

Untersuchungen zur biotechnologischen Synthese der Monolignole Kumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol

Dissertation

zur Erlangung des

Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Alwina Dillmann

geboren am 06.06.1988 in Kasachstan

Gutachter:

1. Prof. Dr. Markus Pietzsch
2. Prof. Dr. Bruno Bühler
3. Prof. Dr.-Ing. Rudolf Hausmann

Tag der Verteidigung: 12.02.2020

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Alwina Dillmann, dass ich die vorliegende Arbeit - mit Ausnahme der aufgeführten Personen, Unterlagen bzw. Literaturstellen - selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Die den aufgeführten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Untersuchungen zur biotechnologischen Synthese der Monolignole Kumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol“ wurde von der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie AG Aufarbeitung biotechnischer Produkte unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Markus Pietzsch angefertigt.

Alwina Dillmann

Leipzig, den

Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Pietzsch für die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit unter seiner Leitung, für die vielen Anregungen und Lösungsvorschläge.

Für die intensiven Diskussionen und wertvollen Ratschläge während der gesamten Zeit möchte ich mich bei Dr. Bodo Moritz ebenfalls bedanken. Zudem stellte er den Stamm BL21 Δ tyrR zur Verfügung.

Ich möchte mich bei den Kooperationspartnern am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, insbesondere bei Dr. Andrej Frolov für die MS-Messungen und Dr. Susann Riemer-Köhler für die Zusammenarbeit bedanken.

Dr. Ströhl am Institut für Chemie der Martin-Luther-Universität danke ich für die Aufnahme der NMR-Daten.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Aufarbeitung biotechnischer Produkte“ danke ich für die Zusammenarbeit, die angenehme Atmosphäre und den vielen Anregungen. Insbesondere möchte ich mich bei Frau Martina Anwand für die Betreuung während den Fermentationen bedanken. Außerdem danke ich Christian Bensing und Jan Klapproth für Hilfestellungen bei chemischen Fragestellungen. Bei Nada Zeno und Mathias Mende bedanke ich mich für die vielen netten Gespräche und die Unterstützung.

In Rahmen ihrer Masterarbeit hat Hilke Buß Erkenntnisse bezüglich der Produktabtrennung und Glykosylierung beitragen können. Deswegen möchte ich auch für ihre Arbeit bedanken.

Abschließend bedanke ich mich bei meinen Freunden und Familie für den Rückhalt und Ablenkung während der Anfertigung dieser Arbeit. Besondere Erwähnung sollen hier Lena, Christiane und André, die immer für mich da sind, finden. Familie Johnke/Liese hat auch immer für die nötigen Abwechslungen und Unternehmungen gesorgt. Vielen Dank dafür.

Inhaltsverzeichnis

Selbstständigkeitserklärung	2
Danksagung	3
Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung und Zielsetzung	9
1.1 Monolignole	9
1.1.1 Biosynthese	9
1.1.2 Mögliche Anwendungen der Monolignole	12
1.1.2.1 Phenylpropene	12
1.1.2.2 Lignane und Norlignane	13
1.1.2.3 Ersatz als Ligninverbindung	14
1.1.3 Bereitstellung von Monolignolen	17
1.2 Motivation und Zielsetzung	20
2 Material und Methoden	21
2.1 Chemikalien	21
2.2 Geräte	23
2.3 Nährmedien und Kits	23
2.4 Plasmide	24
2.5 Methoden und Analytik	27
2.5.1 Elektroporation in <i>E. coli</i>	27
2.5.2 Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion	28
2.5.3 Kultivierungen im Minimalmedium	29
2.5.4 Proteinproduktion in <i>E. coli</i>	29
2.5.5 SDS-PAGE	30
2.5.6 Etablierung der Umsetzung mit ruhenden Zellen	31
2.5.7 Reaktion im Rührreaktor	32
2.5.8 Probenaufbereitung zur HPLC-Analyse	32
2.5.9 HPLC-Messung	33
2.5.10 Untersuchungen zur Stabilität der Kumarylintermediate	34
2.5.11 Proteinbestimmung	35
2.5.12 Zellextraktmessung	35
2.5.13 Aufarbeitung der Monolignole	36
2.5.14 Auftragsanalytik	37

3	Ergebnisse.....	38
3.1	Design des Expressionskonstruktes pTCCN.....	38
3.2	Etablierung der Probenaufbereitung für die HPLC.....	40
3.2.1	Stabilität von Kumarylalkohol	42
3.3	Identifikation und Quantifizierung der Substanzen im Kulturüberstand von BL21 Gold (DE3) pTCCN.....	43
3.4	Vorversuche zur Expression und Aktivität von BL21 Gold (DE3) pTCCN.....	46
3.5	Umsetzung von Tyrosin mit wachsenden Zellen im Minimalmedium	50
3.6	Etablierung von ruhenden Zellen zur Bildung von Kumarylalkohol	52
3.6.1	Einfluss der Expressions- und Reaktionstemperatur auf die Kumarylalkoholbildung ..	54
3.7	Kumarylalkoholbildung mit BL21 Gold D(E3) pTCCN	56
3.7.1	Einfluss von Tyrosin- und Glukosezugabe auf die Kumarylalkoholbildung	56
3.7.2	Einfluss des Reaktionsmediums auf die Kumarylalkoholbildung	58
3.7.3	Mediumwechsel	59
3.7.4	Bestimmung der Löslichkeit und Aktivität der rekombinanten Proteine im Zellextrakt.....	60
3.8	Kumarylalkoholbildung mit BL21 Δ tyrR:T7.....	62
3.8.1	Steigerung der Produktivität durch Verringerung der Substratlimitierung	62
3.8.2	Einfluss der Tyrosin- und Glukosezugabe auf die Kumarylalkoholbildung in BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN	64
3.8.3	Bestimmung der Aktivität der rekombinanten Enzyme im Zellextrakt von BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN	66
3.8.4	Erhöhung der Produktkonzentration durch Aminosäurezugabe	67
3.9	Synthese der Monolignole durch Zugabe von Zimtsäurederivaten mit BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN.....	70
3.9.1	Präparation vom biotechnologisch hergestellten Coniferylalkohol.....	70
3.9.2	Präparation vom biotechnologisch hergestellten Sinapylalkohol.....	73
3.9.3	Inkubation von BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN mit Kumarsäure zur Bildung von Kumarylalkohol.....	76
3.10	Untersuchungen zur Toxizität von Kumarylalkohol	78
3.10.1	Einfluss von Kumarylalkohol auf die Gesamtzellaktivität.....	78
3.10.2	Einfluss auf das Wachstum von <i>E. coli</i>	79
3.10.3	Bestimmung der TAL-Aktivität im Zellextrakt von BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN	80
4	Diskussion.....	82
4.1	Design des Expressionskonstruktes pTCCN.....	82
4.2	Etablierung der Probenaufbereitung für die HPLC.....	84

4.3	Identifikation und Quantifizierung der Substanzen im Kulturüberstand von BL21 Gold (DE3) pTCCN.....	85
4.4	Vorversuche zur Expression und Aktivität von BL21 Gold (DE3) pTCCN.....	85
4.5	Umsetzung von Tyrosin mit wachsenden Zellen im Minimalmedium	87
4.6	Etablierung von ruhenden Zellen zur Bildung von Kumarylalkohol	89
4.6.1	Einfluss der Expressions- und Reaktionstemperatur auf die Kumarylalkoholbildung ..	90
4.7	Kumarylalkoholbildung in BL21 Gold (DE3) pTCCN	91
4.8	Kumarylalkoholbildung in BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN	93
4.9	Synthese der Monolignole durch Zugabe von Zimtsäurederivaten mit BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN.....	95
4.10	Toxizität von Kumarylalkohol	97
5	Zusammenfassung.....	99
6	Ausblick.....	101
7	Literatur	102
8	Anhang.....	114
9	Lebenslauf	120

Abkürzungsverzeichnis

4CL	<i>4-coumarate:CoA ligase</i>
A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm
A ₂₈₀	Absorption bei 280 nm
ADP	Adenosintriphosphat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BFM	Biofeuchtmasse
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BTM	Biotrockenmasse
CA	Chloramphenicol
CAR	<i>carboxylic acid reductase</i>
CAD	<i>cinnamyl alcohol dehydrogenase</i>
cfu	<i>colony forming units</i>
CoA	Coenzym A
C-OH	Coniferylalkohol
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DC	Dünnschichtchromatografie
DIBAL-H	Diisobutylaluminiumhydrid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ε	Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
HK	Hauptkultur
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatografie)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
K-CHO	Kumaraldehyd
K-COOH	Kumarsäure
K-OH	Kumarylalkohol
logP _{O/W}	Logarithmus des Verteilungskoeffizienten in Octanol/Wasser
LB	<i>lysogeny broth</i>
MDF	<i>medium density fiber</i>
MS	Massenspektrometrie
N	biologische Replikate
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH + H ⁺	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH + H ⁺	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanz)
NPT	<i>Norcadia phosphopantetheine transferase</i>
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ORF	<i>open reading frame</i> (offense Leseraster)
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PA-Gel	Polyacrylamid-Gel
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
rbs	<i>ribosome binding site</i> (Ribosombindestelle)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
S-OH	Sinapylalkohol
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer

TAL	Tyrosinammonialyase
TB	<i>terrific broth</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UE	Untereinheit
UF	<i>urea formaldehyde</i>
v/v	<i>volume per volume</i>
VK	Vorkultur
w/v	<i>weight per volume</i>
ZE	Zellextrakt
ZT	Zelltrümmer
$\bar{\mu}$	mittlere Wachstumsrate
μ_{\max}	maximale Wachstumsrate

Anmerkungen:

Englische Fachausdrücke, die keine adäquate deutsche Übersetzung zulassen, sind in dieser Arbeit kursiv geschrieben. Diese werden unter Umständen auch dann benutzt, wenn ein deutsches Äquivalent existiert.

Für biochemische Fachausdrücke werden die international üblichen Abkürzungen verwendet.

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Monolignole

Monolignole sind Naturstoffe, die in Gefäßpflanzen synthetisiert werden. Zum einen bilden sie die Substrate für die Biosynthese des abundanten Polymers Lignin, zum anderen stellen sie den Ausgangspunkt zur Biosynthese diverser pflanzlicher Sekundärmetabolite wie Phenylpropene, Lignane und Norlignane dar. In erster Linie versteht man unter den Monolignolen die drei Verbindungen Kumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol, aber auch Zimtalkohol gehört in diese Gruppe. Die Monolignole werden der Gruppe der Phenylpropanoide zugeordnet und weisen dementsprechend neben dem Phenolring eine C₃-Seitenkette in *para*-Stellung auf (Abbildung 1). Die Biosynthese der Monolignole beginnt bei Phenylalanin oder Tyrosin und beinhaltet eine Desaminierung und mehrere Methoxylierungs- und Reduktionsschritte. Die drei Hauptalkohole unterscheiden sich in der Anzahl der Methoxygruppen. Zimtalkohol hingegen trägt weder eine Methoxygruppe noch eine phenolische Hydroxygruppe [Boerjan *et al.*, 2003]. Neben dem Vorkommen im Holzbestandteil Lignin sind Monolignole und davon abgeleitete Verbindungen aufgrund ihrer aromatischen Struktur oft Bestandteil ätherischer Öle oder für die Farbstoffbildung in Blüten verantwortlich [Koeduka *et al.*, 2006]. Wie viele Phenylpropanoide, zeigen auch Monolignole und davon abgeleitete Verbindungen für den Menschen positive und damit pharmazeutisch relevante Eigenschaften, wie eine antibakterielle [Karapinar, 1990; Moleyar und Narasimham, 1992], antifungale [Barber *et al.*, 2000], schmerzlindernde und entzündungshemmende Wirkung [Charan Raja *et al.*, 2015].

1.1.1 Biosynthese

Eine detaillierte Zusammenfassung der Biosynthese der Monolignole findet sich in der Literatur [Boerjan *et al.*, 2003]. Die wichtigsten Schritte sollen nachfolgend beschrieben werden. Monolignole werden im Zytoplasma der Pflanze synthetisiert und anschließend unter ATP-Verbrauch aus der Zelle zur Zellwandsynthese transportiert. Die Synthese (Abbildung 1 **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) beginnt mit der Desaminierung von Phenylalanin. Anschließend wird der aromatische Ring sukzessive hydroxyliert und *O*-methyliert. Die Carboxylgruppe wird außerdem zu einer Alkoholgruppe reduziert. Ob zuerst die Dekoration des Aromaten, die Reduktion der Säurefunktion oder eine Kombination aus beiden Wegen in den Pflanzen abläuft, ist noch nicht abschließend geklärt. Im am besten untersuchten Weg wird die Monolignolsynthese mit einer nicht-oxidativen Desaminierung von Phenylalanin zur Zimtsäure eingeleitet. Eine Hydroxylierung am C₄-Atom des Aromaten führt zu Kumarsäure, welche mit Hilfe von Coenzym A zu Kumaryl-CoA aktiviert wird. Ausgehend von dieser Verbindung zweigen sich verschiedene Stoffwechselwege neben der Monolignolsynthese zum Beispiel die Flavonoid- oder Coumarinsynthese ab. Für die Synthese des

einfachsten Monolignols Kumarylalkohol folgen zwei reduktive Schritte über den Aldehyd und schließlich zum Alkohol [Boerjan *et al.*, 2003]. Alternativ reagiert die aktivierte Säure mit Shikimi- oder Chinasäure zu einem Ester, welcher am C3-Atom des Aromaten zu Kaffeylshikimi- bzw. Kaffeylchinasäure hydroxyliert wird. Die vermuteten Begründungen für diese aufwendige Reaktion sind: (1) Schutz und Übermittlung des reaktiven Catecholrests für die weitere Reaktion und (2) eine Möglichkeit der metabolischen Kontrolle der Synthese sekundärer Pflanzenmetabolite bei ausreichender Photosyntheserate. Möglicherweise spielen diese Substanzen bei der Verteidigung der Pflanze gegen Herbivore eine Rolle [Vogt, 2010]. Für die Synthese der Monolignole Coniferyl- und Sinapylalkohol wird eine Methylgruppe auf die Hydroxygruppe am C3-Atom des Kaffeyl-Coenzym A übertragen und anschließend wird die aktivierte Säuregruppe reduziert, sodass Coniferylaldehyd entsteht. Coniferylalkohol entsteht durch eine weitere Reduktion. Die Synthese von Sinapylalkohol hingegen erfordert eine weitere Hydroxylierung und Methylierung auf der Ebene des Aldehyds, welcher schließlich zum Alkohol reduziert wird [Boerjan *et al.*, 2003].

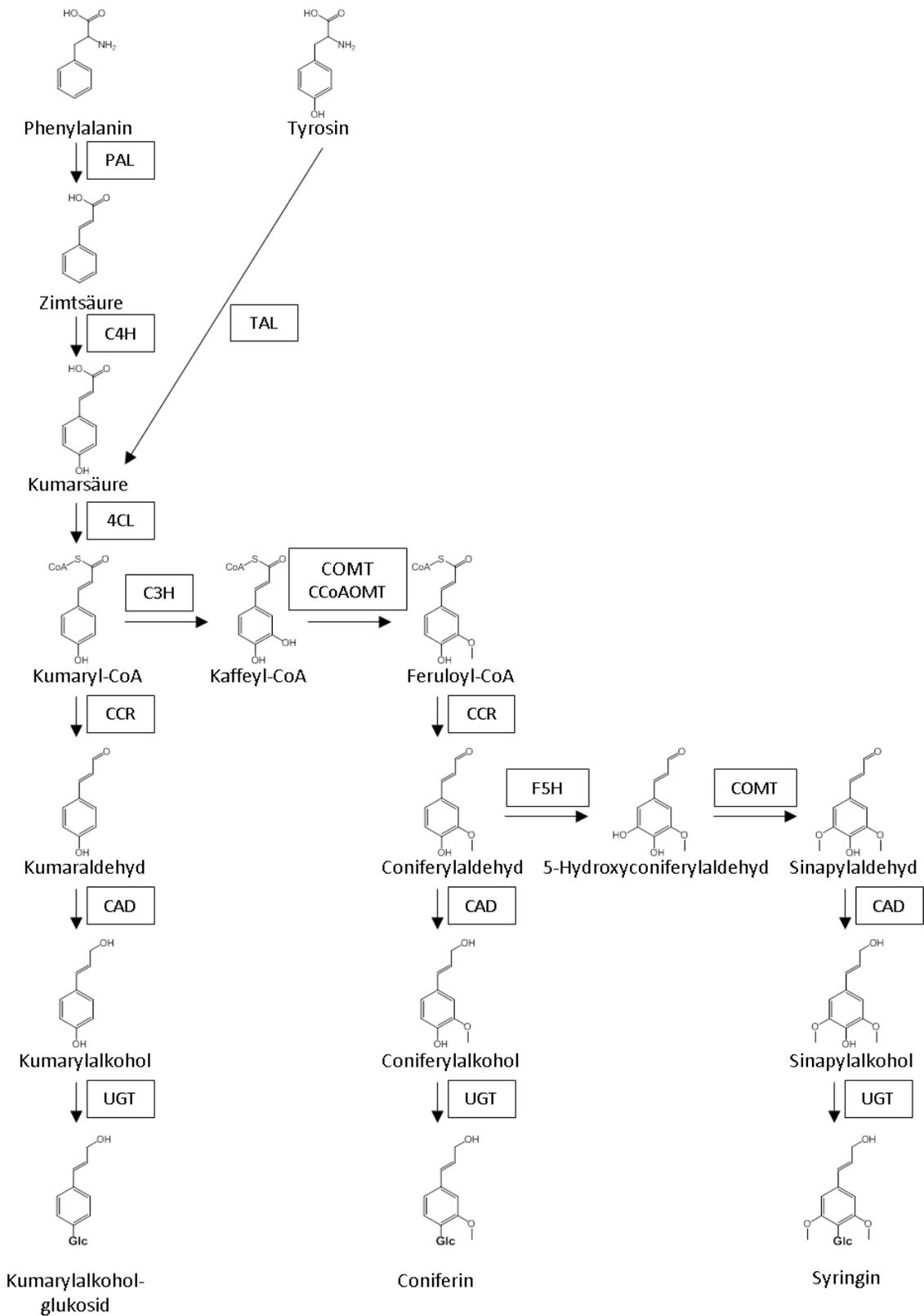


Abbildung 1: Biosynthese der Monolignole in Pflanzen. PAL – Phenylalaninammonialyase, TAL – Tyrosinammonialyase, C4H – cinnamate 4-hydroxylase, 4CL – 4-coumarate:CoA ligase, C3H – coumarate 3-hydroxylase, COMT – caffeic acid O-methyltransferase, F5H – ferulate 5-hydroxylase, CCoAOMT – caffeoyl-CoA O-methyltransferase, CCR – cinnamoyl-CoA reductase, CAD – cinnamyl alcohol dehydrogenase, UGT – UDP-glucose:coniferyl alcohol glycosyltransferase, Glc - Glukose. Modifiziert nach [Boerjan *et al.*, 2003]. Cosubstrate wurden der Übersichtlichkeit halber weggelassen

Da die Monolignole toxisch und instabil sind, werden sie an der phenolischen Hydroxygruppe glykosyliert und in der Vakuole als Kumarylalkoholglykosid, Coniferin und Syringin gespeichert. Nach dem Transport aus der Zelle werden die Monolignole mit Hilfe einer β -Glukosidase freigesetzt und der darauf folgenden Polymerisation zur Verfügung gestellt [Whetten und Sederoff, 1995]. Diese findet über radikalische Kopplung von Kumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol statt. Dabei entstehen die *p*-Hydroxyphenyl- (H), Guaiacyl- (G) und Sinapyl- (S)-Einheiten des Lignins. Dieser Prozess ist irreversibel und dementsprechend strikt reguliert. Die freien Radikale werden mit Hilfe von Laccasen und Peroxidasen generiert. Die Polymerisationsreaktion allerdings wird nur durch die Verfügbarkeit der Substrate und die Mikroumgebung beeinflusst, sodass eine Vielzahl an Bindungen gebildet wird. Wahrscheinlich wird schrittweise ein Monomer an das bestehende Polymer addiert bis keine Monomere mehr verfügbar sind. Dann findet vermutlich eine Verknüpfung mehrerer Polymere statt. Neben den Monolignolen werden auch andere Substanzen wie Kumar- oder Ferulasäure und 4-Hydroxybenzoesäure in das Ligninpolymer eingebaut, wodurch sich die Variabilität im Lignin nochmals deutlich erhöht [Wang *et al.*, 2013].

1.1.2 Mögliche Anwendungen der Monolignole

Neben der Biosynthese von Lignin stellen Monolignole auch den Ausgangspunkt zur Synthese verschiedener pharmazeutisch relevanter Verbindungen dar und sind somit vom weitreichenden Interesse. Aufgrund der hemmenden Wirkung auf Mikroorganismen und Parasiten, die auch den Menschen befallen, und gleichzeitig der vielfältigen gesundheitsfördernden Vorteile für den Menschen der Monolignole und deren Derivate ist eine Entwicklung zur Nutzung als Antibiotikum oder als Arzneimittel in der Schmerz- oder Krebsmedizin vielversprechend [Guzman, 2014; Charan Raja *et al.*, 2015]. Außerdem können Sie als Ersatz für Ligninolate bei der Verwendung in Bindemittel oder der Polymerherstellung dienen [Tachon *et al.*, 2016].

1.1.2.1 Phenylpropene

Phenylpropene sind eine Gruppe der Phenylpropanoide und dienen den Pflanzen als Verteidigung gegen Herbivoren und parasitäre Bakterien und Pilze. Zusätzlich rührt der blumige Duft einiger Pflanzen von hohen Konzentrationen an Phenylpropenen her und dient dem Anlocken von Bestäubern [Koeduka *et al.*, 2006]. Sie leiten sich von den Monolignolen Kumaryl- und Coniferylalkohol ab. Strukturell unterscheiden sich die verschiedenen Phenylpropene in der Substituierung am Aromaten und in der Position der Doppelbindung in der Seitenkette. Ausgehend vom Monolignol findet zunächst eine Acetylierung mit Hilfe der Coniferylalkohol-Acetyltransferase mit Acetyl-Coenzym A als zweitem Substrat statt (Abbildung 2). Anschließend wird eine NADPH/H⁺-abhängige Reduktion der Produkte Kumaryl- bzw. Coniferylacetat katalysiert. Je nach Produktspezifität der involvierten Reduktase entstehen Chavicol bzw. Isochavicol aus Kumarylacetat

und Eugenol bzw. Isoeugenol aus Coniferylacetat [Koeduka *et al.*, 2008; Atkinson, 2018]. Eine mögliche Methylierung mittels *O*-Methyltransferasen und *S*-Adenosylmethionin als Cofaktor an der phenolischen Hydroxylgruppe führt zu den weiteren Phenylpropenen Estragol bzw. Anethol und Methyleugenol bzw. Methyloisoeugenol. Glykosylierte Phenylpropene ausgehend von Chavicol/Isochavicol und Eugenol/Isoeugenol wurden ebenfalls schon nachgewiesen [Atkinson, 2018]. Sowohl Eugenol als auch Anethol zeigten antifungale und antibakterielle Eigenschaften. Aufgrund dieser Eigenschaften, aber auch wegen des ansprechenden Aromas und Geschmacks, werden diese Stoffe oft als natürliche Konservierungsstoffe in der Lebensmittelindustrie eingesetzt [Karapinar, 1990; Moleyar und Narasimham, 1992]. Eugenol, ein Bestandteil essentieller pflanzlicher Öle, hat außerdem eine negative Wirkung auf das Wachstum von Nematoden, die Nutzpflanzen befallen [Sangwan *et al.*, 1990]. Auch eine schmerzlindernde Wirkung und andere positive Eigenschaften auf den Menschen wie eine antioxidative, entzündungshemmende oder krebshemmende Wirkung wurden festgestellt [Prasad *et al.*, 2004; Koeduka *et al.*, 2008].

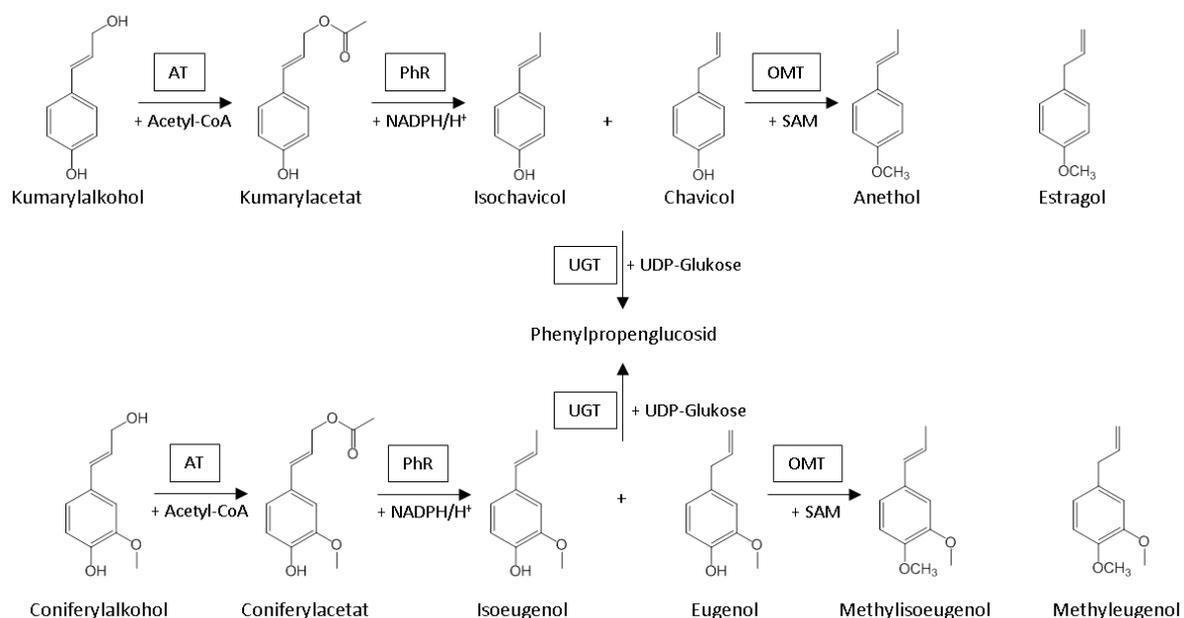


Abbildung 2: Biosynthese der Phenylpropene. AT - Acyltransferase, PhR - Phenylpropenreduktase, OMT - O-Methyltransferase, UGT - UDP-Glykosyltransferase, UDP - Uridindiphosphat. Modifiziert nach [Atkinson, 2018].

1.1.2.2 Lignane und Norlignane

Eine weitere Gruppe, die sich von den Monolignolen ableitet und pharmazeutische Relevanz aufweist, sind die Lignane und Norlignane. Die Variabilität unter den verschiedenen Untergruppen ist recht hoch. Lignane sind Phenylpropanoiddimere, bei denen die Monomere am C8-Atom verknüpft sind. Die am besten untersuchte Gruppe der Lignane ist die enantioselektive Dimerisierung von Coniferylalkohol *in planta* unter der Katalyse durch das *dirigent protein*, wobei Pinoresinol entsteht (Abbildung 3, A). Ausgehend von Pinoresinol können weitere Lignane synthetisiert werden.

Norlignane sind ebenfalls Dimere aus Phenylpropanoiden, die allerdings ein Diphenylpentankohlenstoffskelett bilden (C6-C5-C6). Ein gut untersuchtes Norlignan ist das Sequirin-D (Abbildung 3, B), welches aus der Verknüpfung aus Kumarylalkohol und Kumarsäure gebildet wird [Suzuki und Umezawa, 2007]. Wie die meisten Vertreter aus der Phenylpropanoidgruppe haben auch Verbindungen dieser Stoffgruppe zahlreiche positive Eigenschaften auf den Menschen. Sie besitzen antioxidative, antifungale und entzündungshemmende Eigenschaften [MacRae und Towers, 1984; Teponno *et al.*, 2016; Lv *et al.*, 2017]. In diesem Zusammenhang ist Podophyllotoxin (Abbildung 3, C), das im medizinischen Bereich gegen virale Infektion und Krebserkrankungen eingesetzt wird [Gordaliza *et al.*, 2004], hervorzuheben.

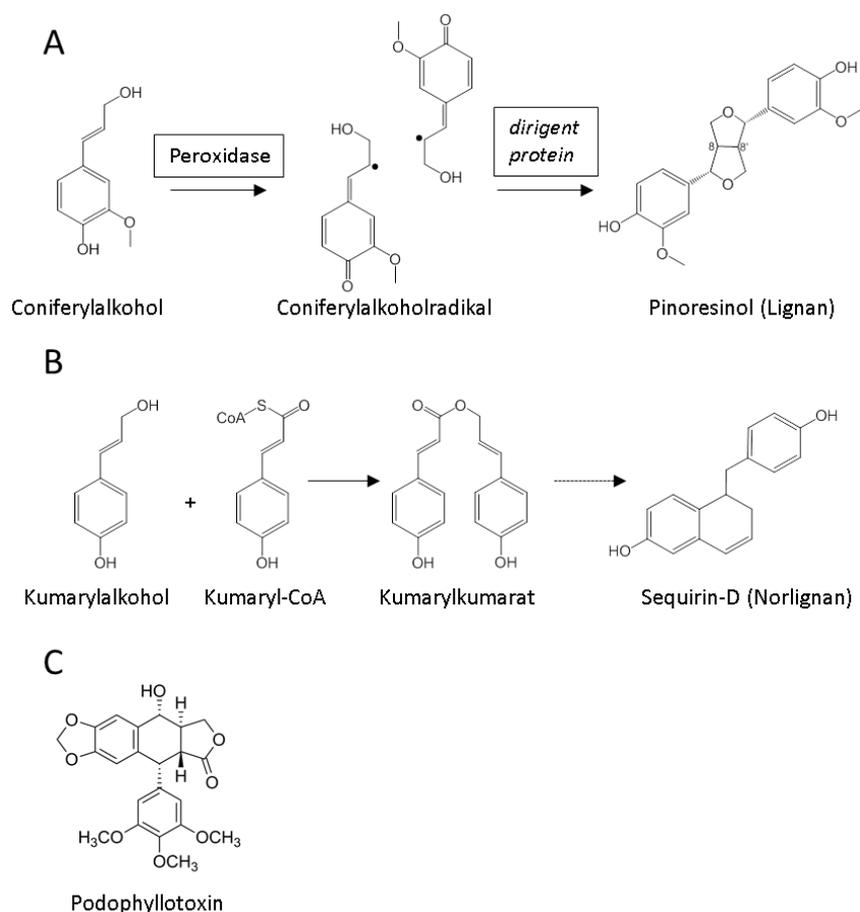


Abbildung 3: Biosynthese von Pinoresinol (A) und Sequirin-D (B) ausgehend von den Monolignolen und Strukturformel von Podophyllotoxin (C). Eingerahmt – Enzym. Modifiziert nach [Suzuki und Umezawa, 2007].

1.1.2.3 Ersatz als Ligninverbindung

Aufgrund der wachsenden Weltbevölkerung steigt der Bedarf an verklebten Holzprodukten, zum Beispiel auf Baustellen und für die Herstellung von Möbeln und Bodenbelägen [Norström *et al.*, 2018]. Über 65 % aller verwendeter Klebstoffe auf der Welt dienen dem Verkleben von Holz [Pizzi, 2016]. Nahezu alle der derzeit verfügbaren Holzklebstoffe basieren auf Polymeren, die mit Hilfe

fossiler Brennstoffe hergestellt wurden [Norström *et al.*, 2018]. Diese Klebstoffe sind günstig und ihre Eigenschaften bezüglich der Bindung und Wasserresistenz wurden über Jahrzehnte optimiert. Allerdings ist die Produktion auf nicht erneuerbare Erdöl-basierte Rohstoffe angewiesen. Zusätzlich wurde das oft verwendete Formaldehyd als karzinogen und toxisch kategorisiert und wird höchstwahrscheinlich in Zukunft für viele Anwendungen verboten [Norström *et al.*, 2018]. Zahlreiche Bestrebungen die herkömmlichen Klebstoffe durch biobasierte und umweltfreundliche Pendanten aus nachhaltigen Rohstoffen zu ersetzen, wurden bereits unternommen [Çetin und Özmen, 2002; Alonso *et al.*, 2004; Mansouri *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009]. Hierfür werden oft Ressourcen aus Biomassen wie Pflanzenproteine, Stärke, Tannine oder Lignin herangezogen [Norström *et al.*, 2018].

Lignin ist ein hochverzweigtes Polymer aus aromatischen Untereinheiten, das in Gefäßpflanzen synthetisiert wird. Als Holzbestandteil stellt Lignin das zweithäufigste Biopolymer auf der Erde dar. Bis zu 30 % des organischen Kohlenstoff in der Biosphäre ist in Lignin gebunden [Boerjan *et al.*, 2003]. Bei der Papierherstellung fällt Lignin als Nebenprodukt an. Die hohe Abundanz, die geringen Kosten bei der Beschaffung und die aromatische Struktur von Lignin weisen sehr gute Voraussetzungen auf, um daraus Bindemittel zu entwickeln [Pizzi, 2016]. Die strukturelle Ähnlichkeit von Lignin zu Phenol ermöglicht den Einsatz in Phenol-Formaldehyd-(PF)-Platten, um Kosten zu senken und die Formaldehydemission zu verringern. Der Einsatz von Lignin, welches aus Holz isoliert wurde, für biobasierte phenolische Harze wurde bereits erfolgreich durchgeführt. Bei der Herstellung von Sperrholz konnten bis zu 70 % des erforderlichen Phenols durch unmodifiziertes Lignin mit vergleichbaren Klebeeigenschaften wie die Kontrollplatte ersetzt werden. Die industriellen Forderungen an Harze wurden dabei alle erfüllt [Tachon *et al.*, 2016]. Allerdings wird oft die Kostenersparnis durch Verwendung von Lignin durch längere Presszeiten aufgehoben [Pizzi, 2006]. Um die Reaktivität des Ligninisolats mit Formaldehyd oder alternativen Aldehyden zu erhöhen, kann es chemisch modifiziert werden, zum Beispiel durch Einführung von Hydroxymethylgruppen (Methylolation) oder Phenolierung. Aber auch Demethylierung, Reduktion, Oxidation und Hydrolyse wurden untersucht, um reaktive, funktionelle Gruppen in Lignin einzuführen [Hu *et al.*, 2011]. Alonso *et al.* zeigten vergleichbare Charakteristika von PF-Klebstoffen, die 35 % methylierten Lignosulfonat beinhalteten, wie die kommerziellen Klebstoffe, sodass sie die Anforderung für die Verwendung in der Sperrholzfertigung erfüllten [Alonso *et al.*, 2004]. Auch Verlinkungen von Diisocyanat mit Lignin wurden bereits erfolgreich bei der Verwendung in Bindemitteln untersucht [Pizzi, 2006; Mansouri *et al.*, 2007]. Nichtsdestotrotz weist Lignin eine hochkomplexe Struktur, die sich nicht nur zwischen den Pflanzenarten stark unterscheiden kann, sondern auch gewebespezifische Merkmale innerhalb einer Pflanze hat, auf. Außerdem spielen die Umweltbedingungen bei der Zusammensetzung des Makromoleküls ebenfalls eine Rolle [Boerjan *et al.*, 2003]. Die Vielzahl verschiedener Bindungen (über 20 bekannte Bindungsmuster) und die hoch verzweigte Struktur machen Lignin zu einem der

komplexesten bekannten Biopolymere [Xu *et al.*, 2014]. Die Quelle der Biomasse beeinflusst dementsprechend die Wahl des Katalysators für die Lignindepolymerisation je nach gewünschtem Produkt. Die bei der Depolymerisation gebildeten Monomere können teilweise wiederum oligomere Strukturen bilden. Es entstehen mannigfaltige, äußerst stabile Verbindungen, die durch C-C-Bindungen vernetzt sind [Rinaldi *et al.*, 2016]. Diese hohe Variabilität und Komplexität des Produktgemisches nach Ligninisolation und die bevorzugte Verwendung von Lignin aus Isolations- und Modifikationsverfahren, die Untereinheiten mit mehr reaktiven Gruppen, einem geringen Molekulargewicht und hoher Reinheit hervorbringen, deutet auf einen vielversprechenden, kontrollierten Einsatz von Monolignolen bei der Herstellung von Bindemitteln hin [Hu *et al.*, 2011; Tachon *et al.*, 2016].

Erstmalig wurde die Funktionalisierung von Lignin bzw. dessen Depolymerisaten mit Hilfe von Enzymen in den 1970er Jahren vorgeschlagen [Kharazipour *et al.*, 1997]. Laccase katalysiert die Oxidation der phenolischen Hydroxylgruppe zu Phenoxyradikalen, wodurch eine radikalische Kopplung zwischen den einzelnen Holzfasern ermöglicht werden soll. Es gelang die Herstellung von *medium density fiber*-(MDF)-Platten aus Weichholzlignin mit Hilfe der Laccasebehandlung ohne Zugabe zusätzlicher Bindemittel. Auch Felby *et al.* nutzten die Laccase-katalysierte Polymerisation von Ligninfragmenten bzw. die Depolymerisation des Lignins an der Faseroberfläche, um MDF-Platten ohne die Verwendung von Kunstharzen herzustellen. Es wurden vergleichbare mechanische Eigenschaften und ausreichende Wasserbeständigkeit der MDF-Platten wie bei der Behandlung mit Harnstoff-Formaldehyd-Kunstharzen erzielt. Allerdings erfordern Laccase-behandelte Faserplatten höhere Presstemperaturen und längere Presszeiten, was die Kommerzialisierung erschwert [Felby *et al.*, 2002; Felby *et al.*, 2004]. Es wurde vorgeschlagen, dass das Lignin nicht nur an der Faseroberfläche enzymatisch oxidiert wird, sondern dass auch Ligninkomponenten Radikale in der Lösung bilden und als Mediator dienen. Solche Mediatoren mit einem geringen Molekulargewicht können die Laccaseaktivität in Domänen, die dem Enzym nicht direkt zugänglich sind, durch Diffusion in diese ermöglichen [Felby *et al.*, 1997]. Als ein solcher Mediator wurde 4-Hydroxy-3-Methoxybenzylharnstoff in Spanplatten in Kombination von Laccase und Harnstoff-Formaldehyd-Klebstoff (UF-Klebstoff, *urea formaldehyde*) eingesetzt. Diese Platten zeigten signifikant höhere Bindungskräfte als Platten ohne eingesetzten Mediator [Fackler *et al.*, 2008]. Bei der Papierherstellung wurden phenolische Säuren wie 4-Hydroxyphenylessigsäure, Kumarsäure oder 3-Ethylbenzothiazolin-6-Sulfonsäure als Mediatoren aufgrund einer verbesserten Interaktion mit den Fasern untersucht. Auch Methylsyngat soll die Radikalbildung während des Prozesses und die Aktivität der Fasern erhöhen, indem es in der Lage ist, in die Fasern zu diffundieren und eine Polymerisation mit dem Lignin einzugehen. Das Resultat war eine verbesserte Wasserbeständigkeit des Zellstoffes [Liu *et al.*, 2009]. Camarero *et al.* zeigten eine vielversprechende Anwendung von

Syringyl-, Guaicyl- und Hydroxyphenyleinheit als natürliche Mediatoren der Laccase [Camarero *et al.*, 2005]. Die Behandlung von Lignin und dessen Depolymerisaten mit Laccase und einem Mediator imitiert die biochemischen Vorgänge während der Lignifizierung von Zellwänden und stellt eine möglichst naturnahe Herstellung von Holzverbundmaterial dar [Kharazipour *et al.*, 1997]. Die logische Konsequenz zur Verbesserung der Bindeeigenschaften ist der Einsatz von Monolignolen wie es bei der Biosynthese von Lignin üblich ist.

Ein weiteres Anwendungsgebiet des Lignins bzw. dessen Depolymerisaten ist die Polymerwissenschaft, wie bei der Synthese von Polyurethanen [Upton und Kasko, 2016]. Es wurden bereits sowohl starre als flexible Lignin-basierte Schäume und Elastomere, welche eine umweltfreundliche Alternative zur herkömmlichen Petrochemie-basierten Produkten darstellen, gefertigt [Griffini *et al.*, 2015; Carriço *et al.*, 2016]. Auch die Herstellung von Polyester und Polyurethanen mit Derivaten des Lignins, wie Vanillin, Ferula-, Kumar- oder Kaffeesäure erzielten bereits Erfolge, unter anderem mit zusätzlichen positiven Eigenschaften der Polymerprodukte (antioxidativ, antibakteriell, antifungal und biologisch abbaubar) [Kaneko *et al.*, 2006; Mialon *et al.*, 2010; Mialon *et al.*, 2011; Kreye *et al.*, 2013; Oulame *et al.*, 2015]. Monolignole, die natürlichen Substrate der Polymerisationsreaktion der Lignifizierung, wurden jedoch bis auf eine Ausnahme des Zimtalkohols [Lerari, 2015] noch nicht in der Herstellung von Polymeren eingesetzt, vermutlich wegen der geringen Verfügbarkeit.

1.1.3 Bereitstellung von Monolignolen

Die Nutzung der Monolignole als natürlicher Pflanzenbestandteil in den oben erwähnten Bereichen kommt dem zunehmenden Trend der Verwendung natürlicher Produkte entgegen. Allerdings ist die Extraktion der Monolignole aus Pflanzenmaterial problematisch, da diese Verbindungen nur in geringen Mengen akkumulieren. Auch die Reinigung gestaltet sich aufgrund einer Vielzahl strukturell ähnlicher Verbindungen als schwierig. Das langsame Wachstum und die Variabilität durch Umwelteinflüsse tragen ebenfalls zur Unwirtschaftlichkeit der Pflanzenextraktion bei [Marienhagen und Bott, 2013]. Die natürliche Quelle Lignin lässt eine Isolierung ebenfalls nicht zu. Zum einen entstehen bei der Depolymerisation fast keine Monolignole, sondern vornehmlich aromatische Monomere mit einem geringeren Molekulargewicht. Zum anderen entsteht eine hochkomplexe Mischung aus verschiedenen aromatischen Verbindungen, die sich nur schwer voneinander trennen lassen [Whetten und Sederoff, 1995]. Eine bessere Verfügbarkeit der Ausgangssubstanzen des Lignins könnte aber ein besseres Verständnis des Polymerisationsvorganges während der Ligninbiosynthese und der Lignindegradation herbeiführen. Es würde die Synthese von Ligninmodellverbindungen und Lignanen aber auch die Herstellung synthetischer Lignine erlauben. Dementsprechend wurden Bestrebungen der chemischen Synthese unternommen, um hochreine

Monolignole zu erlangen. Die ersten Synthesen mit ausreichenden Ausbeuten wurden 1992 durchgeführt [Quideau und Ralph, 1992]. Hierbei wurden die entsprechenden Zimtsäurederivate verestert und anschließend mit Diisobutylaluminiumhydrid reduziert. Nachteile dieser Reaktion sind das organische Lösungsmittel Toluol, die erforderliche Wasserfreiheit und die notwendigen niedrigen Temperaturen. Als Ausgangsstoff wurden auch die Produkte der Lignindepolymerisation 4-Hydroxybenzaldehyd, Vanillin bzw. Syringaldehyd verwendet [Daubresse *et al.*, 1994]. Eine Wittig-Reaktion und eine anschließende Reduktion ergaben das entsprechende Monolignol. Auch bei dieser Reaktion werden niedrige Temperaturen und streng kontrollierte Reaktionsbedingungen (striker Sauerstoffausschluss) erfordert. Außerdem ist eine chromatografische Reinigung des Aldehyds vor der Reduktion notwendig. Beide Reaktionen hatten zusätzlich das Problem der Nebenproduktbildung durch Reduktion der Doppelbindung in der Seitenkette. Diese Nebenreaktion und den Umgang mit Sauerstoff-sensitiven Reagenzien konnte durch die Reduktion von Coniferyl- bzw. Sinapylaldehyd mit Hilfe von Natriumborohydrid mit hohen Ausbeuten von 94 bzw. 99 % umgangen werden [Ludley und Ralph, 1996]. Ein alternativer Reaktionsweg ist die Reduktion der Aldehyde mit Polymer-basiertem Borohydrid [Kim und Ralph, 2005]. Das Resultat sind hochreine Monolignole, die keine weitere Aufreinigung benötigen. Allerdings ist die Ausbeute nur moderat (47 – 72 %). Weitere Optionen zur Vermeidung der Wasserfreiheit und Unterbindung der Reduktion der Doppelbindung in der Seitenkette wurden durch Inkubation entsprechender Phenylpropanoidester mit einem Gemisch aus Lithiumaluminiumhydrid und Benzylchlorid [Wang *et al.*, 2009] oder durch Inkubation der Säuren mit einem Anhydridgemisch unter Schutz der Phenolgruppe mit ausreichend hohen Ausbeuten (81 – 94 %) erzielt [Panzella *et al.*, 2018]. Neben den bereits genannten Nachteilen der Nebenproduktbildung, moderaten Ausbeuten, schwierigen bzw. gefährlichen Reaktionsbedingungen und der Notwendigkeit der Aufreinigung von Zwischenprodukten benutzen alle aufgeführten Methoden relativ teure Ausgangsprodukte wie die Phenylpropanoide Säuren oder – aldehyde für ihre Synthese. Die mikrobielle Herstellung der Monolignole könnte mit vergleichsweise günstigen Substraten wie Glukose und ohne den Einsatz von gefährlichen Chemikalien durchgeführt werden. Außerdem wären chemische Modifikationen wie zum Beispiel die Glykosylierung oder das Einführen chiraler Zentren mit Hilfe von Enzymen realisierbar.

Status quo zur Produktion von Monolignolen in Mikroorganismen

Trotz möglicher chemischer Synthese rückt die steigende Nachfrage nach natürlichen Produkten die biologische Synthese mit Hilfe von Mikroorganismen immer mehr in den Vordergrund [Wang *et al.*, 2011]. Anders als die chemische Synthese werden keine organischen Lösungsmittel, Schwermetalle oder starke Säuren oder Basen benötigt [Marienhagen und Bott, 2013]. Biokatalysatoren können ohne die Verwendung von Schutzgruppen für die Herstellung von Monolignolen aus günstigen, nachwachsenden Ressourcen wie Glukose genutzt werden [Lee *et al.*, 2012]. Der erste vorgestellte

biotechnologische Syntheseweg der Monolignole nutzte die Enzymkombination aus TAL, 4CL, CCR und CAD (vgl. Abbildung 1, S. 11) pflanzlichen und bakteriellen Ursprungs [Jansen *et al.*, 2014]. Hierbei wird ein weiterer Vorteil der mikrobiellen Monolignolsynthese deutlich: Die Kombination von Enzymen aus verschiedenen Organismen erlaubt die effizienteste metabolische Route für das Wunschprodukt zu generieren. Die Umwandlung von Tyrosin bei der Kultivierung im Minimalmedium zeigte nur sehr geringe Produktausbeuten, was durch die geringe katalytische Aktivität der verwendeten TAL begründet wurde. Bei Zugabe von Kumarsäure und die Kultivierung im Komplexmedium wurde eine maximale Produktkonzentration von 733 μM Kumarylalkohol im Kulturüberstand erzielt. Die erfolgreiche Umwandlung von Ferulasäure, aber nicht erfolgreiche Sinapinsäure, wurde ebenfalls erwähnt. Die heterologe Genexpression in Mikroorganismen kann die Erhöhung der Produktakkumulation durch Überexpression von Enzymen, die geschwindigkeitsbestimmende Reaktionen katalysieren, ermöglichen. Die Optimierung eines tetracistronischen Konstruktes wurde in einer Arbeit unter Verwendung derselben Gene untersucht [van Summeren-Wesenhagen *et al.*, 2015]. Die Untersuchung von 81 Klonen ergab, dass die Anordnung des Gens für den ersten katalysierten Schritt, den der TAL, ausschlaggebend für die gesamte Kaskade war und somit die höchsten Produktkonzentration (347 μM) bei vermuteter optimaler Translation des TAL-Gens erzielt werden konnte. Die unterschiedlichen Anordnungen der Gene der folgenden Reaktionsschritte schienen keinen Effekt auf die Produktkonzentration zu haben. Im Laufe des Entstehens der hier vorliegenden Arbeit erschienen weitere Publikationen zur Synthese der Monolignole in *E. coli*. Die höchsten Produktkonzentrationen erzielte die Arbeitsgruppe um Chen [Chen *et al.*, 2017]. Auch diese Arbeitsgruppe nutzte die Enzymkaskade TAL, 4CL, CCR und CAD, allerdings mit Gensequenzen aus anderen Organismen. Zusätzlich wurden auch Gene für eine Hydroxylase und eine Methyltransferase für die Synthese der weiteren Monolignole Coniferyl- und Kaffeylalkohol eingefügt. Die Ganzzellkatalyse macht die aufwendige und kostenintensive Aufreinigung von Enzymen unnötig, was insbesondere bei einem mehrstufigen Prozess vorteilhaft ist [Schmid *et al.*, 2001]. Die Abhängigkeit dieser Reaktionskaskade von Cofaktoren wie NADPH/H⁺ und Coenzym A begünstigt ebenfalls die Verwendung von Ganzzellkatalysatoren. Durch die Zugabe von Zimtsäurederivaten zum, die Enzymkaskade exprimierenden, *E. coli*-Stamm konnte folgende Produktkonzentrationen an Monolignolen erzielt werden: 4,4 mM Kumarylalkohol aus 4,8 mM Kumarsäure; 3,2 mM Kaffeylalkohol aus 4,4 mM Kaffeesäure; 3,2 mM Coniferylalkohol aus 4 mM Ferulasäure. Ein weiterer Vorteil der Biokatalyse in lebenden Zellen bietet das *metabolic engineering* zur Umgehung Stoffwechsel-bedingter Limitierungen, sodass leistungsstarke Bioreaktoren entstehen [Lee *et al.*, 2012]. Zusätzlich können mögliche Feedbackhemmungen von Enzymen durch die Verwendung geeigneter Mutanten in heterologen Wirtssystemen umgangen und die Produktkonzentration erhöht werden [Wang *et al.*, 2011]. Beide Strategien wurden bei der

Produktion eines Tyrosinüberproduzierenden *E. coli*-Stamm in der Arbeit von Chen angewendet. Dieser Stamm ermöglichte die *de novo*-Synthese von 3,3 mM Kumarylalkohol im Komplexmedium. Cokultivierungen zur Synthese von Kaffeyl- und Coniferylalkohol erreichten 5,3 mM (2,5 L-Bioreaktor) bzw. 0,7 mM (Schüttelkolben) Produkt und konnten die Methylierung als limitierenden Schritt identifizieren. Die Verwendung einer immobilisierten Cokultur aus *E. coli*-Zellen, die ein Fusionsgen codierend für die 4CL und die CCR exprimierten, und Zellen, die das Gen für die CAD exprimierten, erreichte deutlich geringere Produktkonzentrationen ausgehend von den entsprechenden Säuren als Substrat (0,6 mM Kumarylalkohol; 0,24 mM Kaffeylalkohol; 0,6 mM Coniferylalkohol) [Liu *et al.*, 2017]. Eine kürzlich erschienene Publikation zeigte erstmals die Produktion von Hydroxyconiferyl- und Sinapylalkohol mit den entsprechenden Säuren als Substrat, wenn auch in geringen Konzentrationen von 520 bzw. 140 μ M [Aschenbrenner *et al.*, 2019]. Ein weiteres Monolignol, der Zimtalkohol, wurde mit Hilfe zweier Zellkulturen, die zum einen das Gen für eine PAL und zum anderen das Gen für eine CAR trugen, unter Zugabe einer kommerziellen Alkoholdehydrogenase *in vitro* synthetisiert. Ausgehend von 10 mM Phenylalanin konnten 8,5 mM Produkt hergestellt werden [Klumbys *et al.*, 2018]. Durch die hohe Spezifität von Biokatalysatoren kann eine fast quantitative Umsetzung des Substrates in das Produkt erreicht werden. Damit einhergehend weisen Biokatalysatoren eine geringe Nebenproduktbildung auf, was die Produktaufarbeitung erleichtert und die Ausbeuten erhöht [Schmid *et al.*, 2001]. Wegen ambienter Temperaturen, atmosphärischen Drucks und neutralem pH-Wert sind biokatalytische Prozesse oft sicherer und umweltfreundlicher als die chemo-katalytische Synthese. Biokatalysatoren werden aus erneuerbaren Quellen produziert, sind biologisch abbaubar und nicht toxisch [Bornscheuer *et al.*, 2012]. Das schnelle Wachstum und die einfachen Kultivierungsbedingungen, aber auch die relativ einfache Genmanipulation von Mikroorganismen, insbesondere *E. coli*, erlauben kurze Produktionszeiten [Pandey *et al.*, 2016]. Meist werden Biokatalysatoren in immobilisierter Form verwendet, sodass sie zurückgewonnen und wiederverwendet werden können. Verglichen zur chemischen Synthese, bei der meist die Säure- oder Aldehydvorläufer der Monolignole verwendet werden, stellen einfache Kohlenstoffverbindungen wie Glukose oder Glycerin günstige Ausgangssubstanzen bei der mikrobiellen Synthese dar (Preisvergleich bei Sigma-Aldrich: Glukose - 15 € pro kg, Glycerin - 55 € pro kg, Kumarsäure - 3244 € pro kg, Kumaraldehyd - nicht verfügbar).

1.2 Motivation und Zielsetzung

Monolignole zeigen eine pharmazeutische Relevanz, da sie die Vorläufer der Phenylpropene und Lignane bilden und diese Verbindungen als antibakterielle, antifungale, schmerzlindernde und entzündungshemmende Mittel eingesetzt werden. Der Bedarf der Monolignole in diesem medizinischen Bereich deutet auf die Lukrativität der Herstellung der Monolignole hin. Monolignole an sich zeigen ebenfalls toxische Eigenschaften bezüglich Bakterien und Pilzen und stellen somit eine

gute Grundlage für die Entwicklung neuer Antibiotika dar. Als Ersatz von ligninbasierten Verbindungen sind noch weitere Anwendungsbereiche der Monolignole denkbar. Die Zusammensetzung, das Vorkommen und die Verfügbarkeit aufgrund der Einstufung als Abfall- bzw. Nebenprodukt von Lignin zeigen zwar ein großes Potential für die Nutzung in Holzbindemitteln. Aber Chargenunterschiede, die geringe Reaktivität und die Komplexität der Lignindepolymerisate erschweren den Einsatz von Lignin in Bindemitteln. In ausreichenden Mengen verfügbar könnte die Verwendung von Monolignolen in Bindemitteln, in Kombination von Lignindepolymerisaten oder als Reinsubstanz, Untersuchungen zur Verringerung der Nachteile von Lignin ermöglichen. Weitere Anwendungen der reinen Monolignole sind bei der Produktion in Schäumen, Folien und Duroplasten denkbar. Allerdings ist die Verfügbarkeit der Monolignole gering und der Preis dementsprechend hoch, sodass Untersuchungen mit diesen Verbindungen nur schwer durchführbar sind.

Ziel dieser Arbeit war es, die Monolignole Kumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol mit Hilfe eines Mikroorganismus so effizient wie möglich herzustellen. Hierfür sollte zunächst die Reaktionskaskade inklusive Auswahl geeigneter Gene entworfen werden. Nach der Auswahl des Produktionsstamms sollte ein effizientes Expressionskonstrukt konzipiert werden. Anschließend sollte dieses Konstrukt in den Produktionsstamm eingeführt und die Expression mit aktiven Genprodukten etabliert werden. Die notwendige Optimierung der Expressions- und Reaktionsbedingungen in ganzen Zellen als Vorbereitung der Hochskalierung sollten ebenfalls Teil dieser Arbeit sein. Mögliche Limitierungen des eingeführten Stoffwechselweges sollten identifiziert und beseitigt werden. Parallel dazu sollte die Aufarbeitungs- und Analyseverfahren der Produkte sowie etwaiger Nebenprodukte entwickelt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Sämtliche verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien.

Bezeichnung	Lieferant	Best. Nr.	Reinheit [%]
Aceton	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	9372.3	> 99,8
Acetonitril	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	8824.2	≥ 99,9
Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung (30%)	Applichem (Darmstadt)	A0947.1000	≥ 99,9
Agar-Agar	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	5210.2	-
Alanin	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	3076	> 98,5
Ampicillin-Natriumsalz	Applichem (Darmstadt)	A0839	-
Ameisensäure	Merck KGaA (Darmstadt)	100264	98 - 100
Albumin aus Rinderserum (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)	05479	> 96
di-Ammoniumhydrogencitrat	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	0267	≥ 98
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	9592.3	≥ 98
Ammoniumchlorid	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	K298.2	≥ 99,5

Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	5606	100
Arginin	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	3144	≥ 99,5
Asparaginsäure	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	T202	≥ 99,5
Benzonase (Emprove)	Merck KgaA (Darmstadt)	1.01695.001	-
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	5239.1	≥ 99
Casaminosäuren	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	A157	-
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	4432.1	≥ 99,8
Coniferylaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)	382051	98
Coniferylalkohol	abcr (Karlsruhe)	AB147056	98
Coomassie-Brillantblau G 250	Merck KgaA (Darmstadt)	9598.1	-
Cystein	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	1693	≥ 99
Dichlormethan	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	7334,2	-
Diethylether	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	5920.2	≥ 99,5
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	6908.1	≥ 99
Essigsäureethylester	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	T164	≥ 99,8
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	8043.2	≥ 99
<i>trans</i> -Ferulasäure	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	9936.2	≥ 99
Glucose-Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	6887.5	-
Glutaminsäure	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	3774	> 98,5
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	3783.2	≥ 99,5
Glycin	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	3908.2	≥ 99
Eisen(III)-chlorid-hexahydrat	Merck KgaA (Darmstadt)	1.03943.0250	> 99
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	9065.4	> 99,8
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	2363.2	-
Histidin	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	3852	> 98,5
4-Hydroxybenzaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)	144088	98
4-Hydroxyphenylpyruvat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)	114286	98
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	CN08.4	> 99
Kaliumdihydrogen-phosphat	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	3904.1	> 99
Dikaliumhydrogen-phosphat	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	P749.3	> 99
Kieselgel 60	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	P091	-
Kobald(II)chlorid-Hexahydrat	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	7095	> 98
Kumaraldehyd	Ark Pharm, Inc. (Arlington Heights, USA)	AK131808	-
Kumarsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)	C9008	> 98
Kumarylalkohol	Key Organics (Cornwall, UK)	MS-210	> 90
Kupfer(II)sulfat-Pentahydrat	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	P025	> 99
Leucin	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	3984	> 98,5
Lysin	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	4207	> 98,5
Magnesiumsulfatheptahydrat	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	P027.1	> 99
Mangan(II)sulfat-Monohydrat	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	7347	> 97
Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	4227.2	-
Methionin	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	9359	> 99
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	3957.2	> 99,5
Natriumtetraborat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)	221732-2.5KG	99
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	T879.2	> 99
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	3957.1	> 99,5
Natriumsulfat	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	5076	100
Pepton aus Gelatine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)	70176	-
Phenylalanin	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	4491	> 98,5
o-Phthaldialdehyd (OPA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)	7976	> 99
o-Phosphorsäure	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	6366.2	> 85
Prolin	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	T205	> 98,5
Protein molecular weight marker	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)	SM0431	-
Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	4625.2	37
Serin	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	4682	> 98,5
Sinapinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)	D7927	> 98
Sinapylaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)	382159	98
Sinapylalkohol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)	404586	80
Struktol J673	Schill & Seilbacher (Hamburg)	3029673	-
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	2367.3	-
Threonin	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	T206	> 99
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	4855.3	≥ 99,9

Trypton / Pepton	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	8952.4	-
Tryptophan	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	4858	> 98,5
Tyrosin	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	T207	≥ 99
Valin	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	4879	> 98,5

2.2 Geräte

Sämtliche verwendeten Geräte sind in der Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Geräte.

Bezeichnung	Typ	Hersteller (Name, Ort, Land)
Elektroporator	Elektroporator 2510	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Fermentationsanlage	SIXFORS Multi-Fermentersystem	Infors HT AG, Bottingen, Schweiz
Hochdruckzellaufschlußsystem	OneShot	Constant Systems Ltd., Daventry, UK
HPLC-Anlage	Thermo Separation Products Spectra System (P2000, AS3000, UV1000, SN4000)	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
	CBM-20A, LC-20AT, LC-10AT, DGU- 14A, SIL-10A, SPD-10A, CTO-10AC	Shimadzu, Kyoto, Japan
pH-Meter	FE20	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Rollermixer	SRT1	Stuart Scientific, Staffordshire, UK
Rotationsverdampfer	Hei-VAP Advantage	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Schüttelinkubator	Multitron II	Infors HT AG, Bottingen, Schweiz
	Inkubator KP196	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
SDS-PAGE-Anlage und Zubehör		Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Spektrophotometer	Genesys 6	ThermoSpectronic Rochester, New, York, USA
	Helios Zeta UV-Vis	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
	Ultrospec 2100 pro Ultrospec 3300 pro	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Thermoblock	Thermostat plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Umwelzkühler	minichiller	Huber, Offenburg, Deutschland
UV-Transilluminator	GenoSmart M	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Vortexer	labDancer S40	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wärmeschrank	UFE 500	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Waage	BP221S BL310	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
	APX-153	Denver Instrument, Göttingen, Deutschland
Zentrifugationsverdampfer	Eppendorf Concentrator 5301	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	SpeedVac Concentrator Setup	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Zentrifuge	Avanti™ J-30i Rotor JA-10 Rotor JA-30.50	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland

2.3 Nährmedien und Kits

Die Zusammensetzungen der verwendeten Medien sind in Tabelle 3 dargestellt. Alle Medien wurden für mindestens 20 min bei 121 °C hitzesterilisiert.

Tabelle 3: Medien für die Kultivierung von *E. coli*.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Bemerkungen
LB-Medium	10 g/L Trypton	Einstellen des pH-Wertes

	10 g/L NaCl 5 g/L Hefeextrakt	auf 7 mit NaOH
LB-Agar-Medium	wie LB-Medium, zusätzlich 15 g/L Agar-Agar	-
Minimalmedium	14,6 g/L K ₂ HPO ₄ 3,6 g/L NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 2,5 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ 2,0 g/L Na ₂ SO ₄ 1,2 g/L MgSO ₄ x 7 H ₂ O 1,0 g/L (NH ₄) ₂ -H-Citrat 0,5 g/L NH ₃ Cl 4 g/L Glukose 2 mL/L Spurenelementlösung	Die Magnesiumsulfat-, Glukose- und Spurenelementlösung wurden jeweils als hochkonzentrierte Stammlösungen separat hergestellt, sterilisiert und nachträglich zugesetzt.
Minimalmedium mit Agar	wie Minimalmedium, zusätzlich 15 g/L Agar-Agar	-
Minimalmedium mit Pepton	wie Minimalmedium, zusätzlich 10/L Pepton aus Gelatine	Die Peptonlösung wurde separat in 5-facher Aufkonzentrierung hergestellt, autoklaviert und nachträglich zugesetzt.
Minimalmedium mit Pepton + Agar	wie Minimalmedium mit Pepton, zusätzlich 15 g/L Agar-Agar	-
Aminosäurelösung	siehe [Collins und Thune, 1996]	-
Spurenelementlösung	20,1 g/L Na ₂ -EDTA 16,7 g/L FeCl ₃ x 6 H ₂ O 0,7 g/L CaCl ₂ x 2 H ₂ O 0,2 g/L CoCl ₂ x 2 H ₂ O 0,1 g/L CuSO ₄ x 5 H ₂ O 0,1 g/L MnSO ₄ x H ₂ O	Sterilfiltration
TB-Medium	12 g/L Trypton 24 g/L Hefeextrakt 5 g/L Glycerin 2,3 g/L KH ₂ PO ₄ 12,5 g/L K ₂ HPO ₄	Phosphatlösungen wurden als 10-fache Stammlösung separat hergestellt, autoklaviert und nachträglich zugesetzt.
TAE-Puffer	40 mM Tris 1 mM EDTA 20 mM Essigsäure	pH 8,5, eingestellt mit 3 M HCl

Folgende Kits wurden während des Entstehens dieser Arbeit verwendet:

Glycerinmessung: Glycerol Assay Kit K-GCROL von Megazyme

Acetatmessung: Acetic acid assay Kit K-ACET von Megazyme

Glukosemessung: YSI 2700 SELECT - Biochemistry Analyzer mit Glucose Oxidase immobilisiert auf einer YSI-Dextrose-Membran.

2.4 Plasmide

Es fand eine Gensynthese des Expressionskonstrukts pTCCN (GeneArt Gene Synthesis, Thermo Scientific, Massachusetts, USA) statt:

Legende:

Restriktionsschnittstelle

T7-Promotor lacO rbs

RgTAL (optimierte Codonverwendung)

FLAG (optimierte Codonverwendung)

NiCAR (optimierte Codonverwendung)

TaCAD (optimierte Codonverwendung)

NPT (optimierte Codonverwendung)

rrnB T1 T7φ

cer-Sequenz

nicht-kodierende Verbindungssequenz
 doppelt unterstriche - Start-ATG
 gepunktet unterstrichen - Stoppcodon

Sequenz des Expressionskonstruktes (Klonierung über EcoNI und DrdI in pACYCDuet1):

CCTGCATTAGGTAATACGACTCACTATAGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTAAAGGAGGAAGCTTATGGCACCCGGTCCG
 ACCAGCCAGAGCCAGGCAGCTACCTGTCCGACCACCAGGTTACCCAGGTGGATATTGTTGAAAAAATGCTGGCAGCACC
 GACCGATAGCACCCCTGGAACCTGGATGGTTATAGCCTGAATCTGGGTGATGTTGTTAGCGCAGCACGTAAAGGTCGTCGGG
 TTCGTGTTAAAGATAGTGATGAAATTCGCAGCAAAATTGATAAAAGCGTGGAATTTCTGCGTAGCCAGCTGAGCATGAGC
 GTTTATGGTGTACCACCGGTTTTGGTGGTAGCGCAGATACCCGTACCGAAGATGCAATTAGCCTGCAGAAAGCACTGCT
 GGAACATCAGCTGTGGTGTCTGCCGAGCAGCTTGGATAGCTTTCGTCTGGGTCTGGTCTGGAAAAATAGCCTGCCGC
 TGGAAGTTGTTCTGGTGAATGACCATTCGTGTTAATAGCCTGACCCGTGGTTCATAGCGCAGTTCGTCTGGTTGTTCTG
 GAAGCACTGACCAATTTCTGAATCATGGTATTACCCGATTGTTCCGCTGCGTGGCACCATTAGCGCAAGCGGTGATCT
 GAGTCCGCTGAGCTATATTGCAGCAGCAATTAGCGGTCCGATCCGATAGCAAAAGTTCATGTTGTTTCATGAGGCAAGAGA
 AAATTCTGTACGCAGTGAAGCAATGGCACTGTTTTAATCTGGAACCGGTTGTTCTGGGTCCGAAAGAAGGTCTGGGTCTG
 GTTAATGGCACCCGAGTTAGCGCAAGCATGGCAACCCTGGCACTGCATGATGCACACATGCTGAGCCTGCTGAGTCAGAG
 CCTGACCGCAATGACCGTTGAAGCAATGGTTGGTTCATGAGGTAGCTTTCATCCGTTTCTGCATGATGTACCCGTCCGC
 ATCCGACCCAGATTGAAGTTGCAGTAAATATTCGTAAACTGCTGGAAGGTAGCCGTTTTCGAGTTCATCATGAAGAAGAG
 GTGAAAGTCAAAGATGATGAAGTATTCTGCGTCAGGATCGTTATCCGCTGCGTACCAGTCCGCAGTGGCTGGGTCCGCT
 GGTAGCGATCTGATTCATGCACATGCAGTTCTGCACATTGAAGCAGGTGAGCAGCACCACCGATAATCCGCTGATTGATG
 TTGAAAAACAAAACCCATCATGGTGGTAAATTTCCAGGCAGCAGCAGTTGCAAAATACCATTGAAAAAACCCGCTGGGC
 CTGGCACAGATTGGTAAACTGAATTTTACCCAGCTGACCGAAATGCTGAATGCAGGTATGAATCGTGGTCTGCCGAGCTG
 TCTGGCAGCAGAAGATCCGAGCCTGAGCTATCATTTGAAAGGTCTGGATATTGCAGCCGAGCATATACCAGCGAACTGG
 GTCATCTGGCAAATCCGGTTACCACCCATGTTTCAGCCTGCCGAAATGGCAAATCAGGCAGTGAATAGCCTGGCACTGATT
 AGCGCAGCTCGTACCACCGAAAGCAATGATGTTCTGAGTCTGCTGCTGGCAACCCATCTGATTTGTTCTGCAGGCCAT
 TGATCTGCGTGCCATTGAATTTGAGTTCAAAAAACAGTTTGGTCCGGCTATTGTTAGCCTGATTGATCAGCATTTTGGTA
 GCGCAATGACCGGTAGCAATTCGCGTATGAACCTGGTTGAAAAAGTGAATAAAACCCTGGCAAACCTCTGGAACAGACC
 AATAGCTATGATCTGGTTCGCGTTGGCATGATGCATTTAGCTTTCAGCAGCAGCAGCAGTTCGTTGAAGTTCTGAGCAGC
 CAGCCTGAGCCTGGCAGCAGTTAATGCATGGAAGTTGCAGCAGCAGAAAGCGCCATTAGTCTGACCCGTCAGGTTCTG
 AACCTTTTGGAGCGCAGCAAGCACCAGCAGTCCGGCACTGAGCTATCTGTACCAGCCTACCCAGATTCTGTATGCATTT
 GTTCGTGAAGAACTGGGTGTTAAAGCAGCTCGTGGTATGTTTTCTGGGTAAACAAGAAGTTACCATTGGTAGCAATGT
 GAGCAAAATCTATGAAGCCATTAAGCGGTCGATTAATAACGTTCTGCTGAAAAATGCTGGCCGATTAATAAGATGATG
 ATGATAAAATAGGAGCGCAATTCATGGCAGTTGATAGTCCGGATGAACGCTGCAGCGTCGATTTGCACAGCTGTTTGCAG
 AAGATGAACAGGTTAAAGCAGCAGCTCCGCTGGAAGCATGTTAGCGCAGCCGTTAGCGCAGCCGGTATCGGCTGGCCAG
 ATTCGAGCAACCGTTATGGCAGGTTATGCAGATCGTCCGGCAGCAGGTCAGCGTGCATTTGAACTGAATACCGATGATGC
 AACCGGTCGTACCAGCCTGCGTCTGCTGCCTCGTTTTGAAACCATTACCTATCGTGAACCTGTGGCAGCGTGTGGTGAAG
 TTGCAGCCGATGGATCATGATCCGAAAAATCCGCTGCGTGGCAGGTTATTTGTTGCACTGCTGGGTTTTACCAGCATT
 GATTATGCAACCCCTGGATCTGGCAGATATTCATCTGGGTGCAGTTACCGTTCGCGTGCAGGCAAGCGCAGCAGTTAGCCA
 GCTGATTGCAATCTGACCGAAACAGTCCGCGTCTGCTGGCAAGCACACCGGAACATCTGGATGCAGCAGTTGAATGTC
 TGCTGGCAGGTACAACCTCCGGAACGCTCGGTTGTTGTTGATTATCATCCGGAAGATGATGATCAGCGTCGACGATTTGAA
 AGTGCAGCTCGTCTGCGCAGATGCAGGTAGCCTGGTTATTTGTTGAACCCCTGGATGCAGTTCGTGCAGTTCGTTCTGTA
 TCTGCCTGCAGCACCCTGTTGTTCCGGATACAGATGATGATCCGCTGGCACTGCTGATTTATACCAGCGGTAGCACCCG
 GCACCCGAAAGGTGCAATGTATACCAATCGTCTGGCAGCAACCATGTGGCAGGGTAAATAGCATGCTGCAGGGTAAATCA
 CAGCGTGTGGGTATTAATCTGAATTAATGCCGATGAGCCATATTGAGGTCGATTTAGCCTGTTTGGTGTCTGGCAGC
 TGGTGGCACCCGATATTTTGCAGCAAAAAGCGATATGAGCACCCCTGTTTGAAGATATTTGGTCTGGTTCGTCGACCGAAA
 TCTTTTTTGTTCGCGTGTGTTGATATGGTGTTCAGCGTTATCAGAGCGAACTGGATCGTCTGATCGCTGCGGTTGCA
 GATCTGGATACCCCTGGATCGTGAAGTTAAAGCAGATCTGCGTGCAGAAATTTCTGGGTGGTCTGTTTCTGTTGTCAGTGT
 TGGTAGCGCACCCGCTGGCAGCCGAAATGAAAAACCTTTATGAAAGCGTTCGATCTGCCGCTGCATGATGGTTATGGTA
 GCACCGAAGCCGGTGAAGCGTTCGCTGGATAATCAGATTACGCGTCCGCTGTTCTGGATTATAAATGGTTGATGTT
 CCGGAACCTGGGTTATTTCTGATCCGATCGTCCGATCCCTGTTGGTGAACCTGCTGCTGAAAGCAGAAACCACCATCCGGG
 TTATTACAAACGTCGGAAGTTACCCAGAAATCTTTGATGAAGATGGCTTCTATAAAACCCGTTGATATTGTTGGCAGAAC
 TGGAAATGATCGTCTGGTTATGTTGATCGTCTGAATAATGTTCTGAAACTGAGCCAGGGTGAATTTGTTACCGTTGCA
 CATCTGGAAGCAGTTTTTGAAGCAGTCCGCTGATTCGTGATTTTTATCTATGGTAGCAGCGAACCTAGCTATCTGCT
 GGCAGTTATTGTTCCGACCGATGATGCCCTGCGTGGTCCGATACCCGAACCCCTGAAAAGCGCAGAACCTGGCAGAAAGCATTC
 AGCGTATTGCAAAAGATGCAAACTGCAGCCGATGAAATTCGCGTGAATTTCTGATTGAAACCGAACCGTTTACCATT
 GCAAAATGGTCTGCTGAGCGGTATTGCAAACTGCTGCGTCCGAATCTGAAAGAAGCTTATGGTGCACAGCTGGAACAAAT
 GTATACCGATCTGGCAACCGGTCAGGCAGATGAACCTGCTGGCACTGCGTCTGGAAGCAGCAGATCTGCCGTTCTGGAAA
 CCGTTAGCCGTCAGCAAAAAGCAATGCTGGGTGTTGCAAGCGCAGATATGCGTCCGGATGCACATTTTACCAGATCTGGGT
 GGTGATAGCTGAGCGCACTGAGCTTTAGCAACCTGCTGCATGAAATTTTGGTGTGAAGTTCGCGTTGGTGTGTTGTTG
 TAGTCCGCGCAAATGAACCTGCTGATCTGGCAACATATATTGAAGCAGAACGTAATAGCCGTTGCAAAACCTGGACCTTTA
 CCAGCGTTCATGGTGGTGGTAGCGAAATTCGTGCAGCCGATCTGACCCCTGGATAAAATTCATTGATGCAGTACCCTGGCA
 GCAGCAGATAGCATTCGATGCACCGGTTCCGGCACAGACCGTTCGCTGACCGGTGCAAAATGGTTATCTGGGTGCGCTT
 TCTGTGCTGGAATGGCTGGAACGCTGGATAAAACAGGTGGCACCCCTGATTTGTGTTGTGCGTGGTAGTGATGCAGCAG
 CAGCCCGTAAACGCTCGGATTGAGCAATTTGATAGCGGTGATCCGGTCTGCTGGAACACTATCAGCAGCTGGCAGCCCGT
 ACCCTGGAAGTTCTGGCAGGCGATATTGGTATCCGAATCTGGGCTGGATGATGCCACCTGGCAGCGTCTGGCAGAAAC
 CGTTGATCTGATTTGATCCGCGCAGCACTGGTTAATCATGTTCTGCGGTATACCCAGCTGTTGGTCCGAATGTTGTTG
 GCACCGCAAAATTTGTTCTGCTGGCAATACCCGACGTCGCAAAACCGGTTACCTATCTGAGCACCCGTTGGTGTTCAGAT
 CAGGTTGATCCGGCAGAAATCAAGAGGATAGTGATGTTCTGTAATGAGCGCAGTGCCTGTTGTTCTGTAAGCTATGC

```

CAATGGTTATGGCAATAGCAAATGGGCAGGCGAAGTCTCTGCTGCGTGAAGCACATGATCTGTGTGGTCTGCCGGTTGCAG
TGTTTCGTAGCGATATGATTCTGGCACATAGCCGTTATGCAGGTCAGCTGAATGTTTCAGGATGTTTTTACCCGTTCTGATT
CTGAGCCTGGTTGCAACCCGGTATTGCACCGTATAGCTTTTATCGTACCGATGCAGATGGTAATCGTCAGCGTGCACATTA
TGATGGTCTGCTGCAGATTTTACCAGCAGCAGCCATTACCGCAGTGGGTATTTCAGGCAACCGAAGGTTTTTCGTACCTATG
ATGTGCTGAATCCGTATGATGATGGTATTAGCCTGGATGAATTTGTGGATTGGCTGGTTGAAAGTGGTTCATCCGATTTCAG
CGCATTACCGATTATAGCGATTGGTTTCATCGTTTCGAAAACCGCAATTCGTGCACTGCCGAAAAACAGCGTCAGGCCAG
CGTTCGCCGCTGCTGGATGCATATCGTAATCCGTGTCGGCAGTTCGTGGTGCCATTCTGCCTGCAAAAAGAAATTTTCAGG
CAGCCGTTTCAGACCGCAAAAATTTGGTCCGGAACAGGATATTCCGCATCTGAGTGCACCCTGATCGATAAATATGTGAGC
GATCTGGAAGTCTGCAGCTGCTGTAAGGAGGCATATGATGGGTAGCGTTGATGCAAGCGAAACCACCGTTACCCGTTGG
GCAGCAGTGCATGCCACCCGGTTCATCTGAGCCCGTATCGTTATACCCTGCGTAAAACCGGTCGGGAAGATGTTGTTCTGAA
AGTGAAATATTGCGGCATTTGCCATACCGATGTTTCATCAGGTTAAAAATGATCTGGGTGCAAGCAAATATCCGATGGTTC
CGGGTCATGAAGTTGTGGGTGAAGTTGTTGAAGTGGGTCCGGAAGTGAAGTGAAGTTCGTCGCGGTGATGTGGTTGGTGT
GGTGTGATTGTTGGTTGTTGTCGTGATTGTCGTCGGTAAAGCAAATGTTGAACAGTATTGCAACAAAAAATCTGGTC
CTACACAGATGTGTATACCGATGGTAAACCGACCCAGGTTGGTTTTGCAAGCGCAATGGTGTGATCAGAAAATTTGTTG
TGAAAATTCGGCAGGTTGTCACCCGGAACAGGCTGCACCTCTGCTGTGTGCCGGTGTACCGTTTTATAGTCCGCTGAAA
CATTTTGGTCTGATGACACCCGGTCTGCGTGGTGGTATTCTGGGTCTGGGTGGTGTGGTTCACATGGGTGTGAAAGTTGC
AAAAAGCATGGGTTCATCATGTTACCGTTATTAGCAGCAGCAACAAAAACGTCGCCGAAGCAATGGATGATCTGGGAGCAG
ATGCATATCTGGTTAGCAGCGATACCGATCAGATGGCAGCAGCCGAGATAGCCTGGATTATATCATTGATACCGTTCCG
GCAAAAATCCGCTGGAACCGTATCTGGCCCTGCTGAAAATGGATGGTAAACTGGTTCGATGGGTGTTATTGCAGAACC
GCTGAGCTTTGTTAGCCGATGGTGTGCTGGGTGCTAAAACCATACCGGTAGCTTTATTGGTAGCATGGATGAAACCG
AAGAGTTCTGCAGTTTTGTGTTGATAAAGGTTGACCAGTCAGATCGAAGTTGTGAAAATGGATTATGTGAACCAGGCA
TTTGAACGCCTGGAACGTAATGATGTTTCGTTATCGTTTTGTTGTTGATGTGGGTGGCAGCAATATTGAAGATGCAGCAT
GGAGCCTTAACATGATTGAAACCATCTGCCAGCCGGTGTGGAAGCGCAGAAGTCTGGAATATCCGGAAGATCTGAA
AGCACATCCGGCAGAAAGAACATCTGATTGCAAAAAGCGTTGAAAAACGTCGTCGCGATTTTATTGGTGCACGTCATTGTTG
CACGTCCTGGCACTGCCGAACCTGGGTGAACCCGCTGTTGCCATTGGTAAAGGTGAACGTGGTGCACCATTGTCCTCGT
GGTGTGTGGGTAGCCTGACCCATTGTGATGGTTATCGTGCAGCAGCCGTTGCACATAAAAATGCGTTTTTCGTAGCATTGG
TATTGATGCAGAACCGCATGCAACCCTGCCGGAAGGTGTTCTGGATAGCGTTAGCCTGCCCTCCGGAACGTGAATGGCTGA
AAACCACCGATAGCCACTGCATCTGGATCGTCTGCTGTTTTGTGCAAAAAGAGGCAACCTATAAAGCATGGTGGCCTCTG
ACCCACAGTTGGCTGGGTTTTGAAGAAGCACATATTACCTTTGAAATCGAAGATGGTAGTGCCGATAGCCGTAATGGCAC
CTTTCATAGCAGACTGCTGGTTCCAGGTCAGACCAATGATGGTGGTACCCGCTGCTGAGCTTTGATGGTTCGTTGGCTGA
TTGCAGATGGTTTTTCTGACCGCCATTGCCTATGCATAAAGGATCCATCCATCCGAAAGGCTCAGTCGAAAAGACTGGG
CCTTTTCGTTTTATGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCCTAGCATAAACCC
TTGGGGCCTCTTCGGGGTCTTGAGGGTTTTTTGACGTCGCATCAGGCAATGAATGCGAAAACCGCGGTGTAATCCGGA
AATACAGGAACGCACGCTGGATGGCCCTTCGCTGGGATGGTGAACCATGAAAAATGGCAGCTTCAGTGGATTAAGTGGG
GGTAATGTGGCCTGTACCCTCTGGTTGCATAGGTATTCATACGGTAAAAATTTATCAGGCGCGATCGCGGCAGTTTTTTCG
GGTGGTTTTGTTGCCATTTTTACCTGCTGCTGCCGTGATCGCGCTGAACCGTTTTAGCGGTGCGTACAATTAAGGGATT
ATGGTAAATCCACTTACTGTCTGCCCTCGTAGCCATCGAGACCCGGTTC

```

- **Sequenz von pCCN**

Zur Generierung des Plasmid pCCN wurde das Plasmid pTCCN mit EcoRI und HindIII (Thermo Scientific, Massachusetts, USA) nach Herstellerangaben behandelt. Nach der Behandlung mit der T4-Polymerase (Thermo Scientific, Massachusetts, USA), fand eine Ligation und Transformation in *E. coli* DH5α statt. Die Klone wurden mit Hilfe einer PCR auf die Abwesenheit des Gens für die TAL und Anwesenheit der Gene für CAR, CAD und NPT untersucht.

- **Sequenz von pTCN**

Zur Generierung des Plasmid pTCN wurde das Plasmid pTCCN mit NdeI und AflIII (Thermo Scientific, Massachusetts, USA) nach Herstellerangaben behandelt. Nach der Behandlung mit der T4-Polymerase (Thermo Scientific, Massachusetts, USA), fand eine Ligation und Transformation in *E. coli* DH5α statt. Die Klone wurden mit Hilfe einer PCR auf die Abwesenheit des Gens für die CAD und Anwesenheit der Gene für TAL, CAR und NPT untersucht.

- **Sequenz von pTAL**

Zur Generierung des Plasmid pTAL wurde das Plasmid pTCCN mit EcoRI und BamHI (Thermo Scientific, Massachusetts, USA) nach Herstellerangaben behandelt. Nach der Behandlung mit der T4-Polymerase (Thermo Scientific, Massachusetts, USA), fand eine Ligation und Transformation in *E. coli* DH5 α statt. Die Klone wurden mit Hilfe einer PCR auf die Anwesenheit des Gens für die TAL und Abwesenheit der Gene für CAR, CAD und NPT untersucht.

- **Sequenz von pCAR**

Das Plasmid wurde freundlicherweise von der Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie zur Verfügung gestellt. Das Genfragment, welches für das Gen der CAR kodiert, wurde aus *Norcadia iowensis* NRRL 5646 mit Hilfe spezifischer Primer (Tabelle 4) amplifiziert und mit Hilfe des Restriktionsenzym BsaI in den Vektor pET28a(+) (Merck, Darmstadt, Deutschland) kloniert.

Tabelle 4: Primer zur Amplifikation des Gens CAR aus *Norcadia iowensis* NRRL 5646.

Bezeichnung	Sequenz
NiCAR_fw	5'- tatggtctccatatggcagtgattcaccgatgagc -3'
NiCAR_rev	5'- tatggtctcctcgagtcagagcagctgaagcagttcc -3'

Es fand eine Gensynthese von pLysT statt (eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland):

Legende:

Restriktionsschnittstelle

rrnB T1

K128Y-Mutation (katalytische Inaktivierung)

doppelt unterstrichen - Start-ATG

gepunktet unterstrichen - Stoppcodon

Sequenz des Expressionskonstruktes (Klonierung über EcoRI und Sall in pBR322):

GAATTCGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCCGGTGAACGCTCTC
 CTGAGTAGGACAAATCCGCCGCCCTAAAGCTTTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTTTAATGCGGTAGTTTTATCACA
 GTTAAATTGCTAACGCAGTCAGGCACCGTGTATGGCTCGTGTACAGTTTAAACAACGTGAATCTACTGACGCAATCTTTGTTC
 ACTGCTCGGCTACCAAGCCAAGTCAGAATGTTGGTGTCCGTGAGATTCGCCAGTGGCACAAGAGCAGGGTTGGCTCGATGTG
 GGATAACACTTTATCATCAAGCGAGACGGTACTGTGGAGGCAGGACGAGATGAGATGGCTGTAGGCTCTCACGCTAAGGGTTA
 CAACCACAACCTCTATCGGCGTCTGCCTTGTGGTGGTATCGACGATAAAGGTAAGTTCGACGCTAACTTTACGCCAGCCAAA
 TGCAATCCCTTCGCTCACTGCTTGTACACTGCTGGCTAAGTACGAAGGCGCTGGTCTTCGCGCCCATCATGAGGTGGCGCCG
 TATGCTTGCCCTTCGTTTCGACCTTAAGCGTTGGTGGGAGAAGAACGAACTGGTCACTTCTGACCGTGGATAATTAATTGAACT
 CACTAAAGGGAGACCACAGCGGTTCCCTTTGTTTCGATTGGAGGTCAAATAATGTCGAC

2.5 Methoden und Analytik

2.5.1 Elektroporation in *E. coli*

Zur Elektroporation wurden 25 ng Plasmid zu 50 μ L elektrokompeter Zellen (*E. coli* DH5 für die Plasmidamplifikation bzw. *E. coli* BL21 Gold (DE3) und *E. coli* Δ tyrR:T7 pTCCN für die Expression) gegeben und im Elektroporator der Elektroporationsvorgang bei 1700 V durchgeführt. Anschließend

wurde 1 mL frisches LB-Medium gegeben und 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden dann auf einer Agarplatte mit Selektionsmedium ausplattiert und für 16 h bei 37 °C inkubiert.

2.5.2 Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion

Klone, die aus der Transformation hervorgingen, wurden auf das Vorhandensein des TAL-Inserts mit Hilfe der Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion (Kolonie-PCR) untersucht. Hierfür wurden die Primer T7_fwd (5' TAATACGACTCACTATAGGG 3') und TAL_rev (5' GGGCAAAGAGAAAATTCTGTACGCACGTG 3') und die Phusion-DNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Der zu untersuchende Klon wurde gepickt, in 50 µL dH₂O resuspendiert und für 15 min bei 99 °C inkubiert. Die DNA der aufgeschlossenen Zellen diente als *template*. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes kann Tabelle 5 entnommen werden.

Tabelle 5: Pippettierschema für die Kolonie-PCR.

Komponente	V [µL]
5x High Fidelity-Puffer	6
2 mM dNTP	3
100 %DMSO	3
	1
template	1
10 µM T7_fwd	1
10 µM TAL_rev	1
25 mM MgSO ₄	0,5
0,3 µM Phusion-Polymerase	0,5
dH ₂ O	13
V _{gesamt}	30

Folgendes PCR-Programm wurde eingestellt:

1. 95 °C 3 min Initiale Denaturierung
2. 95 °C 30 s Denaturierung
3. 52 °C 30 s *Primer-annealing*
4. 72 °C 45 s Elongation
5. Wiederholung von Schritt 2- - 4 für 25 Zyklen
6. 72 °C 5 min Finale Elongation
7. 4 °C Pause

Anschließend folgte die Probenbereitstellung für die Gelelektrophorese. Zur Herstellung eines 1 %-igen Agarosegels wurden 0,35 g Agar abgewogen und mit 35 mL TAE-Puffer erhitzt, bis der Agar vollständig gelöst war. Nach Zugabe von 20 µL Ethidiumbromidlösung ($c_{\text{Stamm}} = 1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) wurde die Lösung in einen Gelschlitten mit Geltaschenkamm gegossen. Nach Aushärten wurde das Gel mit 5 µL DNA-Fragment-Marker und den zu untersuchenden Proben (falls nicht anders angegeben: 5 µL Probe

+ 1 µL 6x Massruler Loading Dye) beladen. Der Elektrophoreselauf wurde für 1 h bei 80 V und 400 mA durchgeführt.

2.5.3 Kultivierungen im Minimalmedium

Nach der Elektroporation von *E. coli* mit dem entsprechenden Plasmid (siehe Tabelle 13, S. 51) wurden die Zellen auf einer Minimalmediumplatte oder einer Minimalmediumplatte, die mit 1 % (w/v) Pepton und 34 µg/mL Chloramphenicol (CA) versetzt war, ausgestrichen und bei 37 °C für 16 h inkubiert. Eine Einzelkolonie dieser Platte wurde zum Animpfen einer Vorkultur (5 mL Minimalmedium mit 34 µg/mL CA) genutzt. Die Flüssigkultur inkubierte schüttelnd bei 37 °C für 16 h. Das Wachstum sollte mittels OD-Messung beobachtet werden. Kulturen, die mit dem Plasmid pLysT transformiert wurden, wurden mit Medium, das zusätzlich 100 mg/mL Ampicillin enthielt, inkubiert.

Die Lösungen für Thiamin, Biotin und Folsäure wurden nach [Collins und Thune, 1996] hergestellt und nach der Herstellung des Minimalmedium zugesetzt (Endkonzentrationen im Medium: 0,5 mg/L Thiamin; 0,001 mg/L Biotin und 0,1 mg/L Folsäure). Die Zugabe von Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan erfolgte ebenfalls nach Fertigstellung des Minimalmediums. Die Aminosäurelösung enthielt 1 mM Tyrosin, 1 mM Phenylalanin und 1 mM Tryptophan. Die Sterilisation erfolgte mittels Filtration. Auch die Lösung, die alle proteinogenen Aminosäuren enthielt, wurde nach Herstellung des Minimalmediums zugegeben.

2.5.4 Proteinproduktion in *E. coli*

Nach der Elektroporation von *E. coli* mit pTCCN wurden die Zellen auf einer Minimalmediumplatte, die mit 1 % (w/v) Pepton und 34 µg/mL Chloramphenicol (CA) versetzt war, ausgestrichen und bei 37 °C für 16 h inkubiert. Eine Einzelkolonie dieser Platte wurde zum Animpfen einer Vorkultur (20 mL Minimalmedium mit 1 % (w/v) Pepton und 34 µg/mL CA) genutzt. Die Flüssigkultur inkubierte schüttelnd bei 37 °C für 16 h. Die Zellkultur wurde anschließend zentrifugiert (20 min | 3.220 g | 4 °C) und mit frischem TB-Medium gewaschen. Die Hauptkultur wurde mit einer entsprechenden Menge der Vorkultur zum Einstellen einer Start-OD von 0,1 angeimpft (8 x 400 mL im Schüttelkolben). Die Hauptkultur wurde unter Schütteln bei 37 °C inkubiert bis eine OD von 0,8 – 1 erreicht war. Anschließend wurde die Genexpression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 1 mM) induziert. Die Expression erfolgte unter Schütteln für 2 h bei 37 °C, 6 h bei 24 °C oder 16 h bei 16 °C. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (15 min | 6.000 g | 4 °C) geerntet und mit 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,5) gewaschen. Das Zellpellet wurde in einem Volumen von 100 mM Phosphatpuffer + 20 % Glycerin aufgenommen, sodass eine OD von 100 eingestellt wurde. Nach dem Einfrieren in Flüssigstickstoff wurden die Zellen bei -80 °C gelagert.

2.5.5 SDS-PAGE

Während der Kultivierung wurden zu optimalen Vergleichszwecken 1/OD-Proben zur Analyse mittels SDS-PAGE angelegt. Hierfür wurde 1 mL Zellsuspension (bei einer Kultur mit einer OD von 1,0) entnommen und für 10 min bei 4 °C und 15.000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µL Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 99 °C inkubiert. Auf das SDS-Polyacrylamid-Gel (SDS-PA-Gel) wurden 10 µL der entsprechenden Probe aufgetragen. Die Zusammensetzungen der zur Herstellung der SDS-PA-Gele und der Durchführung der SDS-PAGE erforderlichen Lösungen können Tabelle 7 entnommen werden.

Tabelle 6: Lösungen zur Herstellung der SDS-PA-Gele.

Lösung	Zusammensetzung
Trenngelpuffer	18,18 g Tris 2 mL 20 % (w/v) SDS-Lösung 100 µL 10 % (w/v) NaN ₃ -Lösung ad 100 mL dH ₂ O pH mit HCl auf 8,8 eingestellt
Sammelpuffer	6,06 g Tris 2 mL 20 % (w/v) SDS-Lösung 100 µL 10 % (w/v) NaN ₃ -Lösung ad 100 mL dH ₂ O pH mit HCl auf 6,8 eingestellt
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %)	29,1 g Acrylamid 0,9 g Bisacrylamid ad 100 mL dH ₂ O
Probenpuffer	2,72 g Tris 15 mL dH ₂ O 3 mL 3 M HCl 25 mL 20 % (w/v) SDS-Lösung 50 mg Bromphenol 50 g Glycerin ad 100 mL dH ₂ O pH mit 3 M HCl auf 6,8 eingestellt vor Verwendung 10 µL Mercaptoethanol pro mL zugesetzt
Kathodenpuffer	200 mL Isopropanol 100 mL Essigsäure ad 1000 mL dH ₂ O

Zum Anfärben der Proteine wurde das Gel für 16 h mit Färbelösung auf dem Wipptisch gelagert. Nach der Färbung wurde das Gel mit dH₂O abgespült und in Entfärbelösung bis zum ausreichenden Kontrast inkubiert. Die Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Zusammensetzung der Lösungen zum Anfärben und Entfärben der SDS-PA-Gele

Lösung	Zusammensetzung
Färbelösung	1 g Comassie-Brilliant Blau G-250 200 mL Isopropanol 100 mL Essigsäure ad 1000 mL dH ₂ O

Entfärbelösung	200 mL Isopropanol 100 mL Essigsäure (100 %) ad 1000mL dH ₂ O
----------------	--

2.5.6 Etablierung der Umsetzung mit ruhenden Zellen

Zur Untersuchung der Einfrierbedingungen der ruhenden Zellen wurden 800 mL TB mit BL21 Gold (DE3) pTCCN angeimpft (mit 6 mL einer VK mit einer OD von 10) und schüttelnd bei 37 °C bis zur einer OD von 1 inkubiert. Nach einer Inkubation bei 24 °C für 6 h wurden die Zellen aufgeteilt und durch Zentrifugation (6.000g, 10 min, 4 °C) geerntet. Die Zellpellets wurden mit 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,5) gewaschen und jeweils ein Pellet wurde in 15 mL 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,5) und 15 mL 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,5) + 20 % Glycerin aufgenommen. Die angelegten 1 mL-Aliquots wurden in Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Die Reaktionsansätze der ruhenden Zellen sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Reaktionsansätze der ruhenden Zellen zur Untersuchung der Zugabe von Glycerin beim Einfrieren.

Reaktionsansatz 1 (Einfrieren mit Glycerin)	Reaktionsansatz 2 (Einfrieren ohne Glycerin)
2 mL BL21 Gold (DE3) pTCCN (eingefroren mit 20 % Glycerin)	2 mL BL21 Gold (DE3) pTCCN (eingefroren ohne Glycerin)
10 mL 2 mM Tyrosin in Phosphatpuffer	10 mL 2 mM Tyrosin in Phosphatpuffer
8 mL 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,5)	6 mL 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,5)
	2 mL 20 % Glycerin
20 mL Gesamtvolumen	20 mL Gesamtvolumen

Die Reaktionsansätze wurden 1 h schüttelnd in Schikanekolben bei 37 °C inkubiert. Die Probennahme für die Aktivitätsbestimmung wie in Abschnitt 2.5.8 beschrieben.

Für die Bewertung des Aktivitätsverlusts während des Einfrier-Tau-Zyklus wurden ruhende Zellen analog zur obigen Beschreibung hergestellt mit der Ausnahme, dass die Genexpression bei 16 °C für 24 h durchgeführt wurde. Der Reaktionsansatz beinhaltete 500 µL 2 mM Tyrosin (in dH₂O gelöst), 750 µL 150 mM Phosphatpuffer (pH 7,5), 250 µL BL21 Gold (DE3) pTCCN (nicht eingefroren). Parallel dazu wurde der gleiche Reaktionsansatz mit eingefrorenen und aufgetauten Zellen hergestellt. Die Reaktionsansätze wurden für 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Aktivität wurde mittels HPLC verfolgt (Abschnitt 2.5.8 und 2.5.9.1).

Die putative Reaktion des Kumarylalkohols mit reaktiven Sauerstoffspezies wurde mit Hilfe einer anaeroben Reaktion untersucht. Hierfür wurden 1 mL-Aliquots ruhender Zellen wie oben beschrieben (Genexpression bei 24 °C für 6 h) hergestellt. Es wurde ein Reaktionsansatz mit 8 mL 2 mM Tyrosin (gelöst in Phosphatpuffer), 5,2 mL 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) und 800 µL 20 % Glukose angesetzt. Dieser wurde in zwei 7 mL-Ansätze aufgeteilt. Ein Reaktionsröhrchen wurde gasdicht verschlossen und 20 min mit N₂ begast. Zu jedem dieser Ansätze wurden 800 µL

BL21 Gold (DE3) pTCCN mit Hilfe einer Spritze und einer Kanüle gegeben und schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben für die HPLC entnommen (Abschnitt 2.5.8 und 2.5.9.1)

2.5.7 Reaktion im Rührreaktor

Für die Monolignolsynthese wurden die Zellen im Eiswasser aufgetaut und anschließend bei 4 °C und 3.200 g für 1 h zentrifugiert. Die Zellen wurden in 50 mL Reaktionsmedium aufgenommen. Der Rührreaktor (SIXFORS Multi-Fermentersystem, Infors HT AG, Bottingen, Schweiz) wurde mit 350 mL Reaktionsmedium befüllt und nach Kalibrieren der pH-Sonde zusammengebaut. Es wurden 50 mL der rekombinanten Zellen (Abschnitt 2.5.4) zugegeben. Der Rührer wurde mit 1000 rpm betrieben. Die Begasung betrug 1 L/min Druckluft. Der Reaktor wurde auf 37 °C geheizt. Der pH wurde mit 20 % Phosphorsäure und 10 % NaOH auf 7,5 reguliert. Wenn es notwendig war, wurde 100 µL Struktol J673 zugegeben. Je nach Experiment wurde Tyrosin (in Form von Pulver) oder Glukose (200 g/L-Stammlösung, autoklaviert) zugegeben. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben für die HPLC-, OD- und Glukosemessung genommen.

Beim Experiment des Mediumaustausches (Abschnitt 3.7.3, S: 59) wurde die Zellesuspension nach 2,5 h bei 4 °C und 6.000 g für 15 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 400 mL 100 mM Phosphatpuffer (pH, 7,5) aufgenommen und wie oben beschrieben im Rührreaktor inkubiert.

2.5.8 Probenaufbereitung zur HPLC-Analyse

Das Protokoll analog zur Literatur beinhaltet die Entnahme von 1,5 mL Zellkultur mit anschließender Zentrifugation (6.000 g | 24 °C | 10 min). Der Überstand (1 mL) wurde mit 10 µL Ameisensäure angesäuert und zwei Mal mit 500 µL Essigsäureethylester extrahiert. Nach Vereinigung der organischen Phasen wurden diese im Zentrifugationsverdampfer zur Gänze eingengt. Der verbleibende Feststoff wurde in 500 µL HPLC-Laufmittel (12 % Acetonitril + 0,2 % Ameisensäure) aufgenommen und 50 µL wurden zur HPLC-Analyse verwendet.

Für die Kontrolle der Extraktion wurde 300 µL 200 µM Kumarylalkohol bzw. Kumarsäure (gelöst in dH₂O) mit 500 µL Ethylacetat extrahiert und zentrifugiert (16.000 g | 24 °C | 5 min). Die organische Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die wässrige Phase wurde noch einmal extrahiert. Nach Vereinigung der organischen Phasen wurden diese im Zentrifugationsverdampfer zur Gänze eingengt. Der verbleibende Feststoff wurde in 300 µL dH₂O aufgenommen und mittels Absorption untersucht. Die wässrigen Phasen wurden ebenfalls spektroskopisch untersucht.

Nach verschiedenen Optimierungsschritten wurde das obige Protokoll verändert. Zunächst wurden 500 µL Zellkulturüberstand zwei Mal mit 300 µL Essigsäureethylester extrahiert. Nach Zugabe von 5 µL Ameisensäure zur wässrigen Phase wurde erneut mit 300 µL Essigsäureethylester extrahiert und die

organischen Phasen vereint. Es erfolgte eine Zugabe von 50 µL 50 % Glycerin zur organischen Phase und anschließend die Einengung im Zentrifugationsverdampfen für 45 min. Zum verbleibenden Glycerin (25 µL) wurde 225 µL Acetonitril und 250 µL H₂O dazugegeben und ausgiebig geschüttelt. Vor der Injektion wurde die Probe zentrifugiert (16.000 g | 24 °C | 10 min) und 5-fach mit H₂O verdünnt.

2.5.9 HPLC-Messung

2.5.9.1 Messung der Phenylpropanoide

Für die Identifikation und Quantifizierung der Phenylpropanoide wurde die Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (*high-performance liquid chromatography*, HPLC) genutzt. Hierfür wurde das Thermo Separation Products Spectra System (P2000, AS3000, UV1000, SN4000) in Kombination der Säule YMC-Pack ODS-A (12 nm, S-5 µm, 150 x 4,6 mm ID, YMC Europe GmbH, Dinslaken) verwendet. Das Laufmittel 12 % Acetonitril (+ 0,2 % Ameisensäure) wurde mit 1 mL/min gepumpt. Der Lauf war 30 min lang. Das Einspritzvolumen betrug 50 µL. Die Detektion wurde bei 291 nm durchgeführt. Die Identifizierung und Quantifizierung erfolgten mit den entsprechenden, käuflich erworbenen Standards.

2.5.9.2 Messung von Tyrosin

Die Quantifizierung von Tyrosin erfolgte mit zwei verschiedenen Methoden: zum einen über die Derivatisierung mit *o*-Phthalaldehyd (OPA) und Messung mittels *reverse phase*-Chromatografie, zum anderen über eine direkte Messung mittels Normalphasenchromatografie.

Für die Quantifizierung von Tyrosin in den Abschnitten 3.1 bis einschließlich 3.7 wurde die Derivatisierung mit OPA durchgeführt. Hierfür wurde 75 mg OPA in 15 mL 400 mM Natriumtetraborat (pH 9,5, eingestellt mit NaOH) für 16 h bei 25 °C gelöst und anschließend filtriert. Kurz vor der Verwendung wurden 75 µL Mercaptoethanol zugesetzt. 333 µL dieser OPA-Lösung wurden zu 166 µL Kulturüberstand gegeben und 2 min bei 25 °C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde mit 1 mL Ethylacetat extrahiert und für 5 min bei 25 °C und 16.000 g zentrifugiert. Die organische Phase wurde verworfen. Die wässrige Phase wurde mit 1 mL Ethylacetat/Chloroformlösung (50/50) extrahiert und für 5 min bei 25 °C und 16.000 g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mit dem folgenden Protokoll vermessen:

Es wurde das Thermo Separation Products Spectra System (P2000, AS3000, UV1000, SN4000) in Kombination der Säule YMC-Pack ODS-A (12 nm, S-5 µm, 150 x 4,6 mm ID, YMC Europe GmbH, Dinslaken) verwendet. Das Laufmittel 16:16:68 Acetonitril:Methanol:H₂O mit 100 mM NaHPO₄ (pH 6,5) wurde mit 1 mL/min gepumpt. Der Lauf war 45 min lang. Das Einspritzvolumen betrug 50 µL. Die Detektion wurde bei 340 nm durchgeführt. Die Identifizierung und Quantifizierung erfolgten mit einem käuflich erworbenen Standard.

Für die Quantifizierung von Tyrosin in dem Abschnitt 3.8 wurde das HPLC-System von Shimadzu (CBM-20A, LC-20AT, LC-10AT, DGU-14A, SIL-10A, SPD-10A, CTO-10AC) in Kombination mit der Säule Infinity Lab Poroshell 120 HILIC (4,6 x 1500 mm, 4-Micron, Agilent, Santa Clara) verwendet. Die beiden Laufmittel enthielten 88 % Acetonitril und 10 mM Ammoniumacetat (Laufmittel A) bzw. 20 % Acetonitril und 10 mM Ammoniumacetat (Laufmittel B). Folgender Lauf wurde mit einem Fluss von 1 mL/min durchgeführt (Tabelle 9). Die Detektion erfolgte bei 278 nm.

Tabelle 9: HPLC-Lauf für Tyrosinmessung.

t [min]	
0 – 13	Gradient von 0 auf 8 % B
13 – 18	Gradient von 8 auf 100 % B
18 – 23	100 % B
23 – 24	Gradient von 100 auf 0 % B
24 – 35	0 % B

2.5.10 Untersuchungen zur Stabilität der Kumarylintermediate

Die Temperatursensitivitätstests wurden mit Kumarsäure (45 μM) und Kumarylalkohol (115 μM), gelöst in H_2O , durchgeführt. Jeweils eine Lösung wurde bei 4, 30, 40 und 50 $^\circ\text{C}$ für 30 min im Thermoblock inkubiert. Anschließend wurden 50 μL der Lösung mittels HPLC untersucht.

Die Untersuchung der Stabilität von Kumarylalkohol im Reaktionsmedium wurde in Phosphatpuffer in 12 mL-Kulturröhrchen durchgeführt. Die Reaktionsansätze sind Tabelle 10 zu entnehmen. Es fand eine Doppelbestimmung statt.

Tabelle 10: Reaktionsansätze zur Untersuchung der Stabilität von Kumarylalkohol im Reaktionsmedium.

Inkubation mit toten Zellen	Inkubation ohne Zellen
1 mL 200 mM Phosphatpuffer (pH 7,5)	1 mL 200 mM Phosphatpuffer (pH 7,5)
1 mL 375 μM Kumarylalkohollösung (in H_2O)	1 mL 375 μM Kumarylalkohollösung
1 mL BL21 Gold (DE3) pACYCDuet (30 min bei 99 $^\circ\text{C}$ inkubiert, OD = 100)	
1 mL H_2O	2 mL H_2O
4 mL Gesamtvolumen	4 mL Gesamtvolumen

Die Reaktionen wurden bei 37 $^\circ\text{C}$ schüttelnd inkubiert. Nach Entnahme von 200 μL nach 0 und 1 h wurden die Proben für 10 min bei 6.000 g bei 24 $^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde 3-fach verdünnt und mittels HPLC analysiert worden.

Zur Ermittlung der Stabilität von Kumarylalkohol und Kumarsäure in Gegenwart von lebenden Zellen wurden je 5 mL Minimalmedium mit einer Start-OD von 0,1 (mit einer Vorkultur) mit BL21 Gold (DE3) pACYCDuet1 bzw. BL21 $\Delta\text{tyrR:T7}$ pACYCDuet1 in 12 mL-Kulturröhrchen angeimpft und mit 8 mM Kumarylalkohol bzw. 500 μM Kumarsäure (beides hochkonzentrierte Stammlösungen gelöst in

Ethanol) bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 300 µL Zellkultur entnommen und für 10 min bei 6.000 g und 24 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde nach 10-facher Verdünnung in H₂O chromatografisch analysiert.

Zur Ermittlung der Stabilität von 4-Hydroxyphenylpyruvat wurden 500 µL 200 µM 4-Hydroxyphenylpyruvat (gelöst in dH₂O) bei 50 °C für 10 min inkubiert und anschließend mittels HPLC gemessen. Eine weitere Probe 4-Hydroxyphenylpyruvat (1 mL, 500 µM) wurde mit 1 M NaOH auf pH 9 eingestellt und anschließend mittels HPLC gemessen.

2.5.11 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Zellextrakt erfolgte nach Bradford [Bradford, 1976]. Für das Farbreagenz wurden 100 mg Coomassie-Brillantblau G-250 in 50 mL 95 %-igem Ethanol gelöst, 100 mL 85 %-ige Phosphorsäure zugesetzt und mit dH₂O auf 600 mL aufgefüllt. Anschließend wurde die Lösung filtriert, 100 mL Glycerin dazugegeben und mit dH₂O auf 1 L aufgefüllt. Nach 24 h konnte das Reagenz verwendet werden. Für den Test wurden 50 µL Proteinlösung mit 2 mL Farbreagenz versetzt, gemischt und die Extinktion bei 595 nm gegen einen Blindwert ermittelt. Als Kalibrierprotein wurde BSA eingesetzt.

2.5.12 Zellextraktmessung

Für die Herstellung des Zellextrakts wurden zu den angegebenen Zeitpunkten 5 mL Zellkultur entnommen und zentrifugiert (3.820 g | 4 °C | 20 min). Das Zellpellet wurde in 2 mL Aufschlusspuffer aufgenommen (Aufschlusspuffer: 20 mM Tris/HCl (pH 7,8), 150 mM Kaliumacetat, 10 % (w/v) Glycerin, 0,5 mM EDTA, 2 µM Pepstatin A). Die Zellen wurden mittels Hochdruck aufgeschlossen (1 Passage bei 1378 bar). Die aufgeschlossenen Zellen wurden für 1 h bei 100.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde gegen 1 L Dialysepuffer (Dialysepuffer: 20 mM Tris/HCl (pH 7,8), 150 mM Kaliumacetat, 10 % (w/v) Glycerin, 0,5 mM EDTA) in einer Membran mit einem *cut-off* von 25 kDa (Spectra/Por®7 Dialysis Membrane, Pre-Treated RC Tubing, Replican, Waltham) über Nacht bei 4 °C dialysiert. Anschließend wurde erneut zentrifugiert (100.000 g | 4 °C | 1 h) und der Überstand in 500 µL-Aliquots bei -80 °C eingefroren.

2.5.12.1 TAL-Aktivität

Der Puffer für die Aktivitätsbestimmung der TAL im Zellextrakt beinhaltete 100 mM Tris/HCl (pH 8,3), 150 mM Kaliumacetat, 5 % (w/v) Glycerin. Ein Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

215 L	0,1 mg/mL Zellextrakt
100 µL	10 mM Tyrosin (gelöst in H ₂ O mit NaOH versetzt)
85 µL	Puffer.

Nach Zugabe des Zellextrakts wurde die Absorption bei 310 nm bei 37 °C über die Zeit verfolgt. Jede Messung wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt.

Aufgrund der hohen Absorption von Kumarylalkohol bei 310 nm wurde die Aktivitätsmessung des Zellextrakts in Gegenwart von Kumarylalkohol bei 325 nm durchgeführt.

2.5.12.2 CAR/CAD-Aktivität

Der Aktivitätspuffer für die Aktivitätsbestimmung der CAR und CAD im Zellextrakt beinhaltete 50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 10 % (w/v) Glycerin. Ein Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

4 µL	0,5 M EDTA
2 µL	1 M DTT
1 µL	0,5 M NADPH/H ⁺
4 µL	0,5 M ATP
100 µL	1,8 mg/mL Zellextrakt
150 µL	2 mM K-COOH (gelöst in H ₂ O mit NaOH versetzt)
1739 µL	Puffer.

Die Reaktion wurde bei 37 °C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 300 µL der Reaktion entnommen und nach dem optimierten Protokoll in Abschnitt 2.5.8 aufgearbeitet und mittels HPLC analysiert (Abschnitt 2.5.9.1).

2.5.13 Aufarbeitung der Monolignole

Der Kulturüberstand mit dem entsprechenden Monolignol nach der Reaktion im Bioreaktor (je 400 mL) wurde zwei Mal mit 200 mL Ethylacetat extrahiert. Zur besseren Phasentrennung wurde das Gemisch zentrifugiert (15 min, 4.000 g, 24 °C). Die vereinten organischen Phasen wurden mit NaSO₄ getrocknet und unter Vakuum eingedunstet. Der Rohextrakt (310 mg bei der Isolierung von Kumarylalkohol, 1429 mg bei der Isolierung von Coniferylalkohol, 689 mg bei der Isolierung von Sinapylalkohol) wurde mit Hilfe einer *Flash*-Chromatografie mit dem Trägermaterial Kieselgel 60 gereinigt. Bei der Isolierung von Kumarylalkohol wurde das Laufmittel CH₃Cl:Ethylacetat (2:1) und für die Isolierung von Coniferyl- und Sinapylalkohol wurde das Laufmittel CH₃Cl:Ethylacetat (1:1) verwendet. Bei der Wahl der Säulenbreite, Säulenhöhe und Fraktionsgröße wurde sich an der Literatur orientiert [Still *et al.*, 1978]. Nach Analyse der gesammelten Fraktionen mittels Dünnschichtchromatografie (DC, Abschnitt 2.5.13.1) wurden die entsprechenden Fraktionen vereinigt und am Rotationsverdampfer eingedunstet. Die Identifikation der Substanz erfolgte per NMR.

2.5.13.1 Dünnschichtchromatografie

Das dünnschichtchromatografische Verfahren diente der schnellen Identifikation der Monolignole. Dabei wurden 10 x 7 cm Kieselgelplatten (Aluminium-Dünnschichtchromatografieplatte, Kieselgel 60 mit Fluoreszenzindikator F254 beschichtet, Merckmillipore) verwendet. Es wurde das gleiche Laufmittel wie für die *Flash*-Chromatografie (Abschnitt 2.5.13) verwendet. Nach erfolgter Trennung

wurden die getrockneten Kieselgelplatten bei einer Wellenlänge von 254 nm analysiert und die Banden angezeichnet. Anhand der R_f -Werte konnten die Substanzen identifiziert werden.

2.5.14 Auftragsanalytik

2.5.14.1 ^1H und ^{13}C -NMR

Die NMR-Messung erfolgte am Institut für Chemie der Martin-Luther-Universität in Halle unter Aufsicht von Dr. D. Ströhl. Die Messung erfolgte am Agilent Technologies 400 MHz VNMR5 mit einem 400 MHz Magnet (54 mm) und dem Probenkopf ^1H - ^{19}F / ^{15}N - ^{31}P 5mm PFG. Die Auswertung wurde mit Hilfe der Software VNMRJ3.2 durchgeführt. Für die Messung wurde 15 -19 mg Probe in 700 μL CD_3OD gelöst.

2.5.14.2 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse erfolgte am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle unter Aufsicht von Dr. A. Frolov. Zunächst erfolgte eine chromatografische Auftrennung der Probe mit Hilfe der Säule Hypersil Gold (50 x 2,1 mm, 1,9 μm Partikelgröße). Mit den Laufmitteln 0,1 % Ameisensäure in H_2O (A) und 0,1 % Ameisensäure in Acetonitril (B) wurde folgender Gradient gefahren:

Tabelle 11: Laufgradient zur HPLC-Trennung.

Zeit [min]	Fluss [mL/min]	Anteil B [%]
0	0,15	5
4	0,15	5
14	0,15	100
15	0,15	100
16	0,15	5
25	0,15	5

Die Messung erfolgte am Orbitrap EliteTM von Thermo ScientificTM mit folgenden Parametern:

Negativmodus

Massenbereich: 100 – 1000 m/z

Resolution: 30.000

ion spray voltage: 3,5 kV

nebulizer gas (N_2): 35 psi

Kapillartemperatur: 275 °C

MS/MS-Fragmentierung: *collision induced dissociation* mit m/z-Isolation von 147 ± 2 m/z
normalized collision energy: 35 % (Helium)

frequency of oscillation: 25 (10 min).

3 Ergebnisse

3.1 Design des Expressionskonstruktes pTCCN

Monolignole (Kumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol) können neben der möglichen Anwendung im Bereich der Bindemittel in Holzwerkstoffen in der Schmerz- und Krebsmedizin aufgrund ihrer positiven Eigenschaften auf den Menschen eingesetzt werden. Die hier vorliegende Arbeit war Teil des Projektes „Biotechnologische Synthese von Lignin-Monomeren als Ausgangsmaterialien für formaldehyd-freie Polymere“. In dieses Projekt war parallel zu der hier vorliegenden Arbeit die Konstruktion eines Tyrosinüberproduzenten eingebunden, sodass dieser Stamm für die folgenden Experimente nicht zur Verfügung stand. Es wurden für die Synthese von Kumarylalkohol zunächst Enzyme identifiziert, die ausgehend von Tyrosin in möglichst wenigen Reaktionsschritten die Umwandlung zum Kumarylalkohol erlauben. Tyrosin eignet sich bei der Etablierung der Enzymkaskade als Ausgangspunkt, weil alle Mikroorganismen Tyrosin in die Zelle transportieren und damit die Substratbereitstellung gewährleistet ist (Abbildung 4, A). Es sind auch bereits zahlreiche Untersuchungen zur Überproduktion von Tyrosin in *E. coli* publiziert worden, so dass ein solcher Stamm als Expressionsstamm eingesetzt werden kann [Lütke-Eversloh und Stephanopoulos, 2008; Patnaik *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2018]. Dies ermöglicht die Produktion der Monolignole ausgehend von günstigen Kohlenstoffquellen wie Glycerin, Glukose oder Lignocellulosehydrolysat [Olsson und Hahn-Hägerdal, 1996]. Die ausgewählte Kombination aus den Genen der Tyrosinammonialyase (TAL), *carboxylic acid reductase* (CAR), *cinnamyl alcohol dehydrogenase* (CAD) und *Norcadia phosphopantetheine transferase* (NPT) wurde als Polycistron unter der Kontrolle des T7-Promotors synthetisiert (Abbildung 4, B). Details zur Auswahl der Gene sind der Diskussion zu entnehmen.

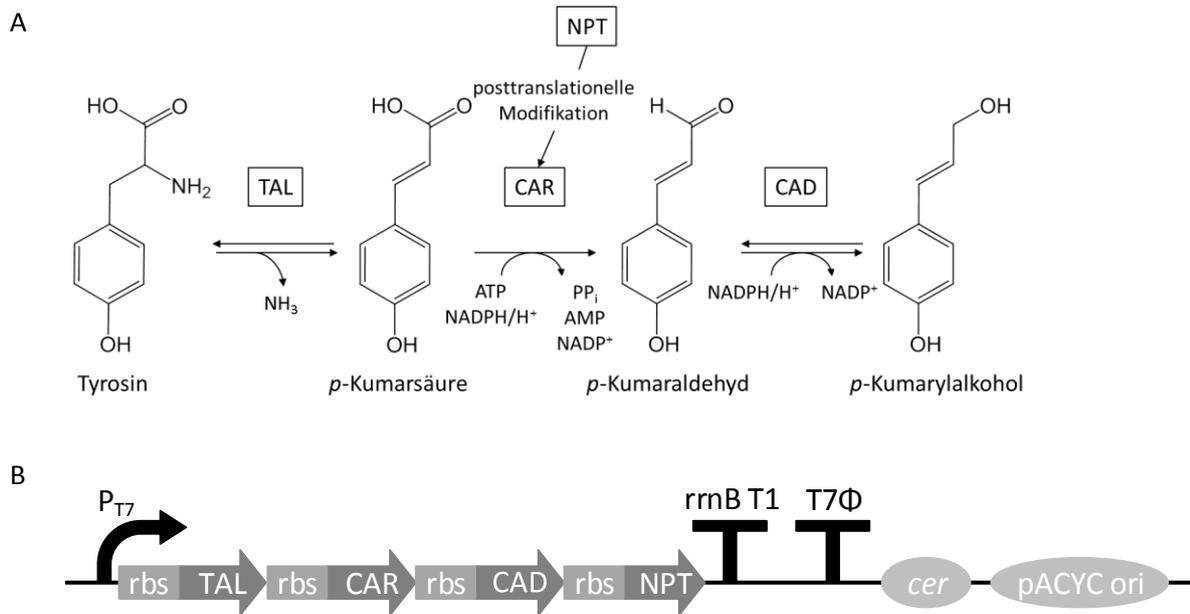


Abbildung 4: A – Postuliertes Reaktionsschema der synthetischen Kaskade zur Umwandlung von Tyrosin zu Kumarylalkohol, B – Schematische Darstellung des Expressionskonstrukts von pTCCN.

Zur Steigerung der Terminationseffizienz wurde ein T7-Terminator (T7) in der *loop*-Region modifiziert (Abbildung 5) und an das Polycistron angehängt. Die Modifizierung erhöht die freie Energie der RNA-Strukturen des Terminators im Vergleich zum unmodifizierten T7-Terminator. Eine weitere Steigerung der Effizienz sollte durch einen zusätzlichen Terminator, den *rrnB* T1-Terminator aus *E. coli*, erzielt werden, sodass ein *read-through* verhindert wird [Mairhofer *et al.*, 2015]. Beim *rrnB* T1 handelt es sich um die Terminationsregion der ribosomalen RNA in *E. coli* mit einer erwiesenen hohen Terminatoreffizienz [Orosz *et al.*, 1991]. Das Einfügen der *cer*-Sequenz nach der Expressionskaskade sollte die Plasmidstabilität erhöhen.

T7Φ	Modifizierter T7Φ	rrnB T1
$\Delta G = -23,8 \text{ kcal/mol}$	$\Delta G = -30,0 \text{ kcal/mol}$	$\Delta G = -28,3 \text{ kcal/mol}$

Abbildung 5: Minimale freien Energien der RNA-Strukturen verschiedener Transkriptionsterminatoren bei 37 °C, berechnet mit *mfold web server* [Zuker, 2003].

Das gesamte Konstrukt wurde mittels Gensynthese (Invitrogen GeneArt) und Umklonierung in den pACYCDuet1-Vektor hergestellt (Abschnitt 2.4, S. 24). Das finale Expressionskonstrukt wurde vollständig sequenziert und die Identität verifiziert. Es fand eine Anpassung der kodierenden Triplets an die Häufigkeit der *E. coli*-tRNA statt. (*codon usage*-Optimierung). Im Nachfolgenden wird das Expressionsplasmid als pTCCN bezeichnet.

3.2 Etablierung der Probenaufbereitung für die HPLC

Um die Aktivität der Genprodukte untersuchen zu können, mussten die erwarteten Produkte der rekombinanten Proteine quantitativ gemessen werden. Für diese Messung eignete sich die HPLC als Analysemethode. Aus der Literatur ging hervor, dass die Monolignole im Kulturüberstand des Expressionsstamms nach Inkubation mit dem Substrat Tyrosin zu erwarten waren [Jansen *et al.*, 2014]. Analog zu Literatur, in der Zimtssäurederivate oder andere Phenylpropanoide isoliert wurden, und einiger Vorarbeiten wurde zunächst das in Abschnitt 2.5.8 (S. 32) beschriebene Protokoll zur Probenaufbereitung für die HPLC angewandt [Furuya *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2012; Zhang und Stephanopoulos, 2013; Wu *et al.*, 2015]. Zur Untersuchung der einzelnen Schritte der Probenaufbereitung wurden Vorversuche zu den erwarteten Substanzen Kumarsäure und Kumarylalkohol durchgeführt. Kumaraldehyd war zunächst nicht verfügbar. Die Probenaufbereitung beginnt mit dem Ansäuern und einer Extraktion, gefolgt von einem Konzentrierungsschritt und dem Resolubilisieren der Substanzen. Es sollte zunächst geprüft werden, ob mit dem verwendeten Verfahren alle Substanzen quantitativ erfasst werden können. Die Absorptionmessungen (Abbildung 6) vor und nach der Aufarbeitung von Kumarsäure und Kumarylalkohol mittels Extraktion mit Ethylacetat aus Phosphatpuffer (Abschnitt 2.5.8, S. 32) zeigen, dass die Kumarsäure im Gegensatz zum Kumarylalkohol fast vollständig extrahiert und resolubilisiert werden kann (Wiederfindungsraten von 94 bzw. 27 %, berechnet anhand des Verhältnisses am Absorptionsmaximum vor und nach der Extraktion).

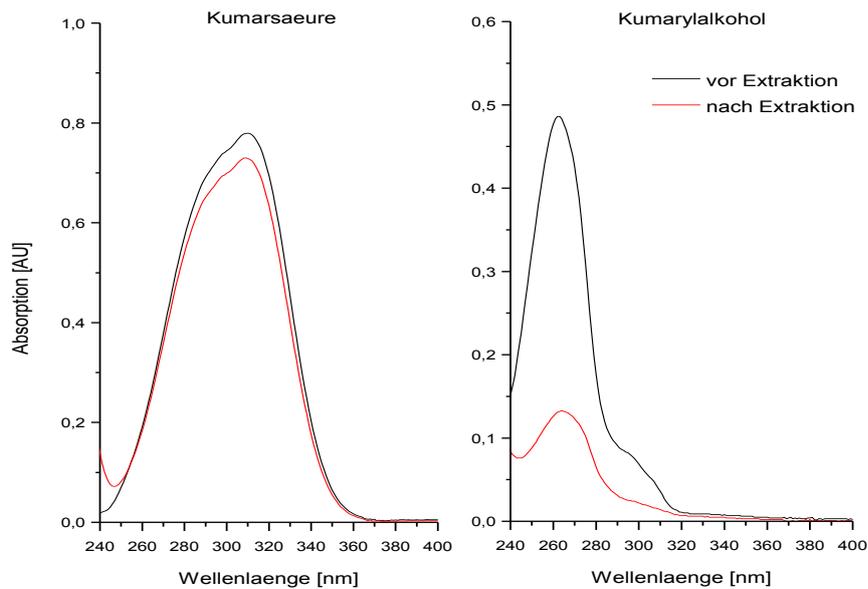


Abbildung 6: Absorptionssmessung vor und nach der Extraktion/Resolubilisierung von Kumarsäure und Kumarylalkohol aus 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,5). Wiederfindungsrate von Kumarsäure = 94 %, Wiederfindungsrate von Kumarylalkohol = 27 %.

Die Absorptionsspektren der jeweiligen wässrigen Phase zeigten keine Absorption (Anhang 1, S. 114), sodass die Extraktion vollständig war und nicht der Grund für die niedrige Wiederfindungsrate des Kumarylalkohols sein kann. Der Grund für die unvollständige Wiederfindung muss in den darauffolgenden Schritten, dem Einengen im Zentrifugationsverdampfer oder dem Lösen des Feststoffes, liegen. Ein unzureichendes Lösen des verbleibenden Kumarylalkohols nach dem Einengen würde die niedrige Wiederfindungsrate erklären. Zur Untersuchung des Resolubilierungsschritts wurde das Pellet nach dem Einengen in verschiedenen Lösungsmitteln aufgenommen und die Wiederfindungsrate mittels Absorption bestimmt (Tabelle 12).

Tabelle 12: Wiederfindungsrate von Kumarylalkohol nach dem Lösen der extrahierten und eingengten Proben in verschiedenen Lösungsmitteln.

Lösungsmittel	Wiederfindungsrate
H ₂ O	10 %
12 % Acetonitril, 88 % H ₂ O	27 %
50 % Acetonitril, 50 % H ₂ O	95 %
80 % Acetonitril, 20 % H ₂ O	95 %
Ethanol	96 %

Bereits 50 % Acetonitril in Wasser genügen, um den gesamten Kumarylalkohol zu lösen. Um das Resolubilisieren weiter zu vereinfachen, wurden außerdem 25 µL Glycerin in die organische Phase

nach der Extraktion gegeben. Die niedrige Wiederfindungsrate des Kumarylalkohols ist demzufolge auf ein unzureichendes Lösen nach der Konzentrierung zurückzuführen. Das endgültige Protokoll ist Abschnitt 2.5.8 (S. 32) zu entnehmen.

3.2.1 Stabilität von Kumarylalkohol

Da die Proben im Rotationsverdampfer erhöhter Temperatur ausgesetzt waren, wurde die Stabilität von Kumarylalkohol durch Inkubation bei verschiedenen Temperaturen und HPLC-Messung untersucht (Abschnitt 2.5.10, S. 34). Die Konzentration des Kumarylalkohols bleibt bei allen untersuchten Temperaturen unverändert, verglichen mit einer Kontrolle, die bei 4 °C gelagert wurde (Abbildung 7, A). Daraus folgt, dass Kumarylalkohol bis zu 50 °C stabil ist. Auch im Phosphatpuffer blieb die Kumarylalkoholkonzentration konstant und demonstrierte damit die Stabilität von Kumarylalkohol im Reaktionsmedium (Abbildung 7, B). Gleiches gilt auch in Gegenwart toter Zellen. Abschließend sollte geklärt werden, ob die in dieser Arbeit verwendeten Expressionsstämme das Endprodukt abbauen oder verstoffwechseln. Abbildung 7 (C) zeigt keine Abnahme der Zielsubstanz bei Inkubation mit lebenden Zellen. Es ist dementsprechend von keiner Degradation oder Metabolisierung von Kumarylalkohol durch *E. coli* auszugehen.

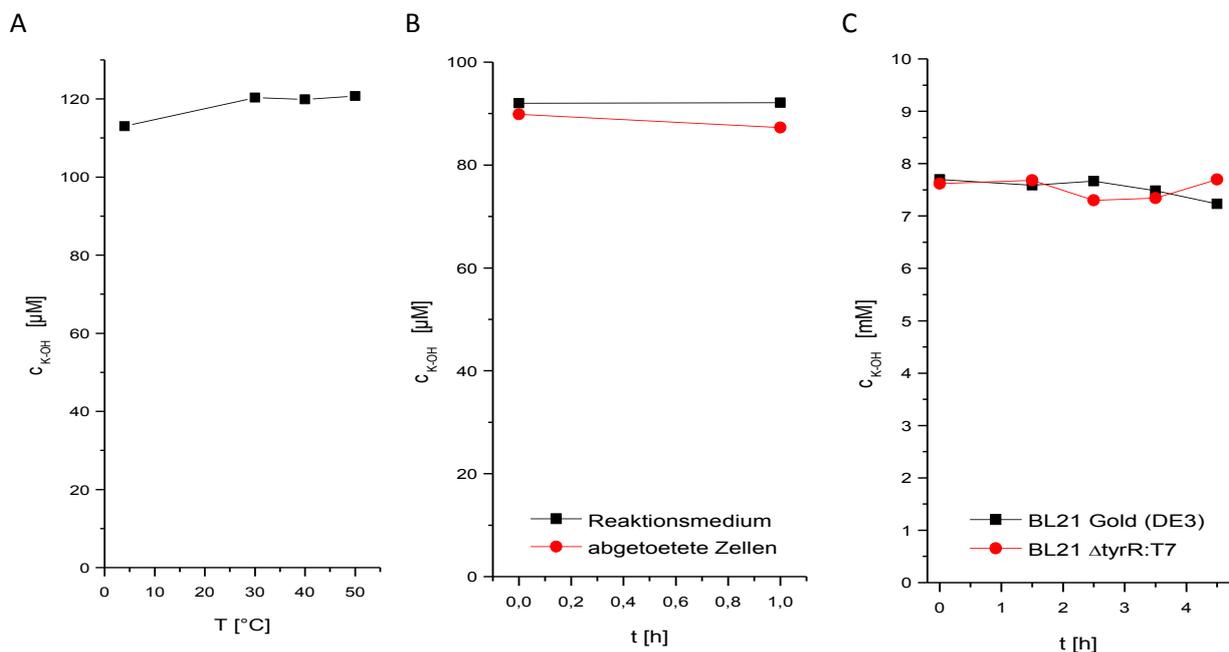


Abbildung 7: Untersuchungen zur Stabilität von Kumarylalkohol. A - Inkubation von Kumarylalkohol bei verschiedenen Temperaturen in H₂O für 30 min; B - Inkubation von Kumarylalkohol im Phosphatpuffer mit und ohne abgetötete *E. coli*-Zellen bei 37 °C; C - Inkubation von Kumarylalkohol in Gegenwart von lebenden *E. coli*-Zellen bei 37 °C im Minimalmedium.

Ein Teil dieser Versuche wurde auch für das Intermediat Kumarsäure durchgeführt. Auch diese Substanz zeigte ebenfalls eine Stabilität bei 50 °C und wurde nach 24 h Inkubation mit lebenden

E. coli-Zellen nicht abgebaut (siehe Anhang 2, S. 115). Kumaraldehyd war zu dem Zeitpunkt nicht verfügbar und wurde daher nicht getestet.

3.3 Identifikation und Quantifizierung der Substanzen im Kulturüberstand von BL21 Gold (DE3) pTCCN

Während der Kultivierung von BL21 Gold (DE3) mit dem Substrat Tyrosin wird die Bildung von Kumarsäure, Kumaraldehyd und Kumarylalkohol erwartet. Diese Verbindungen können vermutlich frei durch die Zellmembran diffundieren [Jansen *et al.*, 2014; van Summeren-Wesenhagen *et al.*, 2015] und sollten im Kulturüberstand mittels HPLC nachgewiesen werden. Für die Bilanzierung und Vergleichbarkeit der Experimente sollte die Bildung dieser Substanzen quantifiziert werden. Die beiden Reinsubstanzen für Kumarsäure und Kumarylalkohol waren beide käuflich erwerblich und wurden mit Hilfe der HPLC auf ihre Quantifizierbarkeit geprüft (Abschnitt 2.5.9.1, S. 33). Nach der Aufnahme der Absorptionsspektren (Abbildung 6) wurde die Wellenlänge 291 nm zur Detektion beider Substanzen gewählt. Die beiden Chromatogramme der Reinsubstanzen wurden mit dem Chromatogramm einer Probe eines Kulturüberstand nach Kultivierung von BL21 Gold (DE3) pTCCN nach Inkubation mit Tyrosin verglichen (Abbildung 8) (Abschnitt 2.5.6, S. 31).

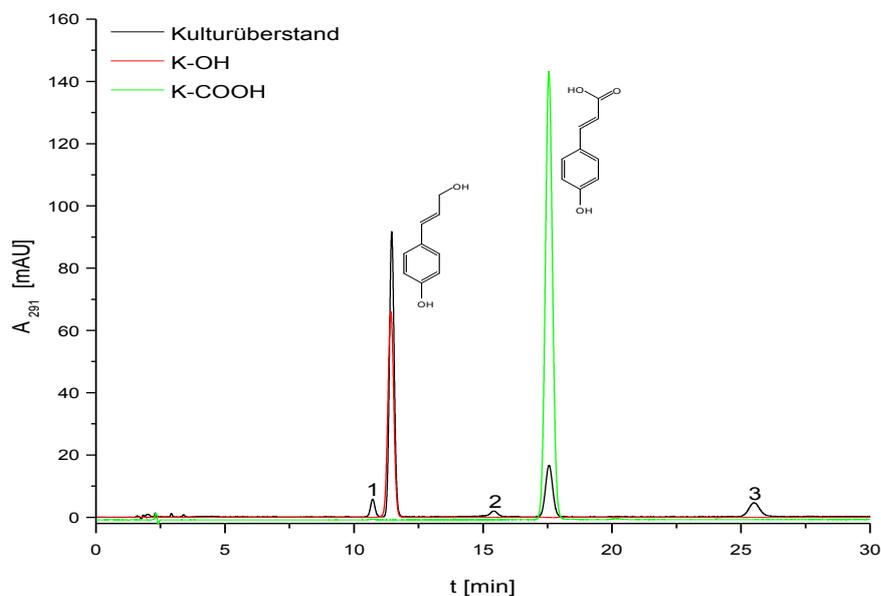


Abbildung 8: HPLC-Chromatogramm von Kumarsäure, Kumarylalkohol und einer typischen Probe des extrahierten Kulturüberstandes nach Kultivierung von BL21 Gold (DE3) pTCCN mit Tyrosin; Signal 1, 2 und 3 - nicht identifizierte Substanzen.

Das Intermediat Kumarsäure und das Endprodukt Kumarylalkohol konnten mit der hier angewendeten Methode (Abschnitt 2.5.9.1, S. 33) getrennt und mit Hilfe von Kalibriergeraden (siehe Abbildung 11, S. 46), die mit den gekauften Reinsubstanzen aufgenommen wurden, quantifiziert werden. Im extrahierten Kulturüberstand, der nach der Inkubation von BL21 Gold (DE3) pTCCN mit

Tyrosin genommen wurde, wurden Signale identifiziert, die die gleiche Retentionszeit aufwiesen wie die Reinsubstanzen Kumarsäure und Kumarylalkohol. Allerdings konnten noch drei weitere Signale im Chromatogramm detektiert werden, die in der Kontrolle (Zellen im Reaktionspuffer ohne zugesetztes Tyrosin) nicht auftraten. Diese Signale sollten auch bestimmten Verbindungen zugeordnet werden. Das zugegebene Substrat Tyrosin kann mit Hilfe *E. coli* eigener Enzyme verstoffwechselt werden [Voet *et al.*, 2010]. Das Abbauprodukt von Tyrosin, 4-Hydroxyphenylpyruvat, konnte mittels HPLC als Peak 2 bei Minute 16 identifiziert werden (Abbildung 9, A). Diese Substanz erwies sich bei erhöhter Temperatur oder längerer Lagerung in dH₂O bei Raumtemperatur als instabil (Abschnitt 2.5.10, S. 34). Im Basischen zerfällt 4-Hydroxyphenylpyruvat zu 4-Hydroxybenzaldehyd und Oxalacetat [Pitt, 1962; Rose und Powell, 1963; Nierop Groot und de Bont, 1998]. Die Reinsubstanz 4-Hydroxybenzaldehyd wurde ebenfalls mittels HPLC analysiert. Aufgrund der bekannten Instabilität von 4-Hydroxyphenylpyruvat im Basischen wurde diese Substanz bei einem pH von 9 inkubiert und vermessen. Das dabei entstandene Zersetzungsprodukt wies dieselbe Retentionszeit wie die Reinsubstanz von 4-Hydroxybenzaldehyd auf. Zur Überprüfung des Absorptionsspektrums wurde das Zersetzungsprodukt von 4-Hydroxyphenylpyruvat mit Hilfe der chromatografischen Reinigung isoliert und einer spektroskopischen Analyse unterzogen. Das Zersetzungsprodukt zeigte das gleiche Absorptionsspektrum wie 4-Hydroxybenzaldehyd (Abbildung 9, B). Somit konnte das Signal 1 in Abbildung 8 als 4-Hydroxybenzaldehyd identifiziert werden.

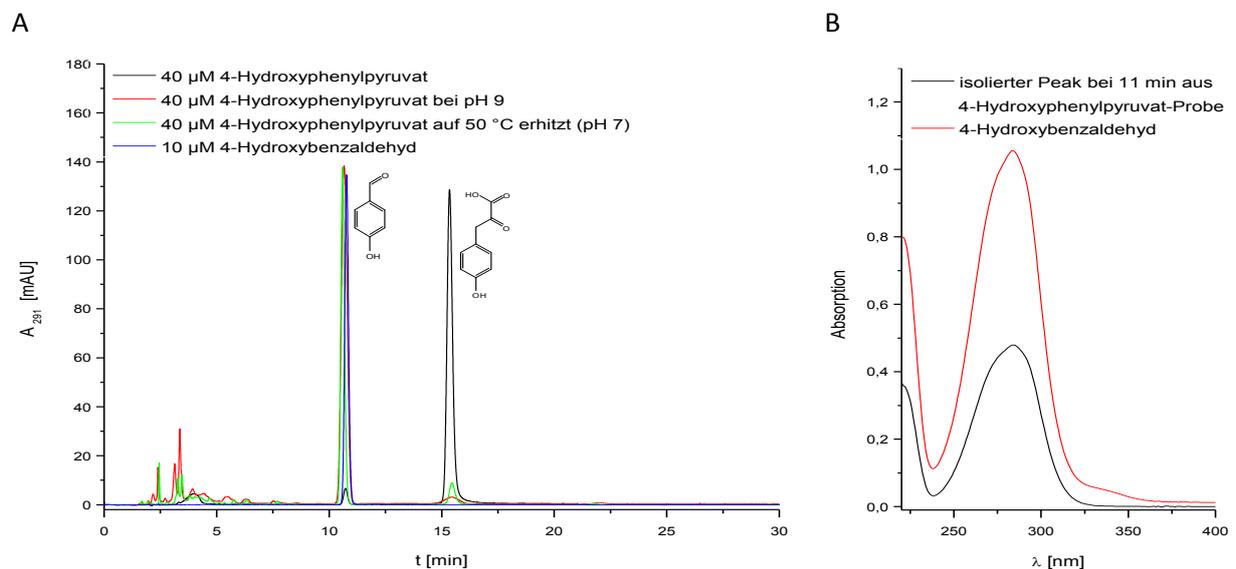


Abbildung 9: Untersuchungen zur Stabilität von 4-Hydroxyphenylpyruvat. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur. Die Substanzen waren im dH₂O gelöst. Der pH von 9 wurde mit NaOH eingestellt A - HPLC-Chromatogramme von 4-Hydroxyphenylpyruvat (bei verschiedenen Bedingungen) und 4-Hydroxybenzaldehyd, B - Vergleich der Absorptionsspektren des isolierten Peaks und 4-Hydroxybenzaldehyd.

Es wurde vermutet, dass das Signal 3 in Abbildung 8 dem Intermediat Kumaraldehyd entspricht. Da diese Substanz zu Beginn der Arbeiten nicht verfügbar war, wurde dieser Peak mit Hilfe der Chromatografie isoliert und massenspektrometrisch analysiert (Abbildung 10) (Abschnitt 2.5.14.2, S. 37). Mit Hilfe des Fragmentationenspektrums konnte eindeutig Kumaraldehyd identifiziert werden. Zum Ende der Arbeiten konnte Kumaraldehyd mit Hilfe einer Reinsubstanz quantifiziert werden.

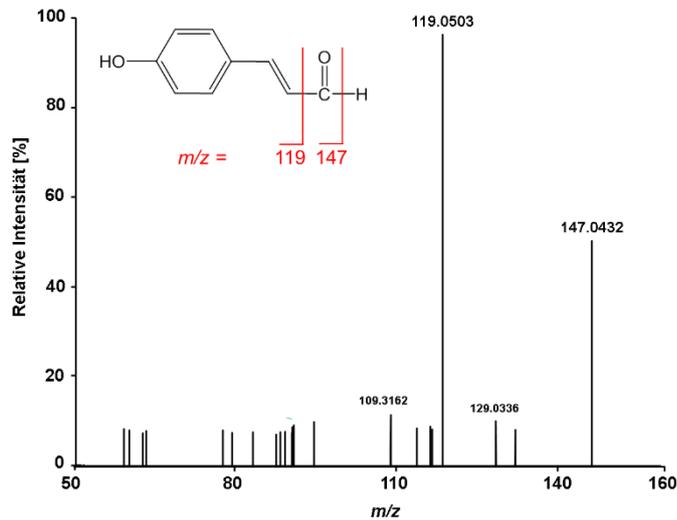


Abbildung 10: Fragmentationenspektrum des isolierten Peaks 3 aus Abbildung 8.

Bei der Inkubation von BL21 Gold (DE3) pTCCN können die Substanzen Kumarsäure, Kumaraldehyd, Kumarylalkohol, 4-Hydroxyphenylpyruvat und 4-Hydroxybenzaldehyd im Kulturüberstand auftreten. Diese können mit hier verwendeten HPLC-Methode eindeutig identifiziert werden. Um eine Bilanzierung zu ermöglichen und eine Vergleichbarkeit unter den Experimenten und der Literatur zu gewährleisten, sollte eine Quantifizierung dieser Substanzen mit Hilfe von Kalibriergeraden erfolgen. Es wurden verschiedene Konzentrationen der jeweiligen Reinsubstanz mittels HPLC vermessen und die erhaltenen Flächen der Signale gegen die eingesetzte Konzentration aufgetragen (Abbildung 11).

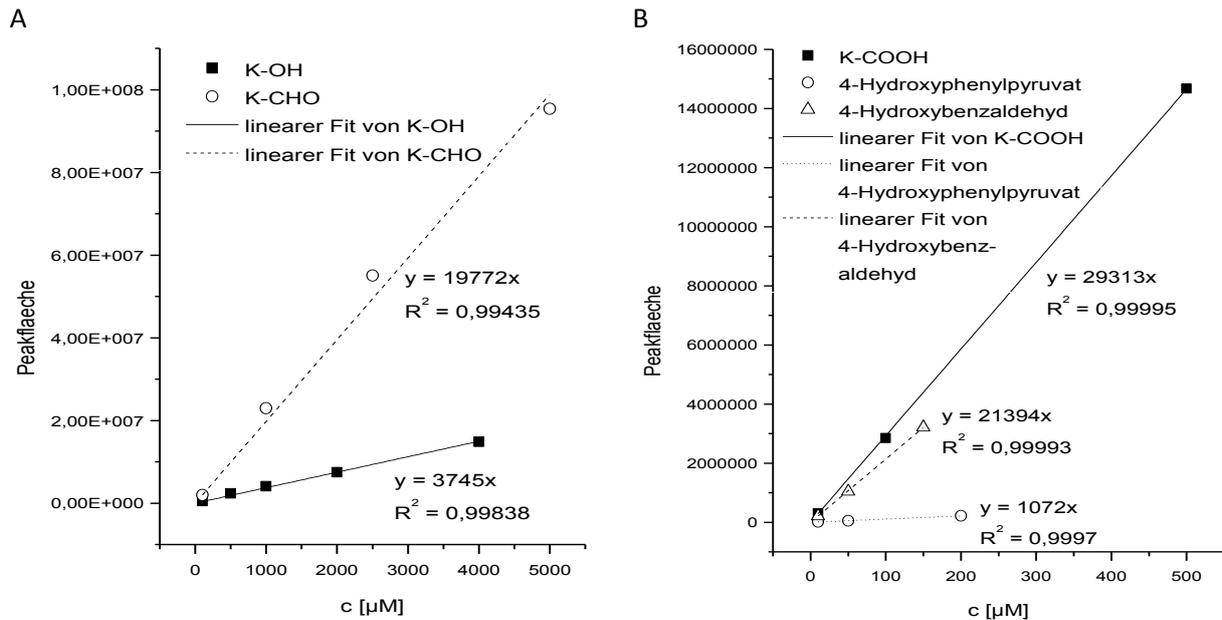


Abbildung 11: Kalibriergeraden der HPLC-Messung des Kulturüberstands nach Inkubation von BL21 Gold (DE3) pTCCN mit Tyrosin. Retentionszeiten: 4-Hydroxybenzaldehyd – 11 min; K-OH – 12 min; 4-Hydroxyphenylpyruvat – 16 min; K-COOH – 17,5 min; K-CHO – 26 min.

Die Kalibriergeraden von Kumarsäure, 4-Hydroxyphenylpyruvat und 4-Hydroxybenzaldehyd zeigen im gemessenen Bereich eine Linearität (10 – 200 bzw. 500 μM), was durch die an eins grenzenden Bestimmtheitsmaße deutlich wird. Die Kalibriergerade von 4-Hydroxyphenylpyruvat zeigte aufgrund der geringen Absorption der Substanz einen deutlich geringeren Anstieg, folgte aber trotzdem einem linearen Verlauf. Die Kalibriergeraden von Kumarylaldehyd und Kumarylalkohol zeigten im Bereich 50 – 5000 (Aldehyd) bzw. 50 – 4000 μM (Alkohol) eine Linearität. Mit Hilfe dieser Geraden war es folglich möglich, die entstehenden Phenylpropanoide im Kulturüberstand zu quantifizieren.

3.4 Vorversuche zur Expression und Aktivität von BL21 Gold (DE3) pTCCN

Zur Überprüfung der Funktionalität des Konstruktes pTCCN wurde das Plasmid (Abschnitt 2.4, S. 24) in den Stamm *E. coli* Gold (DE3) transformiert (Abschnitt 2.5.1, S. 27). Zum Vergleich wurde der Leervektor ebenfalls in *E. coli* Gold (DE3) transformiert und diente als Kontrolle. Die Expression im LB-Medium (Abschnitt 2.5.3, S. 29) bei 37 °C wurde durch IPTG-Zugabe induziert und die mit Hilfe der SDS-PAGE (Abschnitt 2.5.5, S. 30) analysierten Proteinbandenmuster einer Ganzzellprobe auf das Auftreten zusätzlicher Proteinbanden im Vergleich zur Kontrolle untersucht (Abbildung 12, A).

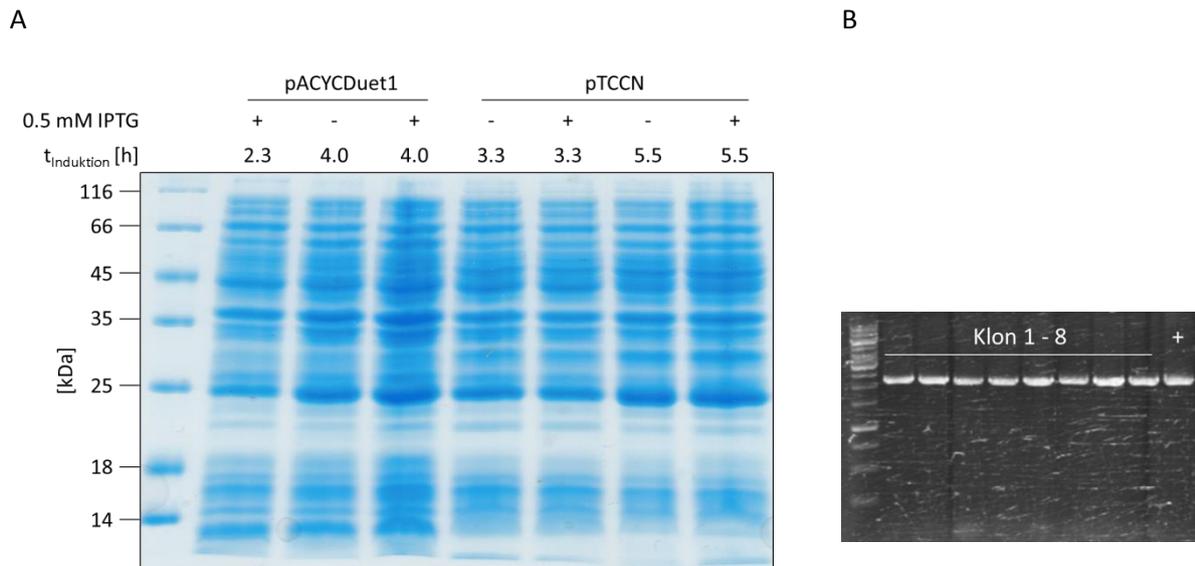


Abbildung 12: Kultivierung von BL21 Gold (DE3) pTCCN und BL21 Gold (DE3) pACYCDuet1 in LB-Medium bei 37 °C. Proben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion genommen ($t_{\text{Induktion}}$). A – 10 %-iges SDS-PA-Gel (1 mm) zur Untersuchung der Proteinzusammensetzung vor und nach der Induktion der Genexpression. B – 1 %-iges Agarosegel zur Untersuchung der Plasmidstabilität in BL21 Gold (DE3) pTCCN mittels Plasmid-spezifischer PCR.

Die Bandenmuster der Proben aus der Kultivierung von den Zellen, die den Leervektor (pACYCDuet1) trugen, und den Zellen, die das Plasmid pTCCN trugen, unterscheiden sich zu keinem der gewählten Zeitpunkte der Induktion. Demzufolge konnte keine eindeutige Überexpression der heterologen Gene im Bandenmuster BL21 Gold (DE3) pTCCN im Induktionszeitraum beobachtet werden (erwartete Molekulargewichte: TAL – 76 kDa, CAR – 128 kDa, CAD – 39 kDa, NPT – 24 kDa). Mögliche Erklärungen für die nicht detektierte Überexpression ist der Abbau der Genprodukte durch *E. coli*, ein Plasmidverlust oder eine schwache Genexpression. Während der Expression wurden Proben zu mehreren Zeitpunkten genommen. Bei einem Abbau würde man eventuell schwächer werdende Banden beobachten. Da dies bei dieser Expression nicht der Fall war, wurde der Plasmidverlust untersucht. Zunächst wurden mehrere Klone BL21 Gold (DE3) pTCCN im LB-Medium kultiviert. Eine Kolonie-PCR (Abschnitt 2.5.2, S. 28) der Klone zeigte, dass das Plasmid in der Zelle in dem gewählten Kultivierungszeitraum propagiert wurde, da in allen Kulturen das Plasmid-spezifische PCR-Produkt detektiert wurde (Abbildung 12, B). Da die Plasmidstabilität gewährleistet war, sollte ein anderes Medium, das zu einer besseren Genexpression führen sollte, untersucht werden. In Abbildung 13 ist die SDS-PAGE-Analyse einer Expression von pTCCN transformiert in BL21 Gold (DE3) im TB-Medium bei 37 °C dargestellt.

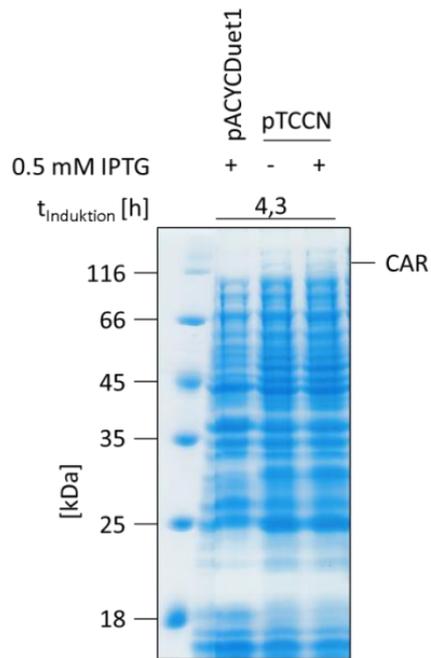


Abbildung 13: 10 %-iges SDS-PA-Gel zur Untersuchung der Genexpression in BL21 Gold (DE3) pTCCN nach Kultivierung im TB-Medium bei 37 °C.

Nach 0 und 4,3 h Induktionszeit ist ein leichtes Signal über der 116 kDa-Markerbande in der induzierten pTCCN-Probe zu erkennen. Dieses Signal ist in der Leervektor nicht vorhanden und kann demzufolge und aufgrund des Laufverhalten dem Signal der CAR (128 kDa) zugeordnet werden. Das Vorhandensein des heterologen Genprodukts CAR deutet auf eine funktionelle Expressionskaskade und eine erfolgreiche Expression in *E. coli*. Um eine höhere Proteinproduktion zu erzielen, wurde eine Expression aufgrund der langsameren Translation bei 16 °C und über 20 h durchgeführt (Abbildung 14). Zeitgleich wurde Tyrosin zur Messung der Aktivität mittels HPLC zugegeben.

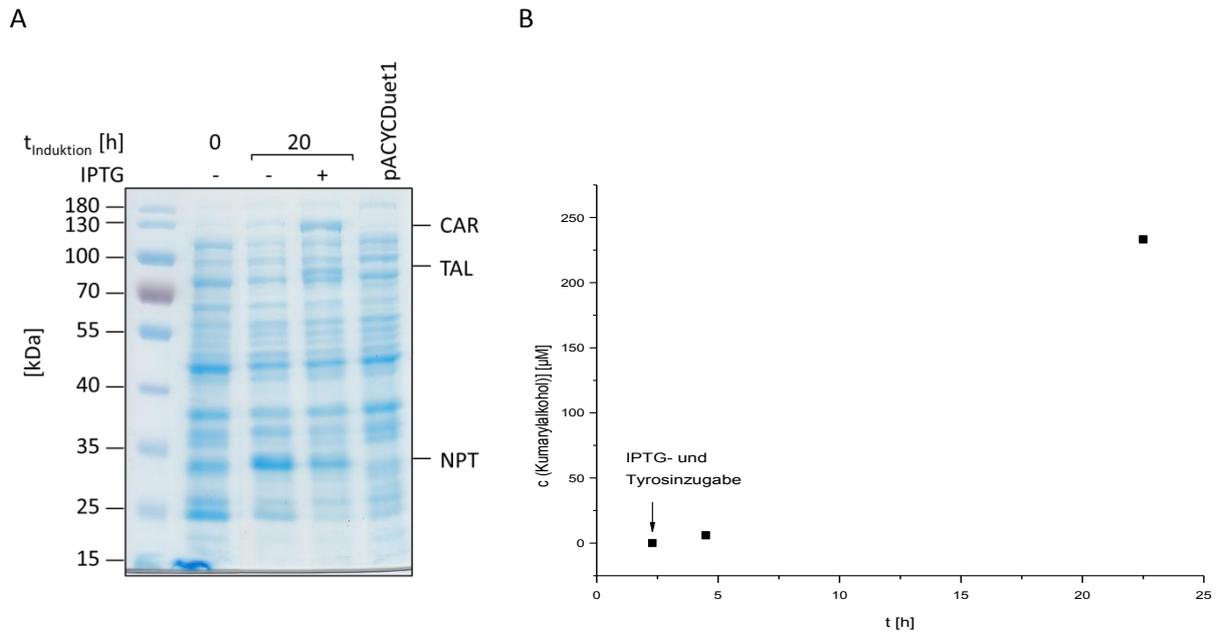


Abbildung 14: Anzucht von BL21 Gold (DE3) pTCCN in TB-Medium bei 37 und Genexpression bei 16 °C. A – 10 % iges SDS-PA-Gel (1 mm) zur Untersuchung der Proteinverteilung vor und nach der Induktion der Genexpression bei 16 °C. B – Bildung von Kumarylalkohol aus 500 μM Tyrosin während der Induktion der Genexpression. Leervektorkontrolle = BL21 Gold (DE3) pACYCDuet1.

Es ist eine deutliche Expression der heterologen Gene der CAR, TAL und NPT im SDS-PA-Gel zu erkennen, die CAD konnte hingegen nicht identifiziert werden (Abbildung 14, A). Auch ist eine Abnahme der Bande für die NPT zu erkennen, was auf einen Abbau der NPT deutet. Das Konstrukt konnte offensichtlich in *E. coli* propagiert und exprimiert werden. Voraussetzungen für eine gute Expression der hier verwendeten Gene sind allerdings ein geeignetes Expressionsmedium und niedrige Expressionstemperaturen. Um die Funktionalität aller vier Genprodukte zu testen, wurden in einem weiteren identischen Experiment ab dem Zeitpunkt der Induktion 500 μM Tyrosin zum Medium gegeben und mit den Zellen inkubiert (Abschnitt 2.5.6, S. 31). Mit der anschließenden HPLC-Analyse wurden die entstehenden Produkte im Kulturüberstand vermessen. In Abbildung 14 (B) ist die Kumarylalkoholbildung ab dem Zeitpunkt der Substratzugabe dargestellt. Der Kumarylalkohol stellte das Hauptprodukt dar, andere Stoffen waren nur gering konzentriert (niedriger μM -Bereich). Man sieht eine Zunahme des Endproduktes Kumarylalkohol bis zu 233 μM nach 22 h Wachstum. Die Bildung des Endproduktes der Reaktionskaskade deutet auf die Aktivität aller vier Genprodukte hin. Das Einbringen von pTCCN in BL21 Gold (DE3) generierte somit einen Stamm, der in der Lage war, das Monolignol Kumarylalkohol zu bilden.

3.5 Umsetzung von Tyrosin mit wachsenden Zellen im Minimalmedium

Da im Komplexmedium wie LB und TB auch Aminosäuren (unter anderem Tyrosin) enthalten sind, sollte die Aktivität der Genprodukte des Expressionskonstruktes im Minimalmedium unter Zusatz verschiedener Substanzen untersucht werden (Abschnitt 2.5.3, S. 29). Die Zusammenfassung ist in Tabelle 13 aufgeführt. Nach der Transformation ist der Stamm BL21 Gold (DE3) pTCCN weder auf Agarplatten bestehend aus Minimalmedium noch in Flüssigmedium gewachsen. Eine Adaption an das Minimalmedium schlug ebenfalls fehl. Die sechste Adaptationskultur trug das Plasmid pTCCN nicht mehr (Anhang 3, S. 115). Zellen, die verkürzte Expressionskonstrukte (Deletion der TAL- oder CAR-Gene aus pTCCN) trugen, zeigten hingegen ein Wachstum auf Minimalmedium. Das fehlende Wachstum von BL21 Gold (DE3) pTCCN konnte durch die Zugabe aromatischer Aminosäuren nicht aufgehoben werden. Eine putative Tyrosindepletion (oder auch Depletion anderer aromatischer Aminosäuren) durch die Aktivität der Genprodukte konnte dementsprechend ausgeschlossen werden. Auch die Zugabe verschiedener Vitamine erzielte keinen Erfolg, sodass deren intrazelluläre Bildung offensichtlich nicht limitierend für das Wachstum ist. Die konstitutive Coexpression des T7-Lysozyms, ein bekannter Inhibitor der T7-RNA-Polymerase [Studier, 1991], konnte das Wachstum ebenfalls nicht ermöglichen. Einzig die Zugabe von Peptiden oder die Gesamtheit der proteinogenen Aminosäuren bewirkte eine erfolgreiche Kultivierung. Es wurde geschlussfolgert, dass durch das Einfügen des Expressionskonstruktes und aufgrund einer basalen Expression in *E. coli* der Aminosäurestoffwechsel beeinflusst wurde und durch Aminosäurezugabe dieser Effekt kompensiert wurde. Die nachfolgenden Kultivierungen von BL21 Gold (DE3) pTCCN wurden in Gegenwart von synthetischer Aminosäurelösung durchgeführt.

Tabelle 13: Kultivierung verschiedener *E. coli*-Stämme transformiert mit verschiedenen Konstrukten im Minimalmedium mit unterschiedlichen Zusätzen.

Stamm	Exprimierte Gene	Zusätze zum Minimalmedium	Wachstum
BL21 Gold (DE3) pTCCN	TAL, CAR, CAD, NPT	-	✗
		Thiamin, Biotin und Folsäure	✗
		Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan	✗
		Trypton	✓
		Casaminosäuren	✓
		synthetische Aminosäurenlg.	✓
BL21 Gold (DE3) pACYCDuet1	-	-	✓
BL21 Gold (DE3) pCCN	CAR, CAD, NPT	-	✓
BL21 Gold (DE3) pTCN	TAL, CAR, NPT	-	✓
BL21 Gold (DE3) pTAL	TAL	-	✓
BL21 Gold (DE3) pCAR	CAR	-	✓
BL21 Gold (DE3) pCAD	CAD	-	✓
BL21 Gold (DE3) pLysT pTCCN	T7-Lysozym, TAL, CAR, CAD, NPT	-	✗
BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN	TAL, CAR, CAD, NPT	-	✗
		Tyrosin, Phenylalanin	✗
BL21 pTCCN	-	-	✗

Die Stämme, die ein verkürztes Konstrukt bzw. die Einzelgene trugen (Abschnitt 2.4, S. 24), konnten stabil im Minimalmedium kultiviert werden. Für die Herstellung von Kumarylalkohol im Minimalmedium bot sich deswegen die Cokultivierung von BL21 Gold (DE3) pCCN und BL21 Gold (DE3) pTAL an. Die Anzucht erfolgte getrennt bei 37 °C in Minimalmedium, gefolgt von der Expression bei 16 °C für 16 h, da sich niedrige Expressionstemperaturen in späteren Experimenten als vorteilhaft für die Produktbildung erwiesen (Abschnitt 3.6.1, S. 54). Anschließend wurden beide Kulturen vereint und mit 2,5 mM Tyrosin und einer Glukosezugabe von 4 g/L zur intrazellulären Cofaktorregenerierung bei 37 °C inkubiert. Die zeitabhängige Bildung von Kumarylalkohol wurde mittels HPLC analysiert (Abbildung 15). Neben großen Mengen an Kumarsäure, die durch eine deutlich höhere Zellzahl an BL21 Gold (DE3) pTAL als BL21 Gold (DE3) pCCN erklärbar sind, wurden auch knapp 500 μ M Kumarylalkohol generiert. Der Kumaraldehyd akkumulierte nur in geringen Mengen. Die Bildung des Endproduktes weist auf eine erfolgreiche Cokultivierung hin.

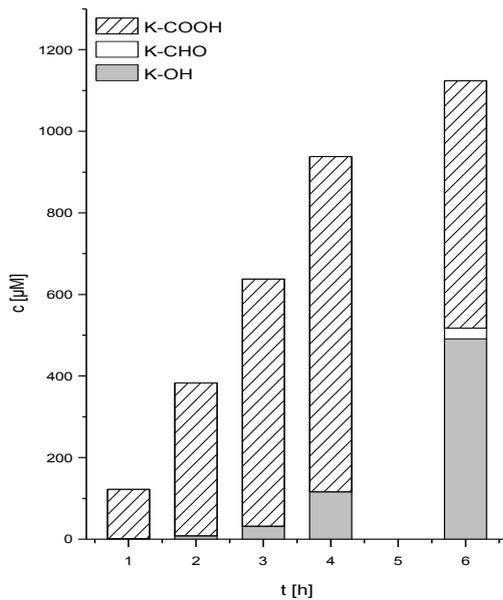


Abbildung 15: Bildung von Kumarylalcohol in einer Cokultur von BL21 Gold (DE3) pCCN (OD = 1) und BL21 Gold (DE3) pTAL (OD = 5) im Minimalmedium mit 2,5 mM Tyrosin bei 37 °C.

3.6 Etablierung von ruhenden Zellen zur Bildung von Kumarylalcohol

Aufgrund des mangelnden Wachstums von BL21 Gold (DE3) pTCCN im Minimalmedium sollte untersucht werden, ob ruhende Zellen zur Umwandlung von Tyrosin zu Kumarylalcohol in der Lage sind. Dazu erfolgte die Anzucht und Genexpression in wachsenden Zellen im Komplexmedium und die Umwandlung von Tyrosin im definierten Medium, das keine Stickstoffquelle enthielt. Dadurch waren die Zellen in der Lage, die zur Verfügung gestellte Energie anstatt ins Wachstum komplett in die Regeneration von Cofaktoren (NADPH/H⁺, ATP) [Julsing *et al.*, 2012], die für die Transformation zu Kumarylalcohol notwendig sind, zu investieren. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erlangen, sollten geeignete Reaktionsparameter für die ruhenden Zellen gefunden werden. In den folgenden Abschnitten wurden hierfür unterschiedliche Bedingungen untersucht, wie die Verwendung von Glycerin beim Einfrieren der ruhenden Zellen, Reaktion unter Sauerstoffausschluss und Expressions- und Reaktionstemperaturen (siehe Abschnitt 2.5.6). Die folgenden Experimente wurden im Phosphatpuffer bei pH 7,5 in Kulturröhrchen durchgeführt.

Zunächst sollte überprüft werden, welche Lagerungsbedingungen geeignet sind, um die Aktivität der wachsenden Zellen aufrechtzuerhalten. Hierfür wurde untersucht, ob die Zugabe von Glycerin, das den Aufschluss der Zellen beim Einfrier-/Auftauvorgang verhindern soll, Einfluss auf die Gesamtzellaktivität hat. Die rekombinanten Zellen des Stamms BL21 Gold (DE3) pTCCN, die nach IPTG-Zugabe 6 h bei 24 °C gewachsen waren, wurden nach der Zellernte mit bzw. ohne 20 % Glycerin im Phosphatpuffer eingefroren (Abschnitt 2.5.6, S. 31). Anschließend wurde die Aktivität untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 16 (A) dargestellt.

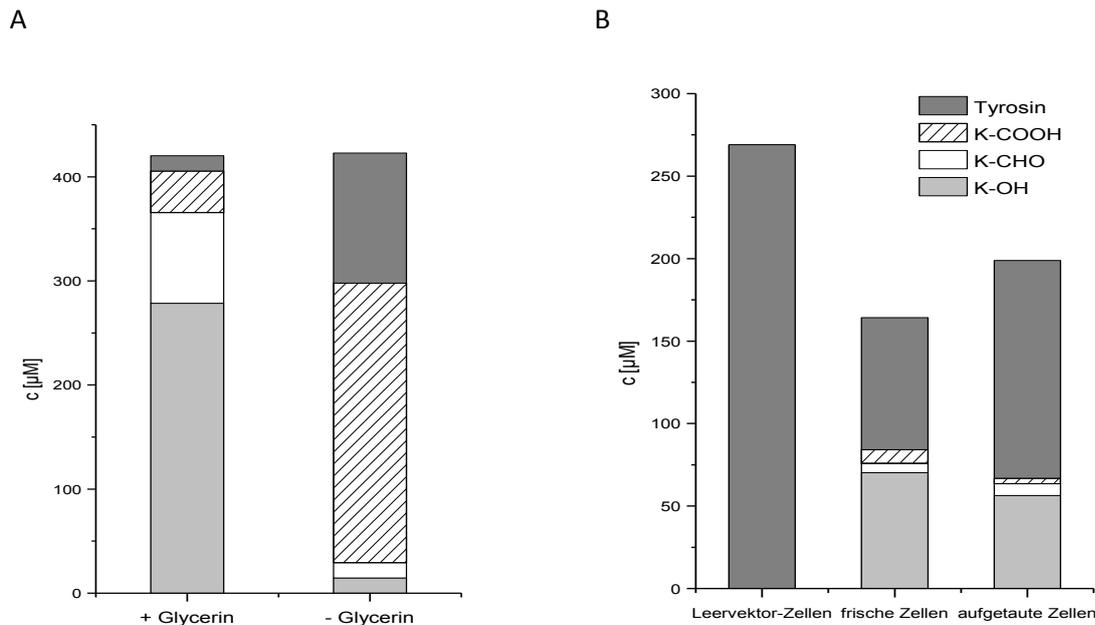


Abbildung 16: Herstellung ruhender, rekombinanter Zellen zur Herstellung von Kumarylalkohol. A – Vergleich der Aktivität der Zellen, die mit bzw. ohne 20 % Glycerin eingefroren wurden, $T_{\text{Expression}} = 24\text{ °C}$, $T_{\text{Reaktion}} = 37\text{ °C}$, $t_{\text{Reaktion}} = 1\text{ h}$. B – Vergleich der Gesamtzellaktivität frischer und aufgetauter Zellen (Lagerung in 20 % Glycerin) und zwischen Zellen, die die Genprodukte für die Kumarylalkoholproduktion nicht enthielten (Leervektor-Zellen), $T_{\text{Expression}} = 16\text{ °C}$, $T_{\text{Reaktion}} = 37\text{ °C}$, $t_{\text{Reaktion}} = 1\text{ h}$, $c_{\text{Start}}(\text{Tyrosin}) = 300\text{ }\mu\text{M}$.

Wenn die Zellen ohne Glycerin eingefroren werden, verändert sich die Produktverteilung. Während bei den Zellen, die mit Glycerin eingefroren wurden, das Endprodukt Kumarylalkohol das Hauptprodukt darstellt, nimmt bei den Zellen, die ohne Glycerin eingefroren wurden, Kumarsäure den größten Teil der Gesamtmenge aller Produkte ein. Das lässt darauf schließen, dass in diesen Zellen vornehmlich der erste Schritt der Reaktionskaskade, die Desaminierung von Tyrosin zu Kumarsäure, durchlaufen wird. Die Reduktion der Kumarsäure zum Kumaraldehyd scheint limitiert zu sein. Das spricht dafür, dass zumindest die CAR beim Einfrieren ohne Glycerin deutlich an Aktivität verliert. Die folgenden Experimente wurden demzufolge mit Zellen durchgeführt, die mit Glycerin eingefroren wurden. Ein Vergleich mit BL21 Gold (DE3) pACYCDuet1 (Leervektor-Zellen tragen keine Gene für die TAL, CAR, CAD oder NPT) zeigt, dass die Produkte Kumarsäure, Kumaraldehyd und Kumarylalkohol nur durch die Aktivität der heterologen Genprodukte TAL, CAR und CAD im Expressionsstamm gebildet werden (Abbildung 16, B). Anschließend sollte untersucht werden, welchen Einfluss der Einfrier-/Auftauvorgang hat (Abbildung 16, B). Die Konzentration der Kumarylintermediate und deren Verteilung nach der Reaktion mit frischen BL21 Gold (DE3) pTCCN liegen in demselben Bereich wie nach der Reaktion mit den aufgetauten Zellen (74 bzw. 62 μM). Es konnte dementsprechend kein drastischer negativer Effekt des Einfrier-/Auftau-Zyklus auf die Aktivität der Zellen festgestellt werden. Die unvollständige Bilanzierung deutete auf eine

konkurrierende Nebenreaktion hin. Die Leervektorkontrolle zeigt einen geringen Abbau an Tyrosin (ca. 30 μM nach 1 h). Da in Abschnitt 3.2.1 (S. 42) gezeigt wurde, dass weder der Kumarylalkohol noch die Kumarsäure durch *E. coli* abgebaut werden, geht wahrscheinlich der Kumaraldehyd Reaktionen mit Metaboliten des Stoffwechsele von *E. coli* ein.

Aufgrund einer potentiellen Reaktion der oxidationsanfälligen Produkte mit reaktiven Sauerstoffspezies sollte überprüft werden, ob eine anaerobe Kultivierung zur höheren Produktkonzentrationen führt (Abbildung 17). Hierbei wurde ein Reaktionsansatz der ruhenden Zellen mit Stickstoff begast und luftdicht verschlossen (Abschnitt 2.5.6, S. 31). Anschließend fand die HPLC-Analyse des Kulturüberstands über die Zeit statt.

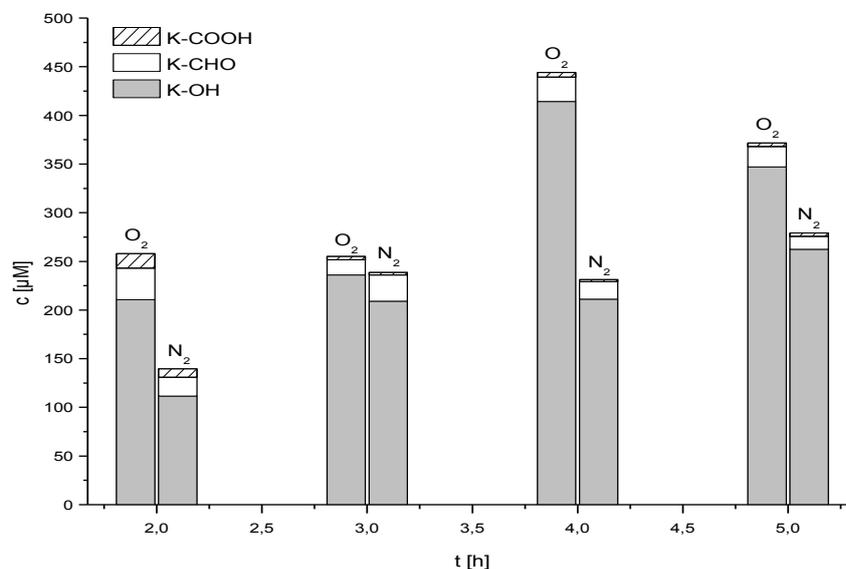


Abbildung 17: Reaktion ruhender Zellen von BL21 Gold (DE3) pTCCN unter aeroben (O₂) und anaeroben (N₂) Bedingungen in Phosphatpuffer mit 500 μM Tyrosin bei 37 °C.

Abbildung 17 zeigt die Produktverteilung im Kulturüberstand der aeroben und anaeroben Kultivierung. Zu allen Zeitpunkten war die Kumarylalkoholkonzentration unter aeroben Bedingungen höher als die Konzentration unter anaeroben Bedingungen. Es wird ersichtlich, dass die anaerobe Inkubation keinen Vorteil gegenüber der aeroben bringt. Eine mögliche Erklärung ist in der Diskussion beschrieben (Abschnitt **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**, S. **Fehler! Textmarke nicht definiert.**).

3.6.1 Einfluss der Expressions- und Reaktionstemperatur auf die Kumarylalkoholbildung

Nach dem die Probenaufbereitung für die HPLC-Analyse, die Lagerungsbedingungen der Zellen und die aeroben Bedingungen während der Tyrosinumwandlung geklärt waren, wurden unterschiedliche Expressions- und Reaktionstemperaturen untersucht (Abschnitt 2.5.6). Da das zugesetzte Tyrosin

nicht vollständig zum Kumarylalkohol umgewandelt wurde, wurden die Reaktionsbedingungen optimiert, um einen Vollumsatz des Substrats zu erhalten. Die Genexpression im Stamm BL21 Gold (DE3) pTCCN wurde bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Anschließend wurden die unterschiedlich exprimierenden Zellen mit Tyrosin wiederum bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Das PA-Gel (Abbildung 18, A) zeigt eine Überexpression der CAR, TAL und NPT. Dabei wurde kein Unterschied in der Bandenintensität der analysierten Ganzzellproben aus den Expressionstests bei 16, 24 und 37 °C über 24, 6 bzw. 3 h festgestellt. Das bedeutet, dass die untersuchten Expressionszeiträume so gewählt worden sind, dass eine ähnlich gute Synthese der rekombinanten Proteine sichergestellt war. Um herauszufinden, ob einzelne Komponenten der Synthesekaskade temperaursensitiv exprimiert werden und wenn ja, welche Temperatur zur aktivsten Kaskade führt, wurde BL21 (DE3) pTCCN nach der jeweiligen Induktion der Expression bei 16, 24 und 37 °C einem Ganzzell-Umsatzexperiment unterzogen (Abschnitt 2.5.6, S. 31). Dabei wurde jeweils eine OD von 13 im Phosphatpuffer eingestellt und der Umsatz von 1 mM Tyrosin nach 1 h Inkubation mittels HPLC vermessen (Abbildung 18, B).

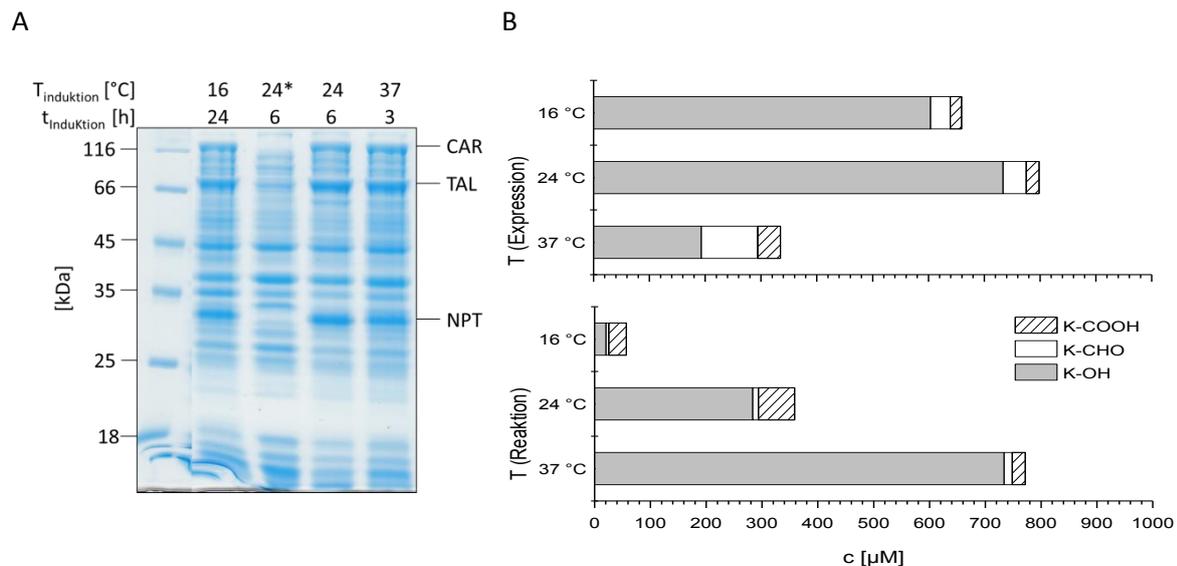


Abbildung 18: Untersuchungen zur Expressions- und Reaktionstemperatur zur Tyrosinumwandlung (1000 µM) in ruhenden Zellen von BL21 Gold (DE3) pTCCN. A - 10 %-iges SDS-PA-Gel zur Untersuchung der Genexpression in BL21 Gold (DE3) nach Anzucht im TB-Medium bei 37 °C und Genexpression bei verschiedenen Temperaturen, * Kontrolle BL21 Gold (DE3) pACYCDuet1. B Umwandlung von Tyrosin zu Kumarylalkohol, oben - Reaktion bei 37 °C für 1 h, unten - Expression bei 24 °C für 6 h.

Der Abbildung 18 (B) kann man entnehmen, dass die niedrigen Expressionstemperaturen (24 und 16 °C) höhere Produktkonzentrationen erzielten. Während der Reaktion hingegen sollte die höhere Temperatur von 37 °C gewählt werden, da in diesem Reaktionsansatz die höchste Produktkonzentration erzielt wurde. Die nachfolgenden Experimente wurden mit Zellen, die bei 24 °C exprimierten, mit einer Reaktionstemperatur von 37 °C durchgeführt. In allen Reaktionsansätzen ist

zu beobachten, dass vornehmlich das Endprodukt Kumarylalkohol gebildet wurde und die Intermediate Kumarsäure und –aldehyd in relativ geringen Mengen akkumulierten. Diese Verteilung der möglichen Produkte spricht für eine geeignete Expression der einzelnen Gene, um die Reaktion zum Endprodukt zu leiten. Bereits nach 1 h wurden bis zu 74 % des eingesetzten Tyrosins zum Kumarylalkohol umgewandelt. Dieser Umsatz weist auf die Effektivität der Reaktionskaskade hin.

Um die Reaktion besser kontrollieren zu können und eventuell eine Vollumsatz zu erzielen, wurde nun ein Rührreaktor unter kontrollierten pH- und Belüftungsbedingungen verwendet und der Reaktionsansatz gleichzeitig von 4 auf 400 mL hochskaliert (Abbildung 19) (Abschnitt 2.5.7, S. 32). Die Produkt-Zeit-Kurve zeigt einen hyperbolen Verlauf mit einem Maximalwert von 1 mM Kumarylalkohol. Da die Substratkonzentration 1 mM betrug, konnte der Komplettumsatz von Tyrosin zur Kumarylalkohol nach ca. 3 h gezeigt werden. Der Komplettumsatz weist auf eine hohe Effektivität der Reaktionskaskade unter kontrollierten pH- und Belüftungsbedingungen hin. Die Maßstabsvergrößerung um das 100-fache wurde damit nachgewiesen. Die Abnahme der OD-Werte während der Reaktion deutet auf ein Absterben der Zellen hin.

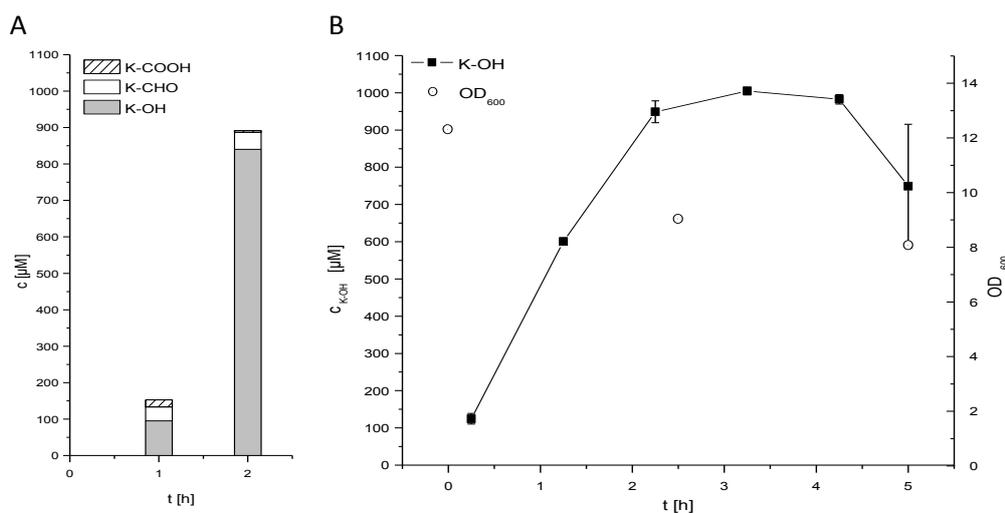


Abbildung 19: Kumarylalkoholbildung in BL21 Gold (DE3) pTCCN in verschiedenen Maßstäben. Expression bei 24 °C für 6 h, Reaktion bei 37 °C in 100 mM Phosphatpuffer (pH = konstant = 7,5), 1 mM Tyrosin. A – 4 mL-Maßstab in 12 mL-Kulturröhrchen, OD = 12,5; B – 400 mL-Maßstab im Rührreaktor, OD = 12,3; kontrollierte pH- (auf 7,5 eingestellt mit NaOH bzw. H₃PO₄) und Belüftungsbedingungen (1000 rpm, 1 L Druckluft / min).

3.7 Kumarylalkoholbildung mit BL21 Gold D(E3) pTCCN

3.7.1 Einfluss von Tyrosin- und Glukosezugabe auf die Kumarylalkoholbildung

Es wurde zunächst geprüft, ob höhere Produktkonzentrationen durch Zugabe höherer Substratmengen erlangt werden können (Abbildung 20, oben) (Abschnitt 2.5.7, S. 32). Hierzu wurde die Reaktion im Bioreaktor mit ruhenden Zellen BL21 Gold (DE3) pTCCN im Phosphatpuffer unter stündlicher Tyrosinzugabe (aufgrund der geringen Löslichkeit) durchgeführt und mittels HPLC

verfolgt. Außerdem wurde parallel ein identischer Versuch unter Glukosezugabe für die Cofaktorregeneration durchgeführt.

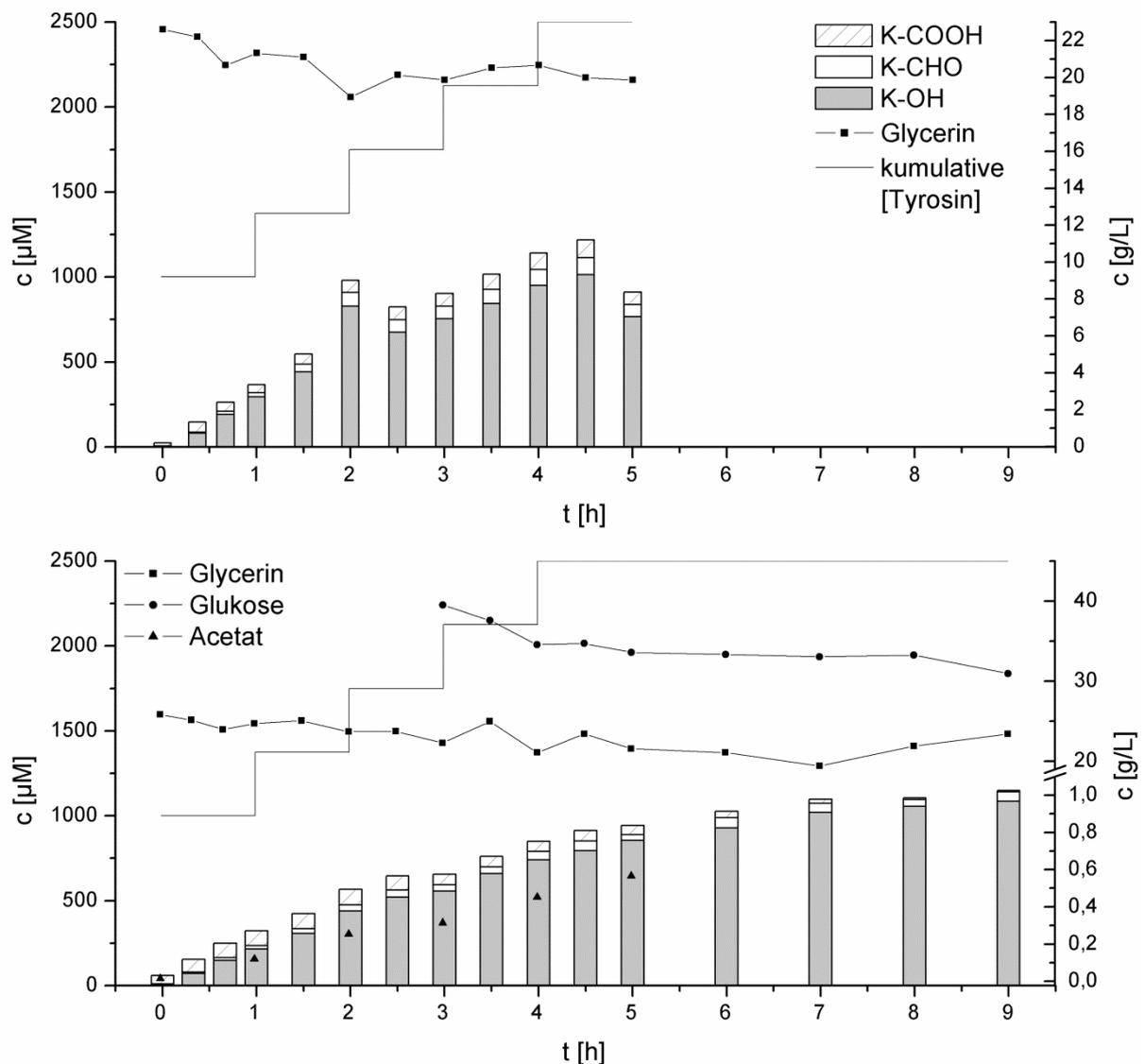


Abbildung 20: Synthese von Kumarylalkohol in ruhenden BL21 Gold (DE3) pTCCN-Zellen im Rührreaktor mit einer Startkonzentration von 1 mM Tyrosin. A – stündliche Zugabe von Tyrosin (je 300 μM), B – stündliche Zugabe von Tyrosin und Zugabe von 4 % Glukose nach 3 h, pH = 7,5 (eingestellt mit NaOH).

Die maximale Kumarylalkoholkonzentration in diesem Reaktionsansatz betrug 1 mM und übersteigt somit nicht die Konzentration, die ohne stündliche Substratzugabe erreicht wurde. Die Glycerinkonzentration sank währenddessen nur gering von 23 auf 20 g/L. Da die zusätzliche Zugabe an Tyrosin trotz genügend Glycerin im Medium keine höheren Kumarylalkoholkonzentration erzielte, wurde vermutet, dass während des Metabolismus von Glycerin es zu einem Engpass an NADPH/H^+ kommen kann [Yao *et al.*, 2016]. Deswegen wurde Glukose als eine zusätzliche Kohlenstoffquelle für die Cofaktorregenerierung untersucht (Abbildung 20, unten). Dieses Experiment wurde außerdem über einen längeren Zeitraum beobachtet. Allerdings konnte keine Erhöhung der

Produktkonzentration nach 5 h Reaktion beobachtet werden. Der Verlauf der Produktbildung ist dem vorhergehenden Experiment sehr ähnlich. Da eine Abnahme der Glukosekonzentration beobachtet wurde, ist es wahrscheinlich, dass der Metabolismus von *E. coli* aktiv ist und Cofaktoren wie ATP und NADPH/H⁺, die an die Verstoffwechslung der Kohlenstoffquelle gebunden sind, gebildet wurden. Bei diesem Experiment ist es wichtig zu erwähnen, dass es mit einer anderen Charge an Biomasse durchgeführt wurde als alle anderen Experimente. In dieser Charge war die Expression deutlich schlechter als in allen anderen Experimenten und eine vergleichsweise starke Basalexpression war zu beobachten (siehe Anhang 4, S. 116). Das hatte vermutlich zur Folge, dass das Erreichen der maximalen Kumarylalkoholkonzentration länger dauerte (1,1 mM nach 9 h Inkubation verglichen zu 1 mM nach ca. 3 h in Abbildung 19). Möglicherweise waren diese Zellen bereits durch die Präsenz toxischer Substanzen (Kumarylalkoholbildung zu einem frühen Zeitpunkt der Kultivierung aufgrund der Basalexpression) einer starken metabolischen Last ausgesetzt (siehe Abschnitt 4.10, S. 97 zur Toxizität von Kumarylalkohol). In anderen vergleichbaren Experimenten (siehe Abbildung 21, 59) wird eine maximale Produktkonzentration von 1,5 mM erzielt. Es wird vermutet, dass dies auf die bessere Fitness der Zellen durch eine bessere Expressionskontrolle zurückzuführen ist. Nichtsdestotrotz sind die obigen beiden Experimente (mit und ohne Glukosezugabe) miteinander vergleichbar, da es sich hier um die gleiche Biomasse handelt. Beide Reaktionsansätze zeigen eine Produktstagnation, sodass das Fehlen einer Energiequelle zur Cofaktorregeneration als Ursache ausgeschlossen werden kann. Ein anderer kritischer Punkt ist die Tyrosinmessung mit dem OPA-Reagenz (Abschnitt 2.5.9.2, S. 33). Zu diesem Zeitpunkt war diese Messung nicht optimiert und stark störanfällig, sodass eine Quantifizierung des Tyrosins bei diesem Experiment nur begrenzt möglich war. Da stündlich Tyrosin zugegeben wurde und zu den Zeitpunkten der Zugabe auch eine deutliche Steigerung des Tyrosinsignals in der HPLC zu verzeichnen war, wird davon ausgegangen, dass genügend Tyrosin vorhanden war. Da zu jedem Zeitpunkt sowohl Glycerin und Glukose, vermutlich auch Tyrosin, im Medium vorhanden waren, wurde eine Cofaktorlimitierung der CAR- und CAD-Reaktion als unwahrscheinlich erachtet. Außerdem wurde keine Akkumulation des Kumaraldehyds, das Produkt der ATP- und NADPH/H⁺-abhängigen CAR-Reaktion, beobachtet, was ebenfalls gegen eine Cofaktorlimitierung spricht. Allerdings wurde eine Zunahme von Acetat, das toxisch für *E. coli* sein kann, beobachtet [Eiteman und Altman, 2006]. Aufgrund der zunehmenden Acetatkonzentration wurde in den folgenden Experimenten Glukose in geringeren Mengen zugegeben.

3.7.2 Einfluss des Reaktionsmediums auf die Kumarylalkoholbildung

Im folgenden Experiment sollte geprüft werden, ob das Fehlen von für den Metabolismus von *E. coli* essenzielle Stoffe wie zum Beispiel Magnesiumionen, Calciumionen oder Spurenelemente im Reaktionsmedium im Laufe der Reaktion einen negativen Effekt auf die Reaktionskaskade hat und somit die Produktbildung limitiert. Hierfür wurde BL21 Gold (DE3) pTCCN in drei unterschiedlichen

Reaktionsmedien im Bioreaktor mit Tyrosin inkubiert und chromatografisch untersucht (Abbildung 21) (Abschnitt 2.5.7, S. 32).

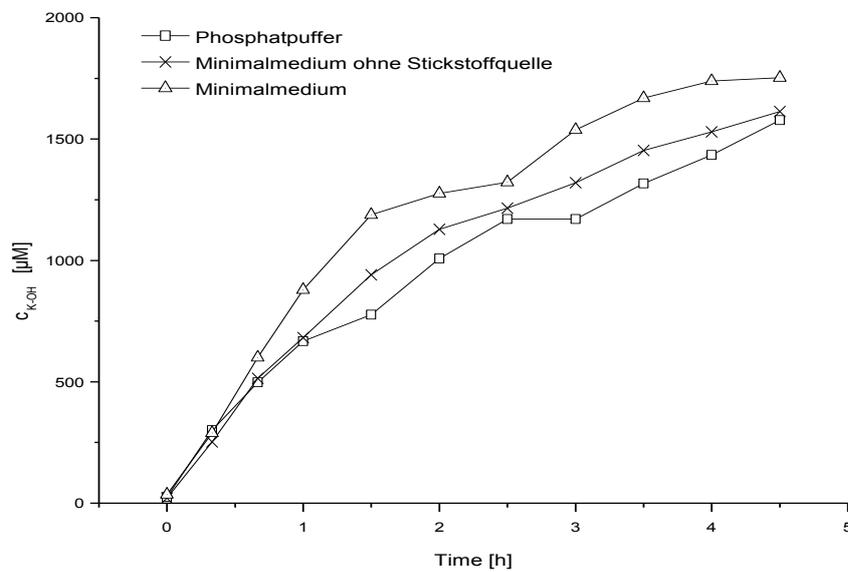


Abbildung 21: Kumarylalcoholbildung in BL21 Gold (DE3) pTCCN in verschiedenen Reaktionsmedien in Gegenwart von 2,5 mM Tyrosin.

Alle drei Progresskurven nehmen einen ähnlichen Verlauf. Die beiden Experimente mit den ruhenden Zellen (Abbildung 21, Phosphatpuffer und Minimalmedium ohne Stickstoffquelle) zeigen eine Kumarylalcoholkonzentration von 1,5 mM. Die Umwandlung von Tyrosin im kompletten Minimalmedium erzielte eine leicht höhere Produktkonzentration von 1,8 mM. Nichtsdestotrotz konnte keine weitere Erhöhung der Produktkonzentration während des Reaktionszeitraums trotz Vorhandensein des Substrats erreicht werden. Weniger das Fehlen bestimmter Metalle als die Anwesenheit einer Stickstoffquelle haben offensichtlich einen Einfluss auf die Reaktionskaskade. Allerdings ist dieser Effekt nur gering und verhindert nicht die Stagnation der Produktbildung. Die folgenden Experimente wurden im kompletten Minimalmedium durchgeführt.

3.7.3 Mediumwechsel

Da die sinkende Kumarylalcoholbildungsrate im Laufe der Reaktion nicht drastisch durch das Minimalmedium verbessert werden konnte, wurde vermutet, dass sich toxische Verbindungen im Medium ansammeln, die die Umwandlung von Tyrosin inhibieren. Um die Hypothese zu prüfen, wurde ein Experiment durchgeführt, bei dem die Kumarylalcoholbildungsrate nach 2,5 h im frischen oder verbrauchten Reaktionsmedium mittels HPLC beobachtet wurde (Abbildung 22) (Abschnitt 2.5.7, S. 32).

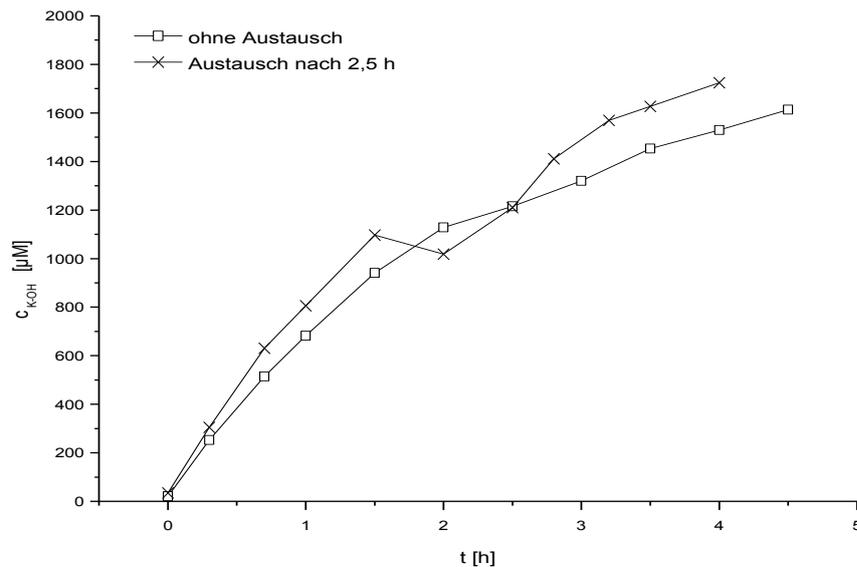


Abbildung 22: Vergleich der Kumarylalcoholbildung in BL21 Gold (DE3) pTCCN im gleichbleibenden und frischem Phosphatpuffer (pH 7,5) in Gegenwart von 2,5 mM Tyrosin, $OD_{\text{Start}} = 8,3$.

Die Produktbildung nimmt unabhängig vom Austausch des Mediums den gleichen Verlauf. Daraus folgt, dass die Limitierung der Produktbildung nicht durch toxische Verbindungen, die sich während der Reaktion bilden können, begründet ist.

3.7.4 Bestimmung der Löslichkeit und Aktivität der rekombinanten Proteine im Zellextrakt

Die Zugaben von mehr Substrat und Glukose, das die mutmaßliche Regeneration der Cofaktoren erlaubt, verursachten keine höheren Produktkonzentrationen und waren somit nicht limitierend für die Produktbildung. Auch das Minimalmedium und das Entfernen eventuell toxischer Verbindungen zeigten keine drastischen Veränderungen in der Progresskurve. Da die Bedingungen für den Umsatz von Tyrosin zu Kumarylalcohol in *E. coli* mit ausreichend Substrat für die Umwandlung und genügend Kohlenstoffquelle für das Aufrechterhalten des Cofaktorregeneration gegeben waren, sollte die Aktivität der rekombinanten Enzyme über den Reaktionsverlauf überprüft werden. Zunächst wurde bestimmt, ob die Enzyme während der Reaktion abgebaut werden oder aggregieren. Hierfür wurde zu Beginn und zum Ende der Ganzzellreaktion von BL21 Gold (DE3) pTCCN eine Probe entnommen und mittels SDS-PAGE der putative Proteinabbau untersucht (Abbildung 23).

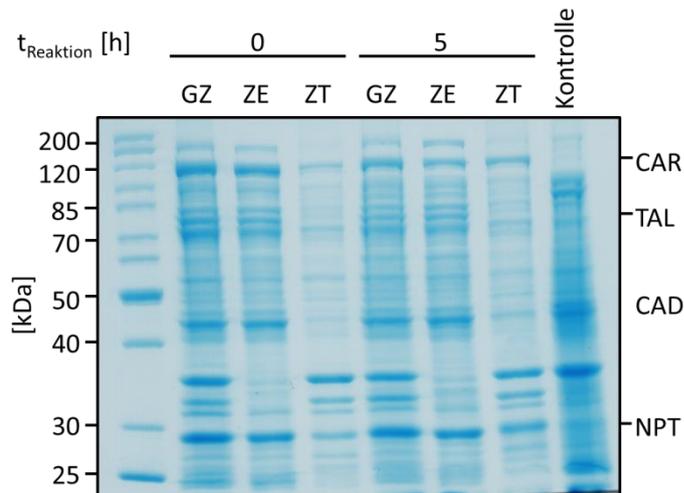


Abbildung 23: 10 %-iges SDS-PA-Gel zur Untersuchung des Proteinabbaus und Aggregation in BL21 Gold (DE3) pTCCN vor und nach Inkubation in Minimalmedium mit 2,5 mM Tyrosin bei 37 °C. GZ – gesamtes Zellysate, ZE – löslicher Zellextrakt, ZT – unlösliche Zelltrümmer (Zentrifugation bei 100.000 g für 1 h), Kontrolle – BL21 Gold (DE3) pACYCDuet1 (nach 0 h Reaktionszeit).

Die Abbildung 23 zeigt Proteinproben aus dem Zellysate und der löslichen und unlöslichen Fraktion aus diesem zu Beginn und zum Ende der Inkubation von BL21 Gold (DE3) pTCCN mit Tyrosin. Der Vergleich zeigt nach 5 h Reaktion eine geringere Intensität des Proteinbandenmusters in den Gesamtzellproben als zu Beginn. Die leicht geringeren Bandenstärken der Zielproteine CAR und TAL können durch eine geringere Konzentration des Gesamtproteins in der 5 h-Probe erklärt werden. Eine leichte Abnahme der Signale in der löslichen Fraktion nach 5 h korreliert mit einer schwachen Zunahme der Signale in der unlöslichen Fraktion. Daraus kann auf eine Aggregation der CAR und der TAL nach 5 h Reaktion geschlossen werden. Nichtsdestotrotz sind noch erhebliche Mengen der rekombinanten Proteine in der löslichen Zellextraktprobe zu erkennen. Die Abnahme der Produktivität von BL21 Gold (DE3) auf fast 0 % nach 5 h Reaktion ist vermutlich keine Folge der Aggregation oder der Degradation der rekombinanten Enzyme. Um zu untersuchen, welchen Effekt die Aggregation auf die Aktivität hat, wurden Aktivitätsmessungen im Zellextrakt durchgeführt (Abbildung 24) Abschnitt 2.5.12, S. 35).

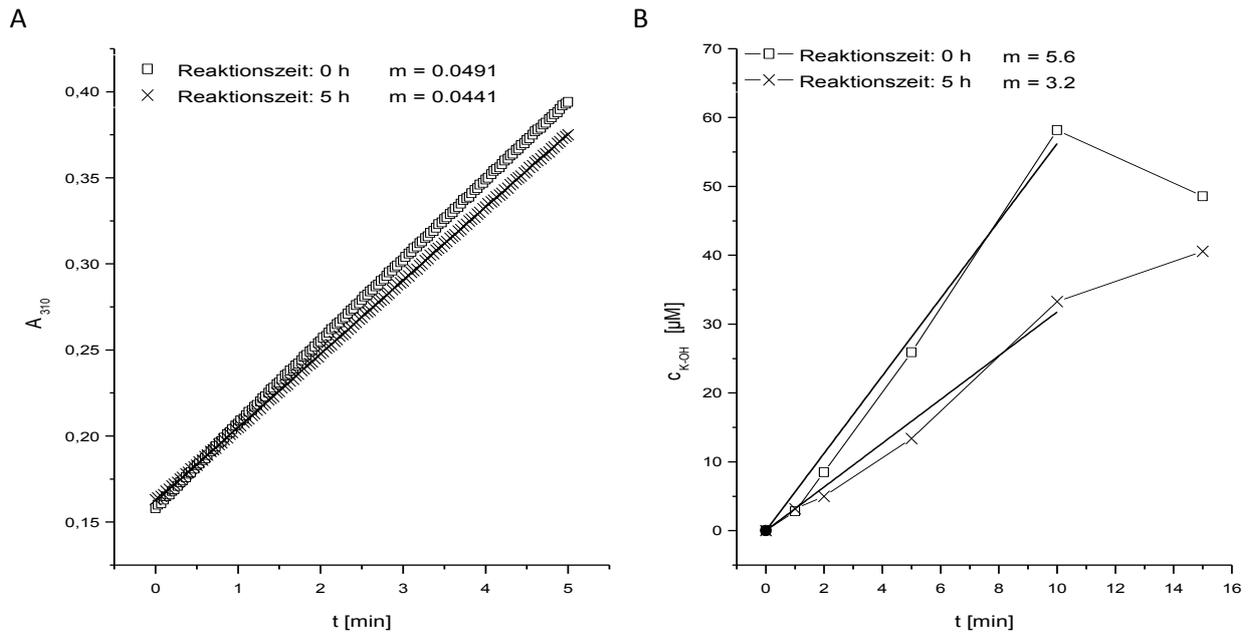


Abbildung 24: *In vitro* Aktivität der TAL (A) und CAR/CAD (B) vor und nach 5 h Reaktion. *E. coli* BL21 Gold (DE3) pTCCN Zellen für die Ganzzellumsatz von Tyrosin zu Kumarylalkohol wurden vor und 5 h nach Beginn der Reaktion mit Tyrosin lysiert, zentrifugiert und das Lysat dialysiert. (A) Absorptionsmessung der Kumarsäure zur Bestimmung der Aktivität der TAL. (B) HPLC-Messung der Kumarylalkoholbildung.

Die Zellextraktmessungen zeigen nur eine leicht geringere TAL-Aktivität nach der fünfstündigen Inkubation von BL21 Gold (DE3) pTCCN mit Tyrosin als vor der Inkubation. Die Aktivität der CAR/CAD hingegen verringerte sich in demselben Zeitraum um 43 %. Aufgrund der noch vorhandenen Aktivität der rekombinanten Enzyme nach 5 h Inkubation ist der vollständige Verlust der Produktivität im Gesamtzellumsatz nicht auf eine Inaktivierung der rekombinanten Proteine zurückzuführen.

3.8 Kumarylalkoholbildung mit BL21 Δ tyrR:T7

3.8.1 Steigerung der Produktivität durch Verringerung der Substratlimitierung

In allen zuvor dargestellten Ergebnissen mit BL21 Gold (DE3) pTCCN war der Kumarylalkohol das Hauptprodukt und Kumarsäure und -aldehyd akkumulierten nur im geringen μ M-Bereich, was auf die Effektivität der Kaskade schließen lässt. Die Ursache für die Stagnation der Produktivität trotz dem Vorhandensein von ausreichend Substrat, einer Kohlenstoffquelle für die Cofaktorregeneration und vorhandene Aktivität der rekombinanten Enzyme (Abschnitt 3.7) könnte die TAL-Reaktion oder eine Reaktion davor sein. Da eine nahezu gleichbleibende TAL-Aktivität während der Reaktion nachgewiesen werden konnte (Abschnitt 3.7.4), war es möglich, dass der Substratimport die Reaktionskaskade limitierte. Bereits bei intrazellulären Tyrosinkonzentrationen im niedrigen μ M-Bereich wird die Expression des Tyrosintransporters durch den Regulator TyrR reprimiert [Pittard, 1996]. Deswegen wurde die Deletionsmutante *E. coli* BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN, in der die Expression des

Tyrosintransporters dereguliert abläuft [Pittard, 1996], generiert. Aus den vorangegangenen Experimenten abgeleitet wurde für die Ganzzellreaktion das komplette Minimalmedium als Reaktionsmedium gewählt und für die Bereitstellung genügender Substratmengen Tyrosin stündlich zugegeben (Abschnitt 2.5.7, S. 32). Die Bioreaktorreaktion wurde wiederum unter pH-kontrollierten Bedingungen mit Zellen, die für 6 h bei 24 °C exprimierten und anschließend geerntet wurden, durchgeführt. Der Kulturüberstand wurde mittels HPLC analysiert (Abbildung 25). Es konnte ein Umsatz von Tyrosin zu Kumarylalkohol beobachtet werden, was auf die Funktionalität der Reaktionskaskade im Deletionsstamm schließen lässt. Die Kumarylalkoholkonzentration erreichte einen Wert von bis zu 3,8 mM nach 6 h.

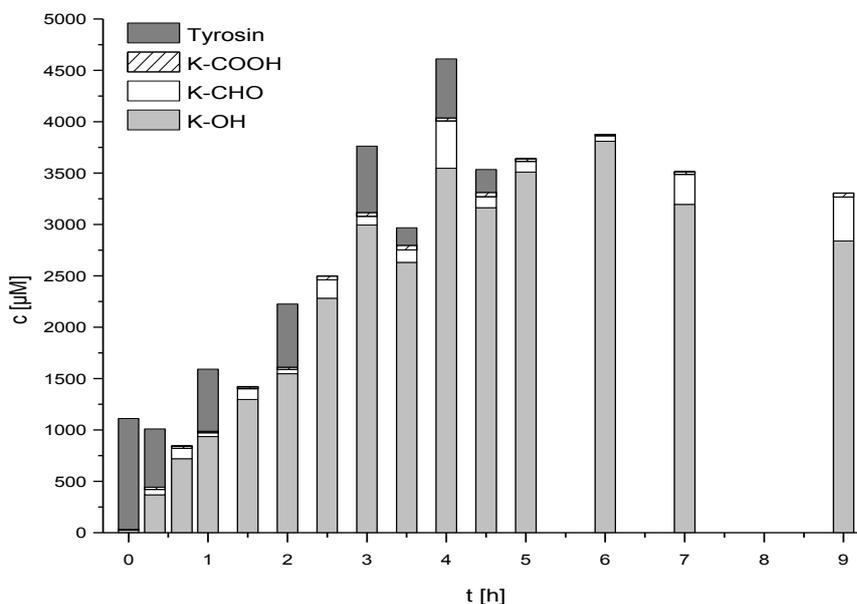


Abbildung 25: Biotransformation in BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN in Minimalmedium unter Zugabe von 3,4 mM Tyrosin.

Weiter ist zu erkennen, dass auch im Deletionsstamm Kumarylalkohol das Hauptprodukt darstellt und somit die rekombinanten Enzyme auch in diesem Stamm in ausreichenden Mengen produziert werden und aktiv sind. Wiederum nimmt die Produktkonzentration am Anfang der Reaktion stetig zu (0 – 4 h) und stagniert danach fast vollständig, was durch eine abnehmende Substratverfügbarkeit begründet werden kann. Da der erreichte Kumarylalkoholwert die zugefütterte Tyrosinkonzentration von 3,4 mM übersteigt, wurde die Substanz, die zur Retentionszeit des Kumarylalkohols retardiert, aufgefangen und mittels spektraler Analyse untersucht (Abbildung 26).

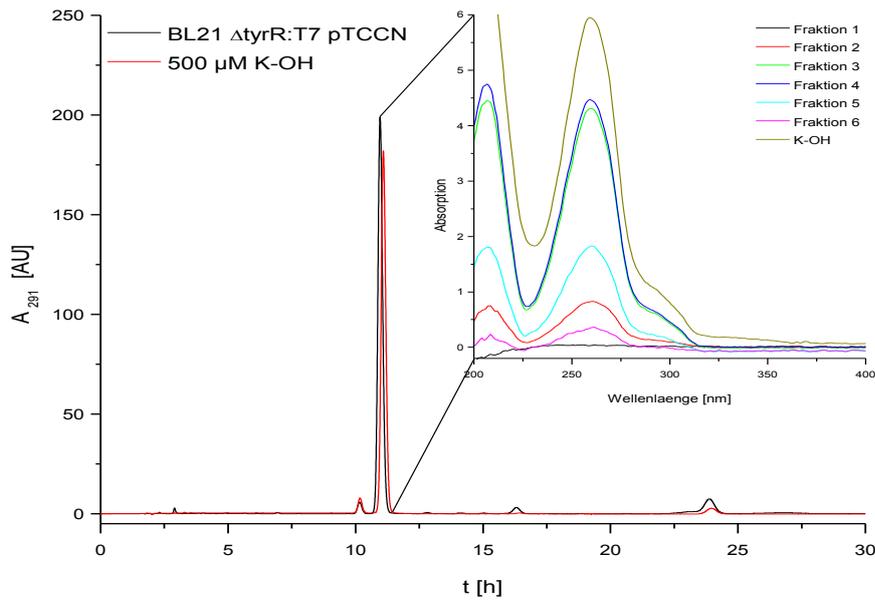


Abbildung 26: Chromatogramm der 6 h-Probe aus Abbildung 25 mit Messung der Absorptionsspektren der aufgesammelten Fraktionen des Kumarylalkoholpeaks bei 11 min.

Die isolierte Substanz zeigt dieselbe Retentionszeit und das gleiche Absorptionsspektrum wie die Referenzsubstanz Kumarylalkohol.

3.8.2 Einfluss der Tyrosin- und Glukosezugabe auf die Kumarylalkoholbildung in BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN

In Abbildung 25 ist zu erkennen, dass nach 4,5 h kein Substrat mehr im Kulturüberstand zur Verfügung steht, was auf die Reaktionskaskade limitierend wirken kann. Außerdem könnte die Glukose ebenfalls begrenzend sein, da während des Reaktionszeitraums keine Zugabe der Kohlenstoffquelle erfolgte. Um die Produktkonzentration weiter zu erhöhen, wurde das Experiment mit höheren Substratmengen und Glukosezugabe durchgeführt. Es wurden zwei Bioreaktorversuche mit BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN (Expression der heterologen Gene bei 24 °C für 6 h) im Minimalmedium mit Zugabe von bis zu 19 mM Tyrosin und mit bzw. ohne Glukosezugabe durchgeführt (Abbildung 27).

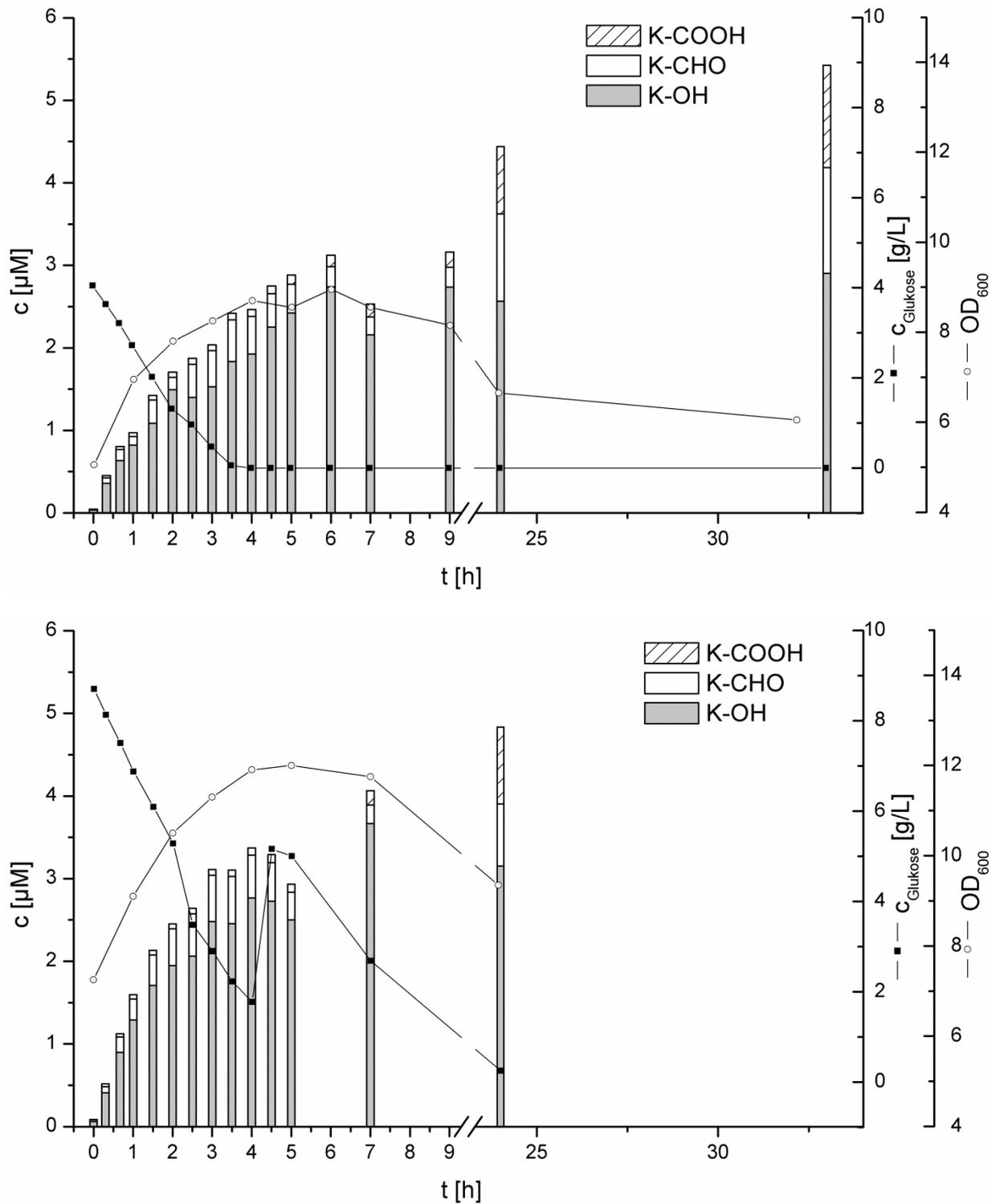


Abbildung 27: Biotransformation in $\Delta\text{tyrR:T7 pTCCN}$ im Minimalmedium bei 37 °C mit Zugabe von 19 mM Tyrosin (oben) und 17 mM Tyrosin und Glukose (unten).

In beiden Experimenten konnte bei der Probennahme ein deutliches Tyrosinpellet beobachtet werden. HPLC-Messungen bestätigten eine Tyrosinkonzentration von 2 mM im Kulturüberstand während des gesamten Reaktionszeitraums. Eine Substratlimitierung erschien demzufolge aufgrund der deregulierten Expression der Tyrosintransporter in BL21 $\Delta\text{tyrR:T7 pTCCN}$ und somit einen deregulierten Tyrosinimport als unwahrscheinlich. Nach einer stetigen Produktzunahme ist in

Abbildung 27 (oben) trotz genügend Substrat wiederum eine Stagnation der Produktbildung nach 6 h bei 2,8 mM Kumarylalkohol zu beobachten. Eine Substratlimitierung als Ursache für die Produktstagnation konnte dementsprechend ausgeschlossen werden. Im zweiten Teil des Experiments nahm die Kumarylalkoholkonzentration nach der Zugabe von Glukose um ca. 1 mM zu, aber stagnierte anschließend und konnte die Höchstkonzentration von 3,8 mM Kumarylalkohol nicht übertreffen (Abbildung 27, unten). Aufgrund der abnehmenden Glukosekonzentration wird von einem aktiven Stoffwechsel in den Zellen ausgegangen. Unter diesen Bedingungen sollte die Cofaktorregenerierung fortbestehen, sodass wahrscheinlich noch Cofaktoren für die Reaktionskaskade zur Verfügung standen. Aus diesem wurde die Cofaktorlimitierung als Grund für die Stagnation der Produktbildung im Deletionsstamm ebenfalls als unwahrscheinlich eingestuft.

3.8.3 Bestimmung der Aktivität der rekombinanten Enzyme im Zellextrakt von BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN

Im Stamm BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN wurde ebenfalls untersucht, ob ein Proteinabbau oder eine Aggregation der rekombinanten Protein stattfand (Vergleich dazu Abschnitt 3.7.4). In Abbildung 28 (A) ist zu beobachten, dass die Signalintensität der CAR und der TAL im PA-Gel über den Reaktionszeitraum abnimmt. Dies korreliert wahrscheinlich mit einer allgemeinen Abnahme des Gesamtproteinbandenbandenmusters, sodass das Verhältnis der rekombinanten Proteine zur Gesamtproteinmenge gleich blieb. Dies wird vor allem im Vergleich der löslichen Fraktionen (Abbildung 28, B) deutlich, in denen die Bandenintensitäten aller Proteine bis zum Ende der Reaktion gleich bleibt. Der Abbau der rekombinanten Proteine ist dementsprechend unwahrscheinlich. Auch sieht man kaum Aggregation der CAR oder TAL. Es ist also davon auszugehen, dass nach 5 h die gleiche Menge an korrekt gefalteter TAL und CAR in der Zelle vorliegt.

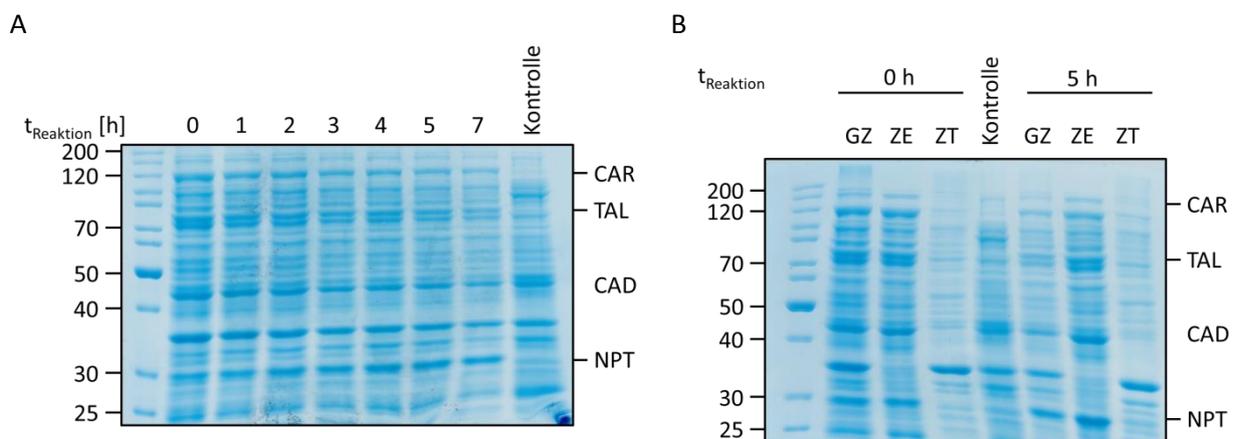


Abbildung 28: 10 %-iges SDS-PA-Gel zur Untersuchung des Proteinabbaus und Aggregation in BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN vor und nach Inkubation in Minimalmedium mit 2,5 mM Tyrosin bei 37 °C. A – Gesamtzellproteinbandenmuster im Verlauf der Reaktion, B – Untersuchung der löslichen und unlöslichen Proteine vor und nach der Reaktion, GZ – gesamter Zellysate, ZE – löslicher Zellextrakt, ZT – unlösliche Zelltrümmer, Kontrolle – BL21 Gold (DE3) pACYCDuet.

Außerdem wurde die Aktivität der rekombinanten Enzyme im Zellextrakt vor und nach 5 h der Reaktion untersucht. Die Abbildung 29 (A) zeigt, dass die TAL-Aktivität während der Reaktion leicht zunimmt, was durch Messschwankungen begründet werden kann. Die CAR-Aktivität nimmt während der Reaktion stark ab. Da zu beiden gewählten Zeitpunkten eine Akkumulation des Kumaraldehyds detektiert wurde, ist die CAR-katalysierte Reaktion nicht der limitierende Schritt in der Reaktionskaskade. Der letzte Schritt der Reaktionskaskade, die CAD-katalysierte Reduktion des Kumaraldehyds zum Kumarylalkohol, begrenzt in diesem Fall die Produktkonzentration. Allerdings liegt die Bildung von Kumarylalkohol zum Ende der Reaktion in demselben Bereich wie zu Beginn (Abbildung 29, B). Es konnte also keine Abnahme des limitierenden Schritts über den Reaktionszeitraum im Ganzzellversuch beobachtet werden, sodass auch der Verlust der Aktivität der rekombinanten Proteine als Ursache des Wegfalls der Produktbildungsrate ausgeschlossen werden kann.

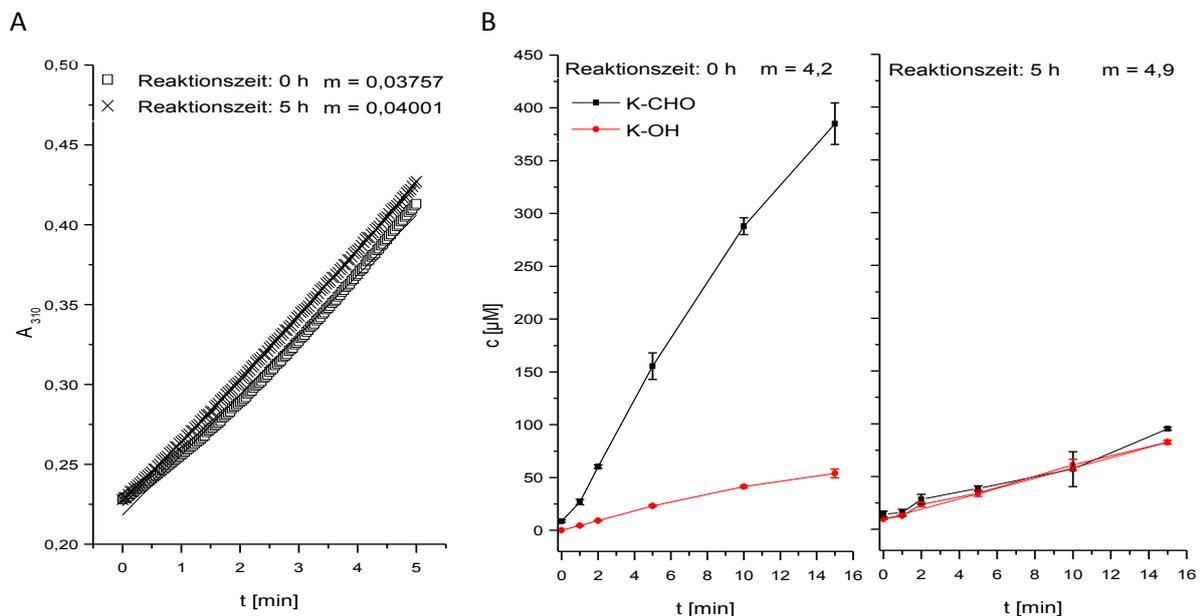


Abbildung 29: Aktivitätsmessung der TAL (A) und CAR/CAD (B) im Zellextrakt nach 0 und 5 h Gesamtzellumsatz von Tyrosin zu Kumarylalkohol in BL21 $\Delta\text{tyrR:T7}$ pTCCN.

3.8.4 Erhöhung der Produktkonzentration durch Aminosäurezugabe

In den Experimenten zu der Minimalmediumkultivierung hat sich eine Toxizität, die durch die Präsenz des Genkonstruktes in der Zelle hervorgerufen wird, als Ursache für das Fehlen des Wachstums auf Minimalmedium erwiesen (Abschnitt 2.5.3, S. 29). Die Zugabe von Aminosäuren zum Medium ermöglichte das Wachstum von BL21 Gold (DE3) pTCCN auf einem definierten Medium. Die Begrenzung der maximalen Produktkonzentration bei 3,8 mM trotz gegebener Voraussetzung (genügend Substrat und Kohlenstoffquelle, aktive rekombinante Enzyme) für die Tyrosinumwandlung

im Bioreaktor deutete ebenfalls auf einen toxischen Effekt, hervorgerufen durch die Reaktionskaskade, hin. Um diese Inhibierung in den Experimenten zur Produktion von Kumarylalkohol zu kompensieren wie es in den Experimenten der Minimalmediumkultivierung gelang, wurde eine Reaktion im Bioreaktor mit BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN mit Aminosäuren im Medium durchgeführt. Außerdem wurde Tyrosin und Glukose zugesetzt. Die Produktbildung im Kulturüberstand wurde mittels HPLC analysiert (Abbildung 30).

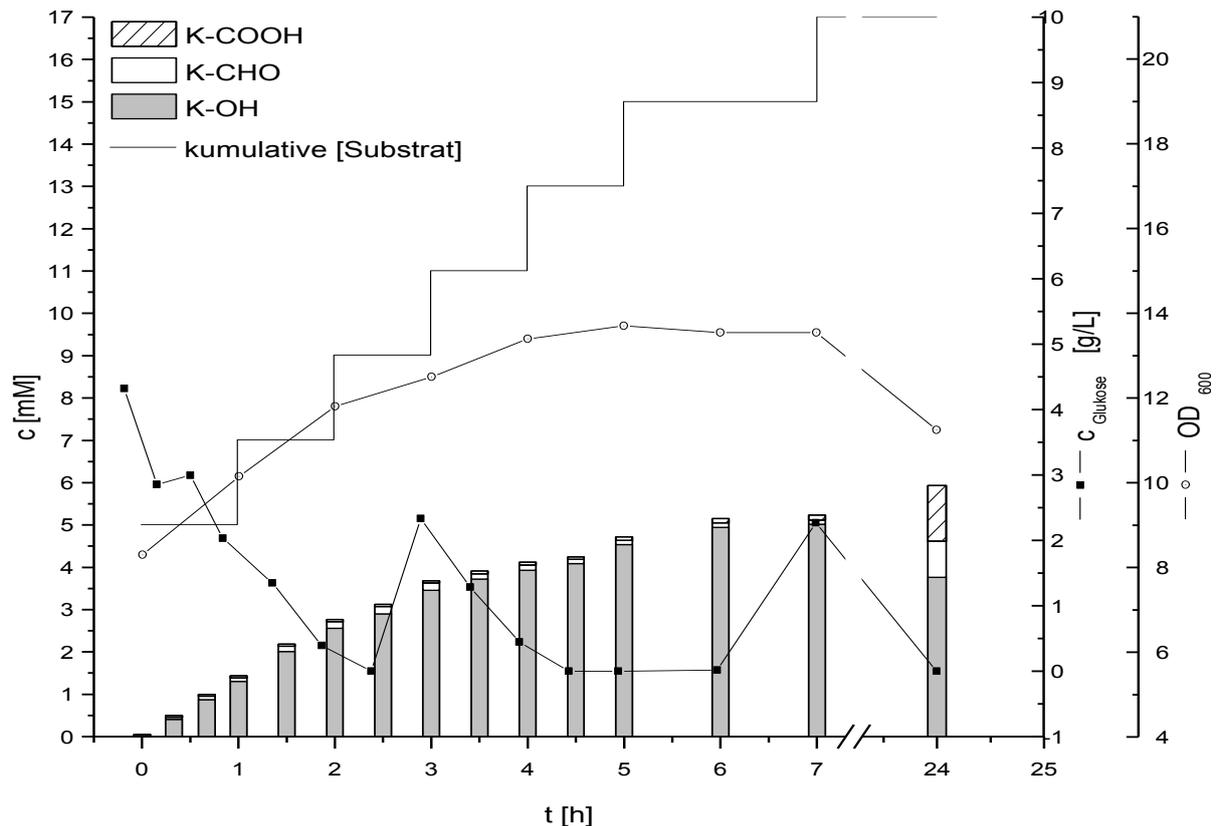


Abbildung 30: Synthese von Kumarylalkohol in BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN im Komplexmedium unter schrittweise Zugabe von 17 mM Tyrosin und Glukose im Rührreaktor bei 37 °C.

Durch das angereicherte Medium durch Aminosäuren konnte die maximale Produktkonzentration auf 5 mM erhöht werden. Nichtsdestotrotz sank die Produktivität der Zellen nach 6 h Reaktion auf Null, obwohl Tyrosin im Medium vorhanden war und Glukose nach 7 h Inkubation nochmals zugegeben wurde. Die Abnahme der Kumarylalkoholkonzentration deutet auf eine Degradation, einen Zerfall oder eine Weiterreaktion der Substanz an.

Der Überstand dieser Kultivierung (400 mL) wurde mittels Ethylacetat extrahiert und der Kumarylalkohol mittels *Flash*-Chromatografie gereinigt (Abschnitt 2.5.13, S. 36). Die Dünnschichtchromatografie (DC) zeigt die gesammelten Fraktionen im Verlauf der Reinigung.

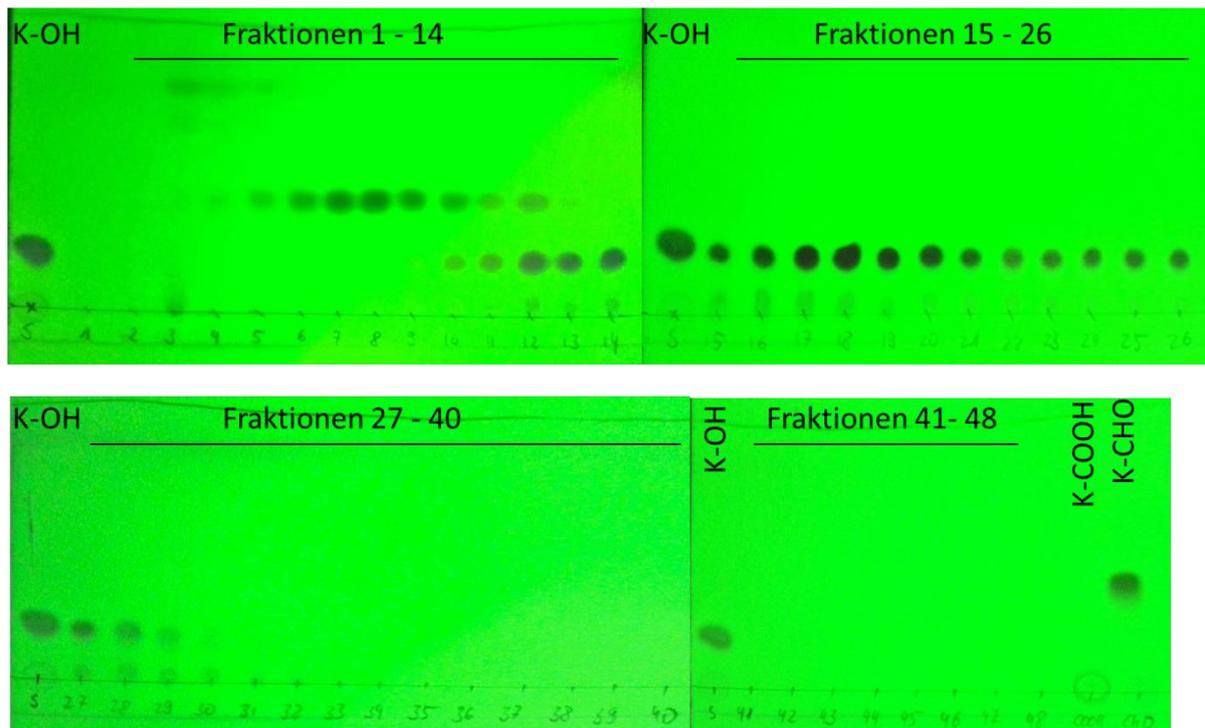


Abbildung 31: DC-Analyse auf F254-Kieselgelplatten der Fraktionen nach Extraktion und Reinigung des Kulturüberstands von BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN (24 h-Inkubation mit 17 mM Tyrosin) mittels Flashchromatografie, Detektion mittels UV-Bestrahlung.

Die DC (Abbildung 31) zeigt eine Trennung der Substanzen Kumarylalkohol ($R_f = 0,2$), Kumaraldehyd ($R_f = 0,4$) und Kumarsäure ($R_f = 0,02$). Die Fraktionen 14 bis 30 enthielten eine Substanz mit dem gleichen R_f -Wert wie Kumarylalkohol (0,2) mit einer Verunreinigung, die das gleiche Laufverhalten wie Kumarsäure zeigte ($R_f = 0,02$). Dieses Ergebnis deutet darauf, dass der Kumarylalkohol mittels *Flash*-Chromatografie isoliert werden konnte. Die Fraktionen mit der Zielsubstanz Kumarylalkohol wurden vereinigt und unter Vakuum eingeeengt. Es konnten 248 mg eines weißlich, gelblichen Pulvers aus 1,2 g Tyrosin produziert und isoliert werden (Abbildung 32).



Abbildung 32: Isolierter Kumarylalkohol (248 mg) nach Aufarbeitung des Kulturüberstands von BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN (24 h-Inkubation mit 17 mM Tyrosin).

Die isolierte Substanz wurde mittels HPLC und NMR als Kumarylalkohol identifiziert (Abbildung 33). Die *Flash*-Chromatografie ist eine geeignete Methode, Kumarylalkohol aus dem Kulturüberstand von *E. coli* zu isolieren. Dieses Experiment bietet eine gute Grundlage für das Hochskalieren der Reinigung von Kumarylalkohol.

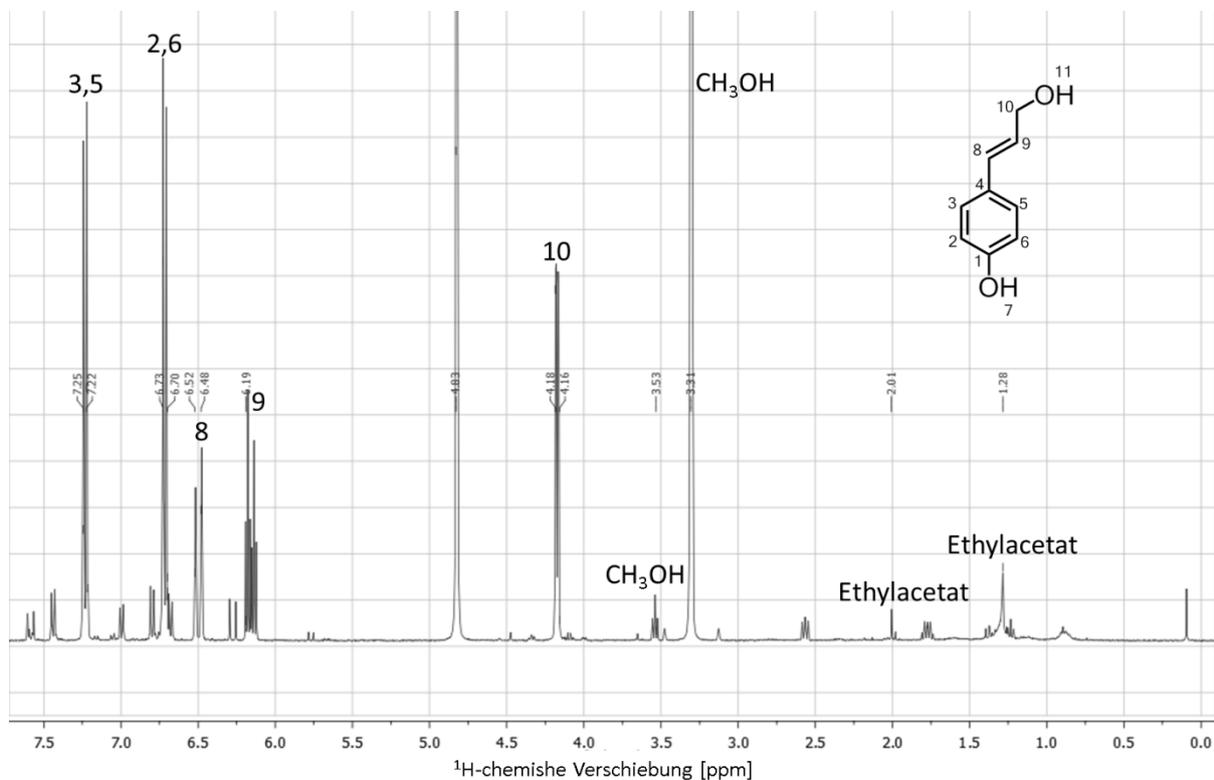


Abbildung 33: ^1H -NMR-Spektrum des isolierten Kumarylalkohols nach Aufarbeitung des Kulturüberstands von BL21 $\Delta\text{tyrR:T7}$ pTCCN (24 h-Inkubation mit 17 mM Tyrosin).

3.9 Synthese der Monolignole durch Zugabe von Zimtsäurederivaten mit BL21 $\Delta\text{tyrR:T7}$ pTCCN

3.9.1 Präparation vom biotechnologisch hergestellten Coniferylalkohol

Aufgrund der Substratpromiskuität der untersuchten Enzyme CAR und CAD ist es möglich, ähnliche Substrate, wie Ferula- und Sinapinsäure bzw. Coniferyl- und Sinapylaldehyd, umzusetzen (Abbildung 34), sodass die anderen Monolignole Coniferyl- und Sinapylalkohol im gleichen Stamm synthetisiert werden können.

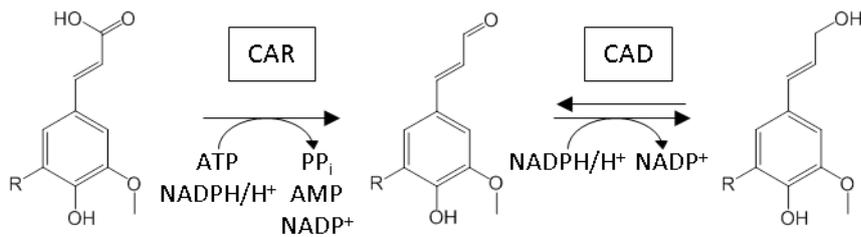


Abbildung 34: Synthese von Coniferyl- bzw. Sinapylalcohol ausgehend von Ferula- bzw. Sinapinsäure in BL21 Gold (DE3) pTCCN. R = H → Ferulasäure bzw. Coniferylaldehyd, Coniferylalcohol. R = OCH₃ → Sinapinsäure bzw. Sinapylaldehyd, Sinapylalcohol.

Analog zur Synthese von Kumarylalcohol wurden die gleichen Reaktionsbedingungen für die Herstellung von Coniferylalcohol eingestellt, wobei 17 mM Ferulasäure anstatt Tyrosin als Substrat dienen (Abbildung 35).

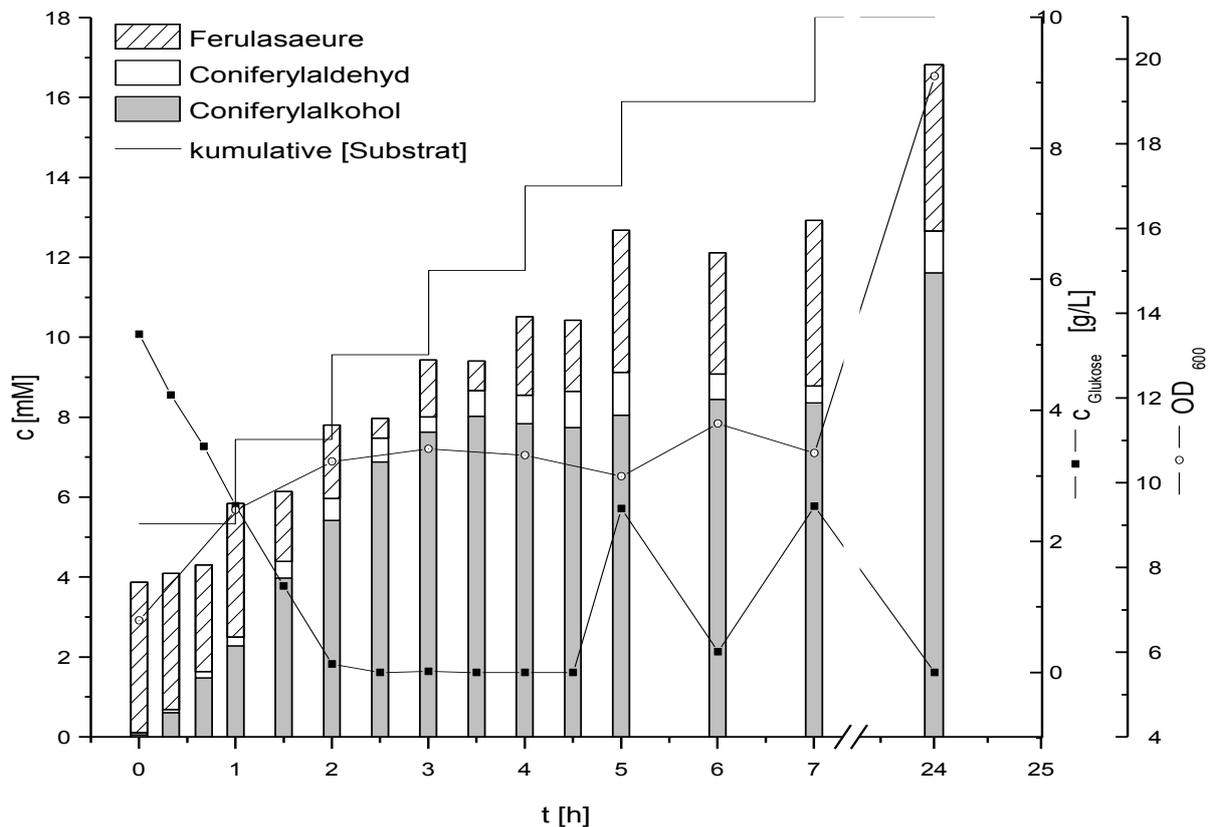


Abbildung 35: Synthese von Coniferylalcohol in BL21 ΔtyrR:T7 pTCCN im Komplexmedium unter schrittweiser Zugabe von 17 mM Ferulasäure und Glukose im Rührreaktor bei 37 °C.

Ferulasäure wird effizient durch BL21 ΔtyrR:T7 pTCCN zu Coniferylalcohol, welches das Hauptprodukt darstellt, umgesetzt. Der Verlauf der Produktbildung ist der Kumarylalcoholbildung in demselben Stamm recht ähnlich. Zu Beginn der Reaktion nimmt die Produktkonzentration stetig zu, wobei die Zunahme geringer wird und schließlich zwischen 3,5 bis 7 h Reaktion keine Produktzunahme mehr zu

beobachtet ist (ca. 8 mM Coniferylalkohol). Anders als bei der Kumarylalkoholbildung ist nach 24 h Reaktion eine deutliche Zunahme an Coniferylalkohol zu verzeichnen (11,6 mM). Auch in dieser Reaktion akkumulierte das Aldehydintermediat nur geringfügig. Unter Berücksichtigung der Messschwankungen konnte die eingesetzte Ferulasäure wiedergefunden werden, sodass eine Bilanzierung möglich war. Das Substrat wurde zu 68 % zum Endprodukt umgesetzt.

Der gebildete Coniferylalkohol wurde mit dem gleichen Verfahren aufgearbeitet, das für den Kumarylalkohol verwendet wurde (Abbildung 36).

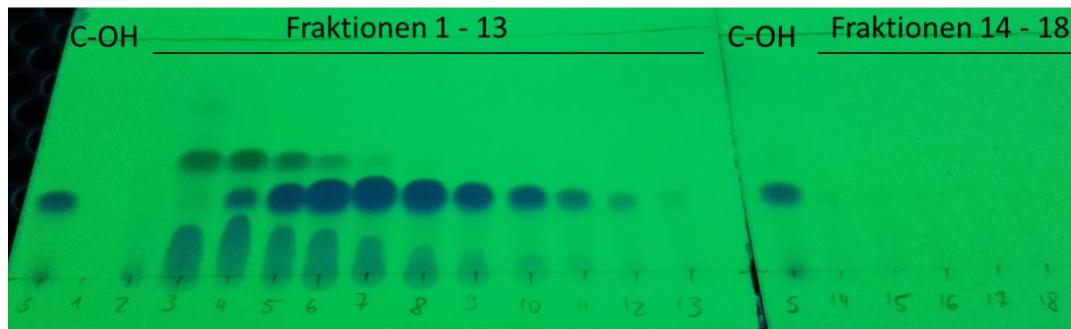


Abbildung 36: DC-Analyse auf F254-Kieselgelplatte der Fraktionen nach Extraktion und Reinigung des Kulturüberstands von BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN (24 h Inkubation mit 17 mM Ferulasäure) mittels Flashchromatografie, Detektion mittels UV-Bestrahlung.

In Abbildung 36 ist eine schlechte Trennung der Substanzen während der Chromatografie zu erkennen. Da Vorversuche zur Reinigung eine effektive Abtrennung des Coniferylalkohols von den anderen Substanzen zeigten, ist hier die schlechte Trennung vermutlich auf eine Überladung der Säule zurückzuführen. Nichtsdestotrotz wurden die Fraktionen 8 bis 18, die eine Substanz aufwiesen, die den gleichen R_f -Wert hatte wie der Coniferylalkohol (0,3), vereinigt und unter Vakuum eingeeengt. Es konnte eine kristalline Substanz mit einem Gewicht von 451 mg (aus 1,3 g Ferulasäure) isoliert werden (Abbildung 37).

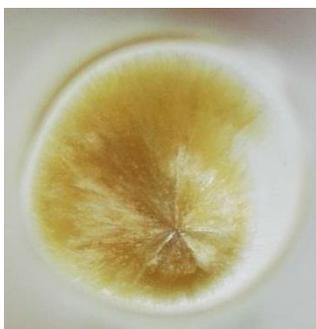


Abbildung 37: Isolierter Coniferylalkohol nach Aufarbeitung des Kulturüberstands von BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN (24 h-Inkubation mit 17 mM Ferulasäure).

Auch diese Substanz wurde mittels NMR analysiert. Mit Hilfe bekannter NMR-Spektren konnte Coniferylalkohol identifiziert werden (Abbildung 38) [Quideau und Ralph, 1992]. Trotz der schlechten Abtrennung des Coniferylalkohols während der *Flash*-Chromatografie eignete sich die Methode zur Reinigung. Eine Wiederholung mit einer höheren Säulenkapazität wäre zur Steigerung der Ausbeute bzw. Reinheit sinnvoll.

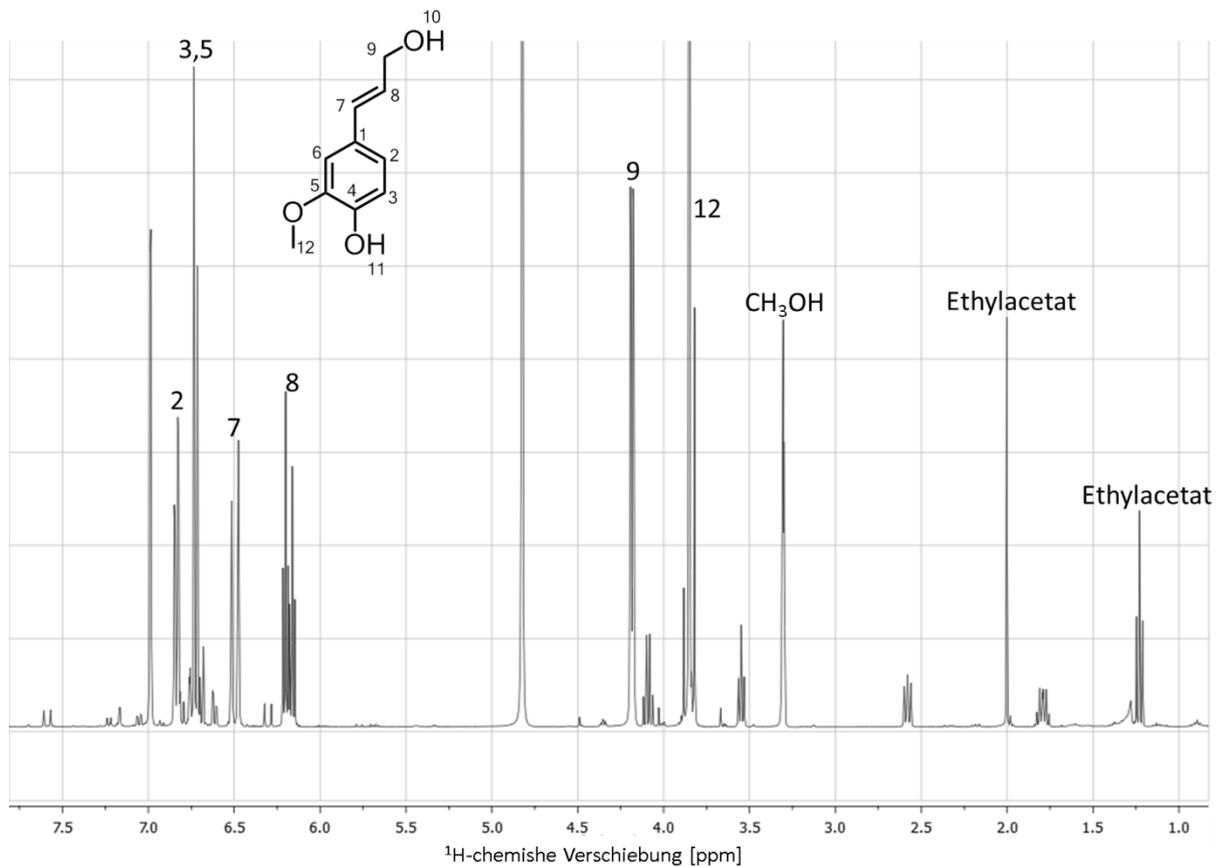


Abbildung 38: ^1H -NMR-Spektrum des isolierten Coniferylalkohols nach Aufarbeitung des Kulturüberstands von BL21 $\Delta\text{tyrR:T7}$ pTCCN (24 h-Inkubation mit 17 mM Ferulasäure).

3.9.2 Präparation vom biotechnologisch hergestellten Sinapylalkohol

Für die Synthese von Sinapylalkohol wurde wiederum der Stamm BL21 $\Delta\text{tyrR:T7}$ pTCCN unter den gleichen Bedingungen wie für die Kumaryl- und Coniferylalkoholsynthese verwendet. Hierfür erfolgte die Zugabe von 17 mM Sinapinsäure (Abbildung 39).

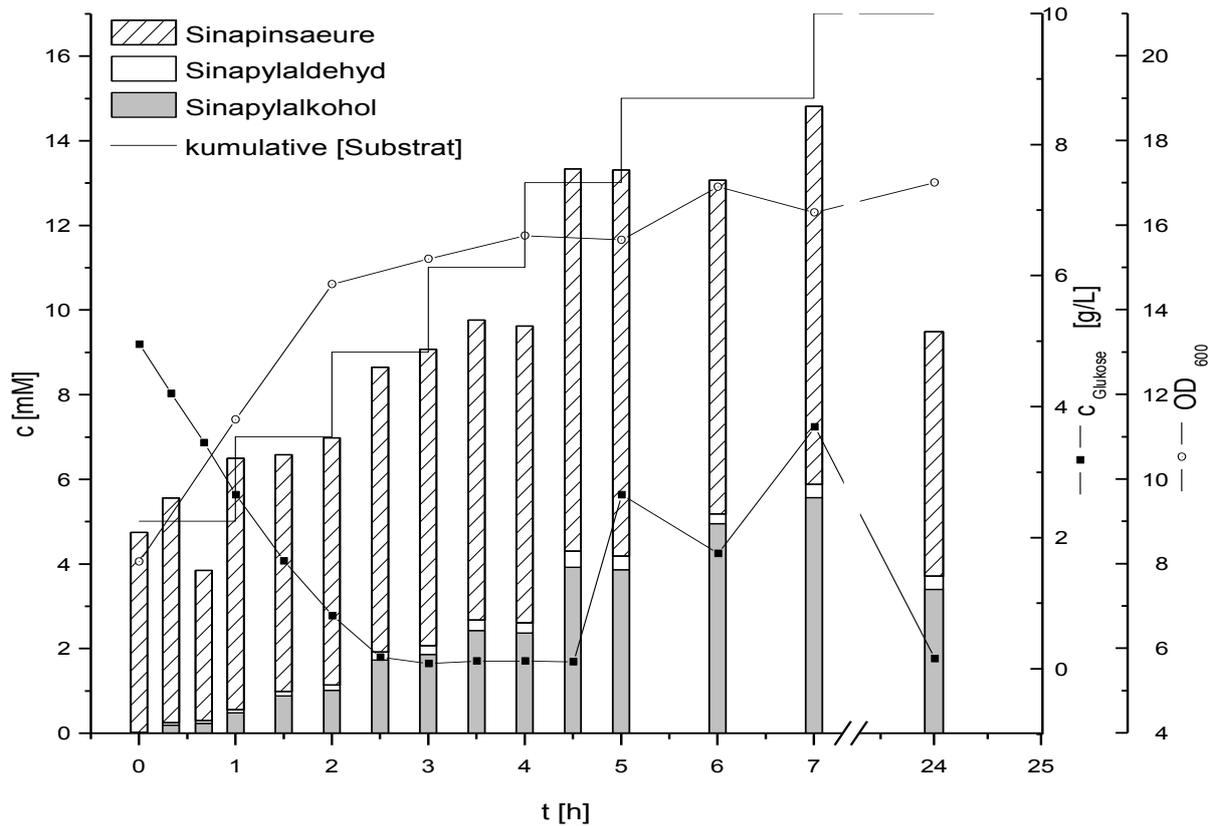


Abbildung 39: Synthese von Sinapylalkohol in BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN im Komplexmedium unter Zugabe von 17 mM Sinapinsäure und Glukose im Rührreaktor bei 37 °C.

Auch für die Produktion von Sinapylalkohol zeigte sich der Stamm BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN als geeignet. Es ist eine stete Zunahme des Produktes bis 7 h und 5,6 mM Sinapylalkohol zu beobachten. Wie bereits bei der Kumarylalkoholbildung in demselben Stamm, ist eine Abnahme des Produktes nach 24 h zu verzeichnen, was auf einen Abbau, Instabilität oder einen anderen Reaktionsweg von Sinapylalkohol spricht. Auch in diesem Experiment akkumulierte der Aldehyd nur in geringen μ M-Konzentrationen, so dass das Endprodukt der Kaskade auch das Hauptprodukt darstellt. Die zugegebene Sinapinsäure konnte bis zum Zeitpunkt von 7 h wiedergefunden werden. Nach 24 h ist die Summe aus den möglichen Produkten und dem gemessenen Substrat deutlich geringer als die zugegebene Menge an Substrat. Möglicherweise werden auch der Sinapylaldehyd und die Sinapinsäure durch die Zelle abgebaut, gehen weitere Reaktionen ein oder sind bei den gewählten Bedingungen instabil.

Der Kulturüberstand dieser Fermentation wurde ebenfalls extrahiert und über eine *Flash*-Chromatografie gereinigt. Die Reinigung wurde mittels DC verfolgt (Abbildung 40).

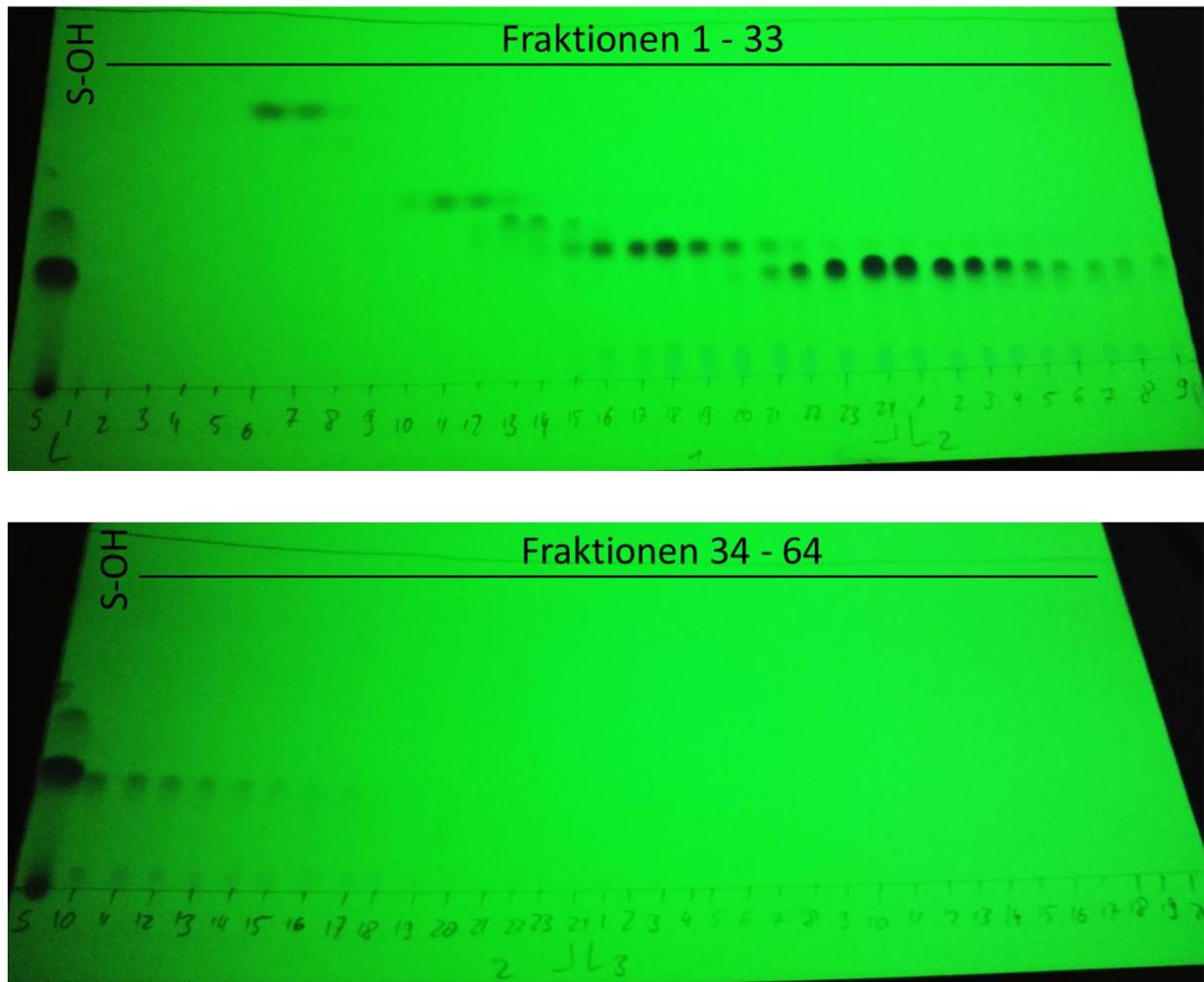


Abbildung 40: DC-Analyse auf F254-Kieselgelplatte der Fraktionen nach Extraktion und Reinigung des Kulturüberstands von BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN (24 h Inkubation mit 17 mM Sinapinsäure) mittels *Flash*-Chromatografie, Detektion mittels UV-Bestrahlung.

Es konnte eine Trennung des Sinapylalkohols ($R_f = 0,3$) von den restlichen detektierten Substanzen in den Fraktionen 23 bis 41 erreicht werden. Nach dem Eintrocknen der vereinten Fraktionen verblieben 366 mg eines orangen Öls (aus 1,5 g Sinapinsäure) (Abbildung 41).



Abbildung 41: Isolierter Sinapylalkohol nach Aufarbeitung des Kulturüberstands von BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN (24 h-Inkubation mit 17 mM Sinapinsäure).

Die Identität des Isolats wurde mittels NMR geprüft und bestätigte die Substanz als Sinapylalkohol (Abbildung 42).

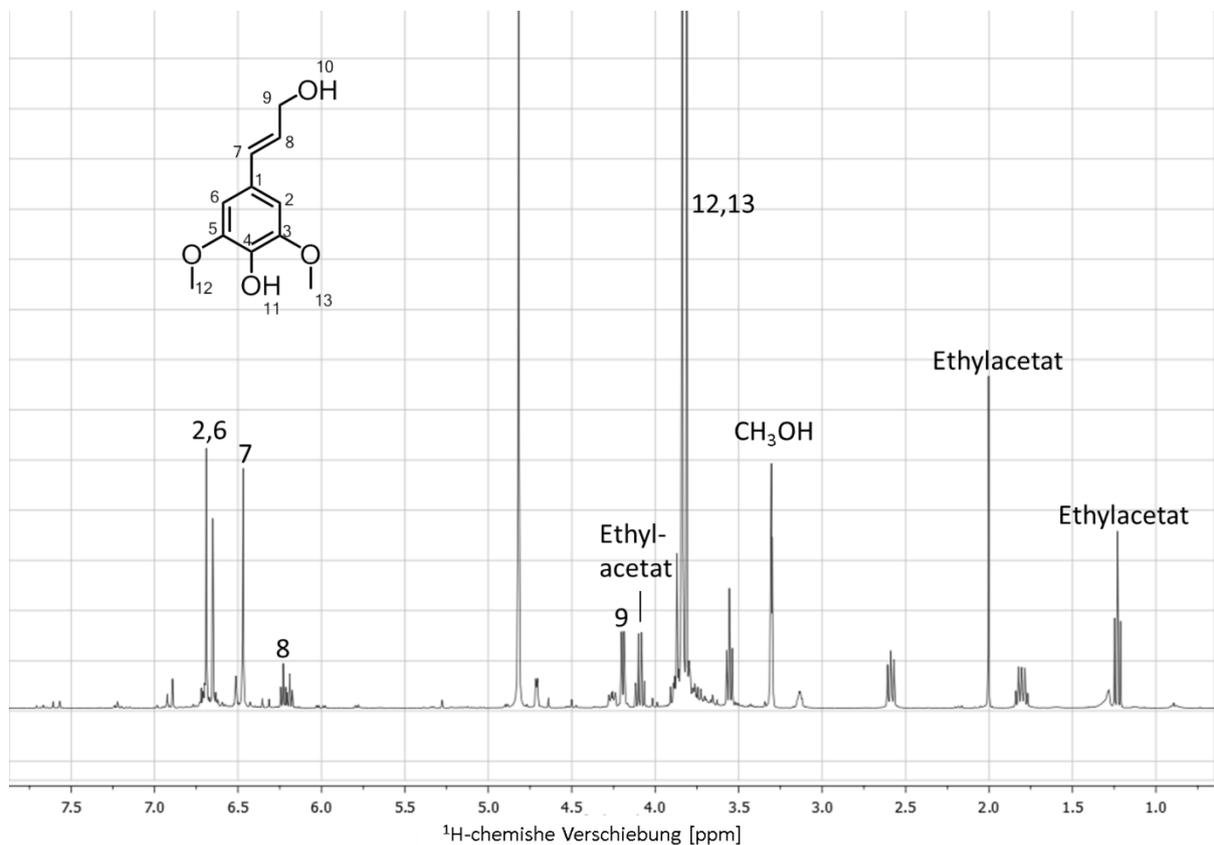


Abbildung 42: ^1H -NMR-Spektrum des isolierten Sinapylalkohols nach Aufarbeitung des Kulturüberstands von BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN (24 h-Inkubation mit 17 mM Sinapinsäure).

3.9.3 Inkubation von BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN mit Kumarsäure zur Bildung von Kumarylalkohol

Nachdem der effektive Umsatz der Ferula- und Sinapinsäure in BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN gezeigt werden konnte, sollte für den direkten Vergleich überprüft werden, ob ähnliche Konzentrationen an

Kumarylalkohol durch Zugabe von Kumarsäure erreicht werden können (Abbildung 43). Auch in diesem Fall verlief die Reaktion unter den gleichen Voraussetzungen wie die oben beschriebenen.

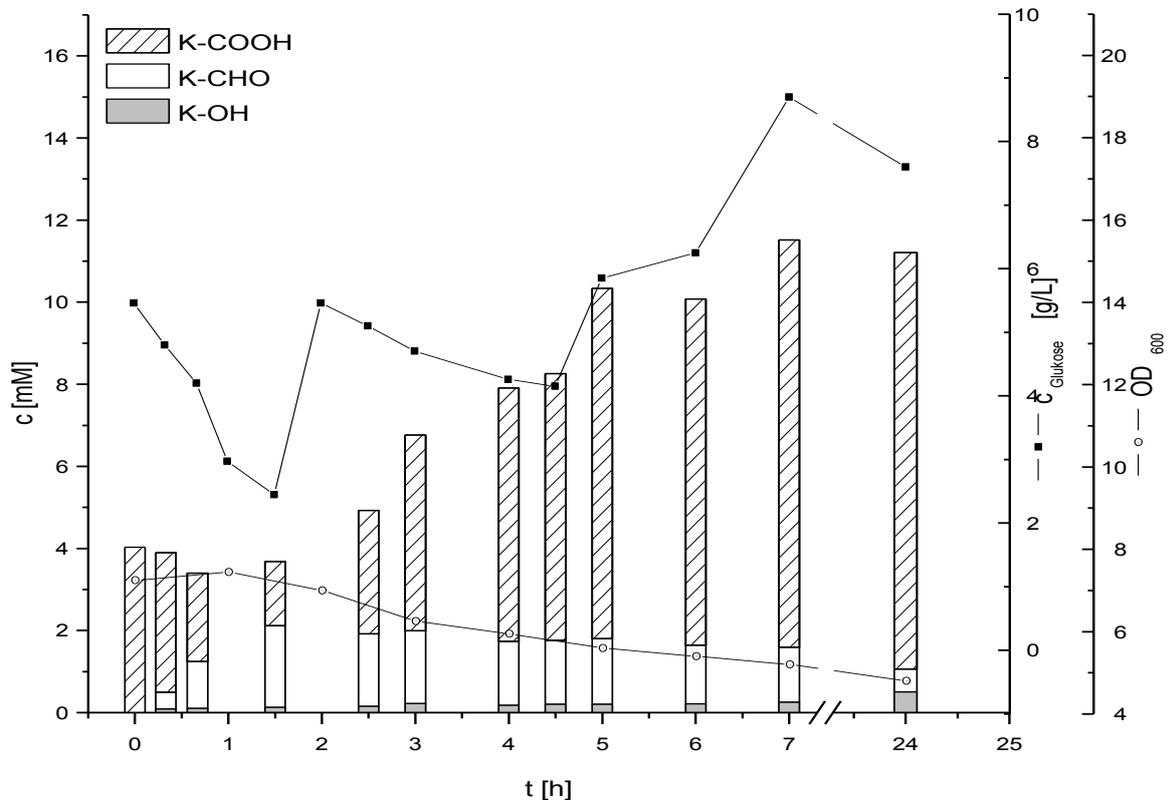


Abbildung 43: Synthese von Kumarylalkohol in BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN im Komplexmedium unter Zugabe von 17 mM Kumarsäure und Glukose im Rührreaktor bei 37 °C.

Die Umwandlung von Kumarsäure zu Kumarylalkohol in BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN erzielte Kumarylalkoholkonzentrationen im niedrigen μ M-Bereich. Das vergleichbare Experiment mit Tyrosin anstatt Kumarsäure als Substrat ergab eine maximale Produktkonzentration von 5 mM (siehe 3.8.4, S. 67). Verglichen zum Experiment mit der Tyrosinzugabe stellt sich hier auch eine andere Verteilung der gebildeten Substanzen ein. Es wurden vergleichsweise (Abbildung 30) hohe Aldehydkonzentration erreicht, was, verglichen mit dem Experiment der Tyrosinzugabe, auf eine verminderte CAD-Aktivität schließen lässt. Ferner konnte nicht die gesamte eingesetzte Kumarsäure wiedergefunden werden. Möglicherweise geht die Kumarsäure eine Reaktion mit einem Metaboliten aus dem *E. coli*-Stoffwechsel ein oder ist unter den gewählten Bedingungen instabil. Ein Abbau durch *E. coli* konnte ausgeschlossen werden (Abschnitt 3.2.1). Möglicherweise hat die Kumarsäure einen negativen Effekt auf die Reaktionskaskade oder auf den Stoffwechsel der Zelle.

3.10 Untersuchungen zur Toxizität von Kumarylalkohol

3.10.1 Einfluss von Kumarylalkohol auf die Gesamtzellaktivität

Die Produktivität der rekombinanten Zellen für die Kumarylalkoholbildung aus Tyrosin fiel trotz gegebener Bedingungen für die Umsetzung wie ausreichend Substrat und Kohlenstoffquelle und aktiver rekombinanter Enzyme stets auf null. Folglich wurde untersucht, ob sich eine der gebildeten Verbindungen negativ auf die Umsetzung von Tyrosin ausübt. In Abschnitt 3.9.3 wurde bereits gezeigt, dass unter hohen Kumarsäurekonzentrationen der Umsatz der Kaskade stark reduziert ist. Allerdings akkumulieren bei Tyrosinzugabe zu BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN nur geringe Kumarsäuremengen, sodass ein negativer Effekt der Kumarsäure auf die Zellen oder Reaktionskaskade unwahrscheinlich ist. Auch die Akkumulation des Kumaraldehyds war relativ niedrig, wohingegen der Kumarylalkohol vergleichsweise hochkonzentriert vorliegt (mM-Bereich verglichen mit μ M-Bereich). Für die folgenden Untersuchungen wurde folglich zunächst der Kumarylalkohol als primär wirkende Substanz untersucht. Deswegen wurde die Produktbildung in BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN in Anwesenheit von 2,5 mM Kumarylalkohol beobachtet. Es wurden zwei Bioreaktoren mit der gleichen Biomasse parallel betrieben. Hierfür wurde BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN (Genexpression bei 24 °C für 6 h) unter kontrollierten pH- und Belüftungsbedingungen zum einen mit Tyrosin und zum anderen mit Tyrosin und Kumarylalkohol inkubiert. Zur Beobachtung der gebildeten Produkte wurde der Kulturüberstand mittels HPLC analysiert. Abbildung 44 zeigt eine deutlich erniedrigte Progresskurve in BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN in Gegenwart von 2,5 mM Kumarylalkohol. Das Produkt Kumarylalkohol hat einen starken negativen Effekt auf die Gesamtzellaktivität, was limitierend auf die Reaktionskaskade wirken könnte, weswegen möglicherweise die Produktkonzentration auf ca. 5 mM Kumarylalkohol begrenzt sind.

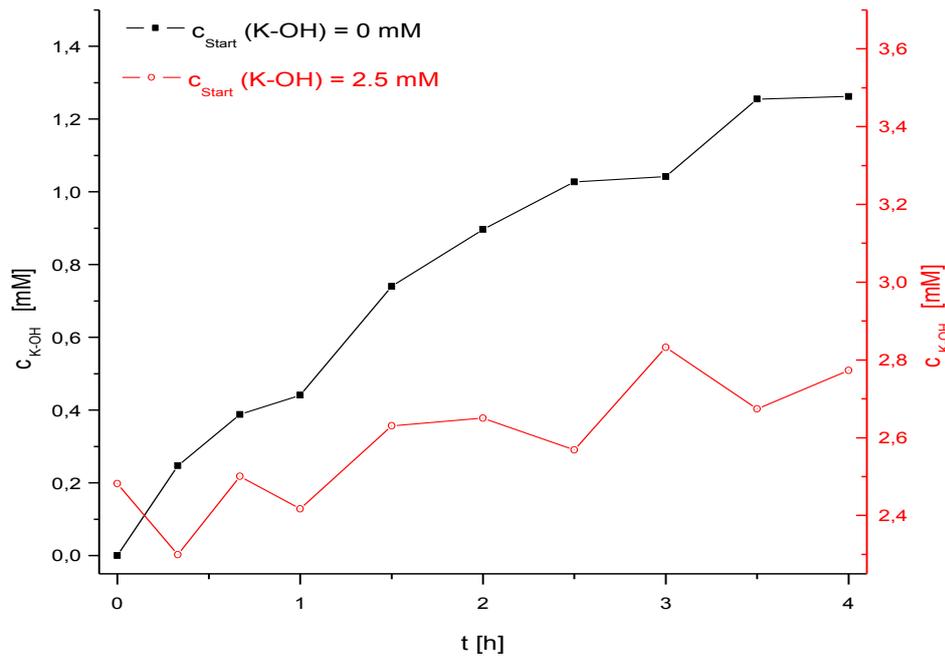


Abbildung 44: Kumarylalkoholbildung in BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN im Rührreaktor bei 37 °C in Gegenwart von 0 und 2,5 mM Kumarylalkohol zu Beginn der Reaktion.

3.10.2 Einfluss auf das Wachstum von *E. coli*

Nach dem der inhibitorische Effekt von Kumarylalkohol auf den Gesamtzellumsatz gezeigt werden konnte, sollte überprüft werden, ob dieser auf den Zellmetabolismus von *E. coli* oder die rekombinanten Enzyme zurückzuführen ist. Zunächst wurde das Wachstum der beiden verwendeten Expressionsstämmen BL21 Gold (DE3) und BL21 Δ tyrR:T7 mit unterschiedlichen Kumarylalkoholkonzentrationen im Medium analysiert (Abbildung 45). Die Kultivierungen erfolgten im Minimalmedium mit der entsprechenden Konzentration an Kumarylalkohol bei 37 °C. Das Wachstum wurde mit Hilfe der OD₆₀₀-Messung verfolgt.

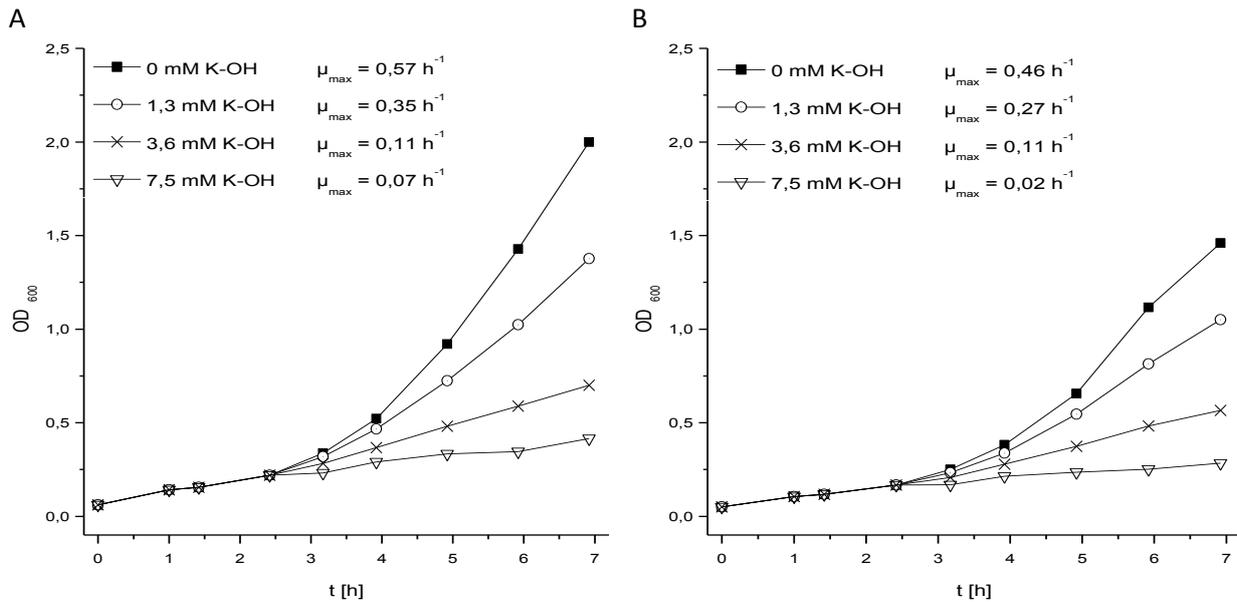


Abbildung 45: Wachstumskurven von BL21 Gold (DE3) pACYCDuet1 (A) und BL21 tyrR:T7 pACYCDuet1 (B) in Gegenwart unterschiedlicher Kumarylalkoholkonzentrationen.

Beide Stämme zeigen bereits bei einer Kumarylalkoholkonzentration von 1,3 mM ein deutlich verzögertes Wachstum mit einer ca. 40 % geringeren Wachstumsrate. Bei 7,5 mM Inhibitorkonzentration konnte nur noch ein sehr geringes Wachstum gemessen werden. Der negative Einfluss auf *E. coli* konnte somit nachgewiesen werden. Der inhibierte Stoffwechsel von BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN bzw. BL21 Gold (DE3) pTCCN in Gegenwart von Kumarylalkohol könnte die Ursache für die Stagnation der Produktivität und die Limitierung der Produktkonzentration auf 5 mM sein.

3.10.3 Bestimmung der TAL-Aktivität im Zellextrakt von BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN

Durch die Aktivitätsmessung im Zellextrakt sollte geklärt werden, ob zusätzlich zur metabolischen Beeinträchtigung die rekombinanten Enzyme durch Kumarylalkohol direkt inhibiert werden. Hierfür wurde zunächst der Umsatz von Tyrosin durch die TAL im Zellextrakt in Gegenwart verschiedener Kumarylalkoholkonzentrationen gemessen. Abbildung 46 verdeutlicht, dass die TAL erst ab einer Inhibitorkonzentration von 2 mM eine erkennbare Hemmung erfährt (81 % Restaktivität). Höhere Inhibitorkonzentrationen konnten aufgrund zu hoher Absorptionen durch Kumarylalkohol nicht gemessen werden.

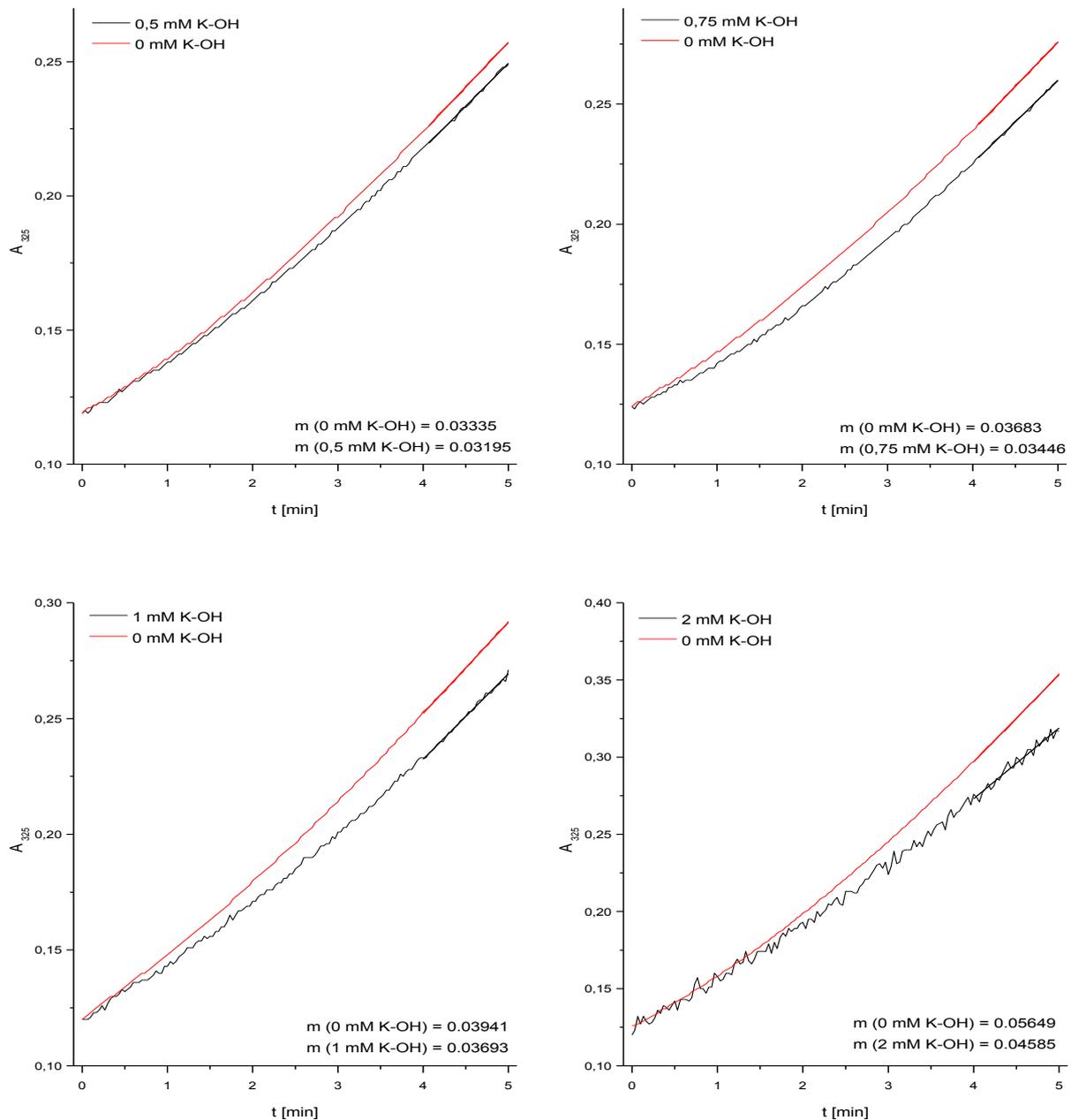


Abbildung 46: Aktivitätsmessung der TAL im Zellextrakt von BL21 Gold (DE3) pTCCN in Gegenwart unterschiedlicher Kumarylalkoholkonzentrationen.

Zellextraktmessungen bezüglich der CAR/CAD-Aktivität in Gegenwart von Kumarylalkohol wurden ebenfalls durchgeführt. Allerdings war die Standardabweichung zu hoch, sodass die Bildung des Kumarylalkohols in diese fiel und die Werte nicht auswertbar waren.

4 Diskussion

4.1 Design des Expressionskonstruktes pTCCN

E. coli ist ein sehr gut etablierter Produktionsorganismus, bei dem eine Vielzahl an genetischen Modifikationen möglich ist. Dieser Organismus zeigt ein schnelles Wachstum und erzielt hohe Zelldichten und ermöglicht somit hohe Produktkonzentrationen [Shiloach *et al.*, 1996]. Das grundlegende Substrat für die Herstellung des Monolignols Kumarylalkohol in der vorliegenden Arbeit ist Tyrosin. Es gibt zahlreiche Publikationen zur Herstellung sogenannter *E. coli*-Tyrosinüberproduzenten [Chávez-Béjar *et al.*, 2008; Lütke-Eversloh und Stephanopoulos, 2008; Patnaik *et al.*, 2008; Juminaga *et al.*, 2012]. Die Gruppe um Patnaik erzielte die bisher höchste Konzentration von 55 g/L an mikrobiell hergestellten Tyrosin und stellt damit eine gute Grundlage zur Herstellung von Monolignolen ausgehend von einfachen Kohlenstoffquellen wie Glukose dar [Patnaik *et al.*, 2008]. Zunächst sollte allerdings die Kaskade zur Kumarylalkoholsynthese in einem gewöhnlichen BL21-Stamm untersucht und optimiert werden. In einem Folgeprojekt kann die Kaskade chromosomal in einen Tyrosinüberproduzentenstamm integriert werden. BL21 (DE3) hat sich aufgrund von Proteasedefizienzen und geringer Acetatakkumulation als ein guter Proteinproduzent erwiesen und wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet [Shiloach *et al.*, 1996].

In Pflanzen beginnt die Biosynthese von Kumarylalkohol mit der Desaminierung der aromatischen Aminosäure Phenylalanin, wodurch Zimtsäure entsteht. Dieser Schritt wird durch die Phenylalaninammoniumlyase (PAL) katalysiert. Anschließend folgt eine Hydroxylierung zur Kumarsäure, welche durch die *cinnamate 4-hydroxylase* (C4H) katalysiert wird. Es schließt sich die Aktivierung der Kumarsäure mit Coenzym A zu Kumaroyl-CoA mit einer anschließenden Reduktion zum Kumaraldehyd an. In Pflanzen werden diese beiden Reaktionen durch die *4-coumaroyl CoA-ligase* (4CL) und die cinnamoyl-CoA reductase (CCR) katalysiert. Schließlich entsteht Kumarylalkohol durch einen weiteren reduktiven Schritt mit Hilfe der *cinnamyl alcohol dehydrogenase* (CAD) [Boerjan *et al.*, 2003]. In der vorliegenden Arbeit ist Tyrosin die Ausgangssubstanz, welche in drei katalytischen Schritten zum Kumarylalkohol überführt wird (Abbildung 4, A). Hierfür wird die Tyrosinammonialyase (TAL), welche die Desaminierung von Tyrosin katalysiert und somit die Hydroxylierung der Zimtsäure umgeht, verwendet. Denn bekanntermaßen führt die heterologe Expression des C4H-Gens zu einem inaktiven Protein [Watts *et al.*, 2004]. Ein weiterer kritischer Faktor bei der Kumarylalkoholsynthese in *E. coli* ist das Intermediat Kumaroyl-CoA, da es von *E. coli*-eigenen Thioesterasen als Substrat erkannt wird und somit der rekombinanten Reaktionskaskade entzogen wird [Beuerle und Pichersky, 2002]. Diese Nebenreaktion kann durch die heterologe Expression der *carboxylic acid reductase* (CAR) umgangen werden. Die CAR ist ein bakterielles Enzym, das die Reduktion verschiedener aromatischer und kurzkettiger Carbonsäuren zu Aldehyden

katalysiert. Hierbei wird das Substrat in der Adenylierungsdomäne des Enzyms durch ATP aktiviert, wodurch das Intermediat Kumaryl-AMP entsteht. Anschließend findet ein nucleophiler Angriff des Phosphopantetheinylrests der CAR auf das Carbonylkohlenstoff statt, sodass ein kovalent gebundenes Thioesterintermediat entsteht. Die herbeigeführte Konformationsänderung des Enzyms befördert das Substratintermediat zur reduktiven Domäne, in der der Thioester mittels NADPH/H⁺ reduziert und der Kumaraldehyd als Produkt abgegeben wird. Durch dieses *channeling* wird verhindert, dass reaktive Intermediate wie das Thioesterintermediat dem *E. coli*-Metabolismus ausgesetzt werden. Die Aktivierung der CAR erfordert eine posttranslationelle Modifikation. Hierfür wird die Übertragung des Phosphopantetheinylrests auf ein Serin der CAR durch die *Norcadia phosphopantetheine transferase* (NPT) katalysiert [Venkitasubramanian *et al.*, 2007], weswegen auch das Gen für dieses Enzym in die Expressionskaskade integriert wurde. Die Gene der TAL, CAR, CAD und NPT wurden in einem Polycistron mit zunehmender Aktivität der Genprodukte angeordnet. Die TAL zeigt zwar mit $0,003 - 0,01 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ [Vannelli *et al.*, 2007; Xue *et al.*, 2007; Liang *et al.*, 2016] eine höhere katalytische Effizienz als die CAR mit $0,003 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ [Finnigan *et al.*, 2017]. Die publizierten kinetischen Werte für die TAL aus *Rhodotorula glutinis* schwanken allerdings sehr stark, sogar innerhalb einer Arbeitsgruppe [Zhu *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2016]. Für homologe Enzyme aus anderen Organismen wurde bereits darauf hingewiesen, dass publizierte Werte nicht reproduziert werden konnten [Vannelli *et al.*, 2007; Jendresen *et al.*, 2015]. Die Ursachen hierfür werden in erster Linie die unterschiedlichen Reaktionsbedingungen sein, da die TAL-Aktivität eine starke Abhängigkeit vom pH-Wert [Xue *et al.*, 2007; Cui *et al.*, 2015] und der Reaktionstemperatur [MacDonald *et al.*, 2016] zeigt. Außerdem wurde bei den Messungen oft die bekannte Produktinhibierung, die ebenfalls einer pH-Abhängigkeit unterliegt [Sariaslani, 2007], und eine postulierte Substrathemmung [MacDonald *et al.*, 2016] nicht in Betracht gezogen. Bei optimalen Reaktionsbedingungen besitzt die TAL aus *Rhodotorula glutinis* den publizierten Werten nach eine höhere katalytische Effizienz als die CAR aus *Norcadia iowensis*. Allerdings ist auch bekannt, dass die TAL bei Überexpression in *E. coli* zur Aggregation neigt [Santos *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2012] und somit den limitierenden Schritt in der Monolignolsynthese darstellt [Jansen *et al.*, 2014]. Die Produktinhibierung der TAL führt ebenfalls zu einer Limitierung an Tyrosinumsatz, sodass zunächst der erste Schritt als geschwindigkeitsbestimmend für die gesamte Kaskade anzusehen ist. Die CAD hingegen erreicht eine katalytische Effizienz von $0.252 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ [Ma, 2010] und sollte damit keine Limitierung hervorrufen. Da es sich bei der NPT um ein Hilfsenzym, das nicht in der Reaktionskaskade involviert ist, handelt, wurde dieses Gen an letzter Position angeordnet. Das Polycistron (Abbildung 4, B) steht unter der Kontrolle des T7-Promotors, wodurch hohe intrazelluläre Proteinkonzentrationen und somit hohe Umsatzraten erzielt werden sollten [Studier und Moffatt, 1986]. In der gleichen Arbeitsgruppe wurde ebenfalls eine Ineffizienz des T7-Terminators angedeutet, die durch andere Arbeitsgruppen bestätigt

werden konnte [Carter *et al.*, 1981; Macdonald *et al.*, 1994; Mairhofer *et al.*, 2015]. Das so hervorgerufene sogenannte *read-through* führt zu einer höheren Kopienzahl des Plasmids in der Zelle und somit zu einer höheren metabolischen Last, die sich in geringeren Ausbeuten des rekombinanten Proteins äußert. Analog zur Literatur wurde ein, in der *loop*-Region modifizierter T7-Terminator (T7 Φ) verwendet, wodurch die freie Energie der RNA um 26 % erhöht wird (Abbildung 5). Außerdem wurde zusätzlich der gegenüber der T7-RNA-Polymerase wirksame *rrnB* T1-Terminator [Orosz *et al.*, 1991; Lyakhov *et al.*, 1998] stromabwärts vom T7 Φ -Terminator kodiert, der in Kombination die Terminationseffizienz auf 99 % erhöhen sollte [Mairhofer *et al.*, 2015].

Eine stabile Expression rekombinanter Gene erfordert die Aufrechterhaltung der Plasmidstabilität durch eine effiziente Replikationskontrolle und Plasmidverteilung auf beide Tochterzellen nach der Zellteilung. Multimerbildung durch homologe Rekombination bildet hierbei eine wichtige Ursache der Plasmidinstabilität [Patient und Summers, 1993]. Plasmidmultimere können mit Hilfe des spezifischen Rekombinationssystems *Xer-cer* des ColE1-Plasmids zu Monomeren aufgelöst werden. Dabei handelt es sich um eine 240 bp-lange Sequenz, die neben regulatorischen Elementen eine Schnittstelle für die Rekombinase XerCD enthält [Summers, 1998; Field und Summers, 2011]. Das Einfügen dieser Sequenz in einen pUC-Vektor erzielte eine fast 100 % Plasmidstabilität nach 80 Generationen. Im Vergleich dazu zeigte der Kontrollvektor bereits nach 20 Generationen eine sehr geringe Stabilität von weniger als 1 % [Patient und Summers, 1993]. Aus diesem Grund wurde die *cer*-Sequenz in der vorliegenden Arbeit verwendeten Vektor eingefügt.

4.2 Etablierung der Probenaufbereitung für die HPLC

Zunächst sollte ein robustes Protokoll zur Vorbereitung der HPLC-Proben ausgearbeitet werden, um eine verlässliche quantitative Analyse zu ermöglichen. Die Vorbereitung in Anlehnung an die Literatur [Furuya *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2012; Zhang und Stephanopoulos, 2013; Wu *et al.*, 2015] offenbarte eine vollständige Extraktion und Wiederfindung von Kumarsäure. Die Extraktion von Kumarylalkohol erschien ebenfalls vollständig, da die wässrige Phase nach der Extraktion keine Absorption durch Kumarylalkohol aufwies. Aufgrund der niedrigen Wiederfindungsrate mittels Absorptionsmessung wurden unterschiedliche Varianten des Verdampfens der organischen Phase und verschiedene Lösungsmittel zur Resolubilisierung des Feststoffes untersucht. Erst das Lösen des Pellets in 50 % Acetonitril erzielte reproduzierbar hohe Wiederfindungsraten von 99 %. Das endgültige Protokoll wurde auf die erschwerte Lösbarkeit von Kumarylalkohol nach dem Einengen durch Glycerinzugabe zur organischen Phase und Lösen in 50 % Acetonitril angepasst. Anschließend wurde gezeigt, dass die Stabilität der beiden Substanzen bei erhöhter Temperatur und im Reaktionsmedium in Gegenwart und Abwesenheit von Zellmetaboliten gewährleistet war. Einige Bakterien- und Hefestämme sind in der Lage, auf Kumarsäure als Kohlenstoffquelle zu wachsen,

wobei der erste Schritt eine Deacetylierung oder Decarboxylierung darstellt [Sutherland *et al.*, 1983; Gurujeyalakshmi und Mahadevan, 1987; Mukai *et al.*, 2010]. Die B-Stämme von *E. coli* können allerdings weder die Kumarsäure als Energiequelle nutzen noch akzeptieren deren vorhandene Decarboxylasen Kumarsäure als Substrat [Lindsay und Priest, 1975; Burlingame und Chapman, 1983; Prieto *et al.*, 2004]. Weitere Wege zum Abbau bzw. Umwandlung von Kumarsäure sind in der Literatur nicht bekannt. Auch liegen keine Daten für Kumaraldehyd oder Kumarylalkohol vor. Die gleichbleibende Konzentration von Kumarsäure und Kumarylalkohol nach Inkubation mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämmen beweist, dass diese Stämme nicht in der Lage sind, die Substanzen zu verstoffwechseln oder degradieren.

4.3 Identifikation und Quantifizierung der Substanzen im Kulturüberstand von BL21 Gold (DE3) pTCCN

Das Chromatogramm des Kulturüberstands von BL21 (DE3) pTCCN nach Inkubation mit Tyrosin (Abbildung 8) zeigt fünf deutlich voneinander getrennte Signale, wobei zwei davon mit Hilfe von gekauften Standards als Kumarsäure und Kumarylalkohol identifiziert werden konnten. Das verwendete Substrat Tyrosin kann von *E. coli* als Stickstoffquelle verwendet werden. Die erste Reaktion dieses Abbauweges wird durch eine Transaminase katalysiert, wobei die Produkte 4-Hydroxyphenylpyruvat und Glutamat (TyrB) bzw. Aspartat (AspC) entstehen [Gelfand und Rudo, 1977; Voet *et al.*, 2010]. Durch die Identifikation des Signals für 4-Hydroxyphenylpyruvat im Kulturüberstand konnte der Abbau des Substrats verifiziert werden. Über diesen Weg wird nur ein relativ geringer Teil des Substrats verloren (50 $\mu\text{M}/\text{h}$). Außerdem wurde die Instabilität dieser Substanz bestätigt (Abbildung 9). Aus früherer Literatur ist der Zerfall von 4-Hydroxyphenylpyruvat zu 4-Hydroxybenzaldehyd und Oxalacetat in Gegenwart von Kupferionen oder im basischen Milieu bekannt [Pitt, 1962; Rose und Powell, 1963; Nierop Groot und de Bont, 1998]. Das Zersetzungsprodukt von 4-Hydroxyphenylpyruvat konnte im Kulturüberstand als 4-Hydroxybenzaldehyd sowohl anhand der Retentionszeit als auch des Absorptionsspektrums detektiert werden. Der verbleibende, nicht identifizierte Peak 3 in der Abbildung 8 konnte mit der Massenspektrometrie als Kumaraldehyd identifiziert werden (Abbildung 10). Mit dieser Methode war es also möglich, klar aufgelöste Signale zu erhalten und zum einen alle Intermediate der Expressionskaskade, zum anderen die Abbauprodukte des Substrates zu identifizieren und zu quantifizieren. Sie ist dementsprechend hervorragend für die Analyse sämtlicher Proben geeignet.

4.4 Vorversuche zur Expression und Aktivität von BL21 Gold (DE3) pTCCN

Der erste Expressionstest des Konstruktes pTCCN in BL21 Gold (DE3) ergab, dass mittels SDS-PAGE keine Banden für die Enzyme unter Verwendung eines LB-Mediums detektiert werden konnten

(Abbildung 12). Ein Plasmidverlust konnte mit Hilfe einer Kolonie-PCR ausgeschlossen werden. Da das Plasmid stabil propagiert wurde, wurde ein anderes Medium zur Genexpression untersucht. TB-Medium ist reicher als LB-Medium und beinhaltet Glycerin als Kohlenstoffquelle, was zum schnelleren Wachstum und höheren Zelldichten führt. Durch eine höhere Zellkonzentration wird der Anteil an rekombinanten Enzymen ebenfalls erhöht. Aufgrund des Puffereffekts von Kaliumphosphat verzögert sich außerdem die Sterbephase [Kram und Finkel, 2015]. In der SDS-PAGE-Analyse der Kultivierung im TB-Medium konnte ein Signal auf der Höhe des Molekulargewichts der CAR, welches in der Leervektorkontrolle nicht vorhanden war, detektiert werden (Abbildung 13). Da das Signal jedoch sehr schwach war, wurde die Genexpression bei geringerer Temperatur durchgeführt (Abbildung 14). Durch den verlangsamten Metabolismus bei geringerer Temperatur und die dadurch verringerte Translationsrate findet der Faltungsprozess verlangsamt statt, was die Ausbeute an korrekt gefalteten rekombinanten Protein erhöhen kann [Baneyx, 1999; Rosano und Ceccarelli, 2014]. Die Expression bei 16 °C zeigt eine deutlich höhere Proteinmenge der Enzyme TAL, CAR und NPT. Die Expression der CAD hingegen schien auch bei niedriger Expressionstemperatur keine Proteinmenge zu liefern. Da das Konstrukt als Polycistron konstruiert wurde, sollten alle vier Gene gleich effizient transkribiert werden. Auch die Ribosomenbindestellen waren identisch, sodass von ähnlicher Translationseffizienz ausgegangen werden kann. Eine mögliche Erklärung für die geringe Ausbeute an CAD ist, dass das Protein anfälliger für Proteinabbau ist. Hierfür gibt es allerdings bisher keine Anzeichen in der Literatur. Auch die Analyse der Menge an CAD über den gesamten Expressionszeitraum ergab kein deutliches Bandensignal für eine Überexpression zu einem früheren Zeitpunkt der Induktion (Anhang 5, S. 117). Dagegen war nach der Expression des Einzelgens ein deutliches Proteinsignal im SDS-PA-Gel zu beobachten. Die Expression des einzelnen Gens zeigte ein Laufverhalten des Genproduktes im PA-Gel bei ca. 43 kDa. Auf dieser Höhe wurde auch ein prominentes Signal eines *E. coli* eigenen Proteins beobachtet, wodurch eine schwache Expression des CAD-Gens mittels SDS-PAGE schwer zu detektieren ist. Die spezifische Analysemethode, z. B. mittels *western blot* bzw. eine Verbesserung der CAD-Genexpression wurde als nicht notwendig erachtet, da der Aktivitätstest des gesamten Konstrukts keine Limitierung durch die CAD-katalysierte Reaktion zeigte. Es konnten 233 µM Kumarylalkohol im Kulturüberstand von BL21 Gold (DE3) pTCCN nach Inkubation mit 500 µM Tyrosin nachgewiesen werden. Die Intermediate Kumarsäure und Kumaraldehyd akkumulierten nur zu sehr geringen Anteilen. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die produzierten Substanzen effektiv aus der Zelle ins Medium abgegeben werden (Anhang 6, S. 118). Kumaraldehyd und Kumarylalkohol sind vermutlich in der Lage frei durch die Membran zu diffundieren [Sikkema *et al.*, 1995]. Für Kumarsäure gibt es Hinweise auf einen aktiven Transport durch das Effluxsystem von *E. coli* [Sariaslani, 2007].

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal die Kombination aus TAL, CAR und CAD zur Kumarylalkoholproduktion in *E. coli* erfolgreich eingesetzt. Eine frühere Publikation konnte fast keine Aktivität der CAR aus *Mycobacterium marinum* gegenüber der Kumarsäure *in vivo* beobachten [Chen *et al.*, 2017]. Die Literatur schreibt der CAR aus *Mycobacterium marinum* verglichen zum hier verwendeten Enzym aus *Norcadia iowensis* ein breiteres Substratspektrum zu, so dass von einer möglichen Umsetzung der Kumarsäure auszugehen ist [Akhtar *et al.*, 2013; Moura *et al.*, 2016]. Im Gegensatz zur Literatur wurden in der vorliegenden Arbeit die Gene für CAR und NPT aus *Norcadia iowensis*, d. h. demselben Organismus, verwendet, was eventuell einen positiven Effekt auf die Aktivierung der CAR gezeigt hat. Allerdings verwies die Gruppe um Venkitasubramanian auf die Austauschbarkeit der Phosphopantetheintransferasen aus verschiedenen Organismen zur Aktivierung der CAR [Venkitasubramanian *et al.*, 2007]. Der ausschlaggebende Unterschied scheint die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Optimierung der Codonverwendung zu sein. Es gibt zahlreiche Publikationen, die beweisen, dass eine Anpassung selten genutzter Codons in einem heterologen Organismus bis zu 140-fach höheren Proteinmengen führen kann [Gustafsson *et al.*, 2004]. Aufgrund von frühzeitiger Termination oder Leserasterverschiebung kann neben der Quantität kann auch die Qualität des Zielproteins darunter leiden [Kane, 1995]. Für die in der vorliegenden Arbeit verwendete TAL konnte bereits ein positiver Effekt der Anpassung der Codons an den Expressionsorganismus gezeigt werden [Liang *et al.*, 2016]. Das Expressionskonstrukt konnte erfolgreich in BL21 Gold (DE3) transformiert und propagiert werden. Außerdem wurden alle rekombinanten Proteine in ihrer aktiven Form produziert, ohne dass die Intermediate der Kaskade in hohen Konzentrationen akkumulierten.

4.5 Umsetzung von Tyrosin mit wachsenden Zellen im Minimalmedium

Um hohe Produktivitäten zu generieren, wurde eine kontinuierliche Fermentation angestrebt. Hierbei wird ein konstanter Zufluss an Medium in den Fermenter geleitet, während gleichzeitig Fermentationsbrühe zu gleichen Anteilen abgeführt wird. Bei geeigneter Zuflussrate befinden sich die Zellen dabei dauerhaft im exponentiellen Wachstum und haben somit metabolisch die besten Voraussetzungen für die heterologe Proteinproduktion. Das führt dazu, dass eine hohe volumetrische Effizienz und hohe Umsatzraten erzielt werden können. Verglichen zur *batch*-Fermentation werden außerdem durch das ständige Abführen des Mediums eventuelle Substrat- oder Produktinhibierungen minimiert [Mears *et al.*, 2017]. Um die kontinuierliche Fermentation optimal kontrollieren zu können, erfordert sie die Verwendung eines definierten Mediums. Hierfür hat sich das oft verwendete M9-Minimalmedium bewährt [Jenzsch *et al.*, 2007]. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Stamm BL21 Gold (DE3) pTCCN zeigte allerdings weder Wachstum auf Agarminimalmediumplatten noch im Flüssigmedium. Dass um ein Gen verkürzte Expressionskonstrukte das Wachstum von BL21 Gold (DE3) nach Transformation zuließen, lässt die

Schlussfolgerung zu, dass die Kombination aller Genprodukte einen toxischen Effekt auf *E. coli* im Minimalmedium zