beeinflusst wird.

Zunächst wurden Schüttelkolbenexperimente durchgeführt, bei denen in beiden Medien *P. pastoris* unter den in der Literatur angegebenen idealen Wachstumsbedingungen (30 °C, 200 rpm) kultiviert wurde [102]. Alle Versuche wurden mit gleichen Volumina

aus derselben Vorkultur angeimpft, um identische Startbedingungen zu garantieren. In regelmäßigen Abständen wurden die optische Dichte und im Fall von YPD auch die Glucosekonzentration (enzymatisch) gemessen.

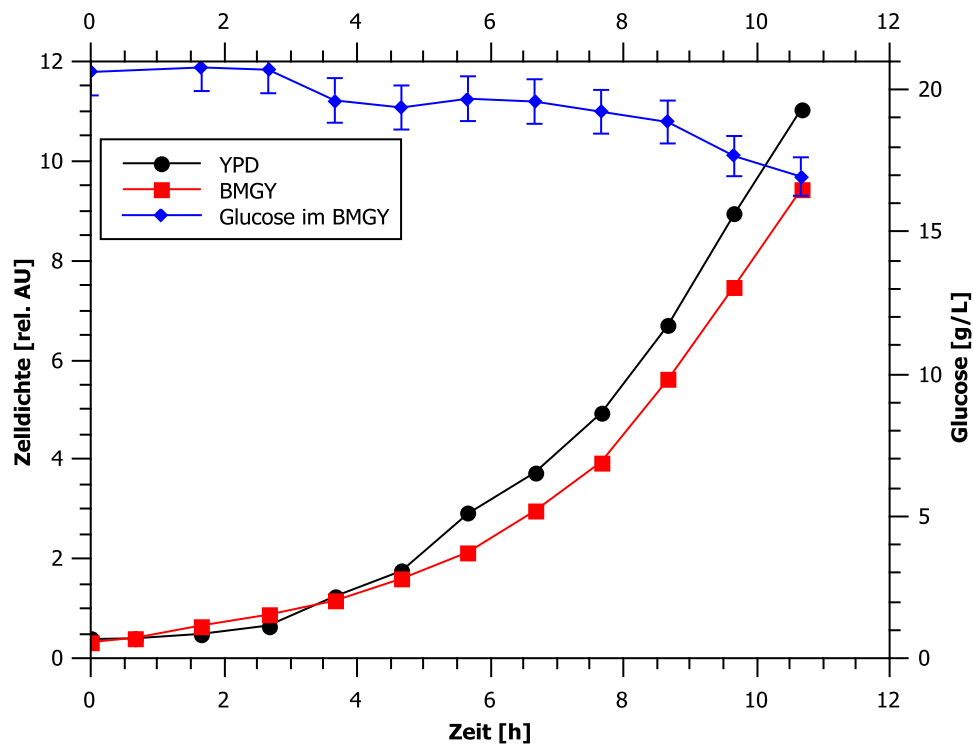


Abbildung 9: Einfluss von YPD- und BMGY-Medium bei der Schüttelkolbenkultivierung von *P. pastoris* CHI im Vergleich.

In Abbildung 9 sind die Verläufe der Zelldichten während der Kultivierungen (200 mL Medium, Kolben mit 3 Schikanen) dargestellt. Für die in YPD kultivierten Hefen ist außerdem die Glucosekonzentration gegen die Zeit gezeigt. Die OD_{600} direkt nach der Inokulation betrug in allen Kolben ca. 0,3 rel. AU. *P. pastoris* zeigte in beiden Medien über den beobachteten Zeitraum ein gutes Wachstum. Eine lag-Phase von ca. 1,5 h wurde beobachtet. Bereits nach 2,5 h wurde eine Verdopplung der OD_{600} beobachtet. In YPD erreichten die Kulturen, nachdem das Wachstum im BMGY bis dahin nahezu identisch gewesen ist, nach 5 h geringfügig höhere Zelldichten. Dieser Trend verstärkte sich bis zum Ende des beobachteten Zeitraums, so dass nach 10 h die OD_{600} in YPD etwas höher gewesen ist (YPD: ca. 11 rel. AU, BMGY: ca. 9,3 rel. AU). Möglicherweise verläuft der Glucosestoffwechsel effizienter und schneller als der Glycerinstoffwechsel. Die Glucosekonzentration (YPD-Medium) sank im beobachteten Zeitraum von knapp 20 g/L auf 16 g/L. Vergleicht man die Zelldichten in den beiden Medien am nächsten Tag (nach ca. 20 h, stationäre Phase) miteinander, ist jedoch kein Unterschied zu sehen. Alle Kultivierungen erreichten eine Zelldichte von ca. 50 rel. AU.

Weiterführende Experimente, bei denen die Konzentration der C-Quelle verdoppelt wurde, zeigten eine deutliche Zunahme der erreichbaren Zelldichten, besonders in

BMGY-Medium. So konnten Zelldichten >70 rel. AU problemlos erreicht werden. Diese Ergebnisse sind im Anhang unter 6.2.2 gezeigt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass nur kleine, vernachlässigbare Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen den untersuchten Medien beobachtet werden konnten. Aufgrund der bereits erwähnten Vorteile des BMGY-Mediums (s.o.), wurde es für die weiteren Experimente mit *P. pastoris* CHI gewählt.

4.2.2 Kultivierungen von *P. pastoris* CHI in verschiedenen Reaktorsystemen

Um das Upscaling nach den guten Ergebnissen in den Schüttelkolbenkultivierungen zu ermöglichen, sollten nun das Wachstumsverhalten und die erreichbare Biomassekonzentration in verschiedenen Reaktorsystemen betrachtet werden. Hierfür wurde zunächst ein 2 L Rührkessel (BIOSTAT A+, Sartorius AG) verwendet. Dieser bietet im Hinblick auf eine Optimierung der Prozessvariablen einen guten Kompromiss zwischen Schüttelkulturen und größeren Reaktoren. Unter Schüttelbedingungen kann schnell, einfach und günstig kultiviert werden, aber es sind keine online-Analytik und keine Regelungen (pH, pO_2 , MeOH) möglich. Das Wachstumsverhalten kann sich außerdem deutlich von dem in Reaktoren unterscheiden. Größere Reaktoren zu verwenden führt hingegen in der Regel auch zu erhöhtem zeitlichen Aufwand und höheren Kosten, weswegen es vorteilhaft ist, zunächst in einem kleineren Reaktorvolumen zu arbeiten. Nachdem der Prozess in kleineren Skalierungsstufen optimiert wurde, ist trotzdem eine spätere Aufskalierung unabdingbar. Deswegen wurden im Hinblick darauf zusätzlich zwei verschiedene, größere Reaktoren mit 10 L Kulturvolumen näher betrachtet und miteinander verglichen; das in Kapitel 4.1.1 beschriebene Beutelreaktorsystem und ein klassischer Edelstahlrührkessel (BIOSTAT C, Sartorius AG). Es wurde aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche (siehe 4.2.1) mit BMGY-Medium gearbeitet.

Im 2 L Rührkessel wurde bei 30 °C kultiviert. Der pH-Wert wurde auf pH 6 geregelt, es wurde mit 2 vvm Druckluft begast. Über eine Regelungskaskade der Rührergeschwindigkeit wurde der pO_2 -Wert bei mindestens 50% gehalten. Die temperaturempfindlichen Medienbestandteile wurden nach dem Autoklavieren steril in den Reaktor gepumpt. Es wurde mit 100 mL angeimpft. Zusätzlich wurde 0,3 mL/L Entschäumer eingesetzt.

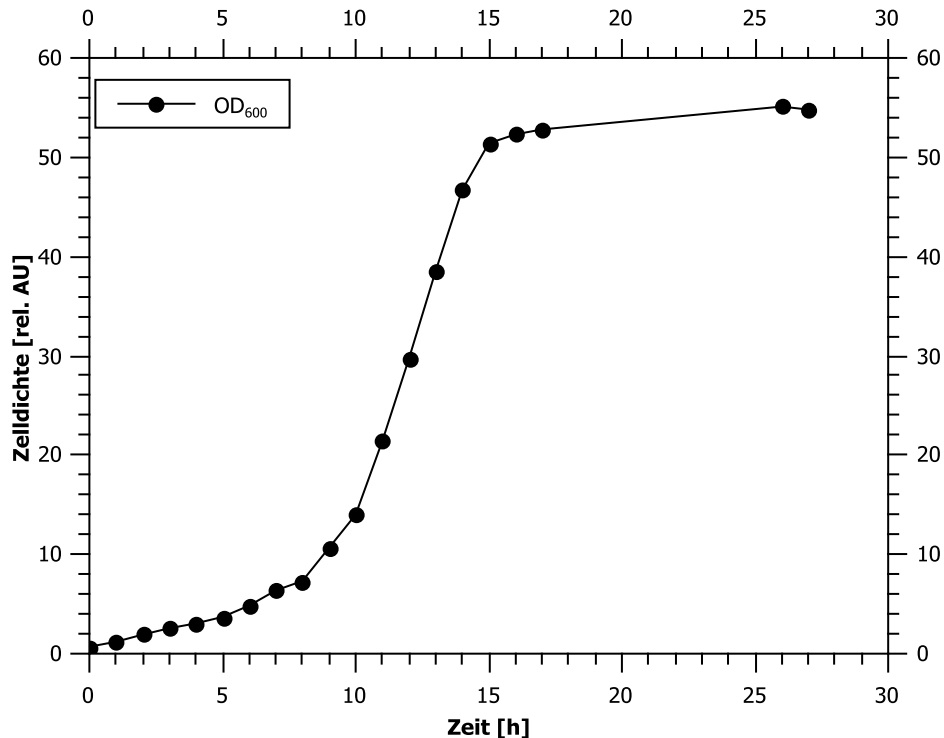


Abbildung 10: Wachstumsverlauf von *P. pastoris* CHI im 2 L-Rührkesselreaktor ($\mu_{\max} = 0,25 \text{ h}^{-1}$).

Der Verlauf der Kultivierung ist in Abbildung 10 zu sehen. Direkt nach der Inokulation wurde eine Zelldichte von 0,7 rel. AU gemessen. Bereits nach 1 h wurde eine Zelldichte von 1,2 rel. AU gemessen. Eine lag-Phase wie in den Schüttelkulturen konnte nicht beobachtet werden. Über den gesamten Zeitraum zeigte die Kultur ein kräftiges, stetiges Wachstum ($\mu_{\max} = 0,25 \text{ h}^{-1}$). Nach 14 h verlangsamte sich das Wachstum. Nach 16 h trat die Kultur bei einer Zelldichte von 52,3 rel. AU in die stationäre Phase ein. Die höchste Zelldichte von 55,1 rel. AU wurde jedoch nach 26 h gemessen, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die Kultur in dem nicht beobachteten Zeitraum zwischen 17 und 26 h noch leicht gewachsen ist. Möglicherweise war, bevor eine Substratlimitierung die Kultur in die stationäre Phase wechseln ließ, eine Sauerstofflimitierung eingetreten. Dafür spricht, dass bereits nach 14 h die maximal mögliche Rührerdrehzahl erreicht wurde und der $p\text{O}_2$ -Wert nicht mehr auf 50% geregelt werden konnte. Eine Biotrockenmasse von 13,6 g/L wurde nach 16 h erreicht. Insgesamt konnte ein sehr gutes Wachstum von *P. pastoris* im 2 L-Maßstab beobachtet werden, so dass der Reaktor für weitere Experimente einen guten Mittelweg zwischen größeren Reaktoren und dem Schüttelmaßstab darstellt.

Für die Kultivierungen im 10 L-Maßstab (Edelstahlrührkessel und Beutelreaktor) wurde mit identischen Prozessbedingungen wie im 2 L-Maßstab gearbeitet. Allerdings betrug die Begasungsrate aus technischen Gründen statt 2 vvm nur 1 vvm im 10 L-Edelstahlrührkessel und nur 0,1 vvm im Beutelreaktor. Die Inokulation erfolgte mit 200 mL. Der $p\text{O}_2$ -Wert wurde bei einer konstanten Begasung über die

Rührergeschwindigkeit, bzw. die Kippfrequenz auf 50% geregelt. Während der Vorbereitung zeigten sich deutlich einige Vorteile des Beutelreaktorsystems. So musste bspw. kein Entschäumer zugesetzt werden, da der Beutelreaktor unter diesem Gesichtspunkt unproblematisch ist. Da für das verwendete BMGY-Medium diverse temperatursensible Bestandteile sterilfiltriert zugegeben und der Phosphatpuffer separat autoklaviert und zugegeben werden muss, ist der Präparationsaufwand im 10 L-Edelstahlrührkessel aufgrund der großen Volumina sehr zeitaufwändig (siehe Beschreibung 6.4.5). In den Beutelreaktor wird das Medium generell über einen Sterilfilter zugegeben. So konnten hier alle Medienbestandteile zugleich in den Reaktor gepumpt werden. Der Beutelreaktor war so im Vergleich zum Edelstahlrührkessel in einem Siebtel der Zeit vorbereitet. Die Nachteile des Beutelreaktorsystems zeigten sich jedoch während der Kultivierungen (siehe Abbildung 11).

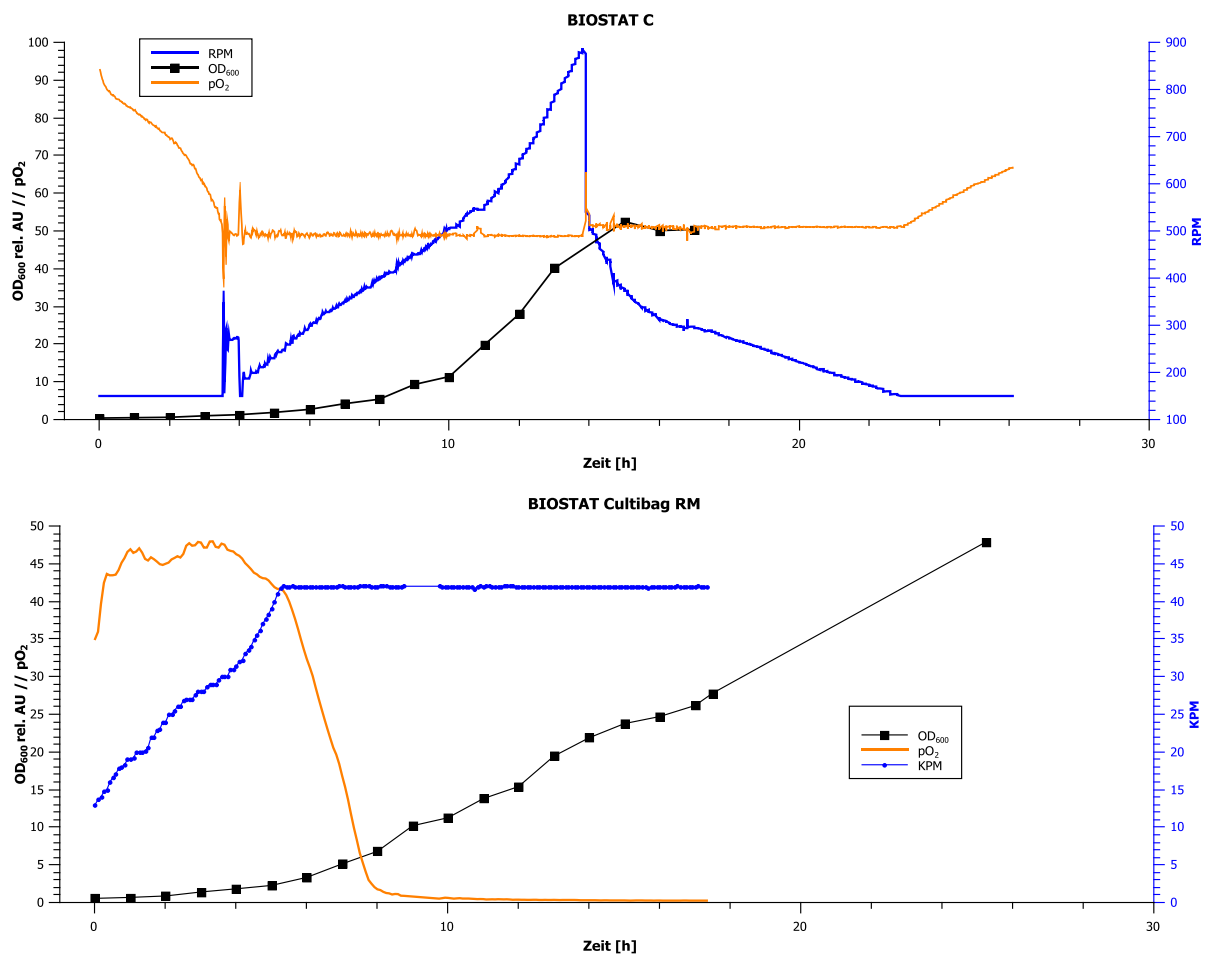


Abbildung 11: *P. pastoris* Kultivierungen im 10 L-Maßstab. Blau: RPM/KPM, Schwarz: Zellichte, Orange: pO_2 -Wert. Oben: STR ($\mu_{\max} = 0,35 \text{ h}^{-1}$), Unten: Beutelreaktor ($\mu_{\max} = 0,22 \text{ h}^{-1}$).

Im Vergleich zum Rührkesselreaktor, in dem die Kultur exponentiell wuchs, zeigte sich im Beutelreaktor ein eher lineares Wachstum. Die max. Wachstumsrate im Rührkessel war mit $\mu_{\max} = 0,35 \text{ h}^{-1}$ (Beutel: $\mu_{\max} = 0,22 \text{ h}^{-1}$) auch deutlich größer. Betrachtet man die Verläufe für den Sauerstoffpartialdruck und die Rührer- bzw. Kippfrequenz, ist deutlich zu sehen, dass im Beutelreaktor eine Sauerstofflimitierung vorlag. Nach 6 h wurde durch die Regelung bereits die maximal mögliche Kippfrequenz (42 KpM) des

Beutelreaktors erreicht. Trotzdem sank der Sauerstoffpartialdruck im Medium stetig, bis nach 8 h ein pO_2 von <2% gemessen wurde. Über die komplette weitere Kultivierung konnte kein höherer pO_2 -Wert mehr erreicht werden. Im Rührkessel hingegen konnte über die geregelte Rührergeschwindigkeit der pO_2 -Wert über die komplette Kultivierungsdauer bei ca. 50% gehalten werden, so dass keine Sauerstofflimitierung vorlag. Vergleicht man die Zelldichten in den beiden Reaktoren miteinander, so ist der Verlauf in den ersten 10 h nahezu identisch. Danach wächst die Kultur im Rührkessel exponentiell weiter, während die Kultur im Beutelreaktor aufgrund der Sauerstofflimitierung linear weiterwächst. Nach 14 h wird im Rührkessel bei einer OD_{600} von 52,5 rel. AU (BTM 20,2 g/L) die stationäre Phase erreicht. Im Beutelreaktor ist zu diesem Zeitpunkt erst eine OD_{600} von 21,9 rel. AU gemessen worden. Nach 25,5 h konnte im Beutelreaktor schließlich bei einer OD_{600} von 47,9 rel. AU (BTM 16,5 g/L) die stationäre Wachstumsphase erreicht werden. Trotz der unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten wurde annähernd die gleiche Biomasse gebildet. Für einen hypothetischen Bioprozess, in dem die Wachstumsgeschwindigkeit keine Rolle spielt, wäre das Beutelreaktorsystem eine gute Alternative. Generell sind die erreichbaren Sauerstofftransferraten im Beutelreaktor für *P. pastoris* aber zu gering, bzw. der Sauerstoffbedarf der Hefe zu groß, um eine ausreichende Versorgung zu garantieren. Ohne Modifikationen des Beutelreaktors, wie z. B. der Einbau eines leistungsfähigeren Massendurchflussreglers, sollte deshalb bei weiteren Kultivierungen im 10 L-Maßstab ein Rührkesselreaktor verwendet werden.

4.2.3 Flavonoid-Fütterungsversuche

Im Hinblick auf einen späteren Produktionsprozess sollte untersucht werden, ob der verwendete Stamm *P. pastoris* CHI die an der Biotransformation beteiligten Flavonoide natürlicherweise abbaut, bzw. ob ohne Induktion eine Transformation beobachtet werden kann. Sollte ein Abbau des Phloretins oder ein Naringeninabbau ohne Phloretinbildung beobachtet werden, käme der Stamm nicht mehr für den geplanten Prozess in Frage. In der Literatur finden sich keine Informationen zu einem möglichen Abbau von Naringenin oder Phloretin durch *Pichia*-Hefen.

Die Hefe wurde in mehreren Schüttelkolben (100 mL Kulturvolumen, BMGY-Medium, 30 °C, 200 rpm) kultiviert. Kultivierungen mit Naringenin (0,06 g/L), mit Phloretin (0,06 g/L) (jeweils in Dimethylsulfoxid, DMSO gelöst) und zur Kontrolle ohne Zusatz wurden parallel durchgeführt. Als Nebeneffekt konnte so auch ein etwaiger Einfluss der eingesetzten Flavonoide auf das Wachstum der Hefe untersucht werden. Stündlich wurden während der exponentiellen Wachstumsphase Proben entnommen und offline photometrisch die Zelldichte und in der HPLC die Flavonoidkonzentrationen gemessen. Außerdem wurde zusätzlich je eine Probe aus der stationären Phase vermessen.

Bezogen auf das Wachstumsverhalten konnte kein Einfluss der Flavonoide beobachtet werden. Alle Kultivierungen zeigten ein sehr ähnliches Wachstum. Möglicherweise waren die eingesetzten Konzentrationen (0,06 g/L) aber auch zu gering, um einen signifikanten Trend aufzuzeigen. Die Wachstumskurven sind im Anhang unter 6.2.2 zu finden.

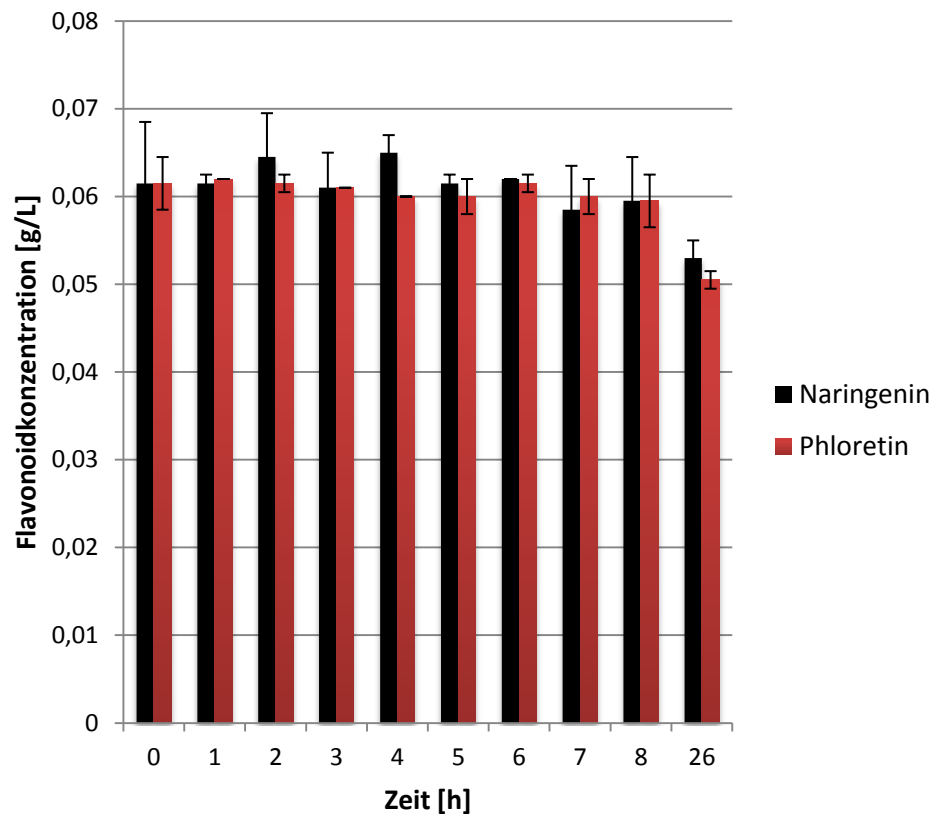


Abbildung 12: Verlauf der Flavonoidkonzentrationen in *P. pastoris* CHI Schüttelkultivierungen.

Betrachtet man die Flavonoidkonzentrationen über die Zeit (siehe Abbildung 12) ist gut zu sehen, dass in keinem Fall ein Abbau über die ersten 8 h (exponentielle Phase) zu sehen war. Erst nach 26 h, als sich die Kultur bereits in der stationären Phase befand, konnte ein leichter Rückgang der Naringenin- und Phloretinkonzentration gemessen werden. Es ist aber zu vermuten, dass es sich hierbei um eine chemische Degradation handelt. Zum einen sollte bei einer biologischen Verwertung durch die Hefe ein deutlich stärkerer Abbau zu sehen sein, zum anderen könnten die Flavonoide in Lösung nicht dauerhaft chemisch stabil sein. Prinzipiell ist *P. pastoris* CHI unter dem untersuchten Gesichtspunkt für die geplante Biotransformation als unproblematisch zu bewerten, da weder Produkte noch Substrate verstoffwechselt werden.

4.2.4 Induktionsverhalten und Aktivität

Für die Untersuchungen zum Induktionsverhalten wurde ebenfalls das BMGY-Medium gewählt. Um eine effiziente Induktion und ein rasches Umstellen auf den

Methanolstoffwechsel zu gewährleisten, wurden die Hefen nach einer kurzen Wachstumsphase bei 1 rel. AU in das sogenannte BMMY-Medium überführt. Dieses ist dem BMGY sehr ähnlich, nur die Kohlenstoffquelle (Glycerin) ist durch Methanol substituiert.

Die Experimente wurden im Schüttelkolbenmaßstab (200 mL Kulturvolumen, BMMY-Medium, 250 rpm) durchgeführt. Die Temperatur wurde, entgegen den Untersuchungen zum Wachstum nicht mehr auf die ideale Wachstumstemperatur von 30 °C, sondern auf 28 °C eingestellt. Bei höheren Temperaturen als 30 °C werden Proteine durch *P. pastoris* nur noch sehr eingeschränkt exprimiert [85, 103]. Über einen Zeitraum von 100 h wurden regelmäßig Proben entnommen. Der Verlauf der Zelldichte wurde photometrisch, die Proteinexpression über SDS-PAGE und die Enzymaktivität über einen Aktivitätstest offline untersucht. Bei jeder Probenahme wurden 500 µL Methanol nachgefüttert (1 mL Methanol/Tag), um die heterologe Expression sicher aufrecht zu erhalten.

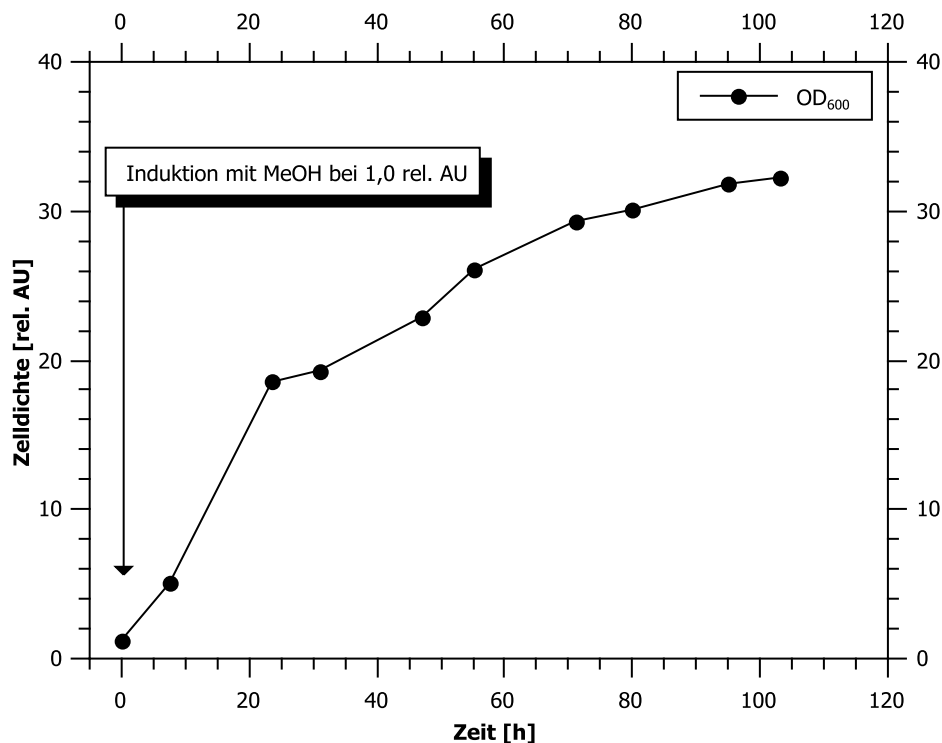


Abbildung 13: Verlauf der Zelldichte einer *P. pastoris* CHI Kultivierung nach der Induktion mit Methanol.

Aus Abbildung 13 geht hervor, dass die Kultur trotz der Induktion mit Methanol kräftig weitergewachsen war und am Ende eine OD_{600} von $\Delta 32$ rel. AU erreicht wurde. Da es sich bei dem kultivierten Stamm um einen Mut^+ -Phänotyp (siehe 3.2.2) handelt, war dies zu erwarten. Das Zelllysate der aufgeschlossenen Proben (der Überstand nach dem Zellaufschluss und nach Zentrifugation) wurde in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die einzelnen Untereinheiten der CHI haben ein Molekulargewicht von ca. 30 kDa (siehe 3.1.3), daher war bei dieser Größe eine große Bande zu erwarten. Das silbergefärbte Gel ist in Abbildung 14 gezeigt.

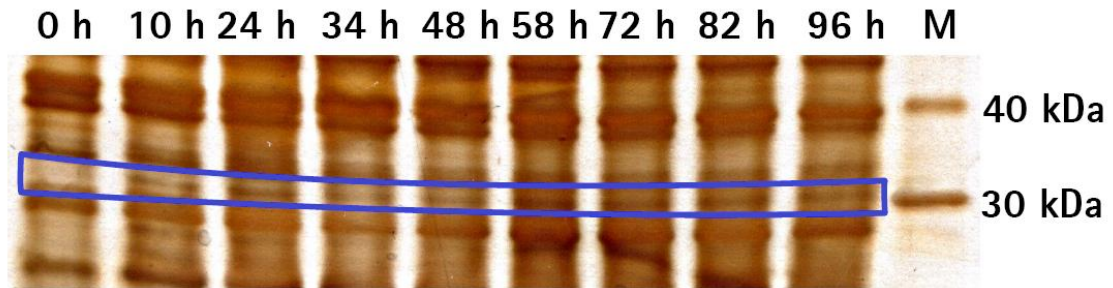


Abbildung 14: SDS-PAGE des Experiments mit *P. pastoris* CHI, silbergefärbt.

Zum Start der Induktion (0 h) war noch keine Bande bei 30 kDa zu sehen. Im weiteren Verlauf der Kultivierung tauchte dann eine scharfe, aber relativ schwache Bande bei 30 kDa auf. Jedoch nahm die Stärke zu späteren Zeitpunkten nicht zu, sie war zu jedem Zeitpunkt ungefähr gleich intensiv. Möglicherweise handelte es sich hier um die CHI. Eine starke Überexpression war jedoch nicht zu sehen.

Zusätzlich wurde ein Enzymaktivitätstest durchgeführt. Dieser wurde in einer früheren Arbeit mit Zellysate von *E. ramulus* entwickelt [3]. Dazu wird Zellysate zusammen mit Naringenin und NADH bei 37 °C inkubiert und nach 0 min, 5 min und 40 min eine Probe entnommen. Die Enzymreaktion wird direkt nach einer Probenahme durch die Zugabe von eiskaltem Methanol abgestoppt und die Flavonoidkonzentration anschließend in der HPLC gemessen. Eine rasche Abnahme von Naringenin und die Bildung von Phloretin bzw. den Abbauprodukten (HPP, Phloroglucinol) dient als Aktivitätsnachweis (siehe Methodenbeschreibung im Anhang unter 6.3.4). Zellysate von *E. ramulus* zeigt zuverlässig eine Aktivität und wurde hier daher vergleichend als Positivkontrolle verwendet.

Alle mit *P. pastoris* CHI durchgeführten Tests zeigten keine Aktivität. In keinem Fall konnte ein signifikanter Abbau des Naringenins beobachtet werden. Parallel dazu durchgeführte Nachweise mit Zellysate von *E. ramulus* zeigten durchweg eine gute Aktivität. Die Ergebnisse sind im Anhang unter 6.2.2 zu finden.

4.2.5 Schlussfolgerungen

In umfangreichen Vorversuchen konnte mit BMGY ein geeignetes Medium gefunden und das Wachstumsverhalten in verschiedenen Systemen und Volumina betrachtet und verglichen werden. Dabei erwiesen sich klassische Rührkesselreaktoren als beste Lösung; der innovative Einsatz eines Beutelreaktorsystems konnte aufgrund der aufgetretenen Sauerstofflimitierung nicht überzeugen.

Auch konnte gezeigt werden, dass *P. pastoris* die an der gewünschten Biotransformation beteiligten Flavonoide nicht natürlicherweise verstoffwechselt. Weder für Naringenin noch für Phloretin konnte ein signifikanter Abbau beobachtet werden. Generell zeigte *P. pastoris* neben den eingangs beschriebenen Vorteilen (Methanol dient gleichzeitig als Lösemittel und Induktor, Sekretion der gebildeten Proteine, sehr hohe Zelldichten) auch

in der Praxis prinzipiell gute Voraussetzungen für den gewünschten Biotransformationsprozess. Das Induktionsverhalten, bzw. die heterologe Expression der CHI, war aber mangelhaft zu bewerten. So ist nur eine sehr schwache Bande bei 30 kDa, dem erwarteten Bereich für die Untereinheiten der CHI, gefunden worden. Gleichzeitig wurde ein starkes Wachstum der Kultur beobachtet. Anscheinend wurde das zugesetzte Methanol größtenteils zum Wachstum und nicht zur Proteinproduktion verwendet. Um von einer guten Überexpression sprechen zu können, müsste deutlich mehr heterologes Protein in der SDS-PAGE nachweisbar sein. Hier wären weitere Optimierungsarbeiten auf genetischer Ebene notwendig. Möglicherweise könnte eine mehrfache Integration des Gens für die CHI, also multiple Kopien, die (Über-)Expression verbessern. Alternativ wäre ein codonoptimiertes Gen ein weiterer Ansatz. Da die CHI ursprünglich aus einem Bakterium stammt, kann die Codon Usage in *Pichia* sich gravierend unterscheiden.

Aufgrund der Ergebnisse der hier gezeigten Arbeiten (mangelhafte Expression der CHI) mit *P. pastoris* CHI wurde von den Projektpartnern an der Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald die Sequenz der CHI in einen *E. coli* Stamm kloniert [101]. Damit stand ein neuer, möglicher Produktionsstamm zur Verfügung. Im Rahmen des Projekts wurde von den Partnern gemeinsam entschieden, zunächst diesen neuen *E. coli* Stamm näher zu untersuchen, bevor genetische Optimierungen mit *P. pastoris* erfolgen sollten. In den nächsten Kapiteln werden die Arbeiten mit diesem *E. coli* Stamm vorgestellt. Weitere Arbeiten und Optimierungen mit *P. pastoris* CHI wurden daher nicht verfolgt.

4.3 Prozessentwicklung mit *E. coli* Rosetta

Für die geplante Biotransformation wurde die Sequenz der CHI (neben *P. pastoris*) auch in *E. coli* Rosetta (DE3) kloniert. Diese molekularbiologischen Arbeiten wurden von der Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald im Rahmen des Projekts durchgeführt [101]. Bei *E. coli* Rosetta (DE3) des Anbieters Novagen handelt es sich um ein *E. coli* BL21 Derivat. *E. coli* Rosetta trägt einen erweiterten tRNA-Satz auf einem Plasmid (pRARE) mit Chloramphenicol-Resistenz. Die tRNA-Konzentration im Cytoplasma ist dadurch, im Vergleich zum BL21, verändert. Es sind mehr Codons, insbesondere solche die in *E. coli* natürlicherweise nicht vorhanden sind, verfügbar. So wird eine universelle Translation heterologer Proteine möglich, die nicht so stark abhängig von der Codon Usage in *E. coli* ist.

Als Vektor wurde ein pET28b-Plasmid mit Kanamycin-Resistenz und T7-Promotor verwendet. Der transformierte Stamm *E. coli* Rosetta pET28b_CHI besitzt entsprechend Chloramphenicol- und Kanamycin-Resistenz und eine IPTG-Zugabe (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) induziert die Überexpression.

In den folgenden Experimenten sollte das Potenzial von *E. coli* Rosetta pET28b_CHI als Produktionsstamm im Hinblick auf den erwünschten Biotransformationsprozess evaluiert werden. Hierfür wurden zunächst das Expressionsverhalten und die Enzymaktivität im Schüttelkolben untersucht. Über eine zweidimensionale Gelelektrophorese sollte anschließend der isoelektrische Punkt der CHI abgeschätzt werden.

Da im Gegensatz zu Hefen die Plasmide in Prokaryoten i.d.R. nicht in das Genom integriert werden, erfolgten alle folgenden Kultivierungen unter Zugabe von Antibiotika (Kanamycin und Chloramphenicol). So konnte die Gefahr von Plasmidverlusten minimiert werden.

4.3.1 Expressionsverhalten und CHI-Aktivität im Schüttelkolben von *E. coli* Rosetta pET28b_CHI

Die Expression erfolgte in Schüttelkolben mit 100 mL LB-Medium (engl. „lysogeny broth“) bei 200 rpm. Zunächst wurden die Zellen bei 37 °C bis zu einer Zelldichte von 1,5 rel. AU angezogen, bevor die Induktion mit IPTG (1 mM Endkonzentration im Medium) folgte. Vor der Induktion wurden die Kolben kurz mit Eiswasser (4 °C) gekühlt und nach der Induktion bei 25 °C weiterkultiviert. Über die niedrigere Temperatur wurde das Wachstum verlangsamt und die Proteinproduktion gesteigert. Außerdem kann dadurch oft die richtige Faltung der Proteine unterstützt werden. Die optische Dichte wurde offline photometrisch gemessen. Die entnommenen Proben wurden zentrifugiert, das Pellet in Kaliumphosphatpuffer resuspendiert und über eine Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Anschließend erfolgten eine SDS-PAGE und der bereits in Abschnitt 4.2.4 beschriebene Aktivitätstest. Als Positivkontrolle wurde Zelllysate von *E. ramulus* auf Enzymaktivität getestet.

Trotz der gewählten, niedrigeren Temperatur und der IPTG-Zugabe zeigte die Kultur ein starkes Wachstum bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 3 rel. AU (Daten nicht gezeigt). Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse der SDS-PAGE.

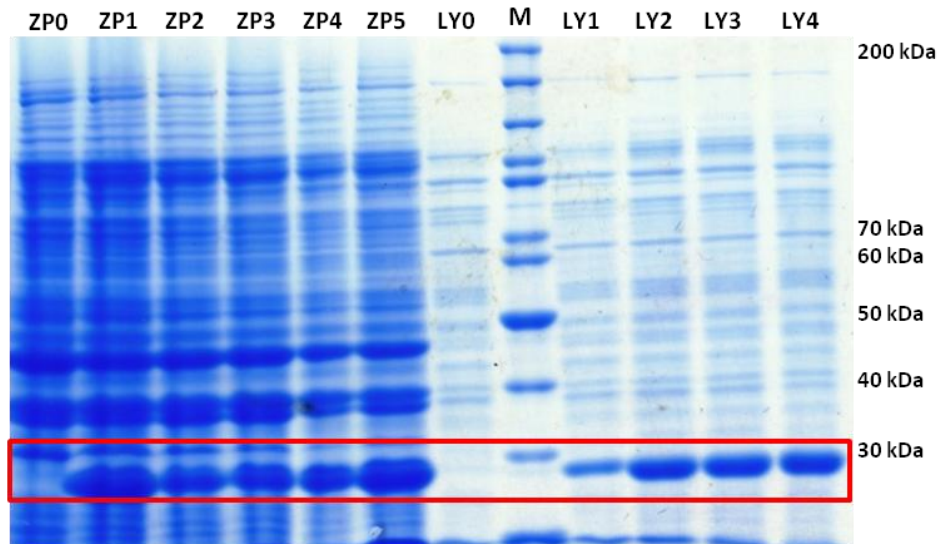


Abbildung 15: SDS-PAGE der Proteinexpression von *E. coli* Rosetta pET28b_CHI, (gefärbt mit kolloidalem Coomassie (ZP = Zellpellet mit Zelltrümmern, LY = Zelllysat, M = Marker). Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (ZP0 = 0 h, ZP1 = 1 h, LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.).

Es ist deutlich eine starke Überexpression bei 30 kDa zu sehen, die im zeitlichen Verlauf zunimmt. Hier handelte es sich um die CHI, da die entsprechende Bande im erwarteten Bereich liegt und vor der Induktion noch nicht zu sehen ist. Die Bande ist sowohl im Zellpellet (ZP) als auch im Zelllysat (LY) gut zu sehen, daher ist davon auszugehen, dass sowohl unlösliches als auch lösliches Protein gebildet wurde.

Prinzipiell sollte genug aktive CHI produziert worden sein. Trotzdem waren alle mit *E. coli* Rosetta pET28b_CHI Zelllysate durchgeführten Enzymaktivitätstests negativ. Die Kontrollen mit Zelllysat von *E. ramulus* waren hingegen stets positiv. Die Ergebnisse der Aktivitätstests sind im Anhang unter 6.2.3 zu finden.

4.3.2 Bestimmung des isoelektrischen Punkt der Chalkon-Isomerase

Im Hinblick auf eine Biotransformation mittels aufgereinigter CHI wäre es hilfreich, den isoelektrischen Punkt (pI) zu kennen, um eine Aufreinigung zu erleichtern. Eine Methode, die schnell und einfach eine Einschätzung ermöglicht, ist die zweidimensionale Gelelektrophorese. Als erste Dimension werden die Proteine in einem Gelstreifen mit einem pH-Gradienten (hier pH 3 – 10) unter elektrischer Spannung aufgetrennt. Dabei wandern die Proteine im Gel aufgrund ihrer Eigenladung bis zu ihrem pI, dem Punkt an dem die Nettoladungen ausgeglichen sind. Dieses Verfahren wird als isoelektrische Fokussierung (IEF) bezeichnet. Anschließend werden die Proteine in der zweiten Dimension mittels einer SDS-PAGE nach ihrer Größe getrennt. In einer früheren Arbeit wurde bereits versucht über diese Methode den pI der CHI zu bestimmen, jedoch war die exprimierte Menge im Wildtyp *E. ramulus* zu gering, um die CHI-Bande im Gel eindeutig identifizieren zu können [3]. Mit dem rekombinanten *E. coli* Stamm, der eine deutliche Überexpression zeigte (siehe 4.3.1),

sollte dieses Problem nicht auftreten. Um die CHI sicher identifizieren zu können, wurden hier 2D-Gele vor und nach Induktion angefertigt. Die Prozessvariablen wurden dabei genau wie im vorherigen Experiment (unter 4.3.1) gewählt. Die Gele wurden silbergefärbt, die genauen Methodenbeschreibungen sind im Anhang unter 6.3.7 zu finden.

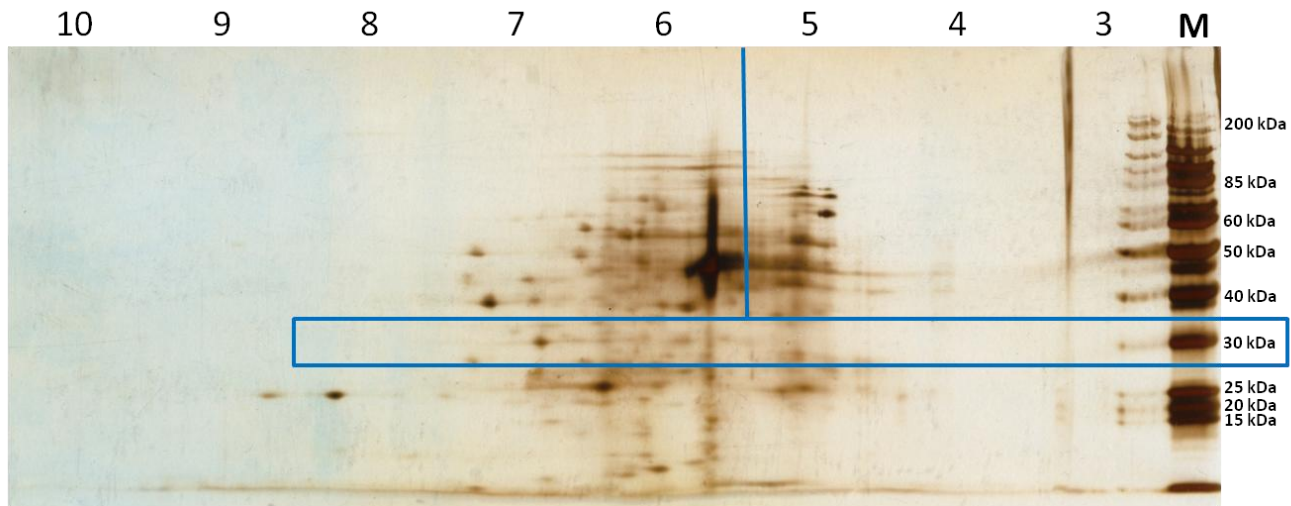


Abbildung 16: 2D-Gel von *E. coli* Rosetta pET28b_CHI vor der Induktion mit IPTG. M = Marker, über dem Gel ist der jeweilige pH-Bereich der ersten Dimension angegeben.

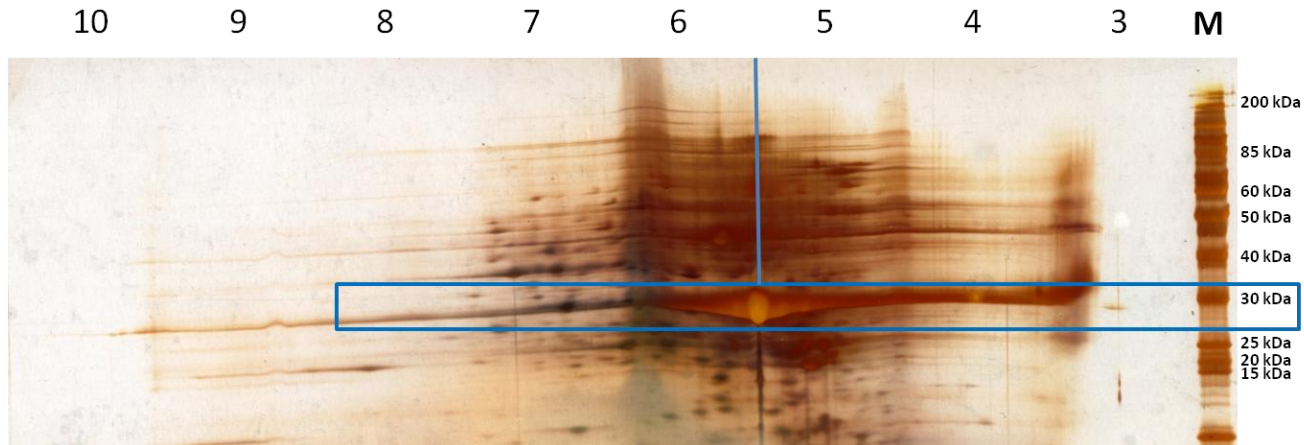


Abbildung 17: 2D-Gel von *E. coli* Rosetta pET28b_CHI nach der Induktion (5 h) mit IPTG. M = Marker, über dem Gel ist der jeweilige pH-Bereich der ersten Dimension angegeben.

