

# **Untersuchungen zur biotechnologischen Produktion von Ferula – und Sinapinsäure**

**Dissertation**

zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

**von Frau Maria Dornheim, M. Sc.**

geb. am 13.11.1990 in Halle/Saale

1. Gutachter: Prof. Dr. Markus Pietzsch
2. Gutachter: Prof. Dr. Ludger Wessjohann
3. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Schmid

Tag der öffentlichen Verteidigung: 15.04.2021

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Maria Dornheim, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, dass keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht worden sind.

Die Dissertation hat in der gegenwärtigen bzw. in einer anderen Fassung noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

---

Halle, 01.07.2020

---

## Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Markus Pietzsch für die Möglichkeit der Promotion und der Überlassung des interessanten Themas bedanken. Außerdem möchte ich mich bei Ihnen für die fortwährende Unterstützung, Diskussionen und Anregungen bedanken.

Ein riesiger Dank gilt Dr. Bodo Moritz. Danke für deine wissenschaftliche und auch moralische Unterstützung. Du hast stets dein bibliotheksartiges Wissen mit mir geteilt, was sowohl meine Entwicklung und Erfahrung als auch die des Projektes stark voran gebracht hat. Danke auch für dein gutes Bauchgefühl, was so häufig (leicht frustrierend) richtig war. Ganz besonders möchte ich mich auch für die Hilfe bei der Programmierung, Etablierung und zeitaufwendigen Einarbeitung in das Dasgip-System bedanken.

Auch bei Dr. Franziska Seifert möchte ich mich für die allgegenwärtige Unterstützung in der Arbeitsgruppe bedanken. Danke für dein reges Interesse am Fortschritt dieser Arbeit und dein konstruktives Feedback. Ebenso möchte ich mich für deine Unterstützung in der Zeit nach Projektende bedanken.

Für die Zuarbeit im Labor möchte ich Frau Schreiber und meinen Studenten Jessica Li und Stefan Franke danken. Für alle administrativen und organisatorischen Arbeiten möchte ich Martina Anwand und Dr. Thomas Hertel danken.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich mich für das angenehme Arbeits- und Pausenklima, sowie der zahlreichen Stammtische danken. Ich bin dankbar für so einige Freundschaften die in der Zeit entstanden sind.

Ein großer Dank gilt auch dem IPB Halle, AG Wessjohann. Insbesondere Prof. Dr. Ludger Wessjohann, Dr. Martin Dippe und Dr. Susann Herrmann möchte ich für die Vorarbeiten zu den Enzymen und der Freigabe von nützlichen Informationen inklusive mehrerer Plasmide danken.

Ein besonderer Dank gilt natürlich meiner Familie und meinen Freunden. Danke für die stetige moralische Unterstützung, sowohl im Studium als auch in der Promotionszeit. Auch meiner gesamten Trainingsgruppe möchte ich für die regelmäßige Ablenkung von der Wissenschaft danken. Vielen Dank auch an Nadine, Franzi und Lui. Ihr seid mir seit unserer Kindheit eine große Stütze, das bedeutet mir sehr viel.

Als letztes möchte ich René hervorheben. Danke, dass du immer ein offenes Ohr hattest, auch dann noch, wenn du das Thema eigentlich nicht mehr hören konntest. Deine moralische Unterstützung hat mir sehr geholfen mit so einigen Problemen fertig zu werden und auch menschlich daran zu wachsen. Ich bin dir auch für die kritischen Diskussionen auf wissenschaftlicher Ebene dankbar. Danke, dass du an meiner Seite bist.

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP/NBT	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat/ <i>Nitro blue tetrazolium</i>
BR	Bioreaktor
BSA	Bovines Serum Albumin
CCoAOMT	<i>Caffeoyl coenzyme A OMT</i>
C3H	Kumarsäure-3-Hydroxylase, engl. <i>Coumarate 3-hydroxylase</i>
C4H	Zimtsäure-4-Hydroxylase, engl. <i>Cinnamic acid 4-hydroxylase</i>
COMT	Kaffeesäure-O-Methyltransferase, engl. <i>Caffeic acid O-methyltransferase</i>
CTR	<i>Carbon transfer rate</i>
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. <i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphate
DOPA	Dihydroxyphenylalanin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>EcHpaBC</i>	HpaBC aus <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEE	Essigsäureethylester
FA1	<i>RcTAL_EcHpaBC_McPFOMT</i>
FA2	<i>RgTAL_EcHpaBC_McPFOMT</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid, oxidierte Form
FADH <sub>2</sub>	Flavin-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form
F5H	Ferulasäure-5-hydroxylase
FLAG	Detektions- <i>tag</i> mit Aminosäuresequenz DYKDDDDK
G	Guajacyl-Propanoid-Einheit
H	Hydroxyphenyl-Propanoid-Einheit
HAL	Histidin-Ammonium-Lyase
HpaB	Oxidase der 4-Hydroxyphenylacetat-3-hydroxylase
HpaC	Reduktase der 4-Hydroxyphenylacetat-3-hydroxylase
HpaBC	4-Hydroxyphenylacetat-3-hydroxylase Bicistron B + C
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
$k_{cat}$	Wechselzahl
$K_i$	Inhibitorische Konstante
$K_M$	Michaelis-Menten-Konstante
LB	<i>lysogeny broth</i>
<i>LpCOMT</i>	COMT aus <i>Lolium perenne</i>
mCOMT	mammalische Catechol-O-Methyltransferase
<i>McPFOMT</i>	PFOMT aus <i>Mesembryanthemum crystallinum</i>
<i>M. crystallinum</i>	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>
MIO	4-Methylidenimidazol-5-on
<i>MsCOMT</i>	COMT aus <i>Medicago sativa</i>

MW	<i>Molecular Weight Marker</i>
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid, oxidierte Form
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
OMT	O-Methyltransferase
OPA	Ortho-Phthaldialdehyd
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PaHpaBC	HpaBC aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
PCR	Polymerasekettenreaktion, engl. <i>Polymerase chain reaction</i>
PFOMT	Phenylpropanoid-Flavonoid-O-Methyltransferase
PPL	vorgefärbte Proteinleiter ( <i>prestained protein ladder</i> )
<i>R. capsulatus</i>	<i>Rhodobacter capsulatus</i>
<i>R. glutinis</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>
RgTAL	TAL aus <i>Rhodotorula glutinis</i>
<i>R. sphaeroides</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>
S	Syringyl-Propanoid-Einheit
SA1	RgTAL_PaHpaBC_McPFOMT
SA2	RgTAL_EcHpaB(Y301I)C_McPFOMT
SAM	S-Adenosylmethionin
Sam5	4-Kumarat-3-hydroxylase aus <i>Saccharothrix espanaensis</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
<i>S. espanaensis</i>	<i>Saccharothrix espanaensis</i>
SK	Schüttelkolben
TA	Totalacrylamid
Tab	Tabelle
TAL	Tyrosin-Ammonium-Lyase
TB	<i>terrific broth</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<i>T. thermophilus</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
UV	Ultraviolett
V <sub>max</sub>	maximale Reaktionsgeschwindigkeit nach Michaelis-Menten-Kinetik

Anmerkungen:

Für biochemische Fachausdrücke werden die international üblichen Abkürzungen verwendet.

Fachausdrücke aus der englischen Sprache ohne eine passende deutsche Entsprechung werden in der vorliegenden Arbeit kursiv geschrieben.

# Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung .....	II
Danksagung.....	III
Abkürzungen .....	IV
Inhaltsverzeichnis .....	V
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Stand des Wissens.....	4
1.1.1 Eigenschaften, Vorkommen und Anwendungen von Ferulasäure .....	4
1.1.2 Eigenschaften, Vorkommen und Anwendungen von Sinapinsäure .....	5
1.1.3 Biosynthese von Ferula- und Sinapinsäure – Vergleich und Auswahl von Enzymen .....	7
1.1.3.1 TAL .....	8
1.1.3.2 HpaBC .....	10
1.1.3.3 SAM-abhängige OMT.....	12
1.1.3.4 Übersicht der verwendeten Enzyme zur Kumar-, Kaffee-, und Ferulasäure.....	14
1.1.3.5 Mögliche Nebenreaktionen der Ferula- und Sinapinsäure-Synthese	19
1.1.4 <i>In vivo</i> Biokatalyse .....	20
1.2 Motivation und Zielsetzung .....	24
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>25</b>
2.1 Material .....	25
2.1.1 Chemikalien.....	25
2.1.2 Stammlösungen.....	27
2.1.3 Puffer und Medien .....	28
2.1.4 Kits und Enzyme für die Molekularbiologie.....	29
2.1.5 Konstrukte .....	29
2.1.6 Organismen .....	30
2.1.7 Vektoren .....	31
2.1.8 Marker und Antikörper .....	31
2.1.9 Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	31
2.2 Methoden .....	33
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	33
2.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	33
2.2.1.2 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese.....	33
2.2.1.3 Restriktionsverdau .....	33
2.2.1.4 5'-Dephosphorylierung .....	34

2.2.1.5	Reinigung von DNA-Fragmenten.....	34
2.2.1.6	Ligation .....	34
2.2.1.7	Quantifizierung von DNA.....	34
2.2.1.8	Transformation von <i>E. coli</i> .....	34
2.2.1.9	Isolierung von Plasmid-DNA.....	35
2.2.1.10	Klonierung der Konstrukte.....	36
2.2.2	Mikrobiologische Methoden .....	36
2.2.2.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> -Stämmen.....	36
2.2.2.2	Parallel-Fermentation.....	37
2.2.3	Proteinchemische Methoden .....	38
2.2.3.1	SDS-PAGE .....	38
2.2.3.2	Western-Blot .....	39
2.2.3.3	Löslichkeitsverteilung von Proteinen .....	39
2.2.3.4	Herstellung von Rohenzymextrakt.....	40
2.2.3.5	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels densitometrischer Analyse .....	40
2.2.3.6	Enzymkinetische Untersuchungen .....	40
2.2.4	Analytik.....	41
2.2.4.1	Produktextraktion .....	41
2.2.4.2	HPLC-Analytik der organischen Phase .....	42
2.2.4.3	Tyrosin-Analytik (Derivatisierung und HPLC-Analytik).....	42
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
3.1	Nachweis der Funktionalität der <i>in silico</i> entworfenen Biosynthesekaskade zur Produktion von Ferulasäure.....	43
3.1.1	Identifizierung einer geeigneten TAL für die rekombinante Biosynthesekaskade.....	43
3.1.1.1	Nachweis der Ferulasäure-Synthese in rekombinanten <i>E. coli</i> -Zellen .....	47
3.1.2	Identifizierung einer geeigneten Hydroxylase für die rekombinante Biosynthesekaskade.....	49
3.1.3	Identifizierung einer geeigneten Methyltransferase für die rekombinante Biosynthesekaskade.....	53
3.1.4	<i>In vitro</i> Charakterisierung der Reaktionskaskade.....	56
3.1.4.1	Kinetische Charakterisierung der <i>RgTAL-FLAG</i> .....	56
3.1.4.2	Kinetische Charakterisierung der <i>EcHpaBC</i> .....	58
3.1.4.3	Kinetische Charakterisierung der <i>PaHpaBC</i> .....	59
3.1.5	<i>In vivo</i> Untersuchung der Reaktionskaskade .....	62

---

3.1.5.1	Untersuchungen zur <i>Bottleneck</i> -Identifizierung durch Zugabe von Methionin und Serin .....	63
3.2	Biosynthese von Sinapinsäure durch rekombinante <i>E. coli</i> .....	65
3.3	Untersuchungen zur Produktion von Ferula- und Sinapinsäure im Bioreaktor .....	72
3.3.1	Untersuchungen zur Stammauswahl und Induktion am Beispiel der Ferulasäure-Produktion (FA2).....	74
3.3.2	Untersuchungen zur Optimierung der Ferulasäure-Produktion (FA2) durch Variation der Laktose-Konzentration .....	79
3.3.3	Ferulasäure-Produktion mit Methionin-Zugabe (FA2) .....	83
3.3.4	Sinapinsäure-Produktion mit Methionin-Zugabe (SA1 & SA2).....	86
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>92</b>
4.1	Produktion von Ferula- und Sinapinsäure .....	92
4.1.1	Limitierungen bei <i>in vivo</i> Multienzymkaskaden .....	97
4.2	Enzymkaskade und deren Reaktionsfluss .....	98
4.2.1	Aktivität der Einzelenzyme.....	98
4.2.1.1	TAL .....	98
4.2.1.2	Hydroxylase .....	99
4.2.1.2.1	Vergleich PaHpaBC und EcHpaB(Y301I)C (Sinapinsäure-Produktion) .....	100
4.2.1.3	O-Methyltransferase.....	100
4.2.2	Gesamtkaskade ( <i>in vitro</i> & <i>in vivo</i> Daten) .....	101
4.2.3	Nebenreaktionen .....	103
4.3	Optimierung der Produktion durch Regulation von Expression und Zellvitalität.....	105
4.4	Steigerung der Produktion durch Methionin-Zugabe.....	106
4.5	Fehlerbetrachtung .....	107
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>110</b>
<b>6</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>112</b>
<b>7</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>114</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>121</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>123</b>
<b>10</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>124</b>
<b>11</b>	<b>Erweiterter Anhang.....</b>	<b>137</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>148</b>



# 1 Einleitung

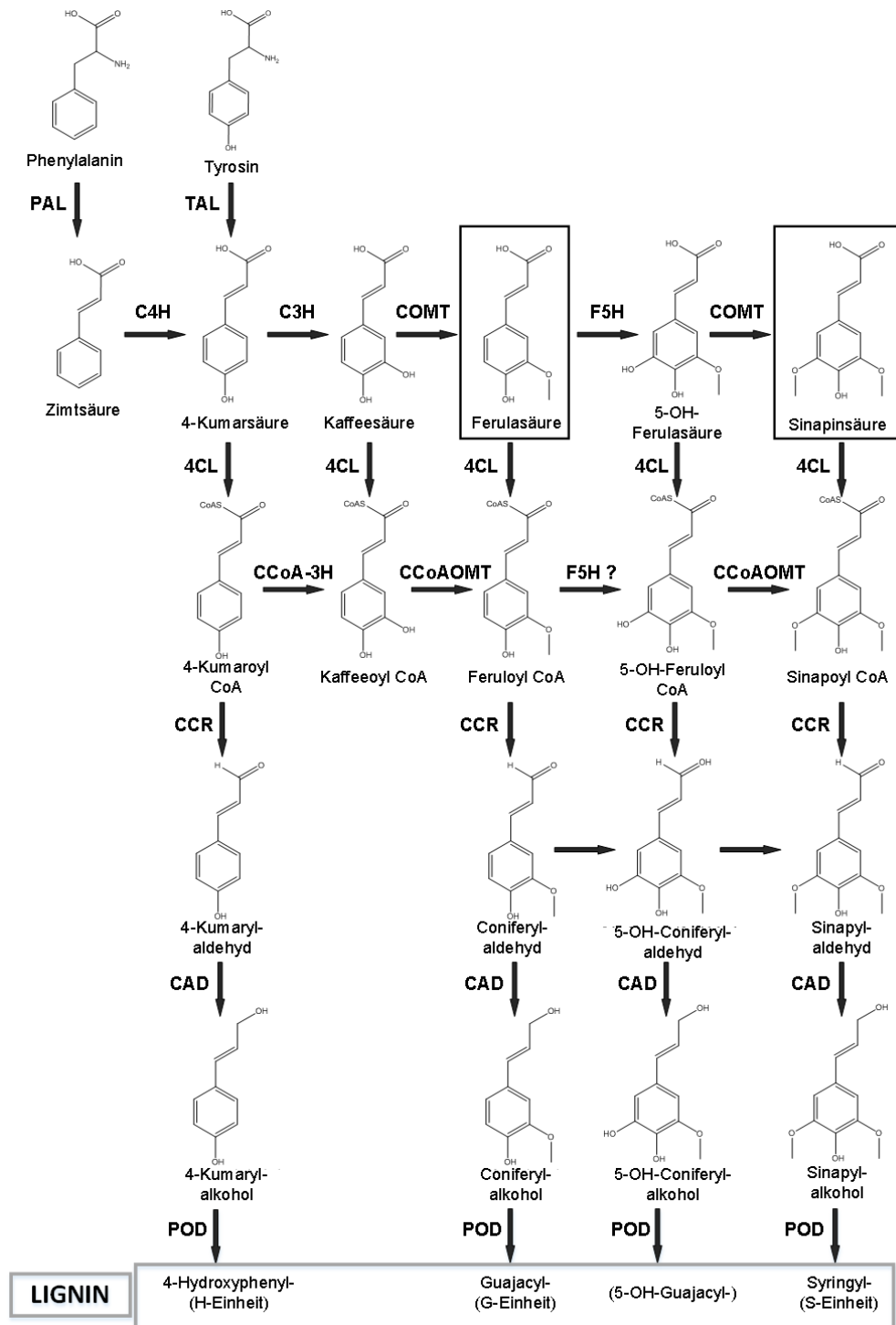
Ferulasäure und Sinapinsäure sind Phenylpropanoide und Teil der Ligninbiosynthese. Lignin ist, nach Zellulose, das zweithäufigste Biopolymer der Erde und macht damit ca. 30 % der organischen Kohlenwasserstoffe aus. Im Laufe der Evolution der Pflanzen aus dem Wasser heraus, wurde die Fähigkeit zur Synthese von Lignin ausgebildet [Boerjan et al., 2003]. Lignin gewährleistet die strukturelle Integrität der Zellen, sowie die Stabilität und Starrheit des Stammes [Chabannes et al., 2001; Voelker et al., 2011]. Außerdem sichert es den Wasserschutz der Zellwand und ermöglicht damit den Wassertransport durch das vaskuläre System. Ebenso dient Lignin zur Abwehr von Pathogenen [Sarkanen und Ludwig, 1971].

Aufgrund dieser Eigenschaften sind Phenylpropanoide und ihre Vorstufen von großem Interesse für die Forschung bzw. für die Anwendung dieser als Bausteine für neue Biomaterialien [Rais und Zibek, 2017]. Da die Depolymerisation von Lignin zur Gewinnung der Monomere bisher immer zu heterogenen Produktgemischen führt [Rößiger et al., 2018], ist die rekombinante Produktion der Phenylpropanoide ein sinnvoller Ansatzpunkt. Die Synthese der Vorstufen Ferula- und Sinapinsäure ist dabei ein Teilprojekt der Produktion von Phenylpropanoiden und wird in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Die Biosynthese und Regulation des metabolisch komplexen Reaktionsflusses zum Aufbau von Lignin ist nach wie vor Gegenstand der aktuellen Forschung [Vanholme et al., 2019; Vanholme et al., 2010; Zhong und Ye, 2009]. Das entstehende aromatische Heteropolymer ist dabei komplex und hauptsächlich aus drei unterschiedlichen Hydroxyzimtalkoholen aufgebaut. Diese Alkohole unterscheiden sich in dem Grad der Methoxylierung am aromatischen Ring (3' und 5'). Das einfachste Monomer ist Kumarylalkohol (keine Methoxylierung), gefolgt von Coniferylalkohol (3'-Methoxylierung) und Sinapylalkohol (3'- und 5'-Methoxylierung) [Brennicke und Schopfer, 2010]. Diese Alkohole werden durch Reduktion aus den jeweiligen Säuren Kumarsäure, Ferulasäure und Sinapinsäure gebildet. Die Monolignole resultieren bei Einbau in das Ligninpolymer jeweils in den H- (Hydroxyphenyl-), G- (Guajacyl-) und S- (Syringyl-) Phenylpropanoid-Einheiten [Brennicke und Schopfer, 2010]. Die Zusammensetzung der H-, G- und S-Einheiten im Ligninpolymer unterscheidet sich je nach Pflanze. Zum Großteil besteht Lignin der zweikeimblättrigen Bedecktsamer (*hardwood*, dt. Laubholz) aus G- und S-Einheiten und nur aus Spuren von H-Einheiten. Dahingegen besteht Nacktsamer-Lignin (*softwood*, dt. Nadelholz) vor allem aus G-Einheiten und geringen Mengen von H-Einheiten. Alle Einheiten in ungefähr gleichem Anteil finden sich in Lignin von Gräsern (Einkeimblättrige Bedecktsamer) wieder [Baucher et al., 1998].

Die sogenannte Lignifizierung erfolgt durch enzymatische Radikalisierung (Laccase und Peroxidase) und anschließender variabler Polymerisation [Sarkanen und Ludwig, 1971]. Die Zusammensetzung des Polymers wird also durch die Biosynthese der Monomere reguliert. Diese Biosynthese ist in Abb. 1.1 dargestellt. Der für diese Arbeit interessante Teil der

Biosynthese ist der obere Teil der Abbildung, der die Biosynthese von Ferula- bzw. Sinapinsäure zeigt. Dabei gibt es zwei Ausgangsmöglichkeiten zur Produktion dieser Säuren. Als Substrate kommen sowohl Phenylalanin, als auch Tyrosin in Frage. Tyrosin als Ausgangssubstrat kommt jedoch eher bei Gräsern vor. Die erste Reaktion stellt für beide Substrate eine Desaminierung dar, die entweder von der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) oder von der Tyrosin-Ammonium-Lyase (TAL) katalysiert wird. Dabei entsteht Zimtsäure bzw. Kumarsäure. Zimtsäure wird anschließend zu Kumarsäure hydroxyliert (Zimtsäure-4-hydroxylase, kurz: C4H), wodurch die zwei Wege sich an dieser Stelle vereinigen. Die weiteren Schritte sind die Hydroxylierung zu Kaffeesäure mit anschließender Methylierung zu Ferulasäure. Die Hydroxylierung wird von einer Kumarsäure-3-hydroxylase (C3H) katalysiert [Vanholme et al., 2010]. Die Methylierung wird von einer Kaffeesäure-O-methyltransferase (COMT) katalysiert. Die Ferulasäure wird anschließend zu 5-Hydroxyferulasäure hydroxyliert (Ferulasäure-5-Hydroxylase, kurz: F5H) und dann erneut methyliert (COMT), so dass Sinapinsäure entsteht. Die Hydroxyzimtsäuren dienen dann wiederum als Substrate für weitere Reaktionen, die letztendlich über verschiedene Wege zu den Monomeren des Lignins führen [Boerjan et al., 2003].



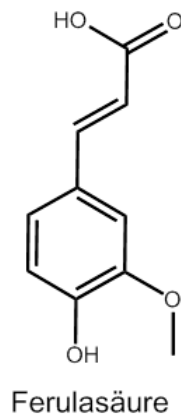
**Abb. 1.1: Biosynthese von Lignin**

Dargestellt ist ein Überblick über die Biosynthese des Lignins. Phenylalanin wird zunächst zu Zimtsäure desaminiert (PAL), anschließend durch die C4H zu Kumarsäure hydroxyliert. Alternativ wird durch die TAL auch Tyrosin zu Kumarsäure desaminiert. Durch Hydroxylierung und anschließender Methylierung am C<sub>3</sub> und C<sub>5</sub> entstehen Kaffeesäure, Ferulasäure, Hydroxyferulasäure und Sinapinsäure. Ausgehend von diesen Zimtsäurederivaten erfolgt die schrittweise Reduktion zu den jeweiligen Alkoholen. Das Enzym 4-Kumarsäure-CoA-Ligase (4CL) katalysiert dabei die Reaktion zu den Coenzym-A-Thioestern. Danach folgt die Reduktion zu den Aldehyden (Zimtsäure-CoA-Reduktase, CCR) und zu den Alkoholen (Zimtalkoholdehydrogenase, CAD). Aus den Alkoholen Kumarylalkohol, Koniferylalkohol und Sinapylalkohol können durch eine Peroxidase (POD) zu den Ligninvorstufen 4-Hydroxyphenyl, Guajacyl und Syringyl radikalisiert und damit für die Polymerisation zum Lignin aktiviert werden. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden Cosubstrate weggelassen.

## 1.1 Stand des Wissens

### 1.1.1 Eigenschaften, Vorkommen und Anwendungen von Ferulasäure

Bei trans-Ferulasäure handelt es sich um eine schwache Säure ( $pK_a=4,58$ ) aus der Gruppe der Phenolsäuren mit einem Molekulargewicht von 194,19 g/mol. Neben der IUPAC Bezeichnung (E)-3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propensäure findet man in der Literatur Trivialnamen wie 4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure [Lee et al., 2006] oder Koniferensäure [Graf, 1992]. Die Strukturformel ist in Abb. 1.2 dargestellt. Es handelt sich um einen Feststoff, der gut in Wasser löslich ist (ca. 6 g/L) und einen logP-Wert von 1,51 hat [Hansch et al., 1995]. Aufgrund des UV-Absorptionsmaximums bei 315 nm [Neil, 2006] kann Ferulasäure sehr gut spektrophotometrisch bzw. mittels HPLC und UV-Detektor analysiert werden.



**Abb. 1.2: Strukturformel von trans-Ferulasäure**

Dargestellt ist die Strukturformel von trans-Ferulasäure, auch 4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure genannt.

Ferulasäure findet sich gehäuft in Samen und Schalen von Pflanzen, wie beispielsweise Commeliniden (Reis, Weizen, Hafer), Gräsern, Gemüse und Früchten [Bourne und Rice-Evans, 1998], wobei der extrahierbare Anteil bei 0,5 – 2 % liegt [Kumar und Pruthi, 2014]. Dabei handelt es sich jedoch nicht um freie Ferulasäure, sondern um glykosidische Konjugate und um Verknüpfungen als Ester oder Amide [Kumar und Pruthi, 2014; Tilay et al., 2008]. Es ist eine alkalische, saure oder enzymatische Extraktion nötig, wobei Parameter wie Lösungsmittel, Extraktionszeit, pH-Wert und Temperatur einen großen Einfluss auf die Ausbeute haben [Buranov und Mazza, 2009]. Es wird versucht landwirtschaftliche Abfälle, wie Reis- und Maiskleie, zu nutzen und daraus beispielsweise veresterte Ferulasäure zu extrahieren [Tilay et al., 2008].

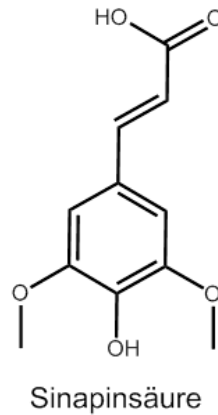
In der Nahrungsmittel- und Duftstoffindustrie kommt Ferulasäure vor allem bei der Vanillin-Herstellung zur Anwendung [Ou und Kwok, 2004]. Ferulasäure stellt dabei einen Vorläufer

des Vanillins dar, welches beispielsweise durch Decarboxylierung generiert wird. Die von der Industrie begehrte Deklaration als natur-identisches Vanillin kann dabei durch die Verwendung von Ferulasäure erreicht werden [Chattopadhyay et al., 2018]. Durch ihr Vorkommen in Getreide, spielt Ferulasäure auch eine wichtige Rolle bei der Weizenbierherstellung. Dabei wird während des Maischens Ferulasäure freigesetzt, die daraufhin bei der Gärung zu 4-Vinylguajacol decarboxyliert wird, welches das typische Weizenbieraroma ist [McMurrough et al., 1996].

Da Ferulasäure einen effektiven Radikalfänger darstellt, ergeben sich viele nutzbringende Eigenschaften, wie anti-oxidative und anti-entzündliche Wirkungen, sowie positive Effekte bei der Behandlung von beispielsweise Krebs, Thrombose und Koronarerkrankungen [Graf, 1992; Kumar und Pruthi, 2014; Ou und Kwok, 2004; Wang und Ou-Yang, 2005]. Ferulasäure ist in Japan bereits als Lebensmittelzusatz zur Verzögerung von Oxidation zugelassen, um Verfärbungen z.B. von Bananen und grünen Erbsen zu vermeiden [Zhao und Moghadasian, 2008]. Auch die anti-mikrobielle Eigenschaft wird dabei von der Lebensmittelindustrie genutzt. Beide Eigenschaften sind auch für die Kosmetikindustrie von Interesse [Cho et al., 2000; Graf, 1992; Robbins, 2003]. Die Eigenschaft des Radikalfangens wird dabei für eine anti-aging Wirkung genutzt, und die anti-mikrobielle Eigenschaft zur Verlängerung der Haltbarkeit. Die gesundheitsförderlichen Wirkungen sind bereits vielfach publiziert, die teilweise auf die Anwendung von Pflanzen aus der traditionellen chinesischen Medizin [Kumar und Pruthi, 2014; Ou und Kwok, 2004], die einen hohen Gehalt an Ferulasäure enthalten, zurückgehen. Aber auch die gezielte Gabe von Ferulasäure zur Beeinflussung der Gesundheit bzw. Heilung wurde bereits untersucht [Wang und Ou-Yang, 2005; Zhao und Moghadasian, 2008]. Man kann man sich aufgrund der positiven Eigenschaften eine große Vielfalt an Einsatzgebieten vorstellen.

### **1.1.2 Eigenschaften, Vorkommen und Anwendungen von Sinapinsäure**

Bei trans-Sinapinsäure handelt es sich um eine schwache Säure ( $pK_a=4,6$ ) aus der Gruppe der Phenolsäuren mit einem Molekulargewicht von 224,21 g/mol. Ein weiterer bekannter Trivialname ist 3,5-Dimethoxy-4-hydroxymzimtsäure [Zou et al., 2002], wobei der IUPAC-Name (E)-3-(4-Hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-2-propensäure ist. Die Strukturformel ist in Abb. 1.3 dargestellt. Es handelt sich um einen Feststoff der mäßig gut in Wasser löslich ist und einen logP-Wert von 1,3 aufweist [Gaspar et al., 2010]. So wie Ferulasäure ist auch Sinapinsäure gut spektrophotometrisch bzw. mittels HPLC und UV-Detektor nachweisbar ( $UV_{max}=312\text{ nm}$ ) [Neil, 2006].



**Abb. 1.3: Strukturformel von trans-Sinapinsäure**

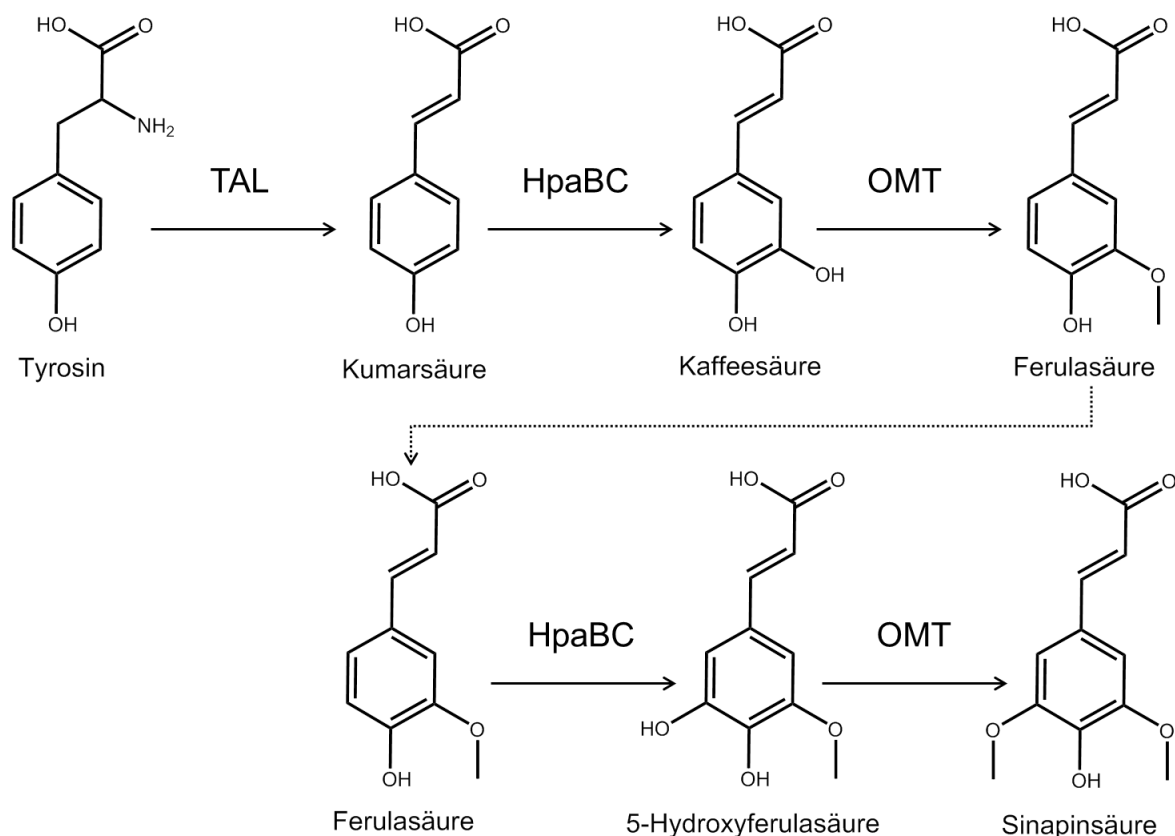
Dargestellt ist die Strukturformel von trans-Sinapinsäure, auch 3,4-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure genannt.

Sinapinsäure ist weit verbreitet im Pflanzenreich, wie beispielsweise in Früchten, Gemüse und Getreide, wobei der größte Anteil in Rapssamen vorkommt [Nićiforović und Abramović, 2014]. 70 – 80 % der Phenolsäuren in Rapssamen sind Sinapinsäure und deren Ester [Bouchereau et al., 1991; Dabrowski und Sosulski, 1984; Naczki et al., 1998]. Sinapinsäure-Ester dienen insbesondere dem Schutz vor UV-B-Strahlung in Pflanzen [Dean et al., 2014]. Bekannte Derivate der Sinapinsäure sind 4-Vinylsyringol, Sinapoylcholin, Syringaldehyd und Sinapoylglukose (1-O-β-D-Glukopyranosyl-Sinapinsäure). Die Extraktion aus Pflanzen gestaltet sich aufgrund der hohen Reaktivität, wie die Reduktion zu Sinapylaldehyd oder 4-Vinylsyringol bei hohen Temperaturen, als schwierig [Cai et al., 1999a], weshalb eine alternative Quelle für Sinapinsäure von Interesse wäre. In den letzten Jahren ist Sinapinsäure in den Fokus von einigen Studien zur gesundheitsfördernden Wirkung gerückt. Wie auch andere Phenolsäure besitzt Sinapinsäure die Fähigkeit zum Abfangen von freien Radikalen (Kaffeensäure > Sinapinsäure > Ferulasäure > Kumarsäure) [Hotta et al., 2002], was einen anti-oxidativen [Natella et al., 1999], anti-mikrobiellen [Nowak et al., 1992], anti-entzündlichen [Yun et al., 2008], anti-aging [Yoon et al., 2007] und anti-kanzerogenen [Hudson et al., 2000] Effekt hat. Sinapinsäure soll dabei sogar ein noch größeres Potenzial als Ferulasäure besitzen [Nićiforović und Abramović, 2014]. Sinapoylcholin wurde beispielsweise als Inhibitor der Acetylcholinesterase beschrieben und ist damit ein potenzielles Therapeutikum bei Alzheimer, Seniler Demenz, Ataxie und Parkinson [He et al., 2008; Yates et al., 2019].

Sinapinsäure wird bisher vor allem als Matrixsubstanz bei MALDI-MS verwendet, jedoch ist auch für Sinapinsäure eine breite Anwendung als Konservierungsmittel in Nahrungsmitteln, Kosmetika und in der pharmazeutischen Industrie denkbar.

### 1.1.3 Biosynthese von Ferula- und Sinapinsäure – Vergleich und Auswahl von Enzymen

Für die Biosynthese von Ferula- bzw. Sinapinsäure ist eine drei- bzw. fünf-stufige Reaktionskaskade ausgehend von Tyrosin nötig (Abb. 1.4). Die Reaktionen werden dabei von der TAL, 4-Hydroxyphenylacetat-3-hydroxylase (HpaBC) (in Pflanzen als C4H bekannt) und der S-Adenosylmethionin (SAM)-abhängigen O-Methyltransferase (OMT) katalysiert. Die erste Reaktion ist die Desaminierung von Tyrosin zu Kumarsäure, katalysiert von der TAL. Anschließend erfolgt eine Hydroxylierung zu Kaffeesäure (HpaBC) und die Methylierung der eingeführten Hydroxylgruppe (OMT), wobei Ferulasäure entsteht. Durch Wahl einer spezifischen 3-Hydroxylase kann die Synthese von Ferulasäure erfolgen. Bei Wahl einer 3- und 5-Hydroxylase (auch HpaBC) kann Ferulasäure weiter zu 5-Hydroxyferulasäure reagieren. Die erneute Methylierung zu Sinapinsäure wird dann wiederum von der OMT katalysiert. Nachfolgend werden die Enzyme und Reaktionen beschrieben, sowie die bereits bekannten enzymkinetischen Parameter (Tab. 1.1, S. 17) und Produktionsausbeuten bei Anwendung dieser Enzyme zusammengefasst (Tab. 1.2, S. 18).



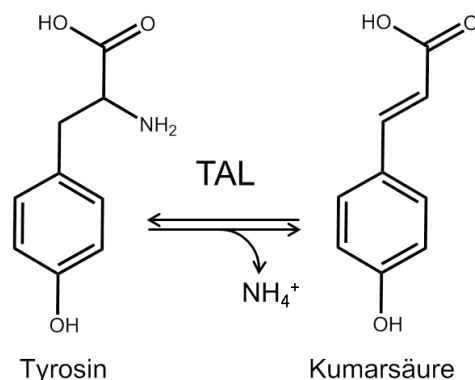
**Abb. 1.4: Reaktionskaskade zur Biosynthese von Ferula- bzw. Sinapinsäure**

Dargestellt sind die Reaktionen ausgehend von Tyrosin, über Kumarsäure, Kaffeesäure zu Ferulasäure bzw. die Weiterreaktionen zu 5-Hydroxyferulasäure und Sinapinsäure. Die Desaminierung wird von der TAL katalysiert. Die Hydroxylierung von Kumarsäure zu Kaffeesäure und Ferulasäure zu 5-Hydroxyferulasäure wird dabei von der HpaBC katalysiert. Die Methylierung von Kaffeesäure zu Ferulasäure und 5-Hydroxyferulasäure zu Sinapinsäure wird von der OMT katalysiert. Aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit wurden Cosubstrate ( $\text{FADH}_2$ , SAM) weggelassen. Die vollständigen Reaktionsgleichungen finden sich auf den nachfolgenden Seiten.

### 1.1.3.1 TAL

Aufgrund des kürzeren Syntheseweges sollte die Produktion mit Tyrosin und damit mit der Reaktion der TAL beginnen. Würde die Produktion mit Phenylalanin beginnen, wäre der Zwischenschritt der Bildung von Zimtsäure nötig, wodurch ein weiteres Enzym zur Hydroxylierung nötig wäre. Die Verwendung einer TAL verkürzt somit die Reaktionskaskade um einen Schritt und ein Enzym im Vergleich zur Verwendung einer PAL, weshalb die Auswahl einer TAL sinnvoll ist.

Die TAL (EC 4.3.1.23) gehört zur Familie der Ammonium-Lyasen, die die (aromatischen) Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin (PAL) und Histidin (Histidin-Ammonium-Lyase, HAL) desaminieren. Dabei wird an den jeweiligen Substraten eine nicht-oxidative Eliminierung von Ammonium-Ionen katalysiert, wodurch die jeweilige  $\alpha, \beta$ -ungesättigte Säure entsteht [Parmeggiani et al., 2018]. Die Reaktion der TAL ausgehend von Tyrosin ist in Abb. 1.5 dargestellt. In Pflanzen, vor allem in Dikotyledonen, findet man häufig PALs. In Monokotyledonen dagegen findet man auch PALs mit einer Aktivität gegenüber Phenylalanin und Tyrosin, weshalb sie dann als PAL/TAL bezeichnet werden. Dies stellt eine alternative Route zur Bildung der Phenylpropanoid-Vorstufe Kumarsäure dar. In Bakterien sind Phenylpropanoide nicht sehr häufig, weshalb auch PALs und TALs nicht allzu verbreitet sind [Louie et al., 2006]. Zimtsäuren können jedoch auch in Bakterien Intermediate in der Biosynthese von Antibiotika oder Antimykotika sein. So wurde beispielsweise in *Saccharothrix espanaensis* eine TAL gefunden, die durch die Bildung von Kumarsäure zu Saccharomicin, einem Antibiotikum, beiträgt [Berner et al., 2006]. Auch in phototrophen Bakterien wie *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides* und *Halorhodospira halophila* wurden TALs beschrieben. In diesen Bakterien dient Kumarsäure als Vorstufe für das Chromophor des photoaktiven gelben Proteins [Kyndt et al., 2002].



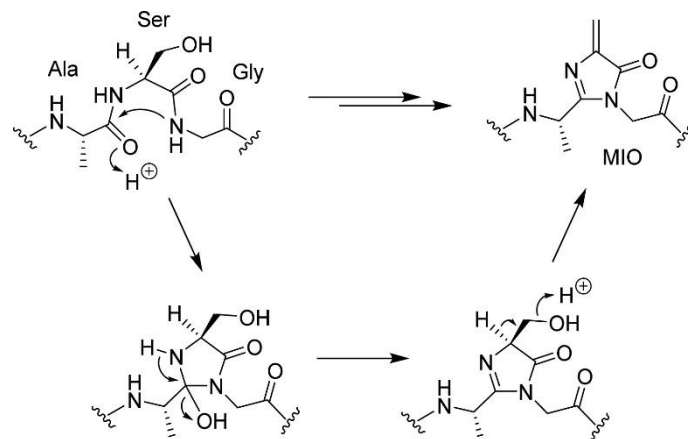
**Abb. 1.5: Reaktion der TAL**

Die TAL katalysiert die Desaminierung von Tyrosin zu Kumarsäure unter Abspaltung von Ammonium-Ionen. Es handelt sich um eine Gleichgewichtsreaktion, die auf Seiten der Produktbildung (Kumarsäure) liegt ( $K_{\text{app}}=4,7 \text{ M}$ ,  $\Delta G^\circ=-0,93 \text{ kcal/mol}$ ) [Havir und Hanson, 1968].



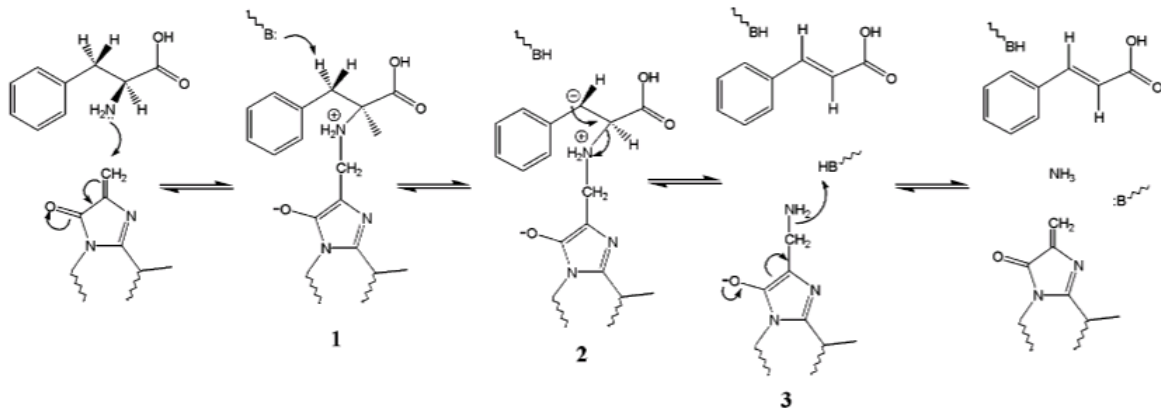
Bei der TAL handelt es sich um ein Homotetramer, welches beispielsweise bei der Variante aus *R. capsulatus* 58 kDa (Monomer) groß ist [Kyndt et al., 2002]. Im aktiven Zentrum entscheidet eine Aminosäure über die Spezifität gegenüber Tyrosin oder Phenylalanin. Histidin (His89 bei *R. sphaeroides*) ist dabei konserviert in TALs und Phenylalanin in dieser Position bei PALs [Louie et al., 2006]. Ein typisches strukturelles Merkmal der Ammonium-Lyasen ist die post-translationale spontane autokatalytische Bildung der aminogenen Gruppe 4-Methylenimidazol-5-on (MIO). Diese entsteht aus dem internen Tripeptid Alanin-Serin-Glycin durch Zyklisierung und Dehydratation [Parmeggiani et al., 2018] (Abb. 1.6). Nachgewiesen wurde diese Besonderheit bei der Aufklärung der Kristallstrukturen der PALs aus *Rhodospiridium toruloides* [Calabrese et al., 2004] und *Petroselinum crispum* [Ritter und Schulz, 2004], der HAL aus *Pseudomonas putida* [Schwede et al., 1999], sowie der TAL aus *R. sphaeroides* [Louie et al., 2006]. Bei dem katalytischen Mechanismus der Desaminierung handelt es sich vermutlich um eine E1cB-Eliminierung (cB: englisch für *conjugated base*, konjugierte Base) [Lovelock et al., 2014]. Der Mechanismus der PAL-katalysierten Desaminierung von Phenylalanin ist in Abb. 1.7 dargestellt. Im ersten Schritt reagiert die MIO-Gruppe mit der Aminogruppe von Phenylalanin. Die elektronenziehende Wirkung des aromatischen Ringes und die positive Ladung des Stickstoffs aktivieren das C3 des Substrates zur Deprotonierung durch eine basische Seitenkette des Enzyms (1), wodurch ein Carbanion (2) entsteht. Es kommt zur Übertragung der Aminogruppe auf die MIO-Gruppe, wodurch Zimtsäure entsteht. Abschließend wird der MIO-NH<sub>2</sub>-Komplex von einer sauren Seitenkette des Enzyms protoniert (3), sodass NH<sub>3</sub> eliminiert und die MIO-Gruppe regeneriert wird [Calabrese et al., 2004].

Die Kristallstruktur der TAL aus *R. sphaeroides* ist beispielhaft in Abb. 1.8 dargestellt.



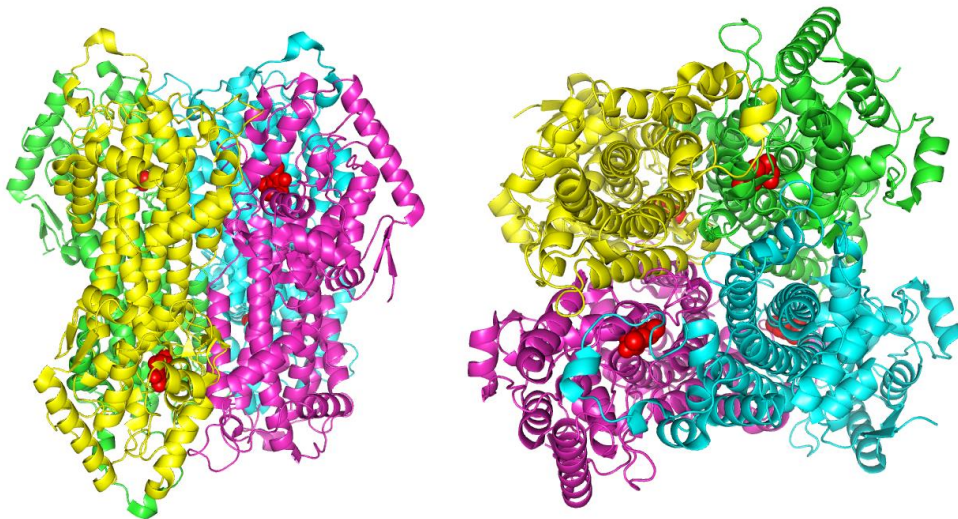
**Abb. 1.6: Autokatalytische Bildung der aminogenen Gruppe MIO**

Dargestellt ist der Mechanismus der autokatalytischen Bildung von MIO aus dem Tripeptid Alanin-Serin-Glycin. [Parmeggiani et al., 2018].



**Abb. 1.7: E1cB-Reaktionsmechanismus der Desaminierung**

Dargestellt ist der vermutete E1cB-Reaktionsmechanismus der Desaminierung von Phenylalanin, katalysiert durch PAL/TAL. (1) Aktivierung des C3-Atoms des Substrates, (2) Deprotonierung durch basische Seitenkette und Bildung eines Carbanion, (3) Übertragung Aminogruppe auf MIO, Bildung von Zimtsäure, anschließend wird MIO-Gruppe durch saure Seitenkette regeneriert. [Calabrese et al., 2004]



**Abb. 1.8: Kristallstruktur der TAL aus *Rhodobacter sphaeroides* (PDB Code 2O6Y)**

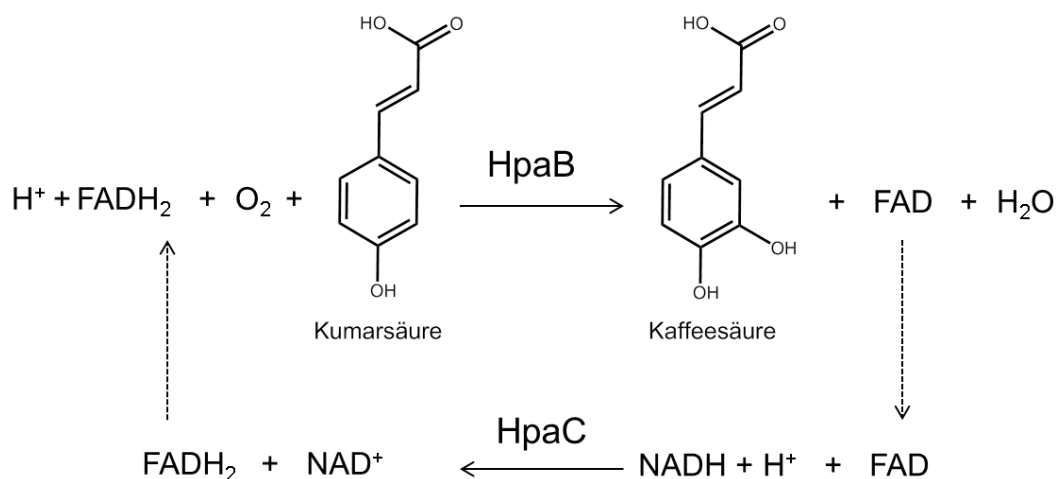
Die 3D-Kristallstruktur der TAL aus *Rhodobacter sphaeroides* ist in der Homotetramer Form aus zwei unterschiedlichen Perspektiven dargestellt. Das Bild wurde mit Pymol erstellt, dabei wurde die Struktur als Cartoon dargestellt und nach den Untereinheiten eingefärbt. In Rot sind die MIO-Gruppen als Kugeln hervorgehoben.

### 1.1.3.2 HpaBC

In Pflanzen wird die Hydroxylierung von Kumarsäure zu Kaffeesäure von der C3H katalysiert. Dabei handelt es sich aber zumeist um Cytochrom P450-abhängige Enzyme, welche Membran-assoziiert sind. Da die rekombinante Produktion solcher Proteine in *E. coli* eher problematisch ist, wurde der Fokus dieser Arbeit auf die Verwendung der löslichen 4-Hydroxyphenylacetat-3-hydroxylase aus Prokaryoten gelegt. Die 4-Hydroxyphenylacetat-3-hydroxylase, kurz HpaBC oder auch HPAH, gehört zu der Familie der Flavoprotein-

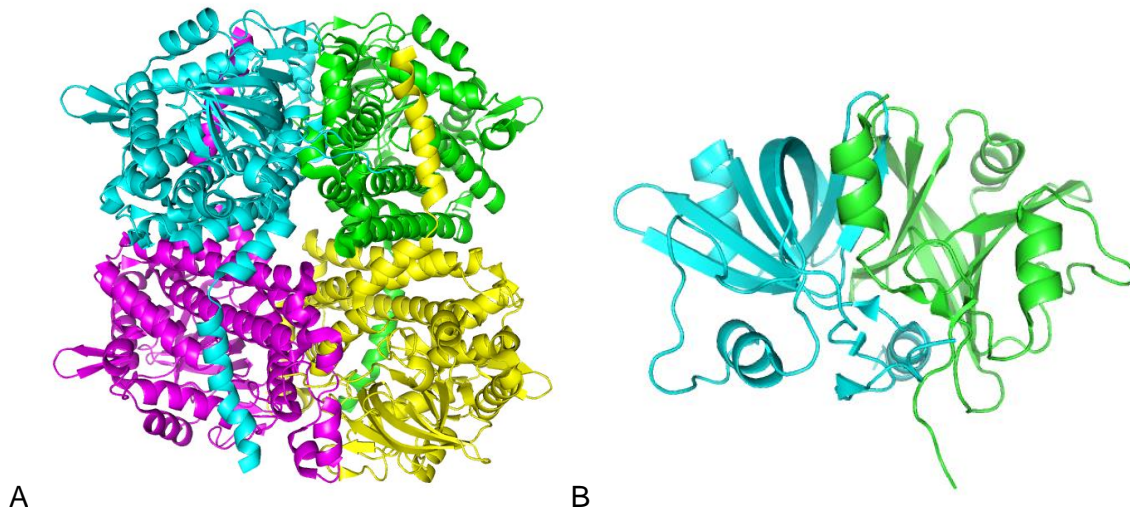
Monooxygenasen, die man in zwei Gruppen einteilen kann. Es gibt die Einzelkomponenten-Monooxygenasen, wie die Hydroxybenzoathydroxylasen oder Phenolhydroxylasen, die zur Detoxifizierung von Böden beitragen [Ballou et al., 2005]. Außerdem gibt es die Zweikomponenten-Monooxygenasen, die eine zusätzliche Flavinreduktase zur Synthese von reduziertem Flavin nutzen, um die anspruchsvollen Reaktionen effizient zu katalysieren. Bisher wurde eine solche HpaBC unter Anderem in *Escherichia coli* [Prieto et al., 1993] und in *Pseudomonas aeruginosa* [Chakraborty et al., 2009] beschrieben. Die HpaB ist dabei die Oxygenase, die in der Natur die Hydroxylierung von Hydroxyphenylacetat unter Verwendung von  $\text{FADH}_2$  und  $\text{O}_2$  zu Dihydroxyphenylacetat und  $\text{FAD}$  mit  $\text{H}_2\text{O}$  katalysiert [Kim et al., 2007]. Es wurden jedoch weitere Substanzen, wie Kumarsäure, beschrieben, die von der HpaBC hydroxyliert werden [Furuya und Kino, 2014; Prieto et al., 1993]. Die Regeneration von  $\text{FADH}_2$  katalysiert dann die Reduktase HpaC unter Verwendung von  $\text{NADH}$  [Galán et al., 2000] (Abb. 1.9). Im Detail reagiert dabei das reduzierte Flavin mit  $\text{O}_2$  zum relativ stabilen und reaktiven Flavin-C4a-hydroperoxid, welches die Hydroxylierung des Substrates bewirkt. Dadurch entsteht Flavin-C4a-hydroxid wovon anschließend Wasser eliminiert wird, wodurch die Reaktion abgeschlossen wird. Die Übertragung des labilen Flavins zwischen HpaB und HpaC ist bisher noch nicht gut verstanden, es wird jedoch beschrieben, dass es sich um eine schnelle Diffusion handelt, bevor reaktive Sauerstoffspezies, wie  $\text{H}_2\text{O}_2$ , gebildet werden können [Ballou et al., 2005; Galán et al., 2000].

Strukturell handelt es sich bei der HpaB um ein Homotetramer, bei der HpaC um ein Homodimer. Die Reduktase ist dabei mit ca. 19 kDa (Monomer) die kleine Komponente und die Oxygenase mit ca. 60 kDa (Monomer) die große Komponente. Eine Kristallstruktur der HpaB und HpaC aus *Thermus thermophilus* wurde bereits beschrieben [Kim et al., 2007] (Abb. 1.10).



**Abb. 1.9: Reaktionen der HpaBC**

Bei der HpaBC handelt es sich um zwei einzelne Enzyme der Monooxygenase HpaB, die die Oxidation von Kumarsäure zu Kaffeesäure unter Verwendung von  $\text{FADH}_2$  und  $\text{O}_2$  katalysiert, sowie der Reduktase HpaC, die die Regeneration von  $\text{FADH}_2$  unter Verwendung von  $\text{NADH}$  katalysiert.

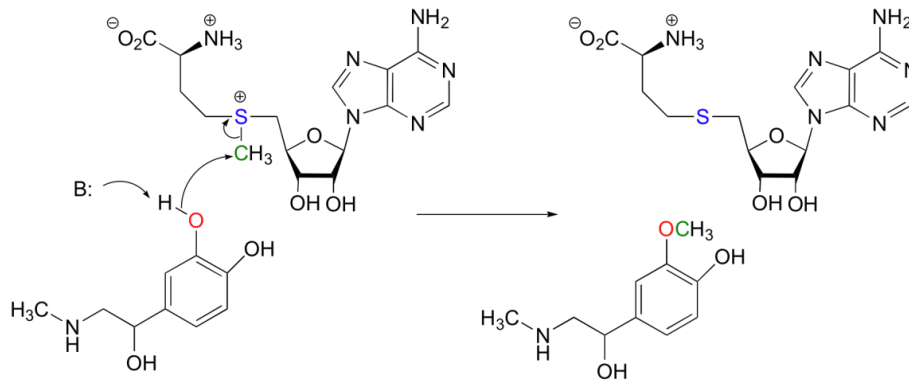


**Abb. 1.10: Kristallstruktur der HpaB und HpaC aus *Thermus thermophilus***

Die 3D-Kristallstruktur der HpaB (**A**) (PDB Code 2YYG) und HpaC (**B**) (PDB Code 2ED4) aus *T. thermophilus* ist in der Homotetramer bzw. Homodimer Form dargestellt. Das Bild wurde mit Pymol erstellt, dabei wurde die Struktur als Cartoon dargestellt und nach den Untereinheiten eingefärbt.

### 1.1.3.3 SAM-abhängige OMT

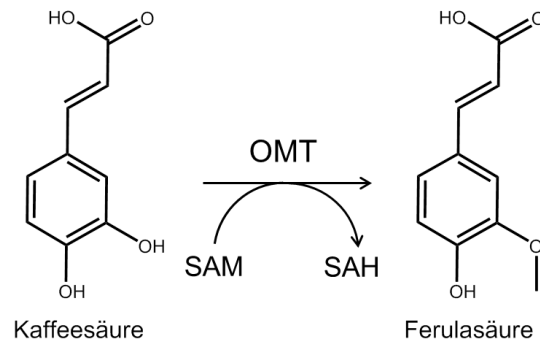
Methyltransferasen sind weit verbreitet in allen Domänen des Lebens [Liscombe et al., 2012]. Sie katalysieren eine Vielzahl an Methylierungen von beispielweise Nukleinsäuren, Proteinen oder kleineren Molekülen, wie Isoprenoiden, Phenylpropanoiden und Alkaloiden. Durch Methylierung werden Mechanismen wie Epigenetik reguliert, aber auch Funktionalitäten von Biomolekülen beeinflusst [Wessjohann et al., 2014]. Dabei wird fast ausschließlich SAM als Cosubstrat genutzt. Alternativ dazu ist beispielsweise die Homocystein-S-Methyltransferase in der Lage die Methylgruppe von S-Methyl-L-methionin auf L-Homocystein zu übertragen [Schlenk und Dainko, 1975]. Im Allgemeinen wird die Methylgruppe von SAM auf ein Akzeptor-Molekül übertragen, wobei S-Adenosylhomocystein (SAH) entsteht. Bei diesem Transfer handelt es sich um einen  $S_N2$ -Mechanismus, wobei Nukleophile, wie O, N, C, Se, As oder Halogenoide von SAM, dem Elektrophil, angegriffen werden können [Struck et al., 2012] (Abb. 1.11). Eine basische Aminosäure im aktiven Zentrum deprotoniert die Hydroxylgruppe des Substrates, wodurch die Nukleophilie gesteigert wird und das Elektrophil angegriffen werden kann. Die Methylgruppe von SAM fungiert durch das positiv geladene Sulfat als Elektrophil. Ebenso macht die positive Ladung die Methylgruppe zu einer sehr guten Abgangsgruppe, da ein neutrales und viel stabileres Sulfat entsteht (SAH) [Soderberg, 2012].



**Abb. 1.11: S<sub>N</sub>2-Mechanismus der Methyltransferase**

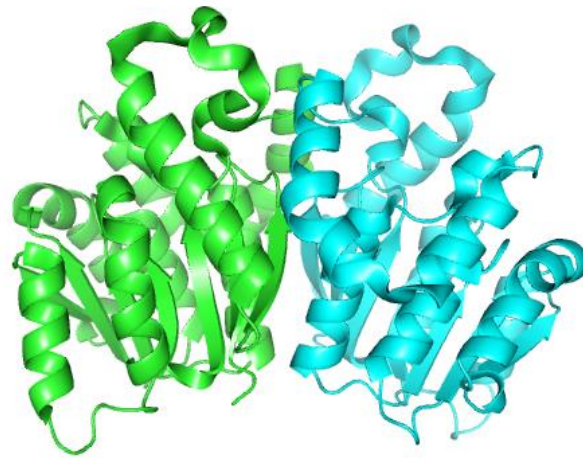
Dargestellt ist die O-Methylierung von Epinephrin durch nukleophilen Angriff (S<sub>N</sub>2) der Methylgruppe von SAM. Eine basische Aminosäureseitenkette (B) des aktiven Zentrums deprotoniert dafür die Hydroxylgruppe, um die Nucleophilie zu erhöhen. Die Methylgruppe von SAM fungiert aufgrund des positiv geladenen Sulfates als Elektrophil. [Soderberg, 2012]

Bei der O-Methylierung wird die Methylgruppe auf eine Hydroxylgruppe von Phenolen, Ribosen oder Carboxylgruppen übertragen [Wessjohann et al., 2014]. Die am besten untersuchte OMT ist die mammalische Catechol-OMT (mCOMT), welche beispielsweise in der Leber für die Detoxifizierung von Catechol sorgt. Die Reaktion der mCOMT ist abhängig von Mg<sup>2+</sup>-Ionen, da hier die Nucleophilie von Sauerstoff zur Aktivierung noch weiter erhöht werden muss. Die Mg<sup>2+</sup>-Ionen ersetzen dabei die Protonen der Hydroxylgruppe und bewirken dadurch die Steigerung der Nucleophilie [Vidgren et al., 1994]. In Pflanzen gibt es eine verwandte OMT, die Phenylpropanoide methyliert und ebenso von bivalenten Kationen abhängig ist. Diese Klasse ist bekannt als *Caffeoyl coenzyme A OMT* (CCoAOMT) und katalysiert die Methylierung in meta-Position von aromatischen vicinalen Dihydroxygruppen [Kopycki et al., 2008] (beispielhafte Reaktion: Abb. 1.12). Sie besitzen meist ein geringes Molekulargewicht (23-27 kDa, Monomere) und methylieren häufig Vorstufen der Phenylpropanoide [Kopycki et al., 2008; Ye et al., 1994]. Dazu gehört auch die Phenylpropanoid- und Flavonoid-OMT (PFOMT) aus *Mesembryanthemum crystallinum* (Eisblume), welche unter Anderem den UV-Schutz durch Methylierung von Flavonoiden unterstützt [Ibdah et al., 2003]. Wie in der Kristallstruktur erkennbar, handelt es sich um ein Homodimer, welches die für diese Enzyme typische Rossmann-Faltung (8  $\alpha$ -Helices, 7  $\beta$ -Faltblätter) aufweist [Kopycki et al., 2008] (Abb. 1.13). In Angiospermen gibt es eine weitere Klasse von Metall-unabhängigen OMTs, welche vor allem Kaffeesäure und deren Derivate methyliert (COMT) [Inoue et al., 1998]. Zu dieser Gruppe gehört auch die COMT aus *Medicago sativa*, von der ebenso die Kristallstruktur bekannt ist und die eine hohe Sequenzähnlichkeit zur PFOMT aufweist [Zubieta et al., 2002]. In beiden Varianten spielt eine Lysin-Seitenkette im aktiven Zentrum eine entscheidende Rolle bei dem nukleophilen Angriff [Brandt et al., 2015].



**Abb. 1.12: Reaktion der SAM-abhängigen OMT**

Dargestellt ist die Methylierung von Kaffeesäure zu Ferulasäure unter Verwendung von SAM.



**Abb. 1.13: Kristallstruktur der PFOMT aus *Mesembryanthemum crystallinum* (PDB Code 3C3Y)**

Die 3D-Kristallstruktur der PFOMT aus *M. crystallinum* ist in der Homodimer Form dargestellt. Das Bild wurde mit Pymol erstellt, dabei wurde die Struktur als Cartoon dargestellt und nach den Untereinheiten eingefärbt.

#### 1.1.3.4 Übersicht der verwendeten Enzyme zur Kumar-, Kaffee-, und Ferulasäure

In Tab. 1.1 ist eine Auswahl an enzymkinetischen Parametern, wie  $K_M$ ,  $k_{cat}$  und spezifische Aktivität, der Enzyme TAL, Hydroxylase (HpaB) und OMT zusammengestellt. In Tab. 1.2 ist eine Übersicht der verwendeten Enzyme der Kumar-, Kaffee- und Ferulasäure in *E. coli* zusammengefasst. Dabei wurde auch die Verwendung eines Tyrosin-Überproduzenten gekennzeichnet. Bei der Produktion von Ferulasäure als Endprodukt handelt es sich, nach bestem Wissen und Gewissen, um eine vollständige Zusammenstellung der Literatur.

Die Produktion der Phenylpropanoide wurde häufig mit den TALs aus *S. espanaensis* (SeSam8), *R. capsulatus* (RcTAL) und *R. glutinis* (RgTAL) durchgeführt. Für diese Varianten wurden verschiedene kinetische Parameter beschrieben, die teilweise durch Unterschiede in der Durchführung voneinander abweichen. So wurden für die RcTAL die  $K_M$ -Werte 15,6  $\mu\text{M}$  (25 °C) [Kyndt et al., 2002] und 160  $\mu\text{M}$  (35 °C) [Xue et al., 2007] beschrieben. Für die RgTAL wurde ein  $K_M$ -Wert von 110  $\mu\text{M}$  beschrieben [Gatenby et al., 2002]. Zusätzlich wurde

eine kompetitive Hemmung für die *RgTAL* beschrieben, wobei ein  $K_i=20 \mu\text{M}$  (Kumarsäure) bei  $\text{pH}=7$  und ein  $K_i=659 \mu\text{M}$  (Kumarsäure) bei  $\text{pH}=9,5$  bestimmt wurde [Sariaslani, 2007]. Obwohl die *SeSam8* bereits häufig zur Produktion von Phenylpropanoiden zum Einsatz kam (Tab. 1.2), wurde ein nur niedriger  $k_{\text{cat}}$  von  $0,015 \text{ s}^{-1}$  beschrieben [Berner et al., 2006]. Die *RcTAL* und *RgTAL* wurden für die Verwendung in der vorliegenden Arbeit ausgewählt.

Die Produktion von Kaffeesäure wurde mit den Hydroxylasen aus *S. espanaensis* (*SeSam5*), *E. coli* (*EcHpaBC*) und *P. aeruginosa* (*PaHpaBC*) durchgeführt (Tab. 1.2). Die *SeSam5* wurde mehrfach für die Kaffeesäure-Produktion verwendet und führte beispielsweise zu  $4,2 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{h})$  [Kang et al., 2012]. Für die *EcHpaBC* wurden die enzymkinetischen Parameter  $K_M=18,4 \mu\text{M}$  und  $k_{\text{cat}}=1,1 \text{ s}^{-1}$  für das natürliche Substrat (4-Hydroxyphenylacetat) bestimmt [Lin und Yan, 2014]. Es wurde jedoch auch beschrieben, dass sich die Parameter bei größeren Substraten, wie Resveratrol, verschlechtern [Lin und Yan, 2014]. Auch wenn diese Variante ein großes Substratspektrum aufweist, ist sie spezifisch für die 3-Hydroxylierung [Prieto et al., 1993]. Neben dem Einsatz zur *de novo* Kaffeesäure-Produktion, wurde auch eine vollständige Umwandlung von  $0,6 \text{ mM}$  Kumarsäure zu Kaffeesäure in 3 h ( $36 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{h})$ ) beschrieben [Lin und Yan, 2012]. Für die *PaHpaBC* wurde bisher nur der Umsatz aus Kumarsäure beschrieben, jedoch scheint diese Variante mit  $883 \text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{h})$  Kaffeesäure eine sehr effiziente Hydroxylase zu sein [Furuya und Kino, 2014]. Enzymkinetische Parameter wurden für die *PaHpaBC* noch nicht beschrieben, jedoch ist bekannt, dass auch Kaffeesäure, Ferulasäure und Coniferylaldehyd hydroxyliert werden [Furuya und Kino, 2014]. Diese Variante ist somit vermutlich keine Option für die Synthese von Ferulasäure, jedoch für die Sinapinsäure-Synthese von Interesse und wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit eingesetzt. Ein weiteres mögliches Enzym für die Sinapinsäure-Produktion stellt die Mutationsvariante *EcHpaB(Y301I)C* dar, die durch den Aminosäure-Austausch eine zusätzliche 5-Hydroxylase-Aktivität aufweist. Dieser Aminosäure-Austausch mit Funktionserweiterung wurde vom Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie Halle generiert und charakterisiert [Herrmann, 2018]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Verwendung der Hydroxylasen *EcHpaBC*, *PaHpaBC*, *EcHpaB(Y301I)C* und *SeSam5* untersucht. Da es sich bei der *SeSam5* nativ nicht um ein Zweikomponenten-Enzym mit Flavinreduktase handelt, wurde zur Optimierung eine Flavinreduktase aus *S. espanaensis* angefügt. Nachfolgend wird diese Kombination der Enzyme als *SeHpaBC* bezeichnet.

Die Produktion von Ferulasäure wurde bisher in den Arbeiten von Choi *et al.*, Kang *et al.*, und An *et al.* beschrieben [An et al., 2016; Choi et al., 2011; Kang et al., 2012]. Dabei wurden die *TAL* (*Sam8*) und die Hydroxylase (*Sam5*) aus *S. espanaensis* und die *COMT* aus *Arabidopsis thaliana* [Choi et al., 2011; Kang et al., 2012] bzw. *Oryza sativa* [An et al., 2016] verwendet und die Gene als monocistronisches Konstrukt unter der Kontrolle des T7-Promoters designiert. Die Produktion erfolgte in *E. coli* C41(DE3) [Choi et al., 2011], *E. coli*

C41(DE3)  $\Delta$ tyrR:tyrA<sup>fbr</sup> aroG<sup>fbr</sup> [An et al., 2016] und BL21(DE3)  $\Delta$ tyrR  $\Delta$ pheA [Kang et al., 2012], wobei die Mutationen zu einem Tyrosin-Überproduktionsstamm führten. Die höchste Ferulasäure-Konzentration konnte in der Arbeit von Kang *et al.* mit  $196 \pm 26$  mg/L ( $1,0 \pm 0,1$  mM) erzielt werden. Dafür wurden die transformierten *E. coli*-Zellen im Schüttelkolben in Komplexmedium angezogen, für 5 h bei 37 °C induziert, geerntet und in Minimalmedium resuspendiert. Die Produktion erfolgte dann unter Zugabe von 15 g/L Glukose über 36 h bei 26 °C (Raum-Zeit-Ausbeute:  $5,4 \pm 0,7$  mg/(L\*h)) [Kang et al., 2012]. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit auch die Biosynthese von Kumar- und Kaffeesäure mit dem jeweils kürzeren Konstrukt untersucht. Dabei konnten  $974 \pm 30$  mg/L ( $5,9 \pm 0,2$  mM) Kumarsäure und  $150 \pm 8$  mg/L ( $0,8 \pm 0,04$  mM) Kaffeesäure produziert werden. Aufgrund von Vorarbeiten des Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie Halle [Herrmann, 2018] geriet die PFOMT aus *M. crystallinum* in den Fokus der vorliegenden Arbeit. Mit einem  $K_M$ -Wert von 1  $\mu$ M gegenüber Kaffeesäure [Kopycki et al., 2008] stellte diese Variante einen interessanten Kandidaten dar. Aufgrund der kinetischen Parameter wurde außerdem die COMT aus *M. sativa* [Parvathi et al., 2001] für weitere Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit ausgewählt. Obwohl die COMT aus *Lolium perenne* bisher nicht rekombinant in *E. coli* produziert wurde, überzeugten die guten enzymkinetischen Parameter gegenüber Kaffee- und 5-Hydroxyferulasäure [Louie et al., 2010], weshalb auch diese Variante zur weiteren Untersuchung in der vorliegenden Arbeit ausgewählt wurde.

Eine rekombinante *in vivo* Sinapinsäure-Synthese wurde bisher nicht beschrieben.



**Tab. 1.1: Auswahl von kinetischen Parametern von TAL, Hydroxylasen und OMT**

Se: *S. espanaensis*, Rc: *R. capsulatus*, Rg: *R. glutinis*, Ec: *E. coli*, Mc: *M. crystallinum*, Ms: *M. sativa*, Lp: *L. perenne*, 4-HPA: 4-Hydroxyphenylacetat

Enzym	Variante	Substrat	$K_M$ [ $\mu\text{M}$ ]	$k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	spez. Aktivität [U/mg]	Anmerkung	Literatur
TAL	SeSam8	Tyrosin	15,5	0,015			[Berner et al., 2006]
	RcTAL	Tyrosin	15,6	27,7		35 °C, pH=8,5	[Kyndt et al., 2002]
		Tyrosin	160	0,06		25 °C, pH=8,5	[Xue et al., 2007]
		Tyrosin				$0,9 \times 10^{-3}$	[Lin und Yan, 2012]
		L-DOPA				$1,5 \times 10^{-3}$	[Lin und Yan, 2012]
	RgTAL	Tyrosin	110	0,5			[Gatenby et al., 2002]
Hydroxylase	EcHpaBC	4-HPA	18,4	1,1			[Lin und Yan, 2014]
		Resveratrol	145	0,09			[Lin und Yan, 2014]
		Tyrosin				$2,44 \times 10^{-3}$	[Lin und Yan, 2012]
		Kumarsäure				$5,37 \times 10^{-3}$	[Lin und Yan, 2012]
OMT	McPFOMT	Kaffeesäure	1,0	0,02			[Kopycki et al., 2008]
	MsCOMT	Kaffeesäure	59,5				[Parvathi et al., 2001]
		OH-Ferulasäure	6,8				[Parvathi et al., 2001]
	LpCOMT	Kaffeesäure	10,3			homolog produziert	[Louie et al., 2010]
		OH-Ferulasäure	3,0			homolog produziert	[Louie et al., 2010]

**Tab. 1.2: Übersicht der verwendeten Enzyme zur Produktion von Kumar-, Kaffee- und Ferulasäure in *E. coli***

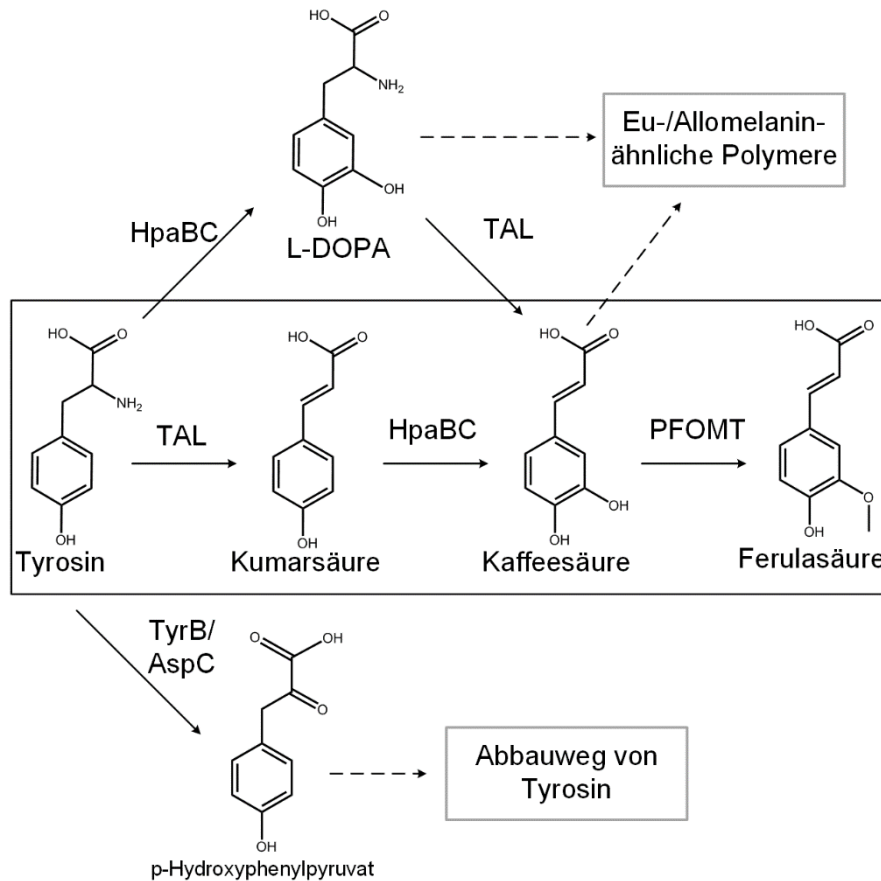
Se: *S. espanaensis*, Rg: *R. glutinis*, Rc: *R. capsulatus*, Ec: *E. coli*, Pa: *P. aeruginosa*, At: *Arabidopsis thaliana*, Os: *Oryza sativa*

Produkt	Substrat	Tyrosin-Überproduzent	TAL	Hydroxylase	OMT	Konzentration Produkt [mM]	Raum-Zeit-Ausbeute [mg/(L*h)]	Literatur
Kumarsäure	Glukose	ja	SeSam8	-	-	5,9	27 ± 0,8	[Kang et al., 2012]
	Tyrosin	nein	RgTAL	-	-	2,6	7,5	[Rodrigues et al., 2015]
Kaffeesäure	Glukose	ja	SeSam8	SeSam5	-	0,8	4,2 ± 0,2	[Kang et al., 2012]
	Glukose	ja	SeSam8	SeSam5	-	0,6	1,1	[Zhang und Stephanopoulos, 2013]
	Glukose	ja	RcTAL	EcHpaBC	-	0,3	1,0	[Lin und Yan, 2012]
	Glukose	ja	RgTAL	EcHpaBC	-	4,3 ± 0,2	0,06 ± 0,003	[Huang et al., 2013]
	Tyrosin	nein	RgTAL	SeSam5	-	1,0	2,9	[Rodrigues et al., 2015]
	Kumar-säure	nein	-	EcHpaBC	-	0,6	36	[Lin und Yan, 2014]
	Kumar-säure	nein	-	PaHpaBC	-	9,8	883	[Furuya und Kino, 2014]
Ferulasäure	Glukose	nein	SeSam8	SeSam5	AtCOMT	0,04	0,2 ± 0,04	[Choi et al., 2011]
	Glukose	ja	SeSam8	SeSam5	AtCOMT	1,0	196 ± 26	[Kang et al., 2012]
	Glukose	ja	SeSam8	SeSam5	OsCOMT	0,3	2,7	[An et al., 2016]

### 1.1.3.5 Mögliche Nebenreaktionen der Ferula- und Sinapinsäure-Synthese

In Abb. 1.14 sind mögliche Nebenreaktionen während der gewünschten Reaktionskaskade hin zur Ferulasäure-Synthese dargestellt. Die Sinapinsäure-Synthese erweitert sich entsprechend um eine Hydroxylierung und Methylierung (siehe auch Abb. 1.4, S. 7), wurde jedoch für eine bessere Übersichtlichkeit in dieser Abbildung weg gelassen. Eine Konkurrenzreaktion zur Desaminierung von Tyrosin stellt der natürliche Abbauweg von *E. coli*, der durch Tyrosin-Aminotransferase (TyrB) und Aspartat-/Tyrosin-/Aromatische-Aminotransferase (AspC) [Gelfand und Steinberg, 1977; Mavrides und Orr, 1975] katalysiert wird, dar. Dabei entsteht im ersten Schritt *p*-Hydroxyphenylpyruvat, was dann wiederrum in weiteren Schritten, beispielsweise zur Nutzung als Stickstoffquelle, abgebaut wird. Ein  $K_M$ -Wert von 0,32 mM wurde für TyrB beschrieben [Hayashi et al., 1993], womit dieses Enzym eine niedrigere Affinität zu Tyrosin im Vergleich zu den TALs aufweist (Tab. 1.1), jedoch in der gleichen Größenordnung liegt.

Eine weitere Konkurrenzreaktion zur TAL stellt auch der alternative Weg über L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA), katalysiert von der HpaBC, dar. Hierbei wird dann L-DOPA wieder von der TAL desaminiert, sodass Kaffeesäure entsteht und so der Reaktionskaskade wieder zugeführt werden kann. Es wurden bereits spezifische Aktivitäten der TAL aus *R. capsulatus* (*RcTAL*) und der HpaBC aus *E. coli* (*EcHpaBC*) beschrieben. Die *RcTAL* zeigt eine leicht höhere spezifische Aktivität gegenüber L-DOPA ( $1,5 \times 10^{-3}$  U/mg) als gegenüber Tyrosin ( $0,9 \times 10^{-3}$  U/mg) [Lin und Yan, 2012]. Die *EcHpaBC* hingegen zeigt eine höhere spezifische Aktivität gegenüber Kumarsäure ( $5,37 \times 10^{-3}$  U/mg) als gegenüber Tyrosin ( $2,44 \times 10^{-3}$  U/mg) [Lin und Yan, 2012]. Auch der Vergleich der *RcTAL* und *EcHpaBC* zeigt, dass die Hydroxylase eine insgesamt höhere spezifische Aktivität gegenüber den Substraten Tyrosin und Kumarsäure aufweist. Je nach Kombination von TAL und HpaBC stellt diese alternative Reaktion also durchaus eine wichtige Konkurrenzreaktion dar. Problematisch an der Bildung von L-DOPA ist die hohe Reaktivität dieser Substanz. Es ist bekannt, dass die HpaBC die Reaktion von L-DOPA zu DOPA-Chinon katalysiert, welches wiederrum spontan zu Eumelanin-ähnlichen Polymeren reagiert [Gibello et al., 1995; Plonka und Grabacka, 2006]. Ebenso wurde beschrieben, dass sich aus Kaffeesäure über die Oxidation zu Chinonen auch Allomelanin-ähnliche Polymere bilden können [Jang et al., 2018].



**Abb. 1.14: Bekannte Nebenreaktionen der Ferulasäure-Synthese**

Neben der gewünschten Reaktionskaskade zur Ferulasäure, gibt es ebenso den Nebenweg über L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA). Es wird zunächst Tyrosin von HpaBC hydroxyliert und anschließend von TAL desaminiert, wodurch wieder Kaffeesäure entsteht. Neben Kaffeesäure stellt aber insbesondere L-DOPA ein Ausgangsstoff für die irreversible Bildung von Eu- und Allomelanin-ähnlichen Polymeren dar. Eine weitere Nebenreaktion stellt der natürliche Abbauweg von Tyrosin über TyrB/AspC dar.

### 1.1.4 *In vivo* Biokatalyse

Viele Pflanzennaturprodukte spielen mittlerweile eine große Rolle im Bereich Pharmazeutika, Kosmetik und Lebensmittelzusätze, wodurch auch der Bedarf an diesen Produkten groß ist [Facchini et al., 2012]. Die Extraktion aus Pflanzen ist jedoch meist ineffizient und bedroht zusätzlich den Bestand an wertvollen (medizinischen) Pflanzenspezies [Brower, 2008; Wang et al., 2011]. Dies macht die alternative Produktion dieser Stoffe unerlässlich. Industriell wird vor allem die chemische Synthese durchgeführt, was jedoch nicht immer der effizienteste und ökonomischste Weg ist [Lin und Tao, 2017]. Alternativ dazu hat die Biokatalyse eine Vielzahl von Vorteilen gegenüber der chemischen Synthese, wie beispielsweise die hohe Selektivität (z.B. Regio- und Enantioselektivität) der zu katalysierenden Reaktion, die die Nebenprodukte deutlich minimiert. Kompliziertere chemische Reaktionen kommen zumeist nicht ohne Schutzgruppen aus, was einzelne Reaktionen sehr zeit- und kostenintensiv macht. Biokatalysatoren sind vor allem bei chemisch komplexen Reaktionen effizienter. Auch

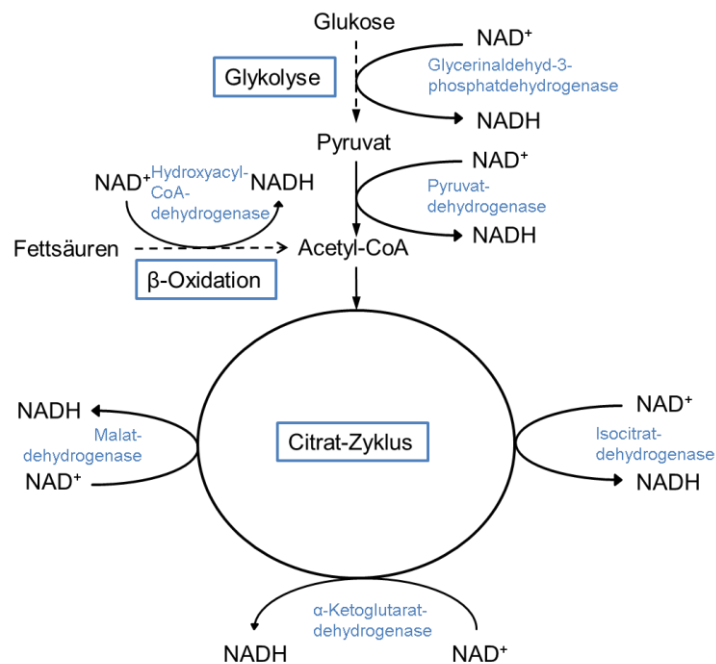
die Bedingungen von chemischen Reaktionen sind meist deutlich harscher, was zusätzlich eine Belastung für die Umwelt darstellen kann [Johannes et al., 2006; Lin und Tao, 2017]. Auch die begehrte Deklaration als natürliches Produkt, kann durch die Produktion mit Biokatalysator erreicht werden [Xu et al., 2007].

Biokatalysatoren können zum einen isoliert in einem *in vitro* Reaktionsansatz eingesetzt werden und zum anderen in einem *in vivo* Ansatz zur Anwendung kommen. Bei dem *in vitro* Ansatz werden die Enzyme zunächst meist rekombinant heterolog produziert und anschließend in einem mehr oder weniger aufwendigen *downstream processing* gereinigt. Die gereinigten Enzyme können dann in einem *in vitro* Ansatz gezielt die gewünschten Reaktionen katalysieren. Neben dem kostenintensiven *downstream processing* können die Stabilität und Langzeitaktivität der Enzyme und die Regeneration von teils benötigten Cofaktoren ein Problem darstellen [Lin und Tao, 2017]. Die Regeneration von Cofaktoren kann durch Verwendung eines weiteren Enzyms gewährleistet werden. Alternativ können die Cofaktoren kontinuierlich zugegeben werden [Woodyer et al., 2006]. Ein industrieller Maßstab gestaltet sich aus diesen Gründen meist als nicht durchführbar [Wachtmeister und Rother, 2016].

Bei einem *in vivo* Ansatz werden die (rekombinant heterolog) produzierten Enzyme nicht aus den Organismen gereinigt, sondern in einer Ganzzellbiokatalyse eingesetzt. Durch die schützende Umgebung der Zellen wird die Stabilität und Langzeitaktivität der Enzyme aufrechterhalten und eine räumliche Nähe zwischen Reaktant und Biokatalysator ermöglicht [Ladkau et al., 2014]. Den größten Vorteil des *in vivo* Biokatalysators stellt jedoch die Regeneration von Cofaktoren dar. Der Metabolismus der Organismen sorgt für einen Nachschub an den benötigten Cofaktoren und recycelt gegebenenfalls sogar Nebenprodukte der Reaktionen [Wachtmeister und Rother, 2016]. Auch Transportmechanismen der Zellen kann die Biokatalyse unterstützen, da beispielsweise Produkte in das umgebende Medium transportiert werden und dadurch Produktinhibierungen vermieden werden [Wachtmeister und Rother, 2016]. Auch wenn die *in vivo* Biokatalyse Nachteile, wie Toxizitätsprobleme oder benötigtes *metabolic engineering*, aufweist, stellt vor allem bei mehrstufigen Reaktionen mit mehreren Enzymen die *in vivo* Biokatalyse eine sinnvolle Alternative zur chemischen Synthese und zur *in vitro* Biokatalyse dar [Ladkau et al., 2014; Wachtmeister und Rother, 2016].

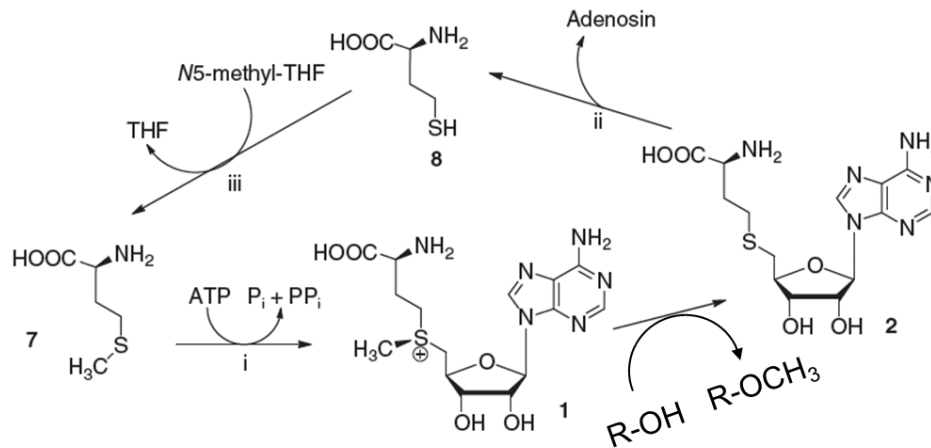
Die Biosynthese von Ferula- und Sinapinsäure mittels der bereits beschriebenen Reaktionen (Abb. 1.4, S. 7) ist von den Cofaktoren NADH (Hydroxylierung) und SAM (Methylierung) abhängig. Zur Verdeutlichung der Bedeutung der Cofaktor-Regeneration innerhalb einer *in vivo* Biokatalyse ist in Abb. 1.15 und Abb. 1.16 die *in vivo* Regeneration von NADH und SAM dargestellt. In Abb. 1.15 ist eine Übersicht über die wichtigsten NADH-Regenerationen dargestellt. Im Metabolismus wird NADH beispielsweise innerhalb der Glykolyse, dem

Citratzyklus und der  $\beta$ -Oxidation synthetisiert. Die intrazelluläre Konzentration an NADH in *E. coli* liegt bei ca.  $83 \mu\text{M}$  [Bennett et al., 2009]. Die Regeneration von NADH ist breit gefächert und durch die große Bedeutung im Metabolismus auch gut abgesichert. Im Vergleich dazu ist die Regeneration von SAM (Abb. 1.16) deutlich aufwendiger und hauptsächlich durch einen Weg sichergestellt. Die SAM-Biosynthese ist zudem hochreguliert, da SAM ein hochreaktives Molekül ist, was durch ATP und Methionin generiert wird. Methionin wird vorher aus Homocystein und Methyl-Tetrahydrofolat gebildet, wobei Homocystein aus der Hydrolyse von SAH stammt und Methyl-Tetrahydrofolat der Regeneration jeweils zugeführt werden muss [Wessjohann et al., 2014]. Die intrazelluläre Konzentration in *E. coli* beträgt ca.  $180 \mu\text{M}$  [Bennett et al., 2009].



**Abb. 1.15: NADH-Regenerationen im Metabolismus**

Schematisch dargestellt sind die wichtigsten NADH-bildenden Reaktionen im Metabolismus. NADH wird während der Glykolyse von der Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase, bei der Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA (Pyruvatdehydrogenase), während der  $\beta$ -Oxidation (Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase), sowie mehrfach während des Citrat-Zyklus (Isocitratdehydrogenase,  $\alpha$ -Ketoglutaratdehydrogenase, Malatdehydrogenase) gebildet. In blauer Schriftfarbe sind jeweils die Enzyme hervorgehoben, mit blauem Rahmen jeweils der Stoffwechselweg.



**Abb. 1.16: SAM-Regeneration**

Dargestellt ist ein Regenerationsweg von SAM. Die Biosynthese von SAM (1) wird von der S-Adenosylmethionin-Synthetase (i) aus den Substraten Methionin (7) und ATP katalysiert. Nebenprodukte dieser Reaktion sind anorganisches Phosphat (P<sub>i</sub>) und anorganisches Pyrophosphat (PP<sub>i</sub>). Durch Übertragung der aktivierten Methylgruppe auf ein Substrat (R-OH) entsteht SAH (2) und das methylierte Produkt (R-OCH<sub>3</sub>). Durch die SAH-Hydrolase (ii) wird Adenosin abgespalten, sodass L-Homocystein (8) entsteht. Mit dem Cofaktor N<sup>5</sup>-Methyltetrahydrofolat (N<sup>5</sup>-Methyl-THF) wird dann wieder Methionin (7) gebildet (L-Homocystein-Methyltransferase, iii). Modifiziert nach [Wessjohann et al., 2014]

## 1.2 Motivation und Zielsetzung

Eine Vielzahl von Pflanzennaturprodukten hat einen großen Einfluss auf das Leben. Sie kommen in Pharmazeutika, Kosmetika und in Lebensmitteln vor [Liu et al., 2017]. So auch die Phenylpropanoide Ferulasäure und Sinapinsäure. Insbesondere Ferulasäure ist bereits ein gefragtes Produkt, welches vor allem in der Vanillin-Produktion zur Anwendung kommt [Ou und Kwok, 2004]. Vanillin ist einer der beliebtesten Aromastoffe weltweit [Banerjee und Chattopadhyay, 2019]. Es wird in Lebensmitteln, Parfüm und Pharmazeutika eingesetzt, wodurch es einen sehr hohen Bedarf an Vanillin gibt. Weltweit werden über 6000 t natürliches Vanillin aus der Orchidee *Vanilla planifolia* gewonnen. Dabei können aus 500 kg Vanilleschoten gerade einmal 1 kg Vanillin extrahiert werden [Banerjee und Chattopadhyay, 2019]. Um den hohen Bedarf an Vanillin zu decken, werden jährlich zusätzlich 18000 t chemisch synthetisiert [Bomgardner, 2016]. Der Preisunterschied zwischen natürlichem und synthetischem Vanillin ist mit 1200 – 4000 US\$/kg (natürlich) und 15 US\$/kg (synthetisch) jedoch sehr hoch [Walton et al., 2003]. Dazu kommt, dass bereits einige Verfahren aufgrund der hohen Umweltbelastung eingestellt oder der Einsatz als Lebensmittelzusatz nicht genehmigt wurden [Fache et al., 2016]. Eine Alternative zur chemischen Synthese stellt die biotechnologische Synthese dar, die immer weiter in den Fokus der Forschung gerückt ist [Kumar und Pruthi, 2014]. Die Deklaration von natur-identischem Vanillin ist dabei nur durch den Einsatz von Ferulasäure als Substrat angesehen [Chattopadhyay et al., 2018]. Neben dem Einsatz in der Vanillin-Produktion sind für Ferulasäure und auch Sinapinsäure noch viele weitere Anwendungen möglich. Aufgrund der anti-oxidativen Wirkung ergeben sich eine Vielzahl an Möglichkeiten im Bereich Pharmazeutika, Kosmetika und Lebensmittel [Nićiforović und Abramovič, 2014; Ou und Kwok, 2004]. Aufgrund des biologischen Hintergrundes als Vorstufen von Lignin wäre ebenso der Einsatz im Bereich Biomaterialien denkbar. Materialien mit zielgerichteten Eigenschaften, durch eine festgelegte Zusammensetzung der Phenylpropanoide wären dabei erstrebenswert.

Ziel dieser Arbeit ist die rekombinante *in vivo* Biosynthese von Ferula- und Sinapinsäure in *E. coli*. Dafür sollten die Enzyme *RcTAL* und *RgTAL*, *EcHpaBC*, *EcHpaB(Y301I)C*, *PaHpaBC* und *SeHpaBC*, sowie *McPFOMT*, *MsCOMT* und *LpCOMT* auf ihre Eignung für die Produktion von Ferula- und Sinapinsäure untersucht werden. Dafür sollte die Expressionsfähigkeit, die *in vivo* und teilweise *in vitro* Aktivität verglichen werden. Nach Auswahl der jeweiligen Enzyme sollte die Biosynthese zunächst im Schüttelkolben-Maßstab untersucht werden. Dabei sollten *Bottlenecks* identifiziert werden und gegebenenfalls Untersuchungen zur Optimierung durchgeführt werden. Nach erfolgreicher Etablierung im Schüttelkolben-Maßstab sollte die Produktion in einen Bioreaktor übertragen werden. Dabei sollten Untersuchungen zur Steigerung der Synthese durch Stammauswahl, Regulation der Expressionsstärke und das Umgehen von *Bottlenecks* durchgeführt werden.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Sämtliche verwendete Chemikalien sind in der Tab. 2.1 zusammengestellt.

**Tab. 2.1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien**

Bezeichnung	Lieferant	Best. Nr.	Reinheit
Aceton	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	9372	≥ 99 %
Acetonitril	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	8825	HPLC Gradient Grade
Acrylamid/ Bisacrylamid (30 % Lösung)	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland	A3574	k. A.
Agar-Agar	Carl Roth GmbH & Co,	5210	k.A.
Agarose	VWR, Radnor, USA	9012-36-6	k.A.
Albumin aus Rinderserum (BSA)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.12018.0025	≥ 98 %
Ameisensäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	8222541001	≥ 98 %
4-(2-Aminoethyl)- benzensulfonylfluorid (AEBSF)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	76307	p.a.
Ammoniumchlorid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	K298	≥ 99 %
Ammoniumhydrogencitrat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	P735	≥ 98 %
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	9592	≥ 98 %
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	3746	≥ 99 %
BCIP/NBT	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	SLBH1944V	k.A.
Benzonase (25 U/μL)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.01695.0001	≥ 99 %
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	P010	≥ 99 %
Bromphenolblau (Na-Salz)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	A512	k. A.
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	5239	≥ 99 %
Coomassie-Brillantblau G250	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	9598	k. A.
Chloramphenicol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	3886	98,5 %
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	3313	≥ 99 %
Ethylendiamintetraessig- säure (Dinatrium-Salz) (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	8043	≥ 99 %
Eisen(III)-Chlorid- Hexahydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.03943.0250	k.A.
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	3738	≥ 99 %
Essigsäureethylester (EEE)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	4442	UV/IR-Grade

Fortsetzung **Tab. 2.1:** Übersicht über die verwendeten Chemikalien

Bezeichnung	Lieferant	Best. Nr.	Reinheit
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	K928	≥ 99 %
Ferulasäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	128708	99 %
Flavinadenindinukleotid (FAD)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	F6625	≥ 95 %
(D)-Glukose	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	X997	k.A.
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	3783	≥ 99 %
Glycin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	3908	≥ 99 %
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	2363	k. A.
Hydroxyferulasäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	67563	≥ 95 %
Isopropyl-β-D- thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	CN08	k.A.
Kaffeesäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	C0625	≥ 98 %
Kaliumacetat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	HN10	≥ 99 %
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	P749	≥ 99 %
di-Kaliumhydrogen- phosphat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	P7493	≥ 99 %
Kanamycinsulfat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	T832	k.A.
Kobalt(II)-Chlorid- Hexahydrat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	T889	≥ 99 %
p-Kumarsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	C9008	≥ 98 %
Kupfer(II)-Chlorid-Dihydrat	Fluka Chemika	61174	k.A.
Kupfer(II)-Sulfat- Pentahydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1027900250	≥ 99 %
α-Laktose-Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	8921	k.A.
Lysozym	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	8259	k. A:
Magnesiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	8147330100	≥ 99 %
Magnesiumsulfat- Heptahydrat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	P027	≥ 99 %
Mangan(II)-Chlorid-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.05934.0100	≥ 99 %
Mangan(II)-Sulfat- Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	4487	≥ 99 %
β-Mercaptoethanol	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland	28625.02	k. A.
Methanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	7342	HPLC Gradient Grade
Methionin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	9359	≥ 99 %
Natriumacetat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	6773	≥ 99 %
Natriumazid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	71289	≥ 99,5 %

Fortsetzung **Tab. 2.1:** Übersicht über die verwendeten Chemikalien

Bezeichnung	Lieferant	Best. Nr.	Reinheit
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	3957	≥ 99 %
Natriumdodecylsulfat (SDS, Rotistock 20%)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	1057	k. A.
di-Natriumhydrogen- phosphat-Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	4984	≥ 99 %
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	6771	≥ 99 %
Natriumsulfat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	8560	≥ 99 %
Nicotinamadenindinukleot id-Hydrogen (NADH)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	N8129	≥ 97 %
Pepstatin A	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	77170	k.A.
Phenol (TE-gesättigt)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	0038	k.A.
2-Propanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	T910	UV/IR Grade
ortho-Phosphorsäure (85 %)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	6366	k. A.
ortho-Phthaldialdehyd	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	P1378	≥ 97 %
Salzsäure (37 %)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	4625	k. A.
Serin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	1714	≥ 99 %
Sinapinsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	D7927	≥ 98 %
Struktol J647	Schill + Seilacher	18412	k. A.
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	2367	k. A.
Tris(hydroxymethyl)- aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	4855	≥ 99 %
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	3051	reinst
Trypton/Pepton	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	8952	k. A.
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	4859	reinst
Tyrosin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	1741	≥ 99 %
Zinksulfat-Heptahydrat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	K301	≥ 99 %

## 2.1.2 Stammlösungen

Sämtliche verwendeten Stammlösungen sind in Tab. 2.2 in alphabetischer Reihenfolge zusammengestellt.

**Tab. 2.2:** Übersicht über die verwendeten Stammlösungen

Stammlösung	Lösungsmittel	Konzentration
Chloramphenicol	Ethanol	33 g/L
Kanamycin	dH <sub>2</sub> O	30 g/L
IPTG	dH <sub>2</sub> O	0,5 mM
Ethidiumbromid	dH <sub>2</sub> O	1 g/L

### 2.1.3 Puffer und Medien

Sämtliche verwendeten Puffer und Medien sind in Tab. 2.3 in alphabetischer Reihenfolge zusammengestellt.

**Tab. 2.3: Übersicht der verwendeten Puffer und Medien**

Bezeichnung	Zusammensetzung	pH
Aufschlusspuffer	20 mM Tris/HCl 150 mM Kaliumacetat 10 % (v/v) Glycerin	7,8
Coomassie-Färbelösung	1,2 mM Coomassie Brilliantblau G-250 4,23 mM Isopropanol 1,6 mM Eisessig	
Entfärbelösung	4,02 mM Isopropanol 1,6 mM Eisessig	
Laemmli-Puffer [Laemmli, 1970]	0,25 mM Tris 1,9 M Glycin 34,7 mM SDS	
LB-Medium	10 g l <sup>-1</sup> Trypton/Pepton 10 g l <sup>-1</sup> NaCl 5 g l <sup>-1</sup> Hefeextrakt	7,0
Lyse-Puffer	50 mM Tris/HCl 2 mM MgCl <sub>2</sub> 1 g/L Lysozym 10 U/mL Benzonase	8,0
Minimalmedium nach [Jenzsch et al., 2006] (5 x) (M9-Grundmedium)	93 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 46,5 mM NH <sub>4</sub> Cl 130,5 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 70,5 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 419 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 22 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> -citrat	
Minimalmedium nach [Jenzsch et al., 2006] (1 x)	1 x M9-Grundmedium 5 mM MgSO <sub>4</sub> -Lösung 0,2 mM CaCl <sub>2</sub> -Lösung 0,5 – 2 % Glukose 1 x Spurenelemente (nach Schäpe)	
Minimalmedium nach [Wilms et al., 2001] (1 x)	20,3 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 9,3 mM NH <sub>4</sub> Cl 22,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 14,1 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 83,8 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 4,1 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> -citrat Zusätze: 4,2 mM MgSO <sub>4</sub> 2 % Glukose 37,7 µM Thiamin-Lösung 661 µM Prolin-Lösung 1 x Spurenelemente (nach Wilms)	
Probenpuffer für SDS-PAGE	0,22 mM Tris 17,3 mM SDS 7,46 µM Bromphenolblau 540 mM Glycerin 100 mM β-Mercaptoethanol	6,8
Phosphatpuffer für TB-Medium (1:10 mit TB-Medium)	0,17 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,72 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris 13,9 mM SDS	6,8
Reaktionspuffer I	100 mM Tris/HCl 150 mM Kaliumacetat	8,3

Fortsetzung **Tab. 2.3:** Übersicht über die verwendeten Puffer und Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung	pH
Reaktionspuffer II	50 mM Tris/HCl 50 mM Kaliumacetat	8,3
Spurenelemente nach [Jenzsch et al., 2006] (100 x)	13,4 mM EDTA 3,1 mM FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O 0,62 mM ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 76 µM CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 42 µM CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O 142 µM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 8,1 µM MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	
Spurenelementelösung nach [Wilms et al., 2001] (333 x)	51,5 mM FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O 41,7 mM CaCl <sub>2</sub> 0,66 mM MnSO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 0,63 mM ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 0,76 mM CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O 0,64 mM CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	
TAE-Puffer (10x)	30 mM EDTA 0,4 M Tris 10 mM EDTA	8,5
TB-Medium	0,2 M Essigsäure 12 g l <sup>-1</sup> Trypton/Pepton 24 g l <sup>-1</sup> Hefeextrakt	-
Trenngelpuffer	0,5 % (m/v) Glycerin 1,5 M Tris 13,9 mM SDS	8,8

### 2.1.4 Kits und Enzyme für die Molekularbiologie

Sämtliche verwendeten Kits sind in Tab. 2.4 in alphabetischer Reihenfolge zusammengestellt.

**Tab. 2.4:** Übersicht der verwendeten molekularbiologischen Enzyme, Reagenzien und Kits

Bezeichnung	Lieferant	Best.Nr.
GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit	ThermoFischer Scientific	K0502
MSB Spin PCRapace	Stratec	1020220300
Phusion	ThermoFischer Scientific	F530S
Taq	ThermoFischer Scientific	EP0701
<i>Nco</i> I	ThermoFischer Scientific	ER0571
<i>Sac</i> I	ThermoFischer Scientific	ER1131
<i>Hind</i> III	ThermoFischer Scientific	ER0501
<i>Bsa</i> I	ThermoFischer Scientific	ER0291
<i>Xho</i> I	ThermoFischer Scientific	ER0691
FastAP	ThermoFischer Scientific	EF0654
RNase	ThermoFischer Scientific	K0502

### 2.1.5 Konstrukte

Sämtliche verwendete Konstrukte sind in der Tabelle 2.5 zusammengestellt. Plasmide zur Klonierung von *RcTAL*, *McPFOMT* und *EcHpaB(Y3011)C* wurden freundlicherweise vom Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie Halle (AG Wessjohann) zur Verfügung gestellt.

Tab. 2.5: Übersicht über die verwendeten Konstrukte

Bezeichnung	backbone	Gen	Ursprungsorganismus	Genetische Veränderungen
FA1	pRSF Duet1	tal	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	Codon Usage Optimierung N-terminaler FLAG-tag
		hpaBC	<i>Escherichia coli</i>	-
		pfomt	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	-
FA2	pRSF Duet1	tal	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Codon Usage Optimierung C-terminaler FLAG-tag
		hpaBC	<i>Escherichia coli</i>	-
		pfomt	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	-
SA1	pRSF Duet1	tal	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Codon Usage Optimierung C-terminaler FLAG-tag
		hpaBC	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
		pfomt	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	-
SA2	pRSF Duet1	tal	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Codon Usage Optimierung C-terminaler FLAG-tag
		hpaBC	<i>Escherichia coli</i>	Mutation Y301I
		pfomt	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	-
RgTAL	pET28a	tal	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Codon Usage Optimierung C-terminaler FLAG-tag
EcHpaBC	pET28a	hpaBC	<i>Escherichia coli</i>	-
PaHpaBC	pET28a	hpaBC	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
SeHpaBC	pET28a	hpaBC	<i>Saccharothrix espanaensis</i>	-
McPFOMT	pET28a	pfomt	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	-
MsCOMT	pET28a	comt	<i>Medicago sativa</i>	-
LpCOMT	pET28a	comt	<i>Lolium perenne</i>	-

Die Sequenzen befinden sich im erweiterten Anhang (Abschnitt 11, S. 137 ff.).

## 2.1.6 Organismen

Sämtliche verwendeten Organismen sind in der Tab. 2.6 in alphabetischer Reihenfolge zusammengestellt.

Tab. 2.6: Übersicht über die verwendeten Organismen

Stamm	Genotyp	Bezeichnung
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) Gold	B F <sup>-</sup> ompT hsdS(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) dcm+ Tetr gal λ (DE3) endA Hte	BL21(DE3)Gold
<i>Escherichia coli</i> BL21 ΔtyrR:T7	B F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) [malB <sup>+</sup> ] <sub>K-12</sub> (λ <sup>S</sup> ) ΔtyrR:T7	BL21ΔR

### 2.1.7 Vektoren

Sämtliche Expressionsversuche wurden mit dem Vektor pET28a (+) (5,37 kb, Kanamycin-Resistenz) oder pRSF Duet 1 (3,83 kb, Kanamycin) von Invitrogen durchgeführt. Um die Basalexpression zu unterdrücken, wurde zum einen das kommerzielle pLysS (Lemo21(DE3)) und zum anderen ein synthetisiertes „pLysT“ (Dr. Bodo Moritz) verwendet.

### 2.1.8 Marker und Antikörper

Sämtliche verwendeten Marker und Antikörper sind in der Tab. 2.7 in alphabetischer Reihenfolge zusammengestellt.

**Tab. 2.7: Übersicht über die verwendeten Marker und Antikörper**

Bezeichnung	Name	Hersteller
primärer Antikörper	anti-poly-FLAG aus Maus	Sigma Aldrich
sekundärer Antikörper	anti-Maus IgG AP aus Ziege	Sigma Aldrich
Proteinmarker	Pierce™ Unstained Protein MW Marker	Thermo Scientific
vorgefärbter Proteinmarker	PageRuler Prestained	Thermo Scientific

### 2.1.9 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Sämtliche verwendeten Geräte sind in der Tab. 2.8 in alphabetischer Reihenfolge zusammengestellt.

**Tab. 2.8: Übersicht über die verwendeten Geräte**

Bezeichnung	Typ	Hersteller (Name, Ort, Land)
Agarosegelapparatur	H&E 33 Mini Horizontal Submarine Unit	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Autoklav	Varioklav Dampfsterilisator	H&P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland
Autoklav	Systec VE-150	Systec GmbH, Linden, Deutschland
Blot-Apparatur	V10-SDB	biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland
Dasgip	Parallel Bioreaktor System für mikrobielle Anwendungen, 4-fach-System mit Bioblock	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Elektrophoresestromversorgung	EPS 301	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Feinwaage	BP 221S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Flowbox	Nu-440-400	NuAire Inc., Plymouth, USA
Gasbrenner	Fuego basic	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Geldokumentation	GenGenius Syngene	VWR, Darmstadt, Deutschland
Glukose-Analysator	YSI2700 Select	YSI Life Sciences, Tunbridge Wells, UK
Hochdruck-homogenisator	Emulsiflex C5	Avestin Inc., Ottawa, Kanada
HPLC-Anlage	SPD-10A, CBM-20A, LC-20AT, LC-10AT, DGU-14A, SIL-10AXL, CTC-10A	Shimadzu, Kyoto, Japan

Fortsetzung **Tab. 2.8:** Übersicht über die verwendeten Geräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller (Name, Ort, Land)</b>
HPLC-Anlage	SpectraSystem P2000 AS3000 UV1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Küvetten	105.202-QS	Hellma Analytics, Mühlheim, Deutschland
NanoDrop	One <sup>c</sup>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
pH-Meter	Fe20/EL20	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Photometer	Genesys 6 10S	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Photometer	Ultrospec 3300 pro	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Pipetten	1-10 µL 2-20 µL 10-100 µL 100-1.000 µL 500-5.000 µL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Roller-Mixer	SRT1	Bibby Scientific Ltd, Staffordshire, UK
Thermoblock	Thermostat plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermocycler	T advanced	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermocycler	T personal 48	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermocycler	T professional Basic Gradient	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermoschüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Ultraschallbad	Sonorex Super 10 P	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Ultra-Turrax	Micra R-T D-1	ART moderne Labortechnik, Mühlheim, Deutschland
Vakuumpumpe	Vacuubrand PC 511	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Vortex	labDancer S40	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Waage	440-35 N	Kern, Balingen, Deutschland
Wärmeschrank	KP 196	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Wipptisch	60281-00	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Zentrifuge	5415 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge	5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge	Avanti J-30i, Rotor JA-10, Rotor JA 30.50	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Ampifizierung von DNA wurde eine PCR nach dem folgend beschriebenen Ansatz und Programm durchgeführt. Für eine analytische PCR wurde ein Gesamtvolumen von 20 µL, für eine präparative PCR ein Gesamtvolumen von 50 µL gewählt. Für eine Kolonie-PCR wurde 1 µL einer Übernachtskultur von maximal OD<sub>600</sub> = 3 eingesetzt und die initiale Denaturierung auf 98 °C erhöht.

##### allgemeiner Ansatz:

0,3 µmol	Phusion/Taq	
10 ng	<i>template</i> DNA	
3,5 pmol	Primer ( <i>forward/reverse</i> )	
0,2 mM	dNTP-Mix	
1 x	Puffer	
2 mM	MgSO <sub>4</sub> oder MgCl <sub>2</sub>	(20 µL oder 50 µL Ansatz)

##### allgemeines PCR-Programm:

1) 5 min	94 °C	Initiale Denaturierung
2) 30 sec	94 °C	Denaturierung
3) 30 sec	≈T <sub>m</sub>	<i>Annealing</i>
4) 0,03 sec/bp*	72 °C	Elongation (*Phusion, Taq: 0,06 sec/bp)
5) 5 min	72 °C	finale Elongation
25-30x 2) bis 4)		

#### 2.2.1.2 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Eine Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse von DNA durchgeführt. Dafür wurde ein 1 %iges Agarosegel hergestellt. Dazu wurden 0,35 g Agarose abgewogen und in 35 mL TAE (1 x) gegeben. Die Suspension wurde in der Mikrowelle erhitzt bis eine homogene Lösung entstand. Anschließend wurde diese auf Handwärme abgekühlt, 20 µL Ethidiumbromid (c = 1 g/L) zugegeben und in den Gelschlitten mit Kamm gegossen. Nach Aushärten und Entfernen des Kamms aus dem Gel erfolgte die Probenauftragung (5 µL Probe + 1 µL 6x Ladepuffer). Zur Größenabschätzung wurden 5 µL des Größenstandards aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80 V und 400 mA für 60 min. Die abschließende Analyse der aufgetrennten DNA wurde mittels Geldokumentation von Syngene GenGenius (VWR, USA) durchgeführt.

#### 2.2.1.3 Restriktionsverdau

Für einen Restriktionsverdau wurde die jeweilige Endonuklease für einen analytischen oder präparativen Ansatz wie folgend beschrieben eingesetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inaktivierung für 15 min bei 80 °C.

analytischer Ansatz:

10 U Restriktionsenzym  
1 µg Plasmid

präparativer Ansatz:

20 U Restriktionsenzym (sequenziell)  
10 µg Plasmid

**2.2.1.4 5'-Dephosphorylierung**

Um Religation des geschnittenen *Insert* in den Ursprungsvektor zu vermeiden, wurde eine 5'-Dephosphorylierung mit Hilfe der FastAP (Alkalische Phosphatase) durchgeführt. Es wurden 2 µL FastAP für einen 100 µL Restriktionsansatz eingesetzt und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung erfolgte für 5 min bei 75 °C.

**2.2.1.5 Reinigung von DNA-Fragmenten**

Die Reinigung von PCR-Produkten oder DNA-Fragmenten (>100 bp) erfolgte nach Herstellerangaben mit dem MSB Spin PCRapace Kit (Strattec).

**2.2.1.6 Ligation**

Die Ligation von gereinigten und geschnittenen *Insert* und Zielvektor erfolgte nach dem allgemeinen Pipettierschema. Im Allgemeinen wurde das gleiche Volumen von *Insert* und Plasmid verwendet, alternativ wurde das Verhältnis je nach Konzentration und Größe der Fragmente angepasst. Die Ligation von *sticky end* Fragmenten erfolgte für ca. 16 h bei 16 °C, bei *blunt end* Fragmenten bei 4 °C.

allgemeiner Ansatz:

5 µL geschnittenes Plasmid  
5 µL geschnittenes *Insert*  
1 µL ATP (25 mM)  
1 µL Ligase  
2 µL Puffer  
6 µL dH<sub>2</sub>O

**2.2.1.7 Quantifizierung von DNA**

Die Quantifizierung der DNA-Konzentration erfolgte durch photospektrometrische Bestimmung der Absorption einer DNA-Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm. Zur qualitativen Bewertung wurde ebenfalls die Absorption bei 280 nm gemessen und das Verhältnis von den Absorptionen 260:280 nm bestimmt. Bei ausreichend gereinigter DNA sollte dieser Quotient zwischen 1,8 und 1,9 liegen.

**2.2.1.8 Transformation von *E. coli***

Zur Transformation von *E. coli* wurden 50 µl elektrokompetente Zellen auf Eis aufgetaut. Bei der Transformation von Plasmid-DNA wurden ca. 2 ng, bei Ligationsansätzen 5 µL verwendet. Alle Schritte wurden zügig und auf Eis bzw. bei 4 °C durchgeführt. Die elektrokompetenten Zellen wurden mit der jeweiligen Menge DNA versetzt und vorsichtig

vermischt. Der Ansatz wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette luftblasenfrei überführt und in einem Elektroporator 2 Spannungspulsen bei 1750 V ausgesetzt. Zu dem Ansatz wurden 450 µL LB-Medium gegeben und für 1 h unter Schütteln (1000 rpm, Eppendorf Thermomixer) bei 37 °C inkubiert. 100 µL dieser Zellsuspension wurden zur Selektion auf eine LB-Agarplatte mit dem jeweiligen Antibiotikum ausgestrichen und für ca. 16 h bei 37 °C inkubiert. Die erhaltenen Einzelkolonien wurden auf eine weitere Selektionsagarplatte ausgestrichen und bis zur weiteren Verwendung (max. 1 Woche) bei 4 °C aufbewahrt. Bei weiterer Kultivierung in Minimalmedium, wurde der Transformationsansatz direkt auf Minimalmedium-Agarplatte ausgestrichen. Eine zusätzliche Adaptation auf Minimalmedium ist dadurch nicht nötig.

### 2.2.1.9 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden Zellen einer *E. coli*-Einzelkolonie steril inokuliert und für mind. 16 h bei 37 °C unter Schütteln (180 rpm, Multitron Infors HT) inkubiert. Die Zellsuspension wurde bei 6.000 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit dem Zellpellet nach Herstellerangaben des GeneJET Plasmid Miniprep kits (Thermo Scientific) verfahren. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurde die Plasmid-DNA mit dH<sub>2</sub>O eluiert, um störende Salze zu vermeiden.

Alternativ dazu wurde für die Präparation von größeren Mengen DNA eine Phenol-/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dafür wurden die geernteten Zellen in 200 µL Puffer I (50 mM Glukose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris/HCl pH 8,) resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 400 µL Puffer II (1 % SDS, 0,2 M NaOH) mit Invertieren des Reaktionsgefäßes. Nach mindestens 1 min Inkubation (maximal 5 min) wurde die Lyse durch Zugabe von 300 µL 3 M Natriumacetat (pH 5,3) gestoppt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 16.000 x g) wurde der Überstand abgenommen und 1:1 mit Phenol/Chloroform (1:1 Mischung) versetzt und kräftig gemischt (Vortex). Die Phasentrennung erfolgte für 5 min bei 10.000 x g und anschließender Abnahme der oberen Phase (wässrige Phase). Diese wurde 1:1 mit Chloroform gemischt und 1 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Zur Fällung der Nukleinsäuren wurde die wässrige Phase abgenommen und mit dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol gemischt. Nach einer Inkubation von 1 min wurde die Probe 30 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Das Nukleinsäure-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und bei maximal 40 °C getrocknet. Für einen RNA-Verdau wurde das Pellet in 150 µL Puffer I resuspendiert (Vortex) und mit 100 µL/mL RNase 1 h bei 60 °C inkubiert. Das Volumen der Probe wurde mit dH<sub>2</sub>O auf 300 µl aufgefüllt und anschließend eine weitere Phenol-/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Vor der alkoholischen DNA-Fällung wurde die Probe mit 1:10 3 M Natriumacetat versetzt. Die Fällung erfolgte erneut mit dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol oder mit dem 2,5-fachem Volumen Ethanol.

### 2.2.1.10 Klonierung der Konstrukte

Die Klonierung der Konstrukte wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die *templates* pJ11\_tal und pQE30\_pfomt für die Generierung der Konstrukte wurden freundlicherweise vom Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie zur Verfügung gestellt. Das *template* pACYC\_AD (RgTAL enthaltend) wurde synthetisiert und freundlicherweise von Alwina Dillmann zur Verfügung gestellt. In die polycistronischen Konstrukte wurden Ribosom-Bindestellen (rbs) eingefügt. Das Konstrukt FA1 wurde als erstes kloniert, die Konstrukte FA2, SA1 und SA2 basieren auf diesem, sodass jeweils nur ein Gen ausgetauscht wurde. Die Auftragssynthesen mit Klonierung in den Zielvektor wurden von BioCat GmbH (Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Eine Übersicht über die Klonierung aller Konstrukte ist in Tabelle 2.9 aufgeführt.

Tab. 2.2.9: Übersicht über die Klonierung

Bezeichnung	Gen	template	PCR-Produkt	Besonderheiten/ Erklärung
FA1	tal	pJ11_tal	<i>NcoI</i> _flag_tal_rbs_ <i>SacI</i>	-
	hpaBC	genom. DNA <i>E. coli</i> BL21	<i>SacI</i> _hpaBC_rbs_ <i>HindIII</i>	Stammspezifische stille Mutationen
	pfomt	pQE30_pfomt	<i>HindIII</i> _pfomt_ <i>XhoI</i>	Subklonierung mit <i>blunt ends</i> in pGEM3Zf+
FA2	tal	pACYC_AD	<i>BsaI</i> _tal_rbs_ <i>SacI</i>	Austausch der tal
SA1	hpaBC	pET28a_PaHp aBC	<i>SacI</i> _hpaBC_rbs_ <i>HindIII</i>	Austausch der hpaBC
SA2	hpaBC (Y301I)	FA2	-	Gensynthese
RgTAL	tal	FA2	<i>NcoI</i> _flag_tal_rbs_ <i>SacI</i>	Klonierung von J. Li
PaHpaBC	hpaBC	-	-	Gensynthese
SeHpaBC	hpaBC	-	-	Gensynthese
EcHpaBC	hpaBC	FA2 + SeHpaBC	<i>SacI</i> _hpaBC_rbs_ <i>HindIII</i>	Austausch der HpaBC
MsCOMT	comt	-	-	Gensynthese
LpCOMT	comt	-	-	Gensynthese

## 2.2.2 Mikrobiologische Methoden

### 2.2.2.1 Kultivierung von *E. coli*-Stämmen

Alle verwendeten Medienbestandteile zur Kultivierung von *E. coli*-Stämmen wurden durch Autoklavieren bei 125 °C für 25 min sterilisiert. Antibiotika und IPTG wurden steril filtriert. Bei der Herstellung von LB- oder Minimalmedium-Agarplatten wurde das Antibiotikum nach Abkühlung der Lösung auf < 55 °C zugesetzt. Für die Kultivierung von *E. coli* wurden 5 mL in Kulturröhrchen (15 mL) und größere Ansätze (≥ 20 mL) in Erlenmeyerkolben mit Schikanen genutzt. Vorkulturen wurden in 20 mL Medium (100 mL Kolben), Expressionstests in 50 mL

Medium (300 mL Kolben) und Produktionen in 100 mL Medium (500 mL Kolben) durchgeführt. Die Inokulation wurde durch steriles Animpfen mit einer Einzelkolonie (von LB- oder Minimalmedium-Agarplatte) im Fall von 5 mL-Kulturen und durch Animpfen mit einer angewachsenen Vorkultur auf eine Start-OD<sub>600</sub> von 0,1 bei größeren Ansätzen vorgenommen. Es kamen LB, TB und Minimalmedium nach Wilms *et al.* als Medien zum Einsatz [Wilms *et al.*, 2001]. Die Kultivierung von *E. coli*-Kulturen wurde bei 16-37 °C und unter Schütteln der Kulturgefäße mit 80-180 rpm (IKA KS4000/Multitron Infors) vorgenommen. Eine Induktion erfolgte in der Regel bei einer OD<sub>600</sub>= 0,6 mit 0,5 mM IPTG.

### 2.2.2.2 Parallel-Fermentation

Alle Experimente im Bioreaktor wurden im DASGIP® Parallel Bioreaktor für mikrobielle Anwendung (max. 250 sL/h, 4-fach System mit Bioblock, 0,3-1 L, Eppendorf) durchgeführt. Vor dem Zusammenbau der Bioreaktoren wurden die pH-Elektroden kalibriert. Die Kalibrierung erfolgte durch eine Zwei-Punkt-Kalibrierung. Dazu wurden technische Puffer mit den pH-Werten 7 und 4 verwendet. Die Temperatur der Puffer wurde auf Raumtemperatur eingestellt. Die zusammengebauten Bioreaktoren wurden mit 500 mL M9-Grundmedium nach Jenzsch *et al.* befüllt und autoklaviert [Jenzsch *et al.*, 2006]. Die Schläuche des DASGIP Systems wurden durch *Cleaning-In-Place* nacheinander mit 70 % Isopropanol, 2 M NaOH, dH<sub>2</sub>O, Medium gereinigt und sterilisiert. Zu steril autoklavierter 30 %iger (w/v) Glukose wurden 400 ml 5 x M9-Medium, 10 mL 1 M MgSO<sub>4</sub>, 1 mL 1 M CaCl<sub>2</sub>, 20 mL 100 x Spurenelemente zugefügt und ad 2 L mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt (alle Bestandteile wurden zuvor sterilisiert). Die Kalibrierung der Pumpen für Tyrosin und Feed-Lösung erfolgte durch Bestimmung des Gewichtes von 10 mL gepumptem Medium mit einer Pumprate von 8 mL/h unter Beachtung der zuvor bestimmten Dichte der jeweiligen Lösung. Vor dem Anschließen der Bioreaktoren an das System wurden jedem Bioreaktor 2,5 mL 1 M MgSO<sub>4</sub>, 0,1 mL 1 M CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mL 100 x Spurenelemente, 0,5 mL Kanamycin und 3 Tropfen 50 % Struktol (ca. 100 µL) zugegeben. Nach Anschließen der Bioreaktoren wurden die pO<sub>2</sub>-Elektroden bei 37 °C, 40 sL/h Begasung, 200 rpm Rühren auf 100 % kalibriert. Durch Abtrennen des Kontaktes zur pO<sub>2</sub>-Elektrode wurde der zweite Punkt auf 0 % kalibriert. Durch die *Shot* Funktion wurde jedem Bioreaktor 0,1 % Feed-Lösung zugesetzt. Der programmierte Prozess (pH= 7, T= 37 °C, pO<sub>2</sub>-Kaskade (Rührer/Begasung) wurde ca. 30 min vor Inokulum gestartet und wurde in drei Phasen unterteilt:

- I) Batch-Phase: 0,1 % Glukose
- II) Exponentielle Fed-Batch-Phase:  $\mu_{\max}$ =0,6 bzw. 0,5
- III) Kontinuierliche Fed-Batch-Phase: kontinuierlicher Feed= 16,66 mL/h bzw. 8,5 mL/h

Eine 100 mL Vorkultur (M9-Medium) wurde mit sehr wenig Biomasse (steriler Zahnstocher) ca. 14 h vor geplantem Inokulum der Bioreaktoren angeimpft und bei 37 °C, 150 rpm geschüttelt. Die Biomasse der Vorkultur wurde steril in 50 mL Greiner geerntet (15 min,

3.220 x g) und anschließend in 20 mL frischem M9-Medium resuspendiert. Die Kultur wurde dann verdünnt, um ein Volumen von 5-15 mL für eine Start-OD<sub>600</sub> von 0,02 im Bioreaktor zu erreichen. Diese Kultur wurde dann in einer Spritze aufgenommen, um mit dem entsprechenden Volumen die Bioreaktoren durch die Septen zu inokulieren. Nach ca. 12 h Wachstum zum Zeitpunkt des Wechsels von exponentiellem zu kontinuierlichem Feed erfolgte die Induktion mit IPTG oder Laktose. Der Start der Produktionsphase erfolgte 4 h nach Induktion durch Zugabe von Tyrosin bzw. Tyrosin/Methionin (je 500 mM, pH<0,3 (HCl)) 1,5 mM/h (20 h) bzw. 1 mM/h (40 h). Die Produktionsphase (ab Induktion) betrug 24 bzw. 48 h. Proben für Analysen wie SDS-PAGE und HPLC wurden in regelmäßigen Abständen durch ein Probenrohr entnommen. Weitere Proben für Analysen der Zellen oder des Überstandes wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Alle Proben wurden bei -20 °C gelagert. Die Analyse des Glukose-Gehaltes wurde mittels Glukose-Analysator bestimmt.

## 2.2.3 Proteinchemische Methoden

### 2.2.3.1 SDS-PAGE

Zur Herstellung von Trenn- und Sammelgel wurden die in Tab. 2.10 aufgelisteten Komponenten zusammengegeben. Die Gelpuffer (Trenngelpuffer: 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 13,9 mM SDS; Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 13,9 mM SDS) wurden mit HCl auf pH 8,8 bzw. pH 6,8 eingestellt. Zur Herstellung der gesättigten APS-Lösung wurde APS in dH<sub>2</sub>O gelöst, sodass ungelöstes APS am Boden verblieb.

**Tab. 2.10: Zusammensetzung der Trenngele und Sammelgele nach [Laemmli, 1970]**

Substanz	2 Trenngele 12,5 %	2 Sammelgele 4,5 %
Gelpuffer	2,5 mL	1,25 mL
Acrylamid/ Bisacrylamid	4,2 mL	0,75 mL
deionisiertes Wasser	3,3 mL	3,0 mL
TEMED	10 µL	10 µL
gesättigtes APS	20 µL	8 µL

Zu trennende Proben wurden mit Probenpuffer (0,22 mM Tris, 17,3 mM SDS, 7,46 µM Bromphenolblau, 540 mM Glycerin, 100 mM β-Mercaptoethanol) versetzt und 5 min bei 99 °C inkubiert. Der verwendete Laemmli-Puffer war 10-fach konzentriert und wurde vor Verwendung entsprechend verdünnt. Die Elektrophorese erfolgte 2-stufig: in der ersten Stufe 6 min bei 80 mA und 300 V und in der zweiten Stufe 40 min bei 60 mA und 300 V.

Für die Probenaufbereitung von 1/OD<sub>600</sub>-Proben wurde 1 mL Zellsuspension der OD<sub>600</sub> von 1,0 der Kultur entnommen und bei 14.000 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Das Zellpellet wurde in 100 µL Probenpuffer pro Probenvolumen

resuspendiert. Alle SDS-PAGE-Proben wurden nach dem Versetzen mit Probenpuffer für 5 min bei 99 °C inkubiert (vollständige Denaturierung der Proteine). Volumina von 5 µL Marker und 10 µL Probe wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

Das Gel wurde in filtrierter Färbelösung (1,2 mM Coomassie Brilliantblau G-250, 4,23 mM Isopropanol und 1,6 mM Eisessig) für 1 h auf dem Wipptisch inkubiert. Nach der Färbung wurde das Gel mit dH<sub>2</sub>O abgespült und mit Entfärbelösung (4,02 mM Isopropanol und 1,6 mM Eisessig) entfärbt.

### 2.2.3.2 Western-Blot

Zur Western-Blot-Analyse wurden SDS-PA-Gele eingesetzt, die nach Abschnitt 2.2.3.1 angefertigt wurden. Es wurde ein vorgefärbter Molmassenstandard verwendet, um den Erfolg des *Blot*-Verfahrens zu überprüfen. Alle Schritte wurden bei RT durchgeführt.

Die verwendete Nitrozellulosemembran und das Whatman-Filterpapier wurden 15 min in Transfer-Puffer (20 % (v/v) MeOH, 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1 % (w/v) SDS) auf dem Wipptisch äquilibriert. Das *Blotten* erfolgte bei 250 mA bei 30 V für 1 h. Im Anschluss wurden das Whatman-Filterpapier und das SDS-PA-Gel entfernt. Alle weiteren Schritte wurden (wenn nicht anders angegeben) auf dem Wipptisch durchgeführt. Die Nitrozellulosemembran wurde nacheinander 2-mal mit je 15 mL TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7,5 und 150 mM NaCl) für 10 min gewaschen, 1 h in 10 mL Blocklösung (3 % BSA (w/v) in TBS) inkubiert, 2-mal mit je 15 mL TBS-TT (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,05 % (v/v) TWEEN®-20 und 0,2 % (v/v) Triton X-100) und 1-mal mit 15 mL TBS für 10 min gewaschen. Es folgte die Bindung des primären Antikörpers (Anti-Flag Antikörper, 1:10.000 in 10 mL Blocklösung) für 1 h. Nach 2-maligem Waschen mit je 15 mL TBS-TT und einmal 15 mL TBS für je 10 min wurde die Nitrozellulosemembran mit dem sekundären Antikörper (Anti-Maus Antikörper gekoppelt an alkalische Phosphatase, 1:10.000 in 10 mL Blocklösung) 1 h inkubiert. Die Nitrozellulosemembran wurde 4-mal mit je 15 mL TBS-TT 10 min gewaschen. Die Anfärbung des Protein-Antikörper-Komplexes erfolgte durch Zugabe von 10 mL alkalischer Phosphatase-Substratlösung (eine BCIP/NBT-Tablette gelöst in 10 mL dH<sub>2</sub>O) für ~2 min ohne Schwenken. Die Farbreaktion wurde durch 2-maliges Waschen mit je 20 mL dH<sub>2</sub>O gestoppt und die Nitrozellulosemembran zum Digitalisieren des Ergebnisses eingescannt.

### 2.2.3.3 Löslichkeitsverteilung von Proteinen

Zur Untersuchung der Löslichkeitsverteilung intrazellulär produzierter Proteine wurde eine 1/OD<sub>600</sub> Probe enzymatisch aufgeschlossen. Dafür wurde die Biomasse mit 130 µL Lyse-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 g/L Lysozym, 10 U/mL Benzonase) resuspendiert und bei 37 °C, 1 h inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend 5 min, 4 °C bei 16.000 x g zentrifugiert und so die löslichen von den unlöslichen Proteinen getrennt.

Lösliche Fraktion: 104 µL des Überstandes wurden abgenommen und mit 416 µL kaltem Aceton vermischt und für 5 min bei 4 °C inkubiert. Die gefällten Proteine wurden durch Zentrifugation (10 min, 4 °C, 16.000 x g) abgetrennt. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde in 80 µL Probenpuffer resuspendiert. Unlösliche Fraktion: Das Pellet wurde in 1 mL 50 mM Tris/HCl pH 8 resuspendiert und anschließend erneut zentrifugiert (5 min, 4 °C, 16.000 x g). Dieser Waschschrift wurde wiederholt. Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Pellet in 100 µL Probenpuffer resuspendiert. Die Proben wurden nach Inkubation für 5 min bei 99 °C mittels SDS-PAGE analysiert.

#### **2.2.3.4 Herstellung von Rohenzymextrakt**

Die Zellen einer *E. coli*-Kultur wurden zunächst durch Zentrifugation bei 6.000 x g für 10 min geerntet (Avanti J-30i, Rotor JA-10, Beckman Coulter). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. 2-3 g der gewonnenen Biofeuchtmasse wurden in 30 mL Aufschlusspuffer resuspendiert und mit 1 mM EDTA, 0,5 mM AEBSF und 2 µM Pepstatin A versetzt und im UltraTurrax homogenisiert. Der mechanische Zellaufschluss durch Hochdruckhomogenisierung wurde bei ~1.000 bar und ~4 °C (5 Zyklen) durchgeführt. Vor Aufschluss der Biomasse wurde das Gerät mit Puffer gespült. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 1 h bei 100.000 x g (Avanti J-30i, Rotor JA-30.50, Beckman Coulter). Der Überstand wurde anschließend 5 x 1 h gegen Aufschlusspuffer mit 0,5 mM EDTA bei 4 °C dialysiert, um niedermolekulare Verbindungen abzutrennen. Das Dialysat wurde erneut für 1 h bei 100.00 x g (Avanti J-30i, Rotor JA-30.50, Beckman Coulter) zentrifugiert, anschließend aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### **2.2.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels densitometrischer Analyse**

Zur Bestimmung der Konzentration des Zielproteins in einem Proteingemisch wurde dieses mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Zur Kalibrierung wurde das Modellprotein BSA in einer Konzentration von 0,1 – 0,5 g/L verwendet. Die Intensität der Banden von BSA und dem Zielprotein wurde in einem Geldokumentationssystem (Syngene) analysiert und die Konzentration daraus abgeleitet.

#### **2.2.3.6 Enzymkinetische Untersuchungen**

##### Kontinuierliche photometrische Messung (TAL)

Die Messung der Aktivität im kontinuierlichen Modus wurde für die enzymkinetische Messung der TAL verwendet. Dabei wurde die Änderung der Absorption bei 310 nm im Photometer gemessen. Diese Änderung entspricht dabei dem Produkt der Reaktion (Kumarsäure). Vor der Messung wurde der Rohenzymextrakt 1:350 in Reaktionspuffer I (100 mM Tris/HCl pH=8,3, 150 mM Kaliumacetat) mit 5 % Glycerin verdünnt. Der Rohenzymextrakt wurde bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert (max. 1 Woche). Vor der



Reaktion wurden 250  $\mu\text{L}$  des Rohenzymextraktes für 5 min bei 37 °C vorgewärmt. In eine Mikro-UV-Küvette wurden ebenso vorgewärmtes Tyrosin, Puffer und Kumarsäure in der jeweils benötigten Konzentration vorgelegt (Gesamtvolumen: 400  $\mu\text{L}$ ). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 216  $\mu\text{L}$  Rohenzymextrakt gestartet und nach zügigem Vermischen photometrisch verfolgt. Die Reaktionszeit betrug jeweils 5 min, die Anstiege wurden zwischen 1 und 3 min bestimmt.

#### Diskontinuierliche Messung mittels HPLC-Analyse (HpaBC)

Die enzymkinetische Untersuchung der HpaBC konnte aufgrund von Überlagerung der UV-Spektren von Substrat (Kumarsäure) und Produkt (Kaffeensäure) nicht kontinuierlich photometrisch durchgeführt werden. Alternativ dazu wurde ein diskontinuierlicher Assay mit HPLC-Analytik gewählt. Die Proben wurden nach Abstoppen der Reaktion wie nachfolgend beschrieben extrahiert und mittels HPLC analysiert. Aufgrund der Abhängigkeit der Reaktion von NADH wurde zusätzlich ein NADH-Regenerationssystem mit Glukose-Dehydrogenase genutzt. Die Zusammensetzung der Reaktion ist nachfolgend beschrieben.

0,5 mM	NADH
5 mM	Glukose
2 mM	MgCl <sub>2</sub>
5 $\mu\text{M}$	FAD
x mM	Kumarsäure
5 $\mu\text{g/mL}$	Glukose-Dehydrogenase
100 $\mu\text{L}$	Rohenzymextrakt

ad 1 mL Reaktionspuffer II (50 mM Tris/HCl pH 8,3, 50 mM Kaliumacetat)

Der Ansatz wurde zunächst ohne Rohenzymextrakt für 5 min bei 37 °C vorgewärmt. Durch Zugabe von Rohenzymextrakt wurde die Reaktion gestartet. Die Reaktion erfolgte bei offenem Deckel bei 1300 rpm (Eppendorf Thermomixer), 37 °C für 8 min. Nach jeweils 1, 2, 4 und 8 min wurden 200  $\mu\text{L}$  als Probe entnommen und in neue Reaktionsgefäße überführt. In diesen waren bereits 4  $\mu\text{L}$  Ameisensäure vorgelegt, um die Reaktion abzustoppen. Als interner Standard wurden vor Extraktion 25 mM Ferulasäure (gelöst in EEE) hinzugegeben.

## 2.2.4 Analytik

### 2.2.4.1 Produktextraktion

Für die Analyse der *in vivo* Produktion wurden Proben der Kultur (ca. 1,3 mL) entnommen und zügig für 5 min, 6.000 x g zentrifugiert. 1 mL des zellfreien Überstandes wurde abgenommen und bis zur Extraktion bei -20 °C gelagert. Zur Extraktion der Produkte (und Intermediate) wurden 1 mL Kulturüberstand mit 10  $\mu\text{L}$  Ameisensäure angesäuert. Die Extraktion erfolgte durch Zugabe von 500  $\mu\text{L}$  EEE mit anschließender Durchmischung (Vortex) und Phasentrennung für 5 min bei 10.000 x g. Die obere Phase (organische Phase)

wurde in ein neues Gefäß überführt, die wässrige Phase wurde ein zweites Mal mit 500 µL EEE extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint. Die Evaporation der organischen Phase der Proben erfolgte vollständig für ca. 1 h bei 30 °C unter Vakuum (SpeedVAc, Eppendorf). Die festen Rückstände wurden zunächst in 100 % Acetonitril (20 – 100 µL) aufgenommen und im Ultraschallbad gelöst. Durch Zugabe von dH<sub>2</sub>O (180 – 900 µL) wurde die Konzentration von Acetonitril auf 10 % eingestellt. Das Volumen wurde dabei individuell für die zu erwartende Produktmenge (bzw. Masse an Rückstand) gewählt. Die Proben wurden bei -20 °C bis zur Analyse mittels HPLC gelagert. Bei Fermentationsproben wurde der Kulturüberstand vor der Extraktion 1:5 mit dH<sub>2</sub>O verdünnt (Endvolumen 500 µL).

#### 2.2.4.2 HPLC-Analytik der organischen Phase

Die zu analysierenden Proben wurden mittels *reversed phase* HPLC isokratisch aufgetrennt und die jeweils enthaltenen Produkte durch Vergleich mit Standardsubstanzen identifiziert und quantifiziert. Bei der stationären Phase handelt es sich um eine C18-Säule (YMC-Pack ODS-A, YMC Europe GmbH), bei der mobilen Phase um 12 % Acetonitril mit 0,2 % Ameisensäure (filtriert, entgast). Zum Spülen des Systems wurde 80 % Acetonitril mit 0,2 % Ameisensäure (filtriert, entgast) verwendet. Jeweils 50 µL einer Probe wurden injiziert und für 30 min bei 310 nm analysiert.

#### 2.2.4.3 Tyrosin-Analytik (Derivatisierung und HPLC-Analytik)

Zur Herstellung einer Ortho-Phthaldialdehyd-(OPA)-Lösung wurden 75 mg OPA in 15 mL 400 mM NaH<sub>2</sub>BO<sub>3</sub> (pH=9,5, NaOH) mit Zugabe von 75 µL β-Mercaptoethanol gegeben. Zum vollständigen Lösen wurde diese abgedunkelt auf einem Roller-Mix inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit einem Sterilfilter filtriert. Für die Derivatisierung von primären Aminen wurden zu 125 µL Probe 375 µL OPA-Lösung (Verhältnis 1:3) gegeben und für 3 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mL EEE gestoppt. Die wässrige Phase wurde anschließend mit einem Chloroform-EEE-Gemisch (40/60-Verhältnis) extrahiert. Die wässrige Phase wurde dann mittels HPLC analysiert. Die derivatisierten Proben sollten innerhalb eines Tages vermessen werden. Zu jeder Derivatisierung wurde ein Tyrosin-Standard (0,5 mM in Minimalmedium) mitgeführt. Die Proben wurden mittels *reversed phase* HPLC isokratisch aufgetrennt. Bei der stationären Phase handelt es sich um eine C18-Säule (YMC-Pack ODS-A, YMC Europe GmbH), bei der mobilen Phase um 16:16:68 (v:v:v) Acetonitril:Methanol:H<sub>2</sub>O mit 100 mM NaHPO<sub>4</sub> (pH 6,5). Zum Spülen des Systems wurde 80 % Acetonitril mit 0,2 % Ameisensäure (filtriert, entgast) verwendet. Jeweils 50 µL einer Probe wurden injiziert und für 30 min bei 340 nm analysiert.

## 3 Ergebnisse

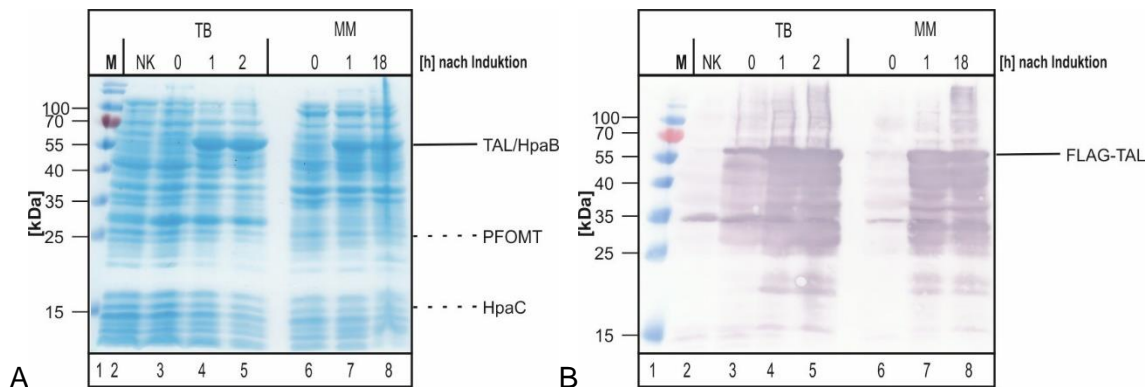
In der vorliegenden Arbeit wurde die Biosynthese von Ferula- und Sinapinsäure mit *E. coli* untersucht. Dafür wurden die Enzyme *RcTAL* und *RgTAL*, *EcHpaBC*, *EcHpaB(Y3011)C*, *PaHpaBC* und *SeHpaBC*, sowie *McPFOMT*, *MsCOMT* und *LpCOMT* auf ihre Eignung für die Produktion untersucht. Es wurden jeweils zwei Konstrukte für die Ferula- und Sinapinsäure-Produktion geplant und kloniert. Als Plasmid wurde das T7-basierte System pRSFDuet-1 aufgrund seiner potenziellen Kompatibilität mit zwei weiteren Plasmiden (pACYCDuet-1, pETDuet-1) gewählt. Die Gene wurden zudem als polycistronisches Konstrukt designt, wobei die 5'-3' Reihenfolge der Gene, der Reihenfolge in der Reaktionskaskade der jeweiligen Enzyme entspricht. Da die *EcHpaBC* und *PaHpaBC* bereits im Wildtyp-Genom als Bicistron vorliegen, wurde für die Konstrukte auch der nicht-codierende Teil zwischen den zwei Genen übernommen. Da es sich bei der Hydroxylase aus *S. espanaensis* (Sam5) wildtypisch nicht um ein Bicistron mit einem Gen für eine Flavin-Reduktase handelt, wurde zu Vergleichszwecken eine Flavin-Reduktase aus dem Genom gewählt und bicistronisch am 3'-Ende des Hydroxylase-Gens angehängt. Die Konstrukte zur Produktion werden nachfolgend als FA1 (*ferulic acid 1*, FLAG-*RcTAL*/*EcHpaBC*/*McPFOMT*), FA2 (*ferulic acid 2*, *RgTAL*-FLAG/*EcHpaBC*/*McPFOMT*), SA1 (*sinapic acid 1*, *RgTAL*-FLAG/*PaHpaBC*/*McPFOMT*) und SA2 (*sinapic acid 2*, *RgTAL*-FLAG/*EcHpaB(Y3011)C*/*McPFOMT*) bezeichnet (Tab. 2.5, S. 30). Außerdem wurden Einzelkonstrukte in pET28a von *EcHpaBC*, *PaHpaBC*, *SeHpaBC*, *McPFOMT*, *MsCOMT* und *LpCOMT* designt. Die Einzelheiten zur Klonierung bzw. Synthese sind im Kapitel Material und Methoden (siehe 2.1.5, S. 29) zusammengestellt. Die Enzyme wurden anhand der Expression, sowie der *in vivo* und teilweise *in vitro* Aktivität vergleichend untersucht. Die Parameter, die dabei eine Rolle spielten, sind in Tab. 1.1 (S. 17) und Tab. 1.2 (S. 18) zusammengefasst. Bei Nachweis einer besseren Eignung eines Enzyms könnte dieses dann gegebenenfalls in einem Konstrukt (FA1/2 oder SA1/2) ausgetauscht werden.

### 3.1 Nachweis der Funktionalität der *in silico* entworfenen Biosynthesekaskade zur Produktion von Ferulasäure

#### 3.1.1 Identifizierung einer geeigneten TAL für die rekombinante Biosynthesekaskade

Eine notwendige Voraussetzung für die Synthese von Ferulasäure in *E. coli* ist die ausreichend gute Expression aller beteiligten Enzyme. Dafür wurde die Expression der Gene des Konstruktes FA1 (FLAG-*RcTAL*/*EcHpaBC*/*McPFOMT*) und FA2 (*RgTAL*-FLAG/*EcHpaBC*/*McPFOMT*) durch Kultivierung und Induktion transformierter BL21(DE3)Gold-Zellen (siehe 2.2.1.8, S. 34) in Komplexmedium TB und in Minimalmedium und mittels SDS-PAGE und Western-Blot auf Überexpression getestet (siehe 2.2.2.1, S. 36).

Die Analyse mittels Western-Blot ( $\alpha$ -FLAG-Antikörper) dient dabei ausschließlich dem Nachweis des FLAG-Epitops der TAL. In Abb. 3.1 sind sowohl das SDS-PA-Gel (siehe 2.2.3.1, S. 38) als auch die Western-Blot-Membran (siehe 2.2.3.2, S. 39) des Expressionstests von FA1 dargestellt. Eine Zunahme der Bandenintensität auf der erwarteten Höhe der RcTAL (theoretisches Molekulargewicht: 58 kDa) in SDS-PAGE (A: Spur 4/5, 7/8), sowie ein Western-Blot-Signal auf der erwarteten Höhe (B: Spur 4/5, 7/8) weisen auf eine Überproduktion der RcTAL hin. Ebenso ist eine Basalexpression im Western-Blot bei der Kultivierung in TB sichtbar (Spur 3), in Minimalmedium ist diese nur gering (Spur 6). Ebenso ist eine Fragmentierung der RcTAL erkennbar. Dies könnte auf einen Abbau oder Translationsabbruch des Zielproteins hindeuten. Mit einem theoretischen Molekulargewicht von 59 kDa kann die HpaB elektrophoretisch unter diesen Bedingungen nicht von der RcTAL (58 kDa) getrennt werden, weshalb eine Überproduktion der HpaB nicht eindeutig nachgewiesen werden kann. Eine Überproduktion der PFOMT (25 kDa) und der HpaC (19 kDa) ist mittels Coomassie-Färbung nicht erkennbar. Während der Kultivierung sowohl in TB als auch in Minimalmedium fiel eine geringe Wachstumsrate ( $\mu_{\max}$ ) der transformierten BL21(DE3)Gold-Zellen von  $0,4 \text{ h}^{-1}$  auf (Leervektor in TB Medium:  $\mu_{\max}=0,8 \text{ h}^{-1}$ ). Dies spricht für eine starke metabolische Last der Genprodukte oder einer möglichen Toxizität der Reaktionskaskade oder deren Produkte.

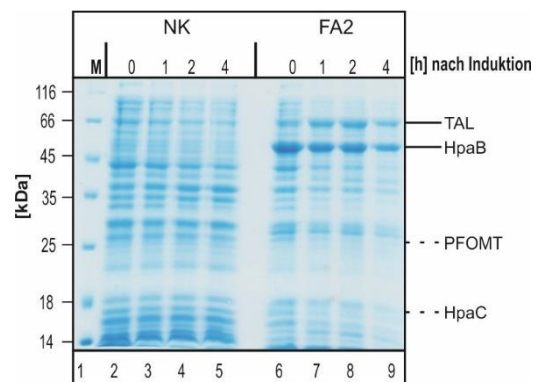


**Abb. 3.1: Expressionstest von FA1 in BL21(DE3)Gold TB & Minimalmedium bei 37 °C**

Die Kultivierung erfolgte mit transformierten BL21(DE3)Gold-Zellen in TB und Minimalmedium bei 37 °C unter Schütteln. Nach Induktion der Expression wurden die Proben 0 h, 1 h und 2 h bei TB und 0 h, 1 h und 18 h bei Minimalmedium analysiert. **A: SDS-PAGE:** 1: Molekulargewichtsmarker (M), 2: Negativkontrolle (NK) Leervektor pRSF Duet1, 3-5: TB, 6-8: Minimalmedium. **B: Western-Blot ( $\alpha$ -FLAG):** Auftragung siehe Bild A. Markiert ist das theoretische Molekulargewicht von TAL (58 kDa), HpaB (59 kDa), PFOMT (27 kDa) und HpaC (19 kDa).

In Abb. 3.2 ist die Analyse des Expressionstest von FA2 in BL21(DE3)Gold in TB Medium mittels SDS-PAGE dargestellt. Als Negativkontrolle wurden die mit Leervektor pRSF Duet1 transformierten BL21(DE3)Gold-Zellen (Spur 2-5) analysiert. Eine intensive Proteinbande in der erwarteten Höhe der HpaB (theoretisches Molekulargewicht 59 kDa) in Spur 6-9 deutet

auf eine Überproduktion der HpaB hin, wobei in Spur 6 auch eine deutliche Basalexpression der HpaB sichtbar ist. In Höhe von ca. 66 kDa ist im Vergleich zur Negativkontrolle ebenso eine erhöhte Bandenintensität erkennbar, die der Überproduktion der TAL (theoretisches Molekulargewicht 76 kDa) entspricht. Nach Induktion erkennt man eine leichte Zunahme der Bandenintensität in Höhe der TAL, jedoch eine Abnahme der Bandenintensität in Höhe der HpaB. Eine Überproduktion der PFOMT und der HpaC ist wie bei der Expression von FA1 nicht erkennbar. Auch während dieser Kultivierung fiel eine langsame Wachstumsrate von  $0,4 \text{ h}^{-1}$  auf (Vergleich Leervektor:  $0,8 \text{ h}^{-1}$ ). Eine Kultivierung in Minimalmedium war nicht erfolgreich. Auch dieses Ergebnis spricht für eine starke metabolische Last durch die Basalexpression und einer eventuellen Toxizität der Genprodukte.



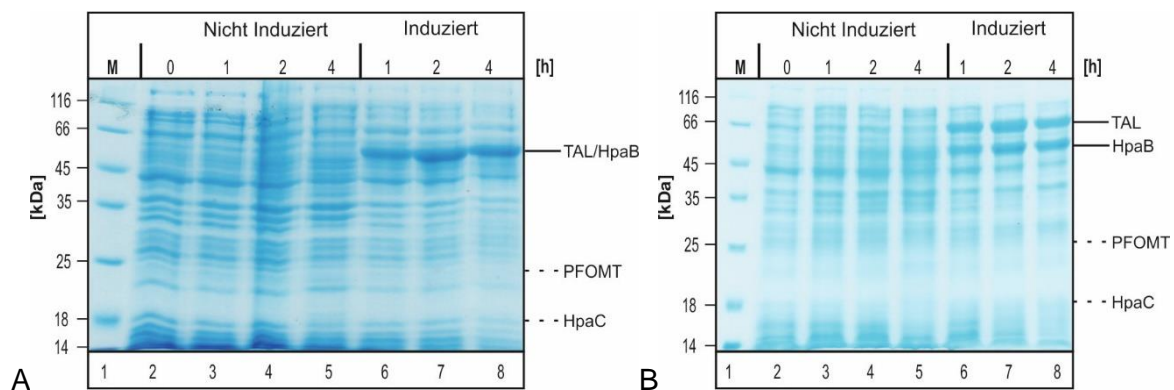
**Abb. 3.2: SDS-PAGE: Expressionstest von FA2 in BL21(DE3)Gold in TB bei 37 °C**

Die Kultivierung erfolgte mit transformierten BL21(DE3)Gold-Zellen in TB Medium bei 37 °C unter Schütteln. Nach Induktion der Expression wurden die Proben 0 h, 1 h, 2 h und 4 h sowohl von FA2 als auch des Leervektors pRSF Duet1 analysiert. 1: Molekulargewichtsmarker (M), 2-5: Negativkontrolle (NK) Leervektor pRSF Duet1, 6-9: FA2. Markiert ist das theoretische Molekulargewicht von TAL (76 kDa), HpaB (59 kDa), PFOMT (27 kDa) und HpaC (19 kDa).

Während weiterer Kultivierungsversuche in unterschiedlichen Zelllinien (z.B. BL21(DE3)Star, Lemo21(DE3)pLysS) und unter unterschiedlichen Bedingungen (z.B. Reduktion Temperatur) zeigten sich nicht reproduzierbare Ergebnisse. Dieses unstete Wachstumsverhalten zeigte sich insbesondere bei der Kultivierung in Minimalmedium. Die Beobachtung, dass mit FA1 und FA2 transformierte *E. coli* langsamer wachsen als mit Leervektor pRSF Duet1 transformierte Zellen, deutet auf einen negativen Selektionsdruck auf die Zellen die mit FA1 und FA2 transformiert wurden hin. Daher wurde untersucht, ob die Plasmide über mehrere Generationen in *E. coli* BL21(DE3)Gold sicher propagiert werden können. Dazu wurden Einzelkolonien von der jeweiligen Agarplatte (TB und Minimalmedium) in Flüssigmedium (TB und Minimalmedium) inokuliert und über Nacht schüttelnd inkubiert. Eine Probe der jeweiligen Kultur wurde für den Nachweis der Plasmide mittels PCR eingesetzt (Primer zur Amplifizierung der TAL). Ein Nachweis der TAL auf DNA-Ebene korreliert dabei mit der stabilen Propagation der Plasmide. Es wurde nachgewiesen, dass bei FA1 10 von 10 Kulturen in TB Medium Plasmid enthielten und nur 4 von 10 Kulturen in Minimalmedium

Plasmid enthielten. Bei FA2 wurde dasselbe Ergebnis für TB Medium erzielt, jedoch wuchsen in Minimalmedium 0 von 10 Kolonien in Flüssigkultur an. Aufgrund der Hypothese der mangelnden Plasmidstabilität, wurde ein „pLysT“ Plasmid (kodierend für das T7 Lysozym, Sequenz siehe erweiterter Anhang S. 137 ff.) zur Unterdrückung der Basalexpression designt (Dr. Bodo Moritz), welches in BL21(DE3)Gold Zellen transformiert wurde. Die Konstrukte FA1 und FA2 wurden anschließend ebenso in diese Zelllinie eingebracht und die Expression getestet.

In Abb. 3.3 ist der durch SDS-PAGE analysierte Expressionstest von FA1 und FA2 in BL21(DE3)Gold pLysT in TB bei 37 °C dargestellt. Neben der zu erwartenden Überproduktion der TAL und HpaB sieht man, dass in der jeweiligen Kultur ohne Induktor auch nach 4 h keine Zunahme einer Bandenintensität in der jeweiligen Höhe der Zielproteine erkennbar ist (A/B: Spur 2-5). Dies zeigt, dass mit dem pLysT System eine vorzeitige Expression erfolgreich unterdrückt wird. Dies spiegelt sich auch in einer höheren Wachstumsrate von  $0,7 \text{ h}^{-1}$  (FA1) und  $0,6 \text{ h}^{-1}$  (FA2) wider.

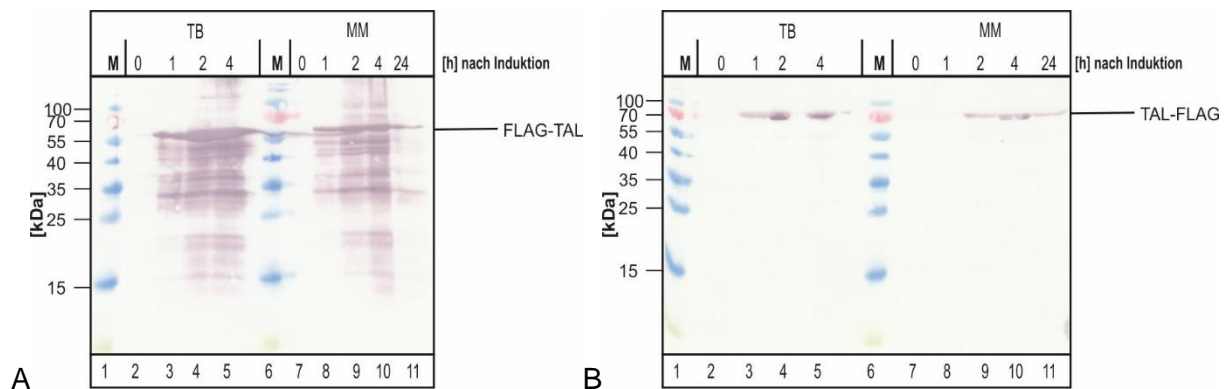


**Abb. 3.3: SDS-PAGE: Expressionstest von FA1 & FA2 in BL21(DE3)Gold pLysT in TB bei 37 °C**

Die Kultivierung erfolgte mit transformierten BL21(DE3)Gold pLysT-Zellen in TB Medium bei 37 °C unter Schütteln. Nach Induktion wurden die Proben 0 h, 1 h, 2 h und 4 h einer nicht induzierten und einer induzierten Kultur von FA1 (A) und FA2 (B) analysiert. **A: FA1:** 1: Molekulargewichtsmarker (M), 2-5: nicht induzierte Kultur (0-4 h), 6-8: induzierte Kultur (1-4 h). **B: FA2:** 1: Molekulargewichtsmarker (M), 2-5: nicht induzierte Kultur (0-4 h), 6-8: induzierte Kultur (1-4 h). Markiert ist das theoretische Molekulargewicht von TAL (FA1 ( $R_cTAL$ : 58 kDa), FA2 ( $R_gTAL$ : 76 kDa), HpaB (59 kDa), PFOMT (27 kDa) und HpaC (19 kDa).

In Abb. 3.4 ist der Western-Blot der Proben des Expressionstest von FA1 und FA2 aus der Kultivierung in TB und auch in Minimalmedium ( $\mu_{max}=0,4 \text{ h}^{-1}$ ) gezeigt. Bei beiden Konstrukten sowohl in TB als auch in Minimalmedium ist keine Basalexpression der TAL detektierbar (jeweils Spur 2 & 7). Die TAL des FA1 Konstruktes ist deutlich stärker nachweisbar als die TAL des FA2 Konstruktes, was jedoch an der unterschiedlich terminalen Position des FLAG-Epitops liegen kann (FA1: N-terminal, FA2: C-terminal). Aufgrund des N-terminalen FLAG-Epitops sind in Bild A (FA1) kürzere Zielprotein-Fragmente nachweisbar, was auf C-terminalen Abbau oder Translationsabbruch hindeutet. In Bild B erkennt man hingegen nur eine dominante Bande, da in diesem Konstrukt nur Vollängen-TAL (C-terminal getaggte

TAL) detektiert werden kann. Bei beiden Konstrukten erkennt man, dass die Intensität der TAL nach Expression in Minimalmedium (je Spur 7-11) geringer ist als in TB-Medium (je Spur 2-5). Diese Analyse mittels Western-Blot zeigt deutlich, dass die Verwendung des pLysT Systems zur Unterdrückung der Basalexpression und damit zur verbesserten Produktion der Genprodukte in TB und vor allem in Minimalmedium führt. Außerdem zeigt es, dass die Verwendung eines induzierbaren Systems unumgänglich ist. Bei einem konstitutiven System könnte es sein, dass die Toxizität zu einer vollständigen Wachstumsinhibition führt. Alle nachfolgenden Versuche der Kultivierung von FA1 und FA2 erfolgten in Gegenwart von pLysT. Die geringe Wachstumsrate in Minimalmedium von  $0,4 \text{ h}^{-1}$  des oben genannten Experimentes zeigt, dass trotzdem eine starke metabolische Last unter diesen Bedingungen besteht. In nachfolgenden Experimenten konnte die maximale Wachstumsrate der Hauptkultur durch Verringerung der Biomasse bei dem Animpfen der Vorkultur und damit der End- $\text{OD}_{600}$  der Vorkultur (nach 16 h, ca.  $\text{OD}_{600}=2$ ) auf  $0,5 - 0,6 \text{ h}^{-1}$  gesteigert werden. Dies geht vermutlich darauf zurück, dass Zellen der Vorkultur, die bereits lange in der stationären Phase waren, einen negativen Einfluss auf die maximale Wachstumsrate der Zellen in der Hauptkultur haben.



**Abb. 3.4: Western-Blot: Expressionstest von FA1 & FA2 in BL21(DE3)Gold pLysT**

Die Kultivierung erfolgte mit transformierten BL21(DE3)Gold pLysT-Zellen in TB und Minimalmedium bei  $37^\circ\text{C}$  unter Schütteln. Nach Induktion wurden die Proben 0 h, 1 h, 2 h und 4 h in TB Medium und in Minimalmedium zusätzlich 24 h von FA1 (A) und FA2 (B) analysiert. **A: FA1 ( $\alpha$ -FLAG):** 1: Molekulargewichtsmarker (M), 2-5: TB Medium (0-4 h), 6: Molekulargewichtsmarker (M), 7-11: Minimalmedium (0-24 h). **B: FA2 ( $\alpha$ -FLAG):** Auftragung siehe Bild A. Markiert ist das theoretische Molekulargewicht von **A: FLAG-TAL ( $R_c$ TAL: 58 kDa)** und **B: TAL-FLAG ( $R_g$ TAL: 76 kDa)**.

### 3.1.1.1 Nachweis der Ferulasäure-Synthese in rekombinanten *E. coli*-Zellen

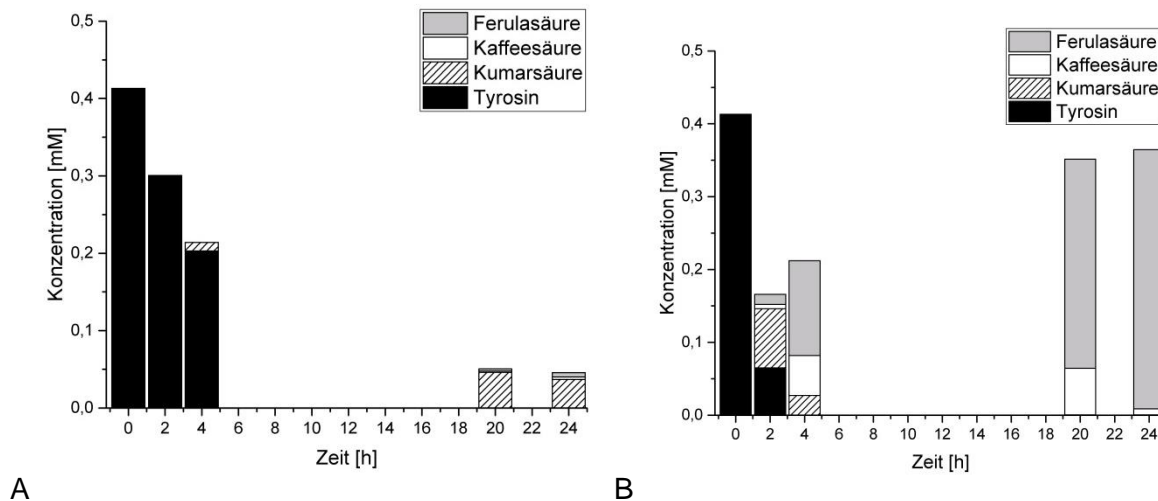
Um die Aktivität der Enzyme *in vivo* zu testen wurden die Kulturen von FA1 und FA2 BL21(DE3)Gold pLysT zum Zeitpunkt der Induktion mit  $0,5 \text{ mM}$  Tyrosin versetzt. Zur besseren Analytik und einer Bilanzierung wurden alle *in vivo* Umsätze in Minimalmedium durchgeführt. Proben des Kulturüberstandes wurden anschließend zu unterschiedlichen Zeitpunkten (nach 0, 2, 4, 20 und 24 h) mit Ameisensäure angesäuert, mit Essigsäureethylester extrahiert und mittels HPLC (siehe 2.2.4, S. 41) auf Kumar-, Kaffee-

und Ferulasäure-Konzentrationen analysiert. In Abb. 3.5 ist der zeitliche Umsatz von Tyrosin dargestellt, wobei in Bild A die Analyse des Kulturüberstandes von FA1 BL21(DE3)Gold pLysT und in Bild B die Analyse des Kulturüberstandes von FA2 BL21(DE3)Gold pLysT gezeigt ist. In Bild A ist innerhalb der ersten 4 h eine Abnahme der Tyrosin Konzentration (schwarz) erkennbar, sowie nach 4 h eine geringe Akkumulation von Kumarsäure (schraffiert). Nach 20 h bzw. 24 h ist kein Tyrosin im Überstand mehr detektierbar, jedoch sind Kumarsäure und auch eine geringe Konzentration von Ferulasäure nachweisbar. Obwohl Tyrosin nur in geringem Anteil in die gewünschte Reaktionskaskade eingeht, wird Tyrosin vollständig in die Zellen aufgenommen und dann vermutlich als Stickstoffquelle verwertet (siehe Abb. 1.14, S. 20). Im Vergleich zum Ergebnis von FA1 ist im Bild B (FA2) eine deutlich frühere und höhere Produktion von Ferulasäure sichtbar. Die Tyrosin Konzentration ist hierbei bereits nach 2 h geringer als bei der Kultivierung von FA1. Nach 2 h sind außerdem bereits signifikante Konzentrationen an Kumarsäure erkennbar, sowie eine leichte Akkumulation von Kaffee- und Ferulasäure sichtbar. Nach 4 h ist bereits eine deutliche Akkumulation von Ferulasäure nachweisbar, welche sich nach 20 h und 24 h nochmals erhöht. In diesem Experiment konnten nach 24 h 0,36 mM Ferulasäure mit leichter Akkumulation von 0,008 mM Kaffeesäure produziert werden. Der schnellere Umsatz von Tyrosin (1. Reaktion: TAL) und damit auch der bessere Gesamtumsatz durch FA2 BL21(DE3)Gold pLysT zeigen, dass das Konstrukt FA2 und damit auch die TAL aus *R. glutinis* im Produktionsorganismus signifikant aktiver ist. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die TAL aus *R. capsulatus* (in FA1) in erheblichen Maße unlöslich produziert wurde, was eine mögliche Erklärung für die deutlichen Unterschiede in der Aktivität sein könnte (Anhang: Abb. 10.1, S. 124). Die Differenz zwischen eingesetztem Tyrosin (0,5 mM) und nachgewiesenem Tyrosin (ca. 0,4 mM) geht auf eine schnelle Aufnahme des Tyrosins durch die Zellen, sowie durch Fehler bei der Einwaage und Analytik zurück. Diese Fehler sollen in der Diskussion weiter betrachtet werden (siehe Kapitel 4.5, S. 107 ff.).

Alle nachfolgenden Versuche zur Biosynthese von Ferulasäure wurden mit dem Konstrukt FA2 durchgeführt.

Die Ergebnisse zum Nachweis der Aktivität zeigen, dass die *in silico* geplante Kaskade *in vivo* funktionsfähig ist. Dadurch war ein direkter Nachweis der Überexpression der einzelnen Enzyme nicht notwendig. Zur Optimierung dieser Reaktionskaskade sollten im Weiteren die jeweils besten Isoenzyme der Hydroxylase und Methyltransferase identifiziert werden. Dafür wurde die *in vivo* Aktivität von jeweils drei Isoenzymen untersucht und beurteilt.





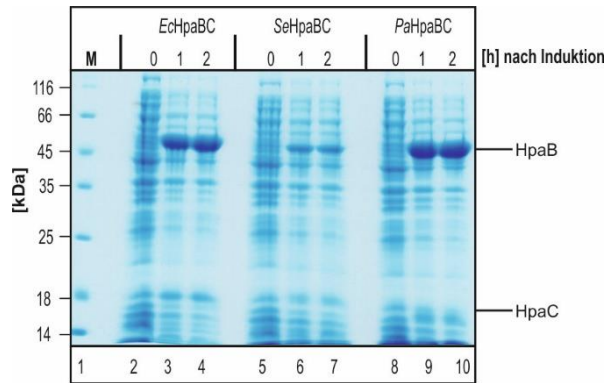
**Abb. 3.5: *In vivo* Aktivitätstest FA1 & FA2 BL21(DE3)Gold pLysT (Zugabe 0,5 mM Tyrosin)**

Die Kultivierung erfolgte mit transformierten BL21(DE3)Gold pLysT-Zellen in Minimalmedium bei 37 °C unter Schütteln. Bei Induktion wurden 0,5 mM Tyrosin hinzugegeben. Die Proben 0 h, 2 h, 4 h, 20 h und 24 h von FA1 (A) und FA2 (B) wurden analysiert. Zeit [h] vs. Konzentration [mM] ist dargestellt. Schwarz: Tyrosin, Schraffiert: Kumarsäure, Weiß: Kaffeesäure, Grau: Ferulasäure.

### 3.1.2 Identifizierung einer geeigneten Hydroxylase für die rekombinante Biosynthesekaskade

Zur Untersuchung der *in silico* ausgewählten Hydroxylasen wurde sowohl die Expression (siehe 2.2.2.1, S. 36) als auch die *in vivo* Aktivität (siehe 2.2.4, S. 41) der HpaBCs im Einzelkonstrukt aus *E. coli* (EcHpaBC), *S. espanaensis* (SeHpaBC) und *P. aeruginosa* (PaHpaBC) getestet. Die Eignung der EcHpaB(Y301I)C wurde nicht in einem Einzelkonstrukt getestet, da diese Variante zu diesem Zeitpunkt nicht zur Verfügung stand. Die Eignung zur Verwendung als Hydroxylase zur Sinapinsäure-Produktion war zudem aus den Daten vom Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie Halle bekannt. Die Produktion von Sinapinsäure mit der Variante EcHpaB(Y301I)C wurde im Konstrukt SA2 untersucht (siehe 3.2, S. 65 ff.).

In Abb. 3.6 ist die Analyse des Expressionstest mittels SDS-PAGE (siehe 2.2.3.1, S. 38) dargestellt. Nach Induktion kann man bei allen drei Hydroxylasen eine Zunahme der Bandenintensität auf Höhe des theoretischen Molekulargewichtes (59 kDa) der jeweiligen HpaB erkennen (Spur 3-4/6-7/9-10), wobei man im Falle der SeHpaBC eine schwächere Zunahme im Vergleich zu den anderen beiden sieht (Spur 6-7). Eine deutliche Überproduktion der jeweiligen HpaC ist nicht erkennbar. Natürlicherweise liegt die HpaBC als Bicistron vor, wodurch das Verhältnis von HpaB und HpaC reguliert wird. Aufgrund der hohen Affinität der HpaC zu FAD ( $K_M=3,1 \mu\text{M}$ ) und NADH ( $K_M=40 \mu\text{M}$ ) kann man vermuten, dass *E. coli* dieses Enzym nur sehr gering konzentriert im Verhältnis zur HpaB benötigt [Galán et al., 2000].



**Abb. 3.6: SDS-PAGE: Expressionstest der HpaBCs (*Ec/Se/Pa*) BL21(DE3)Gold LB bei 37 °C**

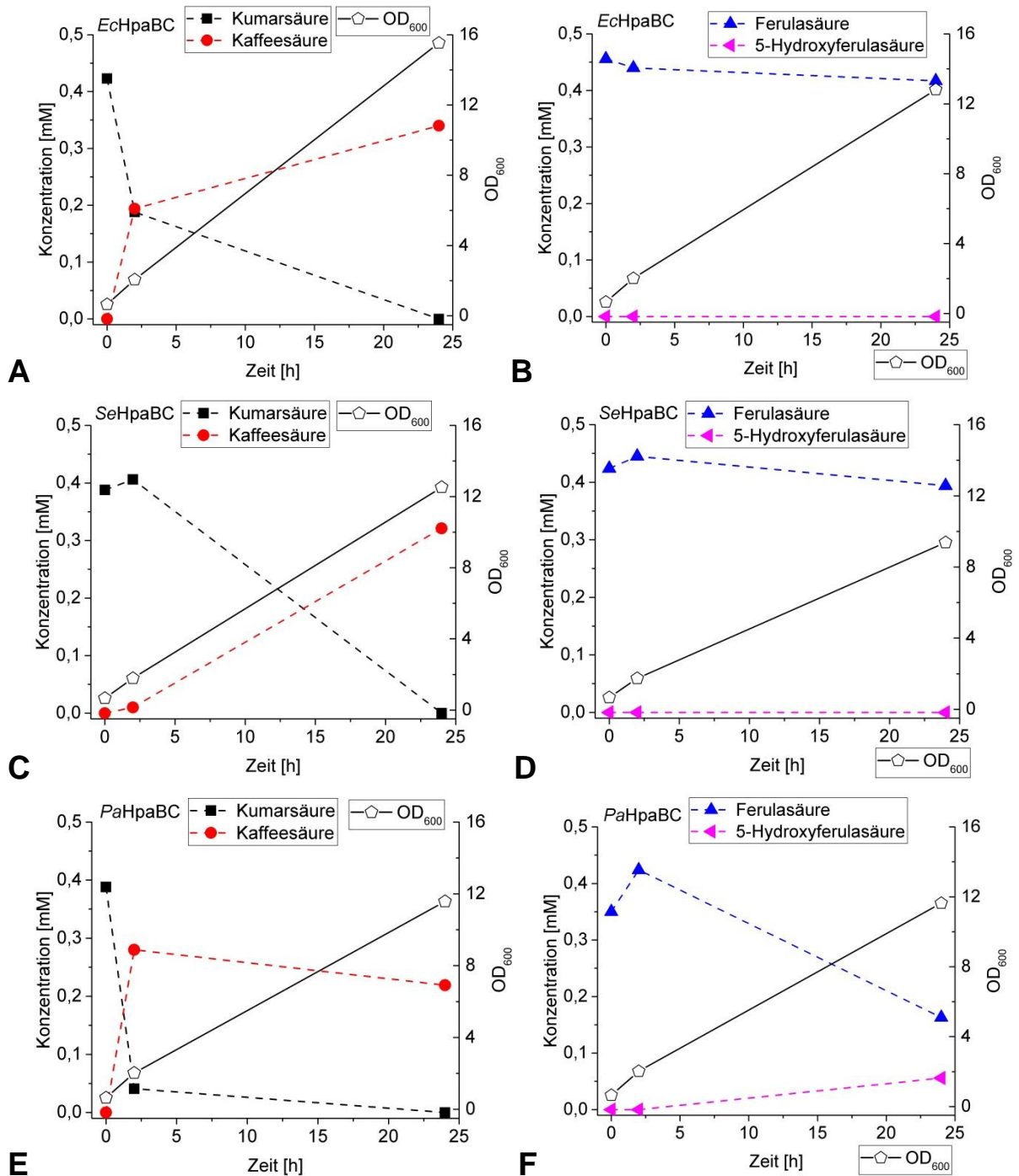
Die Kultivierung erfolgte mit transformierten BL21(DE3)Gold-Zellen in LB Medium bei 37 °C unter Schütteln. Untersucht wurden die HpaBCs aus *E. coli* (*Ec*), *S. espanaensis* (*Se*) und *P. aeruginosa* (*Pa*). Nach Induktion wurden jeweils die 1/OD-Proben 0 h, 1 h und 2 h analysiert. 1: Molekulargewichtsmarker (M), 2-4: *EcHpaBC* (2: 0 h, 3: 1 h, 4: 2 h), 5-7: *SeHpaBC* (5: 0 h, 6: 1 h, 7: 2 h), 8-10: *PaHpaBC* (8: 0 h, 9: 1 h, 10: 2 h). Markiert ist das theoretische Molekulargewicht von HpaB (59 kDa) und HpaC (19 kDa).

Die *in vivo* Aktivität wurde durch Umsatz von verschiedenen Testsubstraten mit rekombinanten Zellen, die die jeweilige zu testende Hydroxylase überexprimiert hatten, untersucht. Dafür wurde zu den jeweiligen Kulturen zeitgleich zur Induktion ( $OD_{600}=0,6$ ) die zu testenden Substrate (Kumar- bzw. Ferulasäure) als Feststoffe zugegeben. Der Zeitpunkt 0 h ist damit auch der Zeitpunkt der Induktion, wodurch die erste Zeit nach der Induktion vermutlich noch nicht die vollständige Enzymaktivität aufweist. Die Überstände der Kulturen wurden auf das eingesetzte Substrat und das jeweilige Produkt (Kaffee- bzw. Hydroxyferulasäure) mittels HPLC untersucht. Der Umsatz des Substrates wurde über 24 h verfolgt. In Abb. 3.7 sind die Ergebnisse der HPLC-Analysen zusammengestellt. Die Differenzen aus eingesetztem und nachgewiesenem Substrat soll im Rahmen einer Fehlerdiskussion (siehe Kapitel 4.5, S. 107 ff.) weiter betrachtet werden. Die Bilder A und B zeigen den Umsatz der *EcHpaBC*, C und D zeigen den Umsatz der *SeHpaBC* und E und F zeigen den Umsatz der *PaHpaBC*. Dabei sind in den Bildern A, C und E die Konzentration des Substrates Kumarsäure und des erwarteten Produktes Kaffeesäure über die Zeit abgebildet. Die Bildung des Produktes Kaffeesäure aus Kumarsäure lässt damit auf die Hydroxylase-Aktivität in 3'-Position schließen. In den Bildern B, D und F ist die Umsetzung des Substrates Ferulasäure in das erwartete Produkt 5-Hydroxyferulasäure über die Zeit dargestellt. Die Bildung von 5-Hydroxyferulasäure aus Ferulasäure lässt wiederum auf eine Hydroxylase-Aktivität in 5'-Position schließen. Die *EcHpaBC* (Bild A) zeigt einen schnellen Umsatz von Kumarsäure in Kaffeesäure von 0,2 mM ( $94 \mu\text{M}/OD_{600}$ ) innerhalb von 2 h (55 % Umsatz) und einen vermutlich vollständigen Umsatz (0 mM Kumarsäure, 0,34 mM Kaffeesäure) nach 24 h. In Bild B kann man erkennen, dass Ferulasäure nicht zum möglichen Produkt 5-Hydroxyferulasäure umgesetzt wird. Da jedoch bereits mit Kaffeesäure eine *in vivo* Aktivität nachgewiesen wurde (Bild A), kann man daraus schließen, dass

Ferulasäure kein geeignetes Substrat für die *EcHpaBC* ist, sie also keine 5-Hydroxylase-Aktivität aufweist. Die *SeHpaBC* (Bild C) zeigt einen deutlich langsameren Umsatz von Kumarsäure zu Kaffeesäure, jedoch nach 24 h auch einen vermutlich vollständigen Umsatz (0 mM Kumarsäure, 0,32 mM Kaffeesäure). Der geringere Umsatz korreliert mit der schlechteren Expression (Abb. 3.6). In Bild D ist erkennbar, dass auch die *SeHpaBC* keine 5-Hydroxylase-Aktivität aufweist. Die *PaHpaBC* (Bild E) zeigt den schnellsten Umsatz von Kumarsäure in 0,28 mM Kaffeesäure (139  $\mu\text{M}/\text{OD}_{600}$ ) innerhalb von 2 h, wobei nur noch 0,04 mM Kumarsäure nachweisbar waren. Dies entspricht einem 90 %-igem Umsatz bereits nach 2 h. Nach 24 h sinkt die Kaffeesäure-Konzentration leicht auf 0,22 mM, wobei aber keine Kumarsäure nachweisbar ist. In Bild F ist erkennbar, dass die *PaHpaBC* eine langsame 5-Hydroxylase-Aktivität aufweist. Nach 24 h wurden 0,06 mM 5-Hydroxyferulasäure nachgewiesen, wobei nur noch 0,16 mM Ferulasäure im Medium vorhanden war (54 % Umsatz). Aufgrund der Instabilität von 5-Hydroxyferulasäure und der Stabilität von Ferulasäure kann man vermuten, dass zwischenzeitlich deutlich mehr 5-Hydroxyferulasäure gebildet wurde als nach 24 h nachweisbar war. Bei diesen Untersuchungen ist zu beachten, dass der Zeitpunkt 0 h auch der Zeitpunkt der Induktion ist. Daher kann davon ausgegangen werden, dass in den ersten 2 h nicht die voll ausgebildete Enzymaktivität wirksam war. Umso erstaunlicher sind die doch deutlichen Umsätze der Kumarsäure in den ersten 2 h.

Eine weitere Beobachtung während der Bildung von Kaffeesäure ist eine starke Braunfärbung der Kultur, die auf eine Komplexbildung von Eisen-Ionen durch Kaffeesäure im basischen Milieu zurückzuführen ist [Hughes und Swain, 1962; Khokhar und Apenten, 2003]. Diese Beobachtung wurde durch Lösen von Kaffeesäure mit den einzelnen Medienbestandteilen bestätigt (Anhang Abb. 10.2). 5-Hydroxyferulasäure (und DOPA) zeigten ebenso eine Braun-Lila-Verfärbung im Medium, was jeweils auf die vicinalen Hydroxygruppen am Benzolring (3'+4' oder 4'+5') zurück zu führen ist.

Bei der Auswahl der am besten geeigneten Hydroxylase für die Biosynthese von Ferulasäure kommen aufgrund der Substratspezifität die *EcHpaBC* und *SeHpaBC* in Frage, wobei die *EcHpaBC* durch die bessere Expression und vermutlich dadurch auch den schnelleren Umsatz die geeignetere Hydroxylase darstellt. Die *PaHpaBC* ist aufgrund ihrer 5-Hydroxylase-Aktivität eine geeignete Hydroxylase für die Sinapinsäure-Produktion. Ein Austausch der *HpaBC* im Konstrukt FA2 ist somit für die Ferulasäure-Produktion nicht nötig.

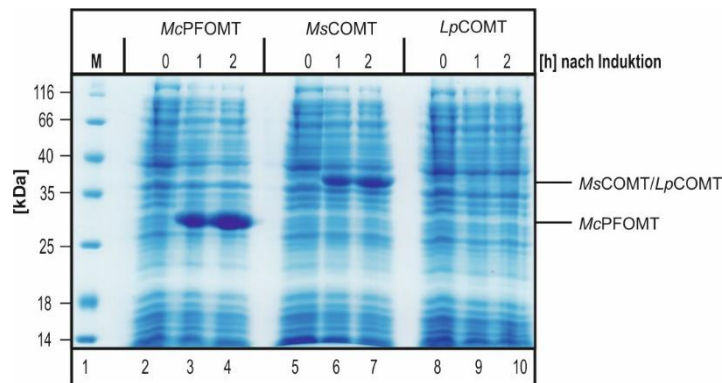


**Abb. 3.7: *In vivo* Aktivitätstest HpaBCs (Zugabe 0,5 mM Kumar-/Ferulasäure)**

Die Kultivierung erfolgte mit transformierten BL21(DE3)Gold-Zellen in Minimalmedium bei 37 °C unter Schütteln. Untersucht wurden die HpaBCs aus *E. coli* (*Ec*) (A, B), *S. espanaensis* (*Se*) (C, D) und *P. aeruginosa* (*Pa*) (E, F). Bei Induktion wurden 0,5 mM Kumarsäure (A, C, E) und 0,5 mM Ferulasäure (B, D, F) hinzugegeben. Die Proben nach 0 h, 2 h, und 24 h wurden jeweils analysiert. Zeit [h] vs. Konzentration [mM] (linke y-Achse) und OD<sub>600</sub> (rechte y-Achse) ist dargestellt. Schwarz: Kumarsäure, Rot: Kaffeesäure, Blau: Ferulasäure, Magenta: 5-Hydroxyferulasäure.

### 3.1.3 Identifizierung einer geeigneten Methyltransferase für die rekombinante Biosynthesekaskade

Zur Untersuchung der *in silico* ausgewählten Methyltransferasen wurde sowohl die Expression (siehe 2.2.2.1, S. 36) als auch die *in vivo* Aktivität (siehe 2.2.4, S. 41) der OMTs aus *M. crystallinum* (McPFOMT), *M. sativa* (MsCOMT) und *L. perenne* (LpCOMT) getestet. In Abb. 3.8 ist die Analyse des Expressionstest mittels SDS-PAGE (siehe 2.2.3.1, S. 38) dargestellt. Nach Induktion der Expression der jeweiligen Methyltransferase McPFOMT und MsCOMT kann man eine Zunahme der Bandenintensität auf der Höhe des theoretischen Molekulargewichtes (McPFOMT: 27 kDa, MsCOMT: 40 kDa) beobachten (Spur 3-4/6-7). Die rekombinante Überexpression dieser beiden Methyltransferasen in *E. coli* ist folglich möglich. Die Analyse der Proteinbanden für die Testexpression der LpCOMT lässt keine Überproduktion erkennen (Spur 9-10).



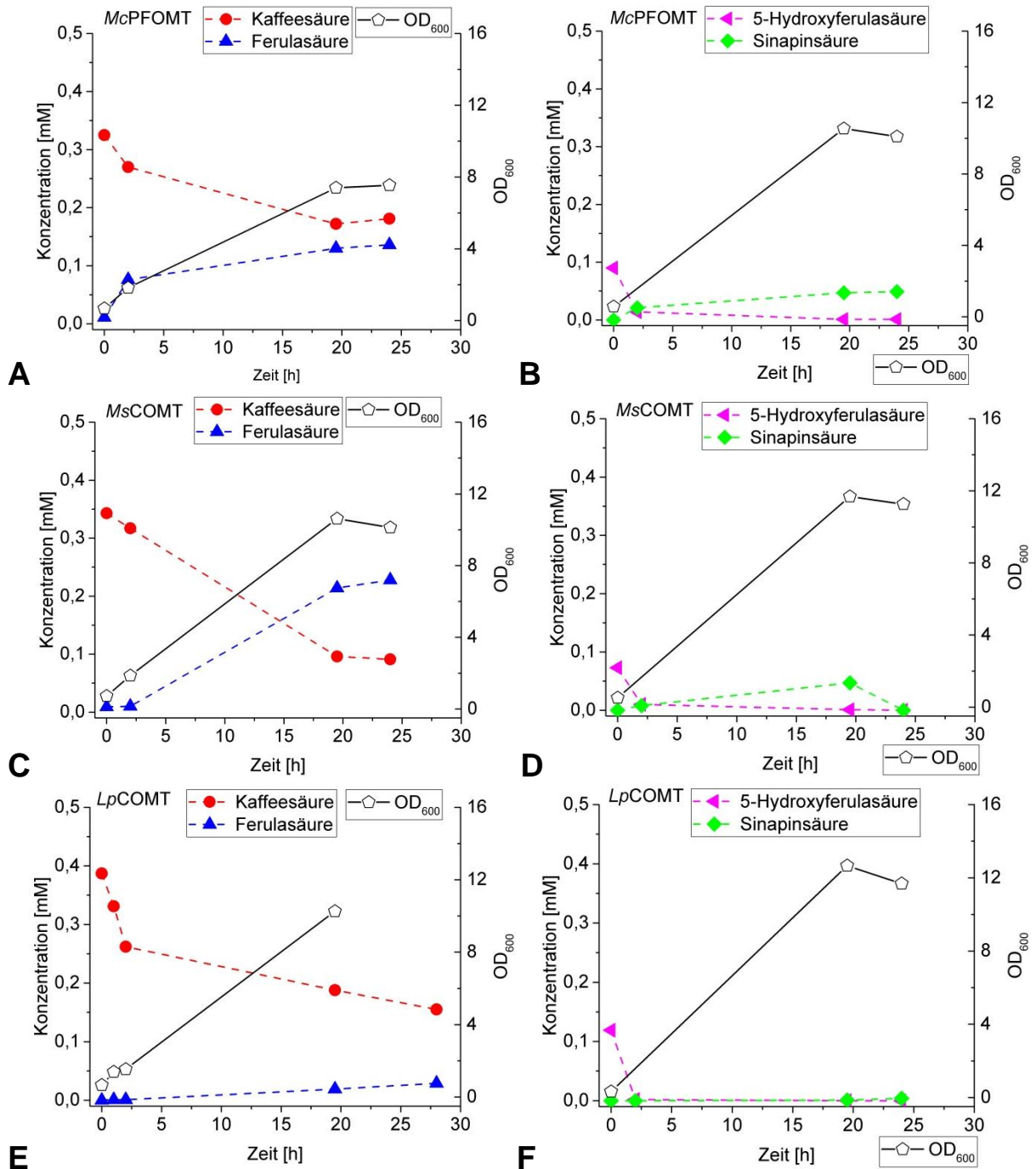
**Abb. 3.8: SDS-PAGE: Expressionstest der OMTs (Mc/Ms/Lp) BL21(DE3)Gold LB bei 37 °C**

Die Kultivierung erfolgte mit transformierten BL21(DE3)Gold-Zellen in LB Medium bei 37 °C unter Schütteln. Untersucht wurden die OMTs aus *M. crystallinum* (McPFOMT), *M. sativa* (MsCOMT) und *L. perenne* (LpCOMT). Nach Induktion wurden jeweils die 1/OD-Proben 0 h, 1 h und 2 h analysiert. 1: Molekulargewichtsmarker (M), 2-4: McPFOMT (2: 0 h, 3: 1 h, 4: 2 h), 5-7: MsCOMT (5: 0 h, 6: 1 h, 7: 2 h), 8-10: LpCOMT (8: 0 h, 9: 1 h, 10: 2 h). Markiert ist das theoretische Molekulargewicht von Ms/LpCOMT (40/39 kDa) und McPFOMT (27 kDa).

Die *in vivo* Aktivität der drei Methyltransferasen wurde durch Umsatz von verschiedenen Testsubstraten mit rekombinanten Zellen, die die jeweilige zu testende Methyltransferase überexprimiert hatten, untersucht. Dafür wurde zu den jeweiligen Kulturen zeitgleich zur Induktion ( $OD_{600}=0,6$ ) die zu testenden Substrate zugegeben. Für die Zugabe von Kaffeesäure wurde eine 250 mM Kaffeesäure-Stammlösung (in Ethanol) zur Minimierung des Fehlers bei der Einwaage verwendet. Die Überstände der Kulturen wurden hinsichtlich der Konzentrationen des eingesetzten Substrates (Kaffee- und 5-Hydroxyferulasäure) und des jeweiligen Produktes (Ferula- und Sinapinsäure) mittels HPLC untersucht. Die Reaktion wurde jeweils über 24 h bzw. 28 h verfolgt. Die Bilder A und B zeigen den Umsatz durch die McPFOMT, C und D zeigen den Umsatz durch die MsCOMT und E und F zeigen den Umsatz durch die LpCOMT. Dabei sind in den Bildern A, C und E die Konzentration des

Substrates Kaffeesäure und des erwarteten Produktes Ferulasäure gegen die Zeit aufgetragen. Die Bildung des Produktes Ferulasäure aus Kaffeesäure lässt damit auf die Methyltransferase-Aktivität in 3'-Position schließen. In den Bildern B, D und F ist die Konzentration des Substrates 5-Hydroxyferulasäure in das erwartete Produkt Sinapinsäure gegen die Zeit dargestellt. Die Bildung von Sinapinsäure aus 5-Hydroxyferulasäure lässt wiederum auf eine Methyltransferase-Aktivität in 5'-Position schließen. Die Differenzen aus eingesetztem und nachgewiesenem Substrat soll im Rahmen einer Fehlerdiskussion weiter betrachtet werden (siehe Kapitel 4.5, S. 107 ff.). Die *McPFOMT* (Bild A) zeigt einen Umsatz von Kaffeesäure zu 0,08 mM Ferulasäure ( $42 \mu\text{M}/\text{OD}_{600}$ ) innerhalb von 2 h (17 % Umsatz) und eine Akkumulation von 0,14 mM Ferulasäure ( $18 \mu\text{M}/\text{OD}_{600}$ ) nach 24 h, wobei der Umsatz nicht vollständig ist (übrig: 0,18 mM Kaffeesäure, 44 % Umsatz). In Bild B ist erkennbar, dass auch ein Umsatz von 5-Hydroxyferulasäure zu Sinapinsäure erfolgte, obwohl zum Zeitpunkt 0 h weniger als 0,1 mM Substrat nachweisbar war. Aufgrund der Instabilität des Substrates kann eine ausschließlich qualitative Aussage zur 5-Methylierungsaktivität gemacht werden. Die *MsCOMT* (Bild C) zeigt einen langsameren Umsatz von Kaffeesäure in Ferulasäure ( $5 \mu\text{M}/\text{OD}_{600}$  Ferulasäure, 7 % Umsatz nach 2 h), wobei nach 24 h 0,23 mM Ferulasäure ( $23 \mu\text{M}/\text{OD}_{600}$ ) nachweisbar waren. Auch hier erfolgte kein vollständiger Umsatz des Substrates (0,09 mM Kaffeesäure nach 24 h, 73 % Umsatz). Auch in Bild D ist erkennbar, dass Sinapinsäure aus 5-Hydroxyferulasäure gebildet wurden, jedoch ist auch hier durch die Instabilität des Substrates nur eine qualitative Aussage zur 5-Methylierungsaktivität möglich ist. Des Weiteren fällt auf, dass nach 24 h keine Sinapinsäure mehr nachweisbar war. Da jedoch nach 20 h Sinapinsäure detektiert wurde, kann man mutmaßen, dass es sich hierbei um einen Messfehler handelt. Die *LpCOMT* (Bild E) zeigt eine relativ geringe Ferulasäure-Bildung (0,08 mM nach 28 h), was vermutlich an der geringen Proteinüberproduktion liegt. In Bild F ist kein Umsatz von 5-Hydroxyferulasäure erkennbar.

Da es sich bei 5-Hydroxyferulasäure um ein instabiles Substrat handelt kann man rein qualitativ nachweisen, dass *McPFOMT* und *MsCOMT* eine 5-Methylierungsaktivität aufweisen, wodurch beide Enzyme für die Sinapinsäure-Produktion in Frage kommen. Aufgrund der relativ schlechten Expression und dem damit verbundenen schlechten Umsatz kommt die *LpCOMT* ohne weitere Optimierung nicht für die Biosynthese von Ferula- oder Sinapinsäure in Frage. Obwohl die *MsCOMT* einen höheren Umsatz von Kaffeesäure nach 24 h als die *McPFOMT* zeigt, ist der Umsatz von Kaffeesäure nach 2 h durch die *McPFOMT* höher. Da auch die enzymkinetischen Parameter eher für die Verwendung der *McPFOMT* sprechen (Tab. 1.1, S. 17) wurde entschieden, dass ein Austausch der PFOMT im Konstrukt FA2 nicht nötig ist. Auch für die Biosynthese von Sinapinsäure muss die PFOMT nicht ausgetauscht werden, da sie eine Aktivität gegenüber 5-Hydroxyferulasäure zeigt.



**Abb. 3.9: In vivo Aktivitätstest OMTs (Zugabe 0,5 mM Kaffee-/5-Hydroxyferulasäure)**

Die Kultivierung erfolgte mit transformierten BL21(DE3)Gold-Zellen in Minimalmedium bei 37 °C unter Schütteln. Untersucht wurden die OMTs aus *M. crystallinum* (McPFOMT) (A, B), *M. sativa* (MsCOMT) (C, D) und *L. perenne* (LpCOMT) (E, F). Bei Induktion wurden 0,5 mM Kaffeesäure (A, C, E) und 0,5 mM 5-Hydroxyferulasäure (B, D, F) hinzugegeben. Die Proben zwischen 0 h und 24 bzw. 28 h wurden analysiert. Zeit [h] vs. Konzentration [mM] (linke y-Achse) und OD<sub>600</sub> (rechte y-Achse) ist dargestellt. Rot: Kaffeesäure, Blau: Ferulasäure, Magenta: 5-Hydroxyferulasäure, Grün: Sinapinsäure.

### 3.1.4 *In vitro* Charakterisierung der Reaktionskaskade

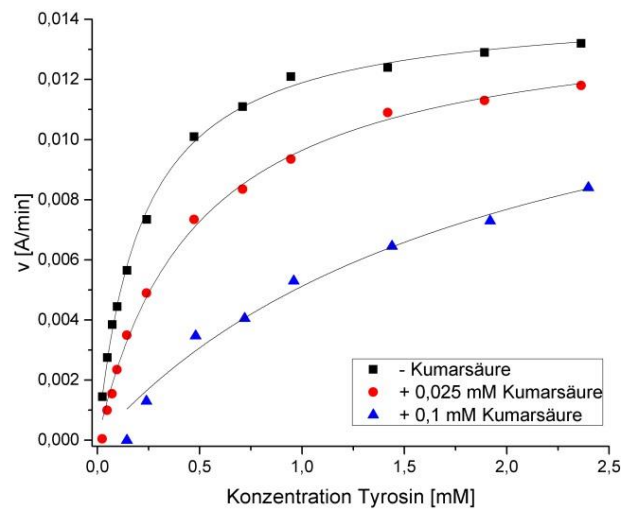
Nachdem geeignete Enzyme für die Biosynthesekaskade zur Biosynthese von Ferulasäure identifiziert worden waren, sollten Untersuchungen zu enzymkinetischen Parametern der Enzyme und damit zur Charakterisierung der Kaskade durchgeführt werden. Diese Daten sollten Hinweise auf das mögliche Zusammenspiel der einzelnen Enzyme in der Reaktionskaskade geben und möglicherweise zu erwartende *Bottlenecks* identifizieren. Die *in vivo* untersuchte vermeintliche Eignung der einzelnen Enzyme kann sich aufgrund dieses Zusammenspiels in der Reaktionskaskade auch als falsch erweisen und kann anhand von kinetischen Parametern bewertet werden. Die Einzelreaktionen der RgTAL-FLAG und der EcHpaBC wurden im Zellextrakt untersucht. Zusätzlich wurde die Einzelreaktion der PaHpaBC im Zellextrakt untersucht. Die Gründe für die Untersuchungen im Zellextrakt waren zum einen die erschwerte Reinigung der nativ produzierten Hydroxylasen bzw. das Fehlen von typischen Reinigungs-*tags* (TAL). Zum anderen kommt im Falle der Hydroxylasen erschwerend hinzu, dass die jeweilige HpaC nicht erkennbar überproduziert wurde und damit die Reinigung sehr aufwendig werden würde. Da die Reinigung der Zielproteine nicht im Fokus dieser Arbeit lag, wurde entschieden, dass eine Bestimmung der apparenten enzymkinetischen Parameter aus dem Zellextrakt ausreichend ist und durch entsprechende Kontrollreaktionen abgesichert werden sollte. Die Reaktion der McPFOMT wurde aufgrund der Abhängigkeit der Reaktion vom instabilen Cosubstrat SAM, sowie der bereits vorhandenen Daten zu dieser Reaktion (Tab. 1.1, S. 17), nicht untersucht. Anhand der jeweiligen ermittelten Progresskurven wurden die Anstiege für die Erstellung einer v/S-Charakteristik bestimmt (siehe 2.2.3.4, 2.2.3.5, 2.2.3.6, S. 40). Aus dieser wurden dann mittels Michaelis-Menten-Kinetik die Parameter  $V_{\max}$  und  $K_M$  bestimmt. Mittels  $V_{\max}$  wurde zudem der  $k_{\text{cat}}$  ermittelt.

#### 3.1.4.1 Kinetische Charakterisierung der RgTAL-FLAG

Für die Bestimmung der enzymkinetischen Parameter der TAL im Zellextrakt wurde eine kontinuierliche Aktivitätsmessung für die Reaktion der TAL (Abb. 1.5, S. 8) durchgeführt. Dafür wurden zunächst mit pET28a\_RgTAL-FLAG transformierte *E. coli* BL21(DE3)Gold angezogen (TB Medium), die Expression der RgTAL-FLAG induziert und nach 4 h bei 37 °C geerntet. Die Herstellung des Zellextraktes und die Bestimmung der Proteinkonzentration von RgTAL-FLAG sind in Kapitel 2.2.3.4 und 2.2.3.5 (S. 40) beschrieben. Die Klonierung, Herstellung der Biomasse, sowie die Herstellung der Zellextraktes wurde von Jessica Li im Rahmen ihres Forschungsgruppenpraktikums durchgeführt. Zur Ermittlung der Progresskurven wurde das RgTAL-FLAG enthaltene Zellextrakt für die Reaktion mit Tyrosin als Substrat eingesetzt. Dabei wurde die Bildung des Produktes Kumarsäure bei 310 nm verfolgt (siehe 2.2.3.6, S. 40). Die Anstiege der Progresskurven (Anhang Abb. 10.3, S. 125) wurden gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Diese v/S-Charakteristik ist in Abb.



3.10 dargestellt. Die Anpassung nach Michaelis-Menten-Kinetik erbrachte für das Substrat Tyrosin einen  $K_{M,app}=216 \pm 7 \mu\text{M}$ . Unter Berücksichtigung des  $V_{max}=0,94 \pm 0,009 \mu\text{M}/\text{min}$  und der eingesetzten Enzymmenge ( $0,73 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) ergab sich außerdem ein  $k_{cat}=0,9 \text{ s}^{-1}$ . Aufgrund der bereits bekannten kompetitiven Produkthemmung [Sariaslani, 2007] wurden die Reaktionen zusätzlich mit zwei unterschiedlichen Produktkonzentrationen durchgeführt. Diese zeigten eine starke kompetitive Produkthemmung mit einem nach Anpassung bestimmten  $K_i$  von  $20 \pm 3,6$  bzw.  $12 \pm 3,2 \mu\text{M}$  ( $25 \mu\text{M}$  bzw.  $100 \mu\text{M}$  Inhibitor). Gemittelt entspricht dies einem  $K_i=16 \mu\text{M}$  für Kumarsäure. Die enzymkinetischen Parameter sind in Tab. 3.1 zusammengefasst.



**Abb. 3.10: v/S-Charakteristika von RgTAL-FLAG (+/- Inhibitor)**

Dargestellt sind die v/S-Charakteristika der RgTAL-FLAG für das Substrat Tyrosin. Die Anstiege (v) der Progresskurven (Dreifachbestimmung, kontinuierlich) wurden mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen (S) ermittelt. Schwarz: ohne Zugabe von Kumarsäure, Rot: In Gegenwart von 0,025 mM Kumarsäure, Blau: In Gegenwart von 0,1 mM Kumarsäure. Die Daten ohne Kumarsäure (Schwarz) wurden mittels Michaelis-Menten-Gleichung angepasst. Die Daten mit Kumarsäure wurden unter Einbeziehung einer kompetitiven Hemmung angepasst. Die Anpassungen erfolgten mit der Software Origin 2016G.

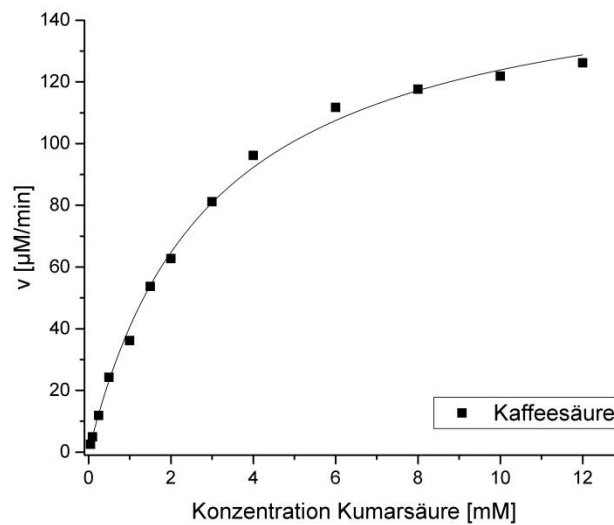
**Tab. 3.1: Ermittelte kinetischen Parameter der RgTAL-FLAG**

Zusammengefasst sind die Anpassungen und die daraus resultierenden Parameter der Datenreihen für 0 mM, 0,025 mM und 0,1 mM Kumarsäure. Mittels Michaelis-Menten-Gleichung wurde der  $K_M$  ermittelt, dieser wurde für die Anpassung der kompetitiven Hemmung festgesetzt. Der  $I_c$  entspricht der Inhibitor-Konzentration und somit der zugegebenen Kumarsäure-Konzentration. Aus dieser Anpassung ergibt sich der  $K_i$ . Anhand des  $V_{max}$  wurde der  $k_{cat}$  bestimmt.

Datenreihe	0 mM Kumarsäure	0,025 mM Kumarsäure	0,1 mM Kumarsäure
Modell	Michaelis Menten	Kompetitive Hemmung	
Gleichung	$v = \frac{V_{max} \times [S]}{K_M + [S]}$	$v = \frac{V_{max} \times [S]}{K_M \left(1 + \frac{I_c}{K_i}\right) + [S]}$	
$V_{max}$ [ $\mu\text{M}/\text{min}$ ]	$0,94 \pm 0,009$	$0,93 \pm 0,03$	$1,0 \pm 0,13$
$K_{M,app}$ [mM]	$0,216 \pm 0,007$		
$K_i$ [mM]	-	$0,02 \pm 0,004$	$0,012 \pm 0,003$
$k_{cat}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	0,9	-	-

### 3.1.4.2 Kinetische Charakterisierung der *EcHpaBC*

Die Untersuchung der *in vitro* Reaktion der *EcHpaBC* im Zellextrakt wurde von Jessica Li im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt. Dafür wurden zunächst mit pET28a\_ *EcHpaBC* transformierte *E. coli* BL21  $\Delta\text{tyrR}$  angezogen (TB Medium), die Expression der *EcHpaBC* induziert und nach 2 h bei 37 °C geerntet. Die Herstellung des Zellextraktes und die Bestimmung der Proteinkonzentration von *EcHpaBC* sind in Kapitel 2.2.3.4 und 2.2.3.5 (S. 40) beschrieben. Für die Bestimmung der enzymkinetischen Parameter wurde eine diskontinuierliche Aktivitätsmessung für die Reaktion der *HpaBC* (Abb. 1.9, S. 11) durchgeführt. Dabei wurde die Bildung der Kaffeesäure mittels HPLC-Analytik verfolgt. Die Anstiege der Progresskurven (Anhang Abb. 10.4, S. 125) wurden gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Diese  $v/S$ -Charakteristik der *EcHpaB* für das Substrat Kumarsäure ist in Abb. 3.11 dargestellt. Die Anpassung nach Michaelis-Menten-Kinetik ergab für das Substrat Kumarsäure einen  $K_{M,app}=3,0 \pm 0,17$  mM (*HpaB*). Unter Berücksichtigung des  $V_{max}=161 \pm 3,43$   $\mu\text{M}/\text{min}$  und der eingesetzten Enzymmenge (84  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ergab sich ein  $k_{cat}=1,9$   $\text{s}^{-1}$ . Eine Produkthemmung war nicht zu beobachten.

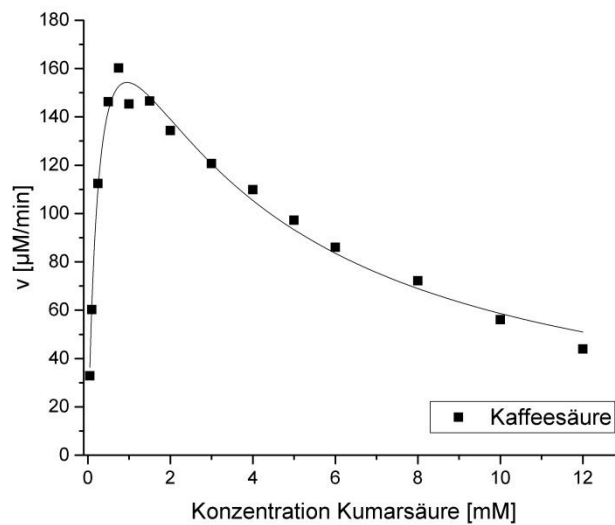


**Abb. 3.11: v/S-Charakteristik der EchHpaBC für das Substrat Kumarsäure**

Dargestellt ist die v/S-Charakteristik der EchHpaBC für das Substrat Kumarsäure. Die Anstiege (v) der Progresskurven (Einfachbestimmung, Vier Zeitpunkte, diskontinuierlich, HPLC) wurden mit unterschiedlichen Substrat Konzentrationen ermittelt. Die Daten wurden mittels Michaelis-Menten-Gleichung angepasst. Die Anpassungen erfolgten mit der Software Origin 2016G.

### 3.1.4.3 Kinetische Charakterisierung der PaHpaBC

Die Untersuchung der *in vitro* Reaktion der PaHpaBC wurde von Jessica Li im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt. Dafür wurden zunächst mit pET28a\_PaHpaBC transformierte *E. coli* BL21(DE3)Gold angezogen (TB Medium), die Expression der PaHpaBC induziert und nach 2 h bei 37 °C geerntet. Die Herstellung des Zellextraktes und die Bestimmung der Proteinkonzentration von PaHpaBC sind in Kapitel 2.2.3.4 und 2.2.3.5 (S. 40) beschrieben. Für die Bestimmung der enzymkinetischen Parameter wurde eine diskontinuierliche Aktivitätsmessung für die Reaktion der HpaBC (Abb. 1.9, S. 11) durchgeführt. Dabei wurde die Bildung der Kaffeesäure mittels HPLC-Analytik verfolgt. Die Anstiege der Progresskurven (Anhang Abb. 10.5, S. 126) wurden gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Diese v/S-Charakteristik ist in Abb. 3.12 dargestellt. Dabei zeigte sich, dass es sich um eine Substratüberschusshemmung handelt. Die Anpassung nach Michaelis-Menten-Kinetik unter Berücksichtigung der Substratüberschusshemmung ergab für das Substrat Kumarsäure einen  $K_{M,app}=0,3$  mM und  $K_i=3,1$  mM (HpaB). Unter Berücksichtigung des  $V_{max}=250$  µM/min und der eingesetzten Enzymmenge (0,2 mg/mL) ergab sich außerdem ein  $k_{cat}=1,2$  s<sup>-1</sup>. Diese Daten zeigen, dass die PaHpaBC eine deutlich höhere katalytische Effizienz für die Hydroxylierung der Kumarsäure als die EchHpaBC aufweist.



**Abb. 3.12: v/S-Charakteristik der PaHpaBC für das Substrat Kumarsäure**

Dargestellt ist die v/S-Charakteristik der PaHpaBC für das Substrat Kumarsäure. Die Anstiege (v) der Progresskurven (Einfachbestimmung, Vier Zeitpunkte, diskontinuierlich, HPLC) wurden mit unterschiedlichen Substrat Konzentrationen ermittelt. Die Daten wurden mittels Michaelis-Menten-Gleichung angepasst. Die Anpassungen erfolgten mit der Software Origin 2016G.

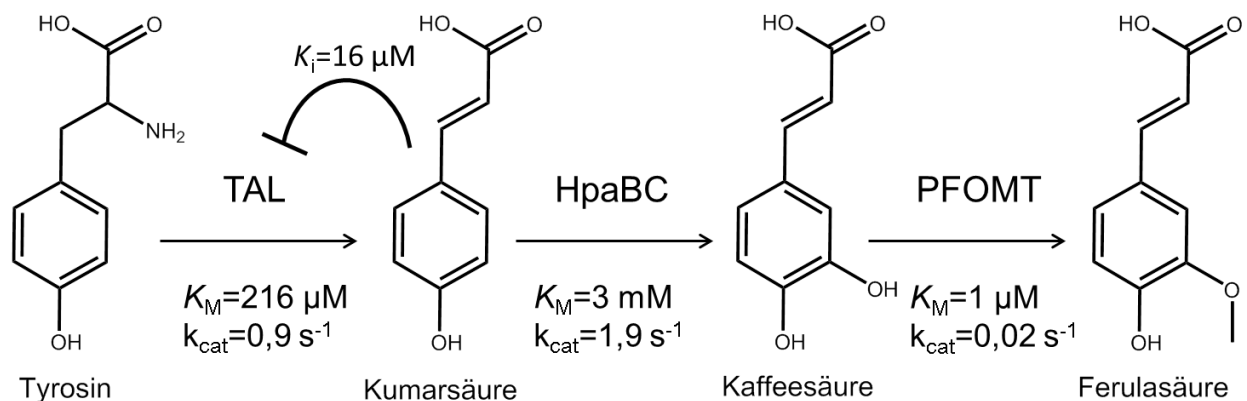
Die ermittelten kinetischen Parameter der an der Ferulasäure-Biosynthese beteiligten Enzyme RgTAL und EchHpaB, sowie die bekannten Kennzahlen für die McPFOMT erlauben nun den Stofffluss durch die Kaskade zu charakterisieren und gegebenenfalls Anpassungen der Expressionskonstrukte abzuleiten. Wenn man die ermittelten enzymkinetischen Parameter (TAL:  $K_{M,app}=216 \mu\text{M}$ ,  $k_{cat}=0,9 \text{ s}^{-1}$ ,  $K_i(\text{Kumarsäure})=16 \mu\text{M}$ ; EchHpaB:  $K_{M,app}=3 \text{ mM}$ ,  $k_{cat}=1,9 \text{ s}^{-1}$ ) sowie die Literaturwerte (PFOMT:  $K_M=1 \mu\text{M}$ ,  $k_{cat}=0,02 \text{ s}^{-1}$ ) nun im Kontext der gesamten Kaskade betrachtet, erkennt man, dass der theoretische Fluss der Reaktion inhibiert ist (Abb. 3.13). Die Kombination der Produkthemmung der Kumarsäure auf die TAL und dem relativ hohen  $K_M$ -Wert der HpaBC in der Folgereaktion gegenüber Kumarsäure zeigt ein mögliches *Bottleneck* auf.

Sollten die Enzyme ähnlich stark exprimiert werden, würde der Stofffluss (und damit die Produktivität) durch das Enzym mit dem kleinsten  $k_{cat}$  limitiert werden (PFOMT) und das Substrat akkumulieren (Kaffeensäure). Enzyme arbeiten allerdings nur effektiv nahe der Substratsättigung. Für die HpaB ist das erst bei Konzentrationen über 3 mM Kumarsäure der Fall ( $K_M=3 \text{ mM}$ ). Diese Konzentration wird aber vermutlich nie erreicht, weil Kumarsäure die Aktivität der TAL erheblich inhibiert ( $K_i=16 \mu\text{M}$ ). Es ist also davon auszugehen, dass die Kaskade deutlich unter der theoretisch maximalen Leistung liegen wird. Dabei wird die intrazelluläre Konzentration der Kumarsäure sich auf eine kritische Konzentration einpegeln, die zu hoch ist um die TAL Reaktion nicht zu inhibieren und zugleich zu niedrig ist um die HpaB zu sättigen. Es folgt daraus, dass die Kaskade dann besonders effektiv sein wird, wenn die HpaB die Kumarsäure-Konzentration möglichst niedrig hält. Dies ist möglich durch

Erhöhung der Enzym-Konzentration oder einen niedrigeren  $K_M$ -Wert der HpaB für Kumarsäure.

Die in Kapitel 3.1.1 (S. 43 ff.) dargestellten Expressionstests der Expressionskonstrukte FA1 und FA2 (Abb. 3.3) zeigen eine deutliche Überproduktion der TAL und HpaB und keine Überproduktion der PFOMT. Daher stellt sich nun die Frage, ob die PFOMT-Konzentration nach Expression ausreichend ist um den Stofffluss durch die Kaskade nicht zu limitieren. Dies würde man an einer starken Akkumulation von Kaffeesäure erkennen. Ob sich diese Hypothese auch in der *in vivo* ablaufenden Reaktionskaskade widerspiegelt, sollte im weiteren Verlauf untersucht werden.

Eine Nebenreaktion der Kaskade stellt die Bildung von DOPA dar (Abb. 1.14, S. 20). Dabei wird zunächst Tyrosin durch die HpaBC hydroxyliert jedoch anschließend wieder durch die TAL desaminiert, wodurch Kaffeesäure entsteht. Die Affinität der RgTAL für DOPA wurde in der vorliegenden Arbeit mit einem  $K_{M,app}=1,2$  mM ( $k_{cat}=1,2$  s<sup>-1</sup>) bestimmt (Daten nicht gezeigt). Die Affinität der HpaB gegenüber Tyrosin wurde nicht bestimmt, weshalb eine Aussage über das Ausmaß der Nebenreaktion nicht möglich ist. Da jedoch die Affinität der TAL gegenüber Tyrosin ( $K_{M,app}=216$  μM) deutlich höher ist als gegenüber DOPA, wird in Anwesenheit von Tyrosin DOPA nicht weiter umgewandelt. Da DOPA instabil ist kann man davon ausgehen, dass die Rate mit der HpaB Tyrosin hydroxyliert gleich der Rate ist mit der dieser Nebenweg den Tyrosin-Pool und damit die Ausbeute der Reaktionskaskade schmälert.



**Abb. 3.13: Biotechnologische Reaktionskaskade von Tyrosin zu Ferulasäure**

Darstellung des Syntheseprozesses von Ferulasäure mit den drei Teilschritten von Tyrosin über Kumarsäure und Kaffeesäure zum Produkt. Eingefügt sind die ermittelten enzymkinetischen Parametern (RgTAL, EcHpaBC) bzw. die Literaturwerte der PFOMT.

### 3.1.5 *In vivo* Untersuchung der Reaktionskaskade

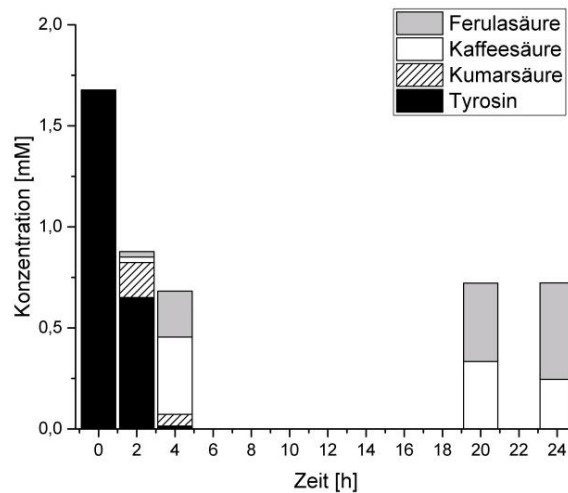
Nachdem die Expression der Zielgene und eine erste Aktivität der Enzyme sicher gestellt, sowie die kinetischen Parameter der *RgTAL* und *EcHpaB* ermittelt worden waren und sich daraus Hinweise auf einen möglichen Engpass im Stofffluss ergaben, wurde der Einfluss der Substratkonzentration auf den *in vivo* Umsatz der Reaktionskaskade untersucht. Dafür wurden mit FA2 transformierte BL21(DE3)Gold pLysT Zellen in Minimalmedium angezogen und zum Induktionszeitpunkt (ca.  $OD_{600}=0,6-0,8$ ) Tyrosin zugegeben (siehe 2.2.2.1, S. 36). Die Konzentration von Tyrosin, Kumar-, Kaffee- und Ferulasäure im Überstand wurde nach Extraktion (siehe 2.2.4.1, S. 41) mittels HPLC-Analytik (siehe 2.2.4.2, 2.2.4.3 S. 42) bestimmt. Eine Zusammenfassung aller Schüttelkolben-Versuche ist im Anhang tabellarisch aufgeführt (Tab. 10.1, S. 134).

Im vorherig gezeigtem Ergebnis der *in vivo* Aktivität der Reaktionskaskade (Abb. 3.5 Bild B, S. 49) konnten durch Zugabe von 0,5 mM Tyrosin 0,36 mM Ferulasäure (72 %) mit geringer Akkumulation von 0,008 mM Kaffeesäure (2 %) innerhalb von 24 h gebildet werden. Im nachfolgend dargestellten Ergebnis wurde die Tyrosin-Konzentration auf 2 mM erhöht (Abb. 3.14). Nach 24 h konnte nur eine leichte Steigerung der Ferulasäure-Produktion (0,48 mM, 24 %) und eine stärkere Akkumulation von 0,25 mM Kaffeesäure (19 %) im Vergleich zur Zugabe von 0,5 mM Tyrosin (Abb. 3.5 Bild B, S. 49) nachweisen (Abb. 3.14). Eine Akkumulation von Kumarsäure ist nach 24 h nicht sichtbar. Wenn man den prozentualen Gesamtumsatz betrachtet (0,5 mM Tyrosin: 74 %, 2 mM Tyrosin: 43 %) fällt auf, dass sich dieser bei Steigerung der Substratkonzentration deutlich verschlechtert. Wenn also eine Erhöhung der Substratkonzentration nicht zu einer Erhöhung der Produktkonzentration führt, deutet das darauf hin, dass ein Enzym oder die Enzymkaskade nahe ihrer maximalen Aktivität ist.

Nach 2 h Reaktion konnte eine Akkumulation von Kumarsäure nachgewiesen werden, was auf einen eingeschränkten Stofffluss zwischen TAL und HpaBC deutet, was auch die enzymkinetischen Parameter vermuten lassen. Auch die rasche Abnahme der Tyrosin-Konzentration im Medium ohne eine entsprechende Zunahme der gewünschten Intermediate lässt vermuten, dass die TAL bereits stark inhibiert ist, wodurch es zu Konkurrenz-Reaktionen wie der Abbau über TyrB und AspC kommt [Gelfand und Steinberg, 1977; Mavrides und Orr, 1975] (Abb. 1.14, S. 20). Eine Steigerung der Tyrosin-Zugabe würde damit kaum zu einer Steigerung der Ferulasäure-Produktion führen, sondern eher zum weiteren Abbau und Nutzung als Stickstoffquelle.

Die späteren Zeitpunkte der Reaktion akkumulieren jedoch insbesondere Kaffeesäure, was wiederum auf den Engpass bei der Methylierung (PFOMT) hindeutet. Ob die Limitierung auf die gering konzentrierte langsame PFOMT oder auf die unzureichende Regeneration des

Cosubstrates SAM (siehe Abb. 1.16, S. 23) zurückzuführen ist, sollte durch Zugabe der SAM-Vorstufe Methionin und dessen Vorläufer Serin getestet werden.



**Abb. 3.14: *In vivo* Umsatz FA2 BL21(DE3)Gold pLysT (Zugabe 2 mM Tyrosin)**

Die Kultivierung erfolgte mit transformierten BL21(DE3)Gold pLysT-Zellen in Minimalmedium bei 37 °C unter Schütteln. Bei Induktion wurden 2 mM Tyrosin hinzugegeben. Die Proben 0 h, 2 h, 4 h, 20 h und 24 h wurden analysiert. Zeit [h] vs. Konzentration [mM] ist dargestellt. Schwarz: Tyrosin, Schraffiert: Kumarsäure, Weiß: Kaffeesäure, Grau: Ferulasäure.

### 3.1.5.1 Untersuchungen zur *Bottleneck*-Identifizierung durch Zugabe von Methionin und Serin

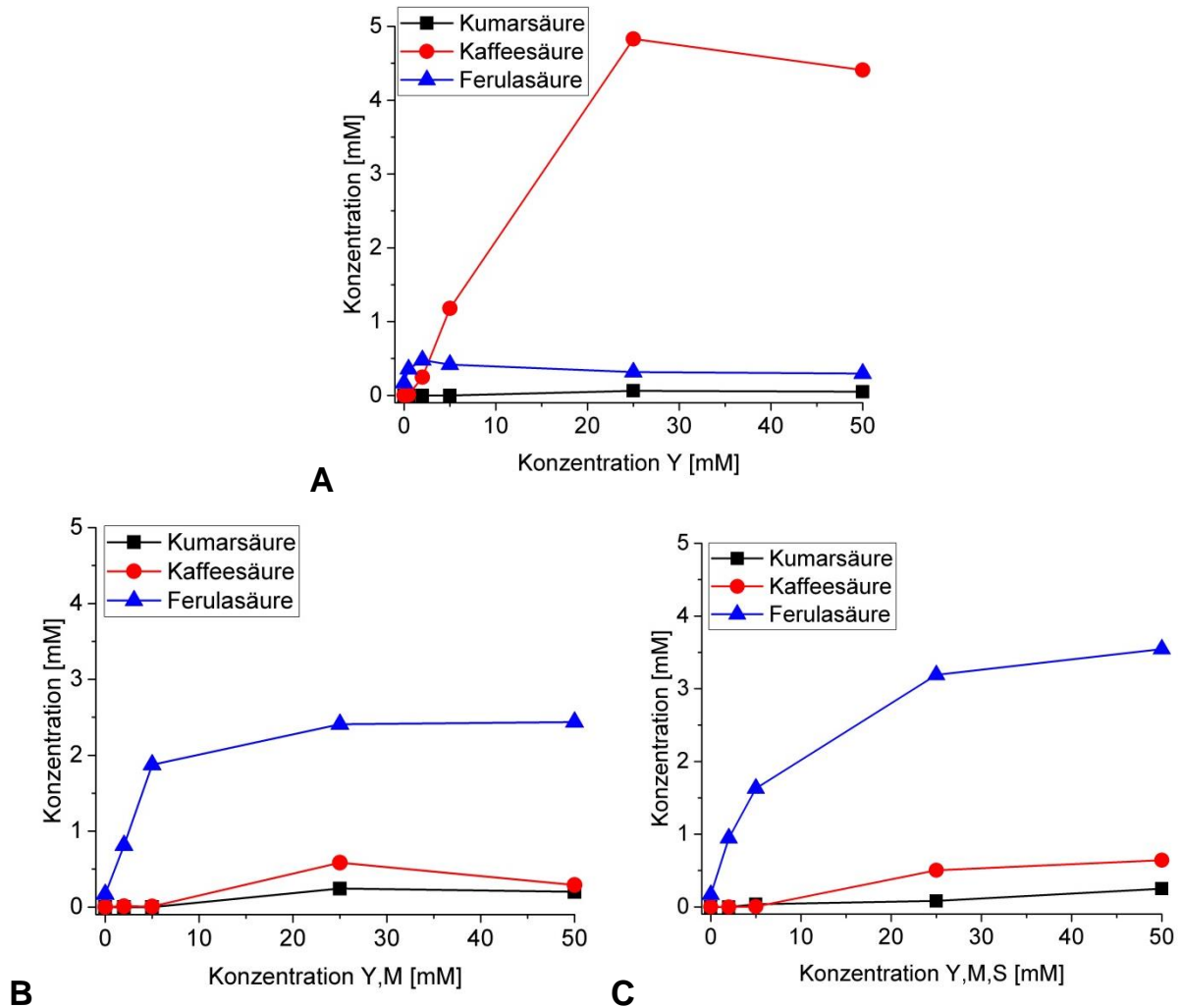
Inwiefern die Limitierung der Reaktionskaskade auf die Aktivität der PFOMT oder der Bereitstellung des Cosubstrates SAM zurückzuführen ist, sollte durch Zugabe von Methionin und Serin als Vorläufer der SAM-Synthese untersucht werden. Dafür wurden die Konzentrationen von Kumar-, Kaffee- und Ferulasäure 24 h nach Zugabe von Tyrosin (0–50 mM), Tyrosin und Methionin (je 0–50 mM) und Tyrosin, Methionin und Serin (je 0–50 mM) bestimmt. Die Schüttelkolben-Experimente (FA2 transformierte BL21(DE3)Gold pLysT) und die Analytik wurden wie in Kapitel 2.2.2.1 (S. 36), 2.2.4.1 und 2.2.4.2 (S. 42) beschrieben durchgeführt. In Bild A ist die Produkt- und Intermediat-Konzentration mit Tyrosin, in Bild B mit Tyrosin und Methionin und in Bild C mit Tyrosin, Methionin und Serin gezeigt (Abb. 3.15). In Bild A kann man erkennen, dass bereits bei 2 mM Tyrosin die Sättigung der Biosynthesekaskade erreicht ist und eine weitere Steigerung der Konzentration an Tyrosin nicht zur weiteren Steigerung der Ferulasäure-Konzentration führt (maximal 0,5 mM). Kumarsäure akkumuliert sich auch bei 50 mM Substrat kaum, was darauf hindeutet, dass die Hydroxylase kein *Bottleneck* darstellt. Dahingegen steigt die Kaffeesäure-Konzentration mit steigender Substratkonzentration, wobei bei 25 mM Substrat das Maximum von 4,8 mM erreicht ist und bei 50 mM Substrat etwas weniger Kaffeesäure nachweisbar ist. Bei diesen Experimenten ist zu berücksichtigen, dass Tyrosin eine Löslichkeitsgrenze von ca. 3 mM in Minimalmedium aufweist und sich dadurch bei 25 und 50 mM auch nach 24 h unlösliches Tyrosin im Medium befand (optisch erkennbar), wodurch die gelöste Tyrosin-Menge

vermutlich vergleichbar ist. Da sich über den Zeitraum der Reaktion immer weiter Tyrosin nachlöst, kann man damit auch ausschließen, dass die Limitierung der Ferulasäure-Produktion durch eine Substratlimitierung auftritt. In Bild B ist die Reaktion mit Tyrosin und Methionin gezeigt. Hier ist eine annähernd 5-fache Steigerung an Ferulasäure-Konzentration erkennbar, wobei ein Maximum von 2,4 mM Ferulasäure erreicht wird. Eine leichte Akkumulation von Kumar- und Kaffeesäure ist ebenso nachweisbar. In Bild C ist die Biosynthese mit Tyrosin, Methionin und Serin gezeigt. Hier ist eine 7-fache Steigerung der Ferulasäure-Konzentration erkennbar. Maximal wurden 3,5 mM Ferulasäure gebildet, wobei auch hier eine leichte Akkumulation von Kumar- und Kaffeesäure nachweisbar ist. Die Zugabe von den Aminosäuren Methionin und Serin, die beide einen Methyl-donor enthalten, führt also zu einer 5-7-fachen Steigerung der Ferulasäure-Konzentration nach 24 h Reaktion. Wenn die PFOMT-Konzentration die Limitierung in der Biosynthesekaskade darstellen würde, würde die Zugabe dieser Aminosäuren keinen so deutlichen Einfluss auf die Biosyntheseleistung haben. Da die Reaktion der PFOMT vom Cosubstrat SAM abhängig ist, welches wiederum direkt durch Methionin und damit auch indirekt über Serin regeneriert wird, muss die Regeneration von SAM für die Limitierung in Anwesenheit von Tyrosin im Vergleich zu Tyrosin und Methionin oder Serin verantwortlich sein.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass im Schüttelkolben durch die Verwendung des Konstruktes FA2 in BL21(DE3)Gold pLysT eine Konzentration von maximal 3,5 mM Ferulasäure ( $OD_{600}=10$ , 100 mL Maßstab) innerhalb von 24 h durch Zugabe von Tyrosin, Methionin und Serin erreicht werden konnte. Eine weitere Steigerung im Rahmen eines Schüttelkolben-Experimentes ist eher nicht zu erwarten, da hier die Biomassemenge und damit der Biokatalysator begrenzt sind.

Diese Experimente haben gezeigt, dass entgegen des *in vitro* ermittelten Stoffflusses (siehe Abb. 3.13, S. 61) und der erwarteten Engpässe, sich *in vivo* eine andere Hauptlimitierung ergab. Diese hängen dabei eher mit der metabolischen Regenerationsfähigkeit der Zellen zusammen, als mit der Biosynthesekaskade selber. Diese Erkenntnisse sind essentiell für die weitere Optimierung der Ferulasäure-Produktion und die Übertragung in ein Bioreaktorsystem unter kontrollierten Bedingungen (pH, Temperatur,  $O_2$ -Sättigung), wo eine weitere Steigerung bei Beachtung der in den Schüttelkolbenexperimenten gewonnenen Erkenntnisse möglich ist (Kapitel 3.3, S. 72 ff.).





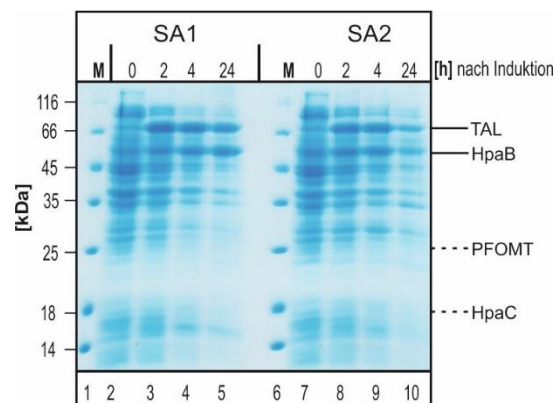
**Abb. 3.15: *In vivo* Umsatz FA2 Zugabe von Tyrosin, Methionin, Serin (0-50 mM)**

Die Kultivierung erfolgte mit transformierten BL21(DE3)Gold pLysT-Zellen in Minimalmedium bei 37 °C unter Schütteln. Bei Induktion wurden (A) Tyrosin (Y), (B) Tyrosin/Methionin (Y,M) und (C) Tyrosin/Methionin/Serin (Y,M,S) hinzugegeben. Die Proben nach 24 h wurden analysiert. Konzentration Substrat [mM] vs. Konzentration Produkte [mM] ist dargestellt. Schwarz: Kumarsäure, Rot: Kaffeesäure, Blau: Ferulasäure.

## 3.2 Biosynthese von Sinapinsäure durch rekombinante *E. coli*

Die Biosynthese von Sinapinsäure in rekombinanten *E. coli* Zellen erfolgt über Desaminierung des Tyrosins und zweifacher sequenzieller Hydroxylierung und Methylierung. Wie in der Einleitung (1.1.3.4, S. 14), Ergebnisteil Abschnitt 3.1.2 (S. 49) und 3.1.3 (S. 53) gezeigt, sind dafür die Hydroxylase HpaBC aus *P. aeruginosa* und die Methyltransferase PFOMT aus *M. crystallinum* (McPFOMT) geeignet. Ein weiteres geeignetes Enzym zur sequenziellen Hydroxylierung am Aromaten ist die *EcHpaBC* mit der Punktmutation Y301I (HpaB). Die 3- und 5-Hydroxylase-Aktivität wurde im Rahmen der Dissertation von Susann Herrmann gezeigt [Herrmann, 2018]. Die Information über diese Mutante wurde freundlicherweise vom Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie (AG Ludger Wessjohann,

Halle/Saale) zur Verfügung gestellt. Für die Biosynthese der Sinapinsäure wurde deshalb die Hydroxylase im Konstrukt FA2 gegen die *PaHpaBC* („SA1“) und *EcHpaBCY301I* („SA2“) ausgetauscht (siehe 2.2.1, S. 33). Zunächst wurde die Expression der Gene der Konstrukte SA1 (*RgTAL-FLAG/PaHpaBC/McPFOMT*) und SA2 (*RgTAL-FLAG/EcHpaB(Y301I)C/McPFOMT*) in BL21(DE3)Gold pLysT getestet. Dazu wurden die rekombinanten Zellen in Minimalmedium angezogen, die Expression induziert (siehe 2.2.2.1, S. 36) und die Zellen nach verschiedenen Zeitabständen mittels SDS-PAGE-Analyse auf eine Veränderung der Proteinzusammensetzung untersucht (siehe 2.2.3.1, S. 38). In der SDS-PAGE-Analyse (Abb. 3.16) kann man erkennen, dass bei beiden Zelllysaten Proteine die dem Molekulargewicht der TAL und HpaB entsprechen nach Induktion überproduziert werden (Spur 3-5, 8-10), wobei die Überproduktion der *PaHpaB* (SA1) nach 2 h Induktion etwas geringer ausgefallen ist (Spur 3). Eine Überproduktion der PFOMT und HpaC ist wie auch schon bei den Konstrukten FA1 und FA2 nicht erkennbar. Des Weiteren fällt auf, dass nach 24 h Induktion bei SA2 die Bandenintensität der TAL und HpaB scheinbar abnimmt (Spur 10), jedoch ist hier auch die Gesamtproteinmenge der jeweiligen Probe geringer, sodass dies nicht unbedingt eine Abnahme der Zielproteinkonzentration bedeuten muss. Insgesamt ist festzustellen, dass beide Konstrukte SA1 und SA2 mit den unterschiedlichen Hydroxylasen *PaHpaBC* und *EcHpaB(Y301I)C* eine vergleichbare Expression unter diesen Bedingungen aufweisen.



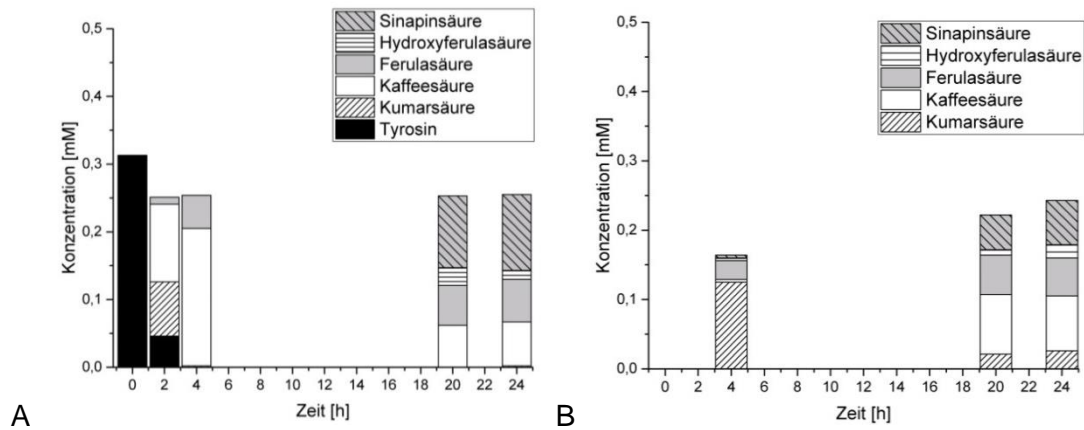
**Abb. 3.16: Expressionstest von SA1/SA2 transformierten BL21(DE3)Gold pLysT**

Die Kultivierung erfolgte mit transformierten BL21(DE3)Gold-Zellen in Minimalmedium bei 37 °C unter Schütteln. Nach Induktion mit IPTG wurden Proben nach 0 h, 2 h, 4 h und 24 h entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert. 1, 6: Molekulargewichtsmarker (M), 2-5: SA1, 7-10: SA2. Markiert ist das theoretische Molekulargewicht von TAL (76 kDa), HpaB (59 kDa), PFOMT (27 kDa) und HpaC (19 kDa).

Nachdem die Expression der rekombinanten Biosynthesegene überprüft worden war, sollte nun die Aktivität der Reaktionskaskade *in vivo* getestet werden (siehe 2.2.4, S. 41). Dafür wurde der Umsatz von Tyrosin im Schüttelkolben mit SA1 oder SA2 transformierten BL21(DE3)Gold pLysT verfolgt. Dazu wurden die transformierten Zellen im Schüttelkolben angezogen und zeitgleich zur Induktion ( $OD_{600}=0,6-0,8$ ) mit Tyrosin versetzt (siehe 2.2.2.1,

S. 36). Proben des Kulturüberstandes wurden in einem Zeitverlauf nach Extraktion (siehe 2.2.4.1, S. 41) mittels HPLC-Analytik (siehe 2.2.4.2, 2.2.4.3, S. 42) auf Tyrosin, Kumar-, Kaffee-, Ferula-, Hydroxyferula- und Sinapinsäure analysiert.

In Abb. 3.17 sind die Produkt- und Intermediat-Konzentrationen über die Zeit aufgetragen, wobei das Ergebnis von SA1 in Bild A und von SA2 in Bild B gezeigt ist. Die Biosynthese mittels Kaskade SA1 (Bild A) zeigt bereits nach 2 h eine starke Akkumulation von Kumar- und Kaffeesäure, sowie eine geringe Akkumulation von Ferulasäure. Nach 4 h ist bereits kein Tyrosin mehr im Überstand detektierbar. Außerdem ist nach 4 h zu erkennen, dass vor allem Kaffeesäure (0,2 mM) akkumulierte. Erst nach 20 h sind die Folgeprodukte 5-Hydroxyferula- (weiß-liniert) und Sinapinsäure (grau-schraffiert) nachweisbar. Eine Akkumulation von Kaffee- und Ferulasäure ist auch zu diesem Zeitpunkt erkennbar. Zwischen 20 h und 24 h ist eine Veränderung der Intermediat-Zusammensetzung kaum sichtbar. Nach 24 h wurden mit Hilfe der Kaskade SA1 im Produktionsstamm BL21(DE3)Gold pLysT 112  $\mu$ M Sinapinsäure synthetisiert. In Bild B ist die Biosynthese von Sinapinsäure mittels der Kaskade SA2 dargestellt. In diesem Experiment wurde keine Analytik von Tyrosin und der Probe nach 2 h durchgeführt. Nach 4 h sind eine deutliche Akkumulation von Kumarsäure erkennbar, sowie eine leichte Akkumulation von Ferula- und auch Sinapinsäure. Im Vergleich zur SA1 kann man hier bereits einen Unterschied in der Intermediat-Zusammensetzung sehen, der einen Hinweis auf die Unterschiede in der Substratpräferenz der Hydroxylasen *PaHpaBC* (SA1) und *EcHpaB(Y3011)C* (SA2) gibt. Nach 20 h ist eine Akkumulation von allen Intermediaten und des Produktes nachweisbar. Nach 24 h nimmt die Sinapinsäure Konzentration nochmals leicht zu. Es wurden mit Hilfe der Kaskade SA2 im Produktionsstamm BL21(DE3)Gold pLysT 64  $\mu$ M Sinapinsäure in 24 h synthetisiert. Aufgrund der längeren Reaktionskaskade bis zur Sinapinsäure im Vergleich zur Reaktionskaskade zur Ferulasäure kann man bei beiden Konstrukten SA1 und SA2 deutlich mehr Intermediate und einen schlechteren Gesamtumsatz (SA1: 22 %; SA2: 13 %) im Vergleich zur Ferulasäure-Produktion (74 %) erkennen. Trotz der längeren und damit metabolisch aufwendigeren Reaktionskaskade konnte damit bereits in den ersten Schüttelkolben-Versuchen eine Sinapinsäure-Produktion mit beiden Konstrukten nachgewiesen werden. Damit wurde auch bestätigt, dass sowohl die Hydroxylasen *PaHpaBC* und *EcHpaB(Y3011)C* als auch die *McPFOMT* eine 3- und 5-Hydroxylierung bzw. Methylierung katalysieren können. Da bei der Ferulasäure-Produktion bereits ein positiver Einfluss der Zugabe von Methionin und Serin gezeigt wurde, sollte dies auch für die Sinapinsäure-Produktion getestet werden.



**Abb. 3.17: *In vivo* Aktivitätstest SA1/SA2 BL21(DE3)Gold pLysT (Zugabe 0,5 mM Tyrosin)**

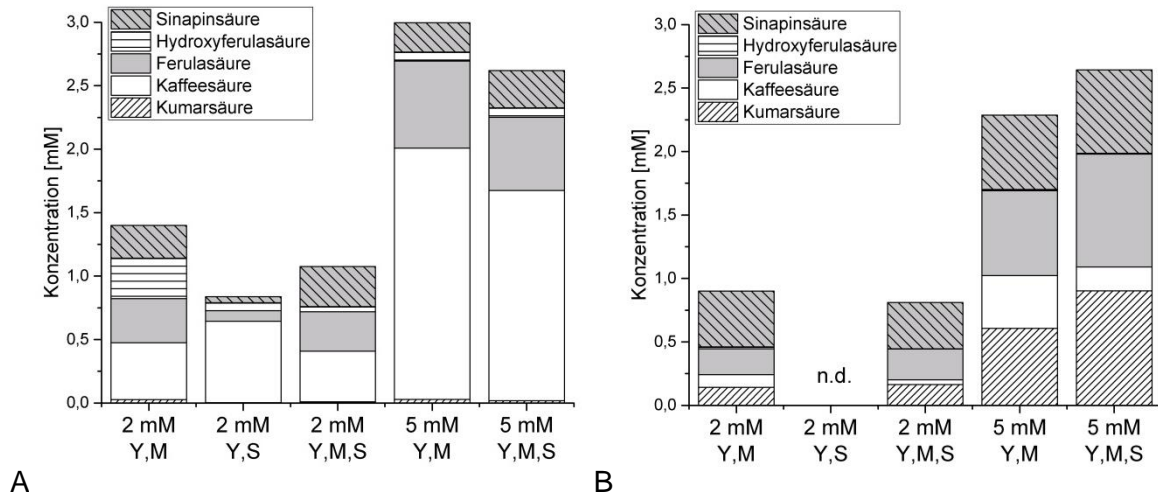
Die Kultivierung erfolgte mit transformierten BL21(DE3)Gold pLysT-Zellen in Minimalmedium bei 37 °C unter Schütteln. Bei Induktion der rekombinanten Gene durch IPTG wurden 0,5 mM Tyrosin hinzugegeben. **A:** SA1, **B:** SA2. Die Proben 0 h, 2 h, 4 h, 20 h und 24 h wurden bei SA1 (**A**) und 4 h, 20 h und 24 h bei SA2 (**B**) analysiert. Bei SA2 wurde die Tyrosin Konzentration nicht bestimmt. Zeit [h] vs. Konzentration [mM] ist dargestellt. Schwarz: Tyrosin, Weiß-Schraffiert: Kumarsäure, Weiß: Kaffeesäure, Grau: Ferulasäure, Weiß-Liniert: 5-Hydroxyferulasäure, Grau-Schraffiert: Sinapinsäure.

Im Laufe der Experimente zur Sinapinsäure-Produktion fiel auf, dass die Gesamtintermediat-Konzentration häufig mit der Zeit sank. Es wurde beschrieben, dass beispielsweise die Produktion von Kaffeesäure abgedunkelt durchgeführt wird [Zhang und Stephanopoulos, 2013], so dass dieser Einfluss auch in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde. Es wurde beobachtet, dass unter abgedunkelten Bedingungen (Schüttelkolben wurden mit Aluminiumfolie umwickelt) es zur Vermeidung der Abnahme der Intermediate führte (über 48 h getestet, Daten nicht gezeigt). Da ein solcher Effekt bei der Ferulasäure-Produktion nicht beobachtet wurde, kann man schlussfolgern, dass es sich dabei um eine licht-induziert Instabilität von 5-Hydroxyferula- oder Sinapinsäure handelt. Die nachfolgenden Experimente zur Sinapinsäure-Produktion wurden deshalb immer in abgedunkelten Schüttelkolben durchgeführt.

Die Steigerung des intrazellulären SAM-Pools durch Zugabe des SAM-Vorläufers Methionin und dessen Vorläufer Serin zur Verbesserung der Methylierungsreaktionen sollte auch bei der Sinapinsäure-Produktion untersucht werden. Dafür wurden 2 bzw. 5 mM Tyrosin mit äquimolarer Konzentration Methionin und/oder Serin bei der Kultivierung von SA1 (Bild A) und SA2 (Bild B) zugesetzt (Abb. 3.18). In Bild A ist die Konzentration der Intermediate mit dem Konstrukt SA1 dargestellt. Der Umsatz mit 2 mM Tyrosin und Methionin (Y,M) führte im Vergleich zum Umsatz mit 2 mM Tyrosin und Serin (Y,S) zu einer deutlich höheren Bildung von Sinapinsäure. Die Zugabe von 2 mM Tyrosin, Methionin und Serin (Y,M,S) resultierte jedoch in eine nochmals etwas höhere Sinapinsäure-Konzentration und eine deutlich geringere Akkumulation von 5-Hydroxyferulasäure, dem Substrat der zweiten Methylierung. Der Vergleich der Zugabe von 5 mM Tyrosin und Methionin (Y,M) mit der Zugabe von 5 mM Tyrosin, Methionin und Serin (Y,M,S) zeigt eine etwas niedrigere Sinapinsäure-Konzentration

als mit Serin, wobei auch die Kaffeesäure-Konzentration höher akkumuliert vorliegt. Insgesamt fällt auf, dass sich in allen Kultivierungen eine besonders hohe Kaffeesäure-Konzentration akkumuliert, die auch von der Zugabe der Methylendonoren nicht unterbunden werden konnte. Der Vorteil der zusätzlichen Serin-Zugabe scheint insgesamt nur marginal. Die höchste Sinapinsäure-Konzentration wurde in dieser Experimentereihe mit 2 mM Tyrosin, Methionin und Serin (Y,M,S) erzielt und lag bei 320  $\mu$ M. In Bild B ist die Konzentration der Intermediate mit dem Konstrukt SA2 dargestellt. Hier wurde die Zugabe von Tyrosin und Serin (Y,S) nicht weiter untersucht, da die Synthese mit SA1 bereits zeigte, dass Serin keinen zusätzlichen positiven Effekt auf die Produktbildung hat. Die Zugabe von 2 mM Tyrosin und Methionin (Y,M) ergibt eine sehr ähnliche Intermediat-Zusammensetzung im Vergleich zur Zugabe von 2 mM Tyrosin, Methionin und Serin (Y,M,S), wobei in diesem Fall die Synthese ohne Serin sogar zu einer höheren Sinapinsäure-Produktion führte. Auch die Zugabe von 5 mM Tyrosin und Methionin führte zu einer ähnlichen Intermediat-Zusammensetzung wie die Zugabe von zusätzlichem Serin. Insgesamt fällt auf, dass bei der Biosynthese mit SA2 insbesondere Kumarsäure akkumuliert wird, was auf eine geringere Substratspezifität für Kumarsäure, also der 3-Hydroxylierung, der *EcHpaB(Y301I)C* im Vergleich zur *PaHpaBC* (SA1) hindeutet. Auch in diesen Experimenten zeigte sich, dass die Serin-Zugabe nur einen geringen Einfluss auf die Sinapinsäure-Produktion hat. Dies zeigt, dass die mangelnde Regeneration von SAM nicht an einer unzureichenden Bereitstellung von C1-Einheiten liegt, sondern die SAM-Synthese aus Methionin und ATP (SAM-Synthetase) selbst limitierend ist.

Die höchste Sinapinsäure-Konzentration wurde in dieser Experimentereihe mit 5 mM Tyrosin, Methionin und Serin (Y,M,S) erzielt und lag bei 660  $\mu$ M. Damit zeigte sich hier, dass die SA2 mit der *EcHpaB(Y301I)C* die bessere Wahl für die Sinapinsäure-Produktion sein könnte. Vergleichend kann man sagen, dass sich ein deutlicher Unterschied in der Intermediat-Zusammensetzung und damit vermutlich auch in der Substratspezifität der beiden Hydroxylasen zeigt. Um dies näher zu analysieren wurde der Umsatz von Ferulasäure als Substrat getestet, um die zweite Hydroxylierung direkt beurteilen zu können. Dabei sollte sich in der Konzentration von 5-Hydroxyferula- und Sinapinsäure zeigen welche Hydroxylase eine höhere Substratspezifität gegenüber Ferulasäure aufweist.

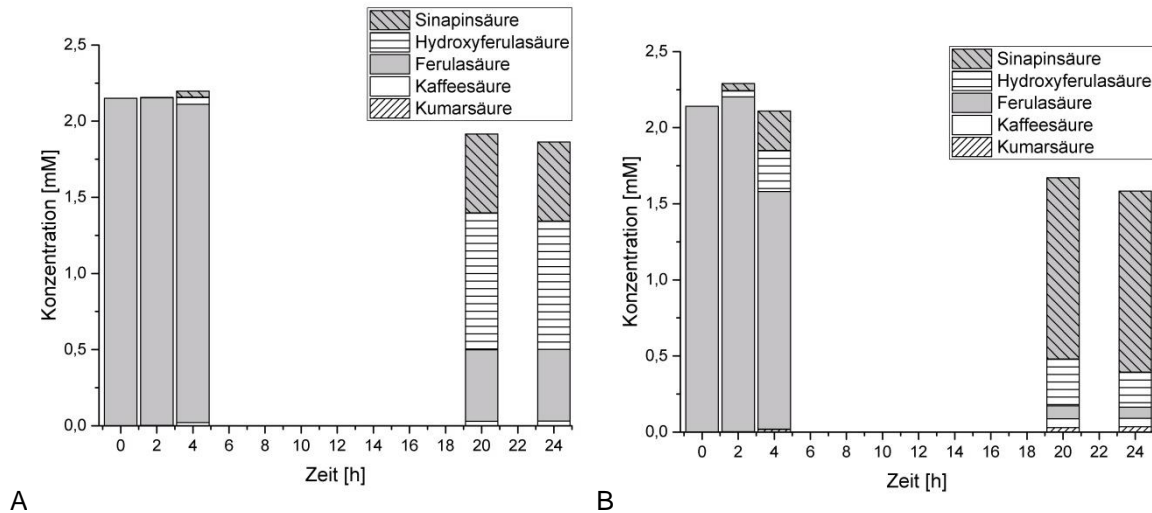


**Abb. 3.18: *In vivo* Umsatz von SA1/SA2 - Zugabe von Tyrosin, Methionin, Serin (2 bzw. 5 mM)**

Die Kultivierung erfolgte mit transformierten BL21(DE3)Gold pLysT-Zellen in Minimalmedium bei 37 °C unter Schütteln. **A:** SA1, **B:** SA2. Bei Induktion wurden 2 bzw. 5 mM Tyrosin (Y), Methionin (M) und/oder Serin (S) hinzugegeben. Die Proben nach 24 h wurden analysiert. Substratzugabe vs. Konzentration [mM] ist dargestellt. Weiß-Schraffiert: Kumarsäure, Weiß: Kaffeesäure, Grau: Ferulasäure, Weiß-Liniert: 5-Hydroxyferulasäure, Grau-Schraffiert: Sinapinsäure.

Um die Hydroxylierung in Position 5 näher zu untersuchen und damit eine Aussage über die Substratspezifität treffen zu können, wurden 2 mM Ferulasäure als Substrat und zusätzlich Methionin für die Reaktion von SA1 und SA2 eingesetzt. Methionin wurde bei diesen Versuchen mit zugegeben, um die der Hydroxylierung nachfolgenden Methylierung möglichst zu maximieren. Der Versuch ohne Methionin wurde ebenso durchgeführt, jedoch wurde hier nur ein geringer Unterschied in der Intermediatverteilung nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Diese Versuche wurden analog den bereits beschriebenen Schüttelkolben-Versuchen durchgeführt (siehe 2.2.4, S. 41). Die Intermediat-Konzentration über die Zeit ist in Abb. 3.19 dargestellt, wobei Bild A den Umsatz von Ferulasäure durch SA1 und Bild B den Umsatz von Ferulasäure durch SA2 zeigt. In Bild A ist zu erkennen, dass eine erste Umwandlung der Ferulasäure zu 5-Hydroxyferula- und Sinapinsäure nach 4 h beginnt und nach 20 bzw. 24 h ca. 75 % des Substrates umgesetzt wurden. Zum Großteil akkumuliert sich hierbei die 5-Hydroxyferulasäure (0,9 mM) und Sinapinsäure (0,52 mM). Aufgrund des unvollständigen Umsatzes der Ferulasäure kann man vermuten, dass die Hydroxylierung und auch die Methylierung (Akkumulation von 5-Hydroxyferulasäure) langsam ablaufen. In Bild B ist der Umsatz von Ferulasäure durch SA2 dargestellt. Hier ist bereits nach 2 h eine erste Umwandlung von Ferulasäure in 5-Hydroxyferula- und Sinapinsäure erkennbar. Nach 4 h akkumulieren sich bereits deutlich diese Folgeprodukte. Nach 20 bzw. 24 h wurde die eingesetzte Ferulasäure nahezu vollständig verbraucht. Als Negativkontrolle wurden *E. coli*-Zellen ohne Konstrukt mit 2 mM Ferulasäure für 48 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert, wobei es zu keiner Abnahme der Ferulasäure-Konzentration kam (Daten nicht gezeigt). Die Akkumulation von Kumar- und Kaffeesäure nach 20 bzw. 24 h lässt auf eine Reaktion der

Gesamtreaktionskaskade mit dem *E. coli*-eigenen intrazellulären Tyrosins schließen, da es sich bei der Hydroxylierung und Methylierung um irreversible Reaktionen handelt, wodurch die Kaffeesäure nicht aus der Ferulasäure gebildet werden kann. Bei der Reaktion des Konstruktes SA2 zeigt sich eine stärkere Akkumulation von Sinapinsäure (1,2 mM) und eine geringere 5-Hydroxyferulasäure Akkumulation (0,2 mM), was auf eine bessere 5-Hydroxylierung mit nachfolgender Methylierung im Vergleich zur SA1 hindeutet. Jedoch fällt in diesem Experiment auf, dass die Gesamtkonzentration nach 24 h nur 1,5 mM entspricht, wobei nicht abgeschätzt werden kann wie viel davon durch das *E. coli*-eigene Tyrosin nachproduziert wurde. Auch der Verlust zwischen 20 und 24 h ist auffällig, wobei dabei hauptsächlich die Konzentration an 5-Hydroxyferulasäure sinkt, was die Hypothese der Instabilität dieser Substanz weiter untermauert und die Intermediat-Konzentration der 5-Hydroxyferulasäure vermutlich immer unterschätzen lässt. Der Unterschied zwischen SA1 und SA2 könnte dabei auf die schlechtere 5-Hydroxyferulasäure-Produktion zurück zu führen sein. Dennoch zeigen diese Experimente im Zusammenhang mit den Tyrosin-Umsätzen, die eine unterschiedliche Intermediatverteilung zeigten, die Unterschiede in der Substratspezifität der Hydroxylasen. Die *P. aeruginosa* Variante (SA1) scheint eine höhere 3- als 5-Hydroxylase Aktivität aufzuweisen, was sich bei der Reaktion mit Tyrosin in der Akkumulation von Kaffeesäure und bei der Reaktion mit Ferulasäure in der schlechteren 5-Hydroxylierung zeigt. Die *E. coli* Mutationsvariante (SA2) scheint eine höhere 5- als 3-Hydroxylase Aktivität aufzuweisen, was sich bei der Reaktion mit Tyrosin in der Akkumulation von Kumarsäure und bei der Reaktion mit Ferulasäure in einer besseren 5-Hydroxylierung zeigt. Die hohe Spezifität der *PaHpaBC* gegenüber Kumarsäure deutete sich bereits in der *in vivo* Untersuchung der *PaHpaBC* an (siehe Abb. 3.7, S. 52), da hier sehr schnell Kumarsäure zu Kaffeesäure hydroxyliert wurde. Die *in vitro* Untersuchungen bestätigten, dass die *PaHpaBC* einen niedrigen  $K_M$ -Wert von 0,3 mM (Kumarsäure) aufweist (siehe 3.1.4.3, S. 59). Eine Zusammenstellung aller durchgeführten Schüttelkolben Experimente ist im Anhang in Tab. 10.2 (SA1) und Tab. 10.3 (SA2) dargestellt. Aufgrund der relativ ähnlichen Sinapinsäure-Ausbeute im Schüttelkolben (Abb. 3.18) sollte im Weiteren die Biosynthese im Bioreaktor mit beiden Konstrukten getestet werden.



**Abb. 3.19: *In vivo* Umsatz von SA1/SA2 – Zugabe von 2 mM Ferulasäure und Methionin**

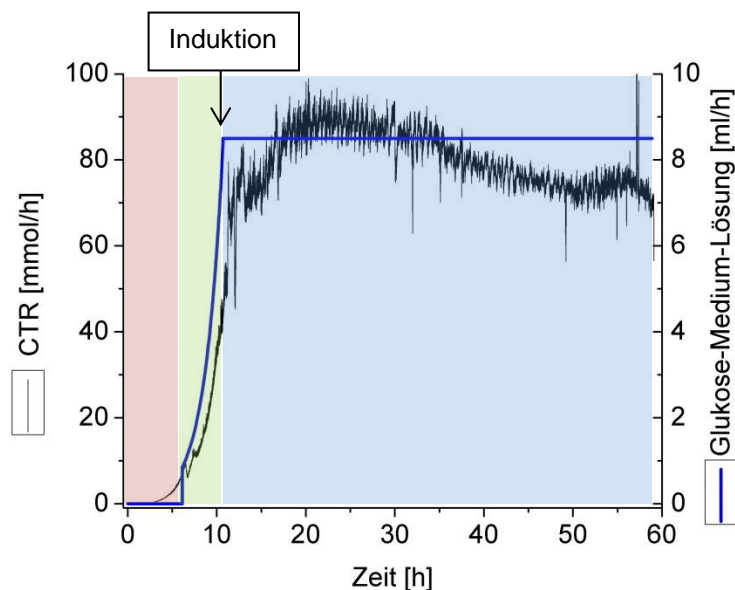
Die Kultivierung erfolgte mit transformierten BL21(DE3)Gold pLysT-Zellen in Minimalmedium bei 37 °C unter Schütteln. **A:** SA1, **B:** SA2. Bei Induktion wurden 2 mM Ferulasäure und Methionin hinzugegeben. Die Proben nach 0 h, 2 h, 4 h, 20 h und 24 h wurden analysiert. Zeit [h] vs. Konzentration [mM] ist dargestellt. Weiß-Schraffiert: Kumarsäure, Weiß: Kaffeesäure, Grau: Ferulasäure, Weiß-Liniert: 5-Hydroxyferulasäure, Grau-Schraffiert: Sinapinsäure.

### 3.3 Untersuchungen zur Produktion von Ferula- und Sinapinsäure im Bioreaktor

Nachdem die Synthese von Ferula- und Sinapinsäure im Schüttelkolben etabliert worden war und die Expression der rekombinanten Gene, Aktivität der Enzyme und der Transport der Intermediate nachgewiesen wurde, sollte die Produktion unter kontrollierten Bedingungen ( $T=37\text{ °C}$ ,  $\text{pH}=7$ ,  $\text{pO}_2=30\%$ ) untersucht werden. Dazu wurde ein Vierfach-Parallel-Bioreaktorsystem verwendet (siehe 2.2.2.2, S. 37). Aufgrund der Limitation in der Geschwindigkeit der Enzyme, gegeben durch die enzymkinetischen Parameter, wie die hohen  $K_M$ -Werte und der Inhibierung des Flusses in der Kaskade, sowie der Limitation der SAM-Konzentration, sollte ein Prozess entwickelt werden, der zum einen eine gute Expression und damit möglichst viel Biokatalysator und zum anderen eine langanhaltende Cosubstrat-Regeneration und Syntheszeit ermöglicht. Dafür wurde eine Fermentationsstrategie entwickelt die (1) durch Substratlimitierung im Minimalmedium eine genaue Biomasseführung erlaubt, (2) durch Laktose-Induktion des T7-Operon den zytotoxischen Effekt von IPTG umgeht und (3) durch Automatisierung der Prozessführung hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erlaubt. Der Prozess kann in drei Phasen eingeteilt werden. In Abb. 3.20 sind diese Phasen innerhalb des Diagramms der *carbon transfer rate* (CTR) und der Flussrate der Glukose-*feed*-Lösung über die Zeit dargestellt und farbig hinterlegt. Die erste Phase (rot) stellt dabei die *Batch*-Phase mit einer geringen vorgelegten Glukosemenge dar. Sie dient der initialen Anzucht der Biomasse bis die Online-Signale ( $\text{pO}_2$ ,



CTR) die Veränderungen im Bioreaktor sicher detektieren können. Sobald die Glukose im *Batch* verstoffwechselt ist, wurde die exponentielle Wachstumsphase (grün) durch exponentiellen *feed* der Glukose gestartet. Der Auslöser für die automatische Initiierung der zweiten Phase ist die Änderung der gelösten Sauerstoffkonzentration ( $pO_2$ ), ausgelöst durch den Verbrauch der *Batch*-Glukose. Die *feed*-Rate wird dabei so gewählt, dass die Zellen stets unter ihrer maximalen Wachstumsrate bleiben. Dies sichert den vollständigen Verbrauch der Glukose und erlaubt die Induktion der rekombinanten Gene mit Laktose. Die Länge der exponentiellen Phase bedingt maßgeblich die Biomasse mit der der Prozess bis zu Ende durchlaufen wird und muss dabei auch den Limitationen des Systems gerecht werden, wie z.B. maximales Zuflussvolumen und maximale Begasungsrate. Am Ende der exponentiellen Phase erfolgt die Induktion der Expression durch Zugabe des Induktors (IPTG oder Laktose) und gleichzeitige Veränderung der *feed*-Rate zu einem kontinuierlichen Fluss (blau). Die CTR zeigt dabei die metabolische Aktivität der Zellen an, da diese an der Änderung des  $CO_2$ -Signals über die Zeit berechnet wird. Diese sollte in der exponentiellen Phase ebenso eine exponentielle Zunahme zeigen und anschließend in der Produktionsphase möglichst nicht stark abfallen, weil diese für die rekombinante Biosynthesekaskade die Regenerierung von Cosubstraten sowie für energieabhängige Transportprozesse für die Bereitstellung von Stoffwechselenergie essentiell ist.



**Abb. 3.20: Darstellung der Drei-Phasen-Fermentation**

Exemplarische Darstellung der Fermentationsstrategie mit drei Phasen: Rot: *Batch*-Phase, Grün: Exponentielle Wachstumsphase (exponentieller *feed*), Blau: Produktionsphase (kontinuierlicher *feed*), Induktion zwischen exponentieller- und Produktionsphase Zeit [h] (x-Achse) vs. CTR [mmol/h] (linke y-Achse) vs. Glukose-Medium-Lösung [mL/h] (rechte y-Achse). Das Ziel der Drei-Phasen-Fermentation ist eine möglichst hohe und konstante CTR über die Zeit. CTR=Maß für die metabolische Aktivität.

### 3.3.1 Untersuchungen zur Stammauswahl und Induktion am Beispiel der Ferulasäure-Produktion (FA2)

Neben dem bereits im Schüttelkolben verwendeten Stamm BL21(DE3)Gold pLysT sollte ein weiterer Stamm zur Produktion von Ferula- und Sinapinsäure untersucht werden. Dabei handelte es sich um BL21 $\Delta$ tyrR:T7 pLysT (BL21 $\Delta$ R pLysT) (Design und Generierung durch B. Moritz), welcher eine Deletion im Gen *tyrR* aufweist. Dieses Gen kodiert den Tyrosin-Repressor TyrR welcher für die Regulation der Biosynthese von aromatischen Aminosäuren, sowie deren Aufnahme verantwortlich ist [Pittard und Yang, 2008]. Eine Deletion bewirkt also, dass die Aufnahme und Synthese von beispielweise Tyrosin verstärkt wird. Eine gleichzeitige Integration der Laktose regulierten T7-RNA-Polymerase in das *tyrR*-Gen in einen Wildtyp BL21 Stamm (ohne  $\lambda$ -Phage) führt außerdem zu einem Produktionsstamm, der im Gegensatz zu klassischen BL21(DE3)-Stämmen ohne  $\lambda$ -Phagenbestandteile auskommt. Ob die Deregelung der Tyrosinsynthese- und aufnahme einen positiven Effekt auf die Biosynthese hat, sollte im Bioreaktorsystem untersucht werden. Des Weiteren sollte die Induktion der Biosynthesekaskade mit IPTG und Laktose verglichen werden. Laktose stellt eine gute Alternative zur Induktion mit IPTG dar, weil Laktose deutlich günstiger ist und außerdem von den *E. coli*-Zellen als C-Quelle genutzt werden kann und damit den Metabolismus der Zellen nicht belastet. IPTG hingegen kann nicht abgebaut werden und bewirkt dadurch eine andauernde Expression der T7-RNA-Polymerase und damit auch der Zielgene. Dies ist eine zusätzliche metabolische Last für die Zellen, was sich wiederum auf die während der Produktionsphase wichtigen Zellvitalität auswirkt. Die Herausforderung bei der Verwendung von Laktose als Induktor ist jedoch, dass Laktose nur bei untersättigender Konzentration (Stoffwechsel-bezogen) von Glukose aufgenommen wird, weshalb die Zellen während der exponentiellen Phase immer unter Glukose-Limitierung wachsen müssen.

In der ersten Vierfach-Parallel-Fermentation wurde die Produktion von Ferulasäure mit dem Konstrukt FA2 in BL21(DE3)Gold pLysT (Parallel-Fermentation I-a, Abb. 3.21, S. 76) und BL21 $\Delta$ R pLysT (Parallel-Fermentation I-b, Abb. 3.22, S. 79), jeweils mit 0,5 mM IPTG und 0,5 % Laktose Induktion untersucht, um die möglichen Vorteile des Deletionsstammes auf die Tyrosinaufnahme und die Induktion mit Laktose zu testen. Einige Prozessparameter der Parallel-Fermentation I sind in Tab. 3.2 aufgeführt. Der generelle Ablauf der Fermentation ist in Kapitel 2.2.2.2 (S. 37) beschrieben. Der erweiterte Datensatz und die Programmierung des Prozessleitsystems sind im Anhang (Abb. 10.6, Abb. 10.7, S. 128 und Abb. 10.8, S. 128 ff.) dargestellt.

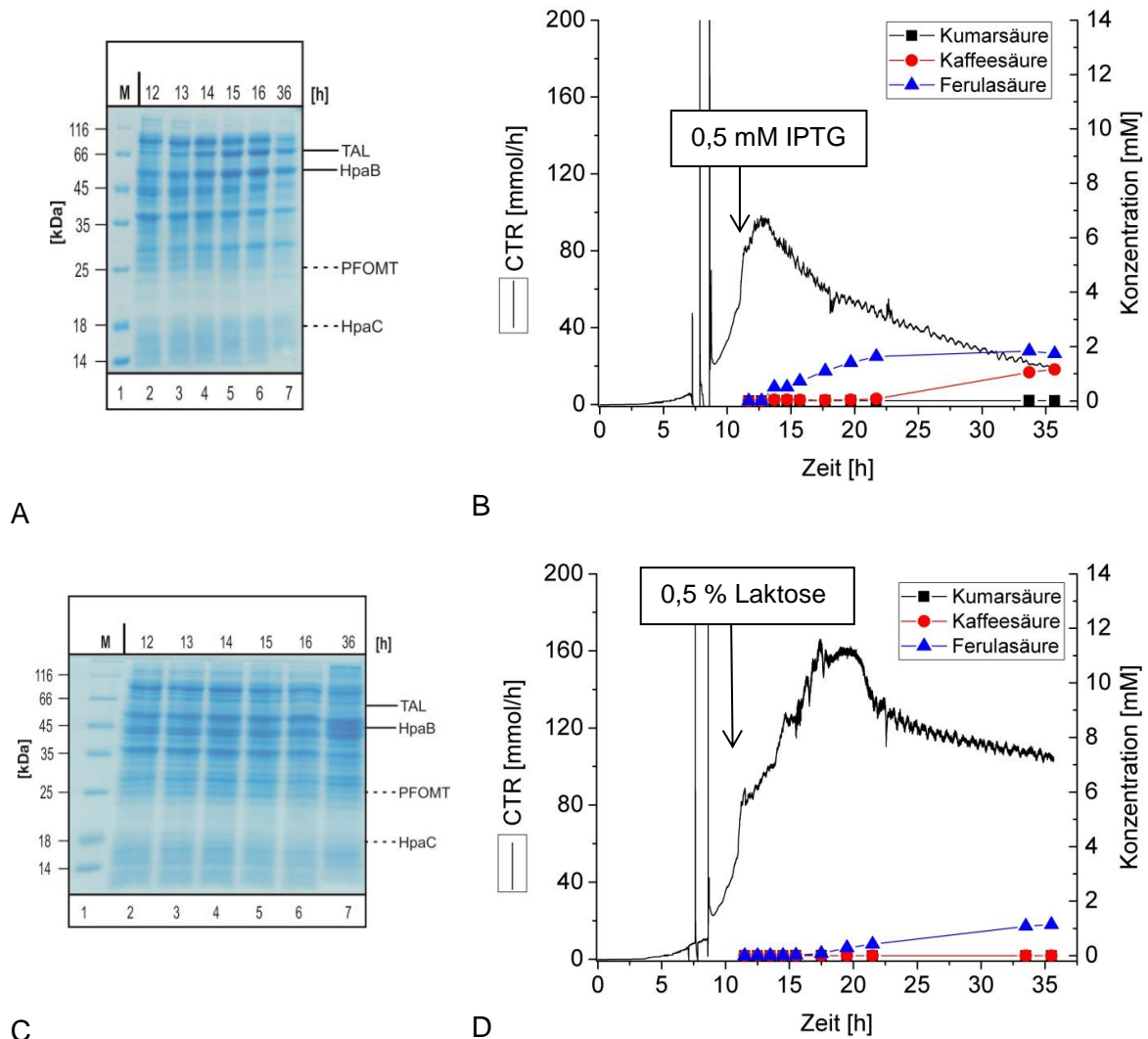
**Tab. 3.2: Bedingungen der Parallel-Fermentation I (BL21(DE3)Gold pLysT & BL21ΔR pLysT)**

Phase	Glukose	Tyrosin
<i>Batch</i>	0,2 % (11 mM)	-
Exponentiell	Exponentiell: $\mu_{\max}=0,6 \text{ h}^{-1}$	-
Produktion	16,66 mL/h, 24 h (28 mmol/h)	1,5 mM/h, 20 h

*BL21(DE3)Gold pLysT IPTG vs. Laktose (Parallel-Fermentation I-a)*

In Abb. 3.21 sind ausgewählte Prozessdaten und die Intermediat-Konzentrationen im Überstand der Parallel-Fermentation I-a mit FA2 transformierten BL21(DE3)Gold pLysT mit IPTG Induktion (Bild A & B) und Laktose Induktion (Bild C & D) dargestellt. Wird die Induktion mit IPTG durchgeführt, kann man in der SDS-PAGE Analyse der  $1/\text{OD}_{600}$  Proben eine sehr gute Expression der TAL und HpaB bereits 1 h nach Zugabe von IPTG (Prozesszeit 13 h, Spur 3) erkennen. Das Bandenmuster des Gelbildes ist vergleichbar mit dem Ergebnis der Schüttelkolben-Versuche (Abb. 3.3, S. 46). Das dazu gehörige Diagramm der CTR und Biosynthese über die Zeit (Bild B) zeigt eine erwartungsgemäße Zunahme der CTR in der exponentiellen Phase, die allerdings nach Induktion mit IPTG stark sinkt und nach 24 h annähernd 20 mmol/h (20 % des Maximums) erreicht. Nach 24 h konnten in diesem Bioreaktor 2 mM Ferulasäure, mit Akkumulation von 1 mM Kaffeesäure, produziert werden. Eine IPTG Induktion zeigt damit die erwartete starke Expression, jedoch ebenso eine hohe metabolische Last für die Zellen oder auch eine mögliche Toxizität der Genprodukte, die sich in der Abnahme der CTR zeigt. Das Ergebnis der Induktion der BL21(DE3) pLysT (FA2) mit Laktose ist in Bild C und D dargestellt. Im Gelbild der SDS-PAGE Analyse (Bild C) kann man erkennen, dass keine sichtbare Überproduktion der Zielproteine (TAL & HpaB) erfolgte. Am Ende des Experimentes wurden 1 mM Ferulasäure nachgewiesen (Bild D). Die CTR steigt auch hier erwartungsgemäß in der exponentiellen Phase, jedoch steigt diese auch nach Induktion mit Laktose weiter im Gegensatz zur Induktion mit IPTG. Erst nach weiteren 10 h sinkt diese langsam auf 100 mmol/h. Die Daten des CTR-Verlaufes, die Intermediatkonzentration zusammen mit der SDS-PAGE zeigen, dass es in diesem Experiment eine zu schwache Expression der Zielgene für eine höhere Ferulasäure-Produktion gab. In der Messung der Glukosekonzentration im Kulturüberstand zeigte sich, dass bereits in der exponentiellen Phase bzw. am Anfang der Produktionsphase Glukose akkumulierte. Das Vorliegen von Glukose könnte zu einer unzureichenden Induktion des Lac-Operons geführt haben und damit zu einer unzureichenden rekombinanten Expression der Kaskadene. Diese Hypothese wird durch das Gelbild der SDS-PAGE weiter unterstützt. Um das Ziel der Laktoseinduktion zu erreichen, sollte im nächsten Versuch

(Parallel-Fermentation II, S. 79 ff.) durch Reduktion des exponentiellen *feed* ( $\mu_{\max}=0,6 \text{ h}^{-1}$  auf  $\mu_{\max}=0,5 \text{ h}^{-1}$ ) ein Wachstum unter Glukoselimitierung erfolgen.



**Abb. 3.21: Parallel-Fermentation I-a: FA2 BL21(DE3)Gold pLysT IPTG vs. Laktose**

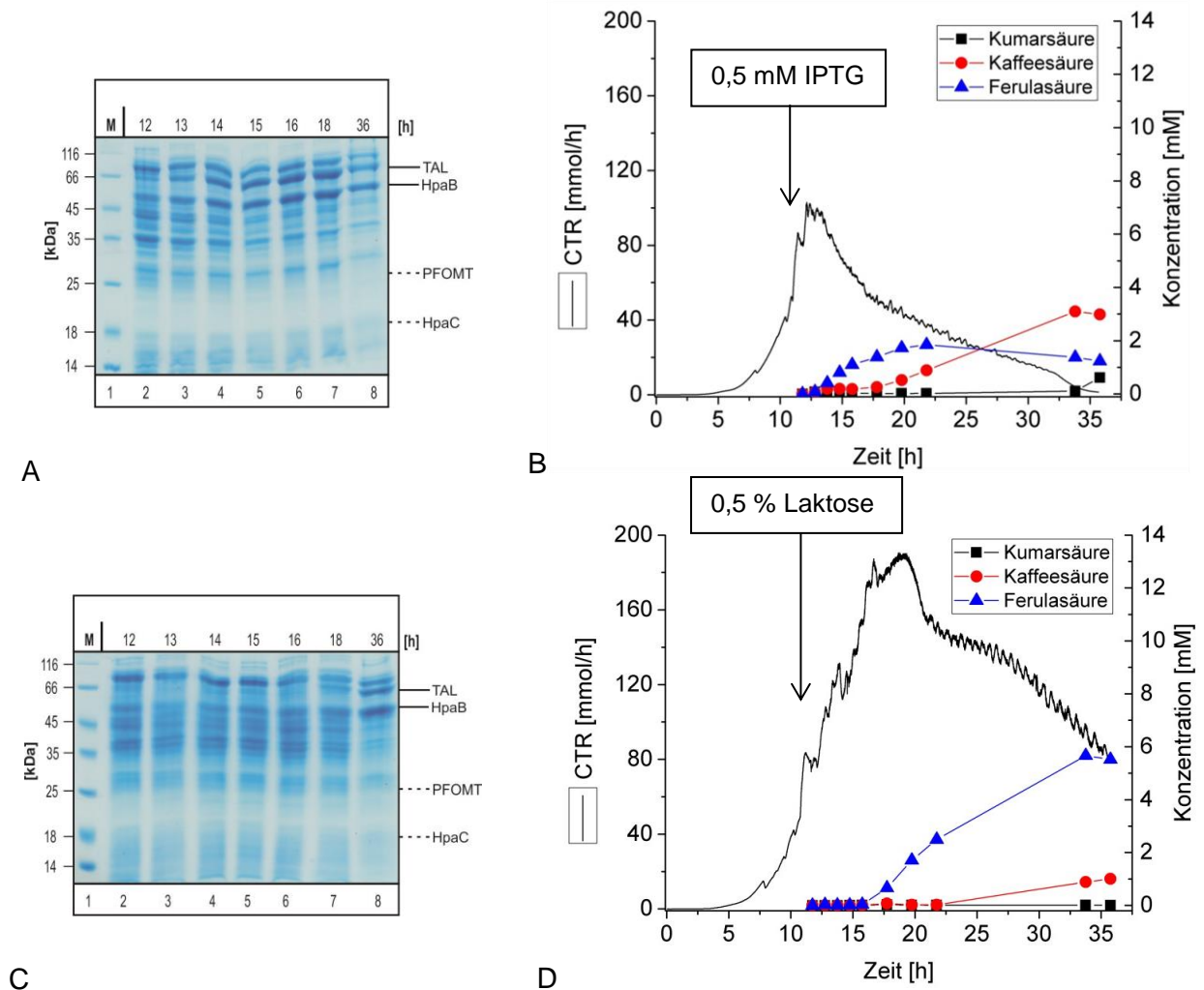
Die Fermentation im Parallel-Bioreaktorsystem erfolgte mit transformierten BL21(DE3)Gold pLysT-Zellen in Minimalmedium bei 37 °C. **A + B:** Induktion mit 0,5 mM IPTG, **C + D:** Induktion mit 0,5 % Laktose, **A + C:** SDS-PAGE (Proben nach Prozesszeit) **B + D:** Prozesszeit [h] vs. CTR [mmol/h] (linke y-Achse) vs. Konzentration der Produkte [mM] (rechte y-Achse). Ab Induktion wurden 1,5 mM/h Tyrosin (20 h) hinzugegeben. Die Proben wurden zwischen 0 und 24 h nach Induktion analysiert. Schwarze-Linie: CTR, Schwarz mit Symbol: Kumarsäure, Rot: Kaffeesäure, Blau: Ferulasäure. SDS-PAGE: Markiert ist das theoretische Molekulargewicht von TAL (76 kDa), HpaB (59 kDa), PFOMT (27 kDa) und HpaC (19 kDa).

BL21ΔR pLysT IPTG vs. Laktose (Parallel-Fermentation I-b)

In Abb. 3.22 sind die Ergebnisse der Parallel-Fermentation I-b von FA2 in BL21ΔR pLysT mit IPTG Induktion (Bild A & B) und Laktose Induktion (Bild C & D) dargestellt. Bei der IPTG Induktion zeigt sich in dieser Zelllinie in der SDS-PAGE (Bild A) eine noch stärkere Expression von TAL & HpaB als in der Induktion der BL21(DE3)Gold pLysT (Abb. 3.21). Bereits 1 h nach Induktion (13 h Prozesszeit, Spur 3) ist eine deutliche Überproduktion der Zielproteine (TAL & HpaB) erkennbar. In der Darstellung des Ergebnis der Fermentation (Bild B) ist erkennbar, dass das Signal der CTR bis zur Induktion exponentiell steigt und danach stark sinkt bis es nach 24 h sogar annähernd 0 mmol/h erreicht. Es wurden ca. 1,2 mM Ferulasäure mit Akkumulation von ca. 3 mM Kaffeesäure produziert. Vergleichend zur IPTG-Induktion mit BL21(DE3)Gold pLysT zeigt sich, dass erneut eine starke Induktion zu einer schlechten Ferulasäure-Produktion mit höherer Kaffeesäure Akkumulation führt. Die Zellen sind in ihrem Stoffwechsel nach Induktion weniger aktiv und können dadurch vermutlich das nötige Cosubstrat SAM nicht ausreichend regenerieren, was eine Akkumulation von Kaffeesäure zu Folge hat. In Bild C und D ist die Induktion mit Laktose gezeigt. In dem Gelbild der SDS-PAGE (Bild C) kann man nur eine späte und schwache Expression (Spur 4-7) erkennen, wobei 24 h nach Induktion eine deutliche Überproduktion sichtbar ist. In Bild D kann man erkennen, dass auch hier die CTR während der exponentiellen Phase und nach Induktion mit Laktose steigt und erst 10 h später langsam sinkt. 24 h nach Induktion erreicht diese ca. 80 mmol/h. Trotz der eher schlechten Expression wurden in diesem Experiment ca. 5,5 mM Ferulasäure mit Akkumulation von 1 mM Kaffeesäure produziert. Bei der Glukose-Analyse zeigte sich, dass zwar auch hier in der exponentiellen Phase Glukose akkumuliert vorlag, jedoch 2 h nach Laktose-Zugabe wieder eine starke Abnahme nachweisbar war (siehe Anhang Abb. 10.8, S. 128). Dies könnte die bessere Induktion im Vergleich zur Biosynthese mit BL21(DE3)Gold pLysT erklären. Man kann sagen, dass die Synthese in BL21ΔR pLysT erfolgreicher war, was auch auf die Deletion des *tyrR* und damit einer besseren Aufnahme des Substrates Tyrosin zurück zu führen sein könnte. Die Verwendung des BL21Δ*tyrR* geht auf die Vermutung zurück, dass die Deletion des *tyrR*-Gens zu einer Aufhebung der transkriptionellen Repression des Tyrosin-Transporter TyrP und AroP führt [Pittard und Yang, 2008]. In Folge dessen wird Tyrosin auch bei hinreichenden intrazellulären Konzentrationen weiter importiert und vermutlich über das natürliche Maß hinaus akkumuliert. Diese überdurchschnittlichen intrazellulären Konzentrationen helfen dann der Produktinhibierung der TAL durch Kumarsäure kompetitiv entgegen zu wirken und den Stofffluss durch die Kaskade weiter zu verbessern. Ob die bessere Syntheseleistung von Ferulasäure in BL21Δ*tyrR* gegenüber BL21(DE3)Gold allein auf den Tyrosintransport zurückzuführen ist, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden. Obwohl der genetische Unterschied zwischen den Zelllinien hauptsächlich

das  $\lambda$ -Lysogen (DE3) und das TyrR-Gen ( $\Delta R$ ) ist, können sie nicht als isogen bezeichnet werden. Im Weiteren sollte deshalb die Biosynthese in dieser Zelllinie weiter untersucht werden.

Was in dieser Parallel-Fermentation (I-a Abb. 3.21 & I-b Abb. 3.22) deutlich wird, ist, dass eine zu starke IPTG-induzierte Expression eine zu starke metabolische Last für die Zellen darstellt und zu einer schlechteren Ferulasäure-Produktion führt. Da in diesem Prozess jedoch nicht nur rekombinantes Protein produziert werden sollte, sondern auch eine Biokatalyse unter Verbrauch von Cosubstraten stattfinden soll, eignet sich die starke IPTG-Induktion nicht. Eine zu schwache Laktose-induzierte Expression liefert jedoch nicht ausreichend Katalysator für die Reaktionskaskade. Eine Balance zwischen Expression und der Zellvitalität scheint entscheidend für die Produktion zu sein. Um sich diesem Optimum zu nähern konnte nur eine titrierbare Induktion herangezogen werden. Eine titrierbare Induktion mittels IPTG lässt sich nur in lacY-Mutanten durchführen [Fernández-Castané et al., 2012]. Um diese Mutation nicht zusätzlich in den Produktionsstamm einführen zu müssen, und auch die bekannten Toxizitätseffekte von IPTG [Donovan et al., 1996] zu umgehen, wurde die titrierbare Induktion mit Laktose etabliert. Die Schwierigkeit bei der Verwendung von Laktose als Induktor bestand in der Überwindung des diauxischen Wachstums in glukosehaltigen Mineralmedien [Wong et al., 1997]. Durch die Verwendung eines Glukose-limitierten *feed*-Protokolls konnte die Glukosekonzentration so niedrig gehalten werden, dass Laktose als zweite Kohlenstoffquelle verwendet wurde und damit die regulierte Induktion der Kaskadengene möglich wurde. Um die Ferulasäure-Produktion zu maximieren war es notwendig den Stofffluss durch die Kaskade so lange wie möglich aufrecht zu erhalten. Weil die Regeneration der Cofaktoren eng an die Vitalität der Zellen gekoppelt ist, wurde versucht die Zellen während der Synthesephase möglichst lange metabolisch aktiv zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde Minimalmedium verwendet, um den Glukose-*feed* und damit die Wachstumsrate, sowie Prozessparameter, wie pH-Wert und O<sub>2</sub>-Sättigung, streng zu kontrollieren und zu regulieren. Durch diese Maßnahmen konnte die Syntheszeit auf 48 h ausgedehnt werden. Allein durch technische Limitationen, wie Reaktorvolumen oder begrenzter O<sub>2</sub>-Sättigung, war eine weitere Verlängerung der Syntheszeit nicht möglich. Es ist wahrscheinlich, dass die Länge der Syntheszeit in größeren Bioreaktoren noch weiter ausgedehnt werden kann.



**Abb. 3.22: Parallel-Fermentation I-b: FA2 BL21ΔR pLysT, IPTG vs. Laktose**

Die Fermentation im Parallel-Bioreaktorsystem erfolgte mit transformierten BL21ΔR pLysT-Zellen in Minimalmedium bei 37 °C. **A + B:** Induktion mit 0,5 mM IPTG, **C + D:** Induktion mit 0,5 % Laktose, **A + C:** SDS-PAGE (Proben nach Prozesszeit) **B + D:** Prozesszeit [h] vs. CTR [mmol/h] (linke y-Achse) vs. Konzentration der Produkte [mM] (rechte y-Achse). Ab Induktion wurden 1,5 mM/h Tyrosin (20 h) hinzugegeben. Die Proben wurden zwischen 0 und 48 h nach Induktion analysiert. Schwarze-Linie: CTR, Schwarz mit Symbol: Kumarsäure, Rot: Kaffeesäure, Blau: Ferulasäure. SDS-PAGE: Markiert ist das theoretische Molekulargewicht von TAL (76 kDa), HpaB (59 kDa), PFOMT (27 kDa) und HpaC (19 kDa).

### 3.3.2 Untersuchungen zur Optimierung der Ferulasäure-Produktion (FA2) durch Variation der Laktose-Konzentration

Wie sich in der vorangegangenen Parallel-Fermentation I (Abschnitt 3.3.1, S. 74) zeigte, ist die Induktion mit IPTG wenig geeignet, um höhere Konzentrationen an Ferulasäure zu erreichen. Daher sollte mittels Titration des Induktors Laktose versucht werden eine Balance der Expression und Zellvitalität herzustellen. Damit Laktose als Induktor in Gegenwart von Glukose wirken kann, sollte die Wachstumsrate der exponentiellen Phase auf  $0,5 \text{ h}^{-1}$  und damit die Glukosekonzentration minimiert werden. Außerdem wurde die Produktionsphase auf 48 h verlängert, um auch die Reaktionszeit zu verlängern, was durch eine langanhaltend stabile Zellvitalität (CTR) ermöglicht werden kann. Aufgrund der Begrenzung des

Bioreaktorvolumens wurde der kontinuierliche *feed* und die Tyrosin-Zugabe ebenso reduziert (Tab. 3.3). In der Parallel-Fermentation II sollten unterschiedliche Laktose-Konzentrationen (0,05 %, 0,15 %, 0,45 %) getestet werden. Der erweiterte Datensatz und die Programmierung der Fermentation sind im Anhang (Abb. 10.9, Abb. 10.10, S. 130 ff.) dargestellt.

**Tab. 3.3: Bedingungen Parallel-Fermentation II**

Phase	Glukose	Tyrosin
<i>Batch</i>	0,1 % (5,6 mM)	-
Exponentielle	Exponentiell: $\mu_{\max}=0,5 \text{ h}^{-1}$	-
Produktion	8,5 mL/h, 48 h (14 mmol/h)	1,0 mM/h, 40 h (4-44 h der Produktion)

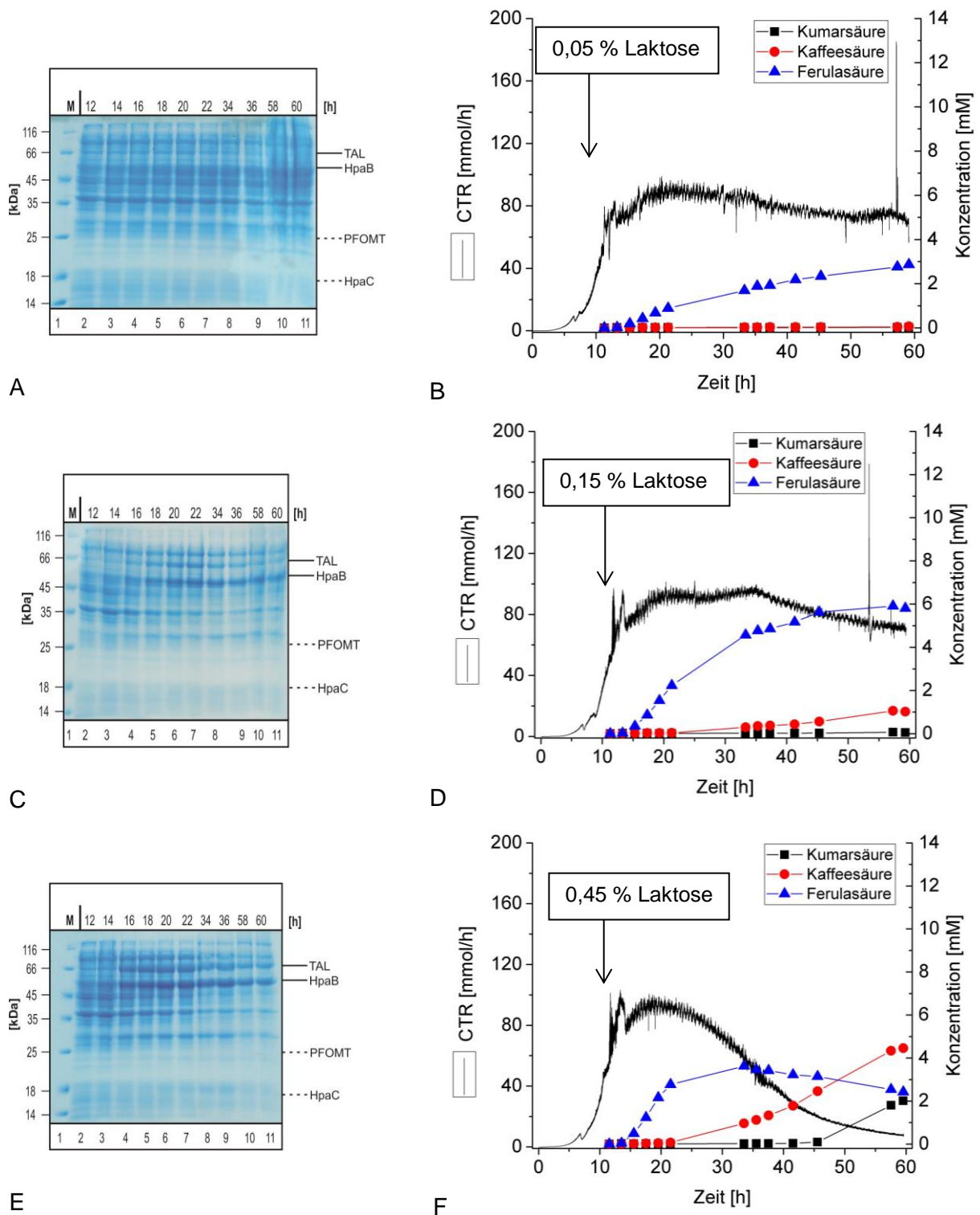
In Abb. 3.23 sind die Ergebnisse der Parallel-Fermentation II zur Optimierung der Balance zwischen Expression und Zellvitalität mit 0,05 % (Bild A & B), 0,15 % (Bild C & D) und 0,45 % Laktose (Bild E & F) dargestellt. In Bild A, C und E sind jeweils die Gelbilder der SDS-PAGE gezeigt. Darin sieht man mit steigender Laktose-Konzentration eine steigende Signalstärke der Banden die den rekombinanten Enzymen TAL und HpaB zuzuordnen sind. In Bild A (0,05 % Laktose) ist dabei keine deutliche Überproduktion, in Bild C (0,15 % Laktose) ist beginnend 4 h nach Induktion (Spur 4) eine leichte Überproduktion und in Bild E (0,45 % Laktose) ist ebenso beginnend 4 h (Spur 4) nach Induktion eine starke Überproduktion erkennbar. Dies zeigt, dass abhängig von der Laktose-Konzentration die Stärke der Expression titrierbar ist. In Bild B ist die CTR und Produktbildung über die Zeit mit 0,05 % Laktose Induktion dargestellt. Aufgrund der langsameren Wachstumsrate durch geringeren exponentiellen *feed* (8,5 mL/h) kann man erkennen, dass hier die CTR in der exponentiellen Phase nur bis ca. 80 mmol/h steigt und dann nach Induktion relativ stabil bis 48 h nach Induktion bleibt. Betrachtet man die Biosynthese, so erkennt man, dass nach 48 h (60 h Prozesszeit) ca. 3 mM Ferulasäure ohne Akkumulation von Intermediaten gebildet wurde und auch zwischen 24 und 48 h Produktionszeit die Produktkonzentration weiter gestiegen ist. Dies zeigt, dass eine Verlängerung der Prozess- und Produktionszeit möglich und sinnvoll ist. In Bild D ist die Biosynthese mit 0,15 % Laktose dargestellt. Auch hier kann man einen ähnlichen Verlauf des CTR Signals beobachten, jedoch sinkt die CTR nach 35 h Prozesszeit leicht ab. Insgesamt kann man jedoch trotzdem von einer relativ stabilen CTR über die gesamte Produktionszeit sprechen. Nach 48 h konnten hier ca. 6 mM Ferulasäure mit Akkumulation von ca. 1 mM Kaffeesäure produziert werden.

In Bild F ist die Biosynthese mit 0,45 % Laktose gezeigt. Hier kann man einen deutlichen Unterschied in der CTR im Vergleich zu den niedrigeren Laktose-Konzentration erkennen. Ca. 10 h nach Induktion zeigt sich eine schnelle Abnahme der CTR, die nach 48 h



annähernd 0 mmol/h erreicht. Nach 35 h Prozesszeit wurden ca. 4 mM Ferulasäure nachgewiesen. Danach gab es keine Zunahme in der Absolutmenge, jedoch eine Volumenzunahme wodurch die Konzentration im weiteren Verlauf abnahm. Am Ende der Produktionsphase akkumulierten sich zudem über 4 mM Kaffeesäure und 2 mM Kumarsäure. Dies zeigt deutlich, dass die zu starke Expression (0,45 % Laktose) der rekombinanten Enzyme allein hinreichend ist um die Zellvitalität drastisch einzuschränken und damit verbunden die Syntheseleistung der rekombinanten Kaskade begrenzt. Demzufolge gibt es eine optimale Konzentration der Kaskadenenzyme, die zu einer maximalen Produktausbeute führen kann. In Summe wurden jedoch fast 9 mM Intermediate und Produkt gebildet, was den höchsten Umsatz, auf die Gesamtkaskade gerechnet, entspricht.

Insgesamt kann man sagen, dass in dieser Parallel-Fermentation die Induktion mit 0,15 % Laktose die höchste Ferulasäure-Produktion (ca. 6 mM) erbrachte, wobei hier eine gute Expression und trotzdem eine relativ stabile CTR über die gesamte Produktionszeit zu beobachten war. Da die Regeneration von SAM eine große metabolische Belastung für die Zellen darstellen könnte, sollte nachfolgend eine Parallel-Fermentation unter Zugabe von Methionin erfolgen. Dabei sollte nochmals die Induktion mit 0,05 %, 0,15 % und 0,45 % Laktose durchgeführt werden (Parallel-Fermentation III), um eine mögliche Kompensation dieser metabolischen Last zu untersuchen.



**Abb. 3.23: Parallel-Fermentation II: FA2 BL21ΔR pLysT 0,05/0,15/0,45 % Laktose**

Die Fermentation im Parallel-Bioreaktorsystem erfolgte mit transformierten BL21ΔR pLysT-Zellen in Minimalmedium bei 37 °C. **A + B:** Induktion mit 0,05 % Laktose, **C + D:** Induktion mit 0,15 % Laktose, **E + F:** Induktion mit 0,45 % Laktose, **A, C, E:** SDS-PAGE (Proben nach Prozesszeit) **B, D, F:** Prozesszeit [h] vs. CTR [mmol/h] (linke y-Achse) vs. Konzentration der Produkte [mM] (rechte y-Achse). Ab Induktion wurden 1 mM/h Tyrosin (40 h) hinzugegeben. Die Proben wurden zwischen 0 und 48 h nach Induktion analysiert. Schwarze-Linie: CTR, Schwarz mit Symbol: Kumarsäure, Rot: Kaffeesäure, Blau: Ferulasäure. SDS-PAGE: Markiert ist das theoretische Molekulargewicht von TAL (76 kDa), HpaB (59 kDa), PFOMT (27 kDa) und HpaC (19 kDa).

### 3.3.3 Ferulasäure-Produktion mit Methionin-Zugabe (FA2)

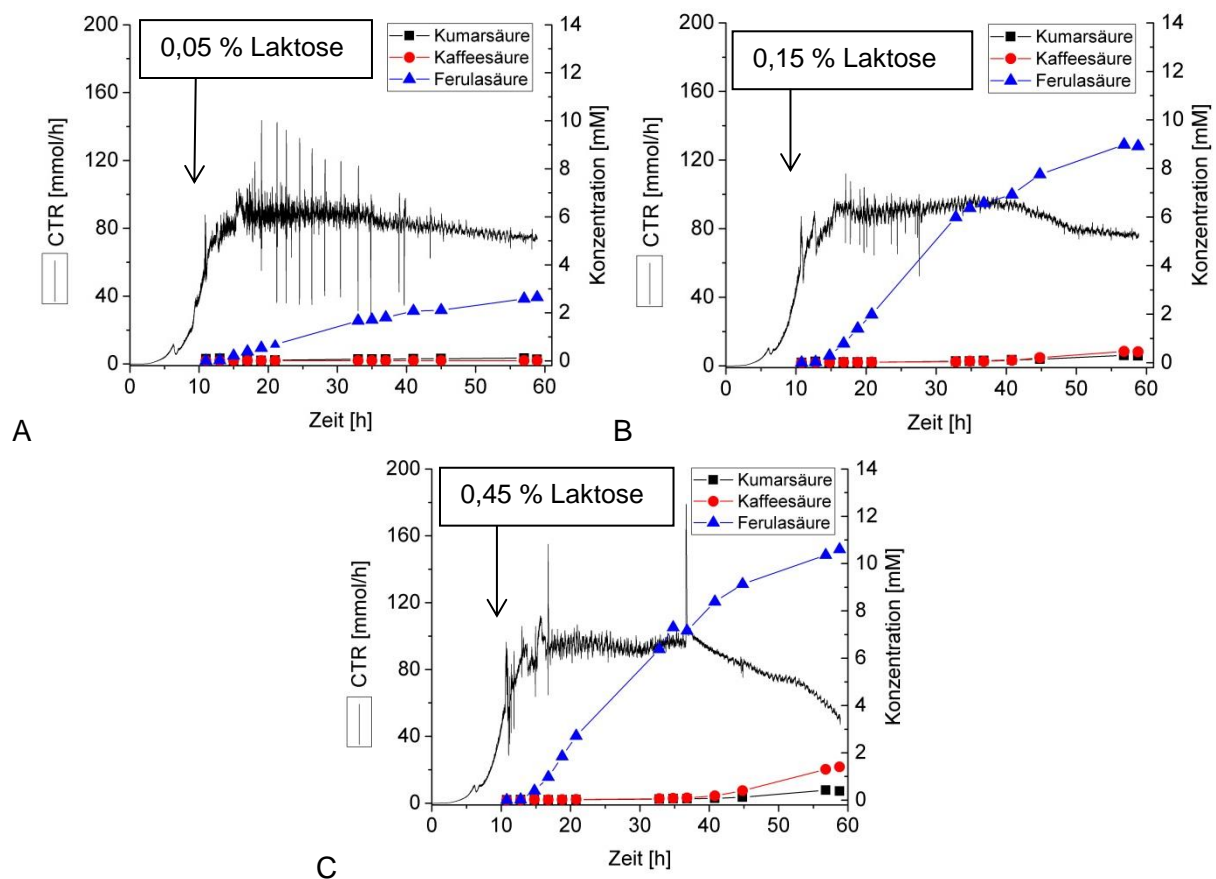
Da sich bereits in Schüttelkolben-Versuchen gezeigt hatte (Kapitel 3.1.5.1, S. 63ff.), dass eine Zugabe von Methionin die Methylierungsreaktion unterstützt und damit einen positiven Einfluss auf die Ferulasäure-Produktion hat, sollte dies auch im Rahmen einer Parallel-Fermentation (III) untersucht werden. Dabei wurde der Versuchsaufbau analog zur Parallel-Fermentation II (siehe 3.3.2, S. 79) gewählt, jedoch äquimolar zum Tyrosin auch Methionin zugegeben. Die Bedingungen dieser Fermentation sind in Tab. 3.4 zusammengefasst. Der erweiterte Datensatz der Fermentation ist im Anhang (Abb. 10.11, S. 130) dargestellt.

**Tab. 3.4: Bedingungen Parallel-Fermentation III**

Phase	Glukose	Tyrosin/Methionin
<i>Batch</i>	0,1 % (5,6 mM)	-
Exponentielle	Exponentiell: $\mu_{\max}=0,5 \text{ h}^{-1}$	-
Produktion	8,5 mL/h, 48 h (14 mmol/h)	1,0 mM/h, 40 h (4-44 h der Produktion)

In Abb. 3.24 sind die Ergebnisse der Parallel-Fermentation III dargestellt, wobei hier Bild A die Auswertung des Experimentes der Induktion mit 0,05 % Laktose, Bild B die Auswertung des Experimentes der Induktion mit 0,15 % und Bild C die Auswertung des Experimentes der Induktion mit 0,45 % Laktose zeigt. Auf die Abbildung der jeweiligen SDS-PAGE-Gelbilder wird aufgrund der unveränderten Induktionsart im Vergleich zu Parallel-Fermentation II (siehe 3.3.2, S. 79) verzichtet. In Bild A zeigt sich ein sehr ähnliches Ergebnis im Vergleich zur Fermentation ohne Methionin (II) (Abb. 3.23, Bild B, S. 82). Auch hier verläuft das Signal der CTR in der gesamten Zeit der Produktionsphase sehr stabil. Nach 48 h Produktionszeit konnten hier ca. 3 mM Ferulasäure ohne Akkumulation von Intermediaten gebildet werden. In diesem Versuch gab es damit keine Verbesserung durch die Zugabe von Methionin, jedoch zeigte sich bei dieser schwachen Induktion vorher auch keine Limitation in der Reaktionskaskade. In Bild B ist das Ergebnis der Induktion mit 0,15 % Laktose dargestellt. Es ist erkennbar, dass auch hier wieder die CTR während der Produktionsphase relativ stabil bleibt, wobei diese nach 40 h sehr langsam auf ca. 80 mmol/h sinkt. Es wurden 9 mM Ferulasäure, mit einer sehr geringen Akkumulation von Kaffeesäure, produziert. Hier wurde die Ferulasäure-Konzentration damit um 50 % im Vergleich zur Produktion ohne Methionin gesteigert. Im Bild C ist das Ergebnis der Induktion mit 0,45 % Laktose dargestellt. Hier erkennt man einen deutlichen Einfluss der Zugabe von Methionin auf die CTR, welche erst nach ca. 40 h langsam sinkt und nach 48 h Produktionszeit immer noch bei 40 mmol/h ist. Im Gegensatz dazu sank die CTR auf 0 mmol/h bei dem Versuch der Ferulasäure-Produktion ohne Methionin-Zugabe mit der gleichen Laktose-Konzentration. Die Zugabe von Methionin kann also das Abfallen der Zellvitalität nach Induktion mit 0,45 % Laktose erheblich

kompensieren. Die verbesserte Vitalität in Kombination mit der starken Überproduktion der Enzyme sollte auch eine verbesserte Biosynthese von Ferulasäure zu Folge haben. Dies zeigte sich tatsächlich auch in der Analyse der Intermediat-Konzentration, so konnten nach 48 h 10,6 mM Ferulasäure nachgewiesen werden. Die Akkumulation der Intermediate wurde auf ca. 1 mM reduziert, was zeigt, dass die Akkumulation der Intermediate (Parallel-Fermentation I) auf eine unzureichende Regenerierung des Cosubstrates SAM zurückzuführen ist. Die Zugabe von Methionin kann diesen Engpass zumindest substantiell weiten und die Produktausbeute um das dreifache erhöhen. Insgesamt kann man festhalten, dass die höchste Ferulasäure-Konzentration (10,6 mM bzw. 2 g/L) in einer Fermentation mit 1 mM/h (40 h) Tyrosin und Methionin und einer Induktion mit 0,45 % Laktose erzielt wurde. Da über die Produktionszeit 40 mM Tyrosin hinzugegeben wurde, entspricht dies einem Umsatz von ca. 30 %. Da sich im Kulturmedium rein optisch keine größere Menge Tyrosin akkumulierte (ab ca. 3 mM unlöslich) kann vermutet werden, dass Tyrosin zu einem Großteil in katabolen Konkurrenzreaktionen von *E. coli* genutzt wird.

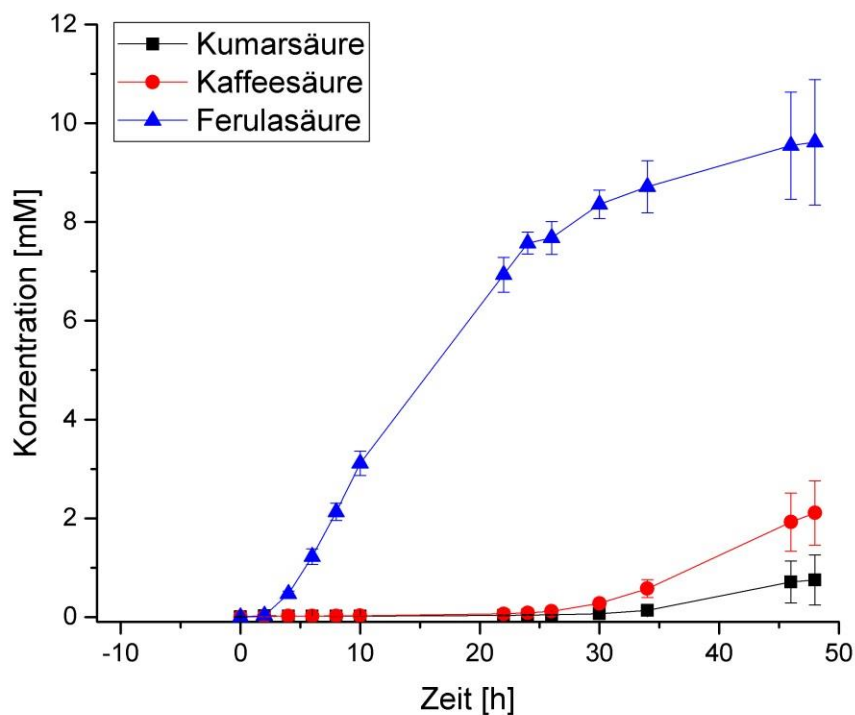


**Abb. 3.24: Parallel-Fermentation III: FA2 BL21ΔR pLysT 0,05/0,15/0,45 % Laktose (Methionin)**

Die Fermentation im Parallel-Bioreaktorsystem erfolgte mit transformierten BL21ΔR pLysT-Zellen in Minimalmedium bei 37 °C. **A:** Induktion mit 0,05 % Laktose, **B:** Induktion mit 0,15 % Laktose, **C:** Induktion mit 0,45 % Laktose. Prozesszeit [h] vs. CTR [mmol/h] (linke y-Achse) vs. Konzentration der Produkte [mM] (rechte y-Achse) ist dargestellt. Ab Induktion wurden 1 mM/h Tyrosin + Methionin (40 h) hinzugegeben. Die Proben wurden zwischen 0 und 48 h nach Induktion analysiert. Schwarze-Linie: CTR, Schwarz mit Symbol: Kumarsäure, Rot: Kaffeesäure, Blau: Ferulasäure.

### Reproduktion der Ferulasäure-Produktion (FA2)

Die Ergebnisse der Fermentation mit der höchsten Ferulasäure-Konzentration sollte in einer weiteren Parallel-Fermentation reproduziert werden (siehe 2.2.2.2, S. 37). In Abb. 3.25 ist das Ergebnis von drei biologischen Replikaten mit den entsprechenden Fehlerbalken dargestellt. Die Zeitachse der Produktionsphase entspricht hier dem Zeitpunkt nach der Induktion (=Zeitpunkt 0 h). Man kann erkennen, dass mit  $9,6 \pm 1,4$  mM ( $1,9 \pm 0,2$  g/L) die Biosynthese der Ferulasäure gut reproduziert werden konnte, wobei der Kurvenverlauf sich in allen Replikaten stark ähnelt. Die Drei-Phasen-Fermentation führte damit zu einem reproduzierbaren Prozess zur Ferulasäure-Produktion. Die Daten der einzelnen Fermentationen sind im Anhang (Abb. 10.12, S. 131 und Abb. 10.13, S. 131) zusammengefasst.



**Abb. 3.25: Ferulasäure-Produktion im Parallel-Bioreaktorsystem (48 h, 1 mM YM/h) (n=3)**

Die drei Fermentationen im Parallel-Bioreaktorsystem erfolgten mit transformierten BL21ΔR pLysT-Zellen in Minimalmedium bei 37 °C. Induktion erfolgte mit 0,45 % Laktose, Zugabe von 1 mM YM/h (40 h). Drei biologische Replikate sind dargestellt, Prozesszeit [h] vs. Konzentration der Produkte [mM] (y-Achse). Die Proben wurden zwischen 0 und 48 h nach Induktion analysiert. Schwarz: Kumarsäure, Rot: Kaffeesäure, Blau: Ferulasäure.

### 3.3.4 Sinapinsäure-Produktion mit Methionin-Zugabe (SA1 & SA2)

Die zuvor etablierten Bedingungen der Ferulasäure-Produktion im Parallel-Bioreaktorsystem (siehe 3.3.3, S. 83 ff.) sollten nun auch auf die Sinapinsäure-Produktion angewendet werden. Dabei sollte die zuvor im Schüttelkolben untersuchte Produktion mit den Plasmiden SA1 und SA2 (Kapitel 3.2, S. 65 ff.) auf den Bioreaktor übertragen werden. Des Weiteren sollte die Induktion mit 0,15 % und 0,45 % Laktose untersucht werden. Die Bedingungen der Parallel-Fermentation IV sind in Tab. 3.5 aufgeführt. Da sich bereits in Schüttelkolben-Versuchen gezeigt hatte, dass das Abdunkeln der Kultur zur Steigerung der Sinapinsäure-Konzentration führte, wurde dies auch hier angewendet. Die Bioreaktoren wurden nach Induktion mit Aluminiumfolie abgedunkelt. Der erweiterte Datensatz der Fermentation ist im Anhang (Abb. 10.14, S. 132 und Abb. 10.15, S. 132) dargestellt.

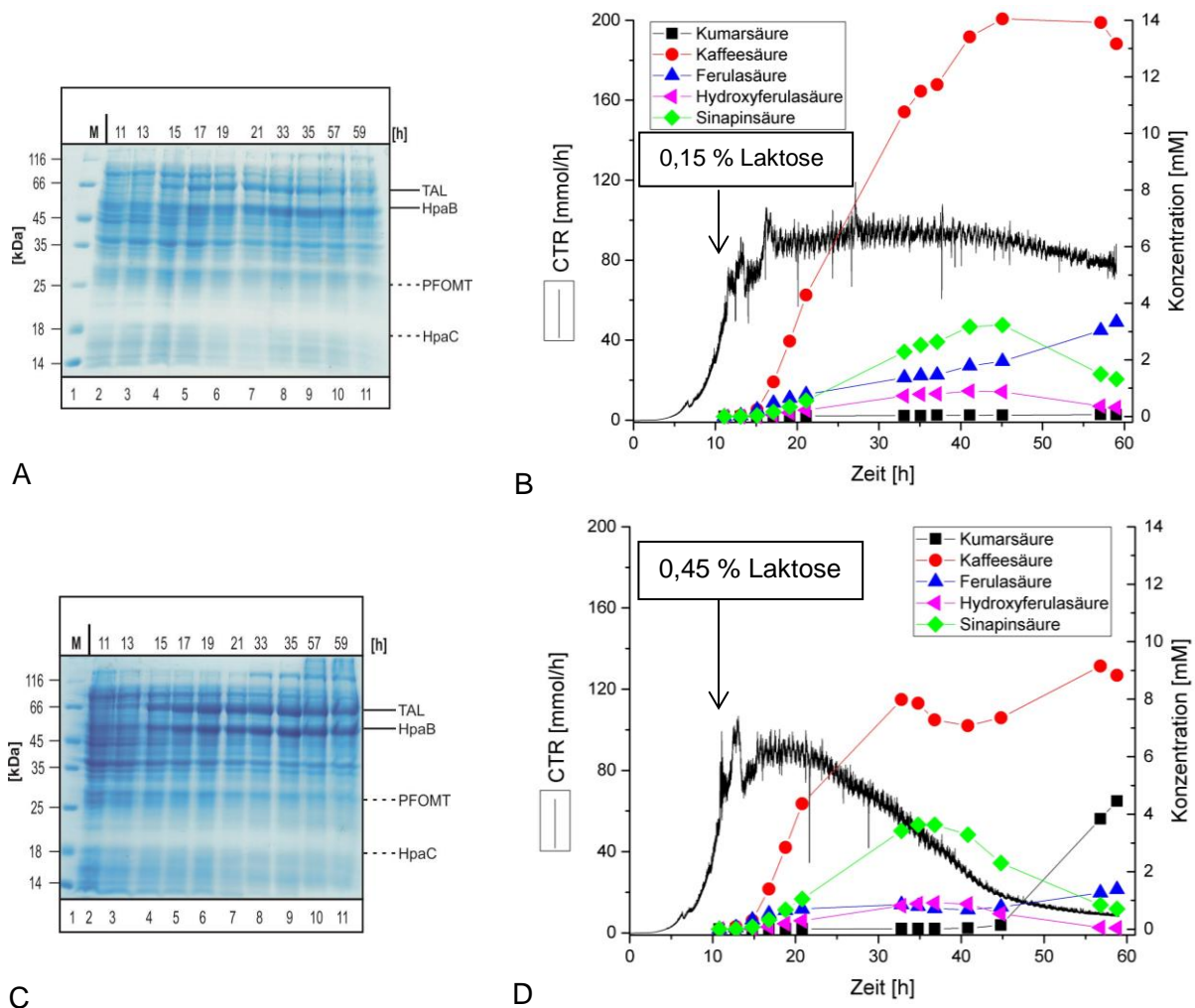
**Tab. 3.5: Bedingungen der Parallel-Fermentation IV zur Sinapinsäure-Produktion (SA1/SA2)**

Phase	Glukose	Tyrosin/Methionin
<i>Batch</i>	0,1 % (0,56 mM)	-
Exponentielle	Exponentiell: $\mu_{\max}=0,5 \text{ h}^{-1}$	-
Produktion	8,5 mL/h, 48 h (14 mmol/h)	1,0 mM/h, 40 h (4-44 h der Produktion)

#### SA1 0,15 % Laktose vs. 0,45 % Laktose (Parallel-Fermentation IV-a)

In Abb. 3.26 sind die Ergebnisse der Parallel-Fermentation IV-a der Sinapinsäure-Produktion mit SA1 (*PaHpaBC*) transformierten BL21 $\Delta$ R pLysT dargestellt. Dabei ist in Bild A und B das Ergebnis der Induktion mit 0,15 % Laktose und in Bild C und D das Ergebnis der Induktion mit 0,45 % Laktose abgebildet. In der SDS-PAGE (Bild A) der Induktion mit 0,15 % Laktose kann man eine gute Überproduktion der TAL und HpaB 4 h nach Induktion (Prozesszeit 15 h, Spur 4) erkennen. Im Vergleich dazu ist in der SDS-PAGE (Bild C) der Induktion mit 0,45 % Laktose eine stärkere und etwas schnellere Überproduktion der TAL und HpaB sichtbar. Bereits 2 h nach Induktion (Prozesszeit 13 h, Spur 2) kann man eine leichte Zunahme der Bandenintensität erkennen, welche dann 4 h nach Induktion (Prozesszeit 15 h, Spur 3) nochmals deutlich zunimmt. In der Abbildung des Experimentes der Induktion mit 0,15 % Laktose (Bild B) ist eine Steigerung der CTR über die exponentielle Phase zu sehen, wobei diese über den gesamten Verlauf der Produktionsphase stabil bei ca. 80 mmol/h liegt. Bei der Betrachtung der Biosynthese fällt auf, dass neben der Vielzahl an akkumulierten Intermediaten sich vor allem Kaffeesäure besonders stark bis zu einem Endwert von 14 mM anreichert. Eine starke Akkumulation von Kaffeesäure war auch in den Schüttelkolben-Versuchen mit diesem Konstrukt erkennbar (Abb. 3.18, S. 70). Auch Ferulasäure wird bis zu

3 mM akkumuliert. Was jedoch ebenso auffällt ist, dass nach 45 h Prozesszeit 3,2 mM Sinapinsäure nachweisbar sind, danach aber auf 1,3 mM sinkt. Bis zu einer Abnahme der Konzentration auf 2,7 mM (59 h) könnte dies auf die Verdünnung durch den kontinuierlichen *feed* und der Zugabe von Tyrosin bei theoretisch gleichbleibender Stoffmenge zurückgeführt werden. In diesem Fall nimmt jedoch auch die absolute Stoffmenge von 2,8 mmol ( $V=0,889\text{ L}$ ,  $t=45\text{ h}$ ) auf 1,3 mmol ( $V=1,07\text{ L}$ ,  $t=59\text{ h}$ ) ab, was einen Verdünnungseffekt ausschließt. Eine Erklärung für den Sinapinsäure-Verlust konnte nicht gefunden werden, jedoch kann eine Reaktion mit *E. coli*-eigenen Enzyme ausgeschlossen werden, da diese Kontrollreaktion über 48 h im Schüttelkolben mit *E. coli*-Zellen ohne Konstrukt getestet wurde (Daten nicht gezeigt). In Bild D ist das Ergebnis der Induktion mit 0,45 % Laktose dargestellt. Hier kann man erkennen, dass die CTR trotz Methionin-Zugabe ca. 10 h nach Induktion stark sinkt und am Ende sogar annähernd auf 0 mmol/h abfällt. Auch hier akkumuliert sich Kaffeesäure sehr stark (ca. 9 mM). Ein deutlicher Unterschied zeigt sich hier in der Akkumulation von Kumarsäure, welche sich zwischen 45 und 60 h auf 4 mM anreichert. Dies in Kombination mit der niedrigen CTR lässt darauf schließen, dass hier nur noch die Cofaktor-unabhängige TAL aktiv ist und zur hohen Akkumulation von Kumarsäure führt. Auch hier kann man eine Abnahme der Sinapinsäure-Konzentration im Verlauf der Fermentation erkennen. Der generelle Prozess scheint sich auf die Sinapinsäure-Produktion übertragen zu lassen, jedoch zeigte sich hier erneut, dass die Balance zwischen Expressionsstärke und Zellvitalität wichtig für die Produktion ist. Durch einen höheren SAM-Bedarf durch zwei Methylierungsreaktionen, scheint hier die Induktion mit 0,45 % Laktose trotz Zugabe von Methionin zu einer zu hohen metabolischen Last durch die Reaktionskaskade zu führen.



**Abb. 3.26: Parallel-Fermentation IV-a: SA1 BL21ΔR pLysT 0,15/0,45 % Laktose**

Die Fermentation im Parallel-Bioreaktorsystem erfolgte mit transformierten BL21ΔR pLysT-Zellen in Minimalmedium bei 37 °C. **A + B:** Induktion mit 0,15 % Laktose **C + D:** Induktion mit 0,45 % Laktose, **A + C:** SDS-PAGE (Proben nach Prozesszeit) **B + D:** Prozesszeit [h] vs. CTR [mmol/h] (linke y-Achse) vs. Konzentration der Produkte [mM] (rechte y-Achse). Ab Induktion wurden 1 mM/h Tyrosin und Methionin (40 h) hinzugegeben. Die Proben wurden zwischen 0 und 48 h nach Induktion analysiert. Schwarze-Linie: CTR, Schwarz mit Symbol: Kumarsäure, Rot: Kaffeesäure, Blau: Ferulasäure Magenta: 5-Hydroxyferulasäure, Grün: Sinapinsäure. SDS-PAGE: Markiert ist das theoretische Molekulargewicht von TAL (76 kDa), HpaB (59 kDa), PFOMT (27 kDa) und HpaC (19 kDa).

SA2 0,15 % Laktose vs. 0,45 % Laktose (Parallel-Fermentation IV-b)

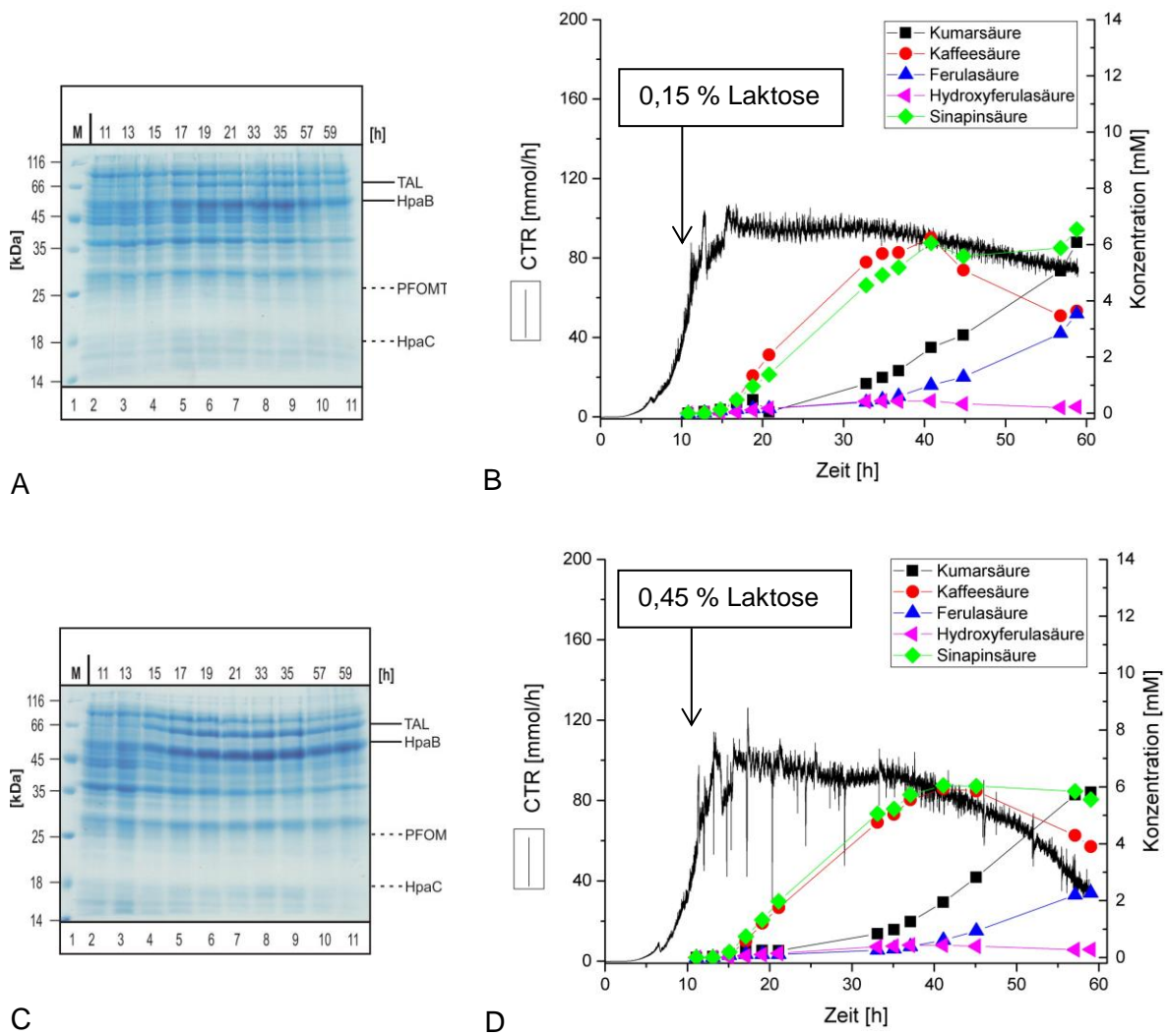
In Abb. 3.27 sind die Ergebnisse der Parallel-Fermentation IV-b der Sinapinsäure-Produktion mit SA2 (*EcHpaB*(Y301I)C) transformierten BL21ΔR pLysT zusammengefasst. In Bild A und B ist das Ergebnis der Induktion mit 0,15 % und in Bild C und D das Ergebnis der Induktion mit 0,45 % Laktose dargestellt. In der SDS-PAGE (Bild A) der Induktion mit 0,15 % Laktose ist zu erkennen, dass 4 h nach Induktion eine leichte Überproduktion der TAL und HpaB erfolgte (Prozesszeit 15 h, Spur 4). Im Vergleich dazu kann man in der SDS-PAGE (Bild C)



der Induktion mit 0,45 % eine deutlich stärkere Überproduktion erkennen. Hier ist bereits 2 h nach Induktion (Prozesszeit 13 h, Spur 3) eine Zunahme der Bandenintensität auf der Höhe der TAL und HpaB sichtbar, die dann 4 h nach Induktion (Prozesszeit 15 h, Spur 4) jeweils nochmal intensiver wird. In der Darstellung der CTR und Produktion über die Zeit bei der Induktion mit 0,15 % Laktose (Bild B) ist sichtbar, dass die CTR über die gesamte Zeit der Produktionsphase relativ stabil bleibt und sich zwischen 80 und 100 mmol/h befindet. Wie bereits bei der Sinapinsäure-Produktion mit dem Konstrukt SA1 konnte eine Vielzahl von Intermediaten nachgewiesen werden, wobei hier 6,5 mM Sinapinsäure nach 48 h produziert wurde. Ebenso wurden zwischen 4 und 6 mM Kumar-, Kaffee- und Ferulasäure akkumuliert. Im Vergleich zur Biosynthese mit SA1 wurde hier also deutlich mehr Kumarsäure jedoch weniger Kaffeesäure akkumuliert. Bei der Biosynthese mit 0,45 % Laktose (Bild D) ergibt sich ein sehr ähnliches Muster in der Intermediat-Zusammensetzung im Vergleich zur Induktion mit 0,15 % Laktose, jedoch zeigte sich eine starke Abnahme der CTR nach ca. 35 h bis auf 40 mmol/h. Trotz des Abfalls der CTR konnten auch hier ca. 6 mM Sinapinsäure produziert werden.

Die Verteilung der Intermediate entspricht der bereits im Schüttelkolben-Maßstab gefundenen Verteilung und ergibt sich mutmaßlich aus der unterschiedlichen Substratspezifität der Hydroxylasen, denn diese sind der einzige genetische Unterschied in den Konstrukten SA1 und SA2. Was bei der Biosynthese mit dem Konstrukt SA2 auffällt, ist dass hier zwar ein scheinbares Maximum in der Sinapinsäure-Konzentration nach 40 h (Prozesszeit) erreicht ist, es jedoch zu keiner Abnahme kommt. Aufgrund der kontinuierlichen Zunahme des Volumens findet hier also eine leichte Zunahme der Stoffmenge statt. Vermutlich handelt es sich um ein Gleichgewicht zwischen der ungeklärten Abnahme der Sinapinsäure und einer Nachproduktion durch die Reaktionskaskade. Ob diese Abnahme durch die unterschiedlichen Hydroxylasen zustande kommt, konnte nicht ausgeschlossen werden.

Der Vergleich der Biosynthese mit SA1 und SA2 zeigte, dass die Synthese mit SA2 (HpaB(Y3011)C aus *E. coli*) zu einer höheren Menge an Sinapinsäure führt, wobei, trotz ähnlicher Ergebnisse, die Induktion mit 0,15 % Laktose die vermutlich stabilere Produktion darstellt. Um dieses Ergebnis zu reproduzieren sollte eine weitere Parallel-Fermentation mit Induktion durch 0,15 % Laktose durchgeführt werden.

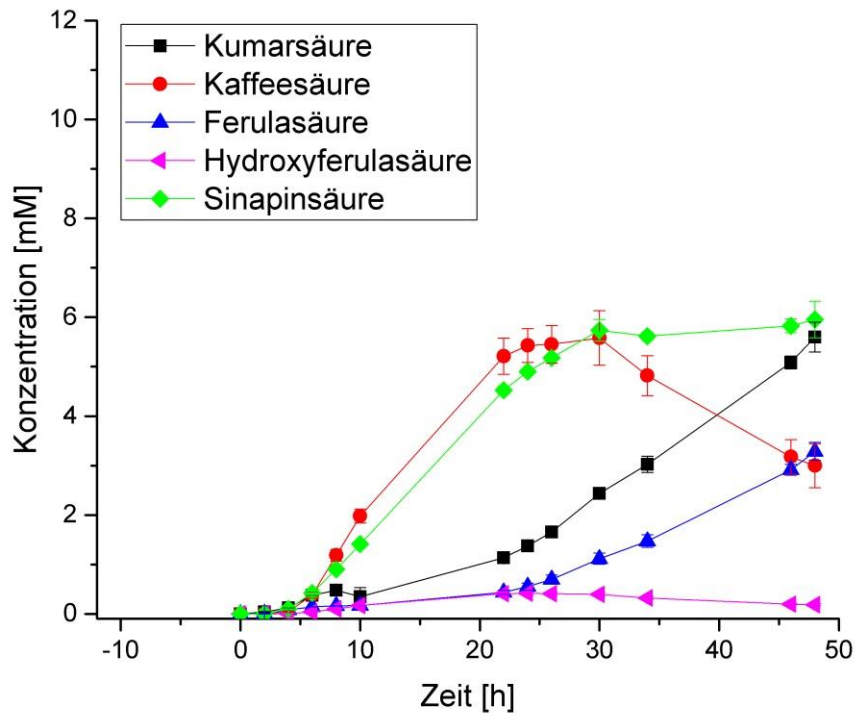


**Abb. 3.27: Parallel-Fermentation IV-b: SA2 BL21ΔR pLysT 0,15/0,45 % Laktose, 1 mM YM/h**

Die Fermentation im Parallel-Bioreaktorsystem erfolgte mit transformierten BL21ΔR pLysT-Zellen in Minimalmedium bei 37 °C. **A + B:** Induktion mit 0,15 % Laktose **C + D:** Induktion mit 0,45 % Laktose, **A + C:** SDS-PAGE (Proben nach Prozesszeit) **B + D:** Prozesszeit [h] vs. CTR [mmol/h] (linke y-Achse) vs. Konzentration der Produkte [mM] (rechte y-Achse). Ab Induktion wurden 1 mM/h Tyrosin und Methionin (40 h) hinzugegeben. Die Proben wurden zwischen 0 und 48 h nach Induktion analysiert. Schwarze-Linie: CTR, Schwarz mit Symbol: Kumarsäure, Rot: Kaffeensäure, Blau: Ferulasäure Magenta: 5-Hydroxyferulasäure, Grün: Sinapinsäure. SDS-PAGE: Markiert ist das theoretische Molekulargewicht von TAL (76 kDa), HpaB (59 kDa), PFOMT (27 kDa) und HpaC (19 kDa).

Reproduktion der Sinapinsäure-Produktion (SA2)

In Abb. 3.28 ist das Ergebnis von drei biologischen Replikaten der Sinapinsäure-Produktion mit SA2 (HpaB(Y3011)C aus *E. coli*) mit 0,15 % Laktose-Induktion gezeigt. Die Zeitachse entspricht der Produktionsphase, wodurch hier der Zeitpunkt 0 h der Zeitpunkt der Induktion ist. Obwohl es sich hier um den Nachweis von vier Intermediaten und dem Produkt Sinapinsäure handelt, konnte eine nahezu deckungsgleiche Biosynthese über 48 h gezeigt werden. Es konnten im Mittel  $5,9 \pm 0,4$  mM ( $1,3 \pm 0,1$  g/L) Sinapinsäure in 48 h produziert werden. Aufgrund der komplexen Reaktionskaskade wurde jedoch auch eine Vielzahl an Intermediaten akkumuliert. Die Ergebnisse der einzelnen Fermentationen sind im Anhang (Abb. 10.16, S. 133 und Abb. 10.17, S. 133) dargestellt.



**Abb. 3.28: Sinapinsäure-Produktion im Parallel-Bioreaktorsystem (48 h, 1 mM YM/h) (n=3)**

Die drei Fermentationen im Parallel-Bioreaktorsystem erfolgten mit SA2 transformierten BL21ΔR pLysT-Zellen in Minimalmedium bei 37 °C. Induktion erfolgte mit 0,15 % Laktose, Zugabe von 1 mM YM/h (40 h). Drei biologische Replikate sind dargestellt, Prozesszeit [h] vs. Konzentration der Produkte [mM] (y-Achse). Die Proben wurden zwischen 0 und 48 h nach Induktion analysiert. Schwarz: Kumarsäure, Rot: Kaffeesäure, Blau: Ferulasäure, Magenta: 5-Hydroxyferulasäure, Grün: Sinapinsäure.

## 4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung einer geeigneten Reaktionskaskade zur *in vivo* Biosynthese von Ferula- und Sinapinsäure in *E. coli*. Ferula- und Sinapinsäure können als Vorstufen von Sekundärmetaboliten, wie beispielsweise Vanillin, dienen oder aufgrund ihrer anti-oxidativen Wirkung zum Beispiel in Kosmetika genutzt werden. In der Literatur wurden bisher noch keine rekombinante Sinapinsäure-Produktion und nur eine relativ geringe Ferulasäure-Produktion beschrieben. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb die neuartige Sinapinsäure-Produktion und eine gesteigerte Ferulasäure-Produktion untersucht werden. Dafür wurde zunächst die Auswahl der einzelnen Enzyme der Reaktionskaskade *in vivo* und zum Teil *in vitro* untersucht. Danach wurde die Synthese sowohl im Schüttelkolben-Maßstab als auch im Parallel-Bioreaktor untersucht. Im Folgenden sollen die Ergebnisse unter Beachtung der vorhandenen Literatur diskutiert und die Zusammenhänge der Ergebnisse beleuchtet werden.

### 4.1 Produktion von Ferula- und Sinapinsäure

Die rekombinante *in vivo* Biosynthese von Ferulasäure wurde bisher in drei Arbeiten beschrieben [An et al., 2016; Choi et al., 2011; Kang et al., 2012], deren Ausbeute und Details der Produktion in Tab. 4.1 zusammengefasst sind und in den Vergleich mit der Ferulasäure-Produktion der vorliegenden Arbeit gestellt wurde. Die Publikation von Choi et al. ist dabei die Vorarbeit der Publikation von Kang et al. [Choi et al., 2011; Kang et al., 2012]. Bei den Angaben der eigenen Arbeit wird in die Synthese im Schüttelkolben und im Bioreaktor unterschieden, da die bekannte Literatur nur Angaben zur Synthese im Schüttelkolben macht.

In den Arbeiten von Choi et al. und Kang et al. wurden die TAL und Hydroxylase aus *S. espanaensis* und die COMT aus *A. thaliana* verwendet, deren Gene monocistronisch, jeweils dem T7-Promotor unterliegend, auf einem Plasmid codiert vorlagen [Choi et al., 2011; Kang et al., 2012]. In der Arbeit von An et al. wurden die TAL und Hydroxylase aus *S. espanaensis* und die COMT aus *O. sativa* verwendet, deren Gene monocistronisch, jeweils dem T7-Promotor unterliegend, auf zwei Plasmide codiert vorlagen [An et al., 2016]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Ferulasäure-Produktion mit der TAL aus *R. glutinis*, Hydroxylase aus *E. coli* und PFOMT aus *M. crystallinum* untersucht. Die Gene lagen polycistronisch dem T7-Promotor unterliegend auf einem Plasmid codiert vor. Zusätzlich wurde ein pLysT-Plasmid verwendet, welches durch Expression von T7-Lysozym eine Basalexpression unterdrückt. Die Diskussion zur Verwendung eines polycistronischen Konstruktes folgt im Kapitel 4.2.2 (S. 101 ff.).

In den Arbeiten von An et al., Choi et al. und Kang et al. wurden die Zellen zunächst in Komplexmedium angezogen, teilweise direkt mit IPTG induziert [Choi et al., 2011; Kang et

al., 2012], anschließend geerntet und in Minimalmedium resuspendiert und mit IPTG induziert (nach Ernte), um die Produktion für 36 h bei 26 °C [Choi et al., 2011; Kang et al., 2012] bzw. für 24 h bei 30 °C [An et al., 2016] durchzuführen. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich Minimalmedium verwendet. Durch zeitgleiche Induktion mit IPTG und Zugabe vom Substrat Tyrosin (und Methionin/Serin) wurde die Produktion im Schüttelkolben untersucht. Im Bioreaktor wurde mit Laktose induziert und zeitverzögert (4 h) Tyrosin und Methionin durch kontinuierlichen *feed* zugegeben. Die Unterbrechung der Kultivierung mit Wechsel des Mediums in der Literatur stellt einen entscheidenden Nachteil im Vergleich zu der vorliegenden Arbeit dar, da dieses Verfahren nicht skalierbar ist.

Durch die Verwendung einer Tyrosinüberproduzenten konnte eine Steigerung von  $0,04 \pm 0,007$  mM [Choi et al., 2011] auf  $1,0 \pm 0,1$  mM [Kang et al., 2012] Ferulasäure in 36 h erreicht werden. Auch bei der Arbeit von An *et al.* wurde ein Tyrosinüberproduzent verwendet, was in 0,32 mM Ferulasäure resultierte. Als Substrat fungierte Glukose [Choi et al., 2011; Kang et al., 2012] bzw. Glukose und Hefeextrakt [An et al., 2016], was einen Unterschied zu dieser Arbeit darstellt, da hier kein Einsatz von Tyrosin nötig ist. Im Schüttelkolben konnten jedoch auch ohne Zugabe von Tyrosin 0,17 mM in 24 h produziert werden (vorliegende Arbeit, siehe Anhang Tab. 10.1, S. 134). Diesen Wert kann man direkt mit der Angabe von Choi *et al.* ( $0,04 \pm 0,007$  mM) vergleichen [Choi et al., 2011]. Auch unter Einbeziehung der Raum-Zeit ist die Produktion mit Glukose in der vorliegenden Arbeit 6,5-fach höher ( $0,2 \pm 0,04$  mg/(L\*h) &  $1,3$  mg/(L\*h)). Die Ferulasäure-Produktion ohne Zugabe von Methyl donor ( $0,48$  mM bzw.  $3,9$  mg/(L\*h)) ordnet sich zwischen den Ausbeuten von  $1,0 \pm 0,1$  mM bzw.  $5,4 \pm 0,7$  mg/(L\*h) [Kang et al., 2012] und  $0,32$  mM bzw.  $2,7$  mg/(L\*h) [An et al., 2016] ein. Jedoch konnte in der vorliegenden Arbeit durch Zugabe von Methyl donor eine Steigerung auf  $3,55$  mM ( $28,7$  mg/(L\*h)) Ferulasäure erreicht werden. Damit ist die maximal erreichte Ferulasäure-Produktion im Schüttelkolben der vorliegenden Arbeit im Vergleich zum höchsten Wert der Literatur 3,5-fach und bei der Raum-Zeit-Ausbeute 5,3-fach höher. Die Ausbeute der Produktion im Bioreaktor mit Zugabe von Tyrosin und Methionin von  $9,6 \pm 1,4$  mM ist 9,7-fach höher als bei Kang *et al.*, wobei die Raum-Zeit-Ausbeute 7,2-fach höher ist [Kang et al., 2012]. Da es für die Sinapinsäure keine publizierte rekombinante Produktion gibt, kann man zur Orientierung die Angaben zur Ferulasäure-Produktion verwenden. Es wurden  $5,9 \pm 0,4$  mM Sinapinsäure in 48 h produziert, was einer 6,6-fach höheren Ausbeute im Vergleich zu Kang *et al.* entspricht, obwohl zwei weitere Reaktionen nötig sind um Sinapinsäure aus Ferulasäure zu bilden [Kang et al., 2012]. Auch bei der Produktion von Kaffeesäure konnten bisher maximal  $4,26$  mM [Huang et al., 2013] ausgehend von Glukose (Tyrosinüberproduzent), und  $1,55$  mM [Rodrigues et al., 2015] ausgehend von Tyrosin produziert werden.

Ursprünglich war auch für die vorliegende Arbeit die genomische Integration der Tyrosin-Biosynthese-Gene geplant, jedoch ist es durchaus wahrscheinlich, dass eine weitere metabolische Belastung der Zellen durch die zusätzliche Reaktionskaskade zur Tyrosin-Synthese nachteilig für die Produktion von Ferula- oder Sinapinsäure ist. Die vorliegende Arbeit liefert einige Hinweise darauf, dass die Zellvitalität von entscheidender Bedeutung für die Produktausbeute ist, was wiederum bedeuten könnte, dass die Entkopplung von Tyrosin und Ferula- bzw. Sinapinsäure-Produktion effizienter ist. Die geringeren Ausbeuten der Literatur könnten neben Unterschieden in der Enzymauswahl und der fehlenden Prozessoptimierung, wie Expressionsregulation und *metabolic engineering* (Methionin-Zugabe), auch auf die Verwendung eines Tyrosin-Überproduzenten zurückzuführen sein.

Die Ferulasäure-Produktion mit Tyrosin und Methionin, sowie der Induktion mit 0,45 % Laktose wurde reproduziert (siehe Anhang Abb. 10.12, Abb. 10.13, S. 131). Das Ergebnis der drei biologischen Replikate zeigt, dass  $9,6 \pm 1,4$  mM ( $1,9 \pm 0,2$  g/L) Ferulasäure in 48 h produziert werden konnten (Abb. 3.25, S. 85). Dies entspricht einer Standardabweichung von 15 %, wobei diese stärkere Abweichung erst 46 h nach Induktion anfällt. Bei Betrachtung der einzelnen Fermentation fällt auf, dass 10,6 mM, 10,7 mM und 7,6 mM Ferulasäure produziert wurden, wobei letztere auch einen starken Abfall in der CTR aufwies, was weiter bestätigt, dass es sich um eine empfindliche Balance zwischen Expression und Zellvitalität resultierend in der Produktkonzentration handelt. Dadurch konnten 2 mM Kumarsäure und 3 mM Kaffeesäure nicht umgewandelt werden. In den anderen Fermentationen wurde keine Kumarsäure und nur maximal 2 mM Kaffeesäure akkumuliert. Wenn man diese Differenz zu der erreichten Ferulasäure-Konzentration addiert, so ergibt dies ebenso 10,6 mM Phenylpropansäuren. Eine weitere Feinabstimmung zwischen 0,15 % und 0,45 % zur noch stabileren Reproduktion wäre also durchaus sinnvoll. Trotzdem konnte die Produktion von Ferulasäure erfolgreich reproduziert werden. Im Vergleich zur Literatur der Ferulasäure-Produktion wurden Standardabweichungen von 13 – 21 % publiziert [Choi et al., 2011; Kang et al., 2012], womit sich die Standardabweichung in der vorliegenden Arbeit in diesen Bereich einordnet. Der Kurvenverlauf der Ferulasäure-Konzentration scheint zwar nach 48 h langsamer zu steigen als zu Beginn der Biosynthese, jedoch ist noch keine Stagnation erkennbar, was dafür spricht, dass eine weitere Zunahme möglich wäre. Trotzdem sollte beachtet werden, dass 10 mM Ferulasäure zu einer halbmaximalen Wachstumsrate ( $EC_{50}$ ) führt (Daten nicht gezeigt), weshalb eine weitere Steigerung durch inhibitorische Effekte des Produktes durchaus problematisch werden könnte.

Auch das Ergebnis der Sinapinsäure-Produktion mit SA2 und 0,15 % Laktose-Induktion wurde reproduziert (siehe Anhang Abb. 10.16, Abb. 10.17, S. 133). In der Darstellung der drei biologischen Replikaten kann man erkennen, dass eine Biosynthese der Sinapinsäure mit  $5,6 \pm 0,4$  mM ( $1,3 \pm 0,1$  g/L) erzielt wurden (Abb. 3.28, S. 91). Die Standardabweichung

ist dabei bei allen Intermediaten sehr gering, wobei die Abweichung für Sinapinsäure nach 48 h nur 7 % beträgt. Dies spricht für einen sehr gut reproduzierbaren Prozess zur Produktion von Sinapinsäure. Eine rekombinante Sinapinsäure-Produktion wurde bisher noch nicht beschrieben.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass eine deutliche Steigerung der Ferulasäure-Produktion in dieser Arbeit gelang und eine bisher neuartige rekombinante Produktion von Sinapinsäure erfolgreich etabliert werden konnte.

**Tab. 4.1: Vergleich der Ferulasäure-Produktion in der Literatur und in der vorliegenden Arbeit**

Darstellung der für die Ferulasäure-Produktion relevanten Informationen aus [An et al., 2016; Choi et al., 2011; Kang et al., 2012] und dieser Arbeit. Abkürzungen: *Se*: *Saccharothrix espanaensis*, *At*: *Arabidopsis thaliana*, *Os*: *Oryza sativa*, *Rg*: *Rhodotorula glutinis*, *Ec*: *Escherichia coli*, *Mc*: *Mesembryanthemum crystallinum*, SK: Schüttelkolben, BR: Bioreaktor, LB: Komplexmedium *lysogeny broth*

	<b>Choi et al.</b>	<b>Kang et al.</b>	<b>An et al.</b>	<b>„Dornheim et al.“ SK</b>	<b>„Dornheim et al.“ BR</b>
Enzyme	SeSam8, SeSam5, AtCOMT		SeSam8, SeSam5, OsCOMT	RgTAL, EcHpaBC, McPFOMT	
Plasmid(e)/ Konstrukte	pET28a_Sam8_Sam5_ COMT monocistronisch (T7 Promotor)		pCDFDuet_Sam5_COMT pACYCDuet_aroG <sup>fbr</sup> _ Sam8_tyrA <sup>fbr</sup> monocistronisch (T7 Promotor)	pRSFDuet_TAL_HpaBC_PFOMT pLysT polycistronisch (T7 Promotor)	
Zelllinie	C41(DE3)	C41(DE3) ΔtyrR:tyrA <sup>fbr</sup> aroG <sup>fbr</sup>	BL21(DE3) ΔtyrRΔpheA	BL21(DE3)	BL21 ΔtyrR:T7
Details der Produktion	SK diskontinuierlich Expression 5 h, 37 °C, LB → Expression 36 h, 26 °C, Minimalmedium		SK diskontinuierlich 37 °C, bis OD <sub>600</sub> =1 → Expression 24 h, 30 °C, Minimalmedium	SK kontinuierlich Expression 24 h, 37 °C, Minimalmedium	BR kontinuierlich, ca. 1 l Expression 48 h, 37 °C, Minimalmedium
Substrat	40 g/L Glukose	15 g/L Glukose	20 g/L Glukose + 10 g/L Hefeextrakt	a) 20 g/L b) 2 mM Y (=0,36 g/L) c) 50 mM Y,M,S (=9,1 g/L Y)	2,55 g/h Glukose + 40 mM Y,M (=7,2 g/L Y)
Konzentration [mM]	0,04 ± 0,007	<b>1,0 ± 0,1</b>	0,32	a) 0,17 b) 0,49 c) 3,55	<b>9,6 ± 1,4</b>
Konzentration [mg/L]	7,1 ± 1,3	<b>196 ± 26</b>	64	a) 33 b) 95 c) 689	<b>1900 ± 200</b>
Raum-Zeit- Ausbeute [mg/(L*h)]	0,2 ± 0,04	<b>5,4 ± 0,7</b>	2,7	a) 1,3 b) 4,0 c) 28,7	<b>39 ± 4,2</b>



### 4.1.1 Limitierungen bei *in vivo* Multienzymkaskaden

Der Einsatz von *in vivo* Multienzymkaskaden rückt aufgrund der Vorteile gegenüber *in vitro* Reaktionen immer weiter in den Fokus der biotechnologischen Forschung. Ein großer Vorteil ist dabei die Minimierung des *Downstream Processing*, da eine Reinigung der Enzyme unnötig ist. Obwohl viele Argumente für einen Einsatz von *in vivo* Multienzymkaskaden sprechen (siehe auch Kapitel 1.1.4, S. 20), gibt es auch Grenzen und Probleme die auftreten können. Bekannte Probleme sind beispielsweise die signifikante metabolische Last durch die Expression von mehreren rekombinanten Proteinen und der Kompromiss der optimalen Bedingungen für Zellwachstum und Expression. Weitere Probleme können die Limitierung beim Transport von Substraten und Produkten durch die Zellmembran und das Risiko der Metabolisierung von Substraten, Intermediaten oder Produkten durch Wirtszellenzyme darstellen [France et al., 2017]. Die Grenze von *in vivo* Multienzymkaskaden bezogen auf die Expression der Gene von einem Plasmid innerhalb einer Zelle liegt dabei bei vier Genen [Both et al., 2016], wobei dies schon als äußerst schwierig beschrieben wird [France et al., 2017]. Es wurde dabei festgestellt, dass die Erweiterung auf zwei Plasmide zu einem stabileren Biokatalysator führt [Both et al., 2016]. Li et al. beschreiben beispielsweise die Verwendung von separaten Enzymmodulen, wobei durch Co-Expression von maximal drei verschiedenen Plasmiden eine Reaktion mit bis zu acht Enzymen möglich war [Li et al., 2016]. Eine weitere Möglichkeit der Erweiterung der Multienzymkaskaden ist die Verwendung von Mischkulturen, wobei die Plasmid-basierte Expression auf verschiedene Zellen aufgeteilt werden kann und so die metabolische Last verringert werden kann [Oberleitner et al., 2017]. Um Probleme mit der Stabilität bei Transformation und Expression durch sehr große Plasmide zu vermeiden, ist die genomische Integration eine zwar aufwendige doch gute Alternative zur Plasmid-basierten Expression [Tyo et al., 2009]. Die genomische Integration ist jedoch nur für final optimierte Kaskaden eine Option, da eine Veränderung der Kaskade, beispielsweise durch *Protein Engineering*, auf Plasmid-Ebene deutlich einfacher erfolgen kann.

Die vorliegende Arbeit mit einer drei- bis fünf-schrittigen Reaktion, die auf der Expression von vier Genen, codiert auf einem Plasmid, liegt im Vergleich zur Literatur also bereits an der kritischen Grenze zur Verwendung von *in vivo* Multienzymkaskaden. Im Vergleich zu den oben genannten Arbeiten wurde in der vorliegenden Arbeit mit einem polycistronischen Konstrukt gearbeitet, was die Größe des Zielplasmides verkleinert und damit eventuell Probleme der Stabilität verringert hat. Die Problematik der Metabolisierung von Substrat und Intermediaten durch Wirtszellenzyme wurde auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet, was zur Reduktion der Ausbeute führte. Das Thema der Nebenreaktionen wird später im Kapitel 4.2.3 (S. 103) näher diskutiert. Auch die metabolische Last durch die Expression der Zielgene und die daraus resultierenden Reaktionen konnte in der vorliegenden Arbeit

beobachtet und untersucht werden. Auch dieses Thema wird später in Kapitel 4.3 (S. 105 ff.) näher diskutiert werden.

## 4.2 Enzymkaskade und deren Reaktionsfluss

### 4.2.1 Aktivität der Einzelenzyme

#### 4.2.1.1 TAL

Für die Identifizierung einer geeigneten TAL für die rekombinante Biosynthesekaskade wurden *in vivo* (siehe 3.1.1, S. 43) und zum Teil *in vitro* (siehe 3.1.4.1, S. 56) Ergebnisse, wie Expressionsfähigkeit und Aktivität, betrachtet. Bei der Literaturrecherche kristallisierten sich die TALs aus *R. capsulatus* und *R. glutinis* aufgrund ihrer enzymkinetischen Parameter und Verwendung in der *in vivo* Produktion heraus (Tab. 1.1, S. 17, Tab. 1.2, S. 18).

Die *RcTAL* wurde in dieser Arbeit *in vivo* im Konstrukt FA1 (Flag-*RcTAL\_EcHpaBC\_McPFOMT*) getestet. Bei dem Test der Aktivität der Reaktionskaskade mit *RcTAL* konnte nur ein sehr geringer Gesamtumsatz innerhalb von 24 h nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung der Löslichkeit zeigte sich, dass die TAL zum Großteil unlöslich produziert wird, weshalb eine *in vitro* Untersuchung nicht durchgeführt wurde. Im Vergleich zur Literatur wurde in der vorliegenden Arbeit die Sequenz der *RcTAL* Codon-Usage optimiert. Es ist bekannt, dass eine Codon-Usage Optimierung auch einen negativen Einfluss auf die rekombinante Produktion haben kann, da die Codons einen Einfluss auf die Translationsgeschwindigkeit und damit auf die Faltung haben können [Mignon et al., 2018]. Die sogenannte Codon-Harmonisierung könnte deshalb zu einer Erhöhung der Löslichkeit des rekombinant produzierten Proteins führen.

Die *RgTAL* wurde in der vorliegenden Arbeit *in vivo* im Konstrukt FA2 (*RgTAL-Flag\_EcHpaBC\_McPFOMT*) und einzeln *in vitro* untersucht. Bei der *in vivo* Untersuchung im Schüttelkolben wurden 0,5 mM Tyrosin innerhalb von 24 h in 0,36 mM (2,75 mg/(L\*h)) Ferulasäure umgesetzt. In der Arbeit von Rodrigues *et al.* wurden beispielsweise 1 mM (2,9 mg/(L\*h)) Kaffeesäure mit der *RgTAL* und *SeSam5* unter Einsatz von 3 mM Tyrosin produziert [Rodrigues et al., 2015], was bezogen auf Raum-Zeit-Ausbeute nahe an der Ferulasäure-Produktion der vorliegenden Arbeit liegt. Bei der *in vitro* Charakterisierung konnten ein  $K_M=216 \mu\text{M}$  und  $k_{\text{cat}}=0,9 \text{ s}^{-1}$  bestimmt werden, welche in der gleichen Größenordnung mit den publizierten Daten ( $K_M=110 \mu\text{M}$  und  $k_{\text{cat}}=0,46 \text{ s}^{-1}$ ) von [Gatenby et al., 2002] liegen. Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit eine starke kompetitive Produkthemmung (Kumarsäure) mit einem  $K_i=16 \mu\text{M}$  (pH=8,3) nachgewiesen. Eine kompetitive Hemmung wurde bereits für die *RgTAL* beschrieben, wobei ein  $K_i=20 \mu\text{M}$  (Kumarsäure) bei pH=7 und ein  $K_i=659 \mu\text{M}$  (Kumarsäure) bei pH=9,5 bestimmt wurde [Sariaslani, 2007]. Die Produkthemmung spiegelt sich auch in der *in vivo* Anwendung für die Kumar- und Kaffeesäure-Produktion wider. So konnte mehr als doppelt so viel Kaffeesäure

wie Kumarsäure produziert werden [Huang et al., 2013], da die zweite Reaktion die Akkumulation des Inhibitors verhindert.

#### 4.2.1.2 Hydroxylase

Für die Identifizierung einer geeigneten Hydroxylase (HpaBC) für die rekombinante Biosynthesekaskade wurden *in vivo* (siehe 3.1.2, S. 49) und zum Teil *in vitro* (siehe 3.1.4.2, S. 58 und 3.1.4.3, S. 59) Ergebnisse, wie Expressionsfähigkeit und Aktivität, betrachtet. Aufgrund der Literaturrecherche wurden die HpaBCs aus *E. coli*, *P. aeruginosa* und *S. espanaensis* zur weiteren Untersuchung ausgewählt (Tab. 1.1, S. 17, Tab. 1.2, S. 18).

Bei der Expression der *EcHpaBC* fällt auf, dass die HpaB sehr stark überproduziert wird, jedoch die HpaC nicht sichtbar überproduziert wird. Natürlicherweise liegt die HpaBC als Bicistron vor, wodurch das Verhältnis von HpaB und HpaC reguliert wird. Auch bei Prieto *et al.* ist dies bei der Expression erkennbar [Prieto et al., 1993]. Bei einem monocistronischem Konstrukt wird auch die HpaC stark überproduziert [Shrestha et al., 2018]. Aufgrund der hohen Affinität der HpaC zu FAD ( $K_M=3,1 \mu\text{M}$ ) und NADH ( $K_M=40 \mu\text{M}$ ) kann man vermuten, dass *E. coli* dieses Enzym nur sehr gering konzentriert im Verhältnis zur HpaB benötigt [Galán et al., 2000]. Bei der *in vivo* Untersuchung der Aktivität in dieser Arbeit wurde bestätigt dass die *EcHpaBC* keine 5-Hydroxylase-Aktivität besitzt, was zuvor auch publiziert wurde [Prieto et al., 1993]. In der *in vitro* Untersuchung der *EcHpaBC* konnte ein  $K_M=3 \text{ mM}$  und  $k_{\text{cat}}=1,9 \text{ s}^{-1}$  für Kumarsäure bestimmt werden. Im Vergleich zum natürlichen Substrat 4-Hydroxyphenylacetat ( $K_M=18,4 \mu\text{M}$  und  $k_{\text{cat}}=1,1 \text{ s}^{-1}$ , [Lin und Yan, 2014]) stellt dies eine deutliche Verschlechterung des  $K_M$ -Wertes dar, was jedoch aufgrund des größeren Substrates nicht unerwartet war. Es wurde bereits für Resveratrol und Umbelliferon, beides größere und aromatische Substrate, der  $K_M=145 \mu\text{M}$  und  $k_{\text{cat}}=0,09 \text{ s}^{-1}$  (Resveratrol) und  $K_M=262 \mu\text{M}$  und  $k_{\text{cat}}=0,07 \text{ s}^{-1}$  (Umbelliferon) beschrieben [Lin und Yan, 2014]. Da diese Werte jedoch deutlich niedriger als der für die Kumarsäure sind, kann man vermuten, dass es neben den sterischen Unterschieden weitere Gründe für die niedrigere Affinität gibt.

Die Expression der *PaHpaBC* zeigte eine Überproduktion der HpaB aber keine sichtbare Überproduktion der HpaC, da auch hier die HpaBC als Bicistron vorliegt. Die *in vivo* Aktivitätsuntersuchung der *PaHpaBC* in der vorliegenden Arbeit zeigte einen schnelleren Umsatz der Kumarsäure in Kaffeesäure im Vergleich zur *EcHpaBC*, was mit dem sehr schnellen Umsatz in der Literatur korreliert [Furuya und Kino, 2014]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die *PaHpaBC* eine 5-Hydroxylase-Aktivität besitzt, da Ferulasäure in 5-Hydroxyferulasäure umgesetzt wurde. Auch die 5-Hydroxylase-Aktivität wurde bereits beschrieben [Furuya und Kino, 2014]. Die *in vitro* Aktivitätsmessung ergab einen  $K_M=300 \mu\text{M}$  und  $k_{\text{cat}}=1,2 \text{ s}^{-1}$ . Auch diese Daten bestätigen, dass die *PaHpaBC* eine deutlich höhere katalytische Effizienz für die Hydroxylierung der Kumarsäure als die *EcHpaBC* aufweist.

Bei dem Expressionstest der SeHpaBC zeigte sich, dass die SeHpaB schwächer überproduziert wird als die Ec/PaHpaB und die HpaC wiederum nicht sichtbar überproduziert wird. Vermutlich gegeben durch die schwächere Expression wurde auch bei dem *in vivo* Aktivitätstest ein langsamerer Umsatz der Kumarsäure in den ersten Stunden der Reaktion nachgewiesen, wobei nach 24 h auch hier ein vollständiger Umsatz erfolgte. Eine 5-Hydroxylase-Aktivität konnte nicht nachgewiesen werden. Trotz der wiederholten Verwendung in der Literatur [An et al., 2016; Kang et al., 2012; Rodrigues et al., 2015; Zhang und Stephanopoulos, 2013], konnte in der vorliegenden Arbeit keine höhere Aktivität dieser Hydroxylase im Vergleich zur Ec/PaHpaBC nachgewiesen werden.

#### 4.2.1.2.1 Vergleich PaHpaBC und EcHpaB(Y301I)C (Sinapinsäure-Produktion)

Die Biosynthese von Sinapinsäure wurde mit den Konstrukten SA1 (PaHpaBC) und SA2 (EcHpaB(Y301I)C), sowohl im Schüttelkolben (siehe 3.2, S. 65) als auch im Parallel-Bioreaktor (siehe 3.3.4, S. 86), untersucht. Während der Experimente zur Sinapinsäure-Produktion fiel die starke Akkumulation von Kaffeesäure bei der Produktion mit SA1 und Kumarsäure bei der Produktion mit SA2 auf. Diese Unterschiede in der Intermediat-Akkumulation deuten auf unterschiedliche Substratspezifitäten der Hydroxylasen hin. Die Ergebnisse zum Umsatz von Ferulasäure (Abb. 3.19, S. 72) zusammen mit den Ergebnissen zum Umsatz von Tyrosin (Abb. 3.18, S. 70; Abb. 3.26, S. 88; Abb. 3.27, S. 90) zeigen, dass die PaHpaBC eine höhere Substratspezifität gegenüber Kumarsäure, also eine höhere 3-Hydroxylase-Aktivität, aufweist und die EcHpaB(Y301I)C eine höhere Substratspezifität gegenüber Ferulasäure, also einer höheren 5-Hydroxylase-Aktivität, aufweist. Die hohe Spezifität der PaHpaBC gegenüber Kumarsäure deutete sich bereits in der *in vivo* Untersuchung der PaHpaBC an, da hier sehr schnell Kumarsäure zu Kaffeesäure hydroxyliert wurde (Abb. 3.7, S. 52). Die *in vitro* Untersuchungen bestätigten, dass die PaHpaBC einen niedrigen  $K_M$ -Wert von 0,3 mM (Kumarsäure) aufweist (3.1.4.3, S. 59). Eine *in vitro* Untersuchung der EcHpaB(Y301I)C wurde nicht durchgeführt, jedoch wurde für die Wildtyp HpaB(C) ein deutlich höherer  $K_M$ -Wert von 3 mM (Kumarsäure) bestimmt (3.1.4.2, S. 58). Inwiefern die Punktmutation eine Änderung der enzymkinetischen Parameter zur Folge hat, kann nicht beurteilt werden. Auch während der Produktion von Sinapinsäure im Bioreaktor mit dem Konstrukt SA2 (EcHpaB(Y301I)C) zeigte sich eine sehr starke Akkumulation von bis zu 14 mM Kaffeesäure (Abb. 3.27, S. 90), welche die zuvor erläuterte hohe Affinität gegenüber Kumarsäure unterstreicht.

#### 4.2.1.3 O-Methyltransferase

Für die Auswahl der OMT wurden die *in vivo* Ergebnisse (siehe 3.1.3, S. 53), wie Expressionsfähigkeit und Aktivität, betrachtet. Aufgrund der Literaturrecherche wurden die OMTs aus *M. crystallinum*, *M. sativa* und *L. perenne* zur weiteren Untersuchung ausgewählt

(Tab. 1.1, S. 17, Tab. 1.2, S. 18). Für die rekombinant in *E. coli* produzierte PFOMT aus *M. crystallinum* wurden die enzymkinetischen Parameter  $K_M=1 \mu\text{M}$  und  $k_{\text{cat}}=0,02 \text{ s}^{-1}$  für Kaffeesäure publiziert [Kopycki et al., 2008]. Der Expressionstest in der vorliegenden Arbeit zeigte eine starke Überproduktion der McPFOMT. In einem *in vivo* Aktivitätstest wurde ein zunächst relativ schneller Umsatz von Kaffeesäure in Ferulasäure nachgewiesen, der jedoch innerhalb von 24 h unvollständig blieb. Obwohl die McPFOMT eine hohe Affinität gegenüber Kaffeesäure besitzt, so handelt es sich jedoch um eine langsame Reaktion was sich in der niedrigen Wechselzahl zeigt. Da hier bereits eine schnelle Limitierung der Reaktion zu beobachten ist, kann man mutmaßen, dass es sich um eine Limitierung durch ein Cosubstrat oder auch Limitierungen im Transport handelt. Dies soll in der Betrachtung der gesamten Reaktionskaskade weiter diskutiert werden (siehe 4.2.2, S. 101 ff.). Bei der Zugabe von 5-Hydroxyferulasäure zeigte sich, dass die McPFOMT eine 5-Methyltransferase-Aktivität besitzt, jedoch konnte dieser Aktivitätstest nicht quantitativ beurteilt werden, da es sich bei dem Substrat um eine instabile Substanz handelt.

Im Expressionstest der MsCOMT zeigte sich eine gute, jedoch schwächere Überproduktion im Vergleich zur McPFOMT. Im *in vivo* Aktivitätstest zeigte sich ein langsamerer Umsatz von Kaffeesäure in Ferulasäure. Auch hier zeigte sich ein unvollständiger Umsatz. Bei der Zugabe von 5-Hydroxyferulasäure bestätigte sich, dass auch MsCOMT eine 5-Methyltransferase-Aktivität besitzt. In der Literatur wurde eine höhere Affinität der MsCOMT zu 5-Hydroxyferulasäure als zu Kaffeesäure publiziert [Parvathi et al., 2001]. Aufgrund der Instabilität dieser Substanz konnte dies in dieser Arbeit nicht beurteilt werden.

#### 4.2.2 Gesamtkaskade (*in vitro* & *in vivo* Daten)

Für die Betrachtung des Zusammenspiels der Enzyme in der Gesamtkaskade wurden die *in vitro* Ergebnisse der TAL (siehe 3.1.4.1, S. 56) und HpaBC (siehe 3.1.4.2, S. 58) sowie die *in vivo* Ergebnisse der Reaktionskaskade (siehe 3.1.5, S. 62) untersucht. Bei dem Vergleich der *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse ist zu beachten, dass es sich bei der Analyse der Intermediate und des Produktes immer um die extrazelluläre Konzentration handelt. In welcher genauen Konzentration sich die Intermediate und Produkte intrazellulär akkumulieren konnte nicht bestimmt werden, jedoch konnte eine hohe Konzentration ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Die intrazellulären Konzentrationen könnten dabei einen genaueren Blick auf die Reaktionskaskade unabhängig von Transportmechanismen und damit auf den tatsächlichen Reaktionsfluss geben. Aufgrund der veränderlichen Intermediat-Zusammensetzung mit Weiterreaktion bis hin zur Ferulasäure kann von einer Art Gleichgewicht zwischen Import und Export ausgegangen werden. Der Export der Kumarsäure erfolgt über die Effluxsysteme AcrAB und AaeXAB [Sariaslani, 2007;

Van Dyk et al., 2004], weshalb es wahrscheinlich ist, dass auch die anderen Zimtsäurederivate darüber transportiert werden.

Die *in vitro* Daten (siehe 3.1.4, S. 59ff) zeigen, dass eine Inhibierung des Flusses in der Reaktionskaskade zwischen der ersten und zweiten Reaktion auftritt. Dies kommt durch die Produktinhibierung (Kumarsäure) der ersten Reaktion (TAL) und der niedrigen Affinität der HpaB gegenüber der Kumarsäure zustande. Bei der Berechnung der katalytischen Effizienz ( $k_{cat}/K_M$ ) ist zudem erkennbar, dass es sich bei der Hydroxylierung um die ineffizienteste Reaktion ( $6,3 \times 10^2 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) handelt, wobei die TAL mit  $4,2 \times 10^3 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$  ebenso ineffizienter als die Methylierung ( $2 \times 10^4 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) [Kopycki et al., 2008] ist. Das mögliche *Bottleneck* der katalytischen geringsten Effizienz der HpaB könnte sich in der Akkumulation von Kumarsäure zeigen. Neben den enzymkinetischen Parametern sind jedoch auch die Enzymmenge und die Abhängigkeit von Cosubstraten wichtig. In einem Expressionstest der Enzyme der Gesamtkaskade (FA2) zeigte sich, dass die TAL und HpaB sehr gut überproduziert werden, HpaC und PFOMT jedoch nicht sichtbar überproduziert vorliegen. Im Expressionstest der HpaBC einzeln zeigte sich, dass auch hier die HpaC nicht sichtbar überproduziert vorliegt, was vermutlich an der natürlichen Regulation im Bicistron liegt. Aufgrund der 3'-Position der PFOMT nach der HpaBC könnte diese natürliche Regulation der geringen HpaC-Transkription auch einen negativen Einfluss auf die Transkription der PFOMT haben. Auch aufgrund der Länge der mRNA (4000 nt) kann es zu vorzeitigen Abbrüchen kommen, was durch die Lage der PFOMT am 3'-Ende zu einer geringeren Proteinkonzentration führen würde. Obwohl dies ein Nachteil bei der Verwendung eines polycistronischen Konstruktes darstellt, so überwiegen jedoch die Vorteile gegenüber einem monocistronischen Konstruktes. Bei einem Polycistron können durch die Verwendung eines Operons deutlich kürzere Sequenzen designt werden, die zudem weniger repetitive Sequenzen enthalten. Bei vier benötigten Genen würde dies ein sehr viel größeres Konstrukt ergeben. Auch der spezifische Stopp der Polymerase kann bei monocistronischen Konstrukten problematisch sein, so kann es zum Überlesen kommen, was zu einem falschen Genprodukt führt. Bei einem Polycistron wird die Translation außerdem nicht von der Stabilität der einzelnen verschiedenen mRNAs beeinflusst. Eine mögliche Optimierung der Expression könnte jedoch die Veränderung der Reihenfolge der Gene zu TAL-HpaB-PFOMT-HpaC sein, um so die Konzentration an PFOMT zu erhöhen.

Für den *in vivo* Aktivitätstest sollte eine Kultivierung in Minimalmedium etabliert werden. Dabei wurde festgestellt, dass die Verwendung eines pLys-Systems (T7-Lysozym) zur Inhibierung der basalen T7-Polymerase-Aktivität notwendig ist, um Plasmidverlust zu vermeiden. Dies wurde auf eine Basalexpression und eine einhergehende Toxizität der Genprodukte zurückgeführt. Man kann vermuten, dass diese Toxizität auf die Aktivität der Gesamtkaskade zurückgeht, da hierbei Tyrosin dem Stoffwechsel von *E. coli* entzogen wird,

welches in Minimalmedium nicht supplementiert wird. Ein eindeutiger Beweis dafür wurde jedoch nicht gefunden. In der Literatur wurden die Zellen in Komplexmedium angezogen, zum Teil induziert, dann geerntet und ungewaschen in Minimalmedium für die Produktion der Ferulasäure umgesetzt [An et al., 2016; Choi et al., 2011; Kang et al., 2012]. Eventuell wurde so die Problematik der Toxizität auf reinem Minimalmedium umgangen. Da bei diesem Ablauf jedoch Komplexmedium mit in das Minimalmedium übertragen wird, ist eine Vergleichbarkeit und Bilanzierung stark fehlerbelastet. Man kann außerdem vermuten, dass die nicht adaptierten Zellen ein inhibiertes Wachstum im Minimalmedium aufweisen, weshalb dieser experimentelle Ablauf keine Option für diese Arbeit war.

Bei der Zugabe von 0,5 mM Tyrosin (Abb. 3.5, S. 49) zeigte sich nach 2 h hauptsächlich die Akkumulation von Kumarsäure, nach 4 h stärker die Akkumulation von Kaffeesäure, jedoch bereits hauptsächlich die Biosynthese von Ferulasäure. Nach 24 h kann man eine annähernd vollständige Umwandlung in Ferulasäure erkennen. Dies zeigt, dass anfangs die Hydroxylierung langsamer ist als die Desaminierung. Dies entspricht dem Reaktionsfluss, der sich aus den *in vitro* Daten ableiten ließ. Nach 4 h zeigt sich jedoch, dass bereits mehr Kaffeesäure als Kumarsäure akkumuliert wurde und bereits hauptsächlich Ferulasäure gebildet wurde. Auch nach 20 h konnte man neben Ferulasäure ausschließlich Kaffeesäure nachweisen. Dies zeigt, dass zwar anfangs die zweite Reaktion langsamer ist als die erste, jedoch schlussendlich eher die dritte Reaktion die langsamste ist. Durch Steigerung der Substratmenge (Abb. 3.15, S. 65) zeigt sich dieses *Bottleneck* noch deutlicher, so steigt die Kaffeesäure Akkumulation (bis 5 mM) mit steigender Substratmenge, die Ferulasäure-Produktion stagniert jedoch bei einer Konzentration von ca. 0,5 mM. Es wurde gezeigt, dass dieses *Bottleneck* nicht auf die geringe Konzentration der PFOMT zurückgeht, sondern auf die Limitierung des Cosubstrates SAM bzw. dessen Vorstufe Methionin. Bei Zugabe von Methionin bzw. dessen Vorstufe Serin konnten im Schüttelkolben bis zu 3,5 mM Ferulasäure in 24 h mit relativ geringer Akkumulation von Kaffeesäure gezeigt werden (Abb. 3.15, S. 65). Aufgrund dieser starken Limitation kommt das *in vitro* bestimmte *Bottleneck* kaum zum Tragen.

### 4.2.3 Nebenreaktionen

Mögliche Nebenreaktionen der Reaktionskaskade sind in Kapitel 1.1.3.5 (S. 19 ff.) beschrieben. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde eine Braunfärbung der Kulturen während der Produktion von Ferula- und Sinapinsäure beobachtet. Diese Verfärbung des Mediums wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben, die auf die Bildung von Melanin-ähnlichen Polymeren, einem bräunlichen bis schwarzen Farbpigment, zurück zuführen ist [Plonka und Grabacka, 2006; Zhang und Stephanopoulos, 2013]. Melanin wird durch Hydroxylierung von Tyrosin oder DOPA und weiter zu Dopachinon gebildet, wobei nachfolgende Reaktionen autokatalytisch ablaufen [Plonka und Grabacka,

2006]. Alternativ zu DOPA als Substrat wird die Melaninbildung auch ausgehend von Kaffeesäure beschrieben [Jang et al., 2018]. Auch für die HpaBC ist eine solche Aktivität beschrieben, wobei Dibenzochinon gebildet wird, was dann autokatalytisch zu Melanin-ähnlichen Polymeren reagiert [Gibello et al., 1995]. Während der Sinapinsäure-Produktion wurden die Kulturen abgedunkelt, um Nebenreaktionen, wie eine lichtinduzierte Reaktion der 5-Hydroxyferulasäure zu vermeiden. Eine solche Reaktion wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben wurde, jedoch wurde eine Abdunkelung der Kulturen bei der Kaffeesäure-Produktion beschrieben, um die Bildung von Allomelanin-ähnlichen Polymeren zu minimieren [Zhang und Stephanopoulos, 2013]. Es wäre eine ähnliche Reaktion ausgehend von 5-Hydroxyferulasäure denkbar, da diese Substanzen sich nur durch eine Methoxygruppe unterscheiden. Interessanterweise konnte kein Effekt bei der Ferulasäure-Produktion durch Abdunkelung der Schüttelkolben festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die enzymkinetischen Parameter, die in dieser Arbeit bestimmt wurden (siehe 3.1.4, S. 56 ff.), deuten an, dass der bevorzugte Weg durch die Kaskade dem gewünschten Weg zur Produktion von Ferula- und Sinapinsäure entspricht, da die RgTAL eine höhere Affinität gegenüber Tyrosin ( $K_{M,app}=216 \mu\text{M}$ ) als gegenüber DOPA ( $K_{M,app}=1,2 \text{ mM}$ ) aufweist. Da jedoch die Affinität der HpaB gegenüber Tyrosin nicht bestimmt wurde, ist eine Aussage über das Ausmaß der Nebenreaktion nicht möglich. Eine Affinität der TAL oder HpaB gegenüber DOPA wurde bisher noch nicht publiziert.

Eine weitere Nebenreaktion ist der natürliche Abbauweg von Tyrosin über TyrB und AspC in *E. coli* [Gelfand und Steinberg, 1977; Mavrides und Orr, 1975]. Einen Hinweis auf diese Nebenreaktion liefern die Ergebnisse der Produktion im Bioreaktor. Wenn man die erreichte Konzentration von Ferulasäure (und den Intermediaten) ins Verhältnis zur zugegebenen Menge an Tyrosin (40 mM) setzt, so wurde ein Umsatz von ca. 30 % erreicht. Da sich jedoch das relativ schlecht lösliche Tyrosin (ca. 3 mM) nicht sichtbar im Bioreaktor akkumulierte, kann man vermuten, dass es zum Großteil als Stickstoffquelle von *E. coli* genutzt wird. In welcher Konzentration sich Tyrosin intrazellulär akkumuliert wurde nicht überprüft. Bennett et al. beschrieb eine intrazelluläre Tyrosin-Konzentration von 29  $\mu\text{M}$  [Bennett et al., 2009], jedoch handelt es sich hierbei um einen Stamm der nicht in der Tyrosinaufnahme dereguliert wurde, was einen Unterschied in der intrazellulären Konzentration bedeuten könnte.

Während der Sinapinsäure-Produktion im Bioreaktor wurde eine Abnahme der Sinapinsäure-Konzentration über die Zeit beobachtet (Abb. 3.26, S. 88). Eine nähere Untersuchung dieser Abnahme konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt werden, weshalb dieser Verlust ungeklärt bleibt. Ein Hinweis auf eine mögliche strukturelle Änderung von Sinapinsäure liefern Cai et al., die eine Luftoxidation von Sinapinsäure zu Thomasidionsäure beschreiben. Thomasidionsäure oxidiert wiederum weiter zu 2,6-Dimethoxybenzochinon und 6-Hydroxy-5,7-dimethoxy-2-naphtholsäure, die zudem eine dunkle Farbe hervorrufen, die



auch in diesen Experimenten beobachtet wurden. Diese Reaktionen wurden für den pH-Bereich 7 bis 10 in einem Phosphat-Borat-Puffer über 240 h untersucht. Nach 34 h Inkubation bei pH 7 konnten nur noch 28 % der eingesetzten Sinapinsäure (0,5 mM) nachgewiesen werden. Zu diesem Zeitpunkt wurden bereits 0,074 mM Thomasidionsäure nachgewiesen, wobei die Folgeprodukte erst zu späteren Zeitpunkten analysiert wurden [Cai et al., 1999b]. In Schüttelkolben-Experimenten der vorliegenden Arbeit mit reinem Minimalmedium war jedoch ein Nachweis von 100 % Sinapinsäure über 48 h möglich (Daten nicht gezeigt). Eventuell könnten die Bedingungen der Fermentation, beispielsweise die höhere Begasung, einen Einfluss auf die Oxidation der Sinapinsäure haben.

### 4.3 Optimierung der Produktion durch Regulation von Expression und Zellvitalität

In den Parallel-Fermentation konnte gezeigt werden, dass abhängig von der Laktose-Konzentration die Expressionsstärke induziert werden kann, welche wiederum einen Einfluss auf die Zellvitalität hat (siehe 3.3.2, S. 79). Dabei zeigte sich, dass eine zu geringe Expression zwar zu einer sehr stabilen CTR, also einer hohen Zellvitalität führt, jedoch die geringe Menge an Biokatalysator zu einer ebenso geringen Ferulasäure-Produktion führt. Im Vergleich dazu führt eine sehr starke Expression zu einer stark abnehmenden CTR, also einer geringen Zellvitalität, und, obwohl ausreichend Biokatalysator vorhanden war, zu einer geringen Ferulasäure-Produktion. Die mittlere Laktose-Konzentration führte zu einer mittleren Expression, die zu einer ausreichend stabilen Zellvitalität führte und letztendlich in der höchsten Ferulasäure-Produktion von 6 mM resultierte (ohne Zugabe von Methionin). Die metabolische Last durch eine starke Expression ist zu groß, um die komplexe Reaktionskaskade bis hin zur Ferulasäure zu katalysieren. Die stark zunehmende Akkumulation der Intermediate mit Abnahme der CTR (0,45 % Laktose) zeigt, dass die benötigten Cosubstrate NADH und SAM nicht ausreichend regeneriert werden können. Die Limitierung durch SAM tritt dabei früher ein als die Limitierung durch NADH, was durch die stärkere Akkumulation von Kaffeesäure und sehr späten Akkumulation von Kumarsäure erkennbar ist, obwohl SAM intrazellulär mit 180  $\mu\text{M}$  höher konzentriert vorliegt als NADH mit 83  $\mu\text{M}$  [Bennett et al., 2009]. Die Optimierung der Balance der Expression wurde sowohl bei der terminalen Oxyfunktionalisierung von Fettsäuremethylestern [Kadisch et al., 2017] als auch bei der Kumar- und Kaffeesäure-Produktion [An et al., 2016; Zhang und Stephanopoulos, 2013] im Bioreaktor beschrieben. Bei Kadisch *et al.* wurde die Verbesserung der Biokatalyse durch Feinabstimmung des Expressionslevels eines Außenmembranproteins, was die Aufnahme von hydrophoben Substraten begünstigt, und der Monooxygenase, die die Reaktion katalysiert, beschrieben. Dabei führte eine zu starke

Expression des Transporters zu einer Toxifizierung durch das Substrat der Reaktion, was wiederum zu einer Reduktion der Zellvitalität und –stabilität führte, die jedoch für die Cofaktor-Regeneration essentiell ist. Dabei wurde festgestellt, dass auch die Feinabstimmung des Expressionslevels der Monooxygenase für die Biokatalysatorstabilität wichtig ist [Kadisich et al., 2017]. Außerdem wurde erwähnt, dass Oxygenasen im Allgemeinen zu oxidativem Stress durch Reduktion von O<sub>2</sub> und dabei entstehende reaktive Sauerstoffspezies, wie Peroxid oder Superoxid, führt [Gorsky et al., 1984]. Eine Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies wurden für die HpaBC aus *E. coli* (und *P. aeruginosa*) bisher nicht beschrieben. Ob die reduzierte Zellvitalität bei hohem Expressionslevel auch darauf zurückgeht, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Zhang und Stephanopolous beschreiben die Kaffeesäure-Produktion mit RgTAL und Sam5 (*S. espanaensis*) im 2 l-Bioreaktor. Durch Verwendung von *high-copy* und *low-copy* Plasmiden wurde verglichen inwiefern die Kopienzahl der TAL mit der Kaffeesäure-Produktion korreliert. Dabei wurde gezeigt, dass eine hohe Kopienzahl zu einer geringen Kaffeesäure-Produktion im Vergleich zu einer geringen Kopienzahl führte. Dies führten sie auf die zusätzliche metabolische Last durch die TAL bzw. deren Reaktion zurück [Zhang und Stephanopoulos, 2013]. Auch An et al. beschreiben bei der Produktion von Kumarsäure eine reduzierte Ausbeute bei mehr als zehn Kopien des TAL-Gens, das genomisch integriert wurde [An et al., 2016]. Dies zeigt, dass bei einer ähnlichen Reaktionskaskade ebenso ein positiver Effekt durch Senkung der Kopienzahl der TAL nachgewiesen wurde, wobei man beachten sollte, dass die Kopienzahl nicht unbedingt mit der Stärke der Expression korreliert. Jedoch könnte dies ein Indiz dafür sein, dass auch die Expression der TAL zusammen mit der Reaktionskaskade einen Einfluss auf die Zellvitalität hat, was auch eingangs anhand der Plasmidinstabilität, ausgelöst durch die Basalexpression und der einhergehenden Toxizität der Genprodukte, gemutmaßt wurde. Insgesamt kann man sagen, dass eine Regulation der Expressionsstärke zur Optimierung der Reaktionskaskade und der daraus resultierenden Produktausbeuten für diese Arbeit essentiell war und auch insgesamt für viele *in vivo* Produktionen angebracht ist. Auch die weitere Feinabstimmung der Expressionsstärke könnte zu nochmals mehr Ferulasäure-Konzentration führen und sollte im Rahmen einer weiteren Prozessoptimierung durchgeführt werden.

#### 4.4 Steigerung der Produktion durch Methionin-Zugabe

Um den Einfluss von Methionin auf die Biosynthese von Ferulasäure im Bioreaktor zu untersuchen wurde äquimolar zu Tyrosin auch Methionin zugegeben, wobei die Induktion mit 0,05 %, 0,15 % und 0,45 % Laktose getestet wurde (siehe 3.3.3, S. 83). Dabei zeigte sich, dass die Zugabe von Methionin im Allgemeinen zu einer Stabilisierung der Zellvitalität führt. Der größte Einfluss zeigte sich bei der Induktion mit 0,45 % Laktose. Hier sank die CTR ohne Methionin bereits 10 h nach Induktion und am Ende der Fermentation erreichte das

Signal annähernd 0 mmol/h. Durch Zugabe von Methionin blieb die CTR bis 25 h nach Induktion konstant und sank danach langsam bis auf ca. 45 mmol/h. Dies zeigt deutlich, dass die abnehmende Zellvitalität nicht alleinig durch die metabolische Last der heterologen Genexpression entsteht, sondern auch signifikant durch die eingebrachte Reaktionskaskade und insbesondere durch die Methylierung und dem hohen Bedarf an Methylendonoren entsteht. Neben dem Einfluss auf die Zellvitalität zeigt die Zugabe von Methionin auch den gewünschten Effekt der Steigerung der Ferulasäure-Produktion. Eine Steigerung konnte bei der Induktion mit 0,15 % und 0,45 % Laktose erreicht werden, wobei dies jeweils zu einer Steigerung um 50 % (auf 9 mM) und 300 % (auf 10,6 mM) führte. Interessanterweise wurde hier die höchste Ferulasäure-Produktion mit der stärksten Induktion erreicht, vermutlich da hier sowohl eine hohe Konzentration an Biokatalysator als auch eine stabile Zellvitalität zur Cosubstrat-Regeneration vorhanden war. Auch bei der Produktion von Vanillin aus Protocatechuat, einer SAM-abhängigen von OMT katalysierten Reaktion, wurde durch Deregulation der SAM-Biosynthese eine Steigerung um 33 % beschrieben, wobei eine zusätzliche Zugabe von Methionin zu einer Steigerung um 100 % führte [Kunjapur et al., 2016]. In der vorliegenden Arbeit konnte in Schüttelkolben-Versuchen eine Steigerung um 480 % durch Zugabe von Methionin und eine Steigerung um 700 % durch Zugabe von Methionin und Serin erreicht werden. Während der Ferulasäure-Produktion im Bioreaktor konnte eine Steigerung um 440 % bzw. um 300 % im Vergleich zur Produktion im Schüttelkolben erreicht werden, indem neben den Standardregelungen, wie pH-Wert und Glukose-Zugabe für ein optimales Wachstum, die Induktion und die Zellvitalität aufeinander eingestellt werden konnten. Anhand der Schüttelkolben-Versuche bei denen Methionin und Serin zugegeben wurde, kann man vermuten, dass eine weitere Steigerung durch Zugabe von Serin möglich wäre, jedoch wäre dies ein weiterer Kostenpunkt, der in einer womöglich späteren großtechnischen Anwendung anfiel und mit der eventuell gesteigerten Ausbeute abgewägt werden müsste.

## 4.5 Fehlerbetrachtung

Um die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit besser beurteilen zu können, sollen nachfolgend mögliche Fehlerquellen während der Handhabung innerhalb der durchgeführten Methoden und damit die Genauigkeit der Daten beleuchtet und beurteilt werden.

Die Ergebnisse zur Produktion von Ferula- und Sinapinsäure, sowie die *in vivo* Aktivitätstests der Einzelenzyme basieren auf der Analytik der Substanzen Tyrosin, Kumar-, Kaffee-, Ferula-, Hydroxyferula- und Sinapinsäure. Für die Analytik von Tyrosin wurde eine Derivatisierungsreaktion mittels ortho-Phthaldialdehyd durchgeführt (siehe 2.2.4.3, S. 42). Die Reaktion ist dabei zeitabhängig und wird durch Zugabe und Vermischen mit Essigsäureethylester gestoppt, wodurch bereits eine Fehlerquelle entsteht. Die Kalibrierung erfolgte jeweils durch Mitführung von einer 0,5 mM Tyrosin-Probe. Eine vorher durchgeführte

Kalibriergerade zeigte eine lineare Abhängigkeit der Konzentration bis 0,5 mM und der Peakfläche. Durch den mitgeführten Standard werden Unterschiede in der Reagenzlösung und in der jeweiligen Handhabung der Probenreihe ausgeglichen, jedoch ist auch das Ansetzen der Tyrosin-Lösung nicht frei von Fehlerquellen. Aufgrund der Derivatisierung handelt es sich insgesamt eher um eine sensible Methodik. Die Analyse der oben genannten Zimtsäure-Derivate erfolgt im direkten Nachweis durch UV-Detektion nach Auftrennung mittels HPLC. Die Substanzen müssen jedoch vorher durch Ansäuern und Extraktion mit organischem Lösungsmittel von anderen störenden Substanzen getrennt werden. Die Handhabung während der Extraktion muss dabei sehr sorgfältig durchgeführt werden, da das Pipettieren von Lösungsmitteln problematisch sein kann. Auch die Abnahme der organischen Phase muss möglichst vollständig erfolgen ohne wässrige Phase zu übertragen. Nach Evaporation mussten die Rückstände wieder in Lösung gebracht werden, was durch Anwendung von Ultraschall bereits optimiert wurde, jedoch könnten hier Fehler durch unvollständiges Lösen entstehen. Die Kalibrierung der Substanzen erfolgte durch eine Fünf-Punkte-Kalibrierung von 0,08 bis 50 nmol der jeweiligen Substanz. Trotz der vielen Schritte während der Probenvorbereitung konnten Wiederfindungsraten von 94 - 98 % erreicht werden.

Während der Versuche im Schüttelkolben wurde das jeweilige Substrat als Feststoff nach Einwaage zur Kultur hinzugegeben. Bei der Zugabe von 0,5 mM und einer 100 ml Kultur liegt man dabei in einem Bereich von weniger als 10 mg. Eine genaue Einwaage einer so geringen Masse ist fehlerbehaftet, weshalb es zu Schwankungen und Abweichungen sowohl bei der Zugabe von 0,5 mM Tyrosin (Abb. 3.5, S. 49; Abb. 3.17, S. 68) als auch der Zimtsäure-Derivate (Abb. 3.7, S. 52; Abb. 3.9, S. 55) kommen kann. Bei der Zugabe von Tyrosin konnten direkt nach Zugabe ca. 80 % (Abb. 3.5, S. 49) bzw. 60 % (Abb. 3.17, S. 68) nachgewiesen werden. Auch bei der Zugabe von Kumar- und Ferulasäure konnten direkt nach Zugabe ca. 80 % nachgewiesen werden (Abb. 3.7, S. 52). Im Falle der Kaffeesäure konnten nur 60 – 80 % nach Zugabe nachgewiesen werden (Abb. 3.9, S. 55), wobei hier die Zugabe bereits aus einer Stammlösung (250 mM in Ethanol) erfolgte, da die Zugabe als Feststoff deutlich schlechtere Daten erbrachte. Aufgrund der reaktiven vicinalen Hydroxygruppe der Kaffeesäure könnte hier auch eine Nebenreaktion abgelaufen sein, die nichts mit den Nachweisgrenzen der Methodik zu tun hat. Einen solchen, nochmals deutlich stärkeren, Effekt zeigte sich auch bei der Zugabe von 5-Hydroxyferulasäure (Abb. 3.9, S. 55), weshalb hier keine Quantifizierung möglich war. Da diese Substanz sehr teuer ist (ca. 12-15 €/mg (Merck, Stand 21.06.2020)) und die Relevanz der Ergebnisse nicht sehr hoch war, wurden keine weiteren Experimente damit durchgeführt. Neben den Fehlerquellen der Einwaage von geringen Mengen und der Analytik kommen noch natürliche Faktoren hinzu, die nur schlecht beeinflusst werden können. Dies ist beispielsweise die Geschwindigkeit des

Importes der Substanzen bzw. dem Gleichgewicht des Importes und Exportes der Substanzen in die Zelle. Der Nachweis der Substanzen erfolgt aus dem Kulturüberstand, es wird also immer eine extrazelluläre Konzentration bestimmt. Im Falle von Tyrosin wurde nachgewiesen, dass eine vollständige Aufnahme von 0,5 mM innerhalb von 4 h in mit Leervektor transformierte *E. coli*-Zellen erfolgt (Daten nicht gezeigt). Im Falle der Zimtsäure-Derivate handelt es sich vermutlich eher um einen ständigen Import und Export, da sonst eine Veränderung der Intermediat-Konzentration über die Zeit nicht möglich gewesen wäre. Bei der Zugabe von Ferula- und Sinapinsäure zu mit Leervektor transformierten *E. coli*-Zellen zeigten sich zwar Schwankungen der Konzentration im Überstand, letztendlich konnte jedoch auch nach 48 h keine signifikante Abnahme beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Weitere Schwankungen kann es bei der Probe direkt nach Zugabe (0 h Probe) der Substanzen als Feststoff geben, da eine rasche Probenahme zur Minimierung von anaeroben Bedingungen innerhalb der Kultur im Konflikt mit der Geschwindigkeit des Auflösens der Substanzen steht.

Da es sich bei den Schüttelkolben-Versuchen um sehr viele Experimente handelte und eher dem Zweck der Etablierung diente wurden hier meistens keine Reproduktionen durchgeführt. Die vollständigen Listen der Schüttelkolben-Versuchen ist dem Anhang (Tab. 10.1, S. 134; Tab. 10.2, S. 135; Tab. 10.3, S. 136) zu entnehmen. Die finalen Ergebnisse der Ferula- und Sinapinsäure-Produktion im Bioreaktor hingegen wurden in drei biologischen Replikaten durchgeführt. Durch die kontinuierliche Zugabe von Tyrosin und Methionin aus einer hochkonzentrierten Stammlösung (je 500 mM, 1 L) während der Produktion im Bioreaktor werden die oben genannten Fehlerquellen der Schüttelkolben-Versuche stark minimiert. Zur Minimierung von Störsubstanzen bzw. zur Vermeidung von Extraktionsproblemen wurden die Proben der Fermentation verdünnt, wodurch zwar ein weiterer Pipettierschritt hinzu kommt, jedoch die Qualität der HPLC-Daten verbessert wurde.

Wie bereits in Kapitel 4.1 (S. 92 ff.) diskutiert liegt die erreichte Standardabweichung der biologischen Replikate der Produktion im Bioreaktor ( $n=3$ ) von 15 % (Ferulasäure, Abb. 3.25, S. 85) und 7 % (Sinapinsäure, Abb. 3.28, S. 91) im bzw. sogar unterhalb des Bereiches der publizierten Standardabweichung zur Ferulasäure-Produktion [Choi et al., 2011; Kang et al., 2012]. Damit kann man, trotz aller aufgeführten möglichen Fehlerquellen, sagen, dass es sich in der vorliegenden Arbeit um reproduzierbare und verlässliche Daten handelt.

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der biotechnologischen Produktion von Ferula- und Sinapinsäure mit *E. coli* ausgehend von Tyrosin. Ziele der Arbeit waren die Auswahl von geeigneten Enzymen zur Biosynthese von Ferula- und Sinapinsäure, die Identifizierung von *Bottlenecks* zur Optimierung des Reaktionsflusses, sowie der Produktion im Bioreaktor. Dafür wurden zunächst die Enzyme aus *R. capsulatus*, *R. glutinis* (TAL), *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. espanaensis* (HpaBC) und *M. crystallinum*, *M. sativa*, *L. perenne* (OMT) *in vivo* und zum Teil *in vitro* untersucht. Bei der Untersuchung der TALs zeigte sich, dass die RcTAL großteils unlöslich produziert wird und deshalb für eine Verwendung in der Reaktionskaskade ungeeignet ist. Die *in vivo* Aktivität der RgTAL konnte im Konstrukt FA2 (RgTAL-FLAG\_EcHpaBC\_McPFOMT) durch Umsatz von Tyrosin nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung der Hydroxylasen (HpaBC) zeigte sich, dass die EcHpaBC für die Ferulasäure-Produktion geeignet ist, da sie eine spezifische 3-Hydroxylase Aktivität aufweist. Die PaHpaBC wurde für die Sinapinsäure-Produktion ausgewählt da diese eine 3- und 5-Hydroxylase Aktivität besitzt. Aufgrund der schwächeren Expression und des langsameren Umsatzes wurde die Verwendung der SeHpaBC nicht weiter untersucht. Die Untersuchung der Methyltransferasen zeigte, dass die McPFOMT für die Ferula- und Sinapinsäure-Produktion geeignet ist, da hier der schnellste Umsatz zu beobachten war und eine 3- und 5-Methyltransferase-Aktivität nachweisbar war. Die MsCOMT zeigte eine schwächere Expression, jedoch relativ ähnliche Ergebnisse wie die McPFOMT. Die LpCOMT konnte nicht sichtbar rekombinant überproduziert werden.

Nach Auswahl der Enzyme für die Biosynthese von Ferula- und Sinapinsäure wurde der Reaktionsfluss der Biosynthese *in vitro* und *in vivo* untersucht. Die *in vitro* Untersuchung der RgTAL zeigte einen  $K_M=216 \mu\text{M}$ ,  $k_{\text{cat}}=0,9 \text{ s}^{-1}$  (Tyrosin) und eine kompetitive Produkthemmung mit  $K_i=16 \mu\text{M}$  durch Kumarsäure. Die EcHpaBC zeigte jedoch einen hohen  $K_M=3 \text{ mM}$  und einen  $k_{\text{cat}}=1,9 \text{ s}^{-1}$  für Kumarsäure, was theoretisch eine Limitierung des Reaktionsflusses bedeutet. Die PaHpaBC hat eine sehr viel höhere Affinität gegenüber Kumarsäure ( $K_M=0,3 \text{ mM}$ ) und eine ähnliche Wechselzahl ( $k_{\text{cat}}=1,2 \text{ s}^{-1}$ ). Die *in vivo* Untersuchung der Reaktionskaskade im Konstrukt FA2 wies interessanterweise die Methylierung als *Bottleneck* nach. Diese Limitierung der Methylierung zeigte sich bei Steigerung der Substratmenge und konnte durch Zugabe von Methionin und Serin teilweise kompensiert werden und führte zu maximal 3,5 mM (0,7 g/L) Ferulasäure innerhalb von 24 h. Für die Biosynthese von Sinapinsäure wurde die Verwendung der Konstrukte SA1 (RgTAL-FLAG\_PaHpaBC\_McPFOMT) und SA2 (RgTAL-FLAG\_EcHpaB(Y3011)C\_McPFOMT) untersucht. Die *in vivo* Synthese im Schüttelkolben führte zu maximal 0,32 mM Sinapinsäure (SA1) und 0,66 mM Sinapinsäure (SA2) und wies außerdem auf einen Unterschied in der

Substratspezifität der Hydroxylasen hin (*PaHpaBC*: 3-Hydroxylierung > 5-Hydroxylierung, *EcHpaB(Y301I)C*: 3-Hydroxylierung < 5-Hydroxylierung).

Für die Produktion im Bioreaktor unter kontrollierten Bedingungen ( $V_{\text{Start}}=0,7$  L, Minimalmedium, pH=7, T=37 °C,  $pO_2=30$  % (Kaskade aus Rührerdrehzahl, Druckluft- und  $O_2$ -Begasung)) wurde eine Drei-Phasen-Fermentation (Batch, Exponentielle, Kontinuierliche/Produktions-Phase) etabliert. Zunächst wurden anhand der Ferulasäure-Produktion die Stammauswahl und die Wahl des Induktors (IPTG oder Laktose) untersucht. Dabei konnte das beste Ergebnis mit BL21 $\Delta$ R pLysT und der Induktion mit Laktose erzielt werden, wobei auffiel, dass die Balance der Expressionsstärke und der Zellvitalität (bzw. CTR) wichtig für die Ferulasäure-Produktion ist. Um diese Balance zu untersuchen, wurden drei unterschiedliche Laktose-Konzentrationen (0,05/0,15/0,45 %) zur Induktion getestet. Dabei zeigte die mittlere Konzentration (0,15 %) das beste Ergebnis hinsichtlich der Ferulasäure-Konzentration (6 mM) sowie einer guten Expression und einer relativ stabilen CTR. Um auch im Bioreaktor die Limitierung der Methylierung auszugleichen wurde anschließend die Zugabe von Methionin bei den drei unterschiedlichen Laktose-Konzentrationen untersucht. Dabei zeigte sich, dass Methionin die Instabilität der Zellvitalität bei starker Expression (0,45 % Laktose) kompensieren konnte und zu  $9,6 \pm 1,4$  mM ( $1,9 \pm 0,2$  g/L;  $39 \pm 4,2$  mg/(L\*h)) Ferulasäure in 48 h führte (1 mM/h Tyrosin/Methionin (Produktionszeit: 4-44 h, Gesamt: 40 mM), Induktion: 0,45 % Laktose, Glukose: Batch= 0,1 % (0,56 mM), Fed-Batch (Kontinuierliche Phase)=14 mmol/h). Bei der Produktion von Sinapinsäure im Bioreaktor, analog zu den Parametern zur Ferulasäure-Produktion, führte die Verwendung von SA2 (*EcHpaB(Y301I)C*) BL21 $\Delta$ R pLysT zu  $5,9 \pm 0,4$  mM ( $1,3 \pm 0,1$  g/L;  $27 \pm 2$  mg/(L\*h)) Sinapinsäure in 48 h (1 mM/h Tyrosin/Methionin (Produktionszeit: 4-44 h, Gesamt: 40 mM), Induktion: 0,15 % Laktose, Glukose: Batch= 0,1 % (0,56 mM), Fed-Batch (Kontinuierliche Phase)=14 mmol/h).

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Produktion von Ferulasäure, mit einer annähernd 10-fachen Steigerung im Vergleich zur Literatur, sowie eine bisher unbeschriebenen rekombinanten Produktion von Sinapinsäure.

## 6 Ausblick

Im Verlauf der Arbeiten ergaben sich einige Anhaltspunkte zur möglichen Optimierung der Produktion von Ferula- und Sinapinsäure, sowie Fragen, die bisher ungeklärt blieben. Die Optimierung der Produktion kann von verschiedenen Seiten angegangen werden, dem *Protein-Engineering*, dem *metabolic engineering* und dem *Prozess-Engineering*.

Bei der *in vitro* Untersuchung der Reaktionskaskade wurde festgestellt, dass es zu einer Inhibition des Reaktionsflusses durch die Kaskade kommt, da die erste Reaktion (TAL) produktinhibiert ist und die zweite Reaktion (HpaBC) eine geringe Substrataffinität besitzt. Durch *Protein-Engineering* könnte man versuchen die Affinität der Hydroxylase gegenüber Kumarsäure zu verbessern, um den Reaktionsfluss durch die Kaskade zu erleichtern. Dies könnte zum einen durch Mutagenese der *EcHpaBC* zur Vergrößerung des aktiven Zentrums oder zum anderen durch Mutagenese der *PaHpaBC* zur Änderung der Substratspezifität (3'-Hydroxylase-Aktivität) für die Ferulasäure-Produktion erfolgen. Dabei wäre auch eine Reduktion der Affinität gegenüber Tyrosin sinnvoll, um eine Nebenreaktion zu DOPA zu vermeiden.

Bei der *in vivo* Untersuchung der Reaktionskaskade wurde nachgewiesen, dass ein *Bottleneck* in der Methylierung vorliegt, was durch die Limitierung von Methionin bzw. SAM zustande kommt. Um den hohen Bedarf an Methylendonoren abzudecken, wäre es sinnvoll im Rahmen eines *metabolic engineering* die intrazelluläre Methionin bzw. SAM-Konzentration zu erhöhen und so die bisher benötigte Zugabe von Methionin zu reduzieren. Dabei könnte man eine Überproduktion der SAM-Synthetase, sowie eine Deregulation der Methionin Synthese durch Deletion von *metJ* durchführen.

Zur allgemeinen Optimierung der Produktion im Bioreaktor könnte ein *Prozess-Engineering* durchgeführt werden. Dabei könnte beispielsweise weiterführend an einer langanhaltenden Zellvitalität durch Anpassung verschiedener Parameter gearbeitet werden. Ebenso wäre es sinnvoll die Induktion mit Laktose-Konzentrationen zwischen 0,15 und 0,45 % zu testen, um die optimale Balance zwischen Expression und Zellvitalität zu erreichen. Durch Änderung des Bioreaktorvolumens könnte man eine höhere *feeding* Rate wählen, die zu mehr Biomasse und damit zu mehr Biokatalysator führt, was wiederum in mehr Produkt resultieren sollte. Eine weitere Möglichkeit wäre die Etablierung einer kontinuierlichen Fermentation, bei dem der Kulturüberstand abgeführt wird und so die Zellen von metabolischen Abfallprodukten und von den toxischen Zielprodukten befreit werden. Dies könnte zusätzlich die Zellvitalität verbessern, was auch eine Verbesserung der Produktion bewirken würde.

Bei Bilanzierung der Reaktionen fiel auf, dass nur ca. 30 % des Substrates in die gewünschte Kaskade bzw. den nachweisbaren Intermediaten und dem Produkt ging.



Mögliche Konkurrenzreaktionen sind dabei der Abbau von Tyrosin zur Nutzung als Stickstoffquelle und die Bildung von DOPA und die darauffolgende irreversible Bildung von Melanin-ähnlichen Polymeren. Um diese Nebenreaktionen weiter zu untersuchen und eventuell zu vermeiden, wäre es möglich C13-markiertes Tyrosin als Substrat zu verwenden und massenspektrometrisch zu analysieren in welchen Nebenprodukten das eingesetzte Tyrosin resultiert.

Eine weitere bisher offene Frage ist der Verlust der Sinapinsäure während der späten Stunden der Produktion im Bioreaktor. Anhand von Literatur konnten zwar Hinweise auf einen möglichen Verbleib gefunden werden, jedoch sind weitere Experimente zur Untersuchung dieses Phänomens nötig, um den Verlust abschließend zu klären. Eine massenspektroskopische Analyse des Kulturüberstandes der Fermentation könnte Aufschluss über mögliche Modifizierung der Sinapinsäure geben. Auch die Aktivität der Hydroxylasen gegenüber Sinapinsäure könnte untersucht werden.

## 7 Literatur

- An, D. G., Cha, M. N., Nadarajan, S. P., Kim, B. G. und Ahn, J.-H. (2016). "Bacterial synthesis of four hydroxycinnamic acids." *Applied Biological Chemistry*, **59**, 173-179.
- Ballou, D. P., Entsch, B. und Cole, L. J. (2005). "Dynamics involved in catalysis by single-component and two-component flavin-dependent aromatic hydroxylases." *Biochemical and biophysical research communications*, **338**, 590-598.
- Banerjee, G. und Chattopadhyay, P. (2019). "Vanillin biotechnology: the perspectives and future." *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **99**, 499-506.
- Baucher, M., Monties, B., Montagu, M. V. und Boerjan, W. (1998). "Biosynthesis and Genetic Engineering of Lignin." *Critical Reviews in Plant Sciences*, **17**, 125-197.
- Bennett, B. D., Kimball, E. H., Gao, M., Osterhout, R., Van Dien, S. J. und Rabinowitz, J. D. (2009). "Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*." *Nature chemical biology*, **5**, 593.
- Berner, M., Krug, D., Bihlmaier, C., Vente, A., Müller, R. und Bechthold, A. (2006). "Genes and Enzymes Involved in Caffeic Acid Biosynthesis in the Actinomycete *Saccharothrix espanaensis*." *Journal of Bacteriology*, **188**, 2666-2673.
- Boerjan, W., Ralph, J. und Baucher, M. (2003). "Lignin biosynthesis." *Annual review of plant biology*, **54**, 519-546.
- Bomgardner, M. (2016). "The problem with vanilla." *C&EN Global Enterprise*, **94**, 38-42.
- Both, P., Busch, H., Kelly, P. P., Mutti, F. G., Turner, N. J. und Flitsch, S. L. (2016). "Whole-Cell Biocatalysts for Stereoselective C–H Amination Reactions." *Angewandte Chemie International Edition*, **55**, 1511-1513.
- Bouchereau, A., Hamelin, J., Lamour, I., Renard, M. und Larher, F. (1991). "Distribution of sinapine and related compounds in seeds of Brassica and allied genera." *Phytochemistry*, **30**, 1873-1881.
- Bourne, L. C. und Rice-Evans, C. (1998). "Bioavailability of ferulic acid." *Biochemical and biophysical research communications*, **253**, 222-227.
- Brandt, W., Manke, K. und Vogt, T. (2015). "A catalytic triad–Lys–Asn–Asp–Is essential for the catalysis of the methyl transfer in plant cation-dependent O-methyltransferases." *Phytochemistry*, **113**, 130-139.
- Brennicke, A. und Schopfer, P. (2010). "Pflanzenphysiologie." Spektrum Akademischer Verlag.
- Brower, V. (2008). "Back to nature: extinction of medicinal plants threatens drug discovery." Oxford University Press.
- Buranov, A. U. und Mazza, G. (2009). "Extraction and purification of ferulic acid from flax shives, wheat and corn bran by alkaline hydrolysis and pressurised solvents." *Food Chemistry*, **115**, 1542-1548.
- Cai, R., Arntfield, S. und Charlton, J. (1999a). "Structural changes of sinapic acid and sinapine bisulfate during autoclaving with respect to the development of colored substances." *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **76**, 433-441.
- Cai, R., Arntfield, S. und Charlton, J. (1999b). "Structural changes of sinapic acid during alkali-induced air oxidation and the development of colored substances." *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **76**, 757-764.
- Calabrese, J. C., Jordan, D. B., Boodhoo, A., Sariaslani, S. und Vannelli, T. (2004). "Crystal structure of phenylalanine ammonia lyase: multiple helix dipoles implicated in catalysis." *Biochemistry*, **43**, 11403-11416.
- Chabannes, M., Ruel, K., Yoshinaga, A., Chabbert, B., Jauneau, A., Joseleau, J. P. und Boudet, A. M. (2001). "In situ analysis of lignins in transgenic tobacco reveals a differential impact of individual transformations on the spatial patterns of lignin deposition at the cellular and subcellular levels." *The Plant Journal*, **28**, 271-282.
- Chakraborty, S., Ortiz-Maldonado, M., Entsch, B. und Ballou, D. P. (2009). "Studies on the mechanism of p-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase from *Pseudomonas aeruginosa*: a system composed of a small flavin reductase and a large flavin-dependent oxygenase." *Biochemistry*, **49**, 372-385.

- Chattopadhyay, P., Banerjee, G. und Sen, S. K. (2018). "Cleaner production of vanillin through biotransformation of ferulic acid esters from agroresidue by *Streptomyces sannanensis*." *Journal of Cleaner Production*, **182**, 272-279.
- Cho, J.-Y., Moon, J.-H. und Park, K.-H. (2000). "Isolation and identification of 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid and 3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid from hot water extracts of *Hovenia dulcis* Thunb and confirmation of their antioxidative and antimicrobial activity." *Korean Journal of Food Science and Technology*, **32**, 1403-1408.
- Choi, O., Wu, C.-Z., Kang, S. Y., Ahn, J. S., Uhm, T.-B. und Hong, Y.-S. (2011). "Biosynthesis of plant-specific phenylpropanoids by construction of an artificial biosynthetic pathway in *Escherichia coli*." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **38**, 1657-1665.
- Dabrowski, K. J. und Sosulski, F. W. (1984). "Composition of free and hydrolyzable phenolic acids in defatted flours of ten oilseeds." *Journal of agricultural and food chemistry*, **32**, 128-130.
- Dean, J. C., Kusaka, R., Walsh, P. S., Allais, F. und Zwier, T. S. (2014). "Plant sunscreens in the UV-B: ultraviolet spectroscopy of jet-cooled sinapoyl malate, sinapic acid, and sinapate ester derivatives." *Journal of the American Chemical Society*, **136**, 14780-14795.
- Donovan, R. S., Robinson, C. W. und Glick, B. (1996). "Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter." *Journal of industrial microbiology*, **16**, 145-154.
- Facchini, P. J., Bohlmann, J., Covello, P. S., De Luca, V., Mahadevan, R., Page, J. E., Ro, D.-K., Sensen, C. W., Storms, R. und Martin, V. J. (2012). "Synthetic biosystems for the production of high-value plant metabolites." *Trends in biotechnology*, **30**, 127-131.
- Faccio, G., Kruus, K., Saloheimo, M. und Thöny-Meyer, L. (2012). "Bacterial tyrosinases and their applications." *Process Biochemistry*, **47**, 1749-1760.
- Fache, M., Boutevin, B. und Caillol, S. (2016). "Vanillin Production from Lignin and Its Use as a Renewable Chemical." *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **4**, 35-46.
- Fernández-Castané, A., Vine, C. E., Caminal, G. und López-Santín, J. (2012). "Evidencing the role of lactose permease in IPTG uptake by *Escherichia coli* in fed-batch high cell density cultures." *Journal of Biotechnology*, **157**, 391-398.
- France, S. P., Hepworth, L. J., Turner, N. J. und Flitsch, S. L. (2017). "Constructing biocatalytic cascades: in vitro and in vivo approaches to de novo multi-enzyme pathways." *Acs Catalysis*, **7**, 710-724.
- Furuya, T. und Kino, K. (2014). "Catalytic activity of the two-component flavin-dependent monooxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* toward cinnamic acid derivatives." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **98**, 1145-1154.
- Galán, B., Díaz, E., Prieto, M. A. und García, J. L. (2000). "Functional analysis of the small component of the 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase of *Escherichia coli* W: a prototype of a new Flavin:NAD(P)H reductase subfamily." *Journal of Bacteriology*, **182**, 627-636.
- Gaspar, A., Martins, M., Silva, P., Garrido, E. M., Garrido, J., Firuzi, O., Miri, R., Saso, L. und Borges, F. (2010). "Dietary phenolic acids and derivatives. Evaluation of the antioxidant activity of sinapic acid and its alkyl esters." *Journal of agricultural and food chemistry*, **58**, 11273-11280.
- Gatenby, A. A., Sariaslani, S., Tang, X.-S., Qi, W. W. und Vannelli, T. (2002). "Bioproduction of para-hydroxycinnamic acid." Google Patents.
- Gelfand, D. H. und Steinberg, R. A. (1977). "Escherichia coli mutants deficient in the aspartate and aromatic amino acid aminotransferases." *Journal of Bacteriology*, **130**, 429.
- Gibello, A., Ferrer, E., Sanz, J. und Martin, M. (1995). "Polymer production by *Klebsiella pneumoniae* 4-hydroxyphenylacetic acid hydroxylase genes cloned in *Escherichia coli*." *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 4167-4171.
- Gorsky, L., Koop, D. R. und Coon, M. J. (1984). "On the stoichiometry of the oxidase and monooxygenase reactions catalyzed by liver microsomal cytochrome P-450. Products of oxygen reduction." *Journal of Biological Chemistry*, **259**, 6812-6817.

- Graf, E. (1992). "Antioxidant potential of ferulic acid." *Free Radical Biology and Medicine*, **13**, 435-448.
- Hansch, C., Leo, A. und Hoekman, D. (1995). "Exploring QSAR: fundamentals and applications in chemistry and biology." American Chemical Society Washington, DC, 557.
- Havir, E. A. und Hanson, K. R. (1968). "L-Phenylalanine ammonia-lyase. II. Mechanism and kinetic properties of the enzyme from potato tubers." *Biochemistry*, **7**, 1904-1914.
- Hayashi, H., Inoue, K., Nagata, T., Kuramitsu, S. und Kagamiyama, H. (1993). "Escherichia coli aromatic amino acid aminotransferase: characterization and comparison with aspartate aminotransferase." *Biochemistry*, **32**, 12229-12239.
- He, L., Li, H., Guo, S., Liu, L., Qiu, J., Li, F. und Cai, B. (2008). "Inhibitory effects of sinapine on activity of acetylcholinesterase in cerebral homogenate and blood serum of rats." *China journal of Chinese materia medica*, **33**, 813-815.
- Herrmann, S. (2018). "Enzymatic synthesis of plant phenylpropanoids," PhD Thesis Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Hotta, H., Nagano, S., Ueda, M., Tsujino, Y., Koyama, J. und Osakai, T. (2002). "Higher radical scavenging activities of polyphenolic antioxidants can be ascribed to chemical reactions following their oxidation." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **1572**, 123-132.
- Huang, Q., Lin, Y. und Yan, Y. (2013). "Caffeic acid production enhancement by engineering a phenylalanine over-producing Escherichia coli strain." *Biotechnology and Bioengineering*, **110**, 3188-3196.
- Hudson, E. A., Dinh, P. A., Kokubun, T., Simmonds, M. S. und Gescher, A. (2000). "Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells." *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, **9**, 1163-1170.
- Hughes, J. und Swain, T. (1962). "After-cooking blackening in potatoes. III.—Examination of the interaction of factors by in vitro experiments." *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **13**, 358-363.
- Ibdah, M., Zhang, X.-H., Schmidt, J. und Vogt, T. (2003). "A novel Mg<sup>2+</sup>-dependent O-methyltransferase in the phenylpropanoid metabolism of *Mesembryanthemum crystallinum*." *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 43961-43972.
- Inoue, K., Sewalt, V. J., Ballance, G. M., Ni, W., Stürzer, C. und Dixon, R. A. (1998). "Developmental expression and substrate specificities of alfalfa caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase in relation to lignification." *Plant physiology*, **117**, 761-770.
- Jang, S., Gang, H., Kim, B.-G. und Choi, K.-Y. (2018). "FCS and ECH dependent production of phenolic aldehyde and melanin pigment from L-tyrosine in Escherichia coli." *Enzyme and Microbial Technology*, **112**, 59-64.
- Jenzsch, M., Gnoth, S., Kleinschmidt, M., Simutis, R. und Lübbert, A. (2006). "Improving the batch-to-batch reproducibility in microbial cultures during recombinant protein production by guiding the process along a predefined total biomass profile." *Bioprocess and biosystems engineering*, **29**, 315-321.
- Johannes, T., Simurdiak, M. und Zhao, H. (2006). "Biocatalysis, Encyclopedia of Chemical Processing." Taylor & Francis. DOI.
- Kadisich, M., Julsing, M. K., Schrewe, M., Jehmlich, N., Scheer, B., von Bergen, M., Schmid, A. und Bühler, B. (2017). "Maximization of cell viability rather than biocatalyst activity improves whole-cell  $\omega$ -oxyfunctionalization performance." *Biotechnology and Bioengineering*, **114**, 874-884.
- Kang, S.-Y., Choi, O., Lee, J. K., Hwang, B. Y., Uhm, T.-B. und Hong, Y.-S. (2012). "Artificial biosynthesis of phenylpropanoic acids in a tyrosine overproducing Escherichia coli strain." *Microbial Cell Factories*, **11**, 153.
- Khokhar, S. und Apenten, R. K. O. (2003). "Iron binding characteristics of phenolic compounds: some tentative structure–activity relations." *Food Chemistry*, **81**, 133-140.

- Kim, S.-H., Hisano, T., Takeda, K., Iwasaki, W., Ebihara, A. und Miki, K. (2007). "Crystal structure of the oxygenase component (HpaB) of the 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase from *Thermus thermophilus* HB8." *Journal of Biological Chemistry*, **282**, 33107-33117.
- Kopycki, J. G., Rauh, D., Chumanevich, A. A., Neumann, P., Vogt, T. und Stubbs, M. T. (2008). "Biochemical and structural analysis of substrate promiscuity in plant Mg<sup>2+</sup>-dependent O-methyltransferases." *Journal of molecular biology*, **378**, 154-164.
- Kumar, N. und Pruthi, V. (2014). "Potential applications of ferulic acid from natural sources." *Biotechnology Reports*, **4**, 86-93.
- Kunjapur, A. M., Hyun, J. C. und Prather, K. L. J. (2016). "Deregulation of S-adenosylmethionine biosynthesis and regeneration improves methylation in the *E. coli* de novo vanillin biosynthesis pathway." *Microbial Cell Factories*, **15**, 61.
- Kyndt, J. A., Meyer, T. E., Cusanovich, M. A. und Van Beeumen, J. J. (2002). "Characterization of a bacterial tyrosine ammonia lyase, a biosynthetic enzyme for the photoactive yellow protein." *FEBS Letters*, **512**, 240-244.
- Ladkau, N., Schmid, A. und Bühler, B. (2014). "The microbial cell—functional unit for energy dependent multistep biocatalysis." *Current opinion in biotechnology*, **30**, 178-189.
- Laemmli, U. (1970). "SDS-page Laemmli method." *Nature*, **227**, 680-5.
- Lee, G.-S., Widjaja, A. und Ju, Y.-H. (2006). "Enzymatic Synthesis of Cinnamic Acid Derivatives." *Biotechnology Letters*, **28**, 581-585.
- Li, A., Ilie, A., Sun, Z., Lonsdale, R., Xu, J. H. und Reetz, M. T. (2016). "Whole-Cell-Catalyzed Multiple Regio- and Stereoselective Functionalizations in Cascade Reactions Enabled by Directed Evolution." *Angewandte Chemie International Edition*, **55**, 12026-12029.
- Lin, B. und Tao, Y. (2017). "Whole-cell biocatalysts by design." *Microbial Cell Factories*, **16**, 106.
- Lin, Y. und Yan, Y. (2012). "Biosynthesis of caffeic acid in *Escherichia coli* using its endogenous hydroxylase complex." *Microb Cell Fact*, **11**.
- Lin, Y. und Yan, Y. (2014). "Biotechnological production of plant-specific hydroxylated phenylpropanoids." *Biotechnology and Bioengineering*, **111**, 1895-1899.
- Liscombe, D. K., Louie, G. V. und Noel, J. P. (2012). "Architectures, mechanisms and molecular evolution of natural product methyltransferases." *Natural product reports*, **29**, 1238-1250.
- Liu, X., Ding, W. und Jiang, H. (2017). "Engineering microbial cell factories for the production of plant natural products: from design principles to industrial-scale production." *Microbial Cell Factories*, **16**, 125.
- Louie, G. V., Bowman, M. E., Moffitt, M. C., Baiga, T. J., Moore, B. S. und Noel, J. P. (2006). "Structural determinants and modulation of substrate specificity in phenylalanine-tyrosine ammonia-lyases." *Chemistry & biology*, **13**, 1327-1338.
- Louie, G. V., Bowman, M. E., Tu, Y., Mouradov, A., Spangenberg, G. und Noel, J. P. (2010). "Structure-function analyses of a caffeic acid O-methyltransferase from perennial ryegrass reveal the molecular basis for substrate preference." *The Plant Cell*, **22**, 4114-4127.
- Lovelock, S. L., Lloyd, R. C. und Turner, N. J. (2014). "Phenylalanine Ammonia Lyase Catalyzed Synthesis of Amino Acids by an MIO-Cofactor Independent Pathway." *Angewandte Chemie International Edition*, **53**, 4652-4656.
- Mavrides, C. und Orr, W. (1975). "Multispecific aspartate and aromatic amino acid aminotransferases in *Escherichia coli*." *J Biol Chem*, **250**, 4128-33.
- McMurrugh, I., Madigan, D., Donnelly, D., Hurley, J., Doyle, A.-M., Hennigan, G., McNulty, N. und Smyth, M. R. (1996). "CONTROL OF FERULIC ACID AND 4-VINYLGUAIAICOL IN BREWING." *Journal of the Institute of Brewing*, **102**, 327-332.
- Mignon, C., Mariano, N., Stadthagen, G., Lugari, A., Lagoutte, P., Donnat, S., Chenavas, S., Perot, C., Sodayer, R. und Werle, B. (2018). "Codon harmonization – going beyond the speed limit for protein expression." *FEBS Letters*, **592**, 1554-1564.

- Naczka, M., Amarowicz, R., Sullivan, A. und Shahidi, F. (1998). "Current research developments on polyphenolics of rapeseed/canola: a review." *Food Chemistry*, **62**, 489-502.
- Natella, F., Nardini, M., Di Felice, M. und Scaccini, C. (1999). "Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: Structure– activity relation." *Journal of agricultural and food chemistry*, **47**, 1453-1459.
- Neil, M. J. (2006). "The Merck Index: An Encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Whitehouse station, New Jersey: Published by Merck Research Laboratories, Division of Merck and Co." Inc.
- Nićiforović, N. und Abramović, H. (2014). "Sinapic acid and its derivatives: natural sources and bioactivity." *Comprehensive reviews in food science and food safety*, **13**, 34-51.
- Nowak, H., Kujawa, K., Zadernowski, R., Rocznik, B. und Kozłowska, H. (1992). "Antioxidative and bactericidal properties of phenolic compounds in rapeseeds." *Lipid/Fett*, **94**, 149-152.
- Oberleitner, N., Ressmann, A., Bica, K., Gärtner, P., Fraaije, M., Bornscheuer, U., Rudroff, F. und Mihovilovic, M. (2017). "From waste to value–direct utilization of limonene from orange peel in a biocatalytic cascade reaction towards chiral carvolactone." *Green Chemistry*, **19**, 367-371.
- Ou, S. und Kwok, K. C. (2004). "Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods." *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **84**, 1261-1269.
- Parmeggiani, F., Weise, N. J., Ahmed, S. T. und Turner, N. J. (2018). "Synthetic and Therapeutic Applications of Ammonia-lyases and Aminomutases." *Chemical Reviews*, **118**, 73-118.
- Parvathi, K., Chen, F., Guo, D., Blount, J. W. und Dixon, R. A. (2001). "Substrate preferences of O-methyltransferases in alfalfa suggest new pathways for 3-O-methylation of monolignols." *The Plant Journal*, **25**, 193-202.
- Pittard, J. und Yang, J. (2008). "Biosynthesis of the aromatic amino acids." *EcoSal Plus*, **3**.
- Plonka, P. M. und Grabacka, M. (2006). "Melanin synthesis in microorganisms–biotechnological and medical aspects." *Acta Biochimica Polonica*, **53**, 429-443.
- Prieto, M. A., Perez-Aranda, A. und Garcia, J. L. (1993). "Characterization of an Escherichia coli aromatic hydroxylase with a broad substrate range." *Journal of Bacteriology*, **175**, 2162-2167.
- Rais, D. und Zibek, S. (2017). "Biotechnological and biochemical utilization of lignin." In: *Biorefineries*, Springer, 469-518.
- Ritter, H. und Schulz, G. E. (2004). "Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase." *The Plant Cell*, **16**, 3426-3436.
- Robbins, R. J. (2003). "Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology." *Journal of agricultural and food chemistry*, **51**, 2866-2887.
- Rodrigues, J., Araújo, R., Prather, K. L., Kluskens, L. und Rodrigues, L. (2015). "Heterologous production of caffeic acid from tyrosine in Escherichia coli." *Enzyme and Microbial Technology*, **71**, 36-44.
- Rößiger, B., Unkelbach, G. und Pufky-Heinrich, D. (2018). "Base-catalyzed depolymerization of lignin: History, challenges and perspectives." *Lignin-Trends and Applications*, 99-120.
- Sariaslani, F. S. (2007). "Development of a Combined Biological and Chemical Process for Production of Industrial Aromatics from Renewable Resources." *Annual Review of Microbiology*, **61**, 51-69.
- Sarkanen, K. V. und Ludwig, C. H. (1971). "Lignins. Occurrence, formation, structure, and reactions."
- Schlenk, F. und Dainko, J. (1975). "The Sn-propyl analogue of S-adenosylmethionine." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **385**, 312-323.
- Schwede, T. F., Rétey, J. und Schulz, G. E. (1999). "Crystal structure of histidine ammonia-lyase revealing a novel polypeptide modification as the catalytic electrophile." *Biochemistry*, **38**, 5355-5361.

- Shrestha, A., Pandey, R. P., Pokhrel, A. R., Dhakal, D., Chu, L. L. und Sohng, J. K. (2018). "Modular pathway engineering for resveratrol and piceatannol production in engineered *Escherichia coli*." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **102**, 9691-9706.
- Soderberg, T. (2012). "Organic chemistry with a biological emphasis." Timothy Soderberg.
- Struck, A. W., Thompson, M. L., Wong, L. S. und Micklefield, J. (2012). "S-Adenosyl-methionine-dependent methyltransferases: highly versatile enzymes in biocatalysis, biosynthesis and other biotechnological applications." *ChemBioChem*, **13**, 2642-2655.
- Tilay, A., Bule, M., Kishenkumar, J. und Annapure, U. (2008). "Preparation of ferulic acid from agricultural wastes: its improved extraction and purification." *Journal of agricultural and food chemistry*, **56**, 7644-7648.
- Tyo, K. E., Ajikumar, P. K. und Stephanopoulos, G. (2009). "Stabilized gene duplication enables long-term selection-free heterologous pathway expression." *Nature biotechnology*, **27**, 760.
- Van Dyk, T. K., Templeton, L. J., Cantera, K. A., Sharpe, P. L. und Sariaslani, F. S. (2004). "Characterization of the *Escherichia coli* AaeAB efflux pump: a metabolic relief valve?" *Journal of Bacteriology*, **186**, 7196-7204.
- Vanholme, R., De Meester, B., Ralph, J. und Boerjan, W. (2019). "Lignin biosynthesis and its integration into metabolism." *Current opinion in biotechnology*, **56**, 230-239.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J. und Boerjan, W. (2010). "Lignin biosynthesis and structure." *Plant physiology*, **153**, 895-905.
- Vidgren, J., Svensson, L. A. und Liljas, A. (1994). "Crystal structure of catechol O-methyltransferase." *Nature*, **368**, 354.
- Voelker, S. L., Lachenbruch, B., Meinzer, F. C. und Strauss, S. H. (2011). "Reduced wood stiffness and strength, and altered stem form, in young antisense 4CL transgenic poplars with reduced lignin contents." *New Phytologist*, **189**, 1096-1109.
- Wachtmeister, J. und Rother, D. (2016). "Recent advances in whole cell biocatalysis techniques bridging from investigative to industrial scale." *Current opinion in biotechnology*, **42**, 169-177.
- Walton, N. J., Mayer, M. J. und Narbad, A. (2003). "Vanillin." *Phytochemistry*, **63**, 505-515.
- Wang, B. H. und Ou-Yang, J. P. (2005). "Pharmacological actions of sodium ferulate in cardiovascular system." *Cardiovascular drug reviews*, **23**, 161-172.
- Wang, Y., Chen, S. und Yu, O. (2011). "Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **91**, 949.
- Wessjohann, L., Dippe, M., Tengg, M. und Gruber-Khadjawi, M. (2014). "Methyltransferases in Biocatalysis." In: *Cascade Biocatalysis*, 393-426.
- Wilms, B., Hauck, A., Reuss, M., Syldatk, C., Mattes, R., Siemann, M. und Altenbuchner, J. (2001). "High-cell-density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an expression system based on the *Escherichia coli* rhaBAD promoter." *Biotechnology and Bioengineering*, **73**, 95-103.
- Wong, P., Gladney, S. und Keasling, J. D. (1997). "Mathematical Model of the lac Operon: Inducer Exclusion, Catabolite Repression, and Diauxic Growth on Glucose and Lactose." *Biotechnology Progress*, **13**, 132-143.
- Woodyer, R. D., Johannes, T. W. und Zhao, H. (2006). "Regeneration of cofactors for enzyme biocatalysis." *Enzyme technology*, 83-101.
- Xu, P., Hua, D. und Ma, C. (2007). "Microbial transformation of propenylbenzenes for natural flavour production." *Trends in biotechnology*, **25**, 571-576.
- Xue, Z., McCluskey, M., Cantera, K., Sariaslani, F. S. und Huang, L. (2007). "Identification, characterization and functional expression of a tyrosine ammonia-lyase and its mutants from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **34**, 599-604.
- Yates, K., Pohl, F., Busch, M., Mozer, A., Watters, L., Shiryaev, A. und Lin, P. K. T. (2019). "Determination of sinapine in rapeseed pomace extract: Its antioxidant and acetylcholinesterase inhibition properties." *Food Chemistry*, **276**, 768-775.

- Ye, Z.-H., Kneusel, R. E., Matern, U. und Varner, J. E. (1994). "An alternative methylation pathway in lignin biosynthesis in Zinnia." *The Plant Cell*, **6**, 1427-1439.
- Yoon, B. H., Jung, J. W., Lee, J.-J., Cho, Y.-W., Jang, C.-G., Jin, C., Oh, T. H. und Ryu, J. H. (2007). "Anxiolytic-like effects of sinapic acid in mice." *Life sciences*, **81**, 234-240.
- Yun, K.-J., Koh, D.-J., Kim, S.-H., Park, S. J., Ryu, J. H., Kim, D.-G., Lee, J.-Y. und Lee, K.-T. (2008). "Anti-inflammatory effects of sinapic acid through the suppression of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, and proinflammatory cytokines expressions via nuclear factor- $\kappa$ B inactivation." *Journal of agricultural and food chemistry*, **56**, 10265-10272.
- Zhang, H. und Stephanopoulos, G. (2013). "Engineering E. coli for caffeic acid biosynthesis from renewable sugars." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97**, 3333-3341.
- Zhao, Z. und Moghadasian, M. H. (2008). "Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review." *Food Chemistry*, **109**, 691-702.
- Zhong, R. und Ye, Z.-H. (2009). "Transcriptional regulation of lignin biosynthesis." *Plant signaling & behavior*, **4**, 1028-1034.
- Zou, Y., Kim, A. R., Kim, J. E., Choi, J. S. und Chung, H. Y. (2002). "Peroxy-nitrite scavenging activity of sinapic acid (3, 5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid) isolated from Brassica juncea." *Journal of agricultural and food chemistry*, **50**, 5884-5890.
- Zubieta, C., Kota, P., Ferrer, J.-L., Dixon, R. A. und Noel, J. P. (2002). "Structural basis for the modulation of lignin monomer methylation by caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3/5-O-methyltransferase." *The Plant Cell*, **14**, 1265-1277.



## 8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Biosynthese von Ligninmonomeren.....	3
Abb. 1.2: Strukturformel von trans-Ferulasäure .....	4
Abb. 1.3: Strukturformel von trans-Sinapinsäure .....	6
Abb. 1.4: Reaktionskaskade zur Biosynthese von Ferula- bzw. Sinapinsäure .....	7
Abb. 1.5: Reaktion der TAL .....	8
Abb. 1.6: Autokatalytische Bildung der aminogenen Gruppe MIO .....	9
Abb. 1.7: E1cB-Reaktionsmechanismus der Desaminierung.....	10
Abb. 1.8: Kristallstruktur der TAL aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i> (PDB Code 2O6Y).....	10
Abb. 1.9: Reaktionen der HpaBC .....	11
Abb. 1.10: Kristallstruktur der HpaB und HpaC aus <i>Thermus thermophilus</i> .....	12
Abb. 1.11: S <sub>N</sub> 2-Mechanismus der Methyltransferase.....	13
Abb. 1.12: Reaktion der SAM-abhängigen OMT.....	14
Abb. 1.13: Kristallstruktur der PFOMT aus <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> (PDB Code 3C3Y).....	14
Abb. 1.14: Bekannte Nebenreaktionen der Ferulasäure-Synthese .....	20
Abb. 1.15: NADH-Regenerationen im Metabolismus .....	22
Abb. 1.16: SAM-Regeneration.....	23
Abb. 3.1: Expressionstest von FA1 in BL21(DE3)Gold TB & Minimalmedium bei 37 °C .....	44
Abb. 3.2: SDS-PAGE: Expressionstest von FA2 in BL21(DE3)Gold in TB bei 37 °C .....	45
Abb. 3.3: SDS-PAGE: Expressionstest von FA1 & FA2 in BL21(DE3)Gold pLysT in TB bei 37 °C.....	46
Abb. 3.4: Western-Blot: Expressionstest von FA1 & FA2 in BL21(DE3)Gold pLysT .....	47
Abb. 3.5: <i>In vivo</i> Aktivitätstest FA1 & FA2 BL21(DE3)Gold pLysT (Zugabe 0,5 mM Tyrosin).....	49
Abb. 3.6: SDS-PAGE: Expressionstest der HpaBCs ( <i>Ec/Se/Pa</i> ) BL21(DE3)Gold LB bei 37 °C .....	50
Abb. 3.7: <i>In vivo</i> Aktivitätstest HpaBCs (Zugabe 0,5 mM Kumar-/Ferulasäure) .....	52
Abb. 3.8: SDS-PAGE: Expressionstest der OMTs ( <i>Mc/Ms/Lp</i> ) BL21(DE3)Gold LB bei 37 °C .....	53
Abb. 3.9: <i>In vivo</i> Aktivitätstest OMTs (Zugabe 0,5 mM Kaffee-/5-Hydroxyferulasäure) .....	55
Abb. 3.10: v/S-Charakteristika von RgTAL-FLAG (+/- Inhibitor).....	57
Abb. 3.11: v/S-Charakteristik der EcHpaBC für das Substrat Kumarsäure .....	59
Abb. 3.12: v/S-Charakteristik der PaHpaBC für das Substrat Kumarsäure .....	60
Abb. 3.13: Biotechnologische Reaktionskaskade von Tyrosin zu Ferulasäure.....	61
Abb. 3.14: <i>In vivo</i> Umsatz FA2 BL21(DE3)Gold pLysT (Zugabe 2 mM Tyrosin) .....	63
Abb. 3.15: <i>In vivo</i> Umsatz FA2 Zugabe von Tyrosin, Methionin, Serin (0-50 mM) .....	65
Abb. 3.16: Expressionstest von SA1/SA2 transformierten BL21(DE3)Gold pLysT.....	66
Abb. 3.17: <i>In vivo</i> Aktivitätstest SA1/SA2 BL21(DE3)Gold pLysT (Zugabe 0,5 mM Tyrosin) .....	68
Abb. 3.18: <i>In vivo</i> Umsatz von SA1/SA2 - Zugabe von Tyrosin, Methionin, Serin (2 bzw. 5 mM).....	70
Abb. 3.19: <i>In vivo</i> Umsatz von SA1/SA2 – Zugabe von 2 mM Ferulasäure und Methionin ...	72
Abb. 3.20: Darstellung der Drei-Phasen-Fermentation .....	73
Abb. 3.21: Parallel-Fermentation I-a: FA2 BL21(DE3)Gold pLysT IPTG vs. Laktose .....	76
Abb. 3.22: Parallel-Fermentation I-b: FA2 BL21ΔR pLysT, IPTG vs. Laktose.....	79

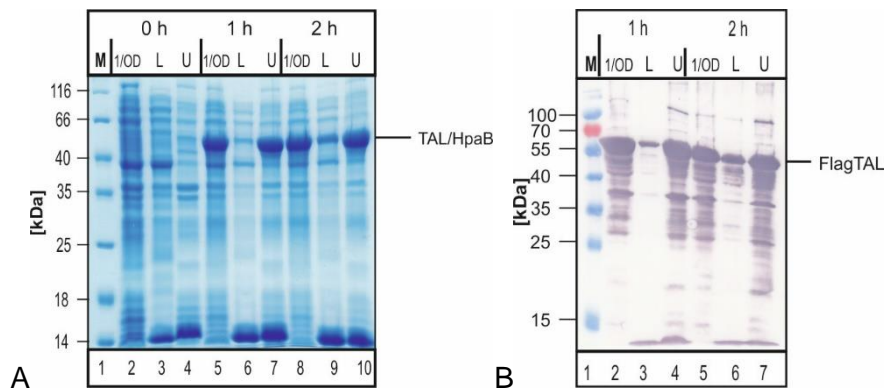
---

Abb. 3.23: Parallel-Fermentation II: FA2 BL21ΔR pLysT 0,05/0,15/0,45 % Laktose .....	82
Abb. 3.24: Parallel-Fermentation III: FA2 BL21ΔR pLysT 0,05/0,15/0,45 % Laktose (Methionin) .....	84
Abb. 3.25: Ferulasäure-Produktion im Parallel-Bioreaktorsystem (48 h, 1 mM YM/h) (n=3)..	85
Abb. 3.26: Parallel-Fermentation IV-a: SA1 BL21ΔR pLysT 0,15/0,45 % Laktose .....	88
Abb. 3.27: Parallel-Fermentation IV-b: SA2 BL21ΔR pLysT 0,15/0,45 % Laktose, 1 mM YM/h .....	90
Abb. 3.28: Sinapinsäure-Produktion im Parallel-Bioreaktorsystem (48 h, 1 mM YM/h) (n=3)	91
Abb. 10.1: Löslichkeitsuntersuchung FA1 BL21(DE3)Star SDS-PAGE/Western-Blot .....	124
Abb. 10.2: Braunfärbung durch HpaBC/Kaffeensäure .....	124
Abb. 10.3: Progresskurven RgTAL-Flag (-/+ Kumarsäure) .....	125
Abb. 10.4: Progresskurven EcHpaB (J. Li) .....	125
Abb. 10.5: Progresskurven PaHpaB (J. Li) .....	126
Abb. 10.6: Programmierung der Parallel-Fermentation I.....	127
Abb. 10.7: Parallel-Fermentation I: FA2 BL21(DE3)Gold pLysT IPTG vs. Laktose .....	128
Abb. 10.8: Parallel-Fermentation I: FA2 BL21ΔR pLysT IPTG vs. Laktose .....	128
Abb. 10.9: Programmierung der Parallel-Fermentation II bis IV .....	129
Abb. 10.10: Parallel-Fermentation II: FA2 BL21ΔR 0,05/0,15/0,45 % Laktose.....	130
Abb. 10.11: Parallel-Fermentation III: FA2 BL21ΔR 0,05/0,15/0,45 % Laktose (Methionin)	130
Abb. 10.12: Reproduktion A: FA2 BL21ΔR 0,45 % Laktose (Methionin) .....	131
Abb. 10.13: Reproduktion B: FA2 BL21ΔR 0,45 % Laktose (Methionin) .....	131
Abb. 10.14: Parallel-Fermentation IV: SA1 BL21ΔR 0,15/0,45 % Laktose (Methionin) .....	132
Abb. 10.15: Parallel-Fermentation IV: SA2 BL21ΔR 0,15/0,45 % Laktose (Methionin) .....	132
Abb. 10.16: Reproduktion A: SA2 BL21ΔR 0,15 % Laktose (Methionin) .....	133
Abb. 10.17: Reproduktion B: SA2 BL21ΔR 0,15 % Laktose (Methionin) .....	133

## 9 Tabellenverzeichnis

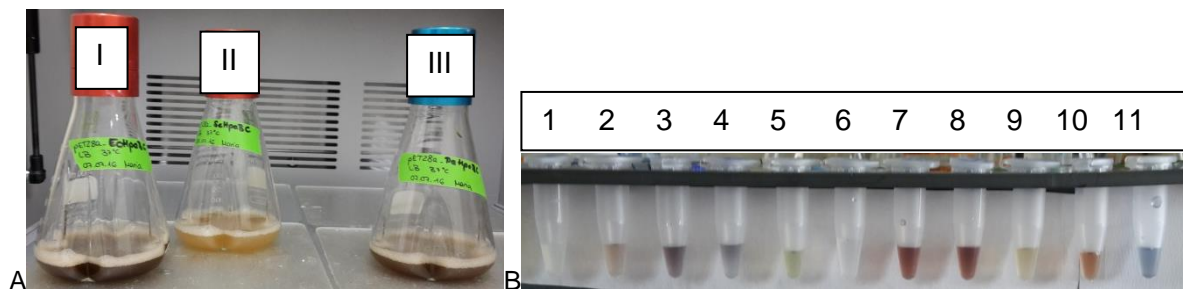
Tab. 1.1: Auswahl von kinetischen Parametern von TAL, Hydroxylasen und OMT.....	17
Tab. 1.2: Übersicht der verwendeten Enzyme zur Produktion von Kumar-, Kaffee- und Ferulasäure in <i>E. coli</i> .....	18
Tab. 2.1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien.....	25
Tab. 2.2: Übersicht über die verwendeten Stammlösungen.....	27
Tab. 2.3: Übersicht der verwendeten Puffer und Medien.....	28
Tab. 2.4: Übersicht der verwendeten molekularbiologischen Enzyme, Reagenzien und Kits	29
Tab. 2.5: Übersicht über die verwendeten Konstrukte.....	30
Tab. 2.6: Übersicht über die verwendeten Organismen.....	30
Tab. 2.7: Übersicht über die verwendeten Marker und Antikörper.....	31
Tab. 2.8: Übersicht über die verwendeten Geräte.....	31
Tab. 2.2.9: Übersicht über die Klonierung.....	36
Tab. 2.10: Zusammensetzung der Trenngele und Sammelgele nach [Laemmli, 1970].....	38
Tab. 3.1: Ermittelte kinetischen Parameter der RgTAL-FLAG.....	58
Tab. 3.2: Bedingungen der Parallel-Fermentation I (BL21(DE3)Gold pLysT & BL21ΔR pLysT) .....	75
Tab. 3.3: Bedingungen Parallel-Fermentation II.....	80
Tab. 3.4: Bedingungen Parallel-Fermentation III.....	83
Tab. 3.5: Bedingungen der Parallel-Fermentation IV zur Sinapinsäure-Produktion (SA1/SA2) .....	86
Tab. 4.1: Vergleich der Ferulasäure-Produktion in der Literatur und in der vorliegenden Arbeit .....	96
Tab. 10.1: Übersicht der Schüttelkolben Versuche- FA2 BL21(DE3)Gold pLysT.....	134
Tab. 10.2: Übersicht der Schüttelkolben Versuche SA1 BL21(DE3)Gold pLysT.....	135
Tab. 10.3: Übersicht der Schüttelkolben Versuche SA2 BL21(DE3)Gold pLysT.....	136

## 10Anhang



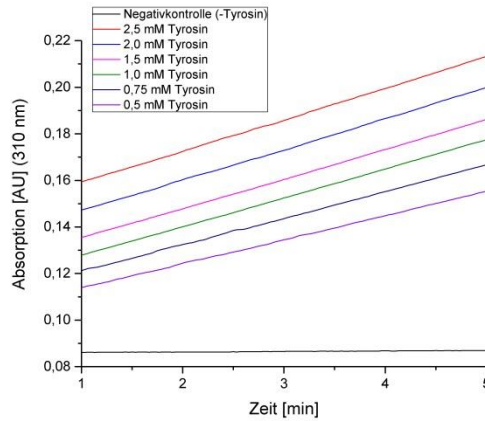
**Abb. 10.1: Löslichkeitsuntersuchung FA1 BL21(DE3)Star SDS-PAGE/Western-Blot**

Die Kultivierung erfolgte mit transformierten BL21(DE3)Star-Zellen in LB bei 37°C unter Schütteln. Nach Induktion wurden die Proben 0 h, 1 h und 2 h enzymatisch aufgeschlossen und die Löslichkeit analysiert. **A: SDS-PAGE:** 1: Molekulargewichtsmarker (M), 2-4: 0 h, 2: 1/OD<sub>600</sub>, 3: Löslich (L), 4: Unlöslich (U), 5-7: 1 h; 5: 1/OD<sub>600</sub>, 6: Löslich (L), 7: Unlöslich (U), 8-10: 2 h, 8: 1/OD<sub>600</sub>, 9: Löslich (L), 10: Unlöslich (U). **B: Western-Blot (α-FLAG):** 1: Molekulargewichtsmarker (M), 2-4: 1 h, 2: 1/OD<sub>600</sub>, 3: Löslich (L), 4: Unlöslich (U), 5-7: 2 h; 5: 1/OD<sub>600</sub>, 6: Löslich (L), 7: Unlöslich (U). Markiert ist das theoretische Molekulargewicht von TAL (58 kDa), HpaB (59 kDa), PFOMT (25 kDa) und HpaC (19 kDa).

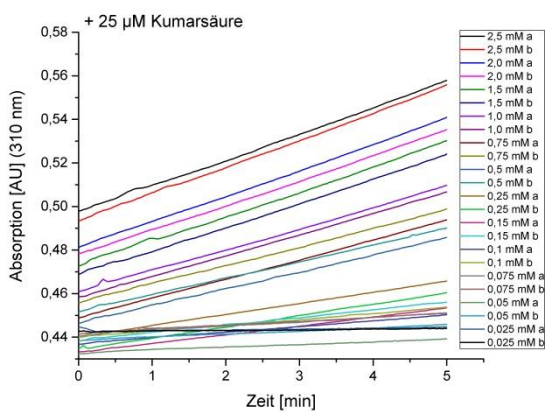


**Abb. 10.2: Braunfärbung durch HpaBC/Kaffeensäure**

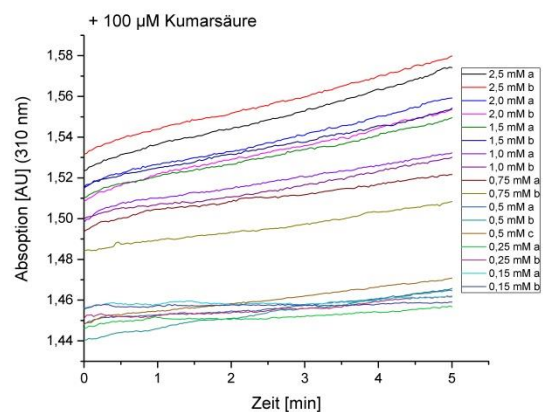
**A:** Kultivierung von pET28a\_HpaBC in LB Medium bei 37 °C (Induktion mit 0,5 mM IPTG), I: *EcHpaBC*, II: *ScHpaBC*, III: *PaHpaBC*. **B:** 100 µl von 2 mM Kaffeensäure in dH<sub>2</sub>O + je 100 µl: 1: MM Grundmedium („MM-“), 2: MM komplett 3: MM- + 2 µl Spurenelemente-Lösung 4: MM- + 20 µl Spurenelemente-Lösung 5: Spurenelemente-Lösung 6: dH<sub>2</sub>O + 2 µl Spurenelemente-Lösung 7: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung + 2 µl Spurenelemente-Lösung 8: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung + 2 µl Spurenelemente-Lösung 9: 10 µl 1 M KOH (-Kaffeensäure) 10: 10 µl 1 M KOH 11: FeCl<sub>3</sub> in Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung



A



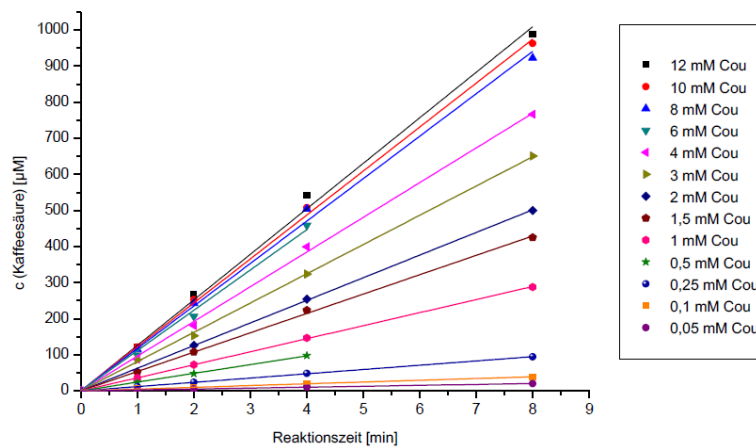
B



C

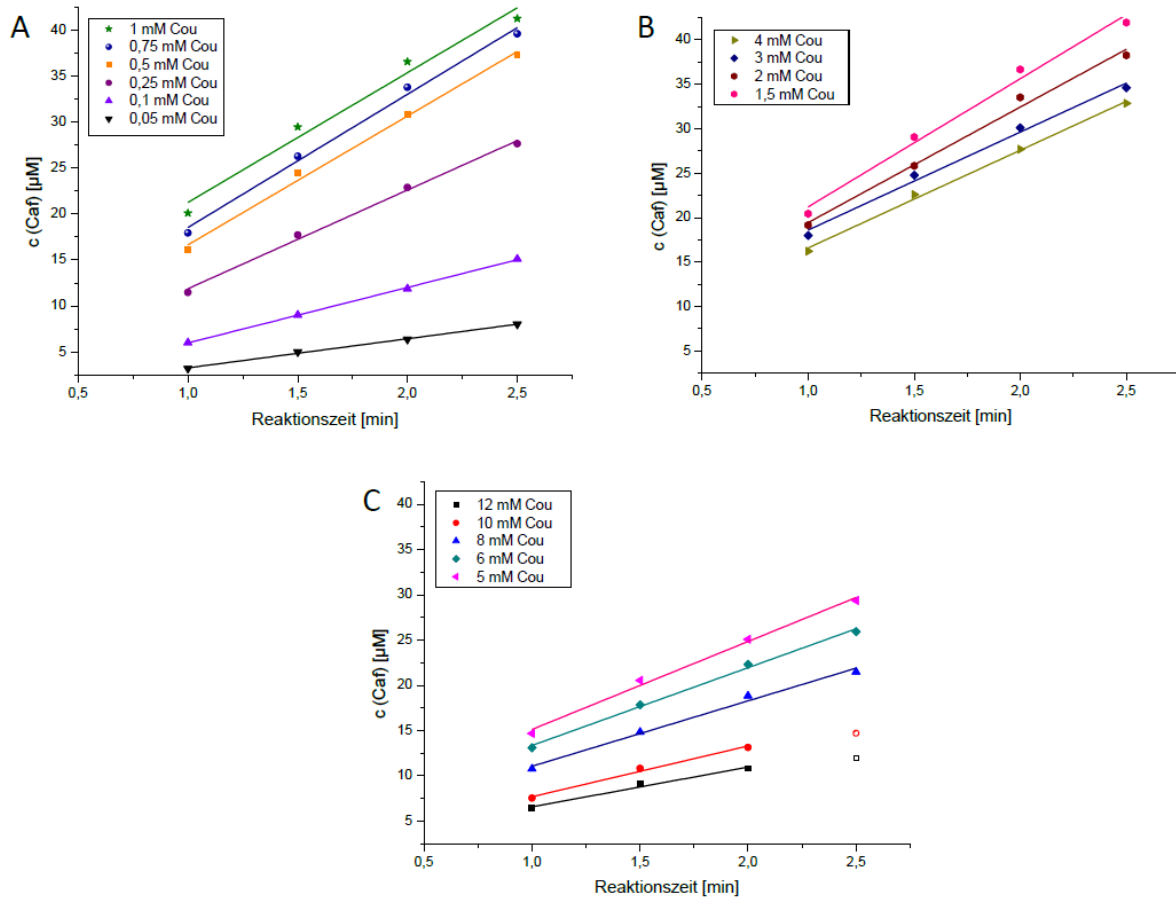
**Abb. 10.3: Progresskurven *RgTAL*-Flag (-/+ Kumarsäure)**

Dargestellt sind die Progresskurven der Bildung von Kumarsäure aus Tyrosin katalysiert durch *RgTAL*-Flag. Die Bildung von Kumarsäure wurde bei 310 nm über 5 min kontinuierlich verfolgt. **A:** ohne Kumarsäure, **B:** mit 25 µM Kumarsäure, **C:** mit 100 µM Kumarsäure.



**Abb. 10.4: Progresskurven *EchHpaB* (J. Li)**

Die im Aktivitätsassay entstandenen Proben wurden mittels HPLC analysiert. Aus der Fläche des Kaffeensäurepeaks im Chromatogramm wurde mithilfe der Kalibriergerade die Kaffeensäure-Konzentration abgeleitet. In Abhängigkeit von der Reaktionszeit dargestellt, ergeben diese Werte die abgebildeten Progresskurven. Der Anstieg der linearen Anpassungen stellt die Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  [ $\mu\text{M}/\text{min}$ ] dar. Diese Abbildung wurde der Masterarbeit von Jessica Li entnommen. Cou= Kumarsäure



**Abb. 10.5: Progresskurven PaHpaB (J. Li)**

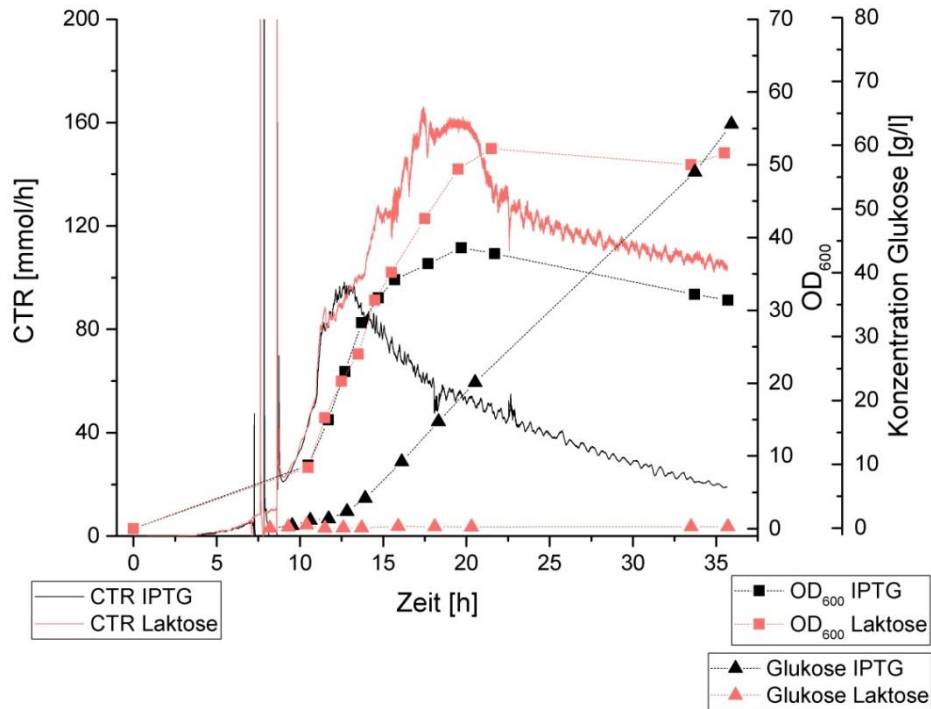
Die im Aktivitätsassay entstandenen Proben wurden mittels HPLC analysiert. Aus der Fläche des Kaffeesäurepeaks im Chromatogramm wurde mithilfe der Kalibriergerade die Kaffeesäure-Konzentration abgeleitet. In Abhängigkeit von der Reaktionszeit dargestellt, ergeben diese Werte die abgebildeten Progresskurven. Der Anstieg der linearen Anpassungen stellt die Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  [ $\mu\text{M}/\text{min}$ ] dar. Caf = Kaffeesäure. Cou = Cumarsäure. **A**  $S_0 = 0,05 - 1$  mM Cumarsäure, **B**  $S_0 = 1,5 - 4$  mM Cumarsäure, **C**  $S_0 = 5 - 12$  mM Cumarsäure. Die Datenpunkte 2,5 min/10 mM Cou ( $\square$ ) und 2,5 min/12 mM Cou ( $\square$ ) wurden bei der Berechnung der Anstiege nicht einbezogen. Diese Abbildung wurde der Masterarbeit von Jessica Li entnommen.

```

VesselScript=Dim StartDelay_h As Double = 0 'delay after inoculation [h] Dim lowLP_PV As Double =
40 'DOPV < lowDOTrg start waiting LP_DO peak Trigger Dim peakDLP_PV As Double = 5
'DeltaDOPV %/min > peakDOTrg DO peak Trigger Dim μmax As Double = 0.6 ' growth rate Dim
Feed_start As Double = 1,666 'ml/h, V_start*c_Glc_Stat / feed (300g/L) Dim tPhase_h As Double
'internal variables Dim Feed As Double = 0 dim DOPV as double Dim LP_PV as Double 'low Pass PV
Dim DLP_PV as Double '[%DO/min] Dim SubLP_PV as Double '[%DO/min] Dim xk as Double Dim sz
as Double Dim c1 as Double Dim c2 as Double Dim yk as Double Dim yk_1 as Double Dim tk as
Double Dim tk_1 as Double Dim SubLP_PV_1 as Double Dim Ti as Double = 1/60 '[h] low pass filter
'Storage dim a(4) As Double if P isNot Nothing then with P DOPV = p.DOPV tPhase_h =
p.RunTime_h - p.PhaseStart_h 'Init Storage if s is Nothing then 'a(1) tk_1 t (k-1) 'a(2)
yk_1 LowPass PV (k-1) 'a(3) SubLP_PV_1 a(1) = 0 a(2) = 0 a(3) = 0 s = a end if
'read storage tk_1 = s(1) yk_1 = s(2) SubLP_PV_1 = s(3) 'low Pass tk =
p.Runtime_h if tk_1 <> 0 then xk = DOPV sz = tk - tk_1 c1 = sz / (Ti + sz)
c2 = Ti / (Ti + sz) yk = c1 * xk + c2 * yk_1 LP_PV = yk SubLP_PV = (yk - yk_1) /
(sz*60) DLP_PV = (c1 * SubLP_PV) + (c2 * SubLP_PV_1) else 'init low Pass yk = DOPV
LP_PV = DOPV DLP_PV = 0 SubLP_PV = 0 end if 'Write Storage a(1) = tk a(2) =
yk a(3) = DLP_PV s = a 'example value output to internal values p.intC = LP_PV
p.IntD = DLP_PV select case p.phase case 0 p.phase = p.phase + 1
p.LogMessage(Entering phase " & p.phase & ": Waiting for InoculationTime > " & format(StartDelay_h,
"###") & "[h]") case 1 'batch phase if p.InoculationTime_H > StartDelay_h then p.phase =
p.phase + 1 p.LogMessage("Entering batch phase " & p.phase & ": Waiting for DOPV < " &
lowDOTrg) end if case 2 'batch phase: activate DO peak trigger if LP_PV < lowLP_PV then
p.phase = p.phase + 1 p.LogMessage("Entering batch phase II " & p.phase & ": Waiting for
DLP_PV > " & peakDLP_PV) end if case 3 'DO peak trigger if DLP_PV > peakDLP_PV then
p.phase = p.phase + 1 p.LogMessage("Entering exp. phase " & p.phase & ": start μ_max based
exponential feeding") end if case 4 'phase of exponential feeding tPhase_h = p.RunTime_h -
p.PhaseStart_h p.FDSP = Feed_start * exp(μmax * tPhase_H) if p.FDPV > 16.66 then
p.phase = p.phase + 1 p.LogMessage("Entering induction phase " & p.phase & ": start continous
feeding") end if case 5 ' continous feeding p.FDSP = 16.66 if tPhase_H > 10/60 and
p.VAPV < (p.VPV*0.005) then p.FASP = 40 else p.FASP = 0 end if if p.VAPV >
(p.VPV*0.005) then p.phase = p.phase + 1 p.LogMessage("Entering production phase "
& p.phase & ":for 24h ") end if case 6 p.FDSP = 16.66 p.FASP = 0 end select 'write
SP 'Select medium pump end with end if"

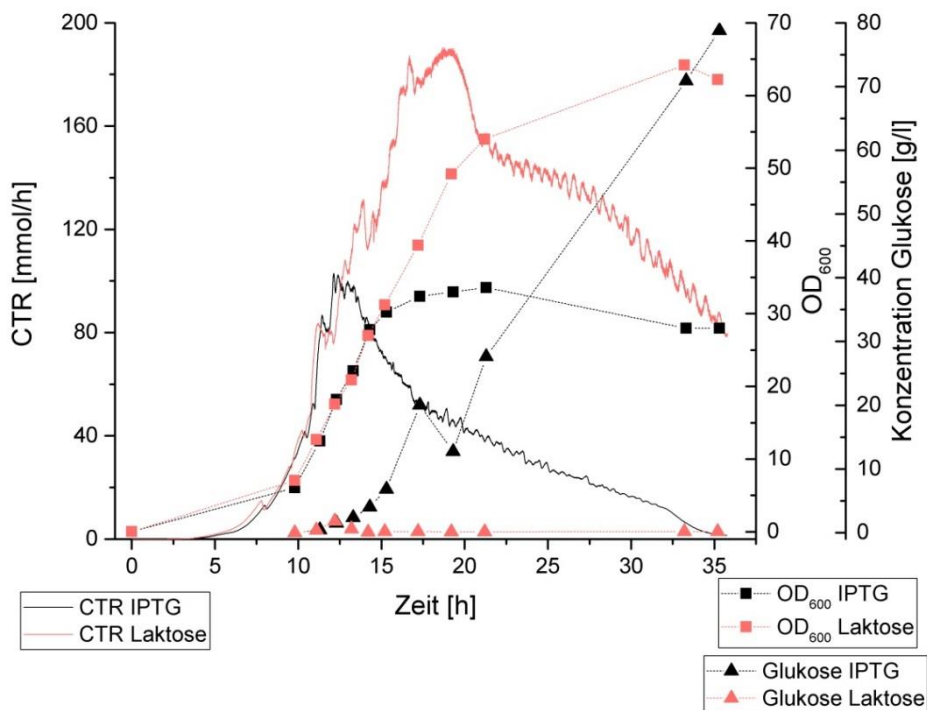
```

**Abb. 10.6: Programmierung der Parallel-Fermentation I**



**Abb. 10.7: Parallel-Fermentation I: FA2 BL21(DE3)Gold pLyst IPTG vs. Laktose**

Ergänzende Darstellung der Fermentationsergebnisse. CTR [mmol/h] (linke y-Achse), OD<sub>600</sub> (rechte y-Achse 1), Konzentration Glukose [g/L] (rechte y-Achse 2) vs. Zeit [h] (x-Achse). Schwarz: IPTG-Induktion. Hellrot: Laktose-Induktion, Linie: CTR, Viereck-Linie: OD<sub>600</sub>, Diamant-Linie: Konzentration Glukose.



**Abb. 10.8: Parallel-Fermentation I: FA2 BL21ΔR pLyst IPTG vs. Laktose**

Ergänzende Darstellung der Fermentationsergebnisse. CTR [mmol/h] (linke y-Achse), OD<sub>600</sub> (rechte y-Achse 1), Konzentration Glukose [g/L] (rechte y-Achse 2) vs. Zeit [h] (x-Achse). Schwarz: IPTG-Induktion. Hellrot: Laktose-Induktion, Linie: CTR, Viereck-Linie: OD<sub>600</sub>, Diamant-Linie: Konzentration Glukose.

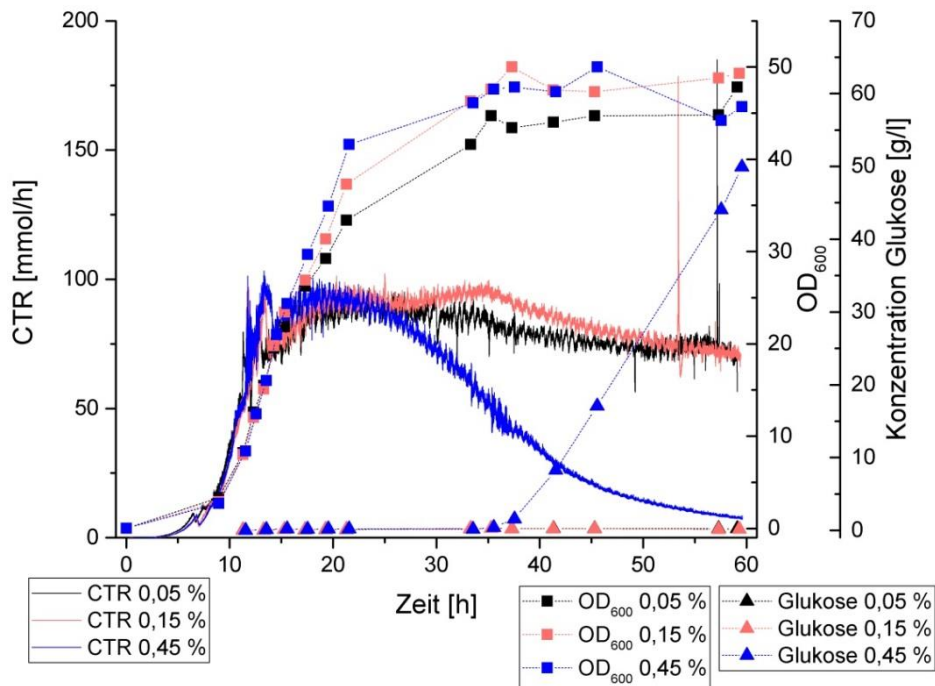


```

VesselScript=Dim StartDelay_h As Double = 0 'delay after inoculation [h] Dim lowLP_PV As Double =
40 'DOPV < lowDOTrg start waiting LP_DO peak Trigger Dim peakDLP_PV As Double = 3
'DeltaDOPV %/min > peakDOTrg DO peak Trigger Dim  $\mu$ max As Double = 0.5 ' growth rate Dim
Feed_start As Double = 0.85 'ml/h, V_start*c_Glc_Stat / feed (300g/L) Dim tPhase_h As Double
'internal variables Dim Feed As Double = 0 dim DOPV as double Dim LP_PV as Double 'low Pass PV
Dim DLP_PV as Double "[%DO/min] Dim SubLP_PV as Double "[%DO/min] Dim xk as Double Dim sz
as Double Dim c1 as Double Dim c2 as Double Dim yk as Double Dim yk_1 as Double Dim tk as
Double Dim tk_1 as Double Dim SubLP_PV_1 as Double Dim Ti as Double = 1/60 [h] low pass filter
'Storage dim a(4) As Double if P isNot Nothing then with P DOPV = p.DOPV tPhase_h =
p.RunTime_h - p.PhaseStart_h 'Init Storage if s is Nothing then 'a(1) tk_1 t (k-1) 'a(2)
yk_1 LowPass PV (k-1) 'a(3) SubLP_PV_1 a(1) = 0 a(2) = 0 a(3) = 0 s = a end if
'read storage tk_1 = s(1) yk_1 = s(2) SubLP_PV_1 = s(3) 'low Pass tk =
p.Runtime_h if tk_1 <> 0 then xk = DOPV sz = tk - tk_1 c1 = sz / (Ti + sz)
c2 = Ti / (Ti + sz) yk = c1 * xk + c2 * yk_1 LP_PV = yk SubLP_PV = (yk - yk_1) /
(sz*60) DLP_PV = (c1 * SubLP_PV) + (c2 * SubLP_PV_1) else 'init low Pass yk = DOPV
LP_PV = DOPV DLP_PV = 0 SubLP_PV = 0 end if 'Write Storage a(1) = tk a(2) =
yk a(3) = DLP_PV s = a 'example value output to internal values p.intC = LP_PV
p.IntD = DLP_PV select case p.phase case 0 p.phase = p.phase + 1
p.LogMessage("Entering phase " & p.phase & ": Waiting for InoculationTime > " & format(StartDelay_h,
"#.##") & "[h]") case 1 'batch phase if p.InoculationTime_H > StartDelay_h then p.phase =
p.phase + 1 p.LogMessage("Entering batch phase " & p.phase & ": Waiting for DOPV < " &
lowLP_PV) end if case 2 'batch phase: activate DO peak trigger if LP_PV < lowLP_PV then
p.phase = p.phase + 1 p.LogMessage("Entering batch phase II " & p.phase & ": Waiting for
DLP_PV > " & peakDLP_PV) end if case 3 'DO peak trigger if DLP_PV > peakDLP_PV then
p.phase = p.phase + 1 p.LogMessage("Entering exp. phase " & p.phase & ": start  $\mu$ _max based
exponential feeding") end if case 4 'phase of exponential feeding tPhase_h = p.RunTime_h -
p.PhaseStart_h p.FDSP = Feed_start * exp( $\mu$ max * tPhase_H) if p.FDPV > 8.5 then
p.phase = p.phase + 1 p.LogMessage("Entering induction phase " & p.phase & ": start continous
feeding") end if case 5 ' continous feeding p.FDSP = 8.5 if tPhase_H > 240/60 and
tPhase_H < 2640/60 then p.FASP = (p.VPV*0.002) else p.FASP = 0 end if 'if p.VAPV >
(0.5+(p.VPV*0.005)) then p.phase = p.phase + 1 p.LogMessage("Entering production
phase " & p.phase & ":for 24h ") ' end if case 6 p.FDSP = 8.5 p.FASP = 0 end select
'write SP 'Select medium pump end with end if"

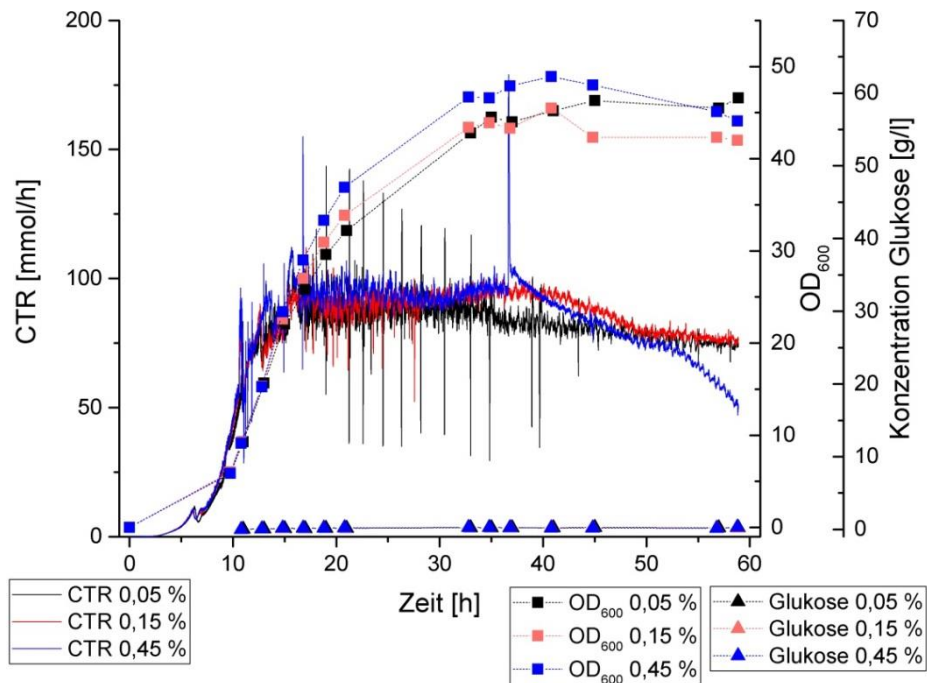
```

**Abb. 10.9: Programmierung der Parallel-Fermentation II bis IV**



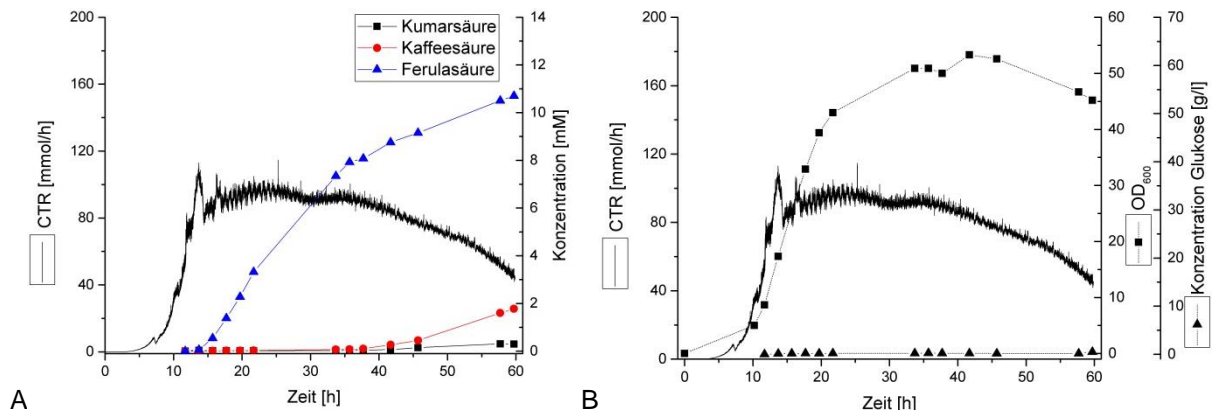
**Abb. 10.10: Parallel-Fermentation II: FA2 BL21ΔR 0,05/0,15/0,45 % Laktose**

Ergänzende Darstellung der Fermentationsergebnisse. CTR [mmol/h] (linke y-Achse), OD<sub>600</sub> (rechte y-Achse 1), Konzentration Glukose [g/L] (rechte y-Achse 2) vs. Zeit [h] (x-Achse). Schwarz: 0,05 % Laktose, Hellrot: 0,15 % Laktose, Blau: 0,45 % Laktose, Linie: CTR, Viereck-Linie: OD<sub>600</sub>, Diamant-Linie: Konzentration Glukose.



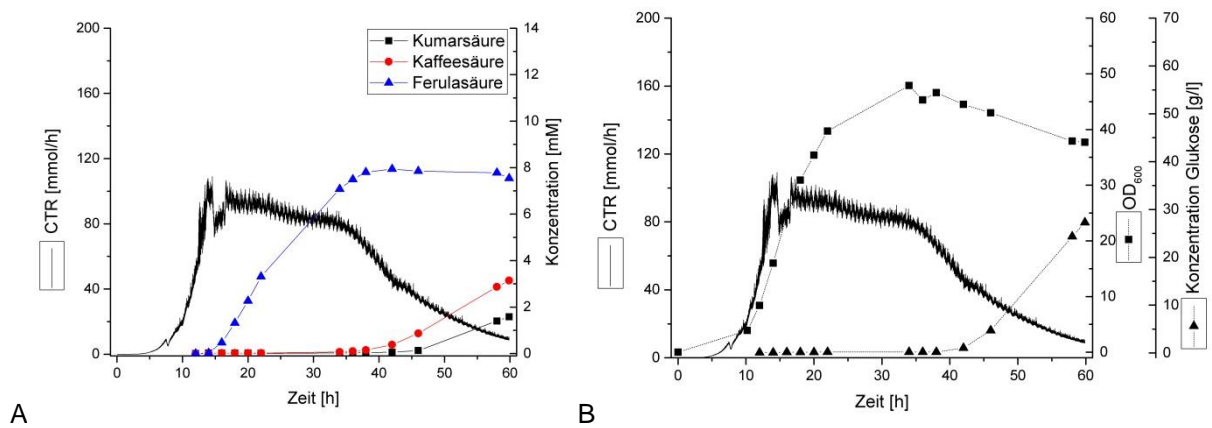
**Abb. 10.11: Parallel-Fermentation III: FA2 BL21ΔR 0,05/0,15/0,45 % Laktose (Methionin)**

Ergänzende Darstellung der Fermentationsergebnisse. CTR [mmol/h] (linke y-Achse), OD<sub>600</sub> (rechte y-Achse 1), Konzentration Glukose [g/L] (rechte y-Achse 2) vs. Zeit [h] (x-Achse). Schwarz: 0,05 % Laktose, Hellrot: 0,15 % Laktose, Blau: 0,45 % Laktose, Linie: CTR, Viereck-Linie: OD<sub>600</sub>, Diamant-Linie: Konzentration Glukose.



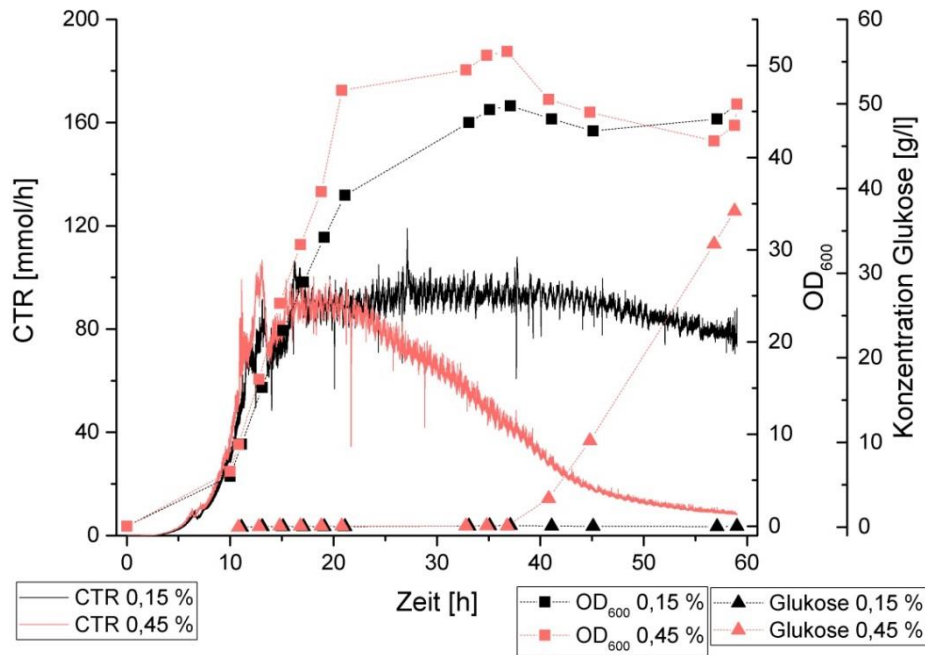
**Abb. 10.12: Reproduktion A: FA2 BL21ΔR 0,45 % Laktose (Methionin)**

Die Fermentation im Parallel-Bioreaktorsystem erfolgte mit transformierten BL21ΔR pLysT-Zellen in MM-Medium bei 37 °C. Ab Induktion wurden 1 mM/h Tyrosin + Methionin (40 h) hinzugegeben. **A:** Prozesszeit [h] vs. CTR [mmol/h] (linke y-Achse) vs. Konzentration der Produkte [mM] (rechte y-Achse), Schwarze-Linie: CTR, Schwarz mit Symbol: Kumarsäure, Rot: Kaffeesäure, Blau: Ferulasäure. **B:** CTR [mmol/h] (linke y-Achse), OD<sub>600</sub> (rechte y-Achse 1), Konzentration Glukose [g/L] (rechte y-Achse 2) vs. Zeit [h] (x-Achse), Linie: CTR, Viereck-Linie: OD<sub>600</sub>, Diamant-Linie: Konzentration Glukose.



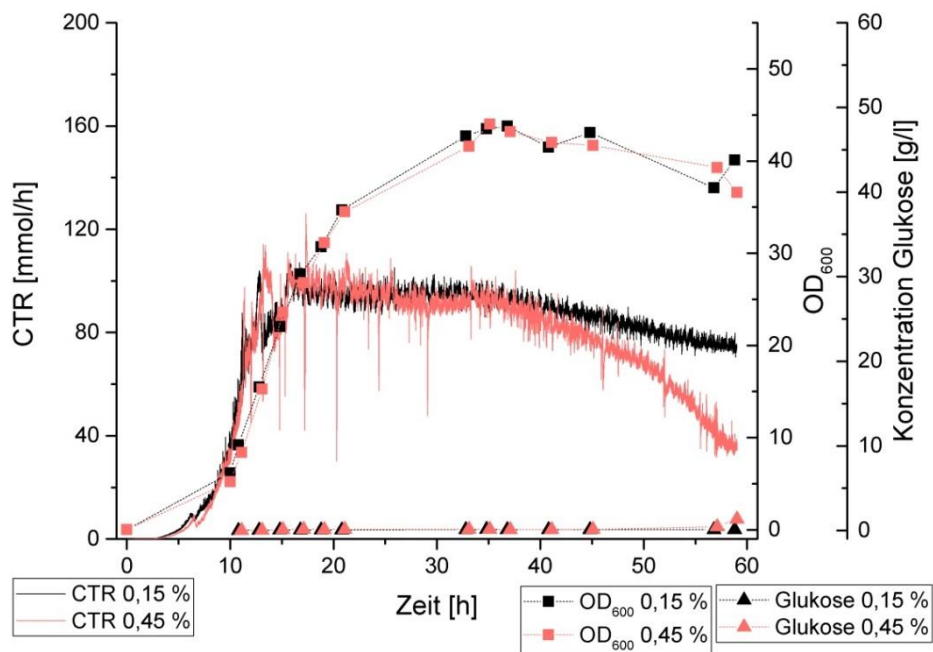
**Abb. 10.13: Reproduktion B: FA2 BL21ΔR 0,45 % Laktose (Methionin)**

Die Fermentation im Parallel-Bioreaktorsystem erfolgte mit transformierten BL21ΔR pLysT-Zellen in MM-Medium bei 37 °C. Ab Induktion wurden 1 mM/h Tyrosin + Methionin (40 h) hinzugegeben. **A:** Prozesszeit [h] vs. CTR [mmol/h] (linke y-Achse) vs. Konzentration der Produkte [mM] (rechte y-Achse), Schwarze-Linie: CTR, Schwarz mit Symbol: Kumarsäure, Rot: Kaffeesäure, Blau: Ferulasäure. **B:** CTR [mmol/h] (linke y-Achse), OD<sub>600</sub> (rechte y-Achse 1), Konzentration Glukose [g/L] (rechte y-Achse 2) vs. Zeit [h] (x-Achse), Linie: CTR, Viereck-Linie: OD<sub>600</sub>, Diamant-Linie: Konzentration Glukose.



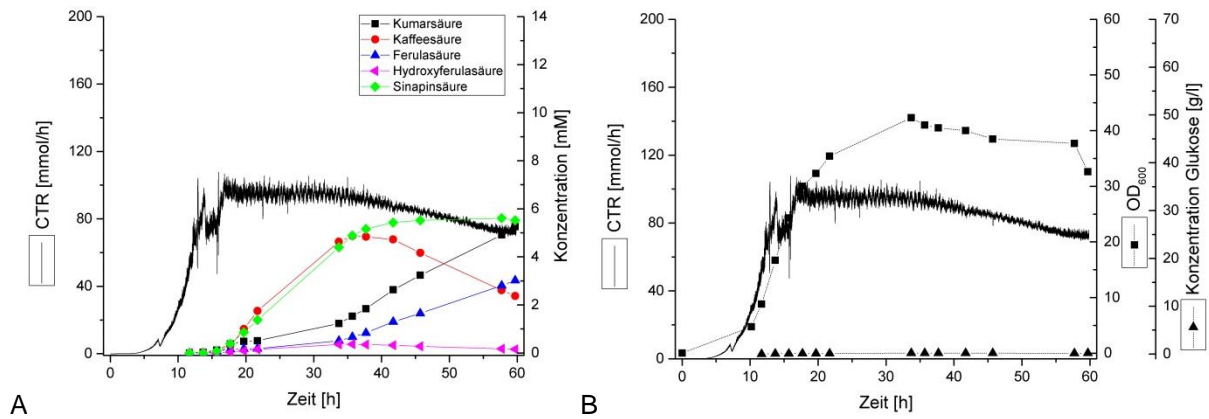
**Abb. 10.14: Parallel-Fermentation IV: SA1 BL21ΔR 0,15/0,45 % Laktose (Methionin)**

Ergänzende Darstellung der Fermentationsergebnisse. CTR [mmol/h] (linke y-Achse),  $OD_{600}$  (rechte y-Achse 1), Konzentration Glukose [g/L] (rechte y-Achse 2) vs. Zeit [h] (x-Achse). Schwarz: IPTG-Induktion. Hellrot: Laktose-Induktion, Linie: CTR, Viereck-Linie:  $OD_{600}$ , Diamant-Linie: Konzentration Glukose.



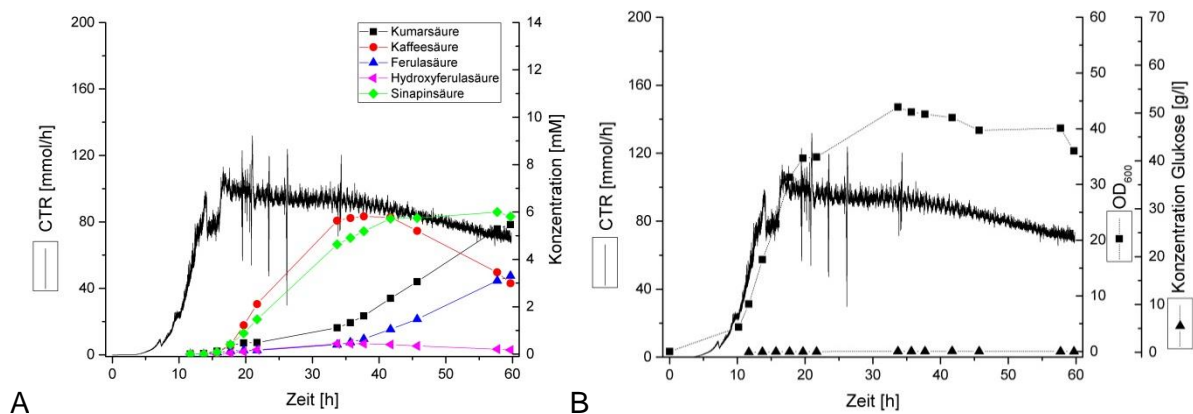
**Abb. 10.15: Parallel-Fermentation IV: SA2 BL21ΔR 0,15/0,45 % Laktose (Methionin)**

Ergänzende Darstellung der Fermentationsergebnisse. CTR [mmol/h] (linke y-Achse),  $OD_{600}$  (rechte y-Achse 1), Konzentration Glukose [g/L] (rechte y-Achse 2) vs. Zeit [h] (x-Achse). Schwarz: IPTG-Induktion. Hellrot: Laktose-Induktion, Linie: CTR, Viereck-Linie:  $OD_{600}$ , Diamant-Linie: Konzentration Glukose.



**Abb. 10.16: Reproduktion A: SA2 BL21ΔR 0,15 % Laktose (Methionin)**

Die Fermentation im Parallel-Bioreaktorsystem erfolgte mit transformierten BL21ΔR pLysT-Zellen in MM-Medium bei 37 °C. Ab Induktion wurden 1 mM/h Tyrosin + Methionin (40 h) hinzugegeben. **A:** Prozesszeit [h] vs. CTR [mmol/h] (linke y-Achse) vs. Konzentration der Produkte [mM] (rechte y-Achse), Schwarze Linie: CTR, Schwarz mit Symbol: Kumarsäure, Rot: Kaffeesäure, Blau: Ferulasäure, Magenta: Hydroxyferulasäure, Grün: Sinapinsäure. **B:** CTR [mmol/h] (linke y-Achse), OD<sub>600</sub> (rechte y-Achse 1), Konzentration Glukose [g/L] (rechte y-Achse 2) vs. Zeit [h] (x-Achse), Linie: CTR, Viereck-Linie: OD<sub>600</sub>, Diamant-Linie: Konzentration Glukose.



**Abb. 10.17: Reproduktion B: SA2 BL21ΔR 0,15 % Laktose (Methionin)**

Die Fermentation im Parallel-Bioreaktorsystem erfolgte mit transformierten BL21ΔR pLysT-Zellen in MM-Medium bei 37 °C. Ab Induktion wurden 1 mM/h Tyrosin + Methionin (40 h) hinzugegeben. **A:** Prozesszeit [h] vs. CTR [mmol/h] (linke y-Achse) vs. Konzentration der Produkte [mM] (rechte y-Achse), Schwarze Linie: CTR, Schwarz mit Symbol: Kumarsäure, Rot: Kaffeesäure, Blau: Ferulasäure, Magenta: Hydroxyferulasäure, Grün: Sinapinsäure. **B:** CTR [mmol/h] (linke y-Achse), OD<sub>600</sub> (rechte y-Achse 1), Konzentration Glukose [g/L] (rechte y-Achse 2) vs. Zeit [h] (x-Achse), Linie: CTR, Viereck-Linie: OD<sub>600</sub>, Diamant-Linie: Konzentration Glukose.

**Tab. 10.1: Übersicht der Schüttelkolben Versuche- FA2 BL21(DE3)Gold pLysT**

D: Abgedunkelt, 4 x Zugabe: 0 h, 2 h, 4 h, 20 h

Temperatur [°C]	Wachstumsrate $\mu_{\max}$ [h <sup>-1</sup> ]	Substrate [mM]			Produkte nach 24 h			OD <sub>600</sub> Induktion	OD <sub>600</sub> 24 h nach Induktion
		Tyrosin	Methionin	Serin	Kumarsäure [mM]	Kaffeesäure [mM]	Ferulasäure [mM]		
37	0,39	0,5			0,001	0,019	0,329	0,709	13,78
37	0,37	0,5			0	0,008	0,306	0,504	13,18
37	0,37	0	(20 g/L Glc)		0	0,002	0,169	0,491	13,42
37	0,22	0,5			0	0,001	0,266	0,458	12,56
37	0,45	0,5			0,001	0,008	0,356	0,686	14,65
37	0,45	0,5	0,5	0,5	0,001	0,027	0,342	0,686	16,35
37	0,45	4 x 0,5			0,001	0,402	0,417	0,686	12,75
37	0,43	4 x 0,5	4 x 0,5	4 x 0,5	0,014	0,016	0,735	0,508	11,56
37	0,47	2	2	2	0,002	0,006	0,946	0,67	12,72
24	0,47	0,5			0	0	0,281	0,498	12,66
37	0,44	5	5	5	0	0	1,967	0,642	11,72
37	0,45	2	2		0,005	0,007	0,828	0,63	12,18
37	0,53	25	25	25	0,082	0,505	3,191	0,659	9,6
37	0,52	50	50	50	0,165	0,872	3,295	0,645	12,2
37	0,52	50	50	50	0,25	0,643	3,546	0,615	9,94
37 D	0,52	5	5	5	0,06	0	1,587	0,625	6,08
37	0,52	2	2		0,002	0,011	0,879	0,627	9,6
37	0,52	2		2	0,002	0,26	0,494	0,648	12
37	0,43	50	50	50	0,224	0,404	3,668	0,643	10,64
37 D	0,49	5	5	5	0,037	0,004	1,63	0,654	6,34
37	0,46	2			0	0,246	0,478	0,658	11,4
37	0,48	2	2		0	0,011	0,814	0,647	10,28
37	0,47	5	5		0	0,007	1,875	0,679	9,48
37	0,48	25	25		0,244	0,585	2,41	0,701	9,02
37	0,48	50	50		0,2	0,29	2,438	0,684	8,34
37	0,41	5			0	1,18	0,418	0,64	11,78
37	0,42	25			0,063	4,83	0,316	0,629	9,5
37	0,42	50			0,05	4,41	0,297	0,656	10,04

**Tab. 10.2: Übersicht der Schüttelkolben Versuche SA1 BL21(DE3)Gold pLysT**

D: Abgedunkelt, 4 x Zugabe: 0 h, 2 h, 4 h, 20 h

Temperatur [°C]	Wachstum rate $\mu_{\max}$ [h <sup>-1</sup> ]	Substrate [mM]			Produkte nach 24 h					OD <sub>600</sub> Induktion	OD <sub>600</sub> 24 h nach Induktion
		Tyrosin	Methionin	Serin	Kumarsäure [mM]	Kaffeesäure [mM]	Ferulasäure [mM]	Hydroxyferulasäure [mM]	Sinapinsäure [mM]		
37	0,46	0,5			0,002	0,065	0,064	0,013	0,112	0,594	10,4
37	0,47	0,5	3 x 0,5	3 x 0,5	0,006	0,03	0,032	0,036	0,226	0,595	9,24
37	0,43	4 x 0,5	4 x 0,5	4 x 0,5	0,096	0,269	0,087	0,109	0,285	0,606	12
24	0,45	0,5			0	0	0,269	0	0,059	0,461	13,76
37	0,45	2	2	2	0,004	0,272	0,166	0,141	0,283	0,591	11,32
37	0,44	2	2 + 3 x 0,5	2 + 3 x 0,5	0,002	0,265	0,253	0,082	0,306	0,555	11,16
37	0,43	2	2		0,003	0,275	0,196	0,126	0,245	0,547	9,7
37	0,52	2	2	2	0	0,118	0,081	0,216	0,318	0,635	14,06
37 D	0,51	2	2	2	0	0,288	0,177	0,112	0,387	0,624	8,9
37 D	0,51	2	2	2	0,01	0,37	0,267	0,047	0,339	0,654	6,72
37	0,51	2	2		0,01	0,238	0,096	0,139	0,317	0,638	10,22
37	0,51	2		2	0,012	0,54	0,103	0,048	0,06	0,64	11,5
37 D	0,45	2	2	2	0,01	0,399	0,31	0,04	0,317	0,679	7,56
37 D	0,46	2	2		0,026	0,448	0,348	0,32	0,257	0,713	6,6
37 D	0,45	5	5		0,028	1,981	0,685	0,072	0,23	0,632	7,72
37	0,45	0			0,002	0,02	0,025	0,001	0,089	0,67	9,96
37D	0,43	2		2	0,003	0,641	0,083	0,063	0,047	0,669	9,44
37D	0,45	5	5	5	0,019	1,655	0,578	0,074	0,293	0,695	7,96

**Tab. 10.3: Übersicht der Schüttelkolben Versuche SA2 BL21(DE3)Gold pLysT**

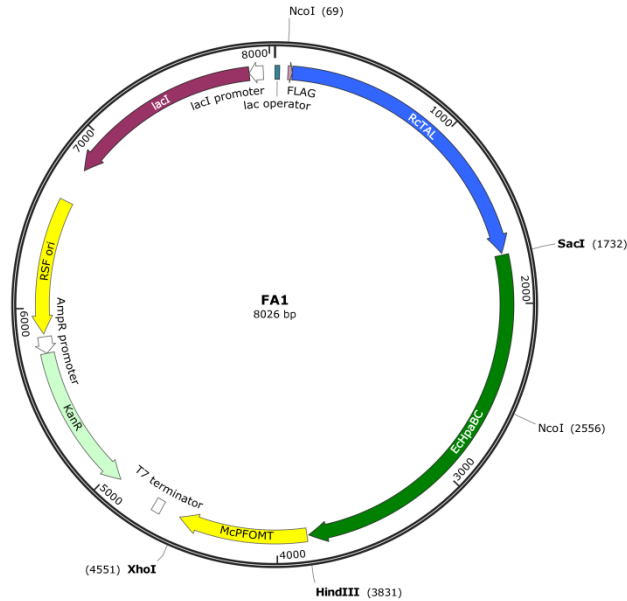
D: Abgedunkelt

Temperatur [°C]	Wachstumsrate $\mu_{\max}$ [h <sup>-1</sup> ]	Substrate [mM]			Produkte nach 24 h					OD <sub>600</sub> Induktion	OD <sub>600</sub> 24 h nach Induktion
		Tyrosin	Methionin	Serin	Kumarsäure [mM]	Kaffeinsäure [mM]	Ferulasäure [mM]	Hydroxyferulasäure [mM]	Sinapinsäure [mM]		
37 D	0,41	2	2		0,142	0,1	0,203	0,016	0,439	0,595	8,38
37 D	0,39	5	5		0,607	0,416	0,668	0,01	0,586	0,558	6,92
37	0,46	0			0,022	0,029	0,047	0,008	0,046	0,603	10,2
37	0,46	0,5			0,027	0,079	0,055	0,019	0,064	0,623	10,28
37	0,44	2	2	2	0,047	0,209	0,055	0,031	0,373	0,632	9,66
37D	0,44	2	2	2	0,164	0,037	0,243	0,002	0,364	0,635	7,42
37D	0,5	5	5	5	0,903	0,188	0,889	0,006	0,657	0,62	6,58



# 11 Erweiterter Anhang

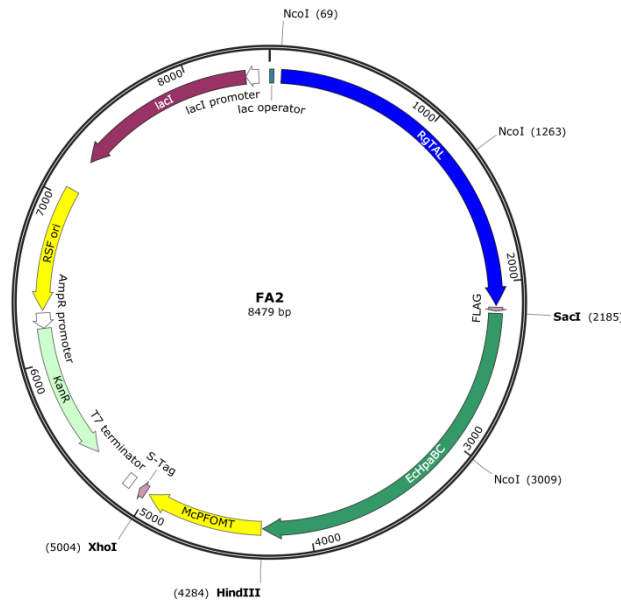
## Plasmidkarte und Sequenz von „FA1“ (pRSF FLAG-RcTAL EcHpaBC McPFOMT)



ggggaattgtgagcgggataacaattcccctgtagaataaattttgtaactttaataaggagatataccATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGGTGTTGG  
 ACGCAACTATTGGCCGCAAACGATGACTCTGCAATCCCAAACCTGCTAAAGATTGTCTGGCACTGGACGGTGCACCTGACCT  
 TGGTCCAGTGCAGAGGCTATCGCGACCCACCGCAGCCGATTAGCGTTACCCAGCGCTGCGCGAACGTTGCGCGCGTGC  
 TCATGCTCGCTTGAGACGCGATCGCCGAACAGCGTCACATCTACGGCATCACGACCCGTTTCGGTCCGCTGGCGAATC  
 GCCTGATTGGCGCGGATCAAGGTGCGGAGCTGCAGCAAACCTGATTACCATTGGCTACCGGTGTCGGTCCGAAGCTG  
 AGCTGGGCTGAGGCGCTGCCCTGATGCTGGCCCGTTGAATTCTATCTTGCAGGGTGGCAGCGGTGGCAGCCCGGAAA  
 CCATCGACCGCATCGTTGCAAGTGCTGAATGCGGGCTTCGACCCGGAAGTGCCGGCTCAGGGTACCGTCCGGTGAAGCGG  
 CGACCTGACCCCGCTGGCACACATGGTGTGGCATTGCAAGGCCGTGGCCGTATGATTGACCCGAGCGGTGCGGTTCAA  
 GAGGCGGGTGGCGTATGGATCGTCTGTGTGGTGGCCCGTTGACCCCTGGCAGCCCGCGATGGCCCTGGCTCTGGTTAATG  
 GTACCAGCGGATGACGGCAATCGCGGCTCTGACTGGCGTGAAGCAGCTCGTGGCATCGACGCGGCACTGCGTCCACAG  
 CGCGGTTCTGATGGAAGTCTGAGCGGTACGCGGTACGCGGAGCATGGCATCCGGCGTTTCGAGAGCTGGCAAGCGATGCATGA  
 CAGCTGCGTGAACCGAGCGTCTGGCCAGGCGCTGGATGGTGCAGGCCGCGTTTGTCTACCCTGACCCGAGCGCGTGC  
 GTCTGACGGCAGCCGATCTGCGTCTGAGGACCATCCGGCTCAAGACCGGTATAGCCTGCGTGTCTCCCGCAATTGGTC  
 GGTGCGGTGTGGGATAACCTGGACTGGCAGCCGCGTCTACTTGGCAGCTGAACAGCGTTACGGACAATCCGATTTT  
 TCCAGAGGGTTGCGCGGTTCCGGCCCTGCACGCGGTTAAGCTTATGGGTGTTTATGTGGCTGGCAAGCGATGCATGA  
 ACGCTGCGCTGGTTACGCTGGCCGTTTGGTGAACGTCAGATTGCGCGTCTGACCGACGAAAACTGAACAAGGGCTTG  
 CCGGCATTTCTGCACGGTGGTCAAGCCGGCCTGCAGTCTGGCTTATGGGTGCGCAAGTGACGGCTACGGCTCTGCTGG  
 CAGAGATGCGCGTAACGCGACCCCGGTTAGCGTGCAAAGCCTGTCTACTAATGGCGTAACCAAGATGTCGTGAGCATG  
 GGCAGATCGCGGCACGTGCTGCTGCGCTCAGCTGCGGTTGAGCCAGATTAGGCCATTCTGGCCCTGGCGCTGG  
 CGCAGGCAATGGACTTGGTGGACGACCCGGAAGGCCAAGCCGGCTGGTCCCTGACGGCCCGTATCTGCGCGATCGTAT  
 CCGTGCCGTGTCCCTGGCCTGCGTGGCGATCGTCTCTGGCCGGTCAATTGAGGCAGTTGCGCAGGGTCTGCGCCAT  
 CCGTCCGCGCAGCAGATCCGCCAGCGTAAGGAGGAGCTCATGAAACCAGAAGATTTCCGCGCCAGTACCCAACGCTCCT  
 TACCCGGGGAAGATCTGAAAAGCCTGCAGATGGTGGCAGATCTATCTATGCGCAGGAGTGAAGACGTCACC  
 ACTCATCCGGCATTTCGTAATGCGCGAGCGTCTGTTGCCAGCTGACGACGCACTGCACAAAACCGGAGATGCAAGGATC  
 TCTGTGTTGGAACACCGACACCGGCAGCGCGGCTATACCCATAAATTTCCGCGTGGCGAAAAGTGCCGACGACCTGC  
 GCCAGCAACGCGACGCCATCGCTGAGTGGTACGCGCTGAGCTATGGCTGGATGGGCCGTACCCAGACTACAAAGCCGC  
 TTTCCGTTGCGCACTGGCGCGAATCCGGGCTTTACGGTCAATTGAGCAGAACGCCGTAAGTGGTACACCCGATTC  
 AGGAAACTGGCCTCTACTTTAACCACGCGATTGTTAACCACCGCATGATCGTCTATTTCGGCAGCCGATAAAGGTAAAGACG  
 TTTACATCAAGCTGAAAAAGAGACTGACGCGGGATTATCGTCAGCGGTGCGAAAAGTGGTTGCCACCAACTCGGCGCTG  
 ACTACTACAACATGATTGGCTTCGGCTCGGCACAAGTATGGGCGAAAACCCGGACTTCGCACTGATGTTTCGTTGCGCCA  
 ATGGATGCCGATGGCGTGAATTAATCTCCCGCGCTTATGAGATGGTTCGCGGGTGTACCGGCTCGCCATACGACTA  
 CCCGCTCTCCAGCCGCTTCGATGAGAACGATGCGACTTGGTATGGATAACGTGCTGATTCATGGGAAAAAGCTGCTGAT  
 CTACCGGATTTTTGATCGCTGCCGTGCTGGACGATGGAAGGCGGTTTTGCCCCTATGTATCCGCTGCAAGCCTGTGTGC  
 GCCTGGCAGTGAATTAGACTTCATTACGGCACTGCTGAAAAAATCACTCGAATGTACCGGCACCCCTGGAGTTCGGTGGT  
 TGCAGGCCGATCTCGGTGAAGTGGTAGCGTGGCGCAACACTTTCGGGATTGAGTGAAGTGGTTCAGAGCAACG  
 CCGTGGGTCAACGGGCTTATTACCGGATCATGCCGACTGCAAACTATCGCGTACTGGCAGCAAAAGCTACCGCA  
 GATCAAAAACATTATCGAACGCAACGTTACAGTGGCCTGATCTATCTCCCTCCAGTGCCCGTGACCTGAATAATCCGCA  
 ATCGACAGTATCTGGCGAAGTATGTGCGCGTTCGAACGGTATGGATCACGTCCAGCGCATCAAGATCCTCAAAGTATG  
 TGGATGCTATTGGCAGCAATTTGGTGGTCCGTCACGAACTGTATGAAATCAACTACTCCGGTAGCCAGGATGAGATTGCG  
 TGCAGTCTGCGCAGGCAAAAACCTCCGGCAATATGGACAAGATGATGGCGATGGTTGATCGCTGCTCGGAA  
 CGACAGGACGGCTGTGCGCACCTGACACAACGACGATATCAACATGCTGGATAAGCTGCTGAAATAACGCA  
 GCAGGAGGTTAAGATGCAATTAGATGAACAACGCTGCGCTTTCGTGACGCGATGGCCAGCCTGTCCGACGGTAAATA  
 TTATCACACCGAGGGCGACGCCGGAATGCGGGATTACGGCAACGGCCGTCTGCTCGGTACGAGTACACCCAGCTC  
 GCTGATGGTGTGCAATACGCCAACAGTGGCATGAACCCGTTTTTCAGGGCAACGGCAAGTTGTGCGTCAACCTCAA  
 CCATGAGCAGGAAGTGGTGGCACGCCACTTCGCGGGCATGACAGGCATGGCGATGGGAGAGCGTTTTAGCCCTCATGCT  
 GGCAAAAAGTCCGCTGGCGCAGCCGGTGTAAAAGTTTCGCTGGCCAGTCTTGAAGGTGAGATCCGCGATGTGCAGGC  
 AATTGGCACACATCTGGTGTATCTGGTGGAGATTA AAAACATCATCCTCAGTGCAGAAGGTGATGACTTACTACTTAAA

CGCCGTTTCCATCCGGTGTATGCTGGAATGGAAGCTGCGATTAAAGGAGAAGCTTATGGATTTTGCTGTGATGAAGCAGGT  
 CAAAAATACAGGATTGCTACAGAGTGAAGGATTAAGGAGTATATTTCCGAAGTACTGCTATCCGCGAGAAGCAGGGTT  
 CCTCAAGGAAGTACAGGAAAGCAATGAAAGTCAACCGACTTATATGTGCTACTTACCACCTTTGCTGAACTTAGTGTCA  
 TTCGTTCTAAAATTAGTGAATGCAAAGAAGACTATTGAAGTTGGAGTCTTTACAGGATACTCCCTTACTACTGCTCTTTC  
 AATTCTGTATGATGGAAGATTACGGCAATTGATTTGACAGAGAGGCATATGAGATTGGCTTGCATTTATCAGAAAAGCT  
 GGTGTGGAGCACAAAATCACTTCATTGAATCGGATGCTATGCTAGCTCTTGACAATCTTCTGCAAGGACAAGAGAGCGGAG  
 GGGAGTTACGACTTTGGCTTTGTTGATGCGGACAACCTAACTACATCAAGTACCATGAGAGGTTGATGAAAATGATCAAG  
 GTGGGTGGCATAGTCGTTATGACAAACATTATGGGGTGGAACTGTAGCCAGCCTGAATCCGAAGTACCAGATTTTCATG  
 AAGGAAAACAGAGAAGCTGTTATTGAACTCAACAAGTTGCTTGTGCTGATCCTCGTATCGAGATTGTACATCTTCCTTTGG  
 GTGATGGTATCACTTTCTGCAGGCGTCTTTATTGACTCGAGTctggttaagaaccgctgctgcgaaattgaaacgccagcacatggactcgtactag  
 cgcagcttaattaacntagctgctgccaccgctgagcaataactagcacaacccttgggctctaaaccggcttggagggtttttgctgaaacctcaggcattgagaagcaca  
 cggtcacactgctccggtagtcaataaacgggtaaacagcaatagacataaagcggctatttaaccgacctgacctgaaccgagcagcaagctgacgaccgggtctccgcaagt  
 gcacttttcggggaatgtgcccggaaaccctattgttttcttaataacattcaaatatgataccgctcatgaatattctagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactgcaatt  
 atccatcagcattatcaataccatattttgaaaaagccgtttctgtaataagggagaaaaactcaccgagcagctccatagatggcaagatcctggatcgtctgctgattccgact  
 cgtccaacatcaatacaaccttaattcccctcgtcaaaaataagggtatcaagtgagaatcaccatgagtgacgactgaatccgggtgagaatggcaaaaattatgattttctcc  
 agactgttcaacagggccagccattacgctgctcaaaaactcactcgcataaccacccggttattcctcgtgattgcgctgagcagcagcaaatccgctgctgttaaagg  
 acaattacaacaggaatcgaatgcaaccggcgcaggaacactgccagcgcatacaataattttcacctgaatcaggatattcttaataacctggaatgctgtttccggggatc  
 gcagtgtgagtaaccatgcatcatcaggagtagcggataaaatgctgtagtgcgaagaggcataaattccctgacgagcttagctgacctcatctgtaacatcattggcaac  
 gctaccttggcatgttcagaaacaactcggcgcacgggcttccatacaatcgaatagattgctgcacctgattgccgacattatcgcgagccattatataccatataaatcagcat  
 ccattgtgaaattaatcggcctagagcaagacgtttccggtgaatggctcactcttctttcaatattgaaacattatcagggttattgctcatgagcggatacaatattga  
 atgtattgaaaaataaacaatataggatcgcagcctctccgcttccctcactgactcgcactcgtcgttgcgactgaggcagcgggtgctcagctcactcaaaagcggtaa  
 tacggttatccacagaatcaggggataagccggaaagacatgtgagcaaaaagcaaacgagcagcgaagcaaacgcccagggcgttttccataggtccgccccctga  
 cgagcatcaaaaaatcgacgctcaagccagaggtggcgaaccgacagactataaagataccaggcgttccccctggagctccctcgtgctcctgttccgacctg  
 ccgctaccggatacctgctcccttccctcgggaagcgtggcgttctcatagctcagctgttggatctcagttcgtgtaggtcgtcgtccaagctgggctgtgtgacgaa  
 cccccctcagcccagccgctgctcccttccgtaactatcgttgcagtcacccggttaagacacgactatcgcacctggcagcagccattgtaactgatttagaggactttg  
 ctgaaattatgcacctgtaaggctaaactgaagaacagattttggtgagtcggctcccaaccactacctgttcaagagttgtagctcagcgaacctgagaaaaaccac  
 cgttggtagcgtgttttttttattatgagatgagatcaatcgtctatcaagcaacagcagctattccgttactctagattcagctcaattatcttcaaaatgtagcacctgaagt  
 cagccccatagataaagttaattctatgtagctgccccgcgccaccgggaaggagcagctgggtggaaggctcgaaggatcggcagatcccggctgctaatgag  
 tgagctaaactacattaattgctgtgctcactgccccttccagctcgggaaacctgctgagcattatgaaatggcaccacgcgcccgggagaggggttgcgtattgggg  
 gccaggtgtgttttccaccagtgagacgggcaacagctgattgcccctcaccgctggccctgagagagttgcagcaagcggctccagcgtgttggcccagcagggcaaat  
 cctgttgatggtgtaaacggcgggataaactgagctgctcgtatcgtctatcccactaccgagatgtccgcaccaacgcgcagcccggactcggtaagtgcgcgactgagc  
 cccagcgcactgatgctggcaaccagcatcgcagtggaacagatgcccctcattcagcattgcatggtttgtgaaaaccggacatggactccagctgcctccggtccgctatc  
 ggctgaatttgagtgagtgagatattatgccagccagcagcagcgcgcccagagacagaaactaatggcccgcctaacagcgcgattgctggtgacccaatgagacca  
 gatgctccagcccagctgcgctaccgctctcatgggagaaaataactgtttaggtgctgctgctcagagacatcaagaaataacgccggaacattagtgagcagctccacag  
 caatggcatcctgctaccagcggatgtaatgatcagccactgacgctgctgagagaagattgtgaccgccccttacaggtctcagcagcgcctgcttaccatcgacacc  
 accacgctggcaccagctgagcggcggagattaatcggcgcgacaatttgcagcggcgcgctgagggccagactggaggtggcaaccgcaatcagcaacgactggttccc  
 gccagttgtgcccagcgggtgggaatgtaattcagctccgcatcggccttcccttccgctgtttccgagaaactggtcgtggttaccacccgagcgggaaaccgctgctg  
 aagagacaccggcatalactctgagacatgataactgactgttaccattcaccacctgaattgactctctccgggctatcattccataccgcaaggtttgcccattcag  
 ggtgctccggatcgcagctctccctatgctgactcctgattgaaataatcagactcactata

**Plasmidkarte und Sequenz von „FA2“ (pRSF RqTAL-FLAG EchPaBC McPFOMT)**

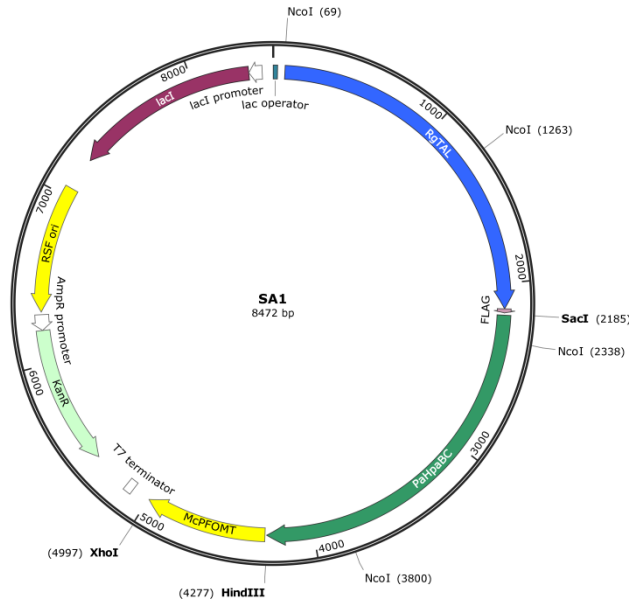


ggggaattgtgagcggataacaattcccctgtagaataattttgttaactttaataaggagatataaccATGGCACCGCTCCGACCAGCCAGAGCCAGGCA  
 CGTACCTGTCCGACCACCCAGGTTACCCAGGTGGATATTTGTTGAAAAAATGCTGGCAGCACCCGACCGATAGCACCTTGGTA  
 ACTGGATGGTTATAGCCTGAATCTGGGTGATGTTGTAGCGCAGCACGTAAGGTCGTCCGGTTCTGTAAAGATAGTGA  
 TGAATTCGACGCAAAAATGATAAAAAGCGTGGAAATTTCTGCGTAGCCAGCTGAGCATGAGCGTTTATGGTGTACCACCGG  
 TTTTGGTGGTAGCGCAGATACCCGTACCGAAGATGCAATTAGCCTGCAGAAAGCACTGCTGGAACATCAGCTGTGTGGTGT  
 TCTGCCGAGCAGCTTTGATAGCTTTCGTCTGGGTCTGGTCTGGAAAAATAGCCTGCCGCTGGAAGTTGTTCTGTGGTGAAT  
 GACCATTCTGTAAATAGCCTGACCCGTTGGTCTATAGCGCAGTTCGTCTGGTTGTTCTGGAAGCACTGACCAATTTTCTGAAT  
 CATGGTATTACCCCGATTGTTCCGCTGCTGGCACCTTAGCGCAAGCGGTGATCTGAGTCCGAGACTGACATATTGCAGCA  
 GCAATTAGCGGTATCCGGATAGCAAAGTTCATGTTGTTTCATGAGGGCAAAGAGAAAATTTCTGACGCACGTGAAGCAATG

GCACGTGTTAATCTGGAACCGGTTGTTCTGGGTCCGAAAGAAGGCTGGGTCTGGTAAATGGCACCCGAGTTAGCGCAAGC  
ATGGCAACCCCTGGCAGTGCATGATGCACACATGCTGAGCCTGCTGAGTACAGAGCCTGACCCGCAATGACCGTTGAAGCAAT  
GGTTGGTGCAGGTAGCTTTTCATCCGTTTTCTGCATGATGTTACCGTCCGATCCGACCCAGATTGAAGTTCCAGGTTAA  
TATTCGTAAGTCTGCTGGAAGGTAGCCGTTTTGCAGTTCATCATGAAGAAGAGGTGAAAGTCAAAGATGATGAAGGTATTCTG  
CGTCAGGATCGTTATCCGCTGCGTACCAGTCCGCACTGGGTGGGTCCGCTGGTTAGCGATCTGATTCATGCACATGCAGTT  
CTGACCAATTGAAGCAGGTGAGAGCACCACCGATAATCCGCTGATTGATGTTGAAAAAAAACCCAGCCATCATGGTGGTAAT  
TTTTAGGAGCAGCAGATTGCAAAATACCATTGGAAAAAACCCGCTGGCCCTGGCACAGATTGGTAAACTGAATTTACCCAG  
CTGACCGAAATGCTGAATGCAGGTATGAATCGTGGTCTGCCGAGCTGTCTGGCAGCAGAAGATCCGAGCCTGAGCTATCA  
TTGTAAGGTCTGGATATTGCAGCCGAGCATATACCAGCGAAGTGGGTATCTGGCAATCCGTTACCACCCATGTTCA  
GCCTGCCGAAATGGCAAAATCAGGCAGTGAATAGCTGGCACTGATTAGCGCACGTCGTACCACCGAAAGCAATGATGTTCT  
GAGTCTGCTGCTGGCAACCCATCTGATTGTGTTCTGACGGCCATTGATCTGCGTGCCATTGAATTTGAGTCAAACCAACAG  
TTTTGGTCCGCTATTGTTAGCTGATTGATCAGCATTTTTGATCGCAATGGTACCGCAATGACCCGGTAGCAATCTGGTATGTTG  
AAAAAGTGAATAAAACCCCTGGCAAAACGCTCTGGAACAGACCAATAGCTATGATCTGGTCCGCTGGCATGATGCATTTAG  
CTTTGCAGCAGGCACCGTTGTTGAAGTCTGAGCAGCAGCAACCTGAGCCTGGCAGCAGTTAATGCATGGAAGTTGCGAG  
CAGCAGAAAGCCGCAATGATCTGACCCGTCAGGTTCTGTAACCCCTTTGGAGCGCAGCAAGCACCAGCAGCTCCGGCAGCTG  
AGCTATCTGTCACCCGTCACCCAGATTCTGTATGCTGATTTGTTCTGTAAGAAGTGGGTGTTAAAGCAGCTCGTGGTATGTTT  
TTCTGGGTAAACAAGAAGTTACCATTGGTAGCAATGTGAGCAAAATCTATGAAGCCATTAAAAGCGGTGCGCATTATAACGT  
TCTGCTGAAAATGCTGGCCGATTATAAAGATGATGATGATAAATAAGGAGGAGCTCATGAAACCAGAAGATTTCCGCGCCA  
GTACCCAACGTCCTTTACCCGGGGAAGAGTATCTGAAAAGCCTGCAGGATGGTCCGAGATCTATCTATCTGGCGAGCGA  
GTGAAAGACGCTACCCACTCATCCGCTATTCGTAATGCCGAGCAGCTGTTGACCCAGCAGTGTACAGCAGCAGTGAACACC  
GGAGATGCAGGACTCTCTGTGTTGGAACACCGACACCCGGCAGCGGGCTATACCCATAAATCTTCCGCGTGGCGAAAA  
GTGCCGACGACCTGCGCCAGCAACGCGACGCCATCGTGAAGTGGTACGCGCTGAGCTATGGCTGGATGGGCCGTACCCC  
AGACTACAAAGCCGCTTTCCGTTGCGCACTGGCGCAATCCGGGCTTTTACGGTCACTTCGAGCAGCAAGCCTGCAACT  
GGTACACCGTATTACGAAACTGGCCTCTACTTTAAACCAGCGATTGTTAACCCACCGATCGTCTGTTCCGCTATTGCCAGC  
ATAAAGTGAAGACGTTTACATCAAGCTGGA AAAAGAGACTGACGCCGGGATTATCGTCAGCGGTGCGAAAGTGGTTGCCA  
CCAACCTCGCGCTGACTCACTACAACATGATTGGCTTCCGCTCGGCACAAGTATGGGCGAAAACCCGGACTTCGCACTG  
ATGTTCTGTTGCGCAATGGATGCCGATGGCGTGAATTAATCTCCCGCCCTTATGAGATGGTCCGCGGTGCTACCCG  
CTGCCATACGACTACCCGCTCCACGCCCTTCGATGAGAACGATGCGATTCTGGTGATGGATAACGCTGATGTTCCATG  
GGAAAACGCTGCTGATCTACCCGCTTTTGTATCGCTCGCTGCGTGGACGATGGAAGCGGTTTTGCCGCTATGATCCGCT  
GCAAGCCTGTGTGCGCTGGCAGTGAATTAGACTTCATTACGGCACTGCTGAAAAATCACTCGAATGTACCCGGCACCCCT  
GGAGTCCGTTGGTGTGACAGCCGATCTCGGTGAAGTGGTAGCGTGGCGCAACACCTTCTGGGCATTGAGTCACTGATGT  
GTTCAGAAGCAACCGGCTGGTCAACGGGGCTTATTACCGGATCATGCCGCACTGCAAACTATCGCCTACTGGCACCA  
ATGGCCTGCGCAAGATCAAAAACATTATCGAACGCAACCTACCAGTGGCCTGATCTATCTCCCTCCAGTGCCCGTGAC  
CTGAATAATCCGCAGATCGACCAGTATCTGGCGAAGTATGTGCGCGGTTGCAACGGTATGGATCACGTCCAGCGCATCAA  
GATCCTCAAACCTGATGGGATGCTATTGGCAGCGAATTTGGTGGTCTGACGAACTGATGAAATCAACTACTCCGTTAG  
CCAGGATGAGATTCCGCTGCACTGTCTGCGCCAGGCACAAAACCTCCGCAATATGGACAAGATGATGGCGATGGTTGATC  
GCTCGCTGTCGGAATAACGACAGGACGCGTGGACTGTGCCGACCTGCACAACACGACGATATCAACATGCTGAGAAAG  
CTGCTGAAAATAACGCAGCAGGAGGTTAAGATGCAATTAGATGAACAACGCCTGCGCTTTCTGACGCGATGGCCAGCCTGT  
CGGCAGCGGTAATATTATACCACCGAGGGCGACGCGGACAATCGCGGATTACGGCAACGGCCGTCTGCTCGGTAC  
GGATACACCACCGCTCGTATGGTGTGCATTAACGCCAACAGTGCAGTGAACCCGTTTTTTCAGGGCAACGGCAAGTTGT  
GCGTCAACGACTCAACCTGAGCAGGAACCTGATGCCACGCCACTTCCGCGGCATGACAGCCATGGCGATGGAAGCGC  
TTTTAGCCTCTCATGCTGGCAAAAAGGTCGGCTGGCGCAGCCGGTCTAAAAGGTTCCGCTGGCCAGTCTTGAAGGTGAGA  
TCCGCGATGTGACAGCAATTGGCACACATCTGGTGTATCTGGTGGAGATTA AAAACATCATCCTCAGTGCAGAAGGTGATG  
GACTTATCTACTTTAAACCCCGTTTTCCATCCGGTATGCTGGAATGGAAGCTGCGATTTAAGGAGAAGCTTATGGATTTTG  
CTGTGATGAAGCAGTCAAAAATACAGGATTGCTACAGATGAGGAGTTATGCCAGTATATCTCCGACTAGTGTCTATCC  
CGGAGAAGCAGGTTTTCTCAAGGAACCTCAGGGAAACCAATGAAAGTACCCAGACTTTATATGTCGACTTACCATTGC  
TGGACAATTGATGTCATTCTAAAATTAGTGAATGCAAGAAGACTATTGAAGTTGGAGTCTTACAGGATACTCCCTCT  
TACTCACTGCTCTTCAATTCCTGATGATGGAAGATTACGGCAATTGATTTCCGACAGAGAGGCATATGAGATTGGCTTGCC  
ATTTATCAGAAAAGCTGGTGTGGAGCACAAAATCACTTCTATTGAATCGGATGCTATGCTAGCTCTTGACACTTCTTGCAA  
GGACAAGAGAGCGGAGGGGTTACGACTTTGGCTTTGTTGTCGGCAAAAACCTAACACTACATCAAGTACCATGAGCGAGGTTG  
ATGAAACTAGTCAAGGTGGGTGGCATAGTCTGTTATGACAACACATTATGGGGTGGAACTGTAGCCAGCCTGAATCCGAA  
GTACCAGATTTTCATGAAGGAAAACAGAGAAGCTGTTATTGAACTCAACAAGTTGCTTGTCTGCTGATCCTCGTATCGAGATTG  
TACATCTTCTTTGGGTGATGGTATCACTTTCTGCGAGCGCTTTTATTGACTCGAGTctggttaagaaacccgctgctgcaaatgtgaacgcca  
gcatggtactgctactgacgagctcaataaactagctgctgcaacgctgagcaataaactagcaataaaccctgggctctaaacgggtgtgaggtttgtgaacc  
tcaggcatgtgagaagcacacggtcacactgctccggtgtagcaataaacggtgaaaccagcaatagacataaagcggctatfaacgacctccctgcaacgagcaagctga  
cgaccgggtctccgcaagtggcacitfttcgggaaatgtgcgcaaccctattgttttttcaatacattcaaatatgtatccgctcatgaatattcttagaaaaactcatcgag  
catcaaatgaaactgcaattttatcatatcaggattatcaataccataatttggaaaaagccgtttctgtaatgaaggagaaaaactcaccgagcagttccataggatggcaagatcctg  
gtatcggtctcgactccgactcccaacatcaatacaacttaatttccctctgcaaaaaaaggttcaaatgagaataccatgatgacgactgaatccggtgagaagt  
gcaaaagttatgcaatttctccagactgttcaaacaggccagccattacgctgcatcaaaaactcactgcatcaaccaaaccggtattctgattcgtgagcgtgagcagcaaaa  
tacgcggtcgtgttaaaaggacaattacaacaggaatcgaatgcaaccggcgaggaactgcccagcgcatacaacaattttcacctgatcaggatattcttaatacctg  
gaatgctgtttccggggatcgagtggtgagtaaacatcatcagcagtagcggataaaatgctgattggtggaagagggcataaattccgctcagccagtttagtctgaccatct  
catctgaacatcattggcaacgctactttgccatgttcagaaacaactctggcgcacggctcccaatacatgatagattgtcgcacctgattgcccagacattatcgcgagccca  
ttatacccatataaatacagcatccatgttgaatttaactcgcgcttagcaagacggttcccggtgaatattgctcatacttctcttcaatattattgaagcattatcagggattatgct  
tcatgagcggatacatattgaaatgattgaaaaataaacaataggatcagcagctcttccgctctcctgctcactgactgctcagctcggctgctgactgcccgcagcggtgic  
agctcactcaaaagcggtataacggtatccacagaatcaggggataaaagcggaaagaacatgtgagcaaaaagcaaacaccggaagaagcaaacgcccaggcggtttt  
ccataggtccgccccctgacgagcatcaaaaaactcagcgtcaagcagaggtggcgaacccgacagagactataaagataaccagcgtttccccctggaagctccctg  
cgctctccctgcccagcctgacgataccttccgcttcccttccggtgaaagcgtgcttctctatagctcagcgtgtggtgattcgtgagcgtgagcgtgagcgtccca  
agctgggctgtgacgaacccccgctcagcccagcgtgccccttatccggttaactatcgtctgagttcaaacccggttaagacacagacttatccgactggcagcagcattgg  
taactgattagagactgttctggaagtatgacctgtaaggctaaactgaaagaacagattttggtgagtgccctccaacccacttaccctgttcaaaagattggtagctcag  
gcaacctgagaaaaaccctggtgagcgggtttttcttattatgatgatgaatcaatcggttctcaagtcacgaacagactatccggtacttagattcagtgcaattatctc  
ttcaaatgtacactcagctcagccacacagataaagtgttaattctatgctgactgagcggcaccggaagagctgactggttgaagctcctcaaggctcctcaaggcctggtg  
agatcccgggtgcaatagtgagcacttaactataaattgctgctcactgccccttccagctgggaaacactgtgctcagcagctgcaatgaatcggccaacgcccgggga  
gagggctgtgctgattggcgccaggggtgttttttaccagtgagacgggcaacagctgattgcccctaccgctggccctgagagagttgacgaagcggctccacgctggt  
tgccccagcggcgaataatcctgttggatggtgtaacggcgggatataacatgagctgctcggatctgctgatccactaccgagatgtccgcaaccaacgcccagcccggact  
cggtaatggcggcagctgcccagcctctgatctggtgcaaccagcagcagctgggaacgatgccctcattcagcattgctggttggaaacccggacattggcactcca  
gtgcccctccggttccgctgattttgattgagtgagatatttgcagtgagatatttgcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc  
tggtgacccaatgacagagatgctccacgcccagctcgtaccgttctcatgggaaaaataaactggtgattggtgctgctgagagacatcaagaataacgcccgaacatta

gtgcaggcagctccacagcaatggcatcctgtgcatccagcggatgtaatgatagcccactgacgcgttgcgcgagaagattgacaccgccgcttacaggcttcgacgccc  
 cttcgttaccatcgacaccaccagctggcaccaggtgatcggcgcgagatgtaatgcggcgcacaatttgcgacggcgcgtgacgggcccagactggaggtggcaacgccaat  
 cagcaacgactgtttgccgccagttgtgtgccacgcgggtgggaatgtaattcagctccgccatcgccgctccacitttcccgcgttttcgcagaaaacgtggctgacctggttcaaca  
 cgccgggaaacgctgtgataagagacaccggcactactctgcgacatgataactggttaccattaccaccctgaattgactctctccgggctatcatgccataaccgca  
 aaggtttgcgccattcgatggtgtccggatctcgacgctctccctatcgactcctgattaggaaataatcagactactata

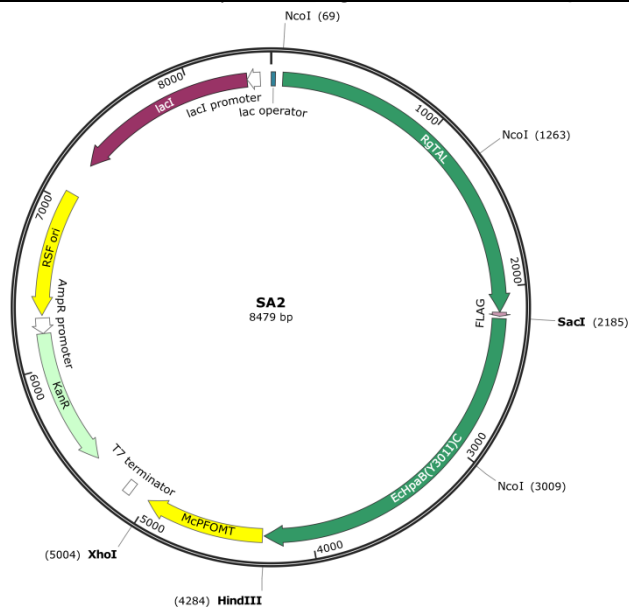
**Plasmidkarte und Sequenz von „SA1“ (pRSF RgTAL-FLAG PaHpaBC McPFOMT)**



ggggaattgtgagcggataacaattcccctgtagaataattttgtaactttaataaggagatataaccATGGCACCGCTCCGACCAGCCAGAGCCAGGCA  
 CGTACCTGTCCGACCACCAGGTTACCCAGGTGGATATTGTTGAAAAAATGCTGGCAGCACCAGCCGATAGCACCCCTGGA  
 ACTGGATGGTTATAGCCTGAATCTGGGTGATGTTGTTAGCGCAGCACGTAAGGTCGTCGGTTCGTGTTAAAGATAGTGA  
 TGAATTCGCAGCAAAATTGATAAAAGCGTGGAAATTTCTGCGTAGCCAGCTGAGCATGAGCGTTTATGGTGTACCACCGG  
 TTTTGGTGGTAGCGCAGATACCCGTACCGAAGATGCAATTAGCCTGCAGAAAGCACTGCTGGAACATCAGCTGTGTGGTGT  
 TCTGCCGAGCAGCTTTGATAGCTTTCTGCTGGTCTGGTCTGGAAAAATAGCCTGCCGCTGGAAGTTGTTCTGGTGGCAAT  
 GACCATTCTGTTAATAGCCTGACCCGTGGTCATAGCGCAGTTCGTCGTTGTTCTGGAAGCACTGACCAATTTTCTGAAT  
 CATGGTATTACCCCGATTGTTCCGCTGCGTGGCACCATTAGCGCAAGCGGTGATCTGAGTCCGCTGAGCTATATTGCAGCA  
 GCAATTAGCGGTATCCGGATAGCAAAGTTCATGTTGTTGATGAGGGCAAAGAGAAAATTCGTACGCACGTGAAGCAATG  
 GCACTGTTAATCTGGAACCCGTTGTTCTGGGTCCGAAAGAAGGCTGGGTCTGGTTAATGGCACCCGAGTTAGCGCAAGC  
 ATGGCAACCCTGGCACTGATGACACATGACACATGCTGAGCCTGCTGAGTCAGAGCCTGACCCGATGACCGTTGAAGCAAT  
 GGTGGTGCATGCAGGTAGCTTTTATCCGTTTCTGCATGATGTTACCCGTCCGCATCCGACCCAGATTGAAGTTGCAGGTAA  
 TATTCGTAAGTCTGGAAGGTAGCCGTTTTGCAGTTCATCATGAAGAAGAGGTGAAAGTCAAAGATGATGAAGTATTCTG  
 CGTCAGGATCGTTATCCGCTGCGTACCAGTCCGCAGTGGTGGTCCGCTGGTTAGCGATCTGATTCATGCACATGCAATG  
 TACCATTGAAGCAGGTGAGCACCACCGATAATCCGCTGATGATGTTGAAAACAAAACCCAGCCATCATGGTGGTAAT  
 TTTGAGGCAGCAGCTGCAAAATACCATGGAAAAACCCGCTGGCCGCTGGCAGAGATTGGTAAATTTGATGAAAAAAGCAG  
 CTGACCGAAATGCTGAATGCAGGTATGAATCGTGGTCTGCCGAGCTGTCTGGCAGCAGAAAGTCCGAGCCTGAGCTATCA  
 TTGTAAGGTCTGGATATTGCAGCCGAGCATATACCAGCAACTGGGTATCTGGCAAATCCGGTTACCAACCATGTTCA  
 GCCTGCCGAAATGGCAAATCAGGCAGTGAATAGCCTGGCACTGATTAGCGCACGTCTACCACCGAAAGCAATGATGTTCT  
 GAGTCTGCTGCTGGCAACCCATCTGATTGTTGTTCTGCAGGCCATTGATCTGCGTGCATTGATTTGATGAAAAAAGCAG  
 TTTGGTCCGGCTATTGTTAGCCTGATTGATCAGCATTGTTGGTAGCGCAATGACCCGTTAGCAATCTGCGTGTGAACTGGTTG  
 AAAAAGTGAATAAAACCCCTGGCAAAACGTTCTGGAACAGACCAATAGCTATGATCTGGTTCCGCGTTGGCATGATGATTTAG  
 CTTTGCAGCAGGCACCGTTGTTGAAGTCTGAGCAGCACCAGCCTGAGCCTGGCAGCAGTTAATGCATGGAAGTTGCAG  
 CAGCAGAAAGCGCCATTAGTCTGACCCGTGAGTTCGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG  
 AGCTATCTGTCACCGCTACCCAGATTCTGTATGCATTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG  
 TTCTGGTAAACAAGAAGTTACCATTGGTAGCAATGTGAGCAAAATCTATGAAGCCATTAAGCGGTTCCGATTAATAACGT  
 TCTGCTGAAAAATGCTGGCCGATTATAAAGATGATGATGATAAATAAGGAGGAGCTCATGAAACCCGAAGATTCCCGTGCCTC  
 TGCCACCCGTCCGTTACCCGGCAGGAGTACCTCGCCAGCCTGCGCAGCAGCCGTGAGATCTAACCTACCGCGACCCG  
 GTCAAGGACGTCACCAAGCCACCCCGCCTCCGCAACCGCGCCGCTCCATGGCCCGGCTCTACGACGCCCTGCACGATC  
 CGCAGAGCAAGGAAAAGCTCTGCTGGGAGACCGATACCGGCAACGGCGGCTATACCCACAAGTTCTCCGCTACGCGCG  
 CAGCGCCGACGAACTGCGCCAGCAGCGCAGCCATCGCCGAGTGGTTCGCGGCTGACCTACGGCTGGATGGGCCGAC  
 CCCGACTACAAGGCCGCTTCGGCAGCGCCCTCGGCCAACCCGGGCTTCTACGGGCGTTTCGAGGACAACGCGGAA  
 ACCTGGTACAAGCGCATCCAGGAAGCCTGCTGTACTCACTCAACCTGCAACCTGCAACCTGCAACCCGCGGCAAGCC  
 GGTGGACCAGGTCAAGGACGTGTTTCTCGTGGTGGACGAGGAAGTCGACGGCGGCATCGTCTGTCAGCGGCGCAAGGTG  
 GTCGCCACGAATTCGCGCTGACCCACTACAACCTCGTCCGCAAGGTTTCGCGCAACTGCTCGGCGCACACCCGACT  
 CGCCCTGATGTTTATCGCGCCGATGAACACCCCGGATGAAGCTGATCTGCCGCCCTCTACGAACTGGTGGCGGGTA  
 TCGCCGTGTCGGTTCGACTACCCGCTGTCAGCCGTTTTCCAGCAGGAACGACGCGATCCTGGTGTGAGAGCCTGTTT  
 ATCCCTGGGAGAAGTACTGATCTACCGGACTTCGAGCGCTGCAAGCAGTGGTTCCCCAGGGTGGCTTCGGCCGGCT  
 GTTCCCGATGCAGGGCTGCACCCGCTGGCGGTCAAGCTCGACTTATACCCGGCGCCCTCTACAAGGCCCTGCAATGCA  
 CCGGCTCCCTGGATTCGCGCGGCTGCAGGCGCAGTGGCGGCAAGTGGTGGCCTGGCGCAACCTGTTCTGGTCTGCTGAC  
 CGAGCCATGTACGGCAACCGCAGCAATGGCAGCGCGCGCTTCTGCCCAGCGCCGAGCCCTGACAGCCTGACGCTACCG  
 CGTGCTGGCGCCGACGGCTACCCGGAGATCAAGAAGACCATCGAGCAGGTGGTCCGAGCGGCCTGATCTACCTGCC  
 TCCGGGCTTCGCGACCTGCACAATCCGCAACTCGACAAGTATCTCCACCTATTGCCGCGGCTCCGGCGCATGGGCCA

CCGGGAGCGGATCAAGATCCTCAAGTCTGCTGCTGGGACGCCATCGGCAGCGAGTTCGGCGGCCGCCACGAGCTGTACGAG  
 ATCAACTACGCCGGCAGCCAGGACGAGATCCGCATGCGAGCCCTGCGCCAGGCCGATCGGCAGCGGGGCGATGAAGGGC  
 ATGCTCGGCATGGTCGAGCAGTGCATGGCGACTACGACGAGAACCGGCTGGACCGTGGCCGACTGCACAACCCGGACG  
 ACATCAACGTGCTCGATCGCATCCGCCAATGAGGAGTTAAGATGTCCAGCTCGAACCCAGGCAGCAAGCCTTCCGCAA  
 CGCCATGGCGCATCTTTCCGGCGCGGTCAACGTGATCACCAGCAACGCCCGGCCGACGCTGCGGGATCACCGCCACC  
 GCGGTCTGCTCGTCAACGACAGCCCGCCGACGCTGATGCTCTGCATCAACCGCAACAGCGAGATGAACACGGTGTTCAA  
 GGCCAACGGTCGACTCTGCGTGAACGTCTCAAGCGGCAACATGAAGAGGTGGCCCGCACTTCGCCCGCATACCCGAG  
 GTCCCGATGGAACGCCGCTTCGCCCTCCACGACTGGCGCGAGGGCTCGCCGGGTTGCCGGTGTGCACGGCGCCCTG  
 GCCAACCTGCAGGACGCATCGCCGAGGTCCAGGAGATCGGCACCCACTCGGTGCTGTTGCTGGAAGTGGAGGACATCC  
 AGGTCCTCGAACAGGGCGGACGGCCTGGTCTACTTCAGCCCGAGCTTCCATCGCCTGCAATGCCCGCGGGCGGGCCTG  
 AGGAGAAGCTTATGGATTTTGTGTGATGAAGCAGGTCAAAAACAGGATTGCTACAGAGTGAAGGATTATGCCAGTAT  
 TCTCCGAAGTGTGTCTATCCGCGAGAAGCAGGGTTCTCAAAGGAACAGGGAAGCCAAATGAAAGCAACCCGACTCTTA  
 TATGTGACTTACCCTTGTGACAATTGATGTCATTCGTTCTAAAATTAGTGAATGCAAAGAAGACTATTGAAGTTGGAG  
 TCTTTACAGGATACTCCCTTACTACTGCTCTTTCAATTCCTGATGATGAAAGATTACGGCAATTGATTTGACAGAGAG  
 GCATATGAGATTGGCTTGCCATTTATCAGAAAAGCTGGTGGAGCACAAAATCACTTCAATTGATCGGATGCTATGCTAG  
 CTCTTGACAATCTTCTCAAGGACAAGAGAGCGGAGTTACGACTTTGGCTTTGTTGATGCGGACAACCACTAACTACA  
 TCAAGTACCATGAGAGGTTGATGAACTAGTCAAGGTGGGTGGCATAGTCGCTTATGACAACACATTATGGGGTGGAACTG  
 TAGCCCAGCCTGAATCCGAAGTACCAGATTTTCATGAAGGAAAACAGAGAAGCTGTTATTGAACTCAACAAGTTGCTTGTGC  
 TGATCCTCGTATCGAGATTGTACATCTTCTTTGGGTGATGGTATCACTTCTGCAGGCGTCTTTATTGACTCGAGTctgtgtaaag  
 aaaccgctgtcggaaaattgaaacgccagcacatggactgctactagcgcagcttaattaacctaggctgtgccaccgtgagcaataactagcataacccttgggacctaa  
 acgggtctgaggggttttttctgtaaacctcaggcatttgagaagcacacggctcacactgctccggtagtaataaacggtaaacccagcaatagacataagcggctttaa  
 ccctgcctgaaccgacgacaagctgacgaccgggtctccgaagtgccactttccgggaaatgtgcgcggaaccctattgtttttctaaatcattcaaatatgatccgctc  
 atgaattaattctagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactgcaatttattcatatcaggattatcaataccatattttgaaaaagccgtttctgtaatgaaggagaaaactcaccg  
 aggcagtccatagatggaagatcctggatcggctcgtcgtgattccgactccaacatcaatacaacctattaattccctcgtcaaaaataaggtatcaagtgagaatcacc  
 atgagtgcagcattatccggtgagaatggcaaaagttagctattctccagactgtttcaacagggccagcattacgctcgtcatcaaaatcactgcctcaaccaaacctgattc  
 atcgtgattgcgctgagcgcagacgaataacggctcgtgttaaaggacaattacaacaggatcgaatgcaaccggcgcaggaaactgccagcgcatacaaatat  
 cacctgaatcaggatattcttaactctggaatgctgtttcccggggatcgcagtggtgagtaaccatgatcatcaggagtagcggataaaatgctgatgctggaagaggcata  
 aattcctgcagcatttagctgacctctatctgtaacatcattgcaacgctacctgttccatgttcagaacaactctggcgcacgggctccacatacaatgatagattgctc  
 acctgattgccgacattatcgcgagccattatacccatataaaatcagcagccatggttgaatgcaacgctcgcgctgagcaagacgttcccggtgaaatggtctatactctcttt  
 caatattatgagcattatcagggttattgctcatgagcggatacatattgaaatgattagaaaaataaacaataggcatgcagcgtcttccctctctcgtcactgactgctac  
 gctcgtcgtcagctcggcgcagcgtgacgctcaaaaagcggtaacaggttatccacagaatcaggggataaagccggaaagacatgtgagcaaaaagcaaaagca  
 ccggaagaagcaaccgcccaggcgttttccataggctccgccccctgacgagcatcaaaaaatcgacgctcaagccagaggtggcgaaacccgacaggactataaagat  
 accagcgtttccccctggaagctccctcgtcctcctcgtcagccctgcccctaccgataactgctccgcttccctcctcgggaagcgtggcgttctcatagctcagcgtgt  
 ggtatctcagttcgttaggtctgctcctcaagctgggctgtgacgaacccccgttcagcccagccgtgcgcttatccggtaactatcgtctgagtccaacccggaagac  
 acgactatcgcactgagcagcagcattggaactgattagagacttctgtgaggtatgacactgtaagcctaactgaaagaacagatttggtagtgccgtcctccaaccc  
 acttacctggtcaaaagattgtagctcagcgaacctgagaaaaccacggtgtagcgtgtttcttattatgatagatgatgaatcaatcggtctcaatgcaacgaacagct  
 attccgtactctagattcagtgcaattatcttcaaatgtagcactgaaagtcagcccatacagataaagtgtgaaattcctatgtagtcccccgcgccaccggaaaggagctga  
 ctgggtgaaagctcctcaagggcatcggctgagatcccgggtgcctaatgagtgagcactaactataaattgctgctcactgcccgttccagtcgggaaacccgtcgtgccagc  
 tgcaataatgaaatcgccaacgcgcccgggagagcgggttgcgtattggcgccaggggtgtttcttaccagtgagacgggcaacagctgattgccctcaccgctggccctg  
 agagagttgcagcaagcggctccacgctggttcccacagcaggcgaaaatcctgtttgatggtggttaacggcgggataaacatgatgctctcggatcgtctatcccactaccg  
 agatgtccgcaaacgcgcagcccggactcggtaatggcgcgactgcccagcctatgatcgttgcaaccagcatcagctgggaacgatgccctcattcagcattgctc  
 atggtttittgaaaaccggacatggcaactccagctcgcctcccgttccgctatcggctgaaattgattgagcagtgagatattatgcccagccagacgcagacgcggcagacag  
 aacttaattggcccgtacaagcgcgatttgcgtgaccacaatgcgaccagatgctccacgccagctcgcgaccgtctcatgggagaaaataactggtgatgggtgctcgtgca  
 gagacatcaagaaataacgccggaacattagtcagggcagctccacaagcaatggcactcgtgctcagcgggatagttatgatcagcccactgacgcttgcgcgagaagat  
 tggcaccgcccgttacagggctcgcagcggcttcttaccatcagaccaccacgctggcaccagttgatcggcgcgagattaatcggcggacaatttgcagcggcggctg  
 cagggccagactggaggtgcaacgcgcaacgactgttgcggcagctgttggcgcagcgggtgggaatgtaattcagctccgcatcggcctccacttttcccgcg  
 ttttcgagaaaactggtgctgctcgttaccacgcgggaaacggctgataagagacaccggcactactcgcgacatgataacgcttactggttccattcaccacctgaattga  
 ctctctccggcgctatcatgccataccgcgaaaggttttgcgccattcaggtgtccggatctcgcgctcctctatgactcctcattaggaataatacagactcactata

Plasmidkarte und Sequenz von „SA2“ (pRSF RqTAL-FLAG PaHpaBC McPFOMT)







CCGACCGATAAAGTGAAAGACGTTTACATCAAGCTGGAAAAAGAGACTGACGCCGGGATTATCGTCAGCGGTGCGAAAGT  
GGTTGCCACCAACTCGGCGCTGACTCACTACAACATGATTGGCTTCGGCTCGGCACAAGTGATGGGCGAAAACCCGGACT  
TCGCACTGATGTTCTGTTGCGCCAATGGATGCCGATGGCGTGAATTAATCTCCCGCGCCTCTTATGAGATGGTCGCGGGTG  
CTACCGGCTCGCCATACGACTACCCGCTCTCCAGCCGCTTCGATGAGAACGATGCGATTCTGGTGATGGATAACGTGCTG  
ATTCCATGGGAAAACGTGCTGATCTACCCGCTTTTGTATCGCTGCCCTGCTGGACGATGGAAGCGGTTTTGCCCGTATG  
TATCCGCTGCAAGCCTGTGTGCGCCTGGCAGTGAATTAGACTTCATTACGGCACTGCTGAAAAAATCACTCGAATGTACC  
GGCACCCCTGGAGTTCGTTGGTGTGCAGGCCGATCTCGGTGAAGTGGTAGCGTGGCGCAACACCTTCTGGGCATTGAGTG  
ACTCGATGTGTTTCCAGAAGCAACGCCGTGGGTCAACGGGGCTTATTTACCGGATCATGCCGCACTGCAAACCTATCGCGTAC  
TGGCACCAATGGCCTACGCGAAGATCAAAAACATTATCGAACGCAACGTTACCAGTGGCCTGATCTATCTCCCTCCAGTG  
CCCGTGACCTGAATAATCCGCAGATCGACCAGTATCTGGCGAAGTATGTGCGCGGTTTCAACGGTATGGATCACGTCCAG  
CGCATCAAGATCCTCAAACCTGATGTGGGATGCTATTGGCAGCGAATTTGGTGGTGTGTCACGAACTGTATGAAATCAACTACT  
CCGGTAGCCAGGATGAGATTGCGCTGCAGTGTCTGCGCCAGGCACAAAACCTCCGGCAATATGGACAAGATGATGGCGATG  
GTTGATCGCTGCCTGTGCGAATACGACCAGGACGGCTGGACTGTGCCGACCTGCACAACAACGACGATATCAACATGCT  
GGATAAGCTGCTGAAATAACGCAGCAGGAGGTTAAGATGCAATTAGATGAACAACGCCCTGCGCTTTCGTGACGCGATGGC  
CAGCCTGTGCGCAGCGGTAAATATTATACCACCGAGGGCGACGCCGGACAATGCGGGATTACGGCAACGGCCGTCTGC  
TCGGTACGGATACACCACCGTGCCTGATGGTGTGCATTAACGCCAACAGTGCATGAACCCGGTTTTTCAGGGCAACCG  
CAAGTTGTGCGTCAACGTCCTCAACCATGAGCAGGAACTGATGGCAGCCACTTCGCGGGCATGACAGGCAATGGCGATGG  
AAGAGCTTTTTAGCCTCTCATGCTGGCAAAAAGTCCGCTGGCAGCCGGTGTAAAAGTTTCGCTGGCCAGTCTTGAA  
GGTGAGATCCGCGATGTGACGCAATTGGCACACATCTGGTGTATCTGGTGGAGATTA AAAACATCATCTCAGTGCAGAA  
GGTATGGACTTATCTACTTTAAACGCCGTTTTCCATCCGGTGTGCTGAAATGGAAGCTGCGATTTAAAGGAGaagcttggcg  
cgactcgagaccaccaccaccactgagatccggctgtaacaaagcccgaaggaagctgagttggctgctgccaccgctgagcaataactagcataacccttgggg  
cctctaaacgggtcttgggggttttctgtaagggaggaactatatccggat

### Sequenz von (pET28a )PaHpaBC

tctagaAATAATTTTGTAACTTTAAGAAGGAGATATAGAGCTCATGAAACCCGAAGATTTCCGTGCCTCTGCCACCCGTCGG  
TTCACCCGGCAGGAGTACCTCGCCAGCCTGCGCGACGACCGTGAGATCTACATCTACGGCGACCGCGTCAAGGACGTCA  
CCAGCCACCCCGCCTTCCGCAACGCGGCCGCTCCATGGCCCGCTCTACGACGCCCTGCACGATCCGCAGAGCAAGGA  
AAAGCTCTGCTGGGAGACCGATACCCGGCAACGCGGCTATAACCCACAAGTTCTTCCGCTACGCGCGCAGCGCCGACGAA  
CTGCGCCAGCAGCGCAGCCATCGCCGAGTGGTGCAGGCTGACCTACGGCTGGATGGGCCGACCCCGGACTACAAG  
GCCGCTTCGGCAGCGCCCTCGGCGCAACCCGGGCTTCTACGGCGTTTTCGAGGACAACGCGAAAACCTGGTACAAGC  
GCATCCAGGAAGCCTGCCTGTACCTCAACCATGCCATCGTCAACCCGCCGATCGACCCGCAAGCCGGTGGACCAGGTC  
AAGGACGTGTTTATCTCGGTGGACGAGGAAGTCGACGGCGGCATCGTGTGACGCGGCCAAGGTGGTGCACCAGAAAT  
CCGCGCTGACCCACTACAATTCGTGCGCCAGGGTTCGGCGCAACTGCTCGGCCGACAACCCGACTTCGCCCTGATGTTT  
ATCGCGCCGATGAACACCCCGGCATGAAGCTGATCTGCCGCCCTCTACGAACTGGTGGCGGGTATCGCCGGATCGC  
CGTTTCGACTACCCGCTGTCAGCCGTTTTCGACGAGAACGACGCGATCGTGGTATGGACAAGGTGTTTATCCCTGGGAG  
AAGCTACTGATCTACCGGACTTCGAGCGCTGCAAGCTGGAAGTGGTTCGCCAGGGTGGCTTCGCGCGCTGTTCCCGATGCA  
GGGCTGCACCCCGCTGGCGGTCAAGCTCGACTTATCACCGCGCCCTCTACAGGCCCTGCAATGCACCCGGCTCCCTG  
GAGTTCCGCGGCGTGCAGGCGCAGGTCGGCGAAGTGGTGGCCTGGCGCAACCTGTTCTGGTGCCTGACCGACGCCATGT  
ACGGCAACGCCAGCGAATGGCACGGCGGCCCTTCTGCCAGCGCCGAGGCCCTGCAGGCCCTACCGCGTGTGGCGC  
CGCAGGCCCTACCCGAGATCAAGAAGACCATCGAGCAGGTGGTGCACGCGCCTGATCTACCTGCCCTCCGGCGTTCCG  
CGACCTGCACAATCCGCAACTCGACAAGTATCTCTCCACCTATTGCCGCGGCTCCGGCGCATGGGCCACCGGGAGCGG  
ATCAAGATCCTCAAGCTGCTCTGGGACGCCATCGGCAGCGAGTTCGGCGGCCGCCACGAGCTGTACGAGATCAACTACGC  
CGGCAGCCAGGACGAGATCCGCATGCAGGCCCTGCGCCAGGCGATCGGCAGCGGGCGATGAAGGGCATGCTCGGCAT  
GGTGCAGCAGTGCATGGGCGACTACGACGAGAACGGCTGGACCGTGCCGCACCTGCACAACCCGGACGACATCAACGTG  
CTCGATCGCATCCGCCAATGAGGAGGTTAAGATGTCCCAGCTCGAACCCAGGCAAGCCTTCCGCAACGCCATGGCGC  
ATCTTTCCGGCGGGTCAACGTGATCACCAGCAACGGCCCGGCCGACGCTGCGGGATCACCGCCACCGGGTCTGCTC  
GGTACCGACAGCCCGCAGCGCTGATGCTCTGCATCAACCGCAACAGCGAGATGAACACGGTGTTCAGGCCAACGGTC  
GACTCTGCGTGAACCTCCTCAGCGGCAACATGAAGAGTGGCCCGCCACTTCGCCGGCATGACCGAGGTCCCGATGGA  
ACGCCGCTTCGCCCTCCACGACTGGCGCGAGGGCTCGCCGGGTTGCCGTTGCTGCACGCGCCCTGGCCAACCTGCA  
GGGACGCATCGCCGAGGTCAGGAGATCGGCACCCACTCGGTGCTGTTGCTGGAAGTGGAGGACATCCAGGTCCTCGAA  
CAGGGCGACGGCCTGGTCTACTTCAGCCGAGCTTCCATCGCCTGCAATGCCCCCGCGGGCGGCCCTGAGGAGaagctt

### Sequenz von (pET28a )SeHpaBC

tctagaAATAATTTTGTAACTTTAAGAAGGAGATATAGAGCTCATGACCATCACGTCACCTGCGCCGGCGGGCCGGCTCAA  
CAACGTCGCCCGATGACGGGCGAGGAGTACCTGGAATCACTGCGGGACGGCCGAGAGGTCTACATCTACGGCGAGCGG  
GTCGACGACGTACCCACGCACCTGGCCTTCCGCAACAGCGTGCCTCCATCGCGCGGCTCTACGACGTGCTGCACGACC  
CGCGCTCCGAAGGTGTGCTGCGGGTGGCCACCGACACCGGCAACGGCGGGTTACCCACCCGTTCTTCAAGACCGCCCG  
CCCCGACTACAAGGCGGCTTCTTCCGGCAGCTCGACGCCAACGCCGAGTTCTACGGGCCGTTTCGAGGCCAACGCCCGC  
CGCTGGTACCGCGACGCCAGGAACGGGTGCTGTACTTCAACCACGCGATCGTGCACCCGCCGGTTCGACCGGGACCGGC  
CCGCCAGCCGGACCGCCGACATCTGCGTGCACGTGGAGGAGGAGACCAGCAGCGGGTTGATCGTCTCCGGCGCCAAGG  
TGGTCCGAGGACCTGGTCCGCGCGCGGAGGCCATCGTCCGGTGGCAGCGGCTGGTGTACGGGTGGATGAAGGCCAC  
CCTGGTGTTCACGGTCCCGATGAACTCGCCCGCCTCAAGCTCATCTGCCGACCTCCTACGAGCTGATGGTCCGCGACGC  
AGGGCTCGCCCTTCGACTACCCGCTGTCGAGCCGGCTCGACGAGAACGACTCGATCATGATCTTCGACCGGGTGTGGTG  
CCCTGGGAGAACGTGTTTATGTACGACGCGGGCGCGGCCAACTCCTTCGCCACCGGGTACAGGCTTCTCGAACGCTTAC





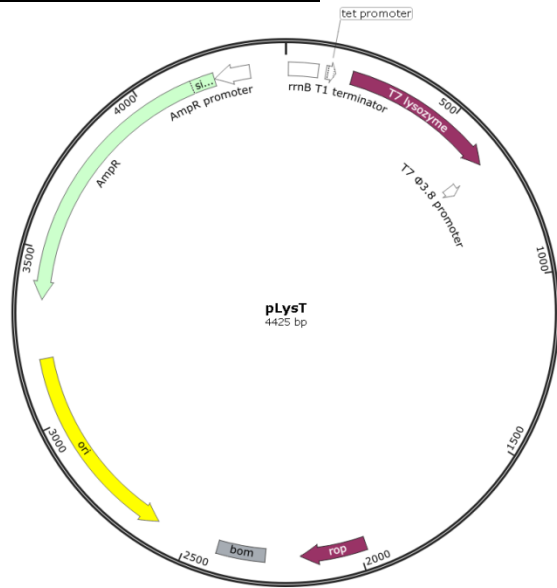
**Sequenz von (pET28a )McPFOMT**

ctctagaAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATAAAGCTTATGGATTTTGCTGTGATGAAGCAGGTCAAAAATACAGGAT  
 TGCTACAGAGTGAGGAGTTATGCCAGTATATTCCTCCGAAGTACTGTCTATCCGCGAGAAGCAGGGTTCCTCAAGGAAGTCA  
 GGAAGCCAATGAAAGTCAACCGACTCTTATATGTCGACTTCACCACCTTGTCTGGACAATTGATGTCATTCGTTCTAAAATT  
 AGTGAATGCAAAGAAGACTATTGAAGTTGGAGCTTTACAGGATACTCCCTCTTACTCACTGCTCTTTCAATTCCCTGATGATG  
 GAAAGATTACGGCAATTGATTTGACAGAGAGGCATATGAGATTGGCTTGCCATTTATCAGAAAAGCTGGTGTGGAGCACA  
 AAATCAACTTCATTGAATCGGATGCTATGCTAGCTCTTACAATCTTCTGCAAGGACAAGAGAGCGAGGGGAGTTACGACTT  
 TGGCTTTGTTGATGCGGACAAACCTAACTACATCAAGTACCATGAGAGGTTGATGAAACTAGTCAAGGTGGGTGGCATACT  
 CGTTATGACAACACATTATGGGGTGAAGTGTAGCCAGCCTGAATCCGAAGTACCAGATTTTCATGAAGGAAAACAGAGA  
 AGCTGTTATTGAACTCAACAAGTTGCTTGTCTGATCCTCGTATCGAGATTGTACATCTTCTTTGGGTGATGGTATCACTT  
 TCTGCAGGCGTCTTTATTGActcgag

**Sequenz von (pET28a )LpCOMT**

tctagaataatTTTgTTTaaactttaagaaggagatataaagcttATGGGGCTCCACCGCCGCCGACATGGCCGCGTCCGCCGACGAGGACGCGTG  
 CATGTTCCGCCCTCCAGCTCGCTTCTCGTGGTCTCCCGATGACGCTGAAGAACGCCATCGAGCTTGGCCTCCTGGAGA  
 TCCTGGTGGCCGCCGGCGGCAAGTCTGCTGACCCCGACCGAGGTGGCCGCCAAGCTCCCGTCCGCGGCAACCCGGAAG  
 CGCCGGACATGGTGGACCGCATACTCCGGCTGCTCGCTGCTACAACGTCGTGACGTGCCTGGTGGAGGAGGGCAAGGA  
 CGGCCGCTCTCCGGAGCTACGGCGCCGCGCCCGTGTGCAAGTTCCTCACCCCAACGAGGACGGCGTCTCCATGGCG  
 GCGCTCGCGCTCATGAACCAGGACAAGTCTCATGGAGAGCTGGTACTACCTCAAGGACGCGGTCTTACGGCGGCAT  
 CCCGTTCAACAAGGCTACGGCATGTCGGGTTTCGAGTACCACGGCACGGACCCGCGTTCACCCGCTTCAACGAAG  
 GGATGAAGAACCACTCCATCATCATACCAAGAAGCTCCTCGAGCTCTACCACGGCTTCGAGGGCTCGGCACCCTCGTC  
 GATGTCGGCGGCGGCTCGGCGCCACCGTGGCCGCCATAGCCGCCACTACCCACCATCAAGGGGGTCAACTTCGACC  
 TCCCCACGTCATCTCCGAGGCGCCGAGTTCGCGGGCTCACCCACGTCGGTGGCGACATGTTCAAGGAGGTGCCCTC  
 GGGAGACACCATCCTCATGAAGTGGATCCTCCAGCTGGAGCGACCACTGCGCCACGCTGCTCAAGAACTGCTACG  
 ACGCGTCCCGGCGCACGGCAAGGTCGTGCTCGTCCAGTGCATCCTGCCGGTCAACCCGGAGGCCAATCCCAGCTCGCA  
 GGGGGTCTTCCAGTGCATGATCATGCTCGCGCACAAACCCGGCGGCGAGGAGAGGTACGAGAGGGAGTTCCAGGCT  
 CTCGCCAGGGGAGCCGATTACCCGGCTCAAGTCCACGTACATCTACGCCAACGCGTGGGCCATCGAGTTCACCAAGTA  
 Gctcgag

**Plasmidkarte und Sequenz von pLysT (B. Moritz)**



TTCGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTATCTGTTGTTTGTGCGGTGAACGCTCTCCT  
 GAGTAGGACAAATCCGCCGCCCTAAAGCTTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTTTAATGCGGTAGTTTATCACAGT  
 TAAATTGCTAACGCAGTCAGGCACCGTGTATGGCTCGTGTACAGTTTAAACAACGTGAATCTACTGACGCAATCTTTGTTCA  
 CTGCTCGGCTACCAAGCCAAGTCAGAATGTTGGTGCCTGAGATTCCGCAAGTGGCACAAAGAGCAGGTTGGCTCGATG  
 TGGGATACCACTTTATCATCAAGCGAGACGGTACTGTGGAGGCAGGACGAGATGAGATGGCTGTAGGCTCTCACGCTAAG  
 GGTTACAACCACAACCTCTATCGGCGTCTGCCTTGTGGTGGTATCGACGATAAAGGTAAGTTCGACGCTAACTTTACGCCA  
 GCCAAATGCAATCCCTTCGCTCACTGCTTGCACACTGCTGGTAAGTACGAAGGCGCTGGTCTTCGCGCCCATCATGAG  
 GTGCGCCGATGCTTGCCTTCGTTTCGACCTTAAGCGTTGGTGGGAGAAGAACGAACGTAAGTTCGACTTCTGACCCGTTGATAA  
 TTAATTGAACCTACTAAAGGGAGACCACAGCGGTTCCCTTTGTTGCGATTGGAGGTCAAATAATGTCGACCGATGCCCTTG  
 AGAGCCTCAACCCAGTCAGCTCCTTCCGGTGGGCGCGGGCATGACTATCGTCCGCCCACTTATGACTGTCTTCTTTATC  
 ATGCAACTCGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCTGGGTCAATTTCCGCGAGGACCGCTTTCGCTGGAGCGCGACGATGAT  
 CGGCTGTGCTGCTTGCCTTTCGGAATCTTGCACGCCCTCGTCAAGCTTCGTCAGTGGTCCCGCCCAACGTTTCG  
 GCGAGAAGCAGGCCATTATCGCCGGCATGGCGGCCGACGCGCTGGGCTACGCTTGTGCTGGCGTTCGCGACGCGAGGCT  
 GGATGGCTTCCCCATTATGATTCTTCTCGTTCGCGGCCATCGGGATGCCCGCTTGCAGGCCATGCTGTCCAGGCAG  
 GTAGATGACGACCATCAGGGACAGCTTCAAGGATCGCTCGCGGCTTACCAGCCTAACTTCGATCATTGGACCGCTGATC  
 GTGCGCGGATTTATGCCCTCGCGGAGCACATGGAACGGTTGGCATGGATTGTAGGCGCCGCTTACCTTGTCTG  
 CCTCCCCGCTTTCGCTCGCGGTGCATGGAGCCGGGCCACCTCGACCTGAATGGAAGCCGGCGGCACCTCGCTAACGGAT  
 TCACCACTCCAAGAATTGGAGCCAATCAATTCTTGGGAGAAGTGTGAATGCGCAAACCAACCTTGGCAGAACATATCCAT  
 CGCGTCCGCCATCTCCAGCAGCCGACGCGGCCGATCTCGGGCAGCGTTGGGTCTGGCCACGGGTGCGCATGATCGTG

CTCCTGTCGTTGAGGACCCGGCTAGGCTGGCGGGGTTGCCTTACTGGTTAGCAGAATGAATCACCGATACGCGAGCGAAC  
GTGAAGCGACTGCTGCTGCAAAACGCTCTGCGACCTGAGCAACAACATGAATGGTCTTCGGTTTTCCGTGTTTTCGTAAAGTCT  
GGAAACGCGGAAGTCAGCGCCCTGCACCATTATGTTCCGGATCTGCATCGCAGGATGCTGCTGGCTACCCTGTGGAACAC  
CTACATCTGTATTAACGAAGCGCTGGCATTGACCCTGAGTGATTTTTCTCTGGTCCCGCCGCATCCATACCGCCAGTTGTTT  
ACCCTACAACGTTCCAGTAACCGGGCATGTTTCATCATCAGTAACCCGTATCGTGAGCATCCTCTCTCGTTTTCATCGGTATC  
ATTACCCCATGAACAGAAATCCCCCTTACACGGAGGCATCAGTGACCAACAGGAAAAAACCGCCCTTAACATGGCCCGC  
TTTTATCAGAAGCCAGACATTAACGCTTCTGGAGAAACTCAACGAGCTGGACGCGGATGAACAGGCAGACATCTGTGAATCG  
CTTACAGACCAGCTGATGAGCTTTACCGCAGCTGCCTCGCGGTTTTCGGTGATGACGGTGAACCTCTGACACATGCA  
GCTCCCGGAGACGGTACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGT  
GGCGGGTGTGGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATTAGCGGAGTGTATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGA  
GCAGATTGACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCT  
CTTCCGTTCTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCCGGTGCAGCGGATCAGCTCACTCAAAGGCGGTA  
ATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAA  
AAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGT  
GGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACAGGCGTTTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTG  
CCGCTTACCGGATACGTGTCGCGCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGCCGCTTTCTCATAGCTCAGCTGAGGTATCTCAGT  
TCGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAA  
CTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGA  
GGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCG  
CTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGT  
TTTTTGTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGC  
TCAGTGGAACGAAAACCTACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTACAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATAAA  
AATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAAATCAGTGAGGCACCTATC  
TCAGCGATCTGTCTATTTGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTGCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCAT  
CTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGA  
AGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGT  
AGTTCCGCCAGTTAATAGTTTGCGAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCAATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCT  
TCATTCAGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGT  
CCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTACTCATGTTATGGCAGCACTGCATAAATCTTACTGTCA  
TGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTT  
GCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGTCTCATTTGGAAAACGTTCTT  
CGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAG  
CATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACAC  
GGAAATGTTGAATACTCATACTTCTCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATAT  
TTGAATGATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCAT  
TATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTTCAAGAA

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben

Name Maria Dornheim  
Geburtsdatum 13.11.1990  
Geburtsort Halle/Saale

## Schulischer und beruflicher Werdegang

02/19-06/20 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Institut für Pharmazie, AG Pietzsch  
Projekt: Designer Proteine

07/15-12/18 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Institut für Pharmazie, AG Pietzsch  
Projekt: Lignin-Monomere  
(Arbeiten zur Promotion)

10/12-05/15 **Master-Studium:** Biochemie (Master of Science)  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Masterarbeit: „Untersuchungen zur heterologen Produktion der  
Oligosaccharyltransferasen Stt3 und PglB in *Escherichia coli* „  
Betreuung: Prof. Markus Pietzsch, Inst. für Pharmazie

10/09-12/12 **Bachelor-Studium:** Biochemie (Bachelor of Science)  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Bachelorarbeit: „Charakterisierung der Wirkung der  
Tyrosinkinaseinhibitoren Sunitinib, Sorafenib und Axitinib auf  
unstimulierte und stimulierte Jurkat-Zellen“  
Betreuung: Prof. Dr. Seliger, Inst. für Medizinische Immunologie

2001-2009 **Abitur**  
Landesgymnasium Latina August-Hermann-Francke Halle/Saale

Maria Dornheim

Halle, den 30.06.2020

## Publikationen

Dornheim, M., Moritz, B., Pietzsch, M. (2020): Biotechnological production of ferulic acid by balanced pulse induction of engineered synthesis cascade (in *E. coli*) (In Bearbeitung)

## Poster

Dornheim, M., Moritz, B., Pietzsch, M. (2018): Ferulic acid synthesis in engineered *E. coli* is limited by methyl-group supply (Vereinigung allgemeiner und angewandter Mikrobiologie, Wolfsburg, Deutschland)

## Vorträge

„Ferulic acid synthesis in engineered *E. coli* is limited by methyl-group supply“ (2018)  
(European Congress on Biotechnology, Genf, Schweiz)

“Biosynthesis of ferulic & sinapic acid – From shake flask to bioreactor“ (2018)  
(Verein deutscher Ingenieure, Fraunhofer CBP Leuna, Deutschland)