In Abbildung 16 ist das 2D-Gel vor der Induktion mit IPTG und in Abbildung 17 5 h nach der Induktion zu sehen. Generell lagen die meisten Spots im pH-Bereich zwischen pH 7 und pH 5. Im Gel vor der Induktion war bei einer Größe von ca. 45 kDa und einem pI von etwa 5,7 ein markanter Proteinspot zu sehen. Auch im Gel nach der Induktion war dieser, trotz der hohen Hintergrundfärbung, gut zu erkennen. Da der Spot als Referenz herangezogen werden konnte, konnten die pI-Werte in beiden Gelen gut miteinander verglichen werden.

Im Gel nach der Induktion konnte ein großer, markanter Proteinspot bei 30 kDa (blauer Kasten) gefunden werden. Hier handelte es sich um die CHI, da die Größe der erwarteten Größe der CHI-Monomere entspricht und der Spot vor der Induktion nicht zu sehen war. Der pI-Wert der CHI liegt damit bei ca. pH 5,4 im leicht sauren Bereich. Eine mögliche Aufreinigungsstrategie, bei der mit neutralen bis schwach basischen Puffern und einer Anionenaustausch-Chromatographie gearbeitet würde, bietet sich aufgrund der Ergebnisse an.

4.3.3 Weiterentwicklung des Produktionsstamms

Bisher ist es gelungen, die CHI heterolog gut und deutlich zu exprimieren. Dabei erwies sich *E. coli* Rosetta im Vergleich zu *P. pastoris* eindeutig als besserer Wirt, da eine gute Überexpression zu sehen war. Trotzdem waren bisher alle Aktivitätsnachweise mit heterologem Zellysate negativ. Kein Abbau von Naringenin und keine Bildung von Phloretin oder Abbauprodukten konnte beobachtet werden. Gleichzeitig zeigten alle parallel mitgetesteten Proben mit Zellysate von *E. ramulus* eine positive Reaktion. Bereits in vergangenen Arbeiten wurde postuliert, dass der bisher bekannte Reaktionsweg (siehe 3.1.3, Abbildung 4) nicht vollständig bekannt ist [3, 59]. So ist unbekannt, ob die CHI die Reaktion bis zum Phloretin alleine katalysiert oder ob eine hypothetische Chalkon-Reduktase beteiligt ist.

Unter anderem F. Rodich et. al konnten zeigen, dass die anaeroben Bakterien *Clostridium tyrobutyricum* und *Clostridium thermoaceticum* sogenannte Enoatreduktasen bilden [75]. Enoatreduktasen katalysieren NADH-abhängig die Reduktion von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen. NADH fungiert dabei als Elektronendonator und wird zu NAD⁺ oxidiert. Dabei sind Enoatreduktasen immer chemo- und oft auch stereoselektiv. Sie reduzieren nur Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen in α - oder β -Position zu einer Carbonylgruppe. Andere Alkene oder die Carbonylgruppe werden nicht verändert.

Enoatreduktasen sind verhältnismäßig große Enzyme. So hat eine Enoatreduktase aus *C. tyrobutyricum* ein Molekulargewicht von 940 kDa. In der Regel sind sie aus Untereinheiten von Eisen-Schwefel-Clustern (Fe₄S₄) mit je einem Molekül FMN (Flavinmononukleotid) und FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid) als Cofaktoren aufgebaut. Diese Untereinheiten sind etwa 73 kDa schwer. Sequenzhomologien zeigen sich zu anderen Oxidoreduktasen. Jedoch sind mit Ausnahme des sogenannten „old yellow enzyme“ aus *S. cerevisiae* keine Ähnlichkeiten zu vergleichbaren Reduktasen in Eukaryoten zu finden. „Old yellow enzyme“, eine NAD(P)H-Dehydrogenase, enthält aber keine Fe₄S₄-Cluster [75].

Zu prokaryotischen Proteinen konnten bspw. Ähnlichkeiten zur 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase aus *E. coli* gefunden werden. So konnte ein gemeinsames, konserviertes Sequenzmotiv (C-(2X)-C-(2-3X)-C-(11-12X)-C) mit vier Cysteinen gefunden werden,

welches ebenfalls in anderen Pyridinnukleotid-abhängigen Flavoproteinen vorkommt [75, 104, 105].

Im Rahmen des Projektclusters wurde durch die zentrale Technologieplattform (Z-Projekt, TU Hamburg-Harburg) das Genom von *E. ramulus* vollständig sequenziert (siehe 4.1.3). Die Projektpartner der Ernst Moritz Arndt Universität konnten mit Hilfe des konservierten Sequenzmotivs (s.o.) aus der Literaturrecherche und einem weiterem Motiv (NXXDXGG) aus der Datenbank BRENDA (BRAunschweig ENzyme DAtabase) im Genom von *E. ramulus* eine Sequenz mit großer Homologie zu anderen Enoatreduktasen finden. Diese Sequenz wurde nun zusätzlich zu der CHI in den vorhandenen *E. coli* Rosetta pET28b_CHI kloniert. Als Vektor wurde das Plasmid pET-52b verwendet.

pET-52b trägt eine Ampicillin-Resistenz als Selektionsmarker. Der entstandene Stamm, *E. coli* Rosetta pET28b_CHI pET-52b_ERED, musste entsprechend mit insgesamt drei Antibiotika (Chloramphenicol, Kanamycin, Ampicillin) kultiviert werden, um die Plasmidstabilität der nun drei Plasmide (pET28b_CHI, pET-52b_ERED, pRARE) sicher zu stellen.

Da auf pET-52b ebenfalls ein T7-Promotor vorhanden ist, sollten beide Enzyme, die Enoatreduktase (ERED) und die CHI, gemeinsam über eine einmalige IPTG-Zugabe induziert werden können. Das erwartete Molekulargewicht eines Monomers der ERED liegt wie bei vergleichbaren Enoatreduktasen aus *Clostridien* bei 73 kDa.

Die in den folgenden Kapiteln beschriebenen Kultivierungen und die Stammhaltung von *E. coli* Rosetta pET28b_CHI pET-52b_ERED (im Folgenden als *E. coli* CHI_ERED bezeichnet) erfolgten stets mit den drei Antibiotika.

4.3.4 Expressionsverhalten und Aktivität im Schüttelkolben von *E. coli* Rosetta pET28b_CHI pET-52b_ERED

Zunächst wurde das Expressionsverhalten im Schüttelkolbenmaßstab betrachtet. Hierzu wurden 500 mL Schikanekolben mit 100 mL LB Medium zunächst bei 37 °C und 150 rpm bis 1,3 rel. AU kultiviert. Danach wurden die Kolben kurz mit Eiswasser (4 °C) gekühlt und mit 1 mM IPTG (Endkonzentration im Medium) induziert. Die Expression erfolgte bei 25 °C, um das Wachstum zu verlangsamen und eine korrekte Faltung zu ermöglichen. Stündlich wurden Proben entnommen und die Zelldichte offline gemessen. Nach dem Zellaufschluss mittels Ultraschallsonde wurden eine SDS-PAGE und ein Enzymaktivitätstest durchgeführt. Auf das SDS-Gel wurden sowohl die Proteine, die nach dem Aufschluss im Überstand waren (Zellysat), als auch die abzentrifugierten Zelltrümmer (Zellpellet) aufgetragen. Lösliches Protein sollte sich im Zellysat wiederfinden.

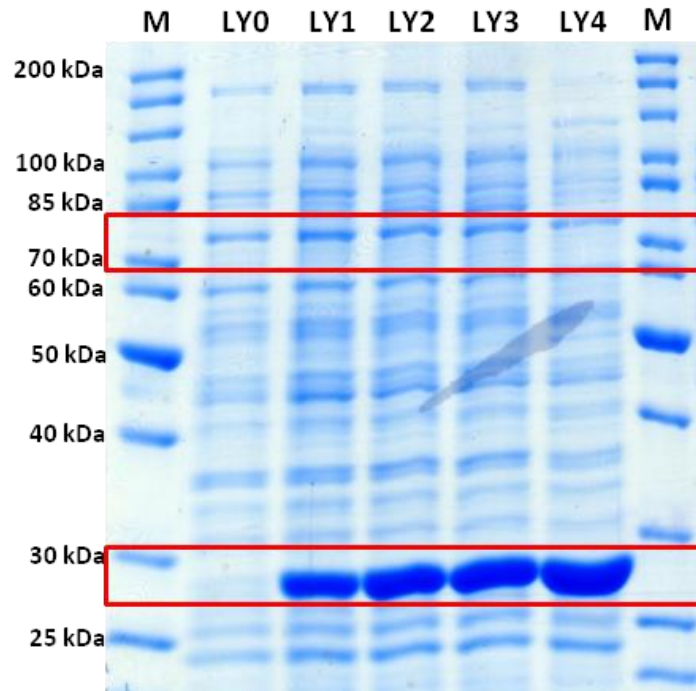


Abbildung 18: SDS-PAGE der Proben einer Kultivierung mit IPTG-Induktion von *E. coli* CHI_ERED, Zelllysatsproben. M = Marker, LY = Zelllysats. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.).

In Abbildung 18 ist das mit kolloidalem Coomassie angefärbte SDS-Gel der Zelllysatsproben gezeigt. Es ist eine deutliche Bande bei 30 kDa zu sehen, die im zeitlichen Verlauf zunimmt. Vor der Induktion war die Bande noch nicht vorhanden. Hierbei handelte es sich um die CHI, die in großer Menge in der löslichen Fraktion zu finden war. Im erwarteten Bereich der Monomere der ERED bei 73 kDa war keine Überexpression erkennbar. Es war in diesem Bereich zwar eine leichte Bande in der löslichen Fraktion zu sehen, welche aber bereits auch zum Zeitpunkt 0 h, d.h. bevor die Expression mit IPTG induziert wurde, vorhanden war. Daher ist nicht davon auszugehen, dass es sich hierbei um die ERED handelte.

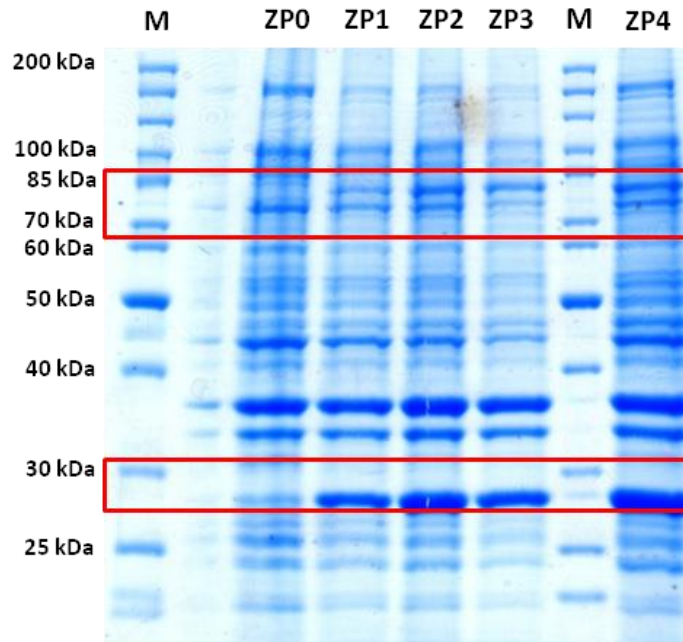


Abbildung 19: SDS-PAGE der Proben einer Kultivierung mit IPTG-Induktion von *E. coli* CHI_ERED, Zellpelletproben. M = Marker, ZP = Zellpellet. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (ZP0 = 0 h, ZP1 = 1 h usw.).

Betrachtet man das Gel mit dem die Zellpellets aufgetrennt wurden (Abbildung 19), so war ebenfalls eine zeitliche Zunahme der CHI bei 30 kDa zu sehen; ein Teil der CHI lag somit unlöslich vor. Auffallend ist, dass sogar vor der Induktion zum Zeitpunkt 0 h bereits eine leichte Bande bei 30 kDa zu erkennen war. Möglicherweise war der Promotor nicht vollständig reprimiert und leicht undicht, so dass bereits vor der IPTG-Induktion eine kleine Menge heterologes Protein vorlag.

Betrachtet man den Bereich bei 73 kDa, wo die ERED erwartet wurde, so ist in der unlöslichen Fraktion ebenfalls keine Überexpression erkennbar. Allerdings tauchte hier nach einer Stunde in der Bahn ZP1 eine Bande auf, die vor der Induktion (ZP0) noch nicht zu sehen war. Im Gel der löslichen Fraktion war diese Bande zu allen Zeitpunkten nicht vorhanden. Dort war im Bereich zwischen 70 und 80 kDa immer nur eine einzelne Bande, bei der es sich wahrscheinlich um ein Protein handelte, das *E. coli* natürlicherweise exprimiert. In den unlöslichen Proben fand sich an der Stelle schon eine Stunde nach Induktion (ZP1) eine doppelte Bande; über der Ersten ist ab dann eine zweite Bande erkennbar gewesen.

Möglicherweise handelte es sich hier um eine geringe Menge der ERED, die unlöslich vorlag. Die Expression war aber nur sehr gering. Ein Plasmidverlust als Ursache der schwachen Expression kann ausgeschlossen werden, da jederzeit mit den notwendigen Antibiotika gearbeitet wurde.

Zusätzlich zur SDS-PAGE wurden Enzymaktivitätstests durchgeführt. Wie bereits in den vorherigen Kapiteln beschrieben, wurde auch hier Zellysat von *E. ramulus* als Positivkontrolle mitgetestet. Für alle Proben mit heterologem Zellysat konnte keine

Aktivität gefunden werden. *E. ramulus* Zelllysate als Kontrolle zeigte einen raschen Abbau des Naringenins und damit eine hohe Enzymaktivität (6.2.3).

Dass die ERED in dem gezeigten Experiment nur in der unlöslichen Fraktion und auch nur in geringen Mengen exprimiert wurde und keine Aktivität nachweisbar gewesen ist, lag möglicherweise daran, dass unter aeroben Bedingungen gearbeitet wurde.

Rohdich et. al gelang zwar die Klonierung und rekombinante Expression der Enoatreduktasen aus *C. tyrobutyricum* und *C. thermoaceticum* in *E. coli*. Dabei zeigte sich jedoch interessanterweise, dass nur unter anaeroben Bedingungen lösliches und aktives Enzym gebildet wurde. Wahrscheinlich können unter aeroben Bedingungen die empfindlichen Fe₄S₄-Cluster nicht korrekt gebildet werden, bzw. sie werden destabilisiert und können wieder zerfallen [75, 106, 107]. Deshalb wurde die heterologe Expression als nächstes unter anaeroben Bedingungen untersucht. Diese Experimente sind im folgenden Abschnitt beschrieben.

4.3.5 Kultivierung und Biotransformation von *E. coli* Rosetta pET28b_CHI pET-52b_ERED im 2 L Reaktor unter anaeroben Bedingungen

Die Enzymproduktion sollte nun unter anaeroben Bedingungen untersucht werden. Bei *E. coli* handelt es sich um ein fakultativ anaerobes Bakterium, d.h. es kann sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen überleben. In Abhängigkeit davon werden unterschiedliche terminale Elektronenakzeptoren in der Atmungskette verwendet. Unter 3.2.1.1 werden die physiologischen Hintergründe hierzu näher erläutert. Prinzipiell ist *E. coli* daher für eine heterologe Expression unter anaeroben Bedingungen geeignet.

Erste Vorversuche haben jedoch gezeigt, dass der hier untersuchte *E. coli* CHI_ERED in anoxisch präparierten Anaerobierflaschen nur extrem langsam wächst (Daten nicht gezeigt). Der Prozess konnte somit nicht komplett unter anaeroben Bedingungen durchgeführt werden. Daher wurde der Prozess in zwei Phasen aufgeteilt.

Zunächst erfolgt die Anzucht von möglichst viel Biomasse unter normalen, aeroben Bedingungen (Wachstumsphase). Anschließend wird auf anoxische Bedingungen gewechselt. Sobald diese erreicht sind, wird die Produktionsphase eingeleitet, indem induziert wird. Der geplante zweiphasige Prozess ist in Abbildung 20 skizziert.

Technisch ist ein auf aerobe Wachstums- und anaerobe Proteinproduktionsphase aufgeteilter Prozess im Schüttelkolbenmaßstab nur aufwändig umzusetzen. In einem Reaktor lässt sich der Wechsel hingegen sehr schnell und einfach einleiten. Die Begasung kann einfach von Druckluft auf Stickstoff geändert werden, so dass der Sauerstoff in kurzer Zeit ausgeblasen und etwaige Reste von der Kultur verbraucht werden.

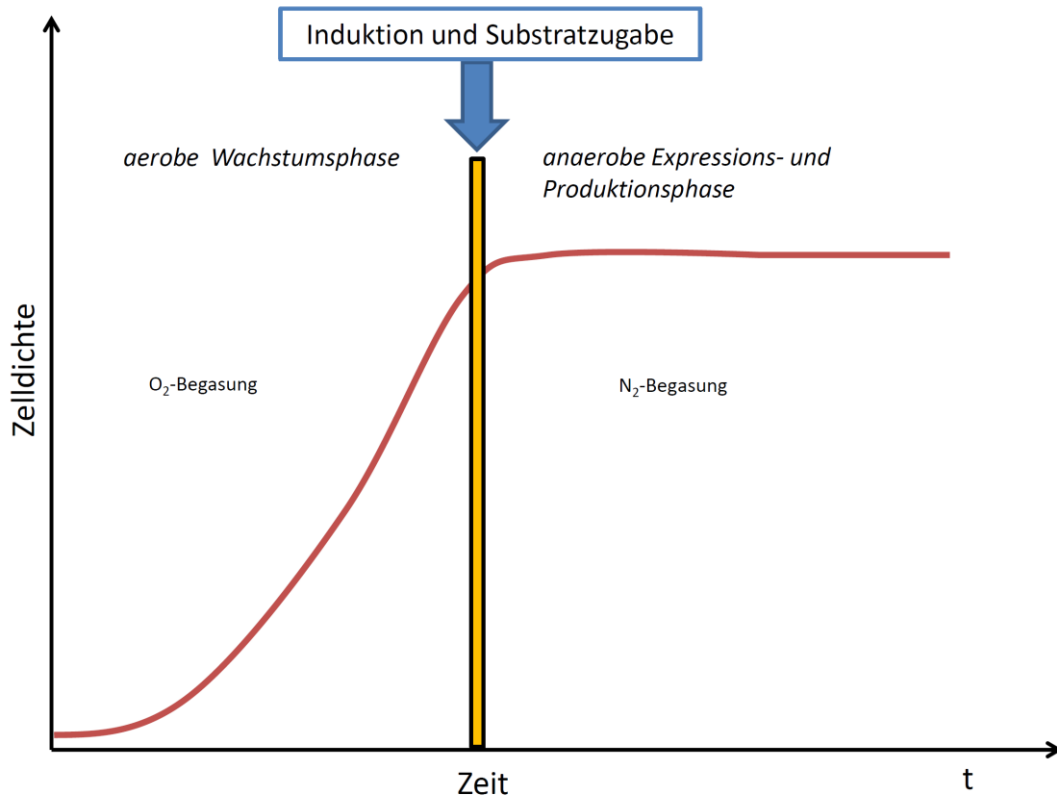


Abbildung 20: Schematische Skizze der entwickelten zweiphasigen Prozessführung mit aerober Wachstums- und anaerober Produktionsphase.

Es wurde ein 2 L-Glasrührkesselreaktor gewählt (BIOSTAT A+, Sartorius AG). So konnte einerseits das Reaktorvolumen möglichst klein gehalten werden (je größer, desto höher sind die Kosten und der Präparationsaufwand) und andererseits konnten die Vorteile eines Reaktors (pH- und O₂-Analytik und -regelung, N₂-Begasung) ausgenutzt werden. Um eine möglichst große Biomassekonzentration anziehen zu können, wurde für die folgenden Versuche TB-Medium anstelle von LB-Medium benutzt. TB-Medium (engl. „terrific broth“) enthält mehr Nährstoffe, ist gepuffert und ermöglicht so höhere Zelldichten (siehe Rezepte Anhang 6.4.5).

Außerdem wurde hier versucht, die Biotransformation ganzzellkatalytisch durchzuführen. Hierzu wurde zusammen mit dem Induktor IPTG auch Substrat (Naringenin) zu der Kultur zugegeben. Eine Ganzzellkatalyse hat den Vorteil, dass die Enzymbaufreinigung komplett entfällt. Für die hier angestrebte Biotransformation müssten zwei Enzyme (CHI und ERED) aufgereinigt werden. Die Aufreinigung der ERED müsste zudem wahrscheinlich unter anaeroben Bedingungen durchgeführt werden [75]. Des Weiteren sind Enoatreduktasen i.d.R. NADH-abhängig, so dass als weitere Schwierigkeit bei einer Enzymkatalyse noch laufend NADH regeneriert oder zugegeben werden müsste. Prinzipiell sind solche Recyclingsysteme, die oft über Alkoholdehydrogenasen das NADH regenerieren, für Enoatreduktasen bereits beschrieben [108]. Eine Biotransformation mit aufgereinigten Enzymen wird dadurch aber verteuert und aufwändiger.

Nahezu alle folgenden Kultivierungen wurden auf dieselbe Weise durchgeführt. Daher wird hier exemplarisch an der folgenden Kultivierung ausführlich beschrieben, wie die entwickelte, zweiphasige Prozessführung (siehe Abbildung 20) in der Praxis durchgeführt worden ist. Wenn in darauffolgenden Kultivierungen davon abweichend gearbeitet wurde, so werden diese Änderungen in den jeweiligen Kapiteln erläutert.

Der Bioreaktor wurde zunächst mit 1,7 L TB-Medium und 0,3 mL/L Antischaummittel befüllt und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen wurden die temperaturempfindlichen Antibiotika und 200 mL Kaliumphosphatpuffer-Lösung über eine Peristaltikpumpe zugeführt.

Die Vorkulturen wurden in Schüttelkolben (37 °C, 150 rpm, 100 mL LB-Medium in 500 mL Schikanekolben) vorbereitet. Inokuliert wurde der Reaktor über ein Septum mit 100 ml Vorkultur, was 5% des gesamten Kulturvolumens entspricht. Während der aeroben Wachstumsphase wurde mit 2 vvm (entsprechend 4 L/min) Druckluft begast. Über die Rührerdrehzahl (Kaskadenregelung) wurde der Sauerstoffpartialdruck bei 50% gehalten. Weitere Prozessvariablen waren eine Temperatur von 30 °C und eine pH-Regelung auf pH 7.

Über Nacht (ca. 14 h) wurde die Kultur in der aeroben Wachstumsphase belassen. Dann wurde offline photometrisch die Zelldichte gemessen. Dabei wurde eine Zelldichte von 15,7 rel. AU. ermittelt.

Nun wurde auf die anaerobe Produktionsphase gewechselt. Hierzu wurde zunächst die Kaskadenregelung des Rührers deaktiviert und – um die Durchmischung der Kultur im Reaktor aufrechtzuerhalten – manuell eine Drehzahl von konstant 150 rpm eingestellt. Anschließend wurde von Druckluft- auf Stickstoffbegasung gewechselt. Die Stickstoffbegasungsrate lag dabei bei ca. 0,1 L/min und wurde für die komplette anaerobe Produktionsphase beibehalten, um zu verhindern, dass Sauerstoff oder Partikel aus der Umgebung über den Abluftkühler in den Reaktor gelangen. Der pO_2 -Wert sank direkt nachdem die Begasung umgestellt wurde innerhalb von weniger als einer Minute auf <1% und verblieb dort für die restliche Zeit des Prozesses. Die Temperatur wurde um 5 °C auf 25 °C gesenkt, um die Proteinfaltung zu unterstützen.

Über ein Septum wurden IPTG (Endkonzentration im Medium 1 mM) und direkt folgend Naringenin (Endkonzentration im Medium ebenfalls 1 mM, entspricht ca. 0,27 g/L) zugegeben. Das nur schwer wasserlösliche Naringenin wurde vor der Zugabe in 2 mL Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Direkt nach der Zugabe wurde die erste Probe entnommen.

Während der anaeroben Produktionsphase wurden stündlich weitere Proben entnommen. Photometrisch wurde die Zelldichte bestimmt. Zelllysate und Zellpellet (nach Ultraschallaufschluss) wurden mittels SDS-PAGE untersucht. Um die Flavonoidkonzentrationen bestimmen zu können, wurde Kulturbrühe mit Ethylacetat extrahiert. Während der Extraktion lysierten die Zellen durch die hohen Ethylacetat-

Konzentrationen, so dass sowohl intra- als auch extrazellulär lokalisierte Flavonoide erfasst wurden. Das Ethylacetat wurde anschließend in einer Vakuumzentrifuge verdampft. Die verbleibenden Flavonoide wurden dann in Methanol resuspendiert und in der HPLC vermessen.

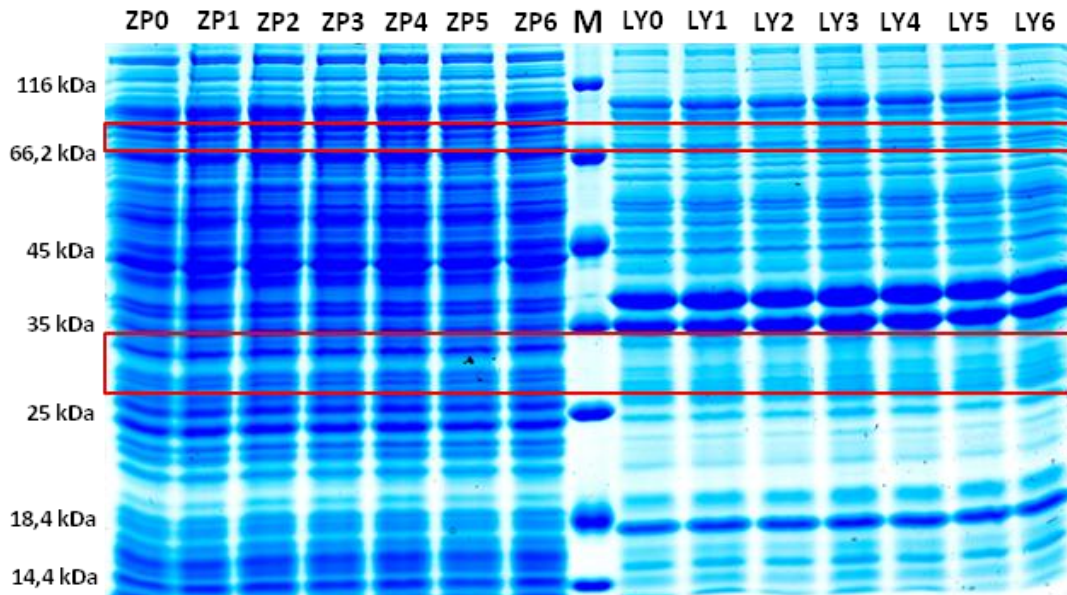


Abbildung 21: SDS-PAGE der anaeroben Produktionsphase einer *E. coli* CHI_ERED Kultivierung bei 25 °C // 1 mM IPTG-Induktion // 1 mM Naringeninzugabe. ZP = Zellpellet, LY = Zelllysat, M = Marker. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (ZP0 = 0 h, ZP1 = 1 h, LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.).

Die Zelldichte sank während der sechsständigen anaeroben Produktionsphase von den zu Beginn gemessenen 15,7 rel. AU auf schließlich 14,3 rel. AU. Wahrscheinlich befand sich die Kultur bereits in der Absterbephase. Im Verlauf konnte auch ein intensiver, kohlarartiger Geruch wahrgenommen werden. DMSO kann von *E. coli* unter anaeroben Bedingungen zu Dimethylsulfid (DMS) verstoffwechselt werden (siehe 3.2.1.1). DMS besitzt einen markanten, kohlähnlichen Duft. Der Geruch war somit wahrscheinlich auf das gebildete DMS zurückzuführen.

In der SDS-PAGE (Abbildung 21) sind links vom Marker die unlöslichen Proben (Zellpellet) und rechts vom Marker die löslichen Proben (Zelllysat) aufgetragen. Weder im erwarteten Bereich der CHI (30 kDa), noch im erwarteten Bereich der ERED (73 kDa) ist eine (Über-)Expression erkennbar.

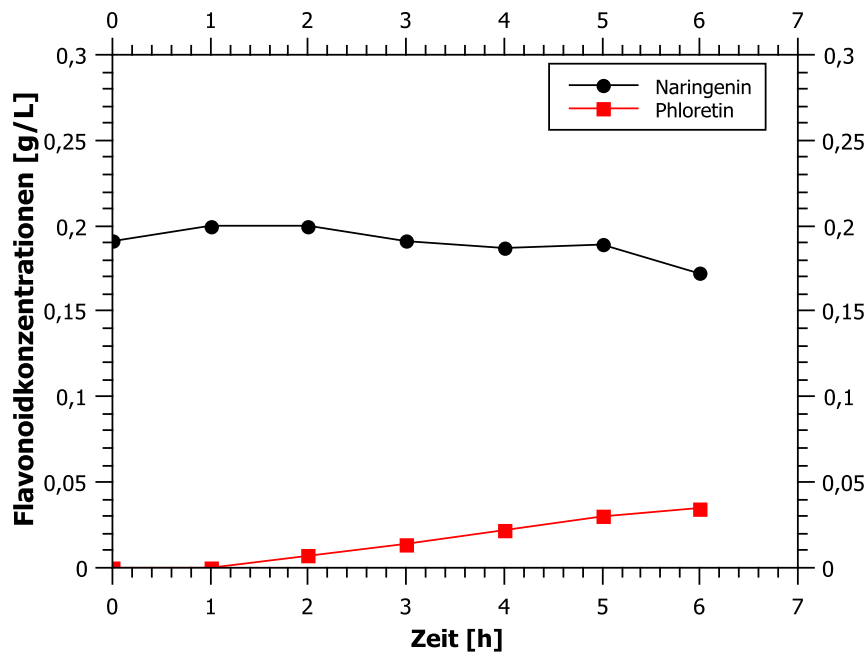


Abbildung 22: Verlauf der Naringenin- und Phloretinkonzentrationen der anaeroben Produktionsphase einer *E. coli* CHI_ERED Kultivierung bei 25 °C // 1 mM IPTG-Induktion.

Betrachtet man den Verlauf der Flavonoidkonzentrationen (Abbildung 22), ist klar eine Bildung von Phloretin erkennbar. Während die Naringeninkonzentration während der 6 h von 0,2 g/L auf 0,17 g/L abnahm, nahm die Phloretinkonzentration nahezu äquivalent von 0 g/L auf 0,035 g/L zu. Dies entspricht einem Umsatz von ca. 17%. Damit konnte zum ersten Mal Phloretin in größeren Mengen biokatalytisch hergestellt werden. In bisherigen Arbeiten bewegten sich die mit *E. ramulus* Zellysate erreichten Mengen im Bereich von 25 $\mu\text{mol/L}$ (entspricht ca. 0,007 g/L) [3].

Interessanterweise konnte also ein Umsatz beobachtet werden, obwohl in der SDS-PAGE keine Überexpression zu sehen war. Die Enzyme müssen aber aktiv vorgelegen haben. In früheren Arbeiten ist bereits die sehr hohe katalytische Aktivität von *E. ramulus* Zellysate (siehe auch 4.1) beobachtet worden, was dafür spricht, dass auch geringe Enzymmengen sehr viel Substrat umsetzen können [3].

Der Umsatz ist im Folgenden definiert als: der gemessene letzte (höchste) Phloretinwert geteilt durch den gemessenen Startwert für Naringenin. So beziehen sich die Umsätze immer auf die tatsächlich gemessenen, und nicht auf die eingewogenen Werte. Die Vergleichbarkeit ist so gegeben, weil nicht immer eine vollständige Extraktion aller Flavonoide erreicht werden konnte (s.u. nächster Absatz).

Obwohl hier 0,27 g/L Naringenin eingewogen und gelöst wurden, konnten nur 0,2 g/L wiedergefunden werden. Die Extraktion könnte hier nicht effizient genug verlaufen sein, bzw. ein Teil der Flavonoide verblieb in der Interphase zusammen mit den lipophilen Zelltrümmern. Des Weiteren könnte das in DMSO gelöste Naringenin nach der Zugabe teilweise auskristallisiert sein.

4.3.6 Wachstumsverhalten von *E. coli* Rosetta pET28b_CHI pET-52b_ERED im 2 L Reaktor bei verschiedenen Temperaturen

Obwohl erfolgreich ganzzellkatalytisch Phloretin produziert werden konnte, waren die Ausbeute und die Enzymexpression nicht optimal. Möglicherweise war die beobachtete mangelnde heterologe Expression durch das fortgeschrittene Wachstum der Kultur oder eine aufgetretene Substratlimitierung begründet. Als die anaerobe Produktionsphase gestartet wurde, befand sich die Kultur wahrscheinlich schon in der Absterbephase (s.o.). Zusätzlich zum physiologischen Stress der IPTG-Induktion und der gesenkten Temperatur kam hier noch die Umstellung auf anaerobe Bedingungen hinzu. Die Kultur war durch diese Stressfaktoren möglicherweise nur eingeschränkt in der Lage, bzw. vital genug, die heterologe Expression und so die Biotransformation zu leisten.

Die anaerobe Produktionsphase sollte daher am besten eingeleitet werden, wenn die Kultur eine hohe Vitalität aufweist. In der Regel ist dies während der exponentiellen Wachstumsphase der Fall. Daher wurde als nächstes das aerobe Wachstumsverhalten von *E. coli* CHI_ERED in TB-Medium bei verschiedenen Temperaturen im 2 L-Rührkesselreaktor charakterisiert, um einen guten Zeitpunkt zum Einleiten der Produktionsphase zu finden. Als Temperaturstufen wurden 25 °C, 30 °C und die für *E. coli* ideale Temperatur von 37 °C gewählt. Die weiteren Prozessvariablen wurden wie oben für das Biotransformationsexperiment (siehe 4.3.5) beschrieben gewählt. Die Zelldichte wurde stündlich offline photometrisch gemessen.

Die Wachstumsverläufe bei den verschiedenen Temperaturen sind in Abbildung 23 dargestellt.

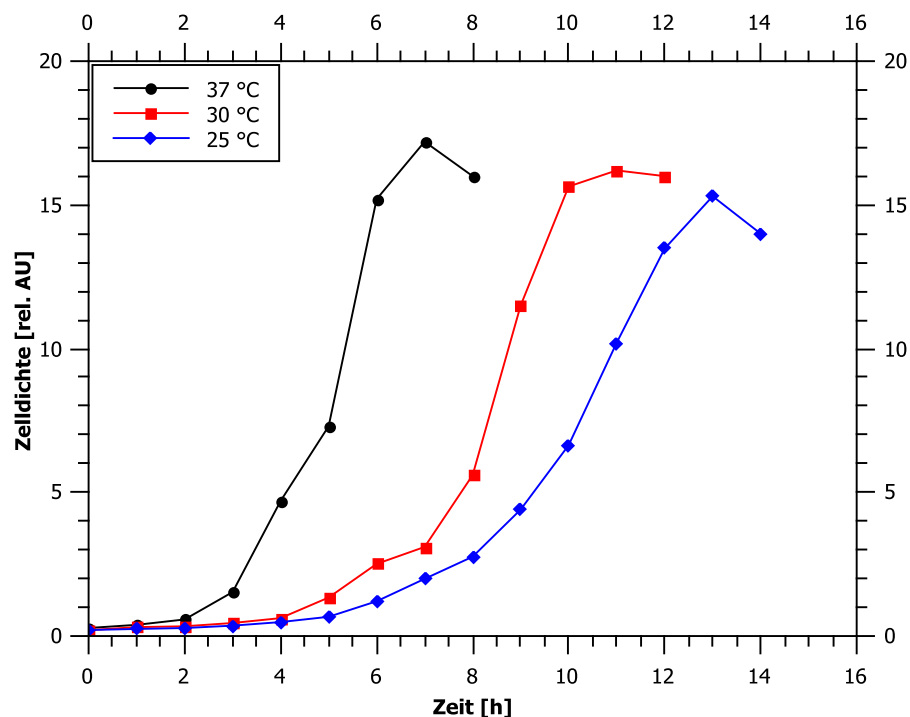


Abbildung 23: Wachstumsverhalten von *E. coli* CHI_ERED im 2 L Glasrührkessel in TB Medium bei verschiedenen Temperaturen.

Zu Beginn wurde in allen Kultivierungen die gleiche Zelldichte von ca. 0,2 rel. AU gemessen. Nach unterschiedlich langen lag-Phasen (37 °C: 2 h, 30 °C: 4 h, 25 °C: 5 h) gingen alle Kultivierungen in die exponentielle Wachstumsphase über.

Bei 37 °C wurde bereits nach ca. 6 h die stationäre Phase erreicht. Die maximale Zelldichte betrug hier 17,2 rel. AU. Bei 30 °C mündete das Wachstum nach ca. 10 h in die stationäre Phase. Es wurden 16,2 rel. AU (nach 11 h) erreicht. Die Kultivierung bei 25 °C benötigte am längsten, um in die stationäre Phase zu kommen. Sie wurde erst nach ca. 13 h erreicht. Die maximale Zelldichte war mit 15,3 rel. AU die geringste der drei Kultivierungen.

Die Ergebnisse zeigten erwartungsgemäß, dass *E. coli* bei niedrigeren Temperaturen langsamer anwächst und geringfügig niedrigere Zelldichten erreicht werden. Die Stoffwechselprozesse laufen bei höheren Temperaturen schneller ab. Die Wachstumskurve bei 30 °C bestätigte die Vermutung, dass sich die Kultur im ersten Biotransformationsexperiment bereits in der Absterbephase befand. Dort wurde nach mehr als 14 h in der aeroben Phase bei 30 °C die anaerobe Produktionsphase eingeleitet (siehe 4.3.5). Hier konnte aber gezeigt werden, dass der verwendete Stamm bei einer Temperatur von 30 °C bereits nach 10 h die exponentielle Phase verlassen hat.

Im Hinblick auf den Biotransformationsprozess erfolgte für die folgenden Versuche die aerobe Wachstumsphase bei 25 °C. So ergab sich die Möglichkeit, zunächst am ersten Tag den Reaktor und die Vorkultur vorbereiten zu können, und am späten Abend zu inokulieren. Am nächsten Morgen nach ca. 10 h befand sich die Kultur dann noch in der exponentiellen Phase, so dass bei einer OD₆₀₀ von ca. 12 – 13 rel. AU mit sehr vitalen Zellen die anaerobe Produktionsphase eingeleitet werden konnte. Bei dieser OD₆₀₀ ist sichergestellt, dass noch keine Substratlimitierungen vorliegt, da die maximal mögliche OD₆₀₀ des Stammes in TB-Medium (ca. 15 – 16 rel. AU) noch nicht erreicht ist. Außerdem wurden die Zellen auf diese Weise über den kompletten Prozessverlauf bei 25 °C belassen, was den physiologischen Stress durch einen Temperaturwechsel vermied.

4.3.7 Biotransformation mit *E. coli* Rosetta pET28b_CHI pET-52b_ERED im 2 L Maßstab während der exponentiellen Wachstumsphase

In der folgenden Kultivierung wurde während der exponentiellen Phase bei einer optischen Dichte 12,0 rel. AU, als die Zellen eine große Vitalität aufwiesen, die anaerobe Produktionsphase eingeleitet. Die Prozessvariablen (u.a. 1 mM IPTG, 0,27 g/L Naringenin, 25 °C), die Analytik und die Arbeitsschritte wurden, wie bei der ersten Biotransformation unter 4.3.5 beschrieben, gewählt bzw. durchgeführt.

Nachdem auf anaerobe Bedingungen umgestellt und induziert wurde, zeigte die Kultur nur noch während der ersten Stunde eine geringe Zunahme der Zelldichte auf

12,3 rel. AU. Im weiteren Verlauf blieb die Zelldichte konstant. Wie schon in Anaerobierflaschen beobachtet, zeigte der verwendete *E. coli* CHI_ERED auch im Reaktor unter anaeroben Bedingungen kein Wachstum. Im vorherigen Abschnitt (4.3.6) konnte gezeigt werden, dass unter den gegebenen Variablen bei aeroben Bedingungen maximale Zelldichten von bis zu 16 rel. AU möglich wären.

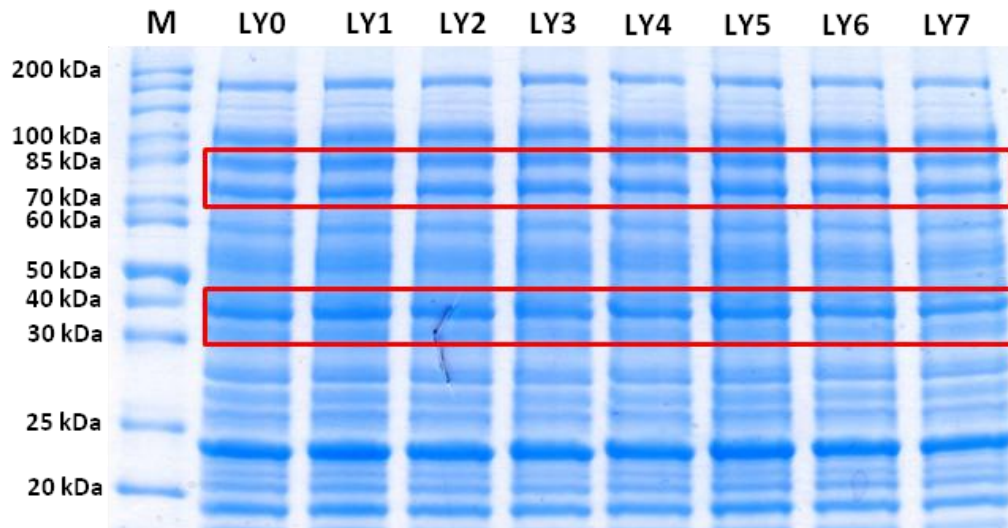


Abbildung 24: SDS-PAGE des Zelllysats *E. coli* CHI_ERED Kultivierung bei 25 °C // 1 mM IPTG-Induktion // 1 mM Naringeninzugabe // Induktion in der exponentiellen Wachstumsphase. LY = Zelllysate, M = Marker. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.).

In Abbildung 24 ist die SDS-PAGE der löslichen Proteine (Zelllysateproben) gezeigt. Eine eindeutige Überexpression war weder für die CHI bei 30 kDa, noch für die ERED bei 73 kDa zu sehen. In beiden Größenbereichen sind zwar Banden zu sehen gewesen, diese waren aber auch schon zum Zeitpunkt 0 h zu sehen. Im zeitlichen Verlauf nahmen diese auch nicht zu. Möglicherweise handelte es sich trotzdem um die Enzyme, dann ist aber davon auszugehen, dass der Promotor nicht hinreichend reprimiert wurde und das Induktionssystem nicht dicht hielt. Dies deutete auf eine Basalexpression der Enzyme hin. Da die Banden im zeitlichen Verlauf nicht zunahmten, ist davon auszugehen, dass trotz der IPTG-Zugabe die Enzyme nicht verstärkt exprimiert wurden.

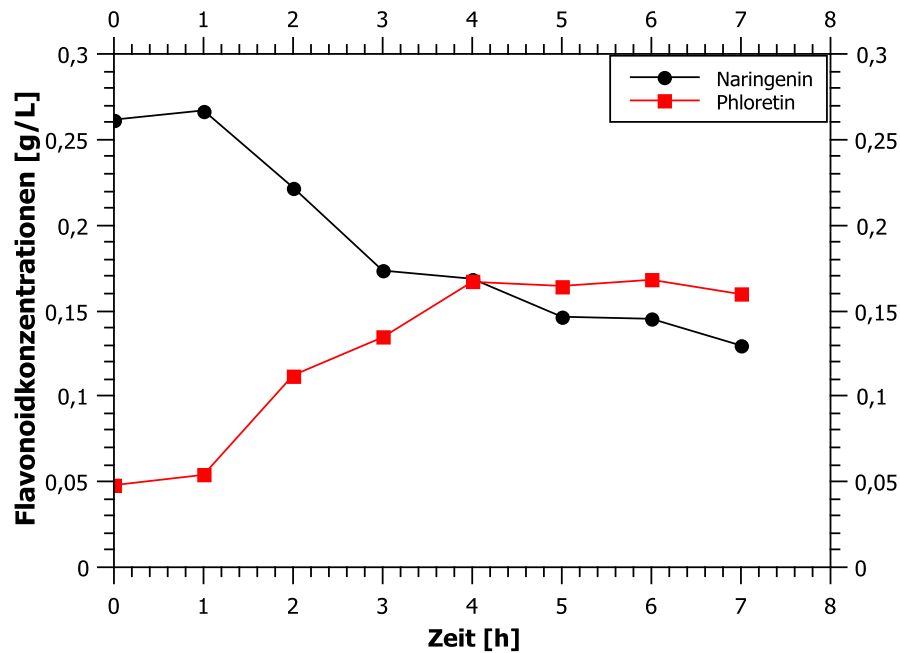


Abbildung 25: Verlauf der Flavonoidkonzentrationen einer *E. coli* CHI_ERED Kultivierung bei 25 °C // 1 mM IPTG-Induktion // 1 mM Naringeninzugabe // Induktion in der exponentiellen Wachstumsphase.

In Abbildung 25 ist der Verlauf der Flavonoidkonzentrationen gegen die Zeit aufgetragen. Es ist zu sehen, dass deutlich mehr Phloretin gebildet wurde als im Versuch mit der Kultur, in die Produktionsphase während der Absterbephase eingeleitet wurde (Experiment 4.3.5). Bereits in der Probe direkt nach der Naringeninzugabe (0 h) konnte eine Phloretinkonzentration von 0,05 g/L gemessen werden. Da die IPTG- und die Naringenin-Zugabe, wie unter 4.3.5 beschrieben, zeitlich unmittelbar hintereinander erfolgten, spricht dies dafür, dass bereits aktive Enzyme im Reaktor vorlagen und das zugegebene Naringenin sofort teilweise umgesetzt wurde. Die Proben für die HPLC-Analyse wurden direkt bei -20 °C eingefroren. Jedoch konnte wahrscheinlich in der Zeit, in der die Proben abkühlten, noch Naringenin umgesetzt werden. So erklärt sich das bereits bei 0 h gemessene Phloretin.

Im weiteren Verlauf stieg die Phloretinkonzentration weiter an bis nach 4 h mit 0,17 g/L ein konstanter Wert erreicht wurde. Die Naringenininkonzentration nahm von anfänglich 0,26 g/L auf 0,13 g/L nach 7 h ab. Das entsprach einem Umsatz von ca. 60% (0,17 g/L Produkt/0,26 g/L Substrat).

Auch in diesem Experiment wurde nur eine schwache Expression in der SDS-PAGE, aber trotzdem eine Umsetzung beobachtet (siehe 4.3.5). Dies spricht für die Vermutung, dass aufgrund sehr hoher Enzymaktivitäten der CHI und der ERED, bereits geringe Enzymmengen für die Biokatalyse ausreichend sind.

Verglichen mit der ersten Biotransformation (siehe 4.3.5, Umsatz ca. 17%) konnte ein ca. 3-fach höherer Umsatz erreicht werden. Höchstwahrscheinlich ist diese deutliche Verbesserung darauf zurückzuführen, dass die Zellen sich in diesem Experiment noch nicht in der Absterbephase befanden. Alle anderen Prozessvariablen wurden beibehalten

und können daher als Ursache ausgeschlossen werden. Bei weiteren Biotransformationsexperimenten sollte der Wechsel in die anaerobe Produktionsphase also unbedingt mit vitalen Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase erfolgen.

Da aufgrund der guten Phloretinbildung davon ausgegangen werden konnte, dass lösliche und aktive Enzyme vorlagen, wurde zusätzlich mit Proben der Kultivierung ein Enzymaktivitätstest (siehe 4.2.4) durchgeführt. Wie bereits in den vorherigen Kapiteln beschrieben, wurde auch hier Zellysat von *E. ramulus* als Positivkontrolle parallel mitgetestet.

Jedoch konnte entgegen den Erwartungen für alle Proben mit heterologem Zellysat keine Aktivität gefunden werden. Die Flavonoidkonzentrationen blieben unverändert. *E. ramulus* Zellysat als Kontrolle zeigte hingegen einen raschen Abbau des Naringenins und damit eine hohe Enzymaktivität (siehe Anhang 6.2.3). Möglicherweise muss der Zellaufschluss mit heterologem Enzym unter anaeroben Bedingungen erfolgen, obwohl dies bei *E. ramulus* nicht notwendig ist. Evtl. liegen in *E. ramulus* noch besondere weitere Enzyme oder Chaperone vor, die einen stabilisierenden Einfluss gegen Luftsauerstoff ausüben.

Als Nebeneffekt der durchgeführten Aktivitätstests konnte interessanterweise auf den Ort der Biokatalyse geschlossen werden. Für die Aktivitätstests wurden die jeweiligen Proben der Reaktorkultivierung zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die in Kaliumphosphatpuffer resuspendierten Zellpellets wurden anschließend mit einer Ultraschallsonde aufgeschlossen (siehe 4.2.4). In der HPLC konnte dann teilweise das während der Reaktorkultivierung gebildete Phloretin nachgewiesen werden. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Flavonoide sich zumindest teilweise intrazellulär befinden und auch die Umsetzung intrazellulär erfolgt. Möglicherweise transportiert *E. coli* die Flavonoide aktiv durch die Zellmembran.

4.3.8 Kultivierung von *E. coli* Rosetta pET28b_CHI pET-52b_ERED im 2 L Maßstab unter aeroben Bedingungen

Im letzten Abschnitt konnte erfolgreich mit *E. coli* CHI_ERED und der besonderen zweiphasigen Prozessführung ganzzellkatalytisch Phloretin hergestellt werden. Im nächsten Experiment sollte der Prozess unter komplett aeroben Bedingungen durchgeführt werden. Bisher stützt sich die Hypothese, die ERED muss unter anaeroben Bedingungen exprimiert werden, auf die aus der Literatur bekannten Informationen, die sich auf Enoatreduktasen aus *Clostridien* beziehen (siehe 4.3.3) und den aeroben Schüttelkolben. Weil im Schüttelkolben kein Naringenin zugefüttert wurde, sollte hier im Reaktor überprüft werden, ob für die Phloretinbildung und die Expression der ERED anaerobe Bedingungen zwingend erforderlich sind. Für die Versuchsdurchführung

wurden identische Prozessvariablen wie in den vorherigen Biotransformationsversuchen gewählt (1 mM IPTG, 0,27 g/L Naringenin, 25 °C zur Induktion). Die Umstellung auf anoxische Bedingungen vor der Induktion wurde dagegen nicht durchgeführt. Die Druckluftbegasungsrate betrug auch in der Produktionsphase weiterhin 2 vvm (entsprechend 4 L/min). Durch die automatische Regelung der Rührergeschwindigkeit wurde ein konstanter Sauerstoff-partialdruck von 50% im Medium während des kompletten Versuchs beibehalten. Es wurde während der exponentiellen Wachstumsphase bei einer Zelldichte von ca. 13,2 rel. AU induziert. Nach der Induktion und Substratzugabe wurden stündlich Proben genommen. Die Zelldichte, die Flavonoidkonzentrationen und die Proteinexpression wurden untersucht.

Wie erwartet zeigte die Kultur unter aeroben Bedingungen auch nach Induktion und Substratzugabe ein stetiges Wachstum, so dass 2 h nach Induktion bereits 19,5 rel. AU erreicht wurden. Über die nächsten Stunden blieb die Zelldichte annähernd konstant ($\pm 0,5$ rel. AU). Damit wurde sogar eine leicht höhere Zelldichte erreicht, als aufgrund der aufgenommenen aeroben Wachstumskurven (siehe 4.3.6) erwartet wurde. Da TB-Medium komplexe Bestandteile (Hefeextrakt, Pepton etc. siehe Anhang 6.4.5) enthält, sind solche Unterschiede jedoch nicht ungewöhnlich. Je nach Hersteller oder Produktcharge können diese komplexen Medienbestandteile leicht unterschiedlich sein.

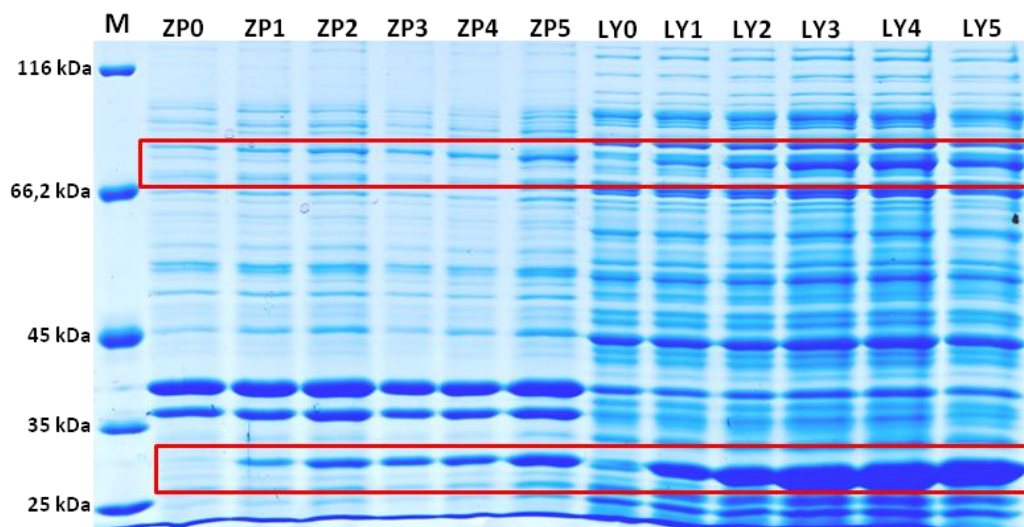


Abbildung 26: SDS-PAGE einer *E. coli* CHI_ERED Kultivierung bei 25 °C // 1 mM IPTG-Induktion // 1 mM Naringeninzugabe // aerobe Bedingungen. LY = Zellysate, ZP = Zellpellet, M = Marker. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (ZP0 = 0 h, ZP1 = 1 h, LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.).

Die Ergebnisse der SDS-PAGE sind in Abbildung 26 zu sehen. Links sind die Zellpellet- und rechts die Zellysateproben aufgetragen worden. Bei 30 kDa, dem erwarteten Bereich der CHI, war sowohl in der löslichen als auch in der unlöslichen Fraktion eine deutliche Bande zu sehen, die auch im zeitlichen Verlauf zunahm. Zu Beginn der Induktion (0 h) war diese Bande in der löslichen Fraktion (Zellysate) bereits schwach ausgeprägt zu erkennen, so dass bereits vor der IPTG-Zugabe teilweise

heterologe CHI exprimiert worden war. In Kapitel 4.4.10 wird näher auf diese Basalexpression eingegangen.

Im Bereich von 73 kDa, dem erwarteten Bereich der Monomere der ERED, ist ebenfalls in beiden Fraktionen eine deutliche Überexpression zu sehen. In den löslichen Fraktionen der Zellysate nahm diese Bande auch deutlich im zeitlichen Verlauf zu und war zu Beginn (0 h) auch noch nicht vorhanden. Daher handelt es sich hier höchstwahrscheinlich um die ERED. Zum ersten Mal konnte damit die Überexpression der ERED nachgewiesen werden. Im Schüttelkolbenmaßstab unter aeroben Bedingungen (siehe 4.3.4) konnte zwar eine geringe Expression der ERED beobachtet werden, hier kann aber erstmals von einer deutlichen Überexpression gesprochen werden. Wahrscheinlich war die wesentlich höhere Zelldichte im Vergleich zum Schüttelkolben der Grund, dass die Überexpression hier im Reaktor so deutlich zu sehen war.

Diese Überexpression konnte trotz einer ähnlich hohen Zelldichte in den vorherigen Reaktorversuchen (4.3.5 und 4.3.7) nicht beobachtet werden. Die Prozessvariablen wurden bis auf die Umstellung auf anoxische Bedingungen gleich gewählt, so dass davon auszugehen ist, dass *E. coli* Schwierigkeiten hatte, die heterologen Proteine in großen Mengen unter anaeroben Bedingungen zu bilden. Da jedoch anscheinend bereits geringe Enzymmengen eine hohe katalytische Aktivität zeigen (siehe 4.3.7), ist dies als wenig problematisch zu bewerten.

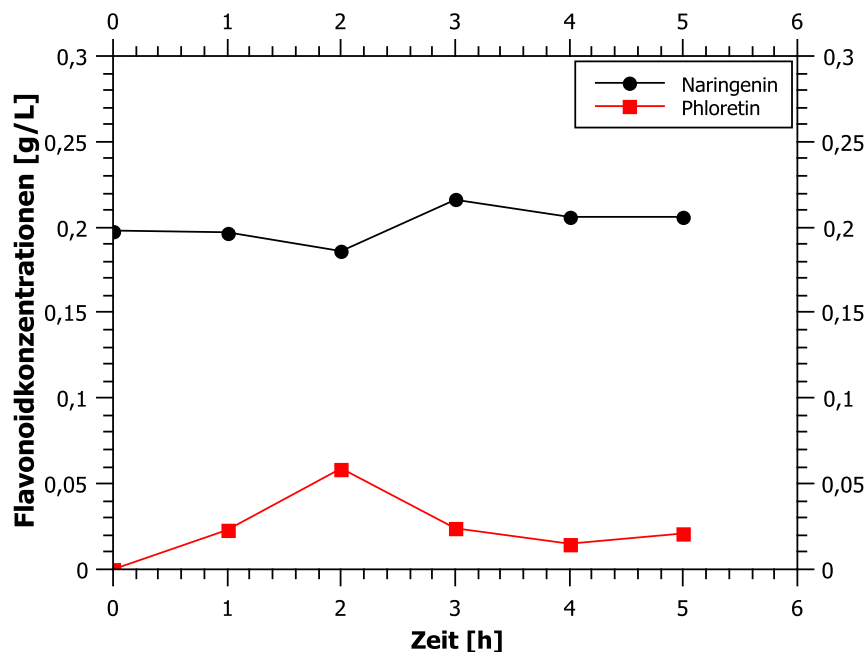


Abbildung 27: Verlauf der Flavonoidkonzentrationen einer *E. coli* CHI_ERED Kultivierung bei 25 °C // 1 mM IPTG-Induktion // 1 mM Naringeninzugabe // aerobe Bedingungen.

Die Ergebnisse der Substrat- und Produktkonzentrationen sind in Abbildung 27 gezeigt. Trotz der aeroben Bedingungen ist eine Phloretinbildung von 0,023 g/L nach 1 h

gemessen worden, nach 2 h wurde mit 0,059 g/L der höchste Wert erreicht. Danach sank die Phloretinkonzentration auf Werte von ca. 0,02 g/L.

Verglichen mit einer Kultivierung, bei der die Produktionsphase anaerob gefahren wurde (vgl. Abschnitt 4.3.7), sind die erreichten Phloretinkonzentrationen nur sehr gering (0,17 g/L vs. 0,059 g/L). Bei den gemessenen 0,059 g/L könnte es sich zudem um einen Ausreißer handeln, da die nachfolgenden Konzentrationen alle deutlich niedriger waren (ca. 0,02 g/L).

Obwohl eine geringe Phloretinbildung beobachtet wurde, haben sich anaerobe Bedingungen während der Produktionsphase als zwingend notwendig erwiesen. Da alle anderen Prozessvariablen identisch gewählt wurden, kann die geringe Phloretinbildung nur auf die aeroben Bedingungen zurückzuführen sein. Wie in der SDS-PAGE zu sehen war, ist die heterologe Expression aerob deutlich stärker. Allerdings ist davon auszugehen, dass die Enzymaktivität der ERED nicht oder nur sehr eingeschränkt vorhanden war, da sonst eine wesentlich höhere Phloretinbildung beobachtet werden müsste.

Dass trotz der aeroben Bedingungen geringe Mengen Phloretin gebildet wurden, könnte darin begründet sein, dass einige Zellen im Reaktor nicht vollständig mit Sauerstoff versorgt waren, also de facto anaerobe Zonen aufgrund einer nicht völlig idealen Durchmischung und Sauerstoffverfügbarkeit vorhanden waren. In diesen sauerstofffreien oder schlecht mit Sauerstoff versorgten Bereichen bzw. Zellen, konnte die ERED korrekt gebildet werden, ohne dass die empfindlichen Fe_4S_4 -Cluster (siehe 4.3.3) destabilisiert oder zerstört wurden.

4.3.9 Kultivierung von *E. coli* Rosetta pET28b_CHI

In diesem Abschnitt wurde die entwickelte zweiphasige Prozessführung mit dem Vorläuferstamm *E. coli* Rosetta pET28b_CHI durchgeführt. *E. coli* Rosetta pET28b_CHI exprimiert nur die CHI, nicht jedoch die ERED. Damit sollte bewiesen werden, dass für eine erfolgreiche Phloretinbildung beide Enzyme, die CHI und die ERED notwendig sind.

Der Prozess wurde wie unter 4.3.5 und 4.3.7 beschrieben durchgeführt (1 mM IPTG // 25 °C // 0,27 g/L Naringenin). Die Flavonoidkonzentrationen wurden offline über HPLC gemessen, die Zelldichte offline photometrisch gemessen.

Bei ca. 12,8 rel. AU wurde auf anaerobe Bedingungen gewechselt. Die Kultur wuchs innerhalb der ersten Stunde noch bis 13,3 rel. AU und stellte danach das Wachstum ein. Die Ergebnisse der HPLC-Messungen sind in Abbildung 28 gezeigt.

Es ist keine Phloretinbildung beobachtet worden. Die CHI war alleine nicht in der Lage, die Biotransformation zu leisten. Die ERED ist somit ebenfalls erforderlich.

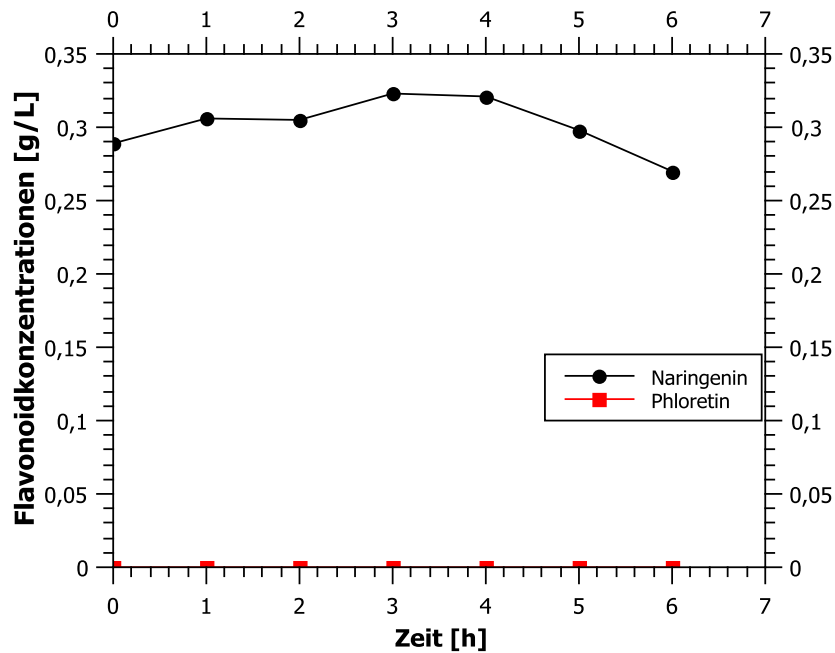


Abbildung 28: Verlauf der Flavonoidkonzentrationen einer *E. coli* Rosetta pET28b_CHI Kultivierung bei 25 °C // 1 mM IPTG-Induktion // 1 mM Naringeninzugabe.

4.3.10 Schlussfolgerungen

Mit dem *E. coli* CHI_ERED konnte erfolgreich ein Bioprozess im 2 L-Glasrührkessel zur Phloretinproduktion entwickelt werden. Die Biotransformation erfolgte dabei ganzzellkatalytisch.

Es wurde eine besondere, zweiphasige Kultivierungsstrategie entwickelt und angewendet (siehe Abbildung 20). Dabei erfolgte zunächst die Biomasseanzucht bis zur exponentiellen Wachstumsphase unter aeroben Bedingungen. Anschließend wurde für die Produktionsphase auf anaerobe Bedingungen gewechselt, induziert und das Substrat zugegeben. Es konnten bis zu 0,17 g/L Phloretin in der Kulturbrühe gebildet werden.

Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn die anaerobe Produktionsphase mit möglichst vitalen Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase eingeleitet wurde. Da das Wachstumsverhalten von *E. coli* CHI_ERED bei verschiedenen Temperaturen (25 °C, 30 °C und 37 °C) charakterisiert wurde, war es gut möglich den idealen Zeitpunkt, um die Produktionsphase einzuleiten, abzuschätzen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die anaeroben Bedingungen zwingend notwendig für eine signifikante Phloretinbildung sind. Unter aeroben Bedingungen während der Produktionsphase wurde nur extrem wenig Phloretin gebildet. Auch konnte gezeigt werden, dass die CHI die Biokatalyse nicht alleine leisten kann; nur wenn CHI und ERED vorhanden sind wurde aus Naringenin auch Phloretin gebildet.

Damit konnten wesentliche Erkenntnisse über die beteiligten Enzyme gewonnen werden, so dass das bisher bekannte Reaktionsschema (siehe Abbildung 4 in Kapitel 3.1.3) aktualisiert werden muss.

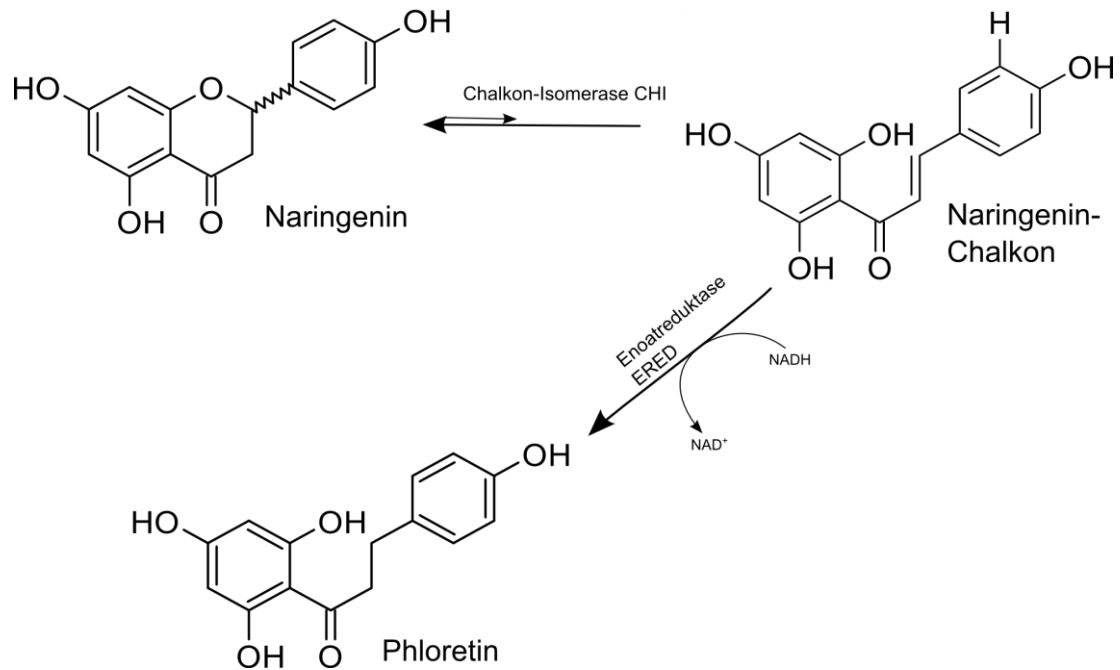


Abbildung 29: Postulierter Umsetzungsweg von Naringenin zu Phloretin und beteiligte Enzyme.

In Abbildung 29 ist das aktualisierte Schema der Umsetzung von Naringenin zu Phloretin gezeigt. Zunächst wird das Naringenin von der CHI zum Naringenin-Chalkon isomerisiert. Die Hypothese, dass das Gleichgewicht hier auf Seiten des Naringenins liegt, konnte durch Umsetzungsversuche der Projektpartner mit Naringenin-Chalkon (unveröffentlichte Daten, M. Thomsen und M. Gall, E. M. A. Universität Greifswald) bestätigt werden.

Vom Naringenin-Chalkon ausgehend katalysiert die ERED NADH-abhängig die höchstwahrscheinlich irreversible Reduktion des Chalkons zum Phloretin. Die weiteren Abbauschritte zum Phloroglucin und zur HPP entfallen, da *E. coli* keine Phloretinhydrolase bildet. Ebenso konnte eine in der Vergangenheit postulierte Hypothese, die CHI könnte evtl. direkt allein die Transformation zum Phloretin leisten, widerlegt werden und entfällt im Schema ebenso.

Des Weiteren lassen die Ergebnisse des vorherigen Abschnitts (siehe 4.3.7) vermuten, dass der verwendete *E. coli* Stamm in der Lage ist, die Flavonoide aktiv durch die Zellmembran zu transportieren, da sie intrazellulär wiedergefunden werden. Da die Enzyme ebenfalls intrazellulär vorliegen, ist dies ein enormer Vorteil, der die ganzzellkatalytische Umsetzung überhaupt erst möglich macht.

Es wird im Folgenden dargestellt, wie der bisher entwickelte, zweiphasige Bioprozess im Hinblick auf die Ausbeute und die Produktbildungsgeschwindigkeit optimiert wurde. In den folgenden Experimenten wurde nun stets bei einer Zelldichte von ca. 11 - 13 rel. AU (exponentielle Wachstumsphase) die anaerobe Phase eingeleitet, um die Experimente gut miteinander vergleichen zu können. Die Prozessvariablen und die Durchführung wurden, wenn nicht anders beschrieben, wie unter 4.3.5 dargestellt gewählt.

4.4 Prozessoptimierung

In den vorangegangenen Abschnitten wurde eingehend die erfolgreiche Entwicklung und Durchführung der ganzzellkatalytischen Umsetzung von Naringenin zu Phloretin im 2 L-Reaktor dargestellt. In den hier folgenden Abschnitten wurde der Prozess weiter optimiert. Der Prozessaufbau und die Durchführung blieben wie unter 4.3.5 beschrieben. Auf eine gesonderte Beschreibung wird daher verzichtet; nur wenn davon abgewichen wurde, wird dies erwähnt.

Der Fokus lag hier zunächst auf einer sogenannten OVAT-Optimierung (engl.: „one variable at a time“). Dabei werden kontrollierbare Faktoren, die das Ergebnis beeinflussen könnten, einzeln nacheinander optimiert. Kontrollierbare Faktoren sind z.B. die Temperatur oder die eingesetzte Konzentration einer Chemikalie. Die Luftfeuchtigkeit der Umgebung ist ein Beispiel für einen nur schwierig oder nicht zu kontrollierenden Faktor.

Zunächst werden beim OVAT-Verfahren ein oder mehrere Ziele der Optimierung festgelegt. Dann wird pro Experiment ein Faktor verändert. Die Ergebnisse mehrerer Experimente lassen schließlich einen Rückschluss auf den besten Wert für diesen Faktor im Hinblick auf die festgelegten Ziele zu.

Im konkreten Fall wurden zum einen eine möglichst große Ausbeute an Phloretin (Umsatz) und zum anderen eine möglichst rasche Produktbildung, also eine kurze Prozessdauer als Ziele gewählt. Als Faktoren, die darauf einen Einfluss ausüben können, wurden die IPTG-Konzentration, die Temperatur und die zu Beginn eingesetzte Naringeninkonzentration gewählt und nacheinander untersucht.

Bisher wurde zu Beginn der anaeroben Produktionsphase immer eine Temperatur von 25 °C, eine IPTG-Konzentration von 1 mM (Endkonzentration in der Kultur) und eine Naringeninkonzentration von 0,272 g/L (\approx 1 mM) eingesetzt. Daher wurden diese als Standardbedingungen definiert.

All diese Faktoren können die heterologe Expression und die anschließende Proteinfaltung und Enzymaktivität sowie den Stoffwechsel des Wirts wesentlich beeinflussen, weswegen diese Faktoren im Folgenden näher untersucht wurden [109].

4.4.1 Variation der IPTG-Konzentration

Als erster Faktor wurde die IPTG-Konzentration variiert und der Einfluss auf die Phloretin-Bildungsgeschwindigkeit und den Umsatz untersucht. Geklärt werden sollte, ob mit dem vorliegenden Konstrukt (*E. coli* CHI_ERED) eine höhere Induktorkonzentration automatisch zu einer höheren Enzymkonzentration und damit auch zu einer schnelleren Naringeninumsetzung führt. Eine höhere Induktorkonzentration kann sich aber auch inhibierend auf die Expression auswirken [109]. Daher wurden, im

Vergleich zu den Standardbedingungen, sowohl höhere als auch niedrigere IPTG-Konzentrationen getestet.

IPTG-Konzentrationen von 0,1 mM, 0,5 mM und 2 mM wurden untersucht und zusätzlich mit den Standardbedingungen verglichen (1 mM, siehe 4.3.7), so dass insgesamt vier verschiedene Bedingungen miteinander verglichen werden konnten. Die Flavonoidkonzentrationen wurden über HPLC und die Proteinexpression wurde mittels SDS-PAGE untersucht.

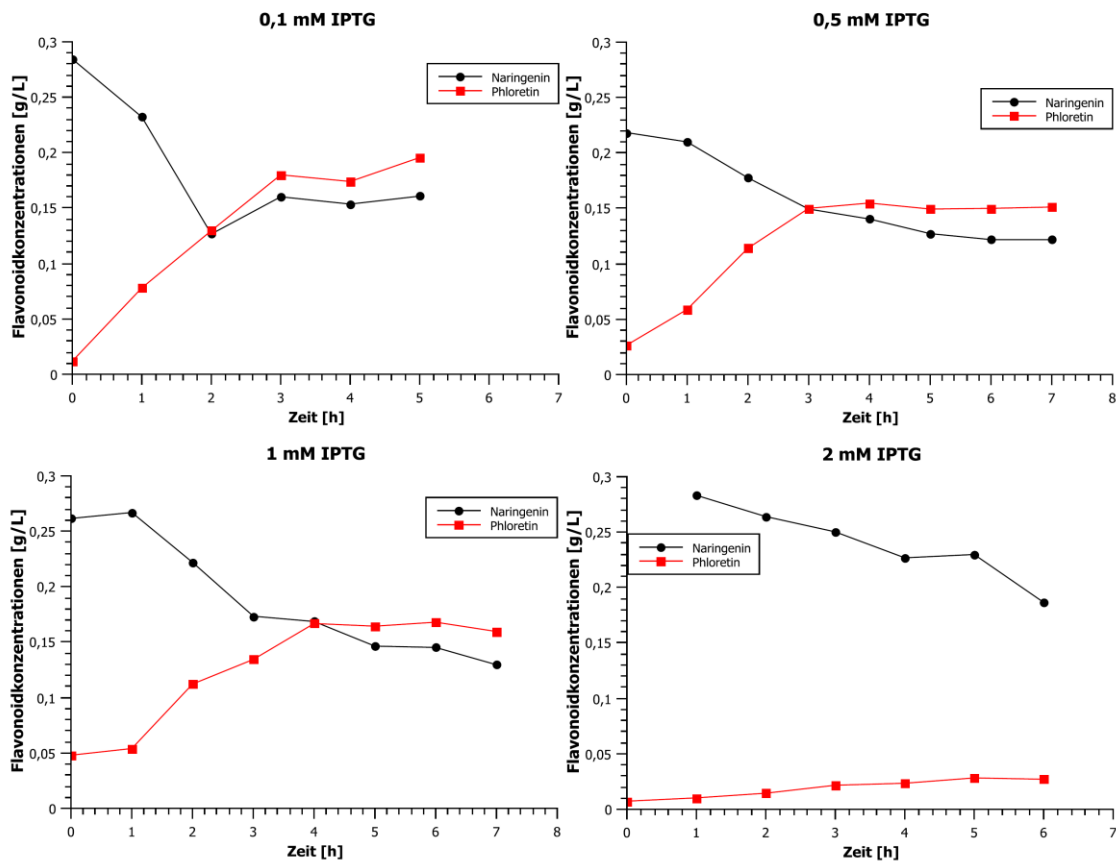


Abbildung 30: Verlauf der Flavonoidkonzentrationen von *E. coli* CHI_ERED mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen induziert.

Abbildung 30 zeigt die Verläufe der Flavonoidkonzentrationen der 4 verschiedenen Kultivierungen. Diese unterscheiden sich deutlich voneinander.

Bei einer IPTG-Konzentration von 0,1 mM (oben links) wurden bereits nach 3 h 0,18 g/L Phloretin erreicht, nach 5 h wurden insgesamt 0,2 g/L erreicht, was einem Umsatz von ca. 68% entspricht.

In der Biotransformation die mit 0,5 mM IPTG (oben rechts) induziert wurde, wurde nach 3 h eine Phloretinkonzentration von 0,15 g/L ermittelt, die dann konstant auf diesem Level blieb. Hier wurde ebenfalls ein Umsatz von ca. 68% ermittelt. Da sowohl Substrat als auch Produktkonzentration teilweise leicht unter den erwarteten Werten (ca. 0,27 g/L Naringenin eingesetzt) lagen, ist hier möglicherweise die Extraktion unvollständig verlaufen. Der Umsatz ist jedoch trotzdem errechnen- und vergleichbar, da beide Flavonoide gleichmäßig und gleichzeitig extrahiert wurden.

Bei der Kultivierung mit 1 mM IPTG (unten links und siehe auch 4.3.7) wurde erst eine Stunde später, nach 4 h, mit 0,17 g/L eine ähnliche Produktkonzentration erreicht. Der Umsatz betrug hier ca. 60%.

Wurde die IPTG-Konzentration auf 2 mM erhöht, wurde die Biokatalyse deutlich inhibiert. Nur eine sehr geringe Produktbildung von 0,028 g/L nach 5 h, entsprechend einem Umsatz von nur ca. 10% konnte beobachtet werden. Die Naringeninkonzentration sank im weiteren Verlauf verhältnismäßig stark um ca. 0,07 g/L, obwohl nicht äquivalent Phloretin gebildet wurde. Möglicherweise kristallisierte ein Teil im Kultivierungsverlauf wieder aus oder wurde chemisch degradiert.

Die Proteinexpression sah bei allen eingesetzten Konzentrationen sehr ähnlich aus. Keine eindeutige Überexpression der CHI oder der ERED war zu sehen. Es müssen aber aktive Enzyme vorgelegen haben, da sonst kein Umsatz beobachtet worden wäre. Trotz einer im Gel beobachteten geringen Expression zeigte sich eine hohe Phloretinbildung. Dies ist abermals ein Indiz für die wahrscheinlich sehr hohen Aktivitäten der beteiligten Enzyme. Für die beobachtete schwache Expression kann hier beispielhaft auf Abbildung 24 verwiesen werden. Die Gele der weiteren untersuchten Konzentrationen (0,1 mM, 0,5 mM und 2 mM IPTG) sind im Anhang unter 6.2.4 gezeigt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die IPTG-Konzentration die Phloretinbildungsgeschwindigkeit und den Umsatz stark beeinflusst. Eine geringere Konzentration zeigte hier bessere Ergebnisse als die bisher verwendeten Standardbedingungen von 1 mM IPTG. Sowohl bei Konzentrationen von 0,5 mM als auch von 0,1 mM IPTG wurde bei identischen weiteren Variablen bereits eine Stunde früher die maximale Phloretinkonzentration erreicht. Auch der beobachtete Umsatz stieg in beiden Fällen um ca. 8%. Wurde die IPTG-Konzentration auf 2 mM erhöht, wurde die Biotransformation stark inhibiert. Bezogen auf die Proteinexpression zeigte die gewählte IPTG-Konzentration aber in keinem Fall einen Einfluss.

Im Hinblick auf die gewählten Ziele (hoher Umsatz und schnelle Produktbildung) erwies sich daher eine IPTG-Konzentration von $\leq 0,5$ mM als am besten geeignet.

4.4.2 Variation der Temperatur

Als nächster Faktor der OVAT-Optimierung sollte der Einfluss der Temperatur auf die Produktbildung und den Umsatz untersucht werden. Hier wurden für die anaerobe Produktionsphase die Temperaturstufen 20 °C, 30 °C und 35 °C gewählt und zusätzlich mit den 25 °C der Standardbedingungen (siehe 4.3.7) verglichen. Für die Temperatur konnten also ebenfalls vier Kultivierungen miteinander verglichen werden. Da die aerobe Wachstumsphase in allen Fällen bei 25 °C durchgeführt wurde, wurde nach der Umstellung auf anaerobe Bedingungen kurz gewartet, bis die gewünschte Temperatur

erreicht war. Erst dann wurde induziert und Substrat zugegeben. Die anderen Variablen entsprachen den zuvor definierten Standardbedingungen (1 mM IPTG und 0,27 g/L Naringenin). Die Proteinexpression (SDS-PAGE) und die Flavonoidkonzentrationen (HPLC-Analytik) wurden untersucht.

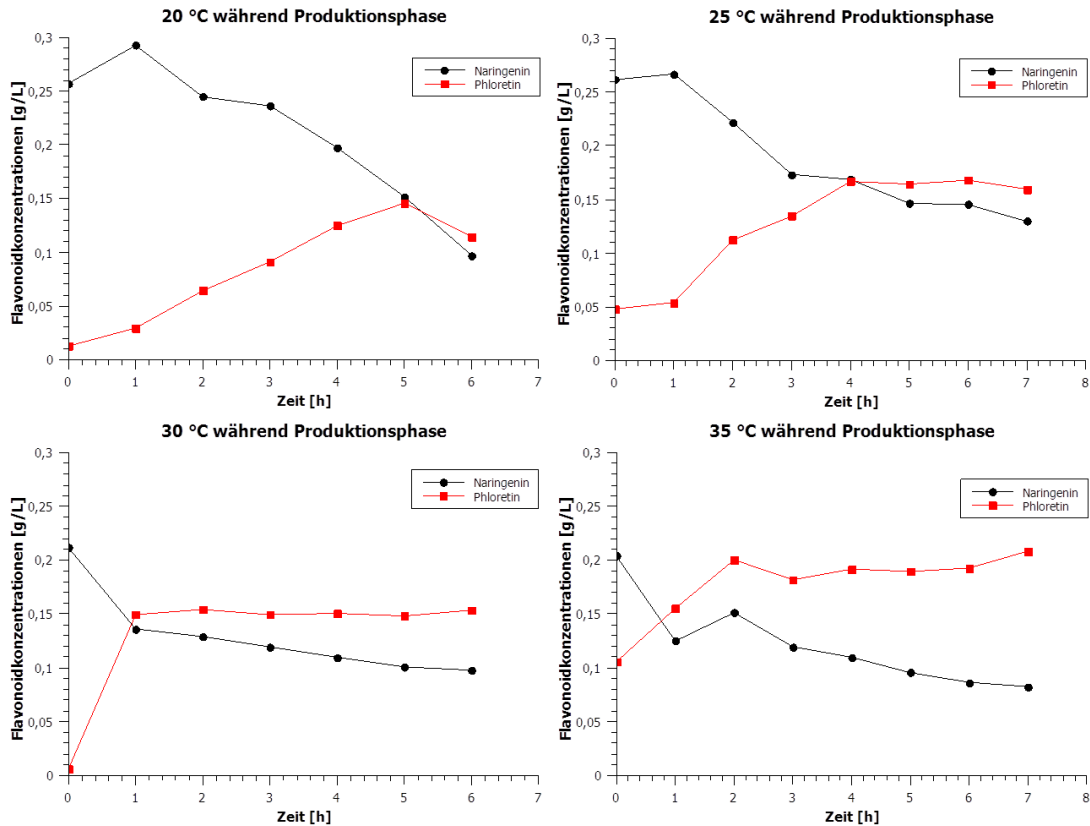


Abbildung 31: Verlauf der Flavonoidkonzentrationen während verschiedener Temperaturen in der anaeroben Produktionsphase mit *E. coli* CHI_ERED.

In Abbildung 31 sind die Verläufe der Naringenin- und Phloretinkonzentrationen zu sehen. Bei einer Temperatur von 20 °C (oben links) während der anaeroben Produktionsphase, erfolgte die Phloretinbildung verglichen mit der bisherigen Temperatur von 25 °C (oben rechts), deutlich langsamer. So wurde eine Phloretinkonzentration von 0,15 g/L erst mehr als eine Stunde später, nach 5 h erreicht. Der Umsatz betrug auch nur rund 44% (bei 25 °C: ca. 60%).

Wurde die Temperatur auf 30 °C erhöht, konnte eine deutlich schnellere Phloretinbildung beobachtet werden. Bereits nach 1 h wurden 0,15 g/L Phloretin erreicht. Dieser Wert blieb während des weiteren Verlaufs konstant, obwohl die Naringeninkonzentration gleichzeitig signifikant bis auf 0,1 g/L sank. Der Umsatz betrug hier ca. 57%.

Eine weitere Temperaturerhöhung auf 35 °C zeigte ein ähnliches Bild wie in der 30 °C Kultivierung. Nach 2 h, eine Stunde später als bei 30 °C, wurde eine konstante Phloretinkonzentration erreicht. Der Umsatz war mit ca. 59% ebenfalls vergleichbar. Es wurden maximal 0,2 g/L Produkt gebildet. Die Substratkonzentration nahm auch hier im weiteren Verlauf schneller ab, als die Produktkonzentration zunahm.

Möglicherweise wurde das Naringenin bei der erhöhten Temperatur verstärkt chemisch degradiert. Die Beobachtung könnte aber auch erklärt werden, wenn man davon ausgeht, dass das Phloretin degradiert und gleichzeitig eine ähnlich große Menge aus Naringenin umgesetzt wurde. Ein Phloretinabbau würde so nicht erkannt werden können, obwohl er stattfindet.

Betrachtet man nun die Proteinexpression, so wurde in den Gelen zu den bei 20 °C und bei 25 °C durchgeführten Biotransformationen, keine Überexpression beobachtet (vgl. Abbildung 24 und Anhang 6.2.4).

Die Gele der löslichen Fraktionen (Zelllysate) der Kultivierungen bei 30 °C (Abbildung 32) und bei 35 °C (Abbildung 33) zeigten eine deutliche Überexpression für die CHI (30 kDa).

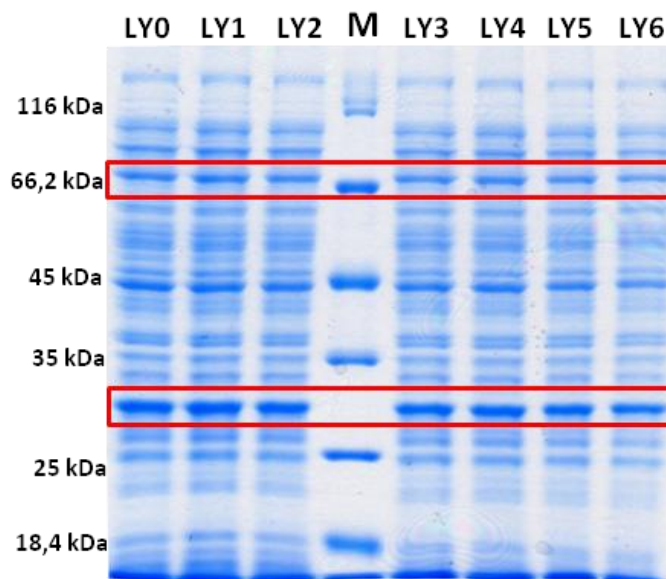


Abbildung 32: SDS-Gel der Zelllysate einer Biotransformation mit *E. coli* CHI_ERED während einer Temperatur von 30 °C in der anaeroben Produktionsphase. LY = Lysat, M = Marker. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.).

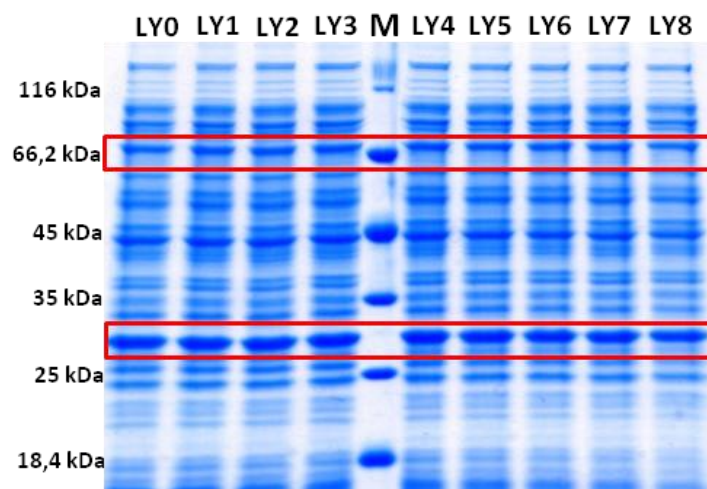


Abbildung 33: SDS-Gel der Zelllysate einer Biotransformation mit *E. coli* CHI_ERED während einer Temperatur von 35 °C in der anaeroben Produktionsphase. LY = Lysat, M = Marker. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.).

Ebenso ist im erwarteten Bereich der ERED bei 73 kDa eine markante Bande zu sehen, die jedoch nicht so stark ausgeprägt ist wie die der CHI. Trotzdem handelt es sich hier wahrscheinlich um die ERED. Interessanterweise ist bei beiden Temperaturen und beiden Enzymbanden bereits zum Zeitpunkt 0 h direkt zu Beginn eine Bande zu sehen. Dies spricht dafür, dass bereits vor der IPTG-Zugabe beide heterologen Enzyme exprimiert wurden. Möglicherweise ist der Promotor nur unzureichend reprimiert und undicht.

Generell kann gesagt werden, dass sich höhere Temperaturen (≥ 30 °C) positiv auf die Produktbildungsgeschwindigkeit und die Proteinexpression auswirkten. Der Umsatz scheint von der Temperatur weniger beeinflusst worden zu sein, da es nur geringe Unterschiede gab.

Als Zwischenfazit konnte also aus der OVAT-Optimierung der Faktoren „IPTG-Konzentration zur Induktion“ und „Temperatur in der anaeroben Produktionsphase“ geschlossen werden, dass sich niedrigere IPTG-Konzentrationen und höhere Temperaturen vor allem sehr positiv auf die Geschwindigkeit der Biotransformation auswirkten. Bei niedrigeren IPTG-Konzentrationen wurde auch auf den Umsatz ein positiver Effekt beobachtet. Die bisherigen Standardbedingungen einer IPTG-Konzentration von 1 mM und einer Temperatur von 25 °C wurden deshalb angepasst.

Die neuen Standardbedingungen, mit denen auch die folgenden Biotransformationen durchgeführt wurden, waren eine IPTG-Konzentration von 0,5 mM und eine Temperatur von 30 °C.

4.4.3 Optimieren der Substratkonzentration

Ziel der folgenden Experimente war, die ideale Naringeninkonzentration zu Beginn der anaeroben Produktionsphase zu definieren. Es sollte untersucht werden, ob eine möglichst hohe Substratkonzentration zu Beginn auch zu einer höheren Produktkonzentration führt. Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Enzyme eine sehr hohe Aktivität aufweisen. Daher könnte eine höhere Substratverfügbarkeit zu Beginn evtl. auch zu einer schnelleren und höheren Produktbildung führen.

Als Vorversuch, da Flavonoide sich negativ auf das Wachstum von Bakterien auswirken können [38], wurde *E. coli* CHI_ERED unter Zusatz von Naringenin (gelöst in DMSO, Konzentrationsbereich 0 – 10 mM) kultiviert. Die Zelldichte wurde photometrisch gemessen.

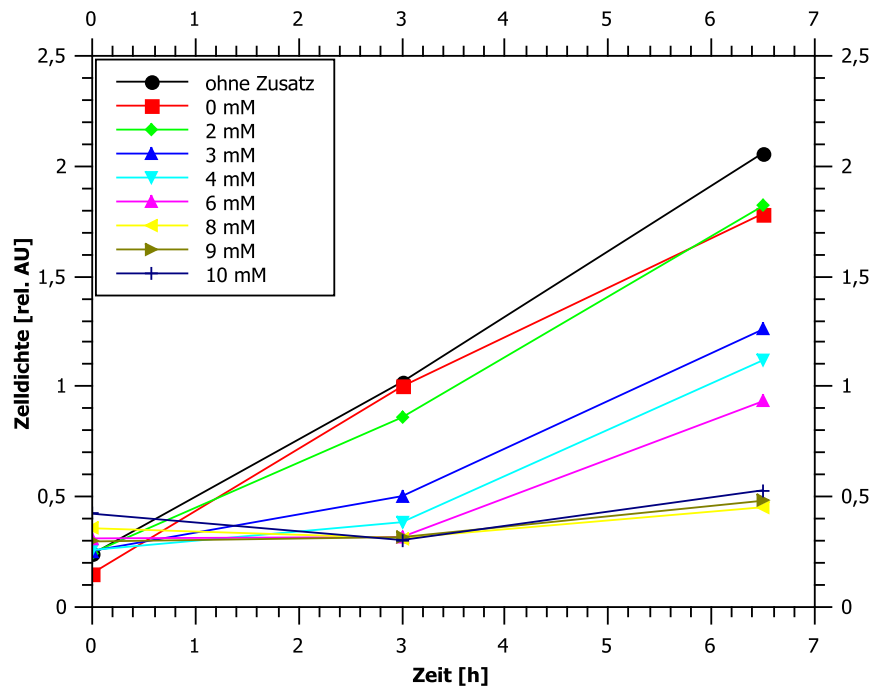


Abbildung 34: Verlauf der Zelldichten von *E. coli* CHI_ERED Kultivierungen unter Zusatz verschiedener Naringeninkonzentrationen.

Die Wachstumskurven sind in Abbildung 34 zu sehen. Die Kultivierungen ohne jeglichen Zusatz zeigten dabei das beste Wachstum (schwarze Kurve, Kreise). Kultivierungen, denen nur DMSO (rote Kurve, Quadrate) oder eine Konzentration von 2 mM Naringenin zugesetzt wurde (grüne Kurve, Rauten), zeigten ebenfalls ein gutes Wachstum. Bei Zusatz von 3, 4 und 6 mM Naringenin war das Wachstum bereits deutlich eingeschränkt, bei noch höheren Konzentrationen wuchsen die Kulturen gar nicht mehr.

Außerdem konnte beobachtet werden, dass das in DMSO gelöste Naringenin bei Konzentrationen von > 4 mM deutlich direkt nach der Zugabe zum Medium in Form von Kristallen ausfiel. Es scheint generell schwierig zu sein, so hohe Konzentrationen (4 mM entsprechen ca. 1,08 g/L) überhaupt in wässrigen Medien zu lösen, bzw. gelöst zu halten. Konzentrationen von >4 mM wurden daher in den folgenden Reaktorversuchen nicht weiter untersucht.

Die im Reaktor durchgeführten Biotransformationen erfolgten mit den neuen Standardbedingungen (0,5 mM IPTG zur Induktion und 30 °C während der Produktionsphase). Naringeninkonzentrationen von 1 mM ($\approx 0,27$ g/L), 2 mM ($\approx 0,54$ g/L), 3 mM ($\approx 0,81$ g/L) und 4 mM ($\approx 1,08$ g/L) wurden untersucht, so dass 4 verschiedene Konzentrationen verglichen werden konnten.

Die Flavonoidkonzentrationen wurden über HPLC und die Proteinexpression wurde mittels SDS-PAGE untersucht.

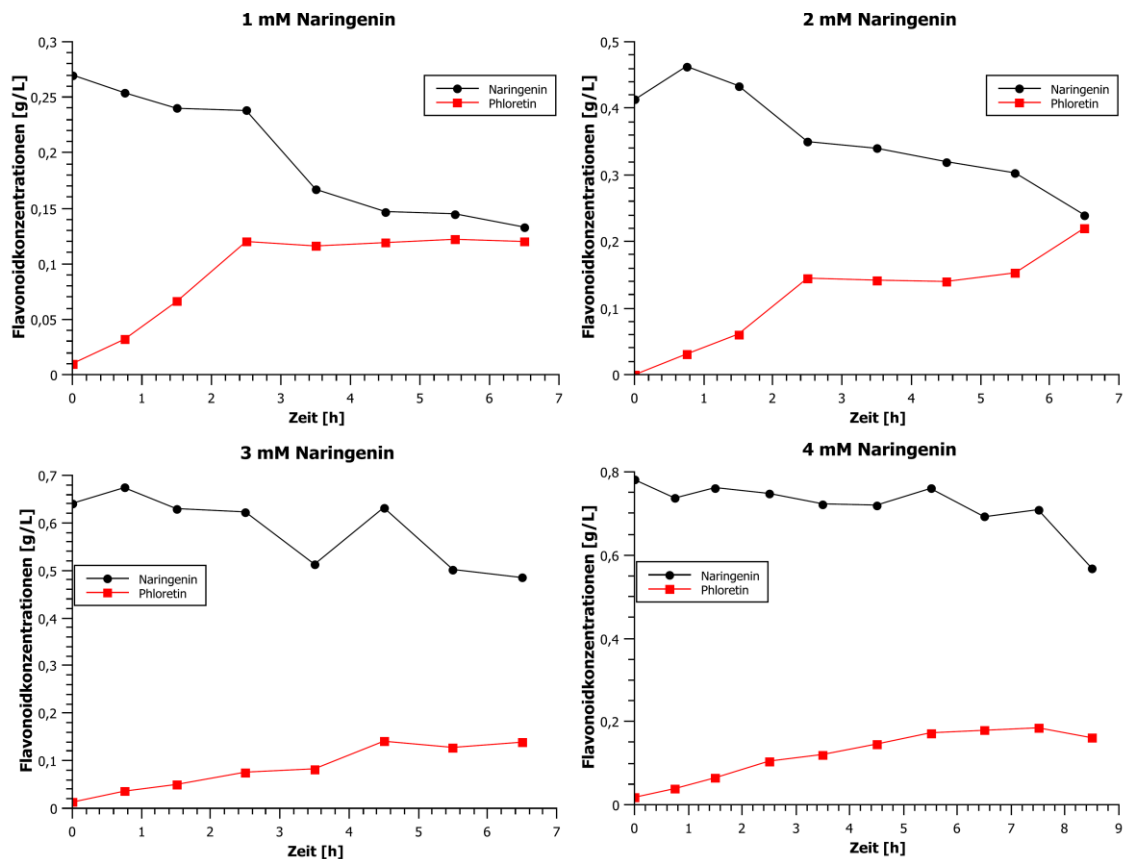


Abbildung 35: Verlauf der Flavonoidkonzentrationen bei verschiedenen initialen Substratkonzentrationen.

Die Konzentrationsverläufe sind in Abbildung 35 zu sehen. Generell lagen die gemessenen Konzentrationen für alle Kultivierungen ≥ 2 mM leicht unter den eingewogenen Werten. Die Extraktion könnte hier unvollständig verlaufen oder ein Teil des Substrats aus der Lösung auskristalliert sein.

Eine höhere eingesetzte Substratkonzentration führte nicht zu einer höheren oder schnelleren Produktbildung. Die höchsten Phloretinwerte von bis zu 0,22 g/L wurden in der Kultivierung gemessen, in der 2 mM (0,54 g/L) Substrat eingesetzt wurden. Bei höheren Konzentrationen wurde die Umsetzung gehemmt, da hier eine viel langsamere Produktbildung beobachtet wurde. Zwar wurden ähnliche finale Konzentrationen (0,14 g/L bzw. 0,18 g/L Phloretin) gemessen, diese wurden aber viel später erreicht. Betrachtet man die Umsätze, so wurden bei 1 mM und 2 mM Naringeninzusatz ca. 50% des eingesetzten Naringenins auch zu Phloretin umgesetzt. Im Fall von 3 mM und 4 mM Naringeninzusatz lag der Umsatz bei nur ca. 20%.

Betrachtet man die Proteinexpression, zeigte sich in allen Kultivierungen ein sehr ähnliches Bild. Exemplarisch sind in Abbildung 36 die Gele der Kultivierung mit 1 mM Naringenin gezeigt, die anderen Gele sind im Anhang unter 6.2.4 zu finden.

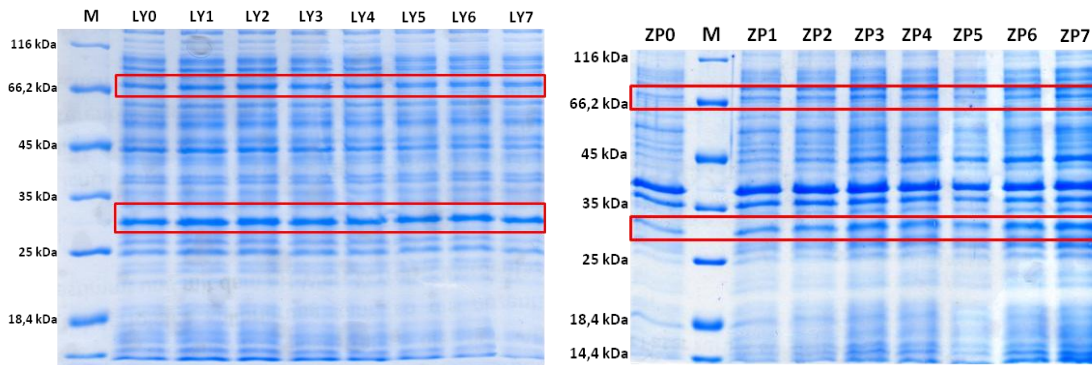


Abbildung 36: SDS-Gele der Kultivierung mit 1 mM Naringenin in der anaeroben Produktionsphase. Links Zellysate, rechts Zellpellets. M = Marker, LY = Zellysate, ZP = Zellpellet. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.).

Sowohl im Zellysate (links) als auch in den Zellpellets (rechts) wurde die CHI deutlich exprimiert (30 kDa). Die ERED bei 73 kDa ist ebenfalls zu sehen, allerdings wurde sie weniger stark exprimiert als die CHI. Auch hier sind die Enzyme schon direkt zum Zeitpunkt 0 h zu sehen, was dafür spricht, dass bereits vor der IPTG-Zugabe eine Expression stattgefunden hatte.

Als ideale, zu Beginn der anaeroben Phase einzusetzende Substratkonzentrationen haben sich 2 mM, bzw. ca. 0,54 g/L erwiesen. Damit konnten die bisher höchsten Phloretinkonzentrationen von 0,22 g/L erreicht werden. Bedenkt man außerdem, dass die gemessenen Werte leicht unter den eingewogenen lagen, da die Extraktion wahrscheinlich unvollständig verlief, waren die tatsächlichen Phloretinkonzentrationen möglicherweise noch höher. Die Produktbildung erfolgte dabei ähnlich schnell wie mit 1 mM (0,27 g/L). Höhere Substratkonzentrationen verlangsamten die Produktbildung deutlich und resultierten auch nicht in höheren Produktkonzentrationen.

Als Standardbedingungen wurden daher 0,54 g/L (2 mM) Naringenin, statt wie bisher 0,27 g/L, gewählt.

4.4.4 Zusammenfassung der OVAT-Optimierung

Insgesamt wurden drei Faktoren im Rahmen der OVAT-Optimierung optimiert. Als Zielgrößen wurden eine schnelle Produktbildung und ein möglichst hoher Umsatz gewählt.

Für die IPTG-Konzentration zur Induktion wurden vier verschiedene Konzentrationen miteinander verglichen. Hier konnte ein Wert von $\leq 0,5$ mM als optimal ermittelt werden. Es wurde hier mit 0,5 mM weitergearbeitet, da die Umsätze und die Reaktionszeit bei 0,5 mM und 0,1 mM IPTG nahezu identisch waren. Die Proteinexpression wurde nicht beeinflusst, alle SDS-Gele sahen sehr ähnlich aus und zeigten keine Überexpression der Enzyme.

Für den Faktor „Temperatur in der anaeroben Produktionsphase“ konnten ebenfalls vier verschiedene Kultivierungen miteinander verglichen werden. Eine Temperatur von 30 °C zeigte die besten Ergebnisse in Bezug auf die Zielgrößen. Hier wurde außerdem auch die Proteinexpression (SDS-Gel) stark beeinflusst. Bei Temperaturen von 30 °C und 35 °C konnte eine gute Expression sowohl für die CHI als auch für die ERED nachgewiesen werden.

Bereits mit teilloptimierten Prozessvariablen (Produktionsphase bei 30 °C, 0,5 mM IPTG) wurde die ideale Naringeninkonzentration zum Beginn der Produktionsphase bestimmt. Da sich höhere Konzentrationen in Vorversuchen als wachstumshemmend erwiesen, wurden hier Konzentrationen im Bereich von 0,27 - 1,08 g/L untersucht. Höhere Konzentrationen als 0,54 g/L führten dabei nicht zu einer schnelleren oder höheren Produktbildung, teilweise wirkten sie sogar inhibierend auf die Biotransformation. Daher wurden 0,54 g/L als ideale Konzentration festgelegt.

Mit diesen optimierten Bedingungen (0,5 mM IPTG, 30 °C, 0,54 g/L Naringenin) wurden nun weitere Versuche zur Prozessoptimierung durchgeführt. Diese sind in den nächsten Kapiteln beschrieben.

4.4.5 Testung eines alternativen Nährmediums für die Biotransformation

Um den Einfluss des Mediums bzw. der Zelldichte zu untersuchen, wurde die Biotransformation in LB-Medium durchgeführt. Unter aeroben Bedingungen im Schüttelkolbenmaßstab wurde in LB-Medium eine gute Expression beobachtet (siehe 4.3.4). Allerdings können in LB-Medium nur geringere Zelldichten erreicht werden. Deswegen musste hier bei einer Zelldichte von 5 rel. AU die anaerobe Produktionsphase eingeleitet werden, um noch mit Zellen arbeiten zu können, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Es wurde mit den zuvor definierten Standardbedingungen (0,5 mM IPTG, 30 °C, 0,54 g/L Naringenin) gearbeitet.

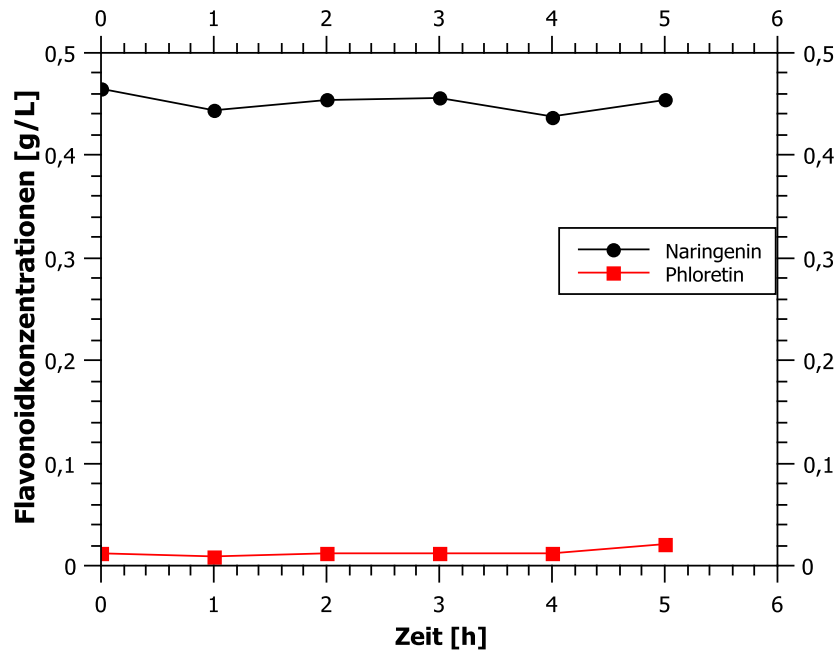


Abbildung 37: Verlauf der Flavonoidkonzentrationen einer Biotransformation in LB-Medium.

Aus Abbildung 37 wird ersichtlich, dass nur extrem wenig Phloretin gebildet wurde. Da LB-Medium wesentlich weniger Nährstoffe als TB-Medium enthält, war die Zelldichte, die zur Induktion knapp 2,5-fach niedriger war als in vergleichbaren Biotransformationen mit TB-Medium, hier möglicherweise entscheidend. Ebenso könnte ein Mangel an bestimmten Nährstoffen unter anaeroben Bedingungen deutlichere Auswirkungen zeigen, da *E. coli* bei Sauerstoffmangelbedingungen seinen kompletten Stoffwechsel umstellt (siehe 3.2.1.1). In der SDS-PAGE war nur eine geringe Expression der CHI zu sehen, die ERED wurde nicht sichtbar exprimiert (siehe Anhang 6.2.4). Obwohl LB-Medium kostengünstiger und schneller zu präparieren ist, sollte weiterhin TB-Medium verwendet werden, da geringere Zelldichten (5 rel. AU vs. 12 rel. AU) anscheinend für eine gute Umsetzung nicht ausreichend waren.

4.4.6 Aufskalierung des Prozesses auf 10 L Volumen

Im Hinblick auf eine industrielle Produktion wurde untersucht, wie sich der Bioprozess mit der zweiphasigen Prozessführung bei einer Maßstabsvergrößerung verhält. Als Reaktor wurde ein Edelstahlrührkessel (BIOSTAT C, Sartorius AG) mit 10 L Kulturvolumen verwendet. Die technische Durchführung erfolgte wie unter 4.3.5 beschrieben, als Prozessbedingungen wurden die optimierten Standardbedingungen verwendet. Im Gegensatz zu den Experimenten im 2 L-Rührkessel konnte hier während der aeroben Phase nur mit 1,5 vvm begast werden, bevor über einen Wechsel auf Stickstoffbegasung die anaerobe Phase eingeleitet wurde. Daher wurde zuvor eine Wachstumskurve aufgenommen, um das Wachstumsverhalten und den idealen Zeitpunkt zum Start der Produktionsphase einschätzen zu können. Das

Wachstumsverhalten und die erreichbaren Zelldichten waren vergleichbar zum 2 L Rührkesselreaktor (siehe Anhang 6.2.5). Bei 12 rel. AU wurde, während sich die Kultur in der exponentiellen Phase befand, auf anoxische Bedingungen gewechselt, induziert und Substrat zugegeben. Die Proteinexpression wurde mittels SDS-PAGE und die Flavonoidkonzentration über HPLC untersucht.

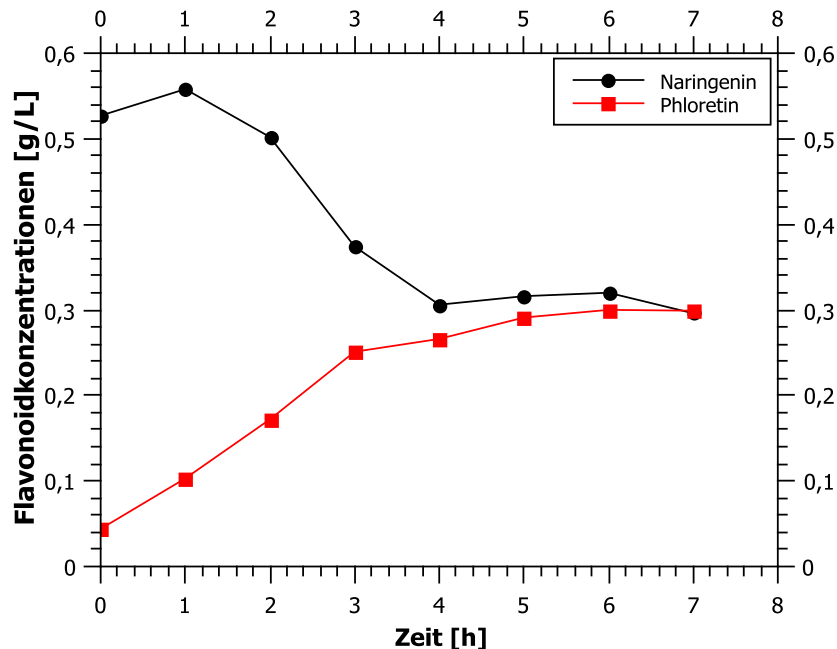


Abbildung 38: Verlauf der Flavonoidkonzentrationen während einer Biotransformation mit *E. coli* CHI_ERED im 10 L Maßstab.

Der Verlauf der Substrat- und Produktkonzentrationen über die Zeit ist in Abbildung 38 zu sehen. Insgesamt ist ein ähnlicher Verlauf wie im 2 L-Maßstab beobachtet worden. Nach 3 h wurde eine Phloretinkonzentration von 0,25 g/L erreicht, die im weiteren Verlauf noch langsam auf 0,3 g/L anstieg. Damit konnte die bisher höchste Phloretinkonzentration überhaupt gemessen werden. Der Umsatz lag bei ca. 57%.

In der SDS-PAGE war interessanterweise nur eine sehr schwache Expression der CHI in der löslichen Fraktion zu sehen (Anhang 6.2.4). Die ERED war gar nicht zu sehen. Dies spricht abermals dafür, dass die Enzyme hohe Aktivitäten besitzen.

Die zweiphasige Prozessführung konnte damit sehr erfolgreich auf den 10 L-Maßstab übertragen werden.

4.4.7 Testung eines Beutelreaktorsystems für die Prozessführung

Da in Kapitel 4.1 gezeigt werden konnte, dass das Einweg-Beutelreaktorsystem sehr gut für eine anaerobe Kultivierung geeignet ist, sollte hier untersucht werden, ob es auch während der anaeroben Produktionsphase des mit *E. coli* CHI_ERED entwickelten Prozesses vorteilhaft wäre. Neben den Vorteilen unter anaeroben Bedingungen (Schutzgas-Atmosphäre) kommen die generellen Vorteile des Systems hinzu. So muss

kein Entschäumer eingesetzt werden und Präparationszeit und –aufwand sind deutlich geringer. Es wurde mit 7,5 L Kulturvolumen und den Standardbedingungen während der anaeroben Produktionsphase gearbeitet. Die Begasungsrate während der aeroben Wachstumsphase lag bei 1 vvm. Im Vergleich zu den unter 4.2.2 beschriebenen Kultivierungen, wo mit maximal 0,1 L/Min begast werden konnte, war hier ein leistungsfähigerer Massendurchflussregler verbaut worden, so dass wesentlich höhere Begasungsraten möglich wurden.

Ab einer Zelldichte von ca. 8 rel. AU zeigte sich jedoch ein verlangsamtes Wachstum aufgrund einsetzender Sauerstofflimitierung. Daher wurde zu diesem Zeitpunkt die anaerobe Produktionsphase gestartet. Damit lag die Zelldichte unter den bisherigen Kultivierungen (12 - 13 rel. AU beim Wechsel auf anoxische Bedingungen). Die Zellen befanden sich aber noch in der Wachstumsphase und waren entsprechend vital.

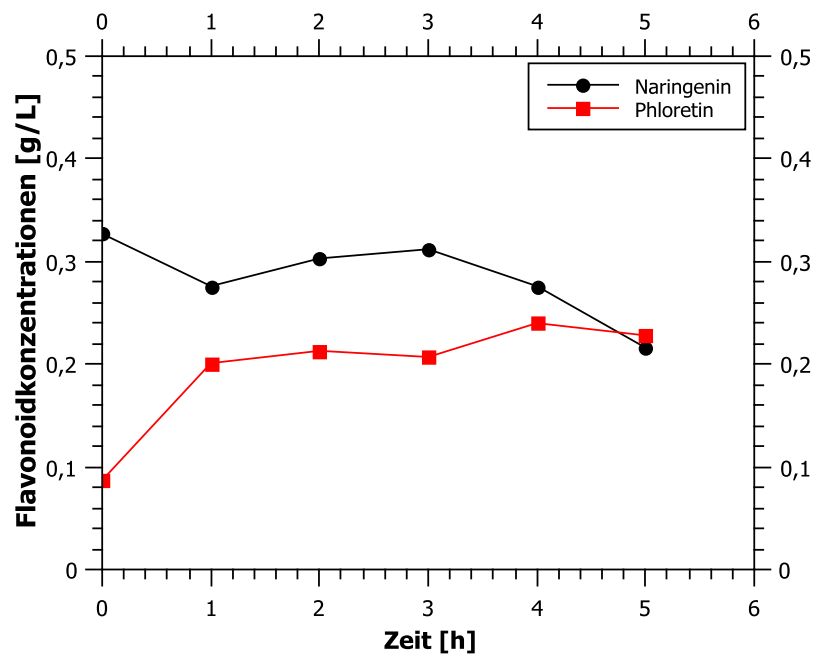


Abbildung 39: Verlauf der Flavonoidkonzentrationen einer Biotransformation mit *E. coli* CHI_ERED unter Standardbedingungen im Beutelreaktorsystem mit 7,5 L Medium

In Abbildung 39 ist zu sehen, dass bereits nach einer Stunde im Beutelreaktor eine nahezu konstant bleibende Phloretinkonzentration erreicht wurde. Möglicherweise lagen die tatsächlichen Konzentrationen noch höher, da keine vollständige Extraktion bei der Probenanalytik erreicht wurde (0,54 g/L Naringenin wurden eingewogen). Ebenso konnte ein hoher Umsatz von ca. 69% erreicht werden.

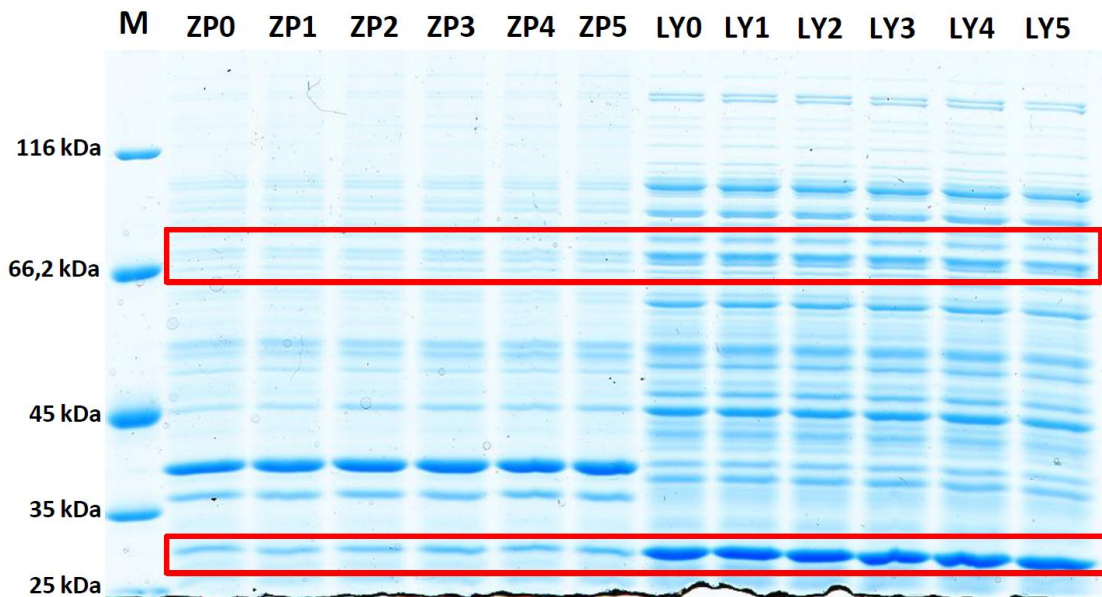


Abbildung 40: SDS-Gele einer Biotransformation mit *E. coli* CHI_ERED unter Standardbedingungen im Beutelsystem. M = Marker, ZP = Zellpellet, LY = Zelllysate. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (ZP0 = 0 h, ZP1 = 1 h, LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.).

Betrachtet man die Proteinexpression (Abbildung 40), ist zu sehen, dass CHI (30 kDa) löslich überexprimiert worden ist. Im Bereich der ERED waren mehrere Proteine zu sehen, so dass die ERED Bande nicht eindeutig zugeordnet werden konnte.

Insgesamt konnte im Beutel also eine sehr gute Biotransformation nachgewiesen werden, obwohl die erreichte Zelldichte während der aeroben Wachstumsphase geringer war als in Rührkesselreaktoren. Der Beutelsystem stellt somit für die biokatalytische Herstellung von Phloretin eine gute Alternative zu klassischen Rührkesseln dar, da der nicht so gute Sauerstoffeintrag bei höheren Zelldichten hier durch die anaerobe Produktion keinen Nachteil darstellt. Die Biotransformation lief hier sogar schneller ab als zuvor, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass kein Entschäumer eingesetzt werden musste.

4.4.8 Herunterskalierung des Bioprozesses auf 200 mL

Als nächstes wurde der zweiphasige Prozess in den Schüttelkolbenmaßstab auf 200 mL herunterskaliert („Downscale“). Bisher musste für die Umsetzungsversuche immer ein Reaktor vorbereitet werden, was aufgrund der aufwändigen Präparation und der anschließenden Reinigung verhältnismäßig zeitintensiv ist. Könnte die Umsetzung im Schüttelkolbenmaßstab durchgeführt werden, wären deutlich mehr Versuche in derselben Zeit möglich. Weitere Optimierungen wären so in kürzerer Zeit und mit einer höheren statistischen Belastbarkeit möglich.

Um den Wechsel auf anaerobe Bedingungen durchführen zu können, musste zwischendurch das Gefäß gewechselt werden, da Schüttelkolben nicht einfach luftdicht verschlossen werden können. Hierfür wurde die Kultur steril nach der (aeroben)

Wachstumsphase im Schüttelkolben in eine anoxisch präparierte Druckausgleichsflasche überführt. Eine aerobe Kultivierung in diesen Flaschen ist nicht möglich, da keine Schikanen vorhanden sind und diese Flaschen luftdicht verschlossen werden. Daher war der Gefäßwechsel zwingend erforderlich. Da der Sauerstoff in der Kultur nicht wie im Reaktor mit Stickstoff ausgetrieben werden konnte, wurde nach der Überführung einige Minuten gewartet, so dass der verbliebende Sauerstoff durch die Kultur veratmet wurde. Erst dann wurde induziert und Substrat zugegeben. Um eine Durchmischung zu gewährleisten, wurden die Kulturen auch in der anaeroben Phase geschüttelt (150 rpm).

Um das Wachstumsverhalten von *E. coli* CHI_ERED im Schüttelkolben in TB-Medium und den idealen Zeitpunkt zum Start der Produktionsphase einschätzen zu können, wurden zuvor Wachstumskurven aufgenommen (siehe Anhang 6.2.5). So konnte die anaerobe Produktionsphase immer bei einer Zelldichte von 11 – 13 rel. AU während der exponentiellen Wachstumsphase eingeleitet werden. Es wurde mit den definierten Standardbedingungen gearbeitet (30 °C, 0,5 mM IPTG, 0,54 g/L Naringenin). Die Flavonoidkonzentrationen wurden über HPLC und die Proteinexpression mittels SDS-PAGE untersucht.

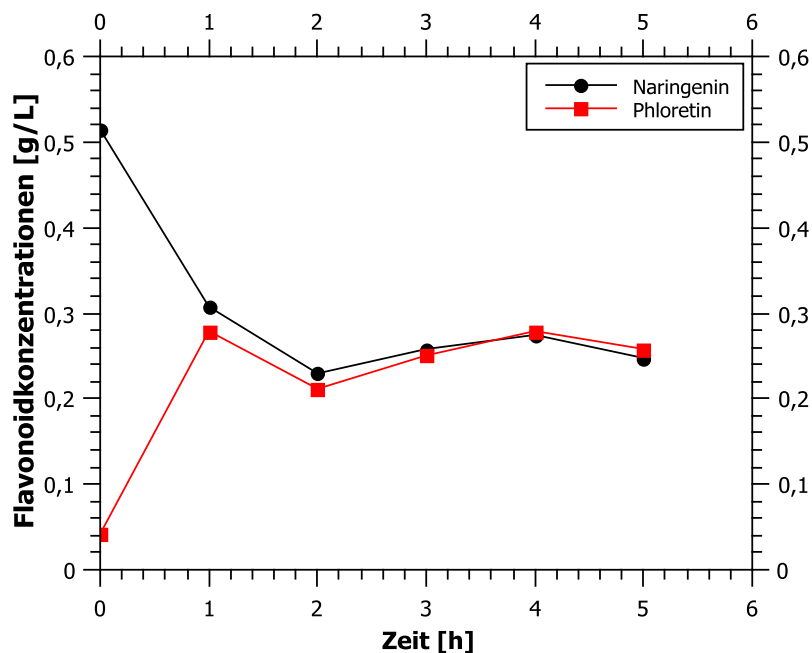


Abbildung 41: Verlauf der Flavonoidkonzentrationen während einer Umsetzung mit *E. coli* CHI_ERED im 200 mL-Maßstab.

Abbildung 41 zeigt den Verlauf der Substrat- und Produktkonzentrationen im 200 mL Maßstab. Es ist eine extrem schnelle Phloretinbildung zu sehen. Bereits nach nur einer Stunde wurde eine im weiteren Verlauf nahezu konstante Konzentration von 0,28 g/L gemessen. Dies war die bisher kürzeste Zeit, in der ein konstanter Produktlevel erreicht werden konnte. Nur im Beutelreaktor (Kapitel 4.4.7) wurde eine ähnlich schnelle Umsetzung beobachtet. Da in den Flaschen ebenfalls kein Entschäumer zugesetzt

werden musste, könnten die schnellen Umsetzungen möglicherweise darauf zurückgeführt werden. Die Ausbeute betrug ca. 50%. Auch eine mehrfache Wiederholung des Experiments bestätigte diese schnelle Produktbildung. Betrachtet man die Proteinexpression (Abbildung 42), ist zu sehen, dass eine sehr starke Überexpression der CHI vorlag.

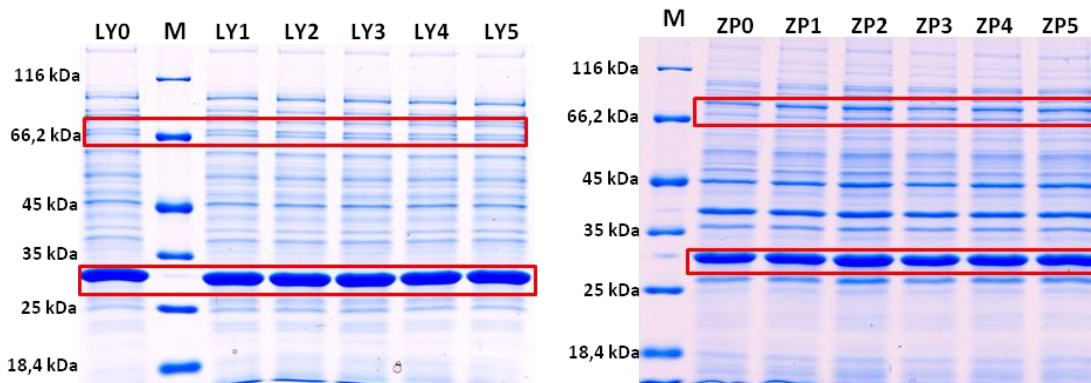


Abbildung 42: SDS-Gele der Umsetzung im 200 mL Maßstab. Links lösliche Fraktionen, rechts unlösliche Fraktionen. M = Marker, LY = Zelllysat, ZP = Zellpellet. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (ZP0 = 0 h, ZP1 = 1 h, LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.).

Eine so starke Überexpression der CHI ist bisher unter anaeroben Bedingungen nicht beobachtet worden. Die ERED ist deutlich schwächer gebildet worden, nur in der unlöslichen Fraktion (rechts) ist eine leichte Überexpression zu erkennen. In den löslichen Fraktionen (links) ist dagegen nur eine sehr schwache Expression der ERED zu sehen. Das Downscaling wirkte sich anscheinend sehr positiv auf die CHI-Expression aus.

Die sehr schnelle Produktbildung ist möglicherweise auf die erhöhte Verfügbarkeit von löslicher CHI zurückzuführen. Auffallend war, dass auch hier, wie bereits zuvor teilweise beobachtet, schon vor der Induktion heterologes Protein vorlag. Ein weiterer Hinweis, dass der Promotor nicht ausreichend reprimiert wurde.

Der zweiphasige Prozess konnte sehr erfolgreich auf den 200 mL Maßstab herunterskaliert werden. Dadurch waren wesentlich mehr Experimente in kürzerer Zeit möglich. Dies eröffnete die Möglichkeit, genauere und belastbarere Optimierungen durchzuführen. Im nächsten Abschnitt wird eine solche Optimierung dargestellt.

4.4.9 „Design of Experiments“: Prozessoptimierung im 200 mL Maßstab

Durch das erfolgreiche Downscaling und die resultierende Zeitersparnis konnte ein wesentlich genaueres und statistisch belastbareres Optimierungsverfahren angewendet werden. Das sogenannte „Design of Experiments“ (DoE) ist ein Verfahren zur statistischen Versuchsplanung. Das Ziel eines DoE ist, mit möglichst wenigen Versuchen möglichst viele Informationen über die Einflussfaktoren auf das Versuchsergebnis zu erhalten. Dazu werden Faktoren innerhalb einer Messreihe systematisch zusammengestellt, variiert und untersucht. In der Literatur findet sich eine

Vielzahl verschiedener Versuchspläne, auch Designs genannt, die als Vorlage dienen können. Diese Designs unterscheiden sich hauptsächlich in der Anzahl der durchzuführenden Experimente und der resultierenden statistischen Sicherheit. Je nach Anzahl der zu variierenden Faktoren und der Komplexität der Problematik und Durchführung wird ein passendes Design ausgewählt [110, 111].

Im Gegensatz zu einer OVAT-Optimierung werden Optimierungsprozesse wesentlich beschleunigt und die tatsächlichen Optima zuverlässiger und mit einer höheren statistischen Belastbarkeit ermittelt. Ebenso können in einem DoE Wechselwirkungen zwischen den variierten Faktoren, also sich gegenseitig beeinflussende Faktoren, erkannt werden. Mit einer OVAT-Optimierung können solche Wechselwirkungen nicht erkannt werden. Allerdings wird für ein DoE eine größere Anzahl an Versuchen benötigt als für eine OVAT-Optimierung. Deswegen war das erfolgreiche Downscaling die Voraussetzung, um ein DoE durchführen zu können.

Als Zielgrößen wurden auch hier eine möglichst hohe Ausbeute und eine möglichst kurze Reaktionszeit, also eine schnelle Produktbildung definiert. Als zu variierende Faktoren wurden die IPTG-Konzentration zur Induktion, die Temperatur und der Zeitpunkt der Substratzugabe (nach Induktion) gewählt. Bisher wurde das Substrat immer direkt zusammen mit dem IPTG zugegeben. Ein möglicherweise besserer Zeitpunkt dafür sollte so ermittelt werden. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die Faktoren und die Bereiche über die sie variiert wurden.

Tabelle 2: Faktoren und variierte Bereich im DoE im 200 mL Maßstab.

Faktor	Bereich
Temperatur	25 °C, 31 °C und 37 °C
IPTG-Konzentration	0,1 mM, 0,5 mM und 1 mM
Zeitpunkt der Substratzugabe	0 h, 2 h und 4 h nach Induktion

Als Design für den Versuchsplan wurde ein sogenanntes Box-Behnken-Design ausgewählt. Dieses stellte im vorliegenden Fall einen guten Kompromiss zwischen einer hohen statistischen Belastbarkeit der Ergebnisse und der Anzahl der durchzuführenden Versuche dar. Insgesamt wurden 14 Versuche durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm MODDE (Fa. Umetrics, Schweden). Genauere Erläuterungen zum Versuchsplan, der Durchführung und der anschließenden mathematischen Auswertung sind im Anhang unter 6.2.6 zu finden.

Auf den nächsten Seiten sind die aus der Auswertung gewonnenen „Response-Surface-Plots“ dargestellt. Diese stellen das Ergebnis des DoE anschaulich dar. Der Zeitpunkt der Substratzugabe zeigte keinen Einfluss auf die Zielgrößen und floss deshalb nicht als Faktor in die Berechnungen und Modelle ein.

Im ersten Plot (Abbildung 43) ist das Ausbeutemodell dargestellt. Die roten Bereiche zeigen eine hohe Ausbeute, die grünen Bereiche eine geringe Ausbeute an. Auf der Y-Achse ist die Ausbeute, auf der X- und der Z-Achse sind die Faktoren aufgetragen. Es ist deutlich zu sehen, dass die höchsten Ausbeuten bei einer Temperatur von 30 °C bis 32 °C und einer IPTG-Konzentration von 0,1 mM erreicht werden. Im 3D-Plot ist dort ein deutlicher roter „Gipfel“ zu sehen, d.h. dort sind die Ausbeuten rechnerisch am höchsten. Es konnten jedoch keine höheren Ausbeuten als in vorherigen Experimenten erreicht werden. Bisher lagen die Ausbeuten in allen Versuchen bei max. ca. 65 – 68%.

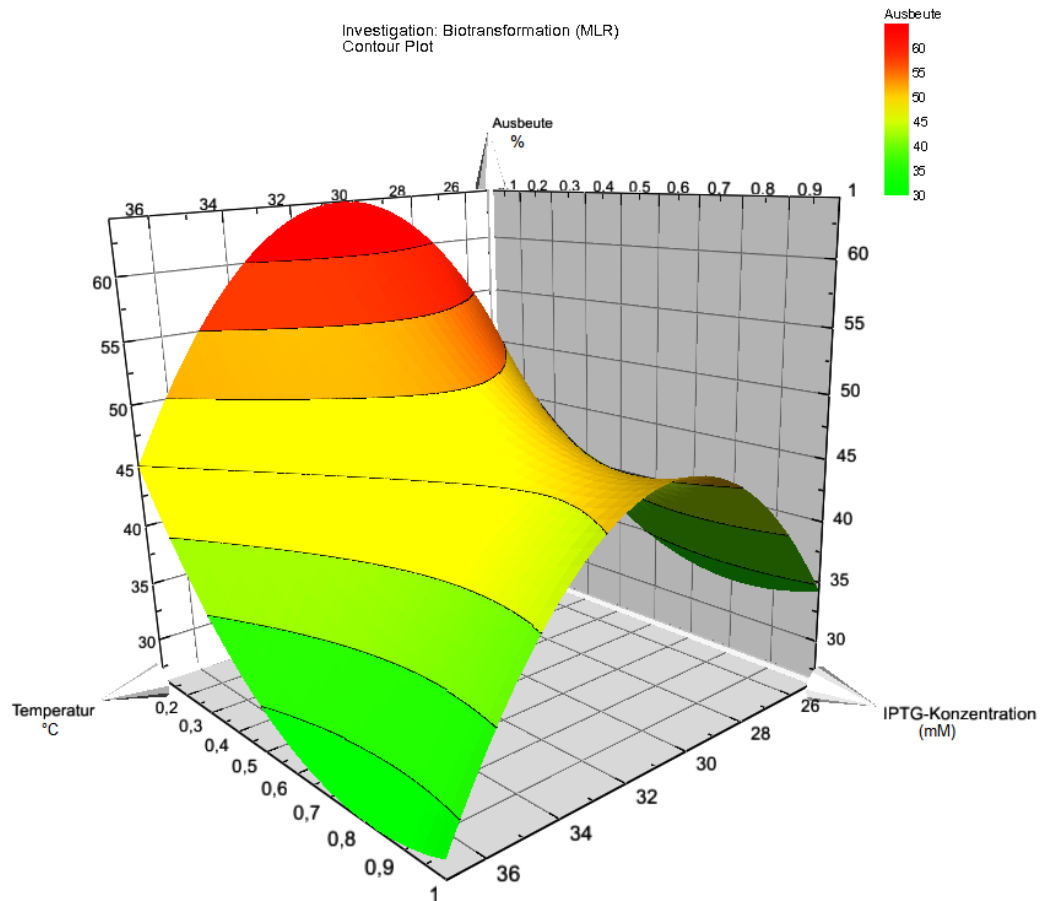


Abbildung 43: "Response-Surface-Plot" mit der Ausbeute als Zielgröße. Auf der Y-Achse ist die Ausbeute in % aufgetragen (30 - 65%). Auf der X-Achse sind die IPTG-Konzentrationen (0,1 - 1 mM) und auf der Z-Achse die Temperaturen (37 - 25 °C) aufgetragen.

Im zweiten 3D-Plot ist das Reaktionszeitmodell dargestellt (siehe Abbildung 44). Da in allen Versuchen kein höherer Umsatz als bestenfalls ca. 65% beobachtet wurde, wurde auf die Reaktionszeit hin optimiert. Dies ist die Zeit, bis eine konstante Phloretinkonzentration vorlag (bzw. ein sich nicht weiter verbessernder Umsatz). Die roten Bereiche im 3D-Plot stehen für eine lange Reaktionszeit, die grünen Bereiche für eine kurze. Weil eine möglichst schnelle Reaktion erwünscht ist, zeigen die grünen Bereiche hier die besten Bedingungen an.

Es ist gut zu sehen, dass bei einer Temperatur zwischen 31 °C und 33 °C die Reaktionszeit am kürzesten ist. Wird die Temperatur verringert, steigt die Reaktionszeit deutlich an. Die IPTG-Konzentration hat auf die Reaktionszeit keinen Einfluss, über den gesamten beobachteten Bereich (0,1 – 1 mM) zeigten sich keine Unterschiede.

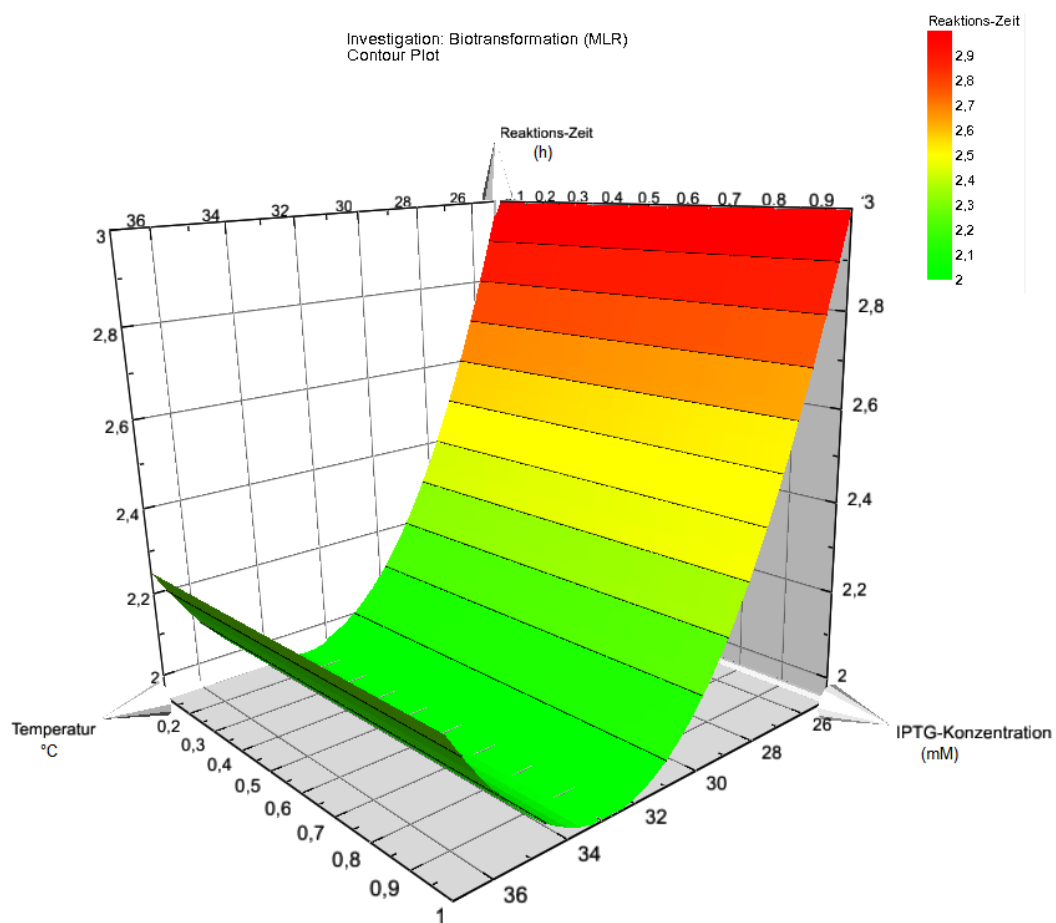


Abbildung 44: "Response-Surface-Plot" mit der Reaktionszeit als Zielgröße. Auf der Y-Achse ist die benötigte Reaktionszeit in h bis zum Erreichen einer konstanten Produktkonzentration aufgetragen (2 h - 3 h). Auf der X-Achse sind die IPTG-Konzentrationen (0,1 - 1 mM) und auf der Z-Achse die Temperaturen (37 - 25 °C) aufgetragen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die aus der OVAT-Optimierung erhaltene Temperatur von 30 °C als ideal bestätigt wurde. Allerdings sollte die eingesetzte IPTG-Konzentration weiter verringert werden. Das DoE ergab einen optimalen Wert von 0,1 mM (OVAT-Optimierung: $\leq 0,5$ mM IPTG).

Zusätzlich wurden Proben aus den Versuchen auch mittels SDS-PAGE analysiert (siehe Anhang 6.2.4). Dabei bestätigte sich auch im 200 mL Maßstab, dass sich höhere

Temperaturen positiv auf die heterologe Expression auswirken. Die heterologen Proteinbanden waren bei höheren Temperaturen (≥ 30 °C) weitaus deutlicher im Gel zu sehen. Allerdings war auch hier in allen Proben, besonders für die CHI, bereits vor der Induktion (Zeitpunkt 0 h) eine Bande im Gel zu erkennen. Im nächsten Abschnitt sollte diese Beobachtung näher untersucht werden.

4.4.10 Untersuchungen zur Induktion in TB-Medium

Bereits in mehreren Versuchen dieser Arbeit wurde beobachtet, dass bereits vor der Zugabe des Induktors IPTG eine Expression der heterologen Enzyme, besonders der CHI in der SDS-PAGE zu sehen war. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass das verwendete Induktionssystem (pET-Expressionssystem) nicht hinreichend reprimiert wird und eine Basalexpression vorliegt. Um das zu überprüfen, wurden Kultivierungen im 200 mL Maßstab mit 0,5 mM IPTG und ohne Zugabe von IPTG durchgeführt. Es wurde bei 30 °C während der anaeroben Produktionsphase gearbeitet. Die Proteinexpression wurde verglichen (SDS-PAGE) und zusätzlich überprüft, ob nach Naringenin-Zugabe Phloretin gebildet wurde.

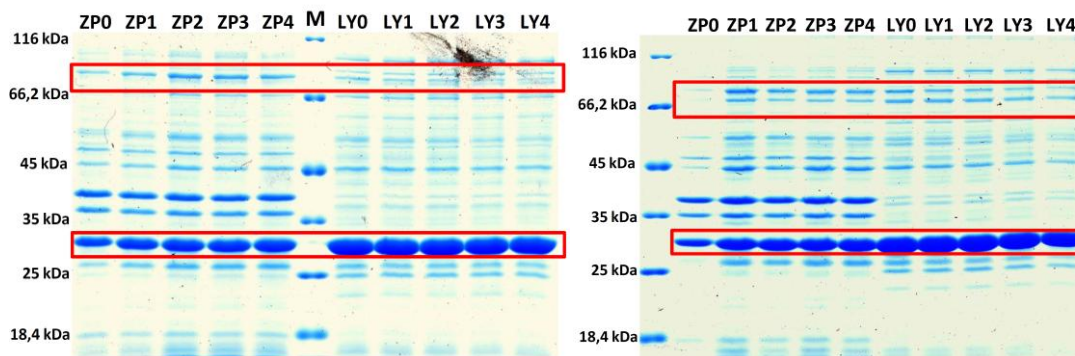


Abbildung 45: SDS-Gele von Biotransformationen im 200 mL Maßstab. Links mit IPTG-, rechts ohne IPTG-Zusatz. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (ZP0 = 0 h, ZP1 = 1 h, LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.).

Abbildung 45 zeigt die SDS-Gele. Sowohl in der Kultivierung mit IPTG-Zugabe (linkes Gel) als auch in der Kultivierung ohne IPTG-Zugabe (rechtes Gel) konnte eine starke Überexpression für die CHI bei 30 kDa beobachtet werden. Für die CHI konnte somit eindeutig eine Basalexpression nachgewiesen werden. Der Vektor pET-28b_CHI ist nachweisbar undicht. Besonders im Gel ohne IPTG-Zugabe war auch eine Expression bei 73 kDa, dem erwarteten Bereich der ERED, zu sehen.

Betrachtet man den Verlauf der Flavonoidkonzentrationen (Abbildung 46) ist zudem auch eine Phloretinbildung in beiden Kultivierungen nachweisbar gewesen. Diese ist ohne IPTG-Zusatz sogar höher gewesen. Hier konnte eine Phloretinkonzentration von 0,326 g/L gemessen werden. Daher muss davon ausgegangen werden, dass auch die ERED basal exprimiert worden ist und somit der zweite Vektor (pET52b_ERED) ebenfalls undicht ist.

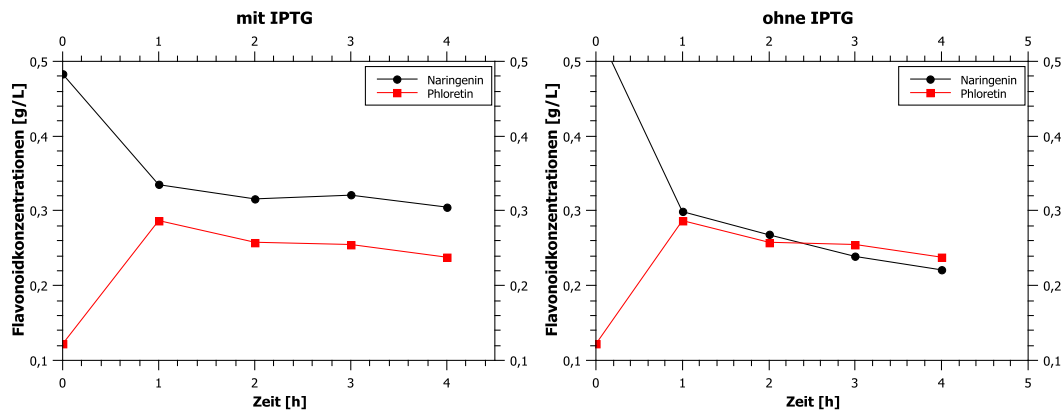


Abbildung 46: Verlauf der Flavonoidkonzentrationen im 200 mL Maßstab. Links mit IPTG-Zugabe, rechts ohne IPTG-Zugabe.

Möglicherweise liegt generell eine Basalexpression vor, die bei den hohen erreichten Zelldichten sehr deutlich wird. Ebenso könnte eine Verunreinigung eines Medienbestandteiles mit Lactose die Ursache für diese starke Basalexpression sein. Im Hinblick auf einen späteren Produktionsprozess kann die Undichtigkeit aber durchaus von Vorteil sein. Induktoren sind auch ein Kostenfaktor. Wenn eine aktive Induktion nicht notwendig ist, können hier Kosten eingespart werden. Um die Experimente vergleichbar zu halten, wurde trotzdem weiterhin mit IPTG induziert.

4.4.11 Umsetzungsversuch mit Phloretin anstelle von Naringenin

Auffallend in den bisherigen Versuchen war, dass trotz der vielen verschiedenen untersuchten Prozessvariablen nie ein 100%iger Umsatz des Naringenins beobachtet werden konnte. In den meisten Fällen konnte lediglich eine Phloretinausbeute zwischen 50% und 60% erzielt werden, während Naringenin nicht weiter abgebaut wurde.

Um auszuschließen, dass dies durch eine Rückreaktion oder ein enzymatisches Gleichgewicht begründet ist, wurde eine Kultivierung durchgeführt, bei der Phloretin anstelle von Naringenin zum Start der anaeroben Phase zugegeben wurde.

Das Experiment wurde im 2 L-Rührkesselreaktor durchgeführt. Es wurde mit den optimierten Standardbedingungen aus dem DoE gearbeitet (30 °C, 0,1 mM IPTG). Statt Naringenin wurden 0,274 g/L Phloretin (gelöst in DMSO) zugegeben.

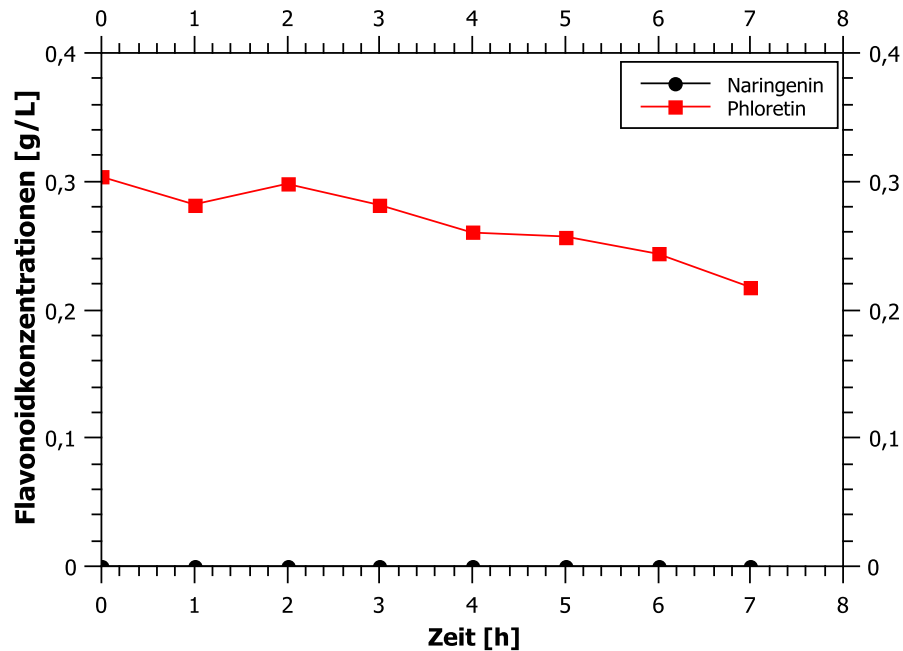


Abbildung 47: Biotransformation mit *E. coli* CHI_ERED im 2 L Rührkessel unter Zugabe von 0,274 g/L Phloretin.

Der Verlauf der Phloretinkonzentration ist in Abbildung 47 gezeigt. Während der Kultivierung konnte zu keinem Zeitpunkt Naringenin gemessen werden. Eine Rückreaktion kann damit ausgeschlossen werden. Trotzdem konnte beobachtet werden, dass die Phloretinkonzentration im zeitlichen Verlauf von ca. 0,27 g/L auf ca. 0,22 g/L sank. Möglicherweise ist das Phloretin in Lösung chemisch instabil und degradierte, wofür der langsame lineare Abfall spricht. Evtl. könnte auch ein Abbau durch Hydrolasen, die von *E. coli* natürlicherweise exprimiert werden, der Grund dafür sein. Der Versuch zeigte jedoch, dass der bisher beobachtete, unvollständige Umsatz des zugesetzten Naringenins nicht durch eine Rückreaktion oder ein enzymatisches Gleichgewicht begründet war.

4.4.12 Untersuchungen zu einer Produktinhibierung

Eine weitere denkbare Erklärung für den unvollständigen Naringenin-Umsatz könnte möglicherweise eine Inhibierung der ERED durch das Produkt Phloretin sein. Um dies zu untersuchen, wurde hier eine Biotransformation im 2 L-Rührkessel durchgeführt, bei der zusätzlich zum Naringenin (0,54 g/L) noch 0,3 g/L Phloretin zu Beginn der Produktionsphase zugegeben wurden. In *E. ramulus* ist das entstehende Phloretin nur ein Intermediat und wird weiter degradiert (siehe 3.1.3), weswegen eine Produktinhibierung der ERED durchaus denkbar wäre, um die Enzymkette des Flavonoidabbaus durch eine Rückkopplung zu regulieren.

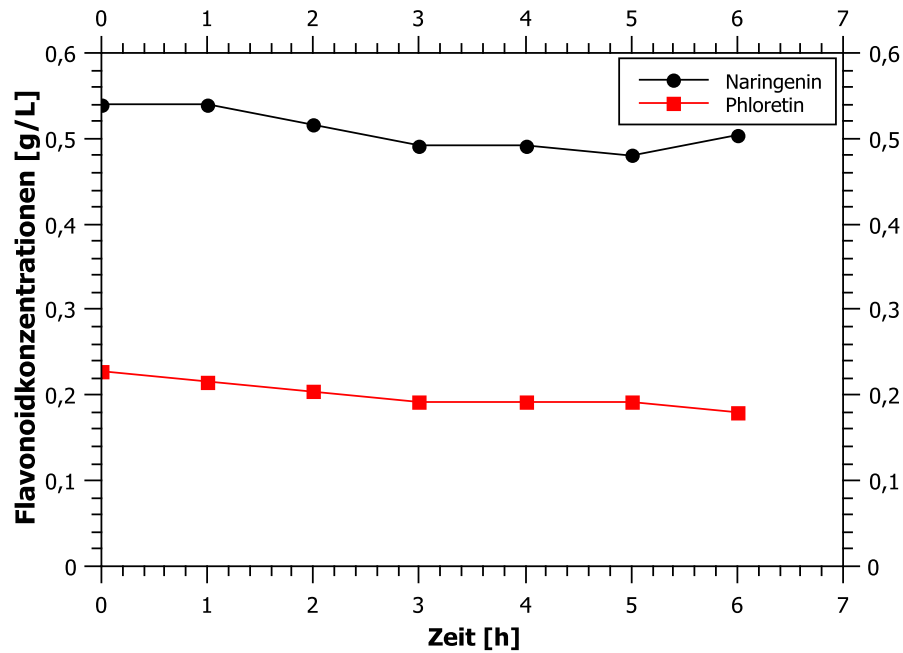


Abbildung 48: Verlauf der Flavonoidkonzentrationen einer Biotransformation im 2 L Maßstab mit *E. coli* CHI_ERED, bei der eine Kombination von Naringenin und Phloretin eingesetzt wurde.

Aus Abbildung 48 ist ersichtlich, dass kein zusätzliches Phloretin gebildet wurde. Dies ist ein deutlicher Hinweis, dass hier eine Produkthemmung der ERED durch das Phloretin vorlag. Wenn nur eine hohe Naringeninkonzentration von 0,81 g/L vorgelegt wurde (siehe 4.4.3), wurde die Reaktion zwar verlangsamt, aber trotzdem noch Phloretin gebildet. Daher ist eine Hemmung, die alleine auf die hohen Flavonoidkonzentrationen zurückzuführen ist, unwahrscheinlich. Es ist außerdem zu sehen, dass sowohl die Phloretin- als auch die Naringeninkonzentration während des Versuchs leicht sanken. Wahrscheinlich handelte es sich hier um eine chemische Degradation.

In einem weiteren Versuch wurde aufgrund der hier gewonnenen Erkenntnisse eine Kultivierung durchgeführt (200 mL Maßstab, 0,1 mM IPTG, 30 °C), bei der nur 0,1 g/L Naringenin eingesetzt wurde. Hier sollte aufgrund der geringen Menge keine Produkthemmung durch das gebildete Phloretin (max. 0,1 g/L wären theoretisch möglich) auftreten, so dass ein vollständiger Umsatz erreichbar wäre. In den vorherigen Kultivierungen wurden Phloretinkonzentrationen von >0,3 g/L erreicht, so dass eine Produkthemmung hier ausgeschlossen werden konnte.

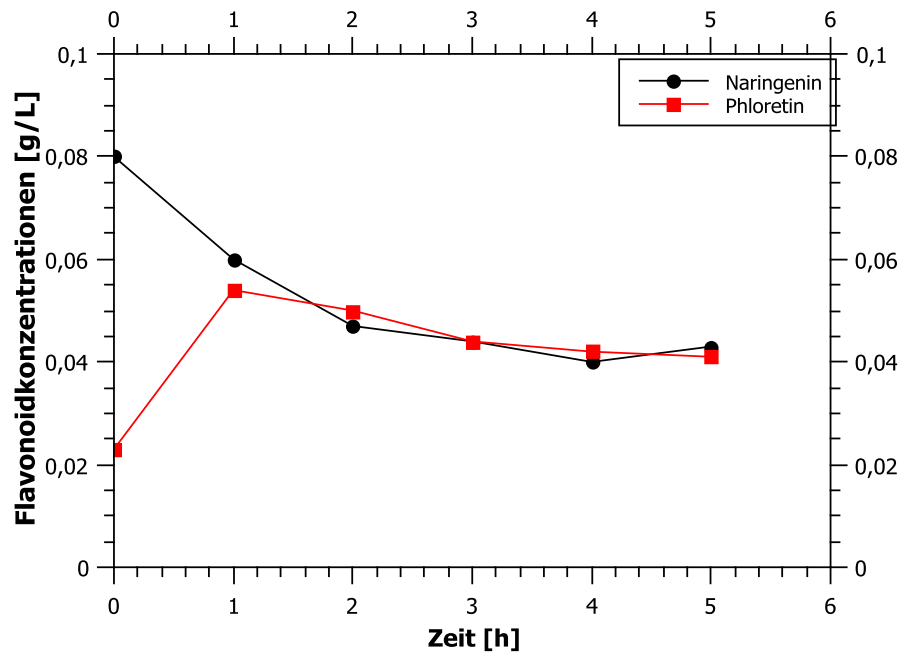


Abbildung 49: Verlauf der Flavonoidkonzentrationen in einer Biotransformation im 200 mL Maßstab mit *E. coli* CHI_ERED und Zusatz von 0,1 g/L Naringenin.

Aus Abbildung 49 wird ersichtlich, dass, obwohl eine Produktinhibierung aufgrund der geringen erreichten Phloretinkonzentrationen ausgeschlossen werden konnte, kein vollständiger Umsatz des Naringenins beobachtet wurde. Daher müssen noch weitere Aspekte für die beobachteten, unvollständigen Umsätze verantwortlich sein.

4.4.13 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Zunächst konnten im OVAT-Verfahren die IPTG-Konzentration, die Temperatur während der anaeroben Produktionsphase und die eingesetzte Naringeninkonzentration erfolgreich optimiert werden.

Mit diesen optimierten Bedingungen konnte der zweiphasige Prozess erfolgreich sowohl in den 10 L-Maßstab auf- als auch auf 200 mL herunterskaliert werden. Durch das erfolgreiche Downscaling konnten mehr Versuche in derselben Zeit als zuvor durchgeführt werden, so dass der Bioprozess weiter im Rahmen eines DoE optimiert werden konnte. Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass der verwendete Stamm *E. coli* CHI_ERED für beide heterologen Enzyme eine starke Basalexpression zeigt. Die Reaktionszeit war bisher in den 200 mL Flaschenkultivierungen und im Beutelreaktor am kürzesten. Bereits nach nur einer Stunde wurden hohe, konstant bleibende Phloretinwerte erreicht. Die Gemeinsamkeit dieser sehr unterschiedlichen Systeme und Skalierungen war, dass in beiden Fällen kein Antischaummittel eingesetzt werden musste. Möglicherweise wirkte sich dies hier sehr positiv auf die Geschwindigkeit der Umsetzung aus.

Trotz der umfangreichen Prozessoptimierungen konnte nie ein 100%iger Umsatz des eingesetzten Naringenins beobachtet werden. Eine Rückreaktion als Ursache konnte

ausgeschlossen werden. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass zwar sehr wahrscheinlich eine Produktinhibierung der ERED bei höheren Phloretinkonzentrationen (ca. $>0,3$ g/L) zum Tragen kommt, jedoch konnte auch mit sehr geringen eingesetzten Substratkonzentrationen kein vollständiger Umsatz beobachtet werden. Daher kann die Produktinhibierung nicht die alleinige Erklärung für die unvollständigen Umsätze sein.

Im nächsten Kapitel sollte geklärt werden, ob eine mögliche Enantioselektivität der CHI die unvollständigen Umsätze erklären kann.

4.5 Untersuchungen zur Enantioselektivität

Betrachtet man das Reaktionsschema der enzymatischen Umsetzung von Naringenin zu Phloretin mit *E. coli* CHI_ERED (Abbildung 29), ist zu sehen, dass das Naringenin als racemisches Gemisch aus (+)-Naringenin und (-)-Naringenin vorliegt. Möglicherweise erklären sich die bisherigen unvollständigen Umsätze von meist 50 – 60%, dadurch, dass nur eines der Enantiomere von der CHI umgesetzt werden kann. Die CHI wäre also ein enantioselektives Enzym, das ein Enantiomer diskriminiert. Die Versuche und Analysen, um dies zu überprüfen, sind Gegenstand der nächsten Kapitel.

4.5.1 Chirale Analysen

Um die Hypothese, dass die CHI nur eines der beiden Enantiomere umsetzt zu untersuchen, wurde eine chirale HPLC-Analytik von Proben einer Biotransformation im 2 L Maßstab (siehe 4.4.3, Kultivierung mit 0,54 g/L Naringenin) durchgeführt. Mit einer chiralen HPLC-Säule konnten (+)-Naringenin und (-)-Naringenin aufgetrennt werden. Diese Analysen wurden beim Industriepartner Symrise AG durchgeführt.

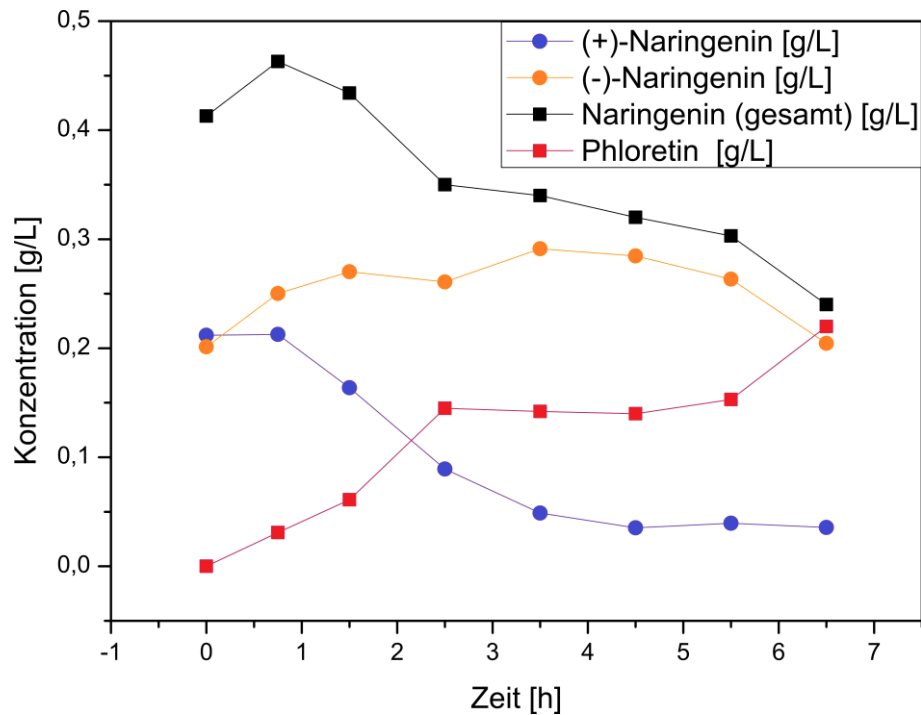


Abbildung 50: Konzentrationsverlauf von (+)-Naringenin, (-)-Naringenin, Gesamtnaringenin und Phloretin in einer Biotransformation im 2 L Maßstab mit *E. coli* CHI_ERED und Zusatz von 0,54 g/L Naringenin.

In Abbildung 50 sind die Ergebnisse der chiralen HPLC-Analytik gezeigt. Es ist zu sehen, dass die CHI tatsächlich nur eines der beiden Enantiomere, das (+)-Naringenin (blaue Kurve) umsetzte. Nach 3,5 h war nahezu das komplette (+)-Naringenin umgesetzt. Die Konzentration an (-)-Naringenin (orangefarbene Kurve) blieb nahezu unverändert. Das gebildete Phloretin stammt fast ausschließlich aus (+)-Naringenin, erst zwischen 5,5 h und 6,5 h entsteht es zum Teil auch aus (-)-Naringenin. Möglicherweise war ein Teil des (-)-Naringenin hier wieder zum (+)-Naringenin racemisiert und wurde direkt von der CHI umgesetzt.

Interessanterweise zeigte *E. ramulus* immer einen 100%igen Abbau von Naringenin [3]. Deshalb wurden auch Proben aus einer anaeroben *E. ramulus* Flaschenkultur (400 mL), denen Naringenin zugesetzt worden ist, mit der chiralen HPLC-Analytik untersucht.

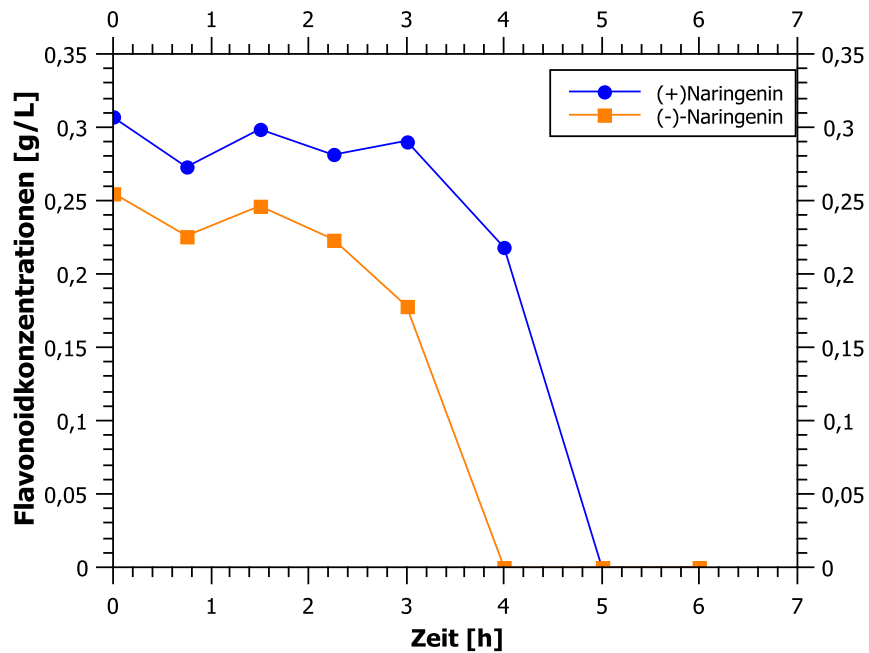


Abbildung 51: Verlauf der (+)-Naringenin- und (-)-Naringeninkonzentrationen in einer anaerob kultivierten *E. ramulus* Schüttelflaschenkultur.

Abbildung 51 zeigt den Verlauf von (+)-Naringenin und (-)-Naringenin in der *E. ramulus* Flaschenkultur. Es ist zu sehen, dass *E. ramulus* die Enantiomere unterschiedlich schnell abgebaut hat. (-)-Naringenin war bereits nach 4 h vollständig abgebaut. Erst danach wurde das (+)-Naringenin, durch die CHI abgebaut, die in dieser Arbeit in den *E. coli* CHI_ERED kloniert wurde. Das bedeutet, dass neben der bekannten CHI ein weiteres Enzym in *E. ramulus* vorhanden sein muss, und das Bakterium unterschiedliche Abbaupfade für die beiden Enantiomere des Naringenins nutzt. Das unbekannte Enzym weist wahrscheinlich ähnlich hohe Aktivitäten wie die CHI auf.

Die Ergebnisse belegen die Enantioselektivität der CHI. Das in Abbildung 29 dargestellte Reaktionsschema der Biotransformation kann daher aufgrund der Erkenntnisse aktualisiert werden.

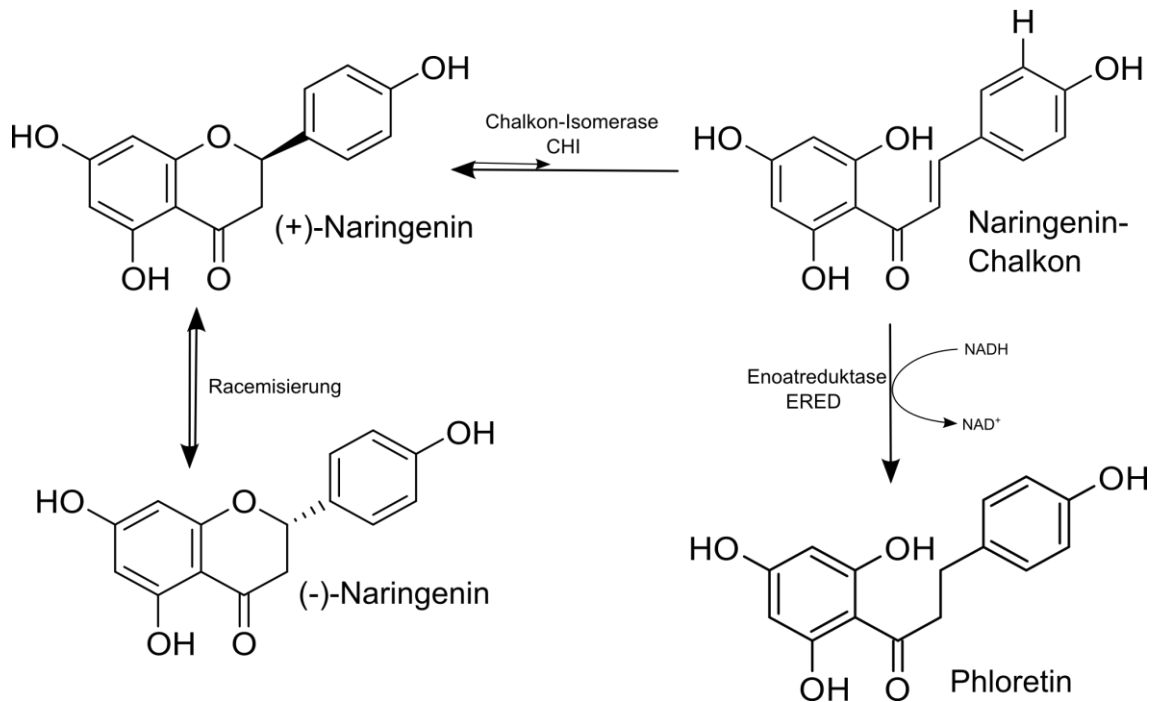


Abbildung 52: Reaktionsschema der Biotransformation von Naringenin zu Phloretin durch *E. coli* CHI_ERED unter Berücksichtigung der Enantioselektivität.

Das aktualisierte Schema der enzymatischen Umsetzung von Naringenin zu Phloretin ist in Abbildung 52 zu sehen. Die CHI isomerisiert nur das (+)-Naringenin zum Naringenin-Chalkon. Nur wenn es vorher chemisch zu (+)-Naringenin racemisiert, kann auch das (-)-Naringenin umgesetzt werden; eine direkte Isomerisierung durch die CHI ist nicht möglich.

Das entstehende Naringenin-Chalkon wird dann weiter durch die ERED zum Phloretin reduziert. Über die chemische Racemisierung erklären sich auch die teilweise beobachteten Ausbeuten von mehr als 50%. Würde keine Racemisierung des (-)-Enantiomers stattfinden, wäre der beobachtete Umsatz immer auf 50% beschränkt geblieben. Damit ist wahrscheinlich die chemische Racemisierung ab einem Umsatz von ca. 50% der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Umsetzung.

Um den maximal erreichbaren Umsatz zu erhöhen, boten sich prinzipiell zwei Möglichkeiten an. Zum einen konnte der Stamm auf molekularbiologischer Ebene weiter verbessert werden, z.B. indem das bisher noch unbekannte Enzym für den zweiten Abbauweg aus *E. ramulus* identifiziert und als drittes heterologes Enzym eingefügt würde. Zum anderen konnte versucht werden, die chemische Racemisierung zu beschleunigen. Dies könnte über die Prozessbedingungen erreicht werden. Dieser Ansatz wurde im folgenden Abschnitt untersucht.

4.5.2 Untersuchungen zu einer möglichen Racemisierung im laufenden Prozess

Ziel der folgenden Experimente war, die chemische Racemisierung des in der Kultur verbleibenden (-)-Naringenins zu beschleunigen, um die erreichbaren Umsätze weiter zu steigern. Hierfür wurde Kulturüberstand einer Biotransformation verwendet, in dem 100% (-)-Naringenin vorlagen. Die Zellen und damit auch die Enzyme wurden abzentrifugiert und verworfen, da sie sonst das aus der chemischen Racemisierung entstehende (+)-Naringenin sofort umsetzen würden und dieses somit nicht messbar wäre. Als Prozessvariablen, die die chemische Racemisierung zum (+)-Naringenin beeinflussen können, wurden der pH-Wert, die Temperatur und die Reaktionszeit untersucht. Mit Reaktionszeit ist die Zeit gemeint, die vergehen muss, bis aus dem vorliegenden 100% (-)-Naringenin wieder (+)-Naringenin gebildet wird.

Im verwendeten Überstand war außerdem das während der Biotransformation gebildete Phloretin vorhanden. Damit konnte ebenfalls die Stabilität des Phloretins untersucht werden.

Um hier auch mögliche Wechselwirkungen zwischen den untersuchten Variablen erfassen zu können und aufgrund der bereits in Kapitel 4.4.9 dargestellten Vorteile, wurden die Experimente als DoE geplant. Es wurde ebenfalls ein Box-Behnken-Design zur Versuchsplanung verwendet, da es auch in diesem Fall einen guten Kompromiss zwischen der Anzahl der nötigen Versuche und der statistischen Belastbarkeit bot.

Als Zielgrößen wurden die Konzentration von Phloretin und die Konzentration von (+)-Naringenin festgelegt. Die Faktoren und die untersuchten Wertebereiche sind in Tabelle 3 dargestellt. Die Analyse der Flavonoidkonzentrationen erfolgte mittels chiraler HPLC-Analytik beim Industriepartner Symrise AG. Ausgewertet wurden die Ergebnisse mit der Software MODDE (Umetrics, Schweden). Die genauen Beschreibungen zum Versuchsplan, der Durchführung und der anschließenden mathematischen Auswertung sind im Anhang unter 6.2.6 zu finden.

Tabelle 3: Faktoren und Wertebereiche für das DoE zur Racemisierung und Phloretinstabilität.

Faktor	Bereich
Temperatur	30 °C, 45 °C und 60 °C
pH-Wert	pH 7, pH 8 und pH 9
Reaktionszeit	0 h, 2 h und 4 h

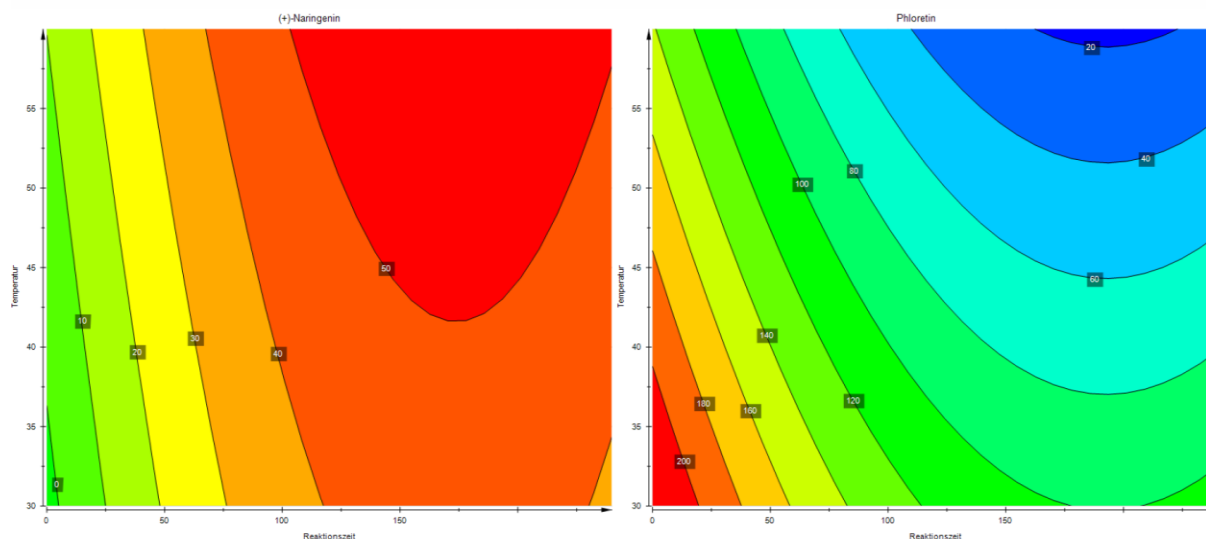


Abbildung 53: Contour-Plots der Modelle für (+)-Naringenin (links) und Phloretin (rechts). Auf der X-Achse ist die Reaktionszeit in Minuten, auf der Y-Achse die Temperatur ($^{\circ}\text{C}$) dargestellt. Rote Flächen symbolisieren hohe Konzentrationen, blaue Flächen geringe Konzentrationen.

Die 2D-Contour-Plots der berechneten Modelle sind in Abbildung 53 zu sehen. Der pH-Wert zeigte keinen Einfluss auf die Racemisierung oder die Phloretinstabilität und wurde daher nicht in die Berechnungen aufgenommen. Daher sind hier auch nur 2D- und keine 3D-Plots dargestellt, wie bei drei untersuchten Faktoren eigentlich zu erwarten wäre (siehe 4.4.9 Ergebnisse). Der linke Plot zeigt das Modell für (+)-Naringenin, der rechte für Phloretin. Rote Flächen symbolisieren dabei hohe Konzentrationen, blaue Flächen geringe Konzentrationen. Es ist deutlich zu sehen, dass die Plots konträre Optima aufweisen. Die Bedingungen, bei denen die höchsten (+)-Naringenin-Konzentrationen gebildet werden (Reaktionszeit >2 bis 3 h und Temperatur >50 $^{\circ}\text{C}$), sind gleichzeitig die, bei denen Phloretin am geringsten konzentriert vorliegt, bzw. am wenigstens stabil ist. Generell zeigte sich auch hier eine chemische Degradation des Phloretins, die auch schon in Kapitel 4.4.11 beobachtet wurde. Dass die chemische Racemisierung zu (+)-Naringenin stattfindet, konnte mit den Experimenten bewiesen werden. Bei 60 $^{\circ}\text{C}$ lag bereits nach einer Stunde wieder ein racemisches Gemisch (50:50) vor.

Im Hinblick auf die Phloretinstabilität werden die idealen Bedingungen (30 $^{\circ}\text{C}$, möglichst kurze Reaktionszeit) während der Biotransformation bereits verwendet. Diese sollten auch nicht verändert werden, da die beobachtete Phloretindegradation schneller verläuft als die Racemisierung. Daher ist eine Optimierung der Racemisierung über die Prozessbedingungen nicht möglich.

4.5.3 Schlussfolgerungen

Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei der CHI um ein enantioselektives Enzym handelt. Nur ein Enantiomer, das (+)-Naringenin wird katalytisch zu Phloretin

umgesetzt. Untersuchungen mit *E. ramulus* zeigten, dass dort vermutlich zwei Enzyme am Naringeninabbau beteiligt sind, von denen eines die CHI ist. Chirale Analysen zeigten, dass die Enantiomere dort unterschiedlich schnell abgebaut wurden.

Die bisherigen Ergebnisse mit Umsätzen von teilweise >50% legten nahe, dass eine chemische Racemisierung stattfindet. Dies konnte mit der chiralen HPLC-Analytik ebenfalls beobachtet werden. Bei 50 °C lag bereits nach 1 h wieder ein Racemat vor. Eine verbesserte Racemisierung über die Prozessbedingungen zu erreichen erwies sich aber als nicht möglich, da bei den hierfür notwendigen Bedingungen eine verstärkte chemische Degradation des Produkts Phloretin beobachtet wurde.

Die beobachtete Enantioselektivität stellt somit ein großes Problem dar, da sie den Umsatz der Reaktion stark einschränkt. Um dies zu lösen, sind weitere molekulargenetische Verbesserungen notwendig. Die Klonierung eines dritten heterologen Gens in das bestehende Konstrukt wäre eine Möglichkeit. Dabei müsste es sich um ein Enzym handeln, das die Umsetzung von (-)-Naringenin zum Naringenin-Chalkon leisten kann. Hierfür in Frage käme das bisher komplett unbekannte Enzym aus *E. ramulus*, das dort den Abbau des (-)-Naringenins leistet. Evtl. handelt es sich dabei aber um keine Isomerase und der Abbau wird anderweitig, z.B. hydrolytisch katalysiert. Im bereits komplett sequenziert vorliegendem Genom von *E. ramulus* konnten keine (Sequenz-)Homologien zu der CHI gefunden werden [101]. Alternativ wäre die Klonierung einer Chalkon-Isomerase pflanzlichen Ursprungs eine Möglichkeit. Hier könnte allerdings die unterschiedliche Codon Usage problematisch werden.

Genetische Verbesserungen, die relativ einfach durchzuführen sind, wären die Klonierung von Genen, die auf die Codon Usage in *E. coli* optimiert sind und die Überführung der bisher auf zwei Vektoren verteilten Gene (CHI auf pET28b, ERED auf pET52b) in einen Vektor. Diese Arbeiten wurden von den Projektpartnern durchgeführt. Biotransformationen mit dem genetisch optimierten Stamm werden im nächsten Kapitel gezeigt.

4.6 Kultivierungen von *E. coli* BL21 pET22_CHI_sERED

Von den Projektpartnern an der Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald wurde aufgrund der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse ein auf genetischer Ebene weiter verbesserter Stamm entwickelt und zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um *E. coli* BL21 pET22_CHI_sERED. Da bisher die Expression der ERED im Vergleich zur CHI immer schwächer war, wurde das Gen der ERED auf die Codon Usage von *E. coli* angepasst und künstlich synthetisiert (synthetische Enoatreduktase, sERED).

Die beiden bisher auf zwei Vektoren verteilten Gene (CHI auf pET28b, ERED auf pET52b) wurden dann gemeinsam in den Vektor pET22 kloniert. Außerdem wurde, da

ein codonoptimiertes Gen genutzt wurde, auf den Rosetta-Stamm verzichtet. Der erweiterte tRNA-Satz, den der Rosetta-Stamm mitbringt, um auch artfremde Gene gut exprimieren zu können, wurde somit überflüssig. Stattdessen wurde *E. coli* BL21 als Wirt benutzt. Da nun nur noch eines anstelle von vorher drei Plasmiden vorhanden war, musste während der Versuche nur noch Ampicillin als Selektionsdruck eingesetzt werden. Die Vektorkarten sind im Anhang unter 6.4.4 zu finden.

In den folgenden Abschnitten wurde die Expression und die Biotransformation mit *E. coli* BL21 pET22_CHI_sERED (im Folgenden als *E. coli* CHI_sERED bezeichnet) untersucht.

4.6.1 Biotransformation im 2 L Maßstab

Die Biotransformation wurde im 2 L Maßstab mit *E. coli* CHI_sERED unter aus dem DoE ermittelten idealen Bedingungen durchgeführt (0,1 mM IPTG, 0,54 g/L Naringenin, 30 °C). Die weitere Durchführung erfolgte wie in den vorherigen 2 L Versuchen (siehe u.a. 4.3.5). Die Proteinexpression mittels SDS-PAGE und die Flavonoidkonzentrationen (HPLC) wurden untersucht.

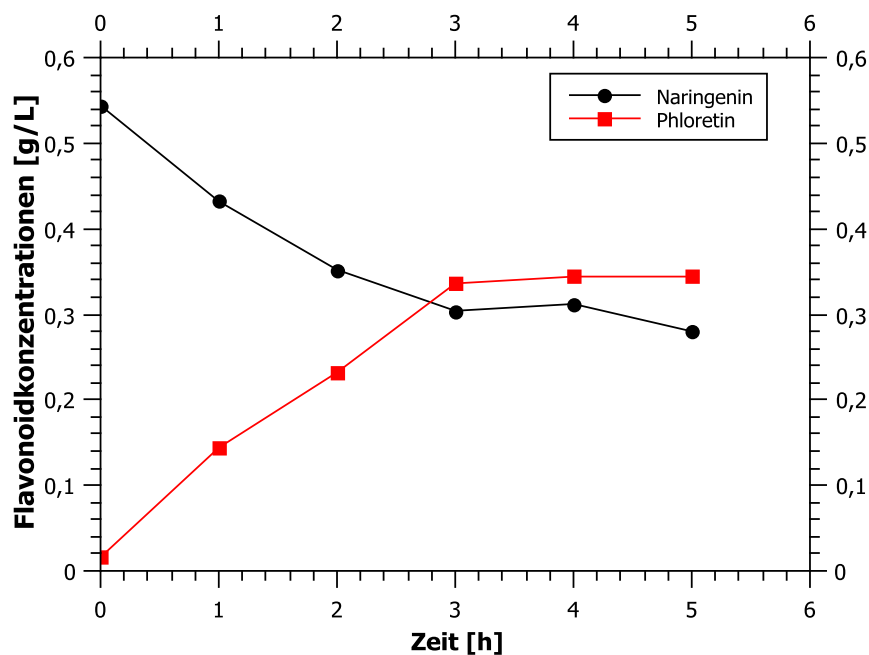


Abbildung 54: Verlauf der Flavonoidkonzentrationen einer Biotransformation im 2 L Maßstab mit *E. coli* CHI_sERED unter Standardbedingungen.

In Abbildung 54 sind die Ergebnisse der HPLC-Analyse dargestellt. Nach 3 h wurde ein konstanter Phloretinwert erreicht. Mit 0,34 g/L Phloretin (nach 4 h) wurde die bisher höchste Phloretinkonzentration gemessen. Es wurde ein Umsatz von ca. 63% erreicht. Verglichen mit 2 L Biotransformationen, die mit dem Vorläufer ohne codon-optimierte ERED (*E. coli* CHI_ERED) durchgeführt wurden, waren sowohl der Umsatz als auch die Reaktionsgeschwindigkeit sehr ähnlich (siehe z.B. 4.4.3). Trotz der genetischen Verbesserungen konnte kein wesentlich höherer Umsatz beobachtet werden.

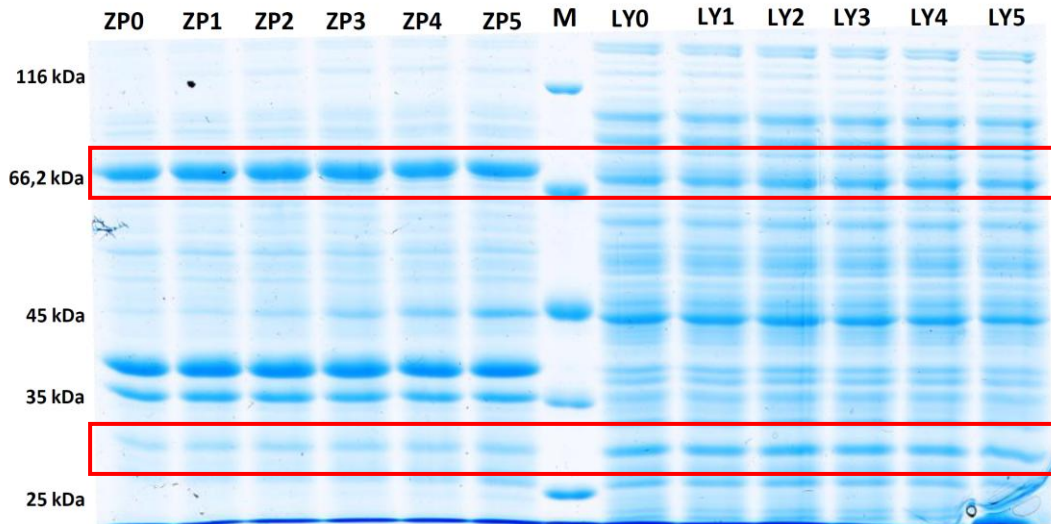


Abbildung 55: SDS-Gel der 2 L Biotransformation mit *E. coli* CHI_sERED. M = Marker, ZP = Zellpellet, LY = Zellysat. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (ZP0 = 0 h, ZP1 = 1 h, LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.).

Im SDS-Gel der Kultivierung ist in den unlöslichen Fraktionen eine sehr starke Bande bei 73 kDa zu sehen. Dabei handelte es sich um die ERED. In den löslichen Fraktionen ist ebenfalls eine gute Expression der ERED zu sehen. Die CHI bei 30 kDa ist in den unlöslichen Fraktionen nur extrem schwach zu sehen, in den löslichen war sie stärker exprimiert worden. Damit lagen beide notwendigen Enzyme auch löslich exprimiert vor.

Beide Enzyme waren allerdings direkt zum Zeitpunkt 0 h bereits exprimiert worden, die Expressionsstärke nahm zudem im zeitlichen Verlauf nicht deutlich zu. Es ist davon auszugehen, dass auch mit dem neuen Stamm eine Basalexpression für beide Enzyme vorliegt. Vergleicht man die Proteinexpression mit der des Vorläuferstammes fällt auf, dass die CHI nicht mehr so deutlich überexprimiert wurde wie im Vorläufer. Dafür zeigte die ERED eine wesentlich stärkere und deutlichere Expression.

4.6.2 Biotransformation im 20 L Maßstab

Mit dem neuen verbesserten Stamm sollte nach der erfolgreichen 2 L Biotransformation eine weitere, bisher nicht erreichte Aufskalierungsstufe umgesetzt werden. Bisher war die 10 L Kultivierung (siehe 4.4.6) das größte Kulturvolumen, in dem der zweiphasige Prozess erfolgreich umgesetzt werden konnte. Dieses Volumen sollte mit der neuen Skalierungsstufe auf 20 L verdoppelt werden. Es wurde ein 30 L Rührkesselreaktor verwendet (BIOSTAT UD, Sartorius AG).

Die Begasungsrate betrug hier 1,5 vvm während der aeroben Wachstumsphase. Während der anaeroben Produktionsphase wurde mit den gleichen Bedingungen wie im vorherigen 2 L Versuch gearbeitet (0,1 mM IPTG, 0,54 g/L Naringenin, 30 °C).

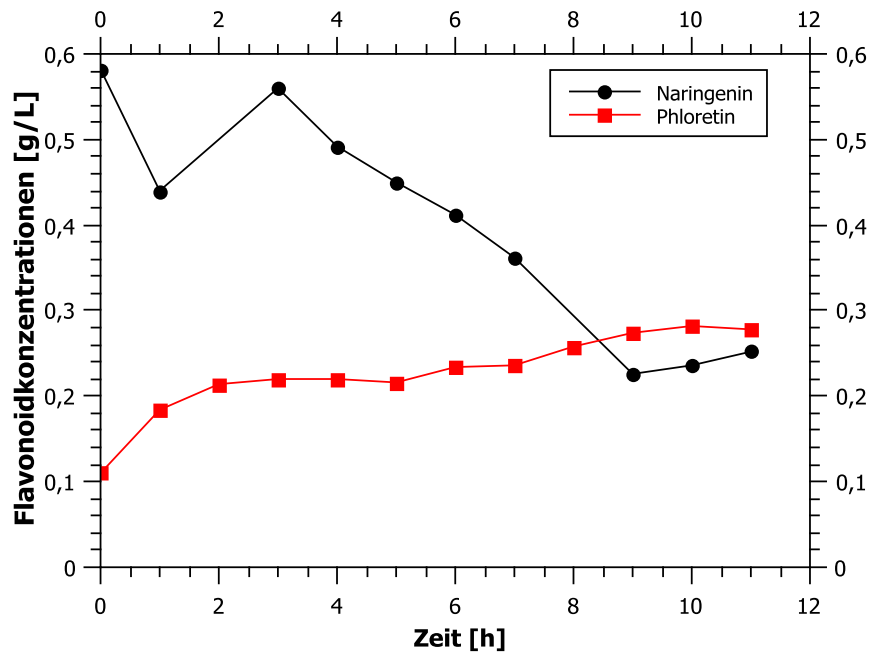


Abbildung 56: Verlauf der Flavonoidkonzentrationen einer Biotransformation im 20 L Maßstab mit *E. coli* CHI_sERED unter Standardbedingungen.

Die besondere zweiphasige Prozessführung konnte auch im 20 L Maßstab problemlos umgesetzt werden. Der Verlauf der Flavonoidkonzentrationen während der anaeroben Produktionsphase ist in Abbildung 56 zu sehen. Bereits sehr schnell, nach einer Stunde wurden 0,18 g/L Phloretin erreicht. Die Phloretinkonzentration stieg langsam über die nächsten 8 h weiter an, bis nach 9 h ein nahezu konstanter Wert erreicht wurde. Nach 6 h wurden 0,23 g/L Phloretin, nach 10 h 0,28 g/L Phloretin erreicht. Die Naringeninkonzentration nahm während der ersten 9 h ab und blieb dann nahezu konstant, bzw. stieg ganz leicht an. Es wurde schließlich ein Umsatz von ca. 50% erreicht.

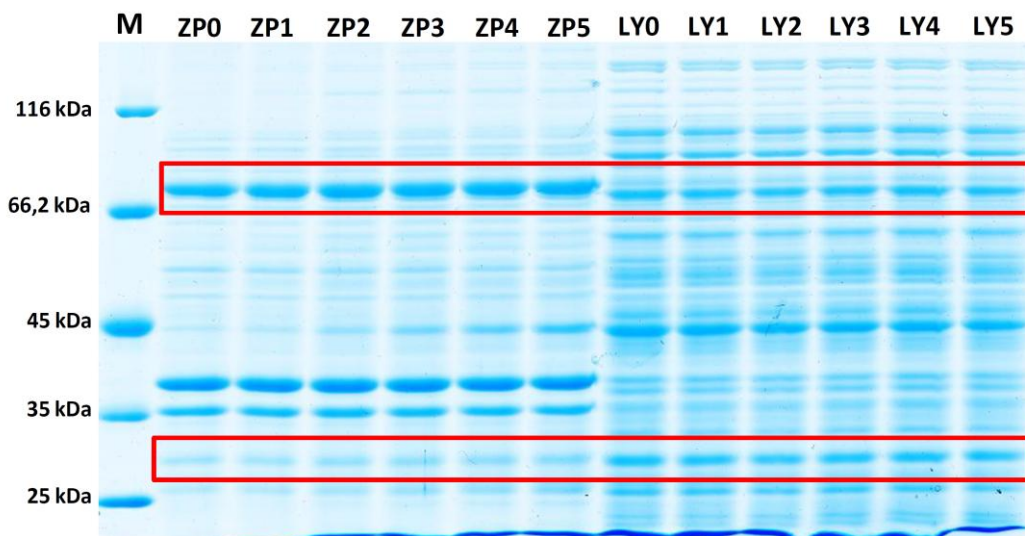


Abbildung 57: SDS-Gel der 20 L Biotransformation mit *E. coli* CHI_sERED. M = Marker, ZP = Zellpellet, LY = Zelllysat. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (ZP0 = 0 h, ZP1 = 1 h, LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.).

Die Proteinexpression im SDS-Gel zeigt Abbildung 57. Es zeigte sich hier ein ähnliches Bild wie schon in der 2 L-Biotransformation (siehe oben 4.6.1). Die CHI ist in den unlöslichen Fraktionen kaum zu sehen, die ERED war hier sehr stark zu sehen. In den löslichen Fraktionen lagen sowohl die CHI als auch die ERED gut exprimiert vor. Auch hier lagen wieder beide heterologen Enzyme schon direkt zu Beginn deutlich vor, was die Hypothese, dass auch der verbesserte Stamm *E. coli* CHI_sERED wie schon der Vorläufer eine deutliche Basalexpression beider Enzyme zeigt.

4.6.3 Zusammenfassung

Die Biotransformation funktioniert auch mit dem neuen Stamm *E. coli* CHI_sERED sehr gut. Im 2 L-Maßstab zeigte sich eine ähnliche Umsetzung wie auch schon mit dem Vorläuferstamm. Es konnten ähnliche Geschwindigkeiten und Ausbeuten erreicht werden. Die erreichte Phloretinkonzentration lag mit 0,34 g/L etwas höher als bisher.

Die besondere zweiphasige Prozessführung konnte erfolgreich auf 20 L aufskaliert werden. Auch in diesem Maßstab konnte biokatalytisch Phloretin produziert werden. Es zeigte sich hier ein anderer Verlauf als in den bisherigen Kultivierungen. Eine über einen so langen Zeitraum (>10 h) stetige Zunahme war zuvor noch nicht beobachtet worden.

Die Proteinexpression unterschied sich deutlich vom Vorläuferstamm. Die CHI wird in *E. coli* CHI_sERED nicht mehr so stark exprimiert. Dafür wird die ERED verstärkt exprimiert und beide Enzyme liegen auch in der löslichen und damit wahrscheinlich aktiven Form vor. Obwohl der Vektor gewechselt wurde, zeigte auch *E. coli* CHI_sERED eine starke Basalexpression. Für einen industriellen Prozess kann dies von Vorteil sein, da die Kosten für den Induktor eingespart werden könnten.

Die Problematik des aufgrund der Enantioselektivität der CHI begrenzten Umsatzes konnte mit den molekularbiologischen Verbesserungen allerdings bisher nicht gelöst werden.

In den bisherigen Kapiteln wurde ein ganzzellkatalytischer Bioprozess entwickelt und optimiert. Im letzten Kapitel werden erste Versuche zur Entwicklung eines passenden Aufreinigungsprozesses für das Produkt Phloretin dargestellt.

4.7 Downstreaming

In dem in dieser Arbeit entwickelten Prozess wird das Phloretin ganzzellkatalytisch produziert. Eine Aufreinigung der Enzyme, und damit eine komplizierte Abfolge mehrerer Verfahren und Schritte ist daher nicht notwendig. Das Phloretin und auch das nicht umgesetzte (-)-Naringenin liegen am Ende gelöst in der Kulturbrühe vor. Wie eingangs beschrieben sind die Flavonoide nur extrem schlecht in Wasser, aber sehr gut

in organischen Lösemitteln löslich. Deswegen wäre ein extraktiver Downstream-Prozess naheliegend, um das Produkt, bzw. das Produkt-Substrat-Gemisch zu gewinnen. Die einfachste Möglichkeit, die in kleinem Maßstab in dieser Arbeit auch zur Vorbereitung der Proben für die HPLC-Analytik genutzt wurde, ist eine komplette Extraktion der Kulturbrühe mit einem geeigneten Lösemittel. Der Nachteil hierbei ist, dass die Zellen und Enzyme dabei zerstört werden. Eine erneute Zugabe und Umsetzung von frischem Substrat, nachdem das Phloretin extrahiert wurde, wäre so unmöglich. Bei den bisher erreichten Phloretinkonzentrationen von ca. 0,3 g/L aus einem Reaktionsansatz ist eine komplette Extraktion noch nicht wirtschaftlich. Außerdem konnte gezeigt werden, dass bei zu hohen Phloretinkonzentrationen eine Produktinhibierung eintritt (siehe 4.4.12). Es wäre daher sinnvoll, gleichzeitig das Produkt zu extrahieren und neues Substrat zuzugeben, um so der Produktinhibierung entgegenzuwirken.

Eine Möglichkeit dies zu erreichen, könnte eine in-situ-Extraktion mittels Hohlfasermodulen sein. Dies wird im nächsten Abschnitt dargestellt.

4.7.1 Extraktion mit Hohlfasermodulen

Das Prinzip der in-situ-Produktextraktion mittels Hohlfasermodule ist schematisch in Abbildung 58 skizziert. Das System besteht prinzipiell aus zwei separaten Kreisläufen. Im ersten Kreislauf (rot dargestellt) wird die Kulturbrühe aus dem Reaktor durch den extracapillaren Raum (ECS, engl.: „extracapillary space“) eines Hohlfasermoduls gepumpt.

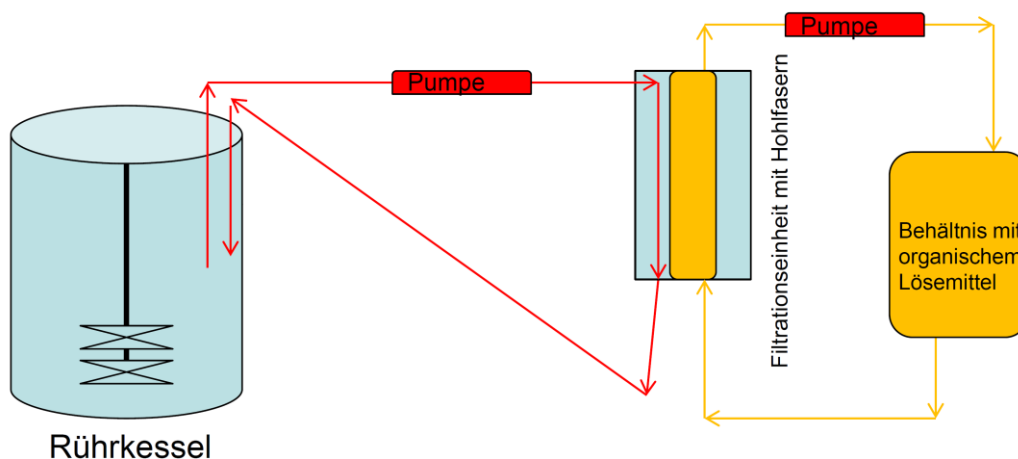


Abbildung 58: Schematische Skizze einer Extraktionsstrategie mit Hohlfasermodulen.

Im zweiten Kreislauf (gelb dargestellt) wird im Gegenstrom zum Ersten ein organisches Lösemittel durch die Hohlfasern (ICS, engl.: „intracapillary space“) gepumpt. Durch die Führung der Prozessströme im Gegenstrom sollten die Flavonoide aus der Reaktorbrühe in den Lösemittelkreislauf extrahiert werden und sich dort allmählich ansammeln. Die

Ausschlussgrenze der Membran, der sogenannte „cut-off“ der Hohlfasern, muss dabei so klein gewählt werden, dass Proteine oder gar ganze Zellen nicht in den Lösemittelkreislauf gelangen können und im Reaktorkreislauf bleiben.

In Vorversuchen wurden verschiedene cut-offs und Lösemittel untersucht (Daten nicht gezeigt). Es konnten geeignete Pumpraten und 2-Butanol als geeignetes Lösemittel gefunden werden.

Im 2 L-Reaktor wurde eine zweiphasige Biotransformation mit *E. coli* CHI_ERED unter Standardbedingungen (30 °C, 0,1 mM IPTG, 0,54 g/L Naringenin) durchgeführt. Als Hohlfasermodule wurde ein kommerziell erwerbliches MidiKros-Modul (SpectrumLabs, USA) mit einem cut-off von 3 kDa und einer Austauschfläche von 235 cm² ($\pm 10\%$) mPES verwendet (modifiziertes Polyethersulfon). Das Lösemittelbehältnis wurde mit 100 mL 2-Butanol gefüllt.

Es wurde mit dem Start der Extraktion gewartet, damit sichergestellt war, dass die Phloretinproduktion abgeschlossen war. Deswegen wurde erst 4 h nachdem die anaerobe Produktionsphase eingeleitet wurde mit der Extraktion begonnen. Dazu wurde die Flussrate des Reaktorkreislaufs auf 10 mL/min eingestellt und die Flussrate des Lösemittelkreislaufs auf 3,75 mL/min.

Die Extraktion wurde anschließend über 4 h durchgeführt. Es wurden die Flavonoidkonzentrationen aus beiden Kreisläufen mittels HPLC vermessen.

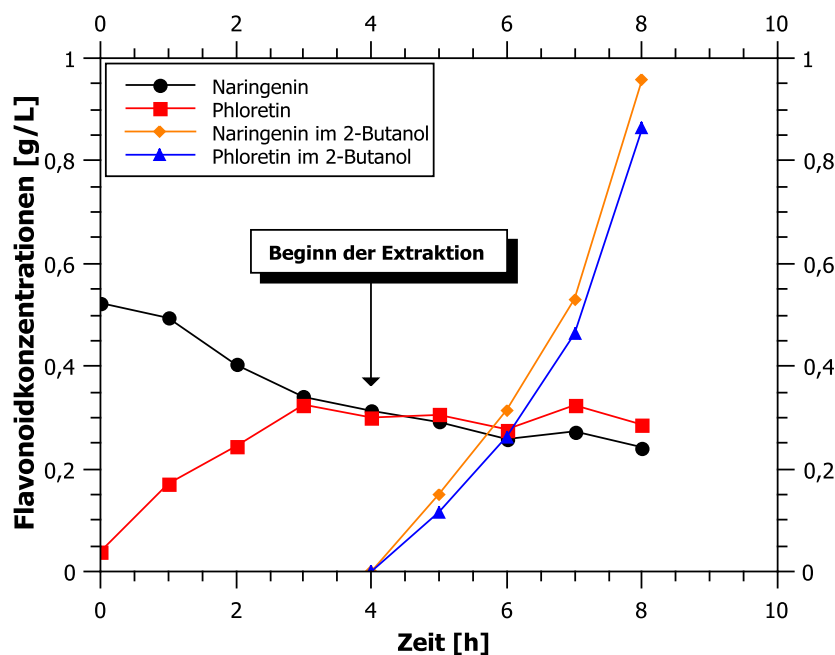


Abbildung 59: Verlauf der Flavonoidkonzentrationen während der Extraktion mit einem Hohlfasermodule. Die Verläufe im Reaktorkreislauf (Schwarze Kreise und rote Quadrate) und im Lösemittelkreislauf (orangefarbene Rauten und blaue Dreiecke) sind dargestellt.

In Abbildung 59 ist der Verlauf der Flavonoidkonzentrationen in den beiden Kreisläufen dargestellt. Es ist zu erkennen, dass eine signifikante Phloretinbildung im Reaktor stattgefunden hatte. Nach 3 h war eine konstante Phloretinkonzentration von ca. 0,3 g/L erreicht worden.

Als die Extraktion nach 4 h gestartet wurde, stiegen die Konzentrationen im Lösemittelkreislauf schnell an. Nach 2 h Extraktion wurden 0,32 g/L Naringenin und 0,26 g/L Phloretin gemessen. Nach 4 h waren es 0,96 g/L Naringenin und 0,86 g/L Phloretin. Dabei wurde beobachtet, dass sich das 2-Butanol im Verlauf immer deutlicher gelblich färbte. Dieses durch die Flavonoide ausgelöst, die in höher konzentrierten Lösungen immer eine gelbliche Farbe zeigten. Während der Extraktion wurde ein Lösemittelverlust von ca. 0,15 mL/min beobachtet. Da 2-Butanol gut mit Wasser mischbar ist, wurde der Verlust wahrscheinlich durch in den Reaktor diffundierendes Lösemittel ausgelöst. Generell kann gesagt werden, dass die Extraktion über Hohlfasermodule gut und vielversprechend funktioniert hat. Betrachtet man jedoch die Flavonoidkonzentrationen im Reaktor, nachdem die Extraktion gestartet wurde genauer, so fällt auf, dass diese nur geringfügig absinkt. Der größte Teil der Flavonoide befand sich somit immer noch im Reaktor. Die Austauschfläche des Moduls müsste also wesentlich vergrößert werden.

4.7.2 Schlussfolgerungen

Aus den hier vorgestellten Ergebnissen konnten wichtige Informationen für eine zukünftige Downstream-Strategie gewonnen werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine Extraktion über Hohlfasermodule prinzipiell sehr gut funktioniert und der Aufbau eine gute Methode darstellt, um das Phloretin zu extrahieren, ohne die Zellen zu zerstören. Es konnten 0,86 g/L Phloretin im Lösemittelkreislauf akkumuliert werden. Der Großteil des entstandenen Phloretins befand sich nach der Extraktion zwar noch im Reaktorkreislauf, jedoch sollte relativ einfach über eine größere Austauschfläche der Hohlfasern auch die Extraktionseffizienz deutlich gesteigert werden können. Bedenkt man außerdem, dass sich andere Materialien als mPES und andere Lösemittel als 2-Butanol noch besser eignen könnten, ist hier ein sehr großes Optimierungspotenzial vorhanden.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die hier vorgestellte Arbeit wurde im Rahmen des BMBF-geförderten Projekts „Biokatalytische Gewinnung von Flavonoiden“ in Kooperation zusammen mit den Partnern Symrise AG und Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald im Biokatalyse2021-Cluster durchgeführt. Das Ziel war es, aus dem günstigen und gut verfügbaren Naringenin auf biokatalytischem Weg Phloretin zu gewinnen.

An dieser Stelle sollen die durchgeführten Arbeiten zusammengefasst und ein Ausblick auf mögliche zukünftige, darauf aufbauende Ideen und Entwicklungen gegeben werden. Zunächst wurde versucht, eine Biotransformation auf Basis des Wildtyp, *Eubacterium ramulus* zu etablieren. Eine hohe Biomassekonzentration, welche die Grundvoraussetzung hierfür ist, konnte erfolgreich über den innovativen Einsatz eines Beutelreaktorsystems für die anaerobe Kultivierung realisiert werden. Über einen entwickelten anaeroben Glucose-fed-batch und verbesserte anaerobe Kultivierungstechniken konnte die Biomasse, im Vergleich zu batch-Kultivierungen, um 25% gesteigert werden.

Da die Handhabung des strikt-anaeroben, scherstress-sensitivem *E. ramulus* jedoch vergleichsweise kompliziert war, wurde im Hinblick auf einen industriellen Prozess auch an einem rekombinanten Produktionsstamm geforscht. Von den Projektpartner wurde hier zunächst ein *Pichia pastoris* Stamm zur Verfügung gestellt, in den die Sequenz der Chalkon-Isomerase (CHI) aus *E. ramulus* kloniert worden war.

Mit diesem *P. pastoris* Stamm wurde versucht, einen Bioprozess zu entwickeln. Hierfür konnten in dieser Arbeit ein geeignetes Kultivierungsmedium gefunden und das Wachstumsverhalten in verschiedenen Reaktoren und Skalierungsstufen charakterisiert werden. Jedoch konnte nur eine sehr schwache Expression der CHI und keine Phloretinbildung nachgewiesen werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Sequenz der CHI in einen *E. coli* Rosetta Stamm kloniert, welcher im Folgenden näher untersucht wurde. Hier konnte eine sehr gute Überexpression der CHI in Schüttelkolbenkultivierungen nachgewiesen werden. Über eine 2D-Gelelektrophorese konnte auch der pI der CHI, der bei ca. pH 5,4 liegt, identifiziert werden. Enzymaktivitätstests mit der produzierten heterologen CHI fielen jedoch negativ aus, während gleichzeitig durchgeführte Nachweise mit *E. ramulus* stets positiv waren.

Über eine Literaturrecherche konnten Hinweise gefunden werden, dass möglicherweise noch ein weiteres Enzym, eine Enoatreduktase, an der Umsetzung von Naringenin zu Phloretin beteiligt sein könnte. Da das Genom von *E. ramulus* komplett sequenziert vorlag, konnte über Homologievergleiche durch die Projektpartner aus Greifswald im Genom von *E. ramulus* eine Gensequenz mit großer Ähnlichkeit zu den in der Literatur

beschriebenen Enoatreduktasen gefunden werden. Diese hypothetische Enoatreduktase (ERED) wurde ebenfalls in den vorliegenden *E. coli* Stamm kloniert.

Erste Versuche mit diesem neuen Stamm zeigten jedoch wieder keine Phloretinbildung. Da die ERED laut Literatur wahrscheinlich bei Anwesenheit von Sauerstoff nicht richtig gefaltet oder inaktiviert werden kann, wurde eine besondere Prozessführung mit teilweise anoxischen Bedingungen im 2 L-Rührkesselreaktor entwickelt. Diese war in zwei Phasen aufgeteilt. Zunächst wurde unter aeroben Bedingungen die erforderliche Biomasse angezogen. Anschließend wurden anaerobe Bedingungen geschaffen, die heterologe Expression induziert und Naringenin zugeben.

Mit dieser zweiphasigen Prozessführung aus aerober Wachstumsphase und anaerober Produktionsphase konnten in ersten Experimenten erfolgreich bis zu 0,035 g/L Phloretin produziert werden. In den folgenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Phloretinproduktion verbessert wird, wenn der Übergang in die Produktionsphase während der exponentiellen Phase bei möglichst vitalen Zellen eingeleitet wird. Die aerobe Wachstumsphase wurde bei verschiedenen Temperaturen charakterisiert, um den idealen Zeitpunkt zum Start der anaeroben Produktionsphase zu finden. Die Phloretinkonzentration konnte so auf 0,17 g/L gesteigert werden.

Es konnte bewiesen werden, dass für eine erfolgreiche Biotransformation beide Enzyme (CHI und ERED) notwendig sind, und dass unter komplett aeroben Bedingungen nur extrem wenig Phloretin produziert wird.

Die Prozessvariablen wurden im Folgenden optimiert. Zunächst konnten über ein OVAT-Verfahren die IPTG-Konzentration zur Induktion, die Temperatur während der anaeroben Produktionsphase und die initial eingesetzte Naringeninkonzentration optimiert werden. Als optimierte Prozessvariablen wurden 0,5 mM IPTG, 30 °C und eine Naringeninkonzentration von 0,54 g/L ermittelt. Damit konnte die gebildete Phloretinkonzentration auf 0,22 g/L erhöht werden.

Mit den optimierten Prozessvariablen konnte die Biotransformation anschließend erfolgreich sowohl in den 10 L-Maßstab aufskaliert als auch in den 200 mL-Maßstab herunterskaliert werden. Ebenso zeigte sich eine gute Phloretinproduktion im Beutelreaktorsystem, so dass in Zukunft gegebenenfalls auf ein weiteres, alternatives Reaktorsystem zurückgegriffen werden kann.

Durch die erfolgreiche Herunterskalierung des Prozesses auf 200 mL konnten mehr Experimente in kürzerer Zeit durchgeführt werden. Daher wurden die Prozessvariablen nochmals mit einer höheren statistischen Sicherheit und Präzision über eine statistische Versuchsplanung („Design of Experiments“) optimiert. Eine noch geringere IPTG-Konzentration von 0,1 mM erwies sich als idealer Wert. Damit konnten Umsätze von bis zu 68% und Phloretinkonzentrationen von 0,3 g/L erreicht werden. Außerdem konnte die Reaktionszeit, in der diese Umsätze erreicht wurden, erheblich von zuvor ca. 3 h auf eine Stunde verkürzt werden.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass wahrscheinlich eine Produktinhibierung durch das gebildete Phloretin die Biokatalyse hemmen kann. Außerdem konnte über Vergleiche von Kultivierungen mit und ohne IPTG-Induktion, eine sehr starke Basalexpression der CHI und ebenso eine Basalexpression der ERED gefunden werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nie ein 100%iger Umsatz des Naringenins erreicht werden. Maximal wurden Umsätze von ca. 50 – 68% erreicht. Eine Rückreaktion als mögliche Ursache konnte ausgeschlossen werden. Ebenso konnte dieser Umstand allein durch die Produktinhibierung nicht erklärt werden.

Da das Naringenin als Racemat vorliegt, würde eine Enantioselektivität diesen Umstand gut erklären. Deshalb wurden Proben aus den Biotransformationen in einer chiralen HPLC analysiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass die CHI enantioselektiv nur das (+)-Naringenin umsetzt. Außerdem konnte über die chirale Analytik gezeigt werden, dass in *E. ramulus* die Enantiomere des Naringenins über verschiedene, voneinander unabhängige Wege abgebaut werden. Damit konnten die bisher bekannten Reaktionsmechanismen durch die Ergebnisse dieser Arbeit erweitert und aktualisiert werden. Erst mit diesen Erkenntnissen konnte die Biotransformation vollständig verstanden werden.

Von den Projektpartnern wurde ein weiterer Produktionsstamm zur Verfügung gestellt, der im Prinzip eine molekularbiologisch verbesserte Variante des bis dahin verwendeten *E. coli* Rosetta Stamms darstellte. Im Wesentlichen wurde hier ein codon-optimiertes Gen für die ERED kloniert.

Es konnten erste Versuche mit dem Stamm durchgeführt und erfolgreich Phloretin produziert werden. Das Umsatzverhalten, bezogen auf die Reaktionsgeschwindigkeit (ca. 3 h im 2 L-Maßstab) und den erreichten maximalen Umsatz (0,3 g/L Phloretin, ca. 50 - 65%), war dabei ähnlich wie das des Vorläuferstammes. Auch der optimierte Stamm zeigte eine Basalexpression der heterologen Enzyme.

Mit diesem Stamm wurde eine weitere Aufskalierung auf 20 L Kulturvolumen umgesetzt. Hier konnten 0,28 g/L Phloretin gebildet werden. Damit konnte die Phloretinproduktion in dieser Arbeit erfolgreich in Maßstäben von 200 mL - 20 L realisiert werden.

Zuletzt konnte gezeigt werden, dass eine extraktive in-situ-Produktaufreinigung über Hohlfasermodule möglich ist. In der Lösemittelphase wurden bis zu 0,86 g/L Phloretin akkumuliert.

Um den Umsatz zukünftig weiter auf bis zu 100% zu steigern, wäre zunächst eine Klonierung eines weiteren Enzyms, das (-)-Naringenin zu (+)-Naringenin umsetzen kann, zielführend. Hier könnte eine pflanzliche Chalkon-Isomerase eine gute Wahl sein. Über die Hohlfasermodule kann sich möglicherweise ein Prozess umsetzen lassen, in dem laufend Produkt ab- und Substrat zugeführt würde. So könnte sich die Produktinhibierung effizient umgehen lassen. Über andere Fasermaterialien und eine

größere Austauschfläche könnte sich das Verfahren sehr einfach und schnell verbessern lassen.

Somit bilden diese Arbeiten eine gute Grundlage für den Aufbau eines wirtschaftlichen Phloretin-Produktionsprozesses und liefern zahlreiche Hinweise im Hinblick auf mögliche weitere Prozessoptimierungen.

6 Anhang

6.1 Übersicht der betreuten Masterarbeiten

In Kapitel 4.1, 4.2 und 4.3 sind teilweise Ergebnisse dargestellt, die während der Zusammenarbeit mit Steffen Hartwig entstanden und Bestandteil der Masterarbeit „Produktion rekombinanter Enzyme für Flavonoid-Biotransformationen, (2011)“ waren. Kapitel 4.3 und 4.4 enthält teilweise Ergebnisse, die während der Masterarbeit „Optimierung der Kultivierungsbedingungen eines transgenen *E. coli* Stammes für die Flavonoid-Biotransformation, (2012)“ in Zusammenarbeit mit Christian Schwarz durchgeführt wurden.

Schließlich sind in Kapitel 4.4, 4.5 und 4.7 teilweise Experimente gezeigt, die während der Zusammenarbeit mit Philipp P. Grünert im Rahmen der durch den Autor betreuten Masterarbeit „Entwicklung eines Bioprozesses zur Flavonoid Transformation, (2012)“ durchgeführt wurden.

6.2 Zusätzliche experimentelle Daten

Im Folgenden sind zusätzliche Ergebnisse dargestellt, auf die i.d.R. im Abschnitt 4 verwiesen worden ist.

6.2.1 Anaerobe Inokulationsapparatur und weitere Daten aus anaeroben Kultivierungen

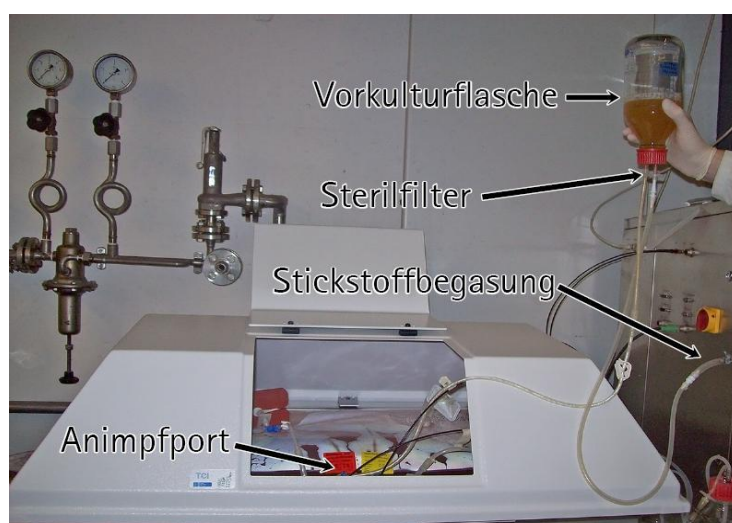


Abbildung 60: Darstellung der entwickelten anoxischen Schlauchbrücke zur Inokulation des Beutelreaktors.

Mit der Apparatur kann direkt, ohne die Verwendung von Spritzen, aus den 1.000 ml Druckausgleichsflaschen angeimpft werden. Dazu wurde eine Kanüle steril über einen Schlauch mit dem Luer-Lock Anschluss des Animpfports verbunden. Die Kanüle wurde durch das Septum der Flasche gestochen und die Vorkultur floss aufgrund der Schwerkraft und dem durch *E. ramulus* aufgebauten Gasdruck in den Reaktor. Da nach kurzer Zeit ein Unterdruck in der Flasche entstehen würde, musste durch eine zweite Kanüle durch einen Sterilfilter mit Stickstoff begast werden. Die Inokulation kann mit dieser Methode, im Vergleich zur Inokulation über 100 ml Spritzen, ca. fünfmal schneller erfolgen. Dies bringt erhebliche Vorteile mit sich, da die Vorkulturen nicht so stark auskühlen und auch weniger Scherstress ausgesetzt sind. Das Verfahren ist in obiger Abbildung dargestellt.

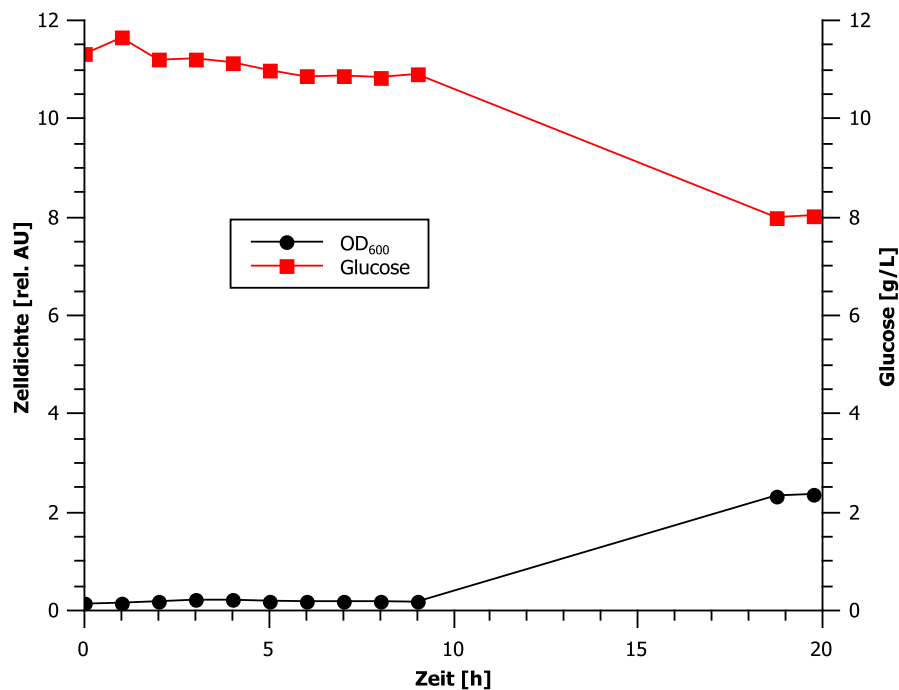


Abbildung 61: Verlauf von Glucose und Zelldichte einer anaeroben Beutelkultivierung im 50 L Maßstab.

6.2.2 Weitere Ergebnisse zu *P. pastoris*

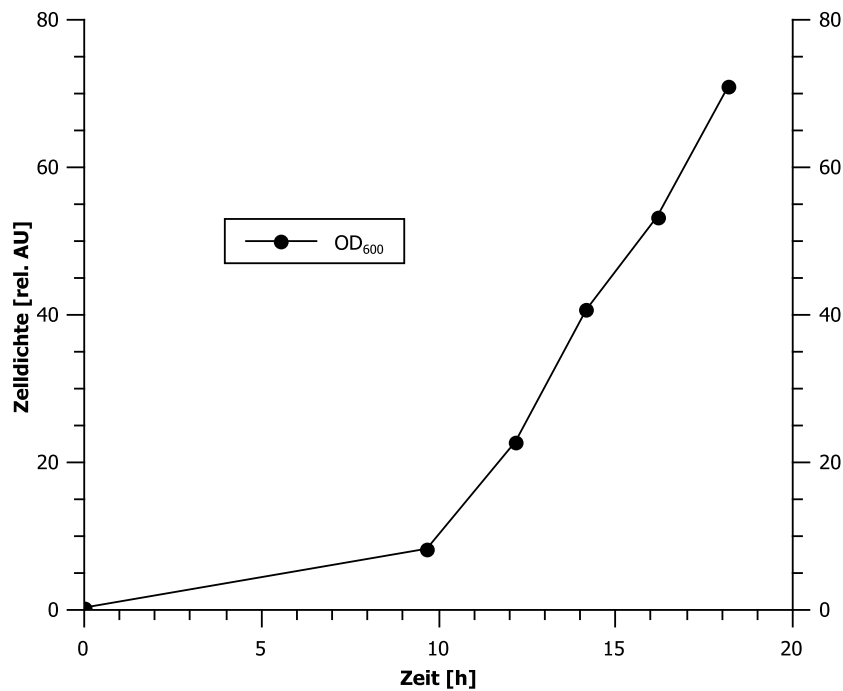


Abbildung 62: Verlauf einer *P. pastoris* Kultivierung in BMGY-Medium mit 2% Glycerin.

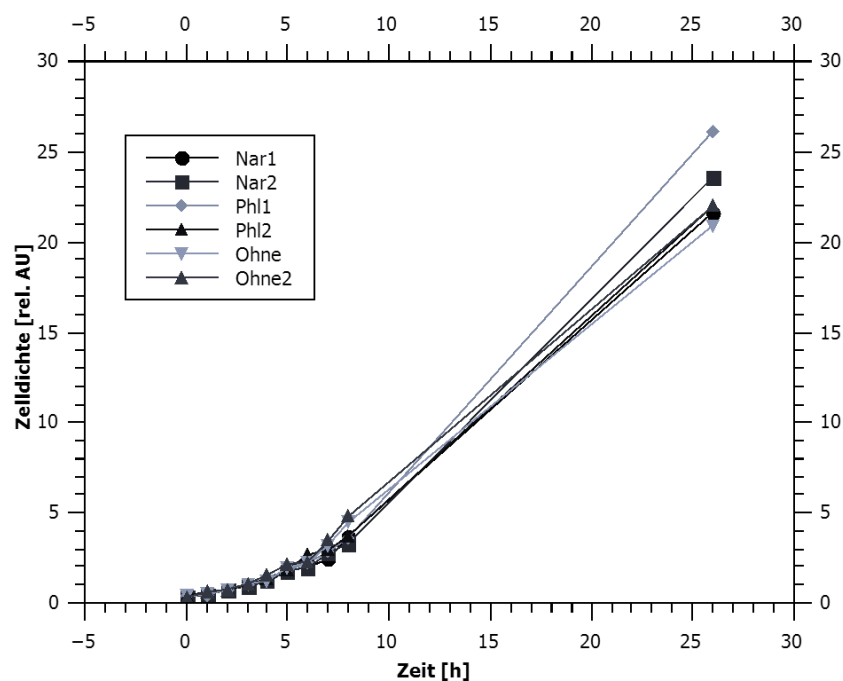


Abbildung 63: Verlauf der Zelldichten über die Zeit von *P. pastoris* Kultivierungen unter Zusatz von 0,06 g/L Naringenin, bzw. Phloretin und Kontrolle ohne Zusatz.

Beispielhaft sind im Folgenden zwei Verläufe der Enzymaktivitätstests gezeigt. Diese sind exemplarisch, da die Werte für *P. pastoris* und die Positivkontrolle immer sehr ähnlich waren.

Tabelle 4: Aktivitätstest mit *P. pastoris* CHI. HPP konnte nicht detektiert werden.

Zeit [min]	Naringenin [g/L]	Phloretin [g/L]
0	0,0095	0
5	0,0097	0
40	0,0092	0

Tabelle 5: Aktivitätstest: Positivkontrolle mit *E. ramulus* Zelllysat.

Zeit [min]	Naringenin [g/L]	Phloretin [g/L]	HPP [g/L]
0	0,0111	0	0
5	0,0024	0,002	0,0184
40	0,0011	0,005	0,018

6.2.3 Ergebnisse der Aktivitätstest mit *E. coli* Rosetta

Beispielhaft sind im Folgenden zwei Verläufe der Enzymaktivitätstests gezeigt. Diese sind exemplarisch, da die Werte für *E. coli* (CHI und CHI_ERED) und die Positivkontrolle immer sehr ähnlich waren.

Tabelle 6: Ergebnisse Aktivitätstest für *E. coli* Rosetta CHI_ERED.

Zeit [min]	Naringenin [g/L]	Phloretin [g/L]	HPP [g/L]
0	0,012	0	0
5	0,0133	0	0
40	0,0122	0	0

Tabelle 7: Positivkontrolle des Aktivitätstest mit *E. ramulus*

Zeit [min]	Naringenin [g/L]	Phloretin [g/L]	HPP [g/L]
0	0,0122	0	0
5	0,0029	0,0025	0,0104
40	0,0021	0,0022	0,0084

6.2.4 Weitere SDS-Gele

Die folgenden SDS-Gele sind teilweise aus den unter 6.1 genannten Masterarbeiten entnommen.

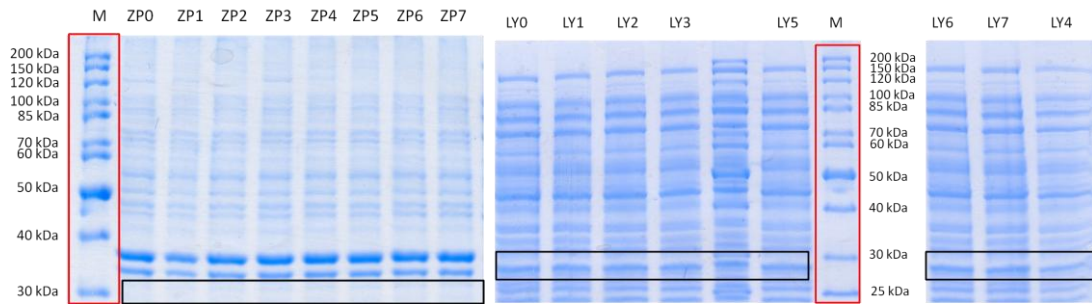


Abbildung 64: SDS-Gele bei 0,5 mM IPTG / 25 °C / 0,27 g/L Naringenin. LY = Zelllysat, ZP = Zellpellet. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.).

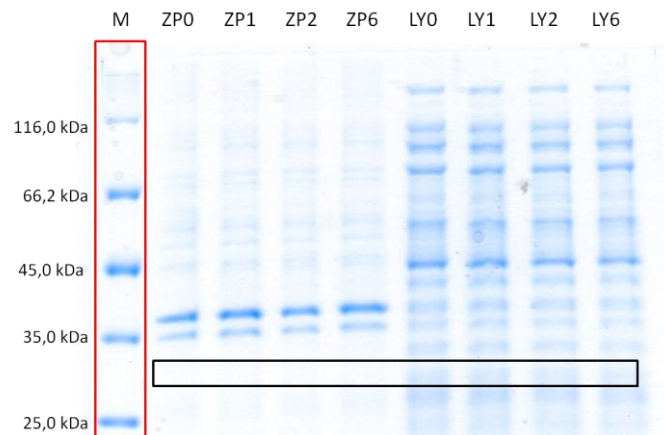


Abbildung 65: SDS-Gel bei 2 mM IPTG / 25 °C / 0,27 g/L Naringenin. LY = Zelllysat, ZP = Zellpellet. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.).

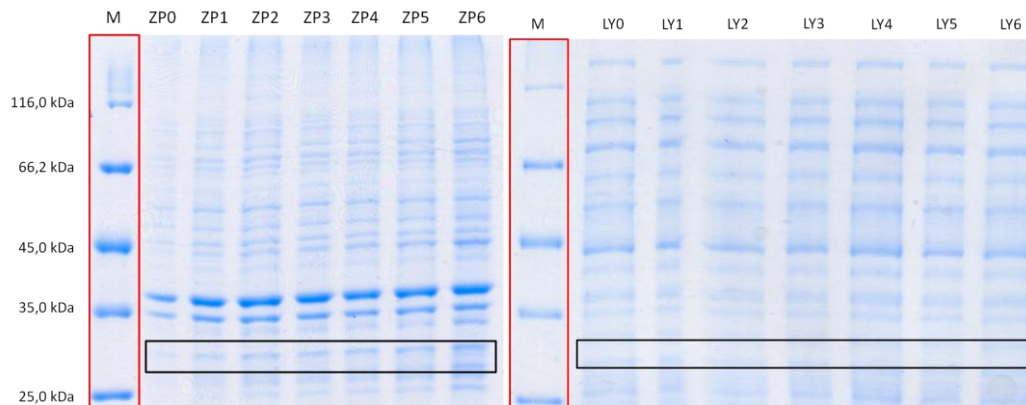


Abbildung 66: SDS-Gele bei 1 mM IPTG / 20 °C / 0,27 g/L Naringenin. LY = Zelllysat, ZP = Zellpellet. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.).

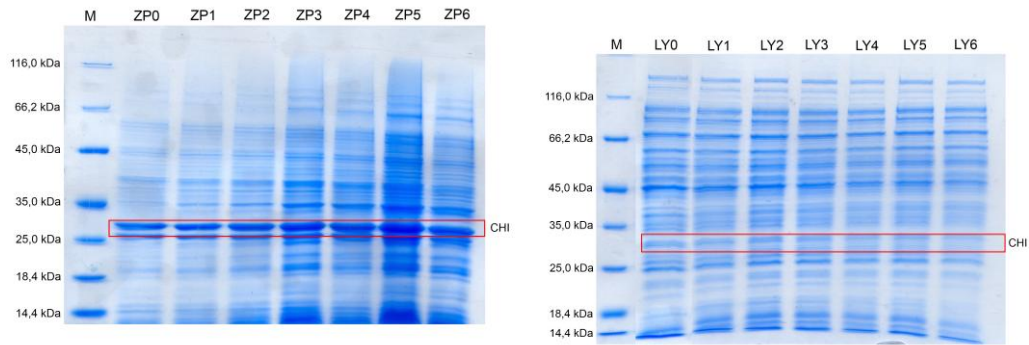


Abbildung 67: SDS-Gele bei 0,5 mM IPTG / 30 °C / 0,54 g/L Naringenin. LY = Zelllysate, ZP = Zellpellet. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.).

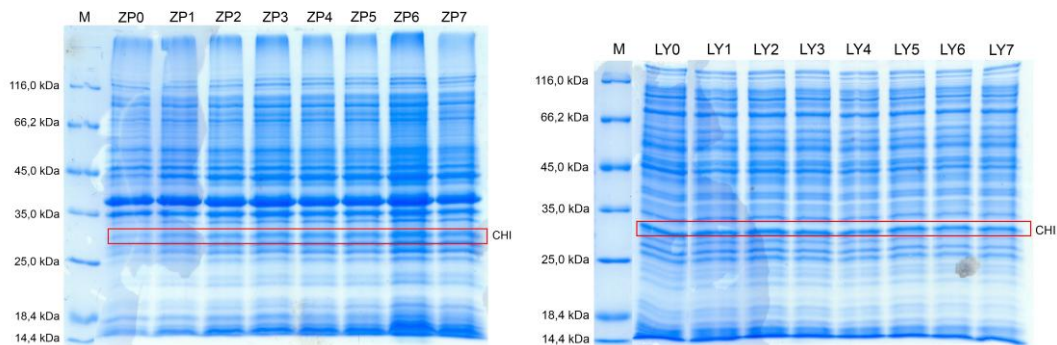


Abbildung 68: SDS-Gele bei 0,5 mM IPTG / 30 °C / 0,81 g/L Naringenin. LY = Zelllysate, ZP = Zellpellet. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.).

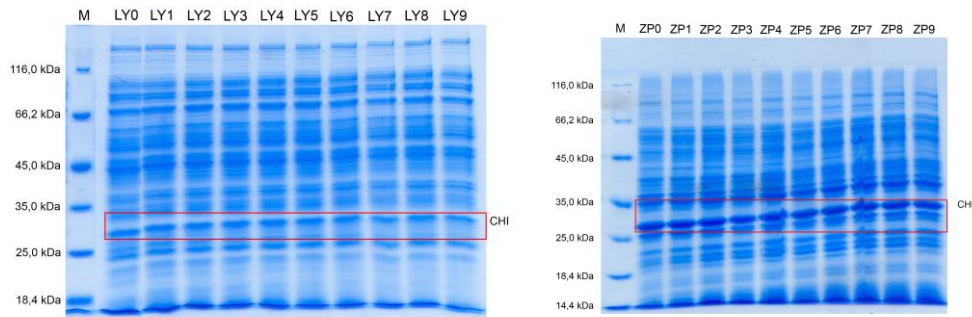


Abbildung 69: SDS-Gele bei 0,5 mM IPTG / 30 °C / 1,08 g/L Naringenin. LY = Zelllysate, ZP = Zellpellet. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.).

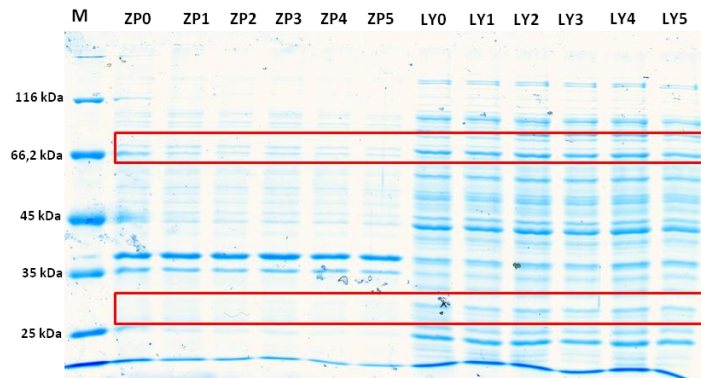


Abbildung 70: SDS-Gel bei 0,5 mM IPTG / 30 °C / 0,54 g/L Naringenin in LB-Medium. LY = Zelllysate, ZP = Zellpellet. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.).

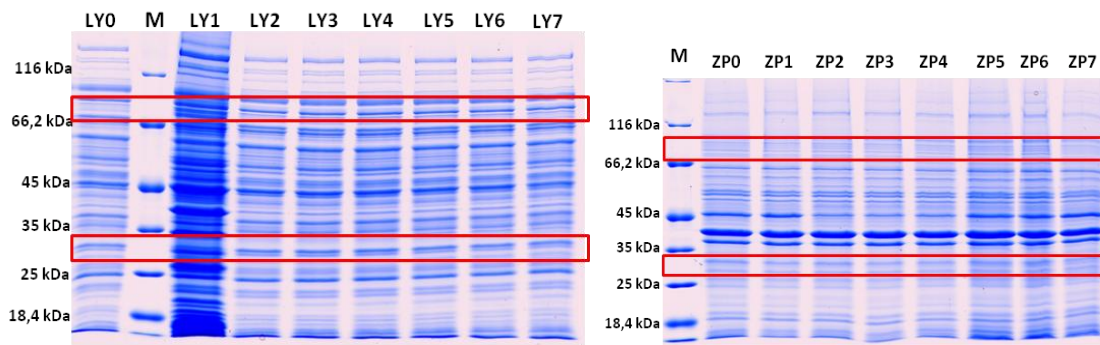


Abbildung 71: SDS-Gele bei 0,5 mM IPTG / 30 °C / 0,54 g/L Naringenin im 10 L Maßstab. LY = Zellysate, ZP = Zellpellet. Jeweils stündliche Abstände zwischen den Proben (LY0 = 0 h, LY1 = 1 h usw.).

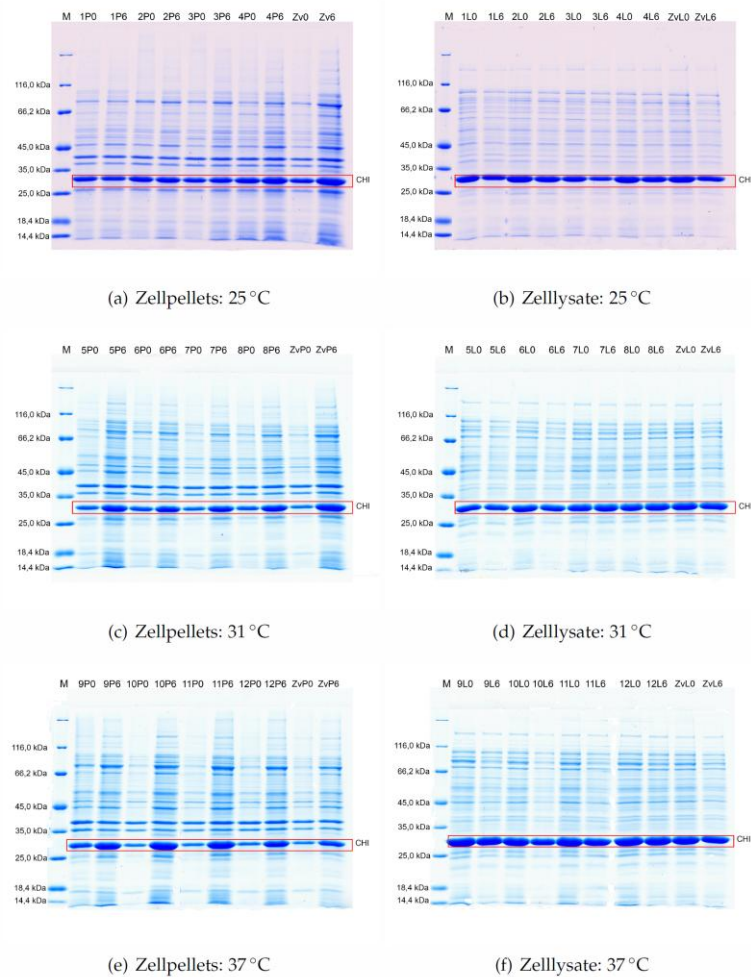


Abbildung 72: SDS-Gele aus den DoE-Versuchen (Kapitel 4.4.9).

6.2.5 Wachstumskurven *E. coli* CHI_ERED

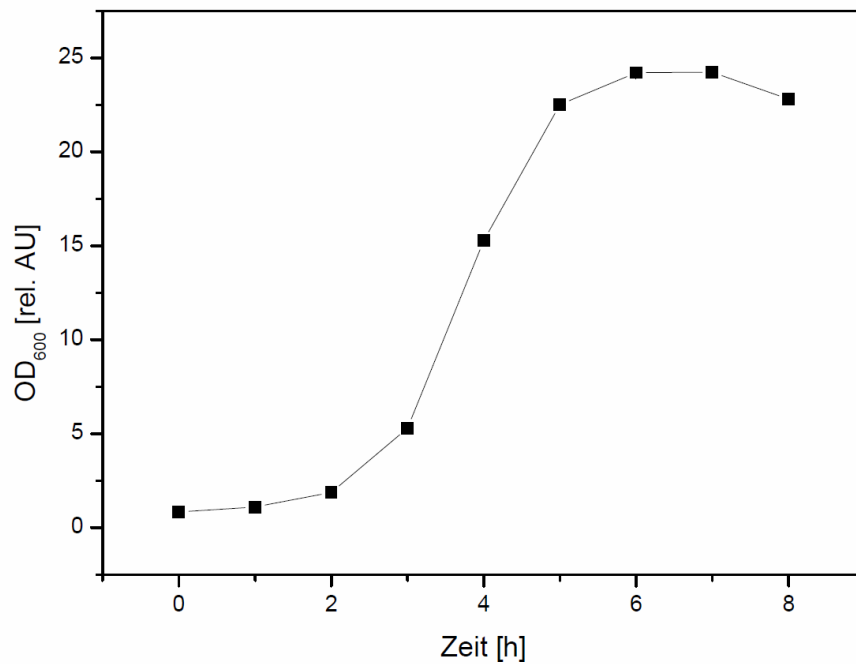


Abbildung 73: Wachstumsverlauf von *E. coli* CHI_ERED im 10 L Reaktor bei 37 °C.

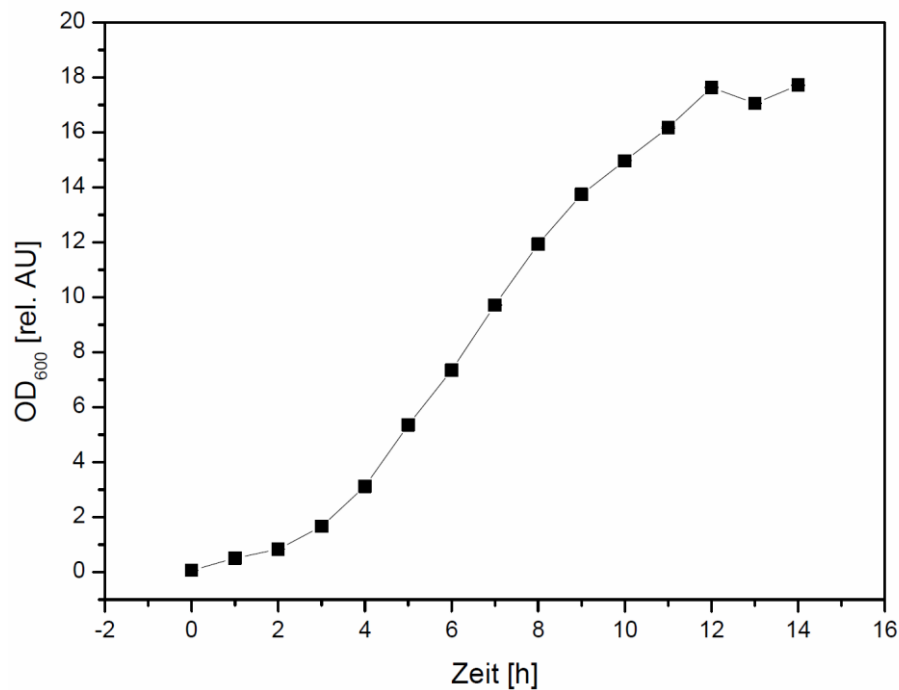


Abbildung 74: Wachstumsverlauf von *E. coli* CHI_ERED im Schüttelkolben bei 30 °C. $\mu_{\max} = 0,63 \text{ h}^{-1}$

6.2.6 Weitere Erläuterungen zu den DoE-Versuchen

Die folgenden Erläuterungen geben nähere Informationen zu den Experimenten, in denen mit der statistischen Versuchsplanung (DoE) gearbeitet wurde. Die folgenden Abschnitte (6.2.6) sind direkt aus der durch den Autor betreuten Masterarbeit

„Entwicklung eines Bioprozesses zur Flavonoid-Transformation“ von Philipp P. Grünert (2012, Institut für Technische Chemie) übernommen.

Zu Kapitel 4.4.9:

Der Versuchsplan wurde in Form eines Box-Behnken-Designs entworfen, da derartige Designs bei drei Faktoren und drei Stufen einen geringeren Versuchsumfang aufweisen als CC-Designs. Die drei Stufen der variierten Faktoren wurden jeweils wie folgt festgelegt:

Temperatur: 25°C, 31°C und 37°C

IPTG-Konzentration: 0,1mM, 0,55mM und 1,0mM

Zeitpunkt der Substratzugabe: nach 0h, 2h und 4h

Der Versuchsplan wird vom Programm MODDE (Umetrics, Schweden) automatisch in randomisierter Form angelegt. Die Durchführung erfolgte allerdings aus praktischen und zeitlichen Gründen in drei Blöcken. Die Blockung erfolgte anhand der Temperaturstufen. Es wurde parallel zu jedem Block ein Zentralversuch durchgeführt. Es wurde darauf geachtet, sämtliche sonstige Faktoren möglichst konstant zu halten (z.B. die verwendeten Schüttelinkubatoren).

Durchführung und Ergebnisse des Box-Behnken-Versuchsplans zur Optimierung des Biotransformationsprozesses

Nr. - Temperatur [°C] - IPTG-Konzentration [mM] - Substrat-Zugabe-Zeitpunkt [h] - Ausbeute [%] - Reaktionszeit [h]

1	25	0,55	0	35,76	4
2	25	0,10	2	50,70	2
3	25	1,00	2	23,96	3
4	25	0,55	4	46,01	3
5	31	0,10	0	55,91	2
6	31	1,00	0	50,00	2
7	31	0,10	4	54,87	2
8	31	1,00	4	57,99	1
9	37	0,55	0	20,14	2
10	37	0,10	2	63,37	2
11	37	1,00	2	23,96	3
12	37	0,55	4	22,92	2
ZVI	31	0,55	2	41,15	2
ZVII	31	0,55	2	49,13	2
ZVIII	31	0,55	2	57,12	3

In den Haupteffekt-Diagrammen, welche aus den Rohdaten erstellt wurden, konnten eindeutige Trends erkannt werden. Bei der mittleren Stufe der Temperatur (31°C) ist zu erkennen, dass die Ausbeute maximiert und die Reaktionszeit minimiert wurde, was dem gesetzten Ziel entsprach. Aus dem Effekt der IPTG-Konzentration wurde

ersichtlich, dass bei der niedrigsten Stufe (0,1mM IPTG) die maximale Ausbeute und die minimale Reaktionszeit erreicht wurden. Eine Variation des Zeitpunktes der Substratzugabe wirkte sich weniger stark auf die Ausbeute und die Reaktionszeit aus. Jedoch entsprach der erhaltene Trend den Annahmen. Wird das Substrat in Bezug auf den Zeitpunkt der Induktion verzögert zugegeben, werden eine höhere Ausbeute und eine Verkürzung der Reaktionszeit erreicht. Wird die Zeit zwischen Induktion und Substratzugabe auf mehr als 2h verlängert, wird die Ausbeute nur noch geringfügig erhöht. Erfolgt die Substratzugabe 4h nachdem induziert wurde, kann in Relation zu einer Substratzugabe nach 2h eine weitere Verkürzung der Reaktionszeit erreicht werden. Anscheinend ist es also -- basierend auf den experimentellen Ergebnissen -- am besten, wenn der Prozess mit einer IPTG-Konzentration von 0,1mM für die Induktion und bei einer Temperatur von 31°C durchgeführt wird, sowie das Substrat 2h nach der Induktion zugegeben wird. Die Ergebnisse wurden außerdem über multilineare Regression und statistisch ausgewertet.

Als zu optimierende Größen wurden die Produktausbeute (in %) und Reaktionszeit, also die Zeit bis eine konstante Phloretinkonzentration erreicht wurde (in h), für die Regression festgelegt. Die gemessenen Ausbeuten sind nicht normalverteilt. Es wurde keine Transformation der Größen vorgenommen, da keine Transformation zu einer Normalverteilung führte. Die erhaltenen Reaktionszeiten sind hingegen normalverteilt.

Bei der Optimierung beider Modelle wurden alle nicht signifikanten Terme entfernt. Als statistisch signifikante Terme wurden die Temperatur und ihr Quadrat, sowie die IPTG-Konzentration und ihr Quadrat in dem Ausbeutemodell belassen. Der Zeitpunkt der Substratzugabe hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf diese Antwortgröße. Es gibt keine signifikanten Wechselwirkungen. Der Residual-Normal-Probability-Plot zeigte keine Ausreißer. Kein Experiment musste für die Auswertung ausgeschlossen werden. Bei der Optimierung des Modells für die Reaktionszeit wurden alle Koeffizienten bis auf die Temperatur und ihren quadratischen Term ausgeschlossen, da alle Faktoren keinen statistisch relevanten Einfluss auf die Zielgröße aufwiesen, dies bei der Temperatur jedoch am wenigsten eindeutig ausfiel. Es wurden keine Ausreißer bzgl. des Reaktionszeit-Modells aufgezeigt.

Für das Ausbeute-Modell ergaben sich als Koeffizienten -3,256 (Temperatur), -15,918 (Quadrat der Temperatur), -8,617 (IPTG-Konzentration) und 7,567 (Quadrat der IPTG-Konzentration). Statistisch signifikant sind nur die IPTG-Konzentration und das Quadrat der Temperatur. Da das Quadrat der Temperatur in die Funktion einging wurde der lineare Term ebenfalls in der Reaktion belassen. Da sowohl Q^2 (Vorhersagegüte des Modells) als auch R^2 (Bestimmtheitsmaß des Modells) durch den Ausschluss des Quadrats der IPTG-Konzentration verschlechtert wurden, wurde das Quadrat der Temperatur ebenfalls im Modell belassen, obwohl es statistisch nicht signifikant ist. Die Koeffizienten des Reaktionszeit-Modells lauten -0,375 (Temperatur) und 0,625

(Quadrat der Temperatur). Einzig die Temperatur wurde sowohl für die Ausbeute als auch für die Reaktionszeit als signifikanter Einfluss erkannt.

Eine finale Einschätzung der Güte der Modelle liefern die zugehörigen Zusammenfassungen der Gütekennzahlen. Das Bestimmtheitsmaß R^2 spiegelt die Güte des Modells wider, wobei ein Ergebnis von „1“ eine perfekte Anpassung bedeutet. Q^2 ist die Vorhersagegüte des Modells und erlaubt eine Aussage über die Stabilität des Modells bzw. seine Tendenz zur Überanpassung (Overfitting). Dieser Wert ist sehr sensibel und stellt damit ein wichtiges Gütekriterium eines Modells dar. Die Modellvalidität ist das Ergebnis aus einem Test auf verschiedene Modellprobleme wie z.B. Ausreißer, Transformationsprobleme oder die Korrektheit eines Modells. Werte, die geringer als 0,25 sind, weisen auf diese statistisch signifikanten Modellprobleme hin. Die Wiederholbarkeit ist eine Kennzahl für die Reproduzierbarkeit und wird aus den Zentralversuchen unter identischen Bedingungen bestimmt.

Die Optimierung wurde mit dem Ziel einen möglichst hohen Q^2 -Wert zu erhalten durchgeführt. D.h. es wurden Modelle mit möglichst hoher Vorhersagegüte angestrebt. Vor der Optimierung, also bevor nicht signifikante Faktoren ausgeschlossen wurden, wies das Ausbeute-Modell ein R^2 von 0,862, ein Q^2 von -0,621, eine Modellvalidität von 0,786 und eine Reproduzierbarkeit von 0,703 auf. Die Reproduzierbarkeit ist relativ niedrig. Das ist mit den Abweichungen der an unterschiedlichen Tagen durchgeführten Zentralversuche zu begründen. Es wurde eine maximale Vorhersagegüte von 0,0697 erhalten. Bei der Optimierung wurde das Bestimmtheitsmaß auf einen Wert von 0,633 gesenkt. Die Ausbeute ist demnach durch das reduzierte Modell etwas schlechter bestimmt als durch das vollständige Modell. Die Modellvalidität wurde ebenfalls geringfügig auf einen Wert von 0,764 gesenkt. Die Verringerung spricht dafür, dass die experimentellen Daten durch das optimierte Modell noch in ähnlichem Maße wieder gegeben werden wie durch das vollständige Modell. Das Vorhandensein statistisch signifikanter Modellprobleme ist unwahrscheinlich. Ausreißer sind durch den dennoch relativ niedrigen Wert auszuschließen. Die unzureichend mögliche Transformation der Daten wurde als Ursache angenommen. Die Vorhersagegüte Q^2 konnte nur auf einen geringfügig höheren Wert gesteigert werden. Die Vorhersagepräzision ist deshalb als gering einzuschätzen.

Bevor die statistisch unsignifikanten Faktoren aus dem Reaktionszeit-Modells ausgeschlossen wurden ergaben sich ein R^2 von 0,602, einen Q^2 von -4,114, eine Modellvalidität von 0,717 und eine Reproduzierbarkeit von 0,364. Die niedrige Reproduzierbarkeit lässt sich einzig durch die Varianz der erhaltenen Reaktionszeiten der Zentralversuche erklären. Das optimierte Modell weist mit einem R^2 -Wert von 0,352 eine verringerte Bestimmtheit auf, beschreibt also die experimentellen Daten schlechter als das unoptimierte Modell. Die Modellvalidität wurde auf einen Wert von 0,841 gesteigert. Ein Vorhandensein statistisch signifikanter Probleme ist damit unwahrscheinlich. Die Vorhersagegüte konnte durch die Optimierung auf -0,038 erhöht

werden. Da der Wert dennoch im negativen Bereich liegt ist das Modell als instabil einzuschätzen. Das ist u.a. damit zu begründen, dass ein dreidimensionales System mit nur zwei anstelle von drei Größen beschrieben wird.

Zu Kapitel 4.5.2:

Als mögliche Parameter, die Einfluss auf die Racemisierung des Naringenins haben könnten, wurden der pH-Wert im Reaktorüberstand, die Temperatur und die Zeit vermutet. D.h. die Auswirkung eines erhöhten pH-Wertes des Reaktorüberstandes, bei verschiedenen Temperaturen, über die Zeit musste analysiert werden. Um auch mögliche Interaktionen und nicht lineare Effekte der drei Faktoren analysieren zu können, wurde die Reracemisierung des (-)-Naringenins zum (+)-Naringenin in Form eines DoE-Versuchs untersucht. Der Versuchsplan wurde in Form eines Box-Behnken-Designs mit drei Faktoren auf drei Stufen entworfen. Die drei Ausprägungen der Faktoren Temperatur (in °C), pH-Wert und Reaktionszeit (in min) wurden jeweils wie folgt festgelegt:

Temperatur 30°C, 45°C und 60°C

pH-Wert pH 7, pH 8 und pH 9

Reaktions-Temperatur 0, 120 und 240

Von dem Design abweichend erfolgten zwei Experimente über andere Reaktionszeiten. Trotz dieser Abweichungen flossen die entsprechenden Experimente in die Auswertung mit ein. Es handelt sich um die beiden Experimente 6 (pH = 9, 45°C, 200) und 14 (pH=8, 45°C, 160). Die Durchführung erfolgte in randomisierter Reihenfolge (siehe folgende Tabelle).

Nr. - Reihenfolge - pH - Temperatur - Reaktionszeit - (+)-Naringenin [%]- (-)-Naringenin [%]- Phloretin [ppm]

1	2	7	30	120	10,46	89,54	174,0
2	11	9	30	120	35,06	64,94	90,50
3	5	7	60	120	52,50	47,50	50,50
4	12	9	45	0	8,53	91,47	131,5
5	1	7	45	0	1,62	98,38	198,5
6	14	9	45	200	49,14	50,86	67,50
7	3	7	45	240	50,23	49,77	81,00
8	13	9	60	120	52,52	47,48	21,00
9	4	8	30	0	1,96	98,04	206,5
10	7	8	60	0	2,83	97,17	191,0
11	6	8	30	240	31,35	68,85	121,0
12	9	8	60	240	52,44	47,56	0,000
13	8	8	45	120	50,03	49,97	74,50
14	15	8	45	160	52,66	47,34	15,50

15 10 8 45 120 50,07 49,93 80,50

Als Zielgrößen wurden der prozentuale Anteil von (+)-Naringenin und die Phloretinkonzentration (in ppm) gewählt. Die Versuchsergebnisse der Zielgrößen sind gegen die Faktoren in der Abbildung... dargestellt. Das Konfidenzintervall liegt in jedem Fall bei 95%.

Die Naringeninracemisierung und Phloretinkonzentration zeigten keinen linearen Verlauf mit steigender Reaktionszeit. Es wird aus thermodynamischer Sicht angenommen, dass sich das Gleichgewicht nach ca. 160 eingestellt hat und im weiteren Verlauf tatsächlich konstant bleibt, d.h. keine Veränderung des Enantiomeren-Verhältnisses stattfindet. Der Verlauf der Zielgrößen ist linear abhängig von der Temperatur, weswegen die Temperatur linear in die Modelle einging. Es war ein schwacher Effekt des pH-Werts auf die Flavonoidkonzentration festzustellen. Mit Erhöhung des pH-Werts werden die Konzentrationen von Naringenin und Phloretin zunehmend geringer. Der pH-Wert ging allerdings nicht in die Modelle ein, da sein Effekt statistisch nicht relevant war.

Der Versuchsplan wurde über multilinare Regression ausgewertet. Als zu optimierende Größen wurden (+)-Naringenin (in %) und Phloretin (in ppm) festgelegt. Die gemessenen Antwortgrößen sind nicht normalverteilt. Es wurde keine Transformation der Größen vorgenommen, da keine Transformation gefunden werden konnte, die zu einer Normalverteilung führte.

Bei der Optimierung beider Modelle wurden alle nicht signifikanten Terme entfernt. Als statistisch signifikante Terme wurden die Temperatur, die Reaktionszeit und ihr Quadrat belassen. Der pH-Wert ging nicht in die Modelle ein, da sein Effekt statistisch nicht signifikant ist. Es gibt keine signifikanten Wechselwirkungen. Bei der Optimierung des Modells für die Naringeninracemisierung wurde aufgrund des Residual Normal Probability-Plots Experiment 1 als Ausreißer erkannt und aus der Auswertung ausgeschlossen.

Für das (+)-Naringenin-Modell ergaben sich als Koeffizienten 6,434 (Temperatur), 20,413 (Reaktionsgeschwindigkeit) und -22,737 (Quadrat der Reaktionsgeschwindigkeit). Die Koeffizienten des Phloretin-Modells lauten -41,1875 (Temperatur), -58,6398 (Reaktionszeit) und 48,4151 (Quadrat der Reaktionszeit). Der Residual Normal Probability-Plot zeigte keine Ausreißer. Für beide Zielgrößen wurden bei der Auswertung des Versuchsdesigns dieselben Faktoren als relevant erkannt. Auch die Effektgrößen sind ähnlich verteilt, allerdings sind die Richtungen der Effekte für alle relevanten Faktoren gegenläufig. Den größten Einfluss auf das Versuchsergebnis hatte die Reaktionszeit. Mit steigender Reaktionszeit stieg der Anteil von (+)-Naringenin an. Der Anteil von Phloretin sank.

Für die Auswertung der Daten standen dafür lediglich zwei der drei durchgeführten Zentralversuche zur Verfügung, da das Experiment „cent-b“ eine vom Design

abweichende Reaktionszeit von 160 min statt der vorgesehenen 120 min aufwies. Die Optimierung des (+)-Naringenin-Modells führte dazu, dass der R²-Wert von 0,961 auf 0,960 sank. Q² stieg von anfänglich 0,365 auf 0,903. Damit wird die Güte des Modells deutlich, denn sowohl die Beschreibung der Daten als auch die Vorhersagefähigkeit des Modells sind als sehr gut einzuschätzen. Die Modellvalidität blieb unverändert bei einem Wert von 0,2 und die Wiederholbarkeit betrug 0,999.

Der hohe Wiederholbarkeits-Wert liegt in der sehr geringen Abweichung zwischen den Zentralversuchen „cent-a“ und „cent-c“ begründet. Der R²-Wert des Phloretin-Modells ist von anfänglich 0,941 auf einen Wert von 0,794 gesunken. Das Modell beschrieb die Daten demnach etwas schlechter als vor der Optimierung. Allerdings ist Q² von 0,409 auf 0,596 gestiegen, womit man bereits von einer guten Vorhersagepräzision des Modells ausgehen kann. Die Modellvalidität ist leicht von 0,431 auf 0,398 gesunken. Statistisch relevante Probleme können damit ausgeschlossen werden. Die Reproduzierbarkeit blieb unverändert bei 0,996.

6.3 Methoden

6.3.1 Allgemeine Techniken

Zur Bestimmung der OD₆₀₀ wurde die entnommene Kulturbrühe mit einer 0,9%igen Natriumchloridlösung soweit verdünnt, dass der gemessene Wert für die OD₆₀₀ immer ≤ 0,7 rel. AU war. Vor dem Messvorgang ist die verdünnte Brühe mithilfe eines Vortexers gründlich gemischt worden, um zu verhindern dass sich Zellen absetzen und das Ergebnis beeinflussen. Die Messung erfolgte bei Raumtemperatur gegen das Verdünnungsmedium (Saline) als Referenz, um einen konstanten Nullwert zu gewährleisten.

Die Glucosekonzentration wurde mit Hilfe eines YSI 2700 Select Analyzer bestimmt. Hierfür wurde zunächst die Probe für 10 min bei 4 °C/13.300 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, mit reinstH₂O 1:10 verdünnt und die Probe am Gerät vermessen.

Zur Bestimmung der Biotrockenmasse wurden jeweils 2 mL Probe entnommen und in ein tariertes 2 mL-Reaktionsgefäß überführt. Die Gefäße wurden hierfür vor der Ermittlung der Leergewichte im Trockenschrank vorgetrocknet. Das mit Saline gewaschene Pellet wurde über Nacht im Trockenschrank bei ca. 90 °C bis zur Massenkonstanz getrocknet und anschließend gewogen.

Die Zellernte erfolgte mittels einer Durchflusszentrifuge. Über eine Pumpe wurde die Kulturbrühe direkt aus dem Reaktorraum durch die Zentrifuge gepumpt. Es wurde zunächst bei 6.000 rpm/4 °C zentrifugiert, bis die Zentrifugalkammer vollständig mit

Kulturbrühe gefüllt gewesen ist. Dann wurde die Geschwindigkeit auf 17.000 rpm erhöht. Es wurde solange zentrifugiert, bis keine Kulturbrühe mehr in dem Reaktor vorhanden gewesen ist. Ein Rest von ca. 400 mL Kulturbrühe verblieb in der Zentrifugalkammer und ist verworfen worden. Die erhaltene Feuchtzellmasse wurde gewogen und anschließend bei -80 °C eingefroren.

6.3.2 Zellaufschluss

Die abzentrifugierte Biofeuchtmasse wird in 1,5 mL Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 6,4) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgt mit einer Ultraschallsonde (Amplitude = 100%, Zyklus = 0,6 s). Während des Aufschlusses müssen die Proben ständig mit Eis gekühlt werden. Die Zellsuspension wird 3x für 1,5min beschallt. Zwischen jeder Probenbeschallung wird die Suspension für 1 min auf Eis ruhen gelassen. Die aufgeschlossenen Zellen werden anschließend für 30 min bei 13.000 RPM zentrifugiert. Der resultierende Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wird in 400 µL Kaliumphosphat-Puffer resuspendiert.

6.3.3 HPLC Messungen

Für die HPLC-Analytik sind die zu vermessenden Proben zunächst für 10 min bei 13.300 rpm/4 °C zentrifugiert. Von dem Überstand wurden 300 µL zur Analytik abgenommen. Um die einzelnen Peaks des Chromatogramms voneinander unterscheiden und quantifizieren zu können, wurde eine Stammlösung mit jeweils 1 g/L Naringenin, Phloretin und HPP erstellt. Daraus wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt und mit der HPLC vermessen. Die Verdünnungsreihe hatte Konzentrationen von 1 g/L bis 0,01 g/L.

Für alle HPLC-Messungen wurden folgende Lösungen eingesetzt:

0,1%ige wässrige Essigsäurelösung → Eluent A

100% Acetonitril → Eluent B

Die Lösungen wurden vor dem Benutzen im Ultraschallbad entgast. Die Messungen wurden bei 40 °C und einer Flussrate von 1,3 mL/min durchgeführt. Das Injektionsvolumen betrug 5 µL. Über einen Dioden-Array-Detektor wurde ein UV-Spektrum aufgenommen, die Absorptionen bei 280 nm wurden zur Identifikation und Quantifizierung herangezogen. Das in VERWEIS dargestellte HPLC-Gradientenprogramm wurde benutzt.

Tabelle 8: Verwendetes HPLC-Gradientprogramm [3].

Zeit [min]	Eluent A in %	Eluent B in %
0	90	10
2,5	90	10
15	60	40
17	0	100
20	0	100
20,1	90	10
23	90	10

6.3.4 Enzymaktivitätstest

Als Nachweis für die Aktivität der CHI wurde ein Aktivitätstest mit anschließender HPLC-Analytik durchgeführt. 1 mL der jeweiligen Zellkultur wird mit einer Ultraschallsonde aufgeschlossen. Nach einem Zentrifugationsschritt von 60min bei 4°C und 15.000 RPM wird der Rohextrakt (Überstand) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Hierzu wurden 1 mL Probenvolumen mit 10 µL Naringenin (20 mM gelöst in DMSO) und 10 µL NADH (10 mM gelöst in Wasser) in einem Thermoschüttler bei 37 °C inkubiert. Zum Startzeitpunkt (0 min), nach 5 min und nach 40 min wurden 200 µL Probe entnommen. Diese wurden sofort nach der Entnahme mit 200 µL eiskaltem MeOH versetzt um die Enzymreaktion zu stoppen. Die mit Methanol versetzte Probe wurde für 24 h bei -20 °C aufbewahrt. Die gekühlten Proben mit den ausgefällten Enzymen werden für 60 min bei 4 °C abzentrifugiert und die Überstände mit einer HPLC vermessen.

6.3.5 Ethylacetatextraktion

1mL der jeweiligen Zellkultur wird 2x mit je 300µL Ethylacetat versetzt. Nach jeder Zugabe wird die Probe geschüttelt und für wenige Sekunden bei 15.000 RPM zentrifugiert. Die gesamte organische Phase (ohne die Interphase) wurde in einer Vakuumzentrifuge bei 40 °C verdampft. Das gebildete Pellet wird anschließend mit 1.000 µL Methanol versetzt. Ein Injektionsvolumen von 5 µL wird in der HPLC direkt vermessen.

Für die Untersuchung der Naringeninracemisierung wurde mittels MTBE aus Reaktorüberständen extrahiert. Es wurden 1,8 mL Methyl-tert-Butylether zu 1,8 mL Probe gegeben. Beide Phasen wurden durch Schütteln gemischt. Die wässrige Phase wurde abgepumpt. Das MTBE wurde anschließend mit Natriumsulfid getrocknet und durch ein Baumwollwatte abpipettiert. Durch die Watte wurde die Probe gefiltert und eine Aufnahme des Natriumsulfids verhindert. Die Extrakte wurden in einem Zentrifugalevaporator verdampft. Das als Rückstand erhaltene Naringenin und Phloretin wurde in 1,8mL Methanol gelöst und in der HPLC analysiert.

Für die chirale Analytik wurden 5,0 g der wässrigen Probe 2 x mit etwa je 5 ml Ethylacetat bei RT ausgeschüttelt. Die Ethylacetatphasen wurde vereinigt und das Lösemittel unter Vakuum abgedampft. Der Niederschlag (TS = 9,28 / 10,2 / 17,37 / 16,02 / 10,96 / 14,34 / 18,53 / 13,35 mg) wurde in Isopropanol resuspendiert und über eine chirale HPLC-Säule bei Fa. Symrise AG analysiert.

6.3.6 SDS-PAGE und Färbungen

Nachdem das Polyacrylamid-Gel auspolymerisiert ist (die Rezepte für die verwendeten Trenn- und Sammelgele finden sich unter 6.4.5) werden Proben und Lämmli-Puffer zu gleichen Teilen miteinander vermischt (jeweils bspw. 15 µL) und auf dem Schüttler bei 95 °C für 10 min aufgeköcht. Danach sind die Proben für das Auftragen auf das Gel bereit. Bei Gelen mit zehn Taschen wurden 7 µL des Proteinmarkers und 10 µL der Proben aufgetragen. Bei Gelen mit 15 Taschen wurden 4 µL des Proteinmarkers und 7 µL der Proben aufgetragen. Die Gele werden in die Elektrophoresekammer eingesetzt und die Elektrophoresekammer bis zu der der Anzahl der Gele entsprechenden Markierung mit SDS-Laufpuffer gefüllt (1 x TGS-Puffer). Das Stacking erfolgt bei 100V innerhalb eines Zeitraums von bis zu 30 min. Anschließend wird die Spannung auf 200V erhöht. Die gelelektrophoretische Auftrennung wird beendet kurz bevor die Lauffront die untere Gelgrenze erreicht.

Das Gel wird nach Beendigung der elektrophoretischen Auftrennung dreimal in reinstH₂O gewaschen. Das Gel wird anschließend über Nacht (min. 3 h) in der Färbelösung, auf dem Schüttler inkubiert. Die Färbung erfolgte nach dem Protokoll des Blue Silver Stains nach Candiano et al., 2004 (Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B & Righetti, P. G. (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 25(9), 1327-1333.). Ein separater Fixierschritt ist nicht notwendig, da die Fixierung ebenfalls in der Färbelösung stattfindet. Die Entfärbung erfolgt durch Waschen in reinstH₂O. Das Wasser wird solange ausgetauscht bis der Gel-Hintergrund komplett entfärbt ist. Die Entfärbung ist auch über Nacht durchführbar.

Silberfärbung: Das Gel wird für mindestens 30 min oder über Nacht in Fixierer-Lösung gelegt. Anschließend wird zweimal kurz für 5 min mit reinstH₂O gewaschen. Nun wird eine Farmers Reducer Lösung frisch angesetzt (1 Spatelspitze K₃[Fe(CN)₆] und 1 Spatelspitze Na₂SO₃ in 100mL reinstH₂O) und das Gel für 2,5 min darin inkubiert. Die Lösung wird verworfen und mehrere Male bis zur vollständigen Entfärbung mit ddH₂O gewaschen. Darauf folgt ein Inkubationsschritt für 30 min in

Silbernitrat-Lösung (ca. 0,1%; 1 kleine Spatelspitze Silbernitrat auf 100mL ddH₂O). Die Lösung wird im Anschluss entsorgt und zweimal für 30 s mit ddH₂O gewaschen. Nun kann das Gel mit Natriumcarbonat-Lösung (2,5% Na₂CO₃ in ddH₂O) kurz gespült werden. Zu 100 ml Natriumcarbonat-Lösung werden 500 µL Formaldehyd hinzupipettiert. Die erhaltene Lösung wird über das Gel gegossen und das Gel beobachtet. Sobald braune Proteinbanden erkennbar sind, wird die Lösung verworfen und die Reaktion mit 5%iger Essigsäure für 10 min abgestoppt.

6.3.7 2D-Gelelektrophorese

Als 2D-Gelelektrophoresesystem wird das Multiphor™ II Electrophoresis System verwendet. Für die erste Dimension, der Auftrennung nach dem pI der Proteine, werden vorgefertigte IEF-Gelstreifen (Immobiline™ DryStrip Kit) mit einem pHGradienten von pH 3 bis pH 10 herangezogen. 1 ml des Rehydrierungspuffers (Urea 6 mol/L, IPT Puffer 0,5 mM, CHAPS 2%, Bromphenolblau 0,002%, reinstH₂O ad 200mL) wird mit 2,8mg DTT versetzt. Davon werden 375 µL mit 25 µL der Zelllysatsprobe vermischt. Nun können 340 µL des Gemisches auf jeden IEF-Streifen gegeben werden. Die Proben diffundieren durch die Rehydrierung über 12 h direkt in die Gelmatrix des getrockneten Streifens. Zur isoelektrischen Fokussierung wird ein Gradientenprogramm angewendet. Zunächst von 500 mV innerhalb von 90 min auf 3.500 mV, dies wird für mind. 5 h gehalten.

Die fokussierten Gelstreifen müssen bei -20 °C für 12 h gelagert werden. Vor dem Gellauf der zweiten Dimension müssen die IEF-Streifen equilibriert werden. Zunächst werden 5 ml des Equilibrierungspuffers (Urea 6 mol/L, Tris-HCl pH 8,8 75 mM, Glycerin 29,3% (v/v), Bromphenolblau 0,002%, reinstH₂O ad 200mL) mit 50mg DTT versetzt, und der Streifen für 15 min in der Lösung equilibriert. Im Anschluss erfolgt ein zweiter Equilibrierungsschritt für 15 min in Iodacetamid-Lösung (5 ml des Equilibrierungspuffers mit 125mg Iodoacetamid). Für die zweite Dimension werden fertig gegossene homogene Polyacrylamid-Gele verwendet (ExcelGel™ 2D-Gel Homogeneous; 12,5%ig; von GE Healthcare, Großbritannien). Als Marker wird der PageRuler™ Proteinmarker (Fermentas, Deutschland) benutzt. Sobald die Bromphenolblau-Bande die untere Begrenzung des Gels erreicht hat, wird der Gellauf beendet und eine Silberfärbung durchgeführt.

6.3.8 Anaerobe Beuteltkultivierungen

Vor jeder Kultivierung wurden die verwendeten Beutel mit einem Gasgemisch (Stickstoff/Kohlenstoffdioxid 80:20) oder Stickstoff bis zu einer kompletten Füllung des Reaktionsraumes begast. Das Gas wurde danach mechanisch aus dem Beutel gedrückt.

Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis der Sauerstoffpartialdruck bei $\leq 4\%$ gewesen ist. Die verwendete Säure und die verwendete Base wurden anoxisch präpariert, indem diese zum kochen erhitzt wurden und während dessen begast worden sind (Stickstoff/Kohlenstoffdioxid 80:20). Das Medium für die Beutelkultivierungen wurde in Chargen zu ca. 2500 mL präpariert. Es wurde während es noch heiß gewesen ist über eine Pumpe und einen Sterilfilter (0,25 μm) in den Beutel gepumpt. Dabei wurden die Schläuche in einem Eisbad gekühlt, damit der Beutel nicht durch zu heißes Medium beschädigt werden konnte. Zur Inokulation wurden Einwegspritzen unter einer Sterilbank mit Vorkulturbrühe befüllt. Über diese erfolgte die Inokulation. Die Entnahme von Proben für die offline-Bestimmung von Glucose und OD₆₀₀ erfolgte über Einwegspritzen mit Luer-Lock-System.

6.3.9 Kultivierungen im 2 L, 10 L und 20 L Maßstab

Es wird eine erste Vorkultur (Vorkultur I) in 25 mL LB-Medium mit 2mL Gefrierkultur beimpft. Das Medium wird mit den entsprechenden Antibiotika-Lösungen versetzt. Vorkultur I wird für 5 h, bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Anschließend werden mit 2 mL aus Vorkultur I 100 mL LB-Medium angeimpft (Vorkultur II). Das Medium wird mit denselben Antibiotika-Konzentrationen angesetzt. Die Kultivierung erfolgt bei 30 °C und 150 rpm für 5 h, bis auf eine optische Dichte von 3 bis 3,5 rel. AU. Parallel wird der Reaktor mit 1,7mL TB-Medium vorbereitet. Zu den 1,7mL TB-Medium werden über eine Animpfgarnitur 200 mL 10 x Kaliumphosphat- Puffer gegeben. 2mL aller Antibiotikallösungen werden über ein Septum in den Reaktor überführt. Mit Vorkultur II wird der Reaktor über ein Septum auf einen Start-OD-Wert von 0,15 angeimpft. Die Reaktor-Kultivierung erfolgt bei 25 – 30 °C über Nacht. Der pH-Wert wird auf pH 7 geregelt. Die Begasung erfolgt mit 2 vvm Luft. Sobald eine optische Dichte von 12 bis 15 rel.AU erreicht ist, wird die Begasung von Luft auf Stickstoff umgeschaltet. Die Begasung wird so eingestellt, dass eine Leichte Blasenbildung zu erkennen ist. Anschließend wird mit IPTG induziert, das Naringenin als Substrat zugegeben und mit der Probennahme begonnen.

Für den 10 L- und 20 L-Maßstab wurden die Volumina entsprechend angepasst. Die Begasung mit Druckluft erfolgte technisch bedingt mit 1,5vvm statt 2,0 vvm.

6.3.10 Kultivierungen im 200 mL Maßstab

Die aerobe Wachstumsphase erfolgte in 1.000mL-Schüttelkolben mit Schikanen. Die Kulturbrühe wurde anschließend für die anaerobe Biotransformationsphase in eine Anaerobierflasche überführt. Dies geschah durch zügiges Gießen unter der Sterilbank. Die Flaschen wurden mit 80% N₂/20% CO₂ begast um anoxische Bedingungen zu

schaffen. Im 200 mL Maßstab konnte keine automatische pH-Regelung erfolgen. Der Rest der Prozessführung entsprach dem Vorgehen im 2 L-Maßstab.

6.4 Materialien

6.4.1 Verwendete Chemikalien

Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller, Land
3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure (HPLC-Standard)	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Acetonitril (HPLC-Grade)	VWR International, LLC, Deutschland
Agar	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Ammoniumsulfat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Ampicillin	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co.KG
Bromphenolblau	Merck KGaA, Deutschland
beta-Mercaptoethanol	Merck KGaA, Deutschland
2-Butanol	Carl Roth GmbH & Co.KG
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Coomassie Brilliant Blau G250	Merck KGaA, Deutschland
Cystein HCl	Merck KGaA, Deutschland
Cystin	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
D-Glukose Monohydrat	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Dikaliumhydrogenphosphat-trihydrat	Merck KGaA, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co.KG
EDTA-Dinatriumsalz	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Eisensulfat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Essigsäure (HPLC-Grade)	AppliChem GmbH, Deutschland
Ethanol	VWR International, LLC, Deutschland
Fleischextrakt	Biotechnica internacional S.A. DE C.V., Mexiko
Fleischpepton	Biotechnica internacional S.A. DE C.V., Mexiko
Glycin	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Glycerin	AppliChem GmbH, Deutschland
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co.KG
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Kaliumchlorid	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Deutschland

Kaliumhexacyanidoferrat(III)	Riedel de-Haen (Sigma-Aldrich), USA
Kanamycin	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Magnesiumsulfat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Mangansulfat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Methanol (HPLC-Grade)	Carl Roth GmbH & Co.KG
Methyl-tert-Butyl-Ether	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
NADH	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Naringenin	Symrise AG, Deutschland
Natriumchlorid	Merck KGaA, Deutschland
Natriumhydroxid	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Natriumphosphat	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Natriumsulfid	Merck KGaA, Deutschland
Natriumthiosulfat	Riedel de-Haen (Sigma-Aldrich), USA
PageRuler Protein Ladder	Fermentas GmbH, Deutschland
protein molecular weight marker 26610/26611, unstained	Thermo Fisher Scientific, USA
Phloretin	Symrise AG, Deutschland
Phosphorsäure	Merck KGaA, Deutschland
Polyacrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Proteosepepton	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Resazurin-Natriumsalz	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Salzsäure (HCl, konzentriert)	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Sodium Dodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Trypton	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Trypton/Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tween 80	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Yeast Nitrogen Base (YNB, ohne Aminosäuren, ohne Ammoniumsulfat)	Fluka (Sigma-Aldrich), USA
Zeocin	Invitrogen Corporation, USA

6.4.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Reaktionsgefäße, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Sterilfiler, Minisart 0,25 µm, Sartorius Stedim Biotech, Deutschland

Einmalspritzen, Omnifix, Braun, Deutschland

Einmalspritzen, Teruma Europe NV, Leuven

Halbmikroküvette, Sarstedt, Deutschland

Butylgummisepten, Ochs GmbH, Deutschland

Pipettenspitzen, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Zentrifugenröhrchen, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Einmalhandschuhe, Latex, Semperguard, Semperit AG Holding, Wien

Einmalhandschuhe, Nitril, Ansell Protective Products, Aalst

Alu-Bördelkappen, Ochs GmbH, Deutschland

6.4.3 Verwendete Geräte

Glucosemessgerät, YSI 2700 Select Analyzer, YSI incorporated, USA

Photometer, Multiskan Spectrum, Thermolabs, USA

Pipetten und Reaktionsgefäße, Eppendorf AG, Deutschland

Zentrifuge mit Kühlaggregat, Megafuge, 1.0 RS, Heraeus, ThermoScientific, USA

kontinuierliche Zentrifuge, Contifuge stratos, Heraeus, ThermoScientific, USA

Zentrifuge FRESCO17, Heraeus, ThermoScientific, USA

Analysenwaage, Analytik AC 210S, Sartorius Stedim Biotech, Deutschland

Dispensette, 100 mL, Brand, Deutschland

Crimp-Zange, Ochs GmbH, Deutschland

Vortex, Gemmy industrial corp., Taiwan

Zentrifuge Eppendorf 5415C, Eppendorf AG, Deutschland

Photometer UVICON922, Kontron Instruments

Autoclav, Systec V-150, Systec GmbH, Deutschland

HPLC, Hitachi Chromaster (VWR)

Interface Chromaster Box

Säulenofen Chromaster 5310

Pumpe Chromaster 5110

Autosampler Chromaster 5210

HPLC, Merck Hitachi HPLC System, Japan

Diode Array Detector L-7455

Interface D-7000

Säulenofen L-7350

Pumpe L-7100

Autosampler L-7200

HPLC-Säule, ZORBAX SB-C18, Agilent, USA

Gelelektrophoreseapparatur, Mini ProteanSystem, Biorad

Ultraschallschallsonde, LABsonic, Sartorius Stedim Biotech, Deutschland

IEF-Streifen und Puffer, Immobiline DryStrip Kit, Pharmacia Biotech, USA

Gelelektrophoreseapparatur, Multiphor II Flachbettssystem, Pharmacia Biotech, USA

Bioreaktor, BIOSTAT Cultibag RM optical, Sartorius Stedim Biotech, Deutschland

Bioreaktor, BIOSTAT C, Sartorius Stedim Biotech, Deutschland

Bioreaktor, BIOSTAT A, Sartorius Stedim Biotech, Deutschland

Bioreaktor, BIOSTAT UD, Sartorius Stedim Biotech, Deutschland

Reinstwasseranlage, Arium ProVF, Sartorius Stedim Biotech, Deutschland

Autoklav, Systec V-150, Systec GmbH, Deutschland

Kühlaggregat, Frigomix R1000 Sartorius Stedim Biotech, Deutschland

Kolbenhub-Pipetten Eppendorf RResearch Eppendorf AG, Deutschland

Kolbenhubpipetten Transferpette RS Brand GmbH & Co. KG, Deutschland

Kultur-Schrank Certomat BS-1 B. Braun Melsungen AG, Deutschland

Kultur-Schrank IKA RKS4000 ic control

Photometer UVIKON 922 Kontron Instruments, Schweiz

Rotations-EvaporatorRVC 2-18 Martin Christ GmbH, Deutschland

Scanner (für SDSPAGE) Scanjet 3500c Hewlett Packard Co., USA

Scanner (für SDSPAGE) Perfection V 750 Pro Seiko Epson Corp., Japan

Schüttler CH-4103 Infors HT, Schweiz

6.4.4 Verwendete Stämme, Stammhaltung und Vektorkarten

Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten Mikroorganismen.

Verwendete Stämme
<i>Eubacterium ramulus</i> DSM Nr.: 16296 (DSMZ, Deutschland)
<i>Pichia pastoris</i> X-33 EasySelect™ Kit (Invitrogen Corporation, USA)
<i>Escherichia coli</i> Rosetta DE3
<i>Escherichia coli</i> BL21

Der verwendete *E. coli* Stamm Rosetta DE3 wurde direkt aus Gefrierkulturen verwendet. Sofern Platten verwendet werden sollen wurden alle Stämme auf den entsprechenden Medienplatten (mit Zeocin bzw. Chloramphenicol, Ampicillin und Kanamycin) bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und monatlich auf frische Platten überimpft. Die ausgestrichenen Platten wurden für 1 d bei 37 °C (*Escherichia coli*) bzw. für 2 d bei 20 °C (*Pichia pastoris*) inkubiert. Die Stammhaltung von *E. ramulus* erfolgte zweimal wöchentlich in neuen Serumflaschen mit ST-Medium und Glukoselösung. Es wurde jeweils 10%ig inokuliert und für 12 h bei 37 °C stehend inkubiert. Zur Kontrolle auf mögliche Kontaminationen wurde bei jeder Überimpfung eine Probe lichtmikroskopisch untersucht. Alle 3 Monate wurden sämtliche Stämme neu aus Gefrierkulturen auf Platten, bzw. Serumfläschchen überimpft.

Nähere Informationen zu Rosetta (DE3) von der Website des Herstellers (www.novagen.de, abgerufen 16.09.2013):

Rosetta™ and Rosetta 2 host strains are BL21 derivatives designed to enhance the expression of eukaryotic proteins that contain codons rarely used in *E. coli*.

Rosetta™ host strains are BL21 derivatives designed to enhance the expression of eukaryotic proteins that contain codons rarely used in *E. coli*. These strains supply tRNAs for AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA codons on a compatible chloramphenicol-resistant plasmid. Thus the Rosetta strains provide for “universal” translation which is otherwise limited by the codon usage of *E. coli*. The tRNA genes are driven by their native promoters. Genotype: F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm pRARE.

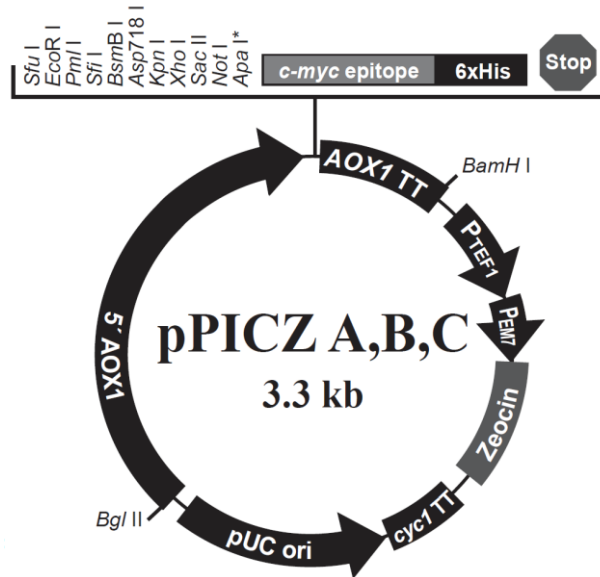


Abbildung 75: pPICZ-Vektor, der in *P. pastoris* CHI verwendet wurde.

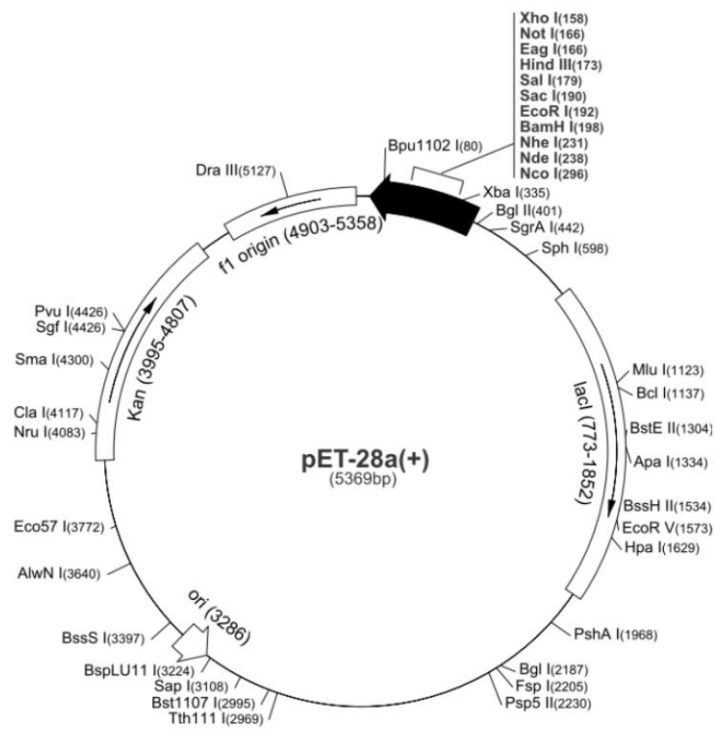


Abbildung 76: Vektorkarte pET-28a der in *E. coli* CHI und *E. coli* CHI_ERED verwendet wurde.

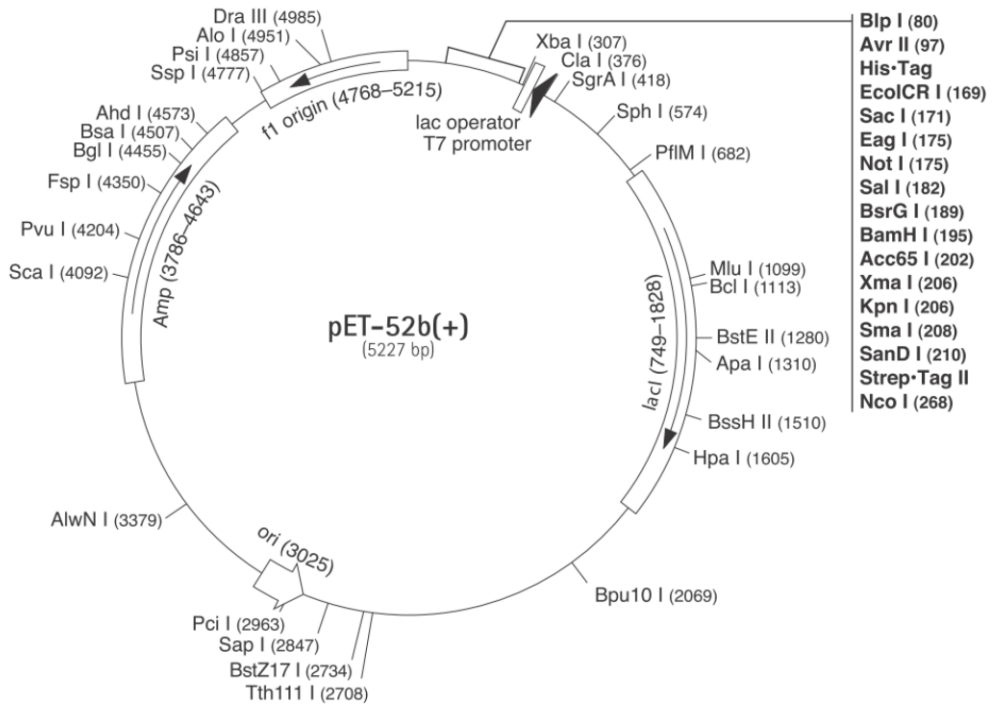


Abbildung 77: Vektorkarte pET-52b der in *E. coli* CHI_ERED verwendet wurde.

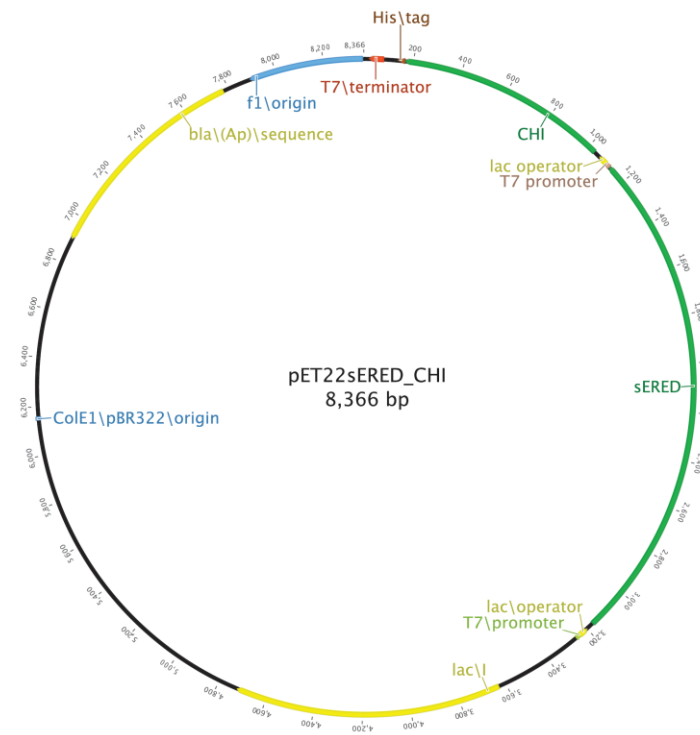


Abbildung 78: Vektorkarte pET-22sERED_CHI, der in *E. coli* CHI_sERED verwendet wurde.

Chalconisomerase

M A D F K F E P M R S L I Y V D C V S E D Y R P K L Q R W I Y K V H I

Abbildung 79: Aminosäuresequenz der CHI aus *E. ramulus*.

6.4.5 Zusammensetzungen der verwendeten Kulturmedien und (Puffer)-Lösungen

Tabelle 11: Zusammensetzung ST-Medium für *E. ramulus*.

Stammmedium (ST Medium)	
Fleischpepton	9 g/L
Proteosepepton	1 g/L
Fleischextrakt	3 g/L
Hefeextrakt	4 g/L
Natriumchlorid	3 g/L
Tween 80	0,5 mL/L
Salzlösung B	2,5 mL/L
Cystin	0,25 g/L
Na ₂ HPO ₄	2 g/L
Cystein*HCl	0,25 g/L
Resazurinlösung	3 mL/L
Glucose	12 g/L (nach autoklavieren separat zugeben)

Zunächst wurden alle Bestandteile außer Cystin, Cystein HCl und Natriumphosphat unter Erhitzen bis zum Kochen in einem Kolben gelöst. Es wurden 3 mL Resazurinlösung pro Liter Medium zugesetzt. Dabei war ein Farbumschlag der Lösung von blau über rot nach gelb zu beobachten. Während des Erhitzens wurde die Lösung ständig mit einem Gasgemisch (Linde AG) von 80% Stickstoff / 20% Kohlenstoffdioxid begast. Sobald die Lösung gelb geworden war, wurde unter Rühren Cystin zugesetzt. Es wurde 10 min rührend weitergekocht. Dann wurden Natriumphosphat und Cystein zugegeben, und das heiße Medium wurde in eine ebenfalls begaste, in einem Eisbad gekühlte 1.000 mL Schottglasflasche gefüllt. Es wurde für weitere 15 min durchgast. Die Flasche wurde dann mit einem Butylgummistopfen und einem Schraubdeckel festverschlossen. Anschließend wurde das Medium 30 min bei 121 °C autoklaviert. Die Präparation kleinerer Mengen Medium (10 mL, 20 mL, 40 mL) erfolgte nahezu analog. Es wurde hierbei mit einer Dispensette partitioniert und das Medium wurde nicht mittels eines Eisbades abgekühlt.

Die Inokulation erfolgte über Einwegspritzen und Kanülen, ebenso die Zugabe von Glucose.

Tabelle 12: Zusammensetzung Resazurin-Lösung.

Resazurinlösung:	
0,2 g Resazurin in 20 mL 0,1 M NaOH lösen, ad 500 mL voll entsalztes H ₂ O	

Tabelle 13: Zusammensetzung Salzlösung B für ST-Medium.

Salzlösung B:	
MgSO ₄ *7 H ₂ O	10 g
FeSO ₄ *7 H ₂ O	0,5 g
NaCl	0,5 g
MnSO ₄ *2 H ₂ O	0,34 g
voll entsalztes H ₂ O	ad 250 mL

Tabelle 14: Zusammensetzung YPD-Medium.

YPD Medium (Yeast Peptone Dextrose)	
Caseinpepton	9 g/L
Hefeextrakt	10 g/L
<i>Für Platten: Agar</i>	15 g/L
Voll entsalztes H ₂ O Glucoselösung	ad 900 mL + 100 mL

Die Medienbestandteile in 900 ml voll entsalztem Wasser lösen. Den pH-Wert auf 6,5 einstellen. Zum Gießen von Platten zusätzlich 20 g Agar hinzugeben. Das Medium für mind. 20 Min bei 121 °C und 2 bar autoklavieren und nach Abkühlen auf 60 °C steril 50 ml der Glucoselösung hinzugeben (440 g Glucose-Monohydrat einwiegen, auf 1 L mit VE-Wasser auffüllen und autoklavieren, Konzentration = 400 g/L).

Nun gegebenenfalls 1 ml einer 100 mg/mL Zeocin Stammlösung (gelöst in Reinstwasser) hinzugeben und gegebenenfalls Platten gießen.

Tabelle 15: Zusammensetzung BMGY und BMMY-Medium.

BMGY/BMMY Medium	
Caseinpepton	2%
Hefeextrakt	1%
Kaliumphosphat pH 6	100 mM/L
Yeast Nitrogen Base	1,34%
Biotin	0,0004%
Glycerin/Methanol	1%

Für 1 L Medium 10 g des Hefeextrakts und 20 g Pepton in 700 ml in VE-Wasser lösen. Für 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklavieren und auf Zimmertemperatur herunterkühlen lassen. Nun 100 mL eines 1 mol/L Kaliumphosphatpuffers (22,98 g K_2HPO_4 und 118,34 g KH_2PO_4 in 1.000 ml VE-Wasser lösen, auf pH 6,0 einstellen, autoklavieren), 100 ml der YNB-Lösung (13,4 g YNB, gelöst in 100 ml), 2 mL Biotinlösung (20 mg Biotin in 100 mL Reinstwasser und sterilfiltriert) und 100 mL einer Glycerinstammlösung (100 mL Glycerin mit 900 mL VE-Wasser auffüllen und autoklavieren) hinzugeben. Für das BMMY-Medium Methanolstammlösung anstatt Glycerinstammlösung verwenden (50 mL Methanol mit 950 mL VE-Wasser auffüllen und autoklavieren). Die Medien können für 30 Tage bei 4 °C gelagert werden.

Tabelle 16: Zusammensetzung LB-Medium.

LB-Medium (<i>lysogeny broth</i>)	
Trypton	10 g/L
NaCl	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
<i>Für Platten: Agar</i>	15 g/L

Nach dem Lösen aller Medienbestandteile in destilliertem Wasser wird der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Anschließend wird für 20 min bei 121 °C/2 bar autoklaviert.

Tabelle 17: Zusammensetzung TB-Medium.

TB-Medium (<i>terrific broth</i>)	
Trypton	12 g
Hefeextrakt	24 g
Glycerin	4 g
10x KP Puffer	100 mL
<i>Für Platten:</i> Agar	15 g/L
VE-Wasser	ad 1.000 mL

10 x KP-Puffer:	
Dikaliumhydrogenphosphat-trihydrat (K ₂ HPO ₄):	125,40 g
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄):	23,14 g
voll entsalztes H ₂ O	ad 500 mL

Nach dem Lösen aller Medienbestandteile in destilliertem Wasser wird für 20 min bei 121 °C/2 bar autoklaviert. Anschließend wird der separat autoklavierte KP-Puffer zugegeben. Es kann nicht zusammen autoklaviert werden, da sonst Salze und Mikronährstoffe komplexiert werden und ausfallen könnten. Die Präparation im Vergleich zu LB-Medium ist leicht aufwändiger, da die Kaliumphosphatpuffer-Lösung separat autoklaviert werden muss (Spurenelemente könnten sonst vom Phosphat komplexiert werden und sind dann nicht mehr biologisch verwertbar).

Tabelle 18: Antibiotika-Stammlösungen.

Antibiotikum	Lösemittel	Konzentration
Ampicillin	Reinst-Wasser	100 mg/mL
Kanamycin	Reinst-Wasser	50 mg/mL
Chloramphenicol	70% Ethanol	50 mg/mL

Es werden größere Volumina angesetzt und diese in 1 mL aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Es wird 1 mL auf 1 L Kultur verwendet (1:1000).

Tabelle 19: Zusammensetzung Zellaufschlusspuffer.

Zellaufschlusspuffer (50 mM, pH 6,4):	
Dikaliumhydrogenphosphat-trihydrat (K ₂ HPO ₄):	2,6 g
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄):	1,01 g
reinst H ₂ O	ad 500 mL

Die Bestandteile werden nach dem Einwiegen in reinstH₂O gelöst. Der pH-Wert wird auf 6,4 eingestellt.

Tabelle 20: Zusammensetzung SDS-Laufpuffer.

10x TGS-Puffer	
Glycin	140 g
Tris-Base	3 g
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	10 g
reinst H ₂ O	ad 1.000 mL
2x SDS-Puffer	
Bromphenolblau	20 mg
EDTA-Natriumsalz	58 mg
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	5 g
Tris-HCl	0,315 g
reinst H ₂ O	ad 80 mL

Tabelle 21: Zusammensetzung Laemmli-Puffer.

Laemmli-Puffer	
2x SDS-Puffer	80%
β-Mercaptoethanol	10%
Glycerin (55% in reinst H ₂ O)	10%

Tabelle 22: Zusammensetzung der kolloidalen Coomassie-Lösung.

Kolloidale Coomassie-Lösung	
Coomassie Brilliant Blau G250	0,12%
Ammoniumsulfat	10%

Methanol	20%
Phosphorsäure (85%)	10%
reinst H ₂ O	60%

Tabelle 23: Bestandteile Entfärberlösung für kolloidale Coomassie-Färbung.

Entfärber-/Fixiererlösung	
Ethanol (96%)	50%
Phosphorsäure (85%)	20%
reinst H ₂ O	30%

Tabelle 24: Zusammensetzung Entfärberlösung für Silberfärbung.

Entfärber für Silberfärbung	
Ethanol (96%)	45%
Essigsäure (100%)	45%
reinst H ₂ O	10%

Tabelle 25: Rezept für Trenngele und Sammelgele (SDS-PAGE).

Rezept für 2 Trenngele (12%ig)	
Rotiphor Polyacrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) 40%ig	3 mL
Tris-HCl (1,5 M / pH 8,8)	2,8 mL
SDS (1%ig)	1 mL
reinstH ₂ O	3,2 mL
TEMED	20 µL
APS (25%ig)	20 µL
Rezept für 2 Sammelgele (12%ig)	
Rotiphor Polyacrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) 40%ig	0,75 mL
Tris-HCl (1,5 M / pH 6,8)	0,63 mL
SDS (1%ig)	0,3 mL

reinstH ₂ O	3,77 mL
TEMED	10 µL
APS (25%ig)	10 µL

7 Literatur

1. GeróS, H., M.M. Chaves, and S. Delrot, *The Biochemistry of the Grape Berry*. 2012: Bentham Science Publishers.
2. Döring, W., *Flavonoide: Chemischer Aufbau, Eigenschaften*. Pharmazeutische Wissenschaft, Gebr. Störck Verlag, 2008. **1**: p. 8-12.
3. Schmidt, A., *Biokatalytische Gewinnung von Flavonoiden*, in *Institute for Technical Chemistry*. 2011, Leibniz University Hanover: Dissertation.
4. Fraenkel, G.S., *Raison Detre of Secondary Plant Substances*. Science, 1959. **129**(3361): p. 1466-1470.
5. Harborne, J.B., *Role of Secondary Metabolites in Chemical Defense-Mechanisms in Plants*. Bioactive Compounds from Plants, 1990. **154**: p. 126-139.
6. Rieseberg, L.H. and E.E. Schilling, *Floral Flavonoids and Ultraviolet Patterns in Viguiera (Compositae)*. American Journal of Botany, 1985. **72**(7): p. 999-1004.
7. Belitz, H., Grosch, W., Schieberle, P., *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 2007: Springer Verlag.
8. Sandhar H.K., K.B., Prasher S., Tiwari P., Salhan M., Sharma P., *A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids*. Internationale Pharmaceutica Scientia, 2011. **1**(1): p. 25 - 41.
9. Hess, D., *Pflanzenphysiologie: Grundlagen der Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen*. Vol. 15. 2008, Stuttgart: E. Ulmer.
10. Grisebac.H and W. Barz, *Biochemistry of Flavonoids*. Naturwissenschaften, 1969. **56**(11): p. 538-&.
11. Watzl, B. and G. Rechkemmer, *Flavonoids*. Ernährungs-Umschau, 2001. **48**(12): p. 499-503.
12. Williams, C.A. and R.J. Grayer, *Anthocyanins and other flavonoids*. Natural Product Reports, 2004. **21**(4): p. 539-573.
13. Slade, D., D. Ferreira, and J.P.J. Marais, *Circular dichroism, a powerful tool for the assessment of absolute configuration of flavonoids*. Phytochemistry, 2005. **66**(18): p. 2177-2215.
14. Harborne, J., Baxter, H., *The handbook of natural flavonoids*. Vol. 1-2. 2001, New York: Wiley & son.
15. Graf, B.A., P.E. Milbury, and J.B. Blumberg, *Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence*. J Med Food, 2005. **8**(3): p. 281-90.
16. Mushtaq, M., Wani. SM., *Polyphenols and Human Health - A Review*. Int J Pharm Bio Sci, 2013. **4**(2): p. 338-360.
17. Cavia-Saiz, M., et al., *Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: a comparative study*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010. **90**(7): p. 1238-1244.
18. BlosteinFujii, A. and R.A. DiSilvestro, *Evidence for and against flavonoid antioxidant actions in vivo*. Faseb Journal, 1997. **11**(3): p. 3474-3474.
19. Tripoli, E., et al., *Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review*. Food Chemistry, 2007. **104**(2): p. 466-479.
20. Blumenstein, A., et al., *Oxidative stress induced effects on endothelial dependent arterial vasorelaxation*. Atherosclerosis Supplements, 2004. **5**(1): p. 108-108.
21. Jantet, G. and R.S. Grp, *Chronic venous insufficiency: Worldwide results of the RELIEF study*. Angiology, 2002. **53**(3): p. 245-256.
22. Kalus, U., et al., *Improvement of cutaneous microcirculation and oxygen supply in patients with chronic venous insufficiency by orally administered extract of red vine leaves AS 195: a randomised, double-blind, placebo-controlled, crossover study*. Drugs R D, 2004. **5**(2): p. 63-71.
23. Pradhan, S.C. and C. Girish, *Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine*. Indian Journal of Medical Research, 2006. **124**(5): p. 491-504.
24. Saller, R., R. Meier, and R. Brignoli, *The use of silymarin in the treatment of liver diseases*. Drugs, 2001. **61**(14): p. 2035-2063.
25. Guardia, T., et al., *Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat*. Farmaco, 2001. **56**(9): p. 683-687.

26. Maher, P., et al., *Fisetin Lowers Methylglyoxal Dependent Protein Glycation and Limits the Complications of Diabetes*. Plos One, 2011. **6**(6).
27. Fernandez, S.P., et al., *Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides*. European Journal of Pharmacology, 2006. **539**(3): p. 168-176.
28. Tapas, A.R., D.M. Sakarkar, and R.B. Kakde, *Flavonoids as Nutraceuticals: A Review*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2008. **7**(3): p. 1089-1099.
29. Viana, M., et al., *In vitro effects of a flavonoid-rich extract on LDL oxidation*. Atherosclerosis, 1996. **123**(1-2): p. 83-91.
30. Richter, C., *Reactive Oxygen and DNA Damage in Mitochondria*. Mutation Research, 1992. **275**(3-6): p. 249-255.
31. Jellinger, K.A., *Recent developments in the pathology of Parkinson's disease*. Ageing and Dementia Current and Future Concepts, 2002: p. 347-376.
32. Ames, B.N., M.K. Shigenaga, and T.M. Hagen, *Oxidants, Antioxidants, and the Degenerative Diseases of Aging*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1993. **90**(17): p. 7915-7922.
33. Singal, P.K., et al., *The role of oxidative stress in the genesis of heart disease*. Cardiovascular Research, 1998. **40**(3): p. 426-432.
34. Ley, J.P., et al., *Enhancers for Sweet Taste from the World of Non-Volatiles: Polyphenols as Taste Modifiers*. Sweetness and Sweeteners, 2008. **979**: p. 400-409.
35. Ley, J., et al. *Structural analogues of hispolon as flavor modifiers*. in *Expression of Multidisciplinary Flavour Science, Proceedings of the 12 th Queurman Symposium, July 1-4 2008, Interlaken, Switzerland*. 2010: Zuercher Hochschule fuer Angewandte Wissenschaften, Institut fuer Chemie und Biologische Chemie Waedenswil, Germany.
36. Backes, M., Vössing, T., Ley, J., Paetz, S., *Use of neoflavonoids for flavor modification*, S. AG, Editor. 2012: USA.
37. Behrens, M., et al., *Sweet and Umami Taste: Natural Products, Their Chemosensory Targets, and Beyond*. Angewandte Chemie-International Edition, 2011. **50**(10): p. 2220-2242.
38. Narayana, K.R., et al., *Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential*. Indian Journal of Pharmacology, 2001. **33**(1): p. 2-16.
39. Taleb-Contini, S.H., et al., *Antimicrobial activity of flavonoids and steroids isolated from two Chromolaena species*. Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas, 2003. **39**(4): p. 403-408.
40. Rattanachaikunsopon, P. and P. Phumkhachorn, *Contents and antibacterial activity of flavonoids extracted from leaves of Psidium guajava*. Journal of Medicinal Plants Research, 2010. **4**(5): p. 393-396.
41. Formica, J.V. and W. Regelson, *Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids*. Food and Chemical Toxicology, 1995. **33**(12): p. 1061-1080.
42. Martin, H.J., F. Kornmann, and G.F. Fuhrmann, *The inhibitory effects of flavonoids and antiestrogens on the Glut1 glucose transporter in human erythrocytes*. Chemo-Biological Interactions, 2003. **146**(3): p. 225-235.
43. Hertog, M.G.L., et al., *Dietary Antioxidant Flavonoids and Risk of Coronary Heart-Disease - the Zutphen Elderly Study*. Lancet, 1993. **342**(8878): p. 1007-1011.
44. Bailey, D.G., et al., *Grapefruit juice-drug interactions*. British Journal of Clinical Pharmacology, 1998. **46**(2): p. 101-110.
45. Bailey, D.G., et al., *Grapefruit juice felodipine interaction: Effect of naringin and 6',7'-dihydroxybergamottin in humans*. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 1998. **64**(3): p. 248-256.
46. Puel, C., et al., *Prevention of bone loss by phloridzin, an apple polyphenol, in ovariectomized rats under inflammation conditions*. Calcified Tissue International, 2005. **77**(5): p. 311-318.
47. Knekt, P., et al., *Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms*. American Journal of Epidemiology, 1997. **146**(3): p. 223-230.
48. Christensen, K.Y., et al., *The Risk of Lung Cancer Related to Dietary Intake of Flavonoids*. Nutrition and Cancer-an International Journal, 2012. **64**(7): p. 964-974.
49. Veeriah, S., et al., *Apple flavonoids inhibit growth of HT29 human colon cancer cells and modulate expression of genes involved in the biotransformation of xenobiotics*. Molecular Carcinogenesis, 2006. **45**(3): p. 164-174.
50. Manach, C., et al., *Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies*. American Journal of Clinical Nutrition, 2005. **81**(1): p. 230s-242s.

51. Tomas-Barberén, F.A. and M.N. Clifford, *Flavanones, chalcones and dihydrochalcones - nature, occurrence and dietary burden*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2000. **80**(7): p. 1073-1080.
52. Gross, E., *Persönliche Information*. 2013: Holzminden.
53. Gosch, C., H. Halbwirth, and K. Stich, *Phloridzin: Biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants*. Phytochemistry, 2010. **71**(8-9): p. 838-843.
54. Xu, K., et al., *High-speed counter-current chromatography preparative separation and purification of phloretin from apple tree bark*. Separation and Purification Technology, 2010. **72**(3): p. 406-409.
55. Nijveldt, R.J., et al., *Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications*. American Journal of Clinical Nutrition, 2001. **74**(4): p. 418-425.
56. Auner, B.G., M. Wirth, and C. Valenta, *Antioxidative activity and cytotoxicity of four different flavonoids for dermal applications*. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2005. **15**(3): p. 227-232.
57. Schneider, H., *Abbau von Flavonoiden durch Mikroorganismen des Gastrointestinaltrakts*, in *Institut für Ernährungswissenschaft*. 1999, Universität Potsdam: Potsdam.
58. Moore, W.E.C., J.L. Johnson, and L.V. Holdeman, *Emendation of Bacteroidaceae and Butyrivibrio and Descriptions of Desulfomonas Gen-Nov and 10 New Species in Genera Desulfomonas, Butyrivibrio, Eubacterium, Clostridium, and Ruminococcus*. International Journal of Systematic Bacteriology, 1976. **26**(2): p. 238-252.
59. Herles, C., *Untersuchungen zum enzymatischen Abbau ausgewählter Flavonoide durch Eubacterium ramulus*, in *Deutsches Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke*. 2003, Universität Potsdam: Dissertation.
60. Schneider, H. and M. Blaut, *Anaerobic degradation of flavonoids by Eubacterium ramulus*. Archives of Microbiology, 2000. **173**(1): p. 71-75.
61. Schoefer, L., *Transformation of flavonoids by bacteria from the human intestinal tract*. Dissertation, Universität Potsdam, 2002.
62. Bednar, R.A. and J.R. Hadcock, *Purification and Characterization of Chalcone Isomerase from Soybeans*. Journal of Biological Chemistry, 1988. **263**(20): p. 9582-9588.
63. Mckhann, H.I. and A.M. Hirsch, *Isolation of Chalcone Synthase and Chalcone Isomerase Cdnas from Alfalfa (Medicago-Sativa L) - Highest Transcript Levels Occur in Young Roots and Root-Tips*. Plant Molecular Biology, 1994. **24**(5): p. 767-777.
64. Herles, C., A. Braune, and M. Blaut, *First bacterial chalcone isomerase isolated from Eubacterium ramulus*. Archives of Microbiology, 2004. **181**(6): p. 428-434.
65. Schoefer, L., A. Braune, and M. Blaut, *Cloning and expression of a phloretin hydrolase gene from Eubacterium ramulus and characterization of the recombinant enzyme*. Applied and Environmental Microbiology, 2004. **70**(10): p. 6131-6137.
66. Ferrer-Miralles, N., et al., *Microbial factories for recombinant pharmaceuticals*. Microbial Cell Factories, 2009. **8**.
67. Demain, A.L. and P. Vaishnav, *Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms*. Biotechnology Advances, 2009. **27**(3): p. 297-306.
68. Blattner, F.R., et al., *The complete genome sequence of Escherichia coli K-12*. Science, 1997. **277**(5331): p. 1453-&.
69. Novy, R., et al., *Overcoming the codon bias of E. coli for enhanced protein expression*. Innovations, 2001. **12**(12): p. 1-3.
70. Lavallie, E.R., et al., *A Thioredoxin Gene Fusion Expression System That Circumvents Inclusion Body Formation in the Escherichia-Coli Cytoplasm*. Bio-Technology, 1993. **11**(2): p. 187-193.
71. J.C. Fieshko, H.J.R., G. Reed (Eds.), *Fermentation technology using recombinant organisms*. Biotechnology. Vol. 7b. 1989, Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft.
72. Terpe, K., *Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006. **72**(2): p. 211-222.
73. Murashima, K., et al., *Heterologous production of Clostridium cellulovorans engB, using protease-deficient Bacillus subtilis, and preparation of active recombinant cellulosomes*. Journal of Bacteriology, 2002. **184**(1): p. 76-81.
74. Dabrowski, S., et al., *1,3-propanediol production by Escherichia coli expressing genes of dha operon from Clostridium butyricum 2CR371.5*. Acta Biochimica Polonica, 2012. **59**(3): p. 357-361.

75. Rohdich, F., et al., *Enoate reductases of Clostridia - Cloning, sequencing, and expression*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(8): p. 5779-5787.
76. Crooke, H. and J. Cole, *The Biogenesis of C-Type Cytochromes in Escherichia-Coli Requires a Membrane-Bound Protein, Dipz, with a Protein Disulfide Isomerase-Like Domain*. Molecular Microbiology, 1995. **15**(6): p. 1139-1150.
77. Cole, J.A., B.M. Newman, and P. White, *Biochemical and Genetic-Characterization of Nirb-Mutants of Escherichia-Coli-K12 Pleiotropically Defective in Nitrite and Sulfite Reduction*. Journal of General Microbiology, 1980. **120**(Oct): p. 475-483.
78. Clark, D.P., *The Fermentation Pathways of Escherichia-Coli*. Fems Microbiology Reviews, 1989. **63**(3): p. 223-234.
79. Gonzalez, R., et al., *A new model for the anaerobic fermentation of glycerol in enteric bacteria: Trunk and auxiliary pathways in Escherichia coli*. Metabolic Engineering, 2008. **10**(5): p. 234-245.
80. Gething, M.J. and J. Sambrook, *Protein Folding in the Cell*. Nature, 1992. **355**(6355): p. 33-45.
81. Hornsey, I., *A History of Beer and Brewing*. Vol. 1. 2004, Washington D.C.: Royal Society of Chemistry.
82. Branduardi, P., C. Smeraldi, and D. Porro, *Metabolically engineered yeasts: 'Potential' industrial applications*. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2008. **15**(1): p. 31-40.
83. Dumas, B., et al., *Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast*. Yeast, 2003. **20**: p. S220-S220.
84. Egli, T., et al., *Methanol Metabolism in Yeasts - Regulation of the Synthesis of Catabolic Enzymes*. Archives of Microbiology, 1980. **124**(2-3): p. 115-121.
85. Macauley-Patrick, S., et al., *Heterologous protein production using the Pichia pastoris expression system*. Yeast, 2005. **22**(4): p. 249-270.
86. Cereghino, J.L. and J.M. Cregg, *Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris*. Fems Microbiology Reviews, 2000. **24**(1): p. 45-66.
87. Wegner, G.H., *Emerging Applications of the Methylotrophic Yeasts*. Fems Microbiology Reviews, 1990. **87**(3-4): p. 279-283.
88. Agathos, S.N., *Production Scale Insect Cell-Culture*. Biotechnology Advances, 1991. **9**(1): p. 51-68.
89. Wang, C.H., S.L. Kau, and C.F. Lo, *Cytopathology of a Recombinant Baculovirus in a Continuous Cell-Line, Iplb-Sf-21-Ae*. Electron Microscopy II, 1992: p. 296-297.
90. Jarvis, D.L. and E.E. Finn, *Biochemical-Analysis of the N-Glycosylation Pathway in Baculovirus-Infected Lepidopteran Insect Cells*. Virology, 1995. **212**(2): p. 500-511.
91. Jayapal, K.R., et al., *Recombinant protein therapeutics from CHO cells - 20 years and counting*. Chemical Engineering Progress, 2007. **103**(10): p. 40-47.
92. Butler, M. and A. Meneses-Acosta, *Recent advances in technology supporting biopharmaceutical production from mammalian cells*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012. **96**(4): p. 885-894.
93. Jonczyk, P., et al., *Strictly Anaerobic Batch Cultivation of Eubacterium ramulus in a Novel Disposable Bag Reactor System*. Chemie Ingenieur Technik, 2011. **83**(12): p. 2147-2152.
94. Jonczyk, P., et al., *Cultivation of shear stress sensitive microorganisms in disposable bag reactor systems*. Journal of Biotechnology, 2013.
95. Jonczyk, P., *Anaerobe Kultivierung von Eubacterium ramulus zur biokatalytischen Gewinnung von ausgewählten Flavonoiden*, in Institut für Technische Chemie. 2010, Leibniz Universität Hannover: Masterarbeit.
96. Glindkamp, A., et al., *Sensors in Disposable Bioreactors Status and Trends*. Disposable Bioreactors, 2009. **115**: p. 145-169.
97. Dreher, T., et al., *High Cell Density Escherichia coli Cultivation in Different Single-Use Bioreactor Systems*. Chemie Ingenieur Technik, 2013. **85**(1-2): p. 162-171.
98. Eibl, R., et al., *Disposable bioreactors: the current state-of-the-art and recommended applications in biotechnology*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010. **86**(1): p. 41-49.
99. Eibl, R., S. Werner, and D. Eibl, *Disposable bioreactors for plant liquid cultures at Litre-scale*. Engineering in Life Sciences, 2009. **9**(3): p. 156-164.
100. Eibl, R., S. Werner, and D. Eibl, *Bag Bioreactor Based on Wave-Induced Motion: Characteristics and Applications*. Disposable Bioreactors, 2009. **115**: p. 55-87.
101. Gall, M., *Arbeitstitel: Biotransformation von Flavonoiden*, in Institut für Biochemie. Dissertation, in Arbeit, Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald: Greifswald.

102. Higgins, D.R., Cregg, James M., *Pichia protocols*. Methods in Molecular Biology. Vol. 103. 1998, Totowa, New Jersey: Humana Press.
103. Cregg, J.M., et al., *Recombinant protein expression in Pichia pastoris*. Molecular Biotechnology, 2000. **16**(1): p. 23-52.
104. Tischer, W., J. Bader, and H. Simon, *Purification and Some Properties of a Hitherto-Unknown Enzyme Reducing the Carbon-Carbon Double-Bond of Alpha,Beta-Unsaturated Carboxylate Anions*. European Journal of Biochemistry, 1979. **97**(1): p. 103-112.
105. Simon, H., et al., *Reduction of 2-Enoates and Alkanoates with Carbon-Monoxide or Formate, Viologens, and Clostridium-Thermoaceticum to Saturated Acids and Unsaturated and Saturated Alcohols*. Angewandte Chemie-International Edition in English, 1987. **26**(8): p. 785-787.
106. Khoroshilova, N., et al., *Iron-sulfur cluster disassembly in the FNR protein of Escherichia coli by O-2: [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion with loss of biological activity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. **94**(12): p. 6087-6092.
107. Beinert, H., R.H. Holm, and E. Munck, *Iron-sulfur clusters: Nature's modular, multipurpose structures*. Science, 1997. **277**(5326): p. 653-659.
108. Tauber, K., et al., *A Highly Efficient ADH-Coupled NADH-Recycling System for the Asymmetric Bioreduction of Carbon-Carbon Double Bonds Using Enoate Reductases*. Biotechnology and Bioengineering, 2011. **108**(6): p. 1462-1467.
109. Donovan, R.S., C.W. Robinson, and B.R. Glick, *Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter*. Journal of Industrial Microbiology, 1996. **16**(3): p. 145-154.
110. Kleppmann, V.W., *Taschenbuch Versuchsplanung*. 2003: Carl Hanser Verlag.
111. Siebertz, K., van Bebber, D., Hochkirchen, T., *Statistische Versuchsplanung - Design of Experiments (DoE)*. 2010: Springer Verlag.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Patrick Jonczyk
E-Mail	Patrick.Jonczyk@gmail.com
Geburtsdatum und -ort	27. November 1984 in Hannover
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

- 2013 **Promotion Dr. rer. nat.** am Institut für Technische Chemie, Thema: vorliegende Arbeit
- 12/2010 – 12/2013 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter**
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover,
Institut für Technische Chemie
- 04/2010 – 09/2010 **Masterarbeit** am Institut für Technische Chemie,
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover,
unter Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper,
Thema: Anaerobe Kultivierung von *Eubacterium ramulus*
zur biokatalytischen Gewinnung von ausgewählten
Flavonoiden; Note: *sehr gut*
- 10/2008 – 09/2010 **Masterstudiengang „Life Science“**,
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover,
Schwerpunkte: Bioprozesstechnik und Naturstoffchemie;
Note: *ausgezeichnet*
- 03/2008 – 04/2008 **Bachelorarbeit** am Institut für Mikrobiologie,
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, unter
Leitung von Prof. Dr. Auling,
Thema: Induktionsverhalten von
Überexpressionsplasmiden in coryneformen Bakterien ;
Note: *gut*
- 10/2005 – 09/2008 **Bachelorstudiengang „Life Science“**,
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover,
Note: *sehr gut*

07/2004 – 04/2005 **Zivildienst** beim Caritas e.V. Hannover, Altenzentrum
Wilhelm-Maxen-Haus, Garbsen

1997 – 06/2004 Besuch des Georg-Büchner-Gymnasiums in Seelze
Abschluss: **Allgemeine Hochschulreife**; Note: *1,9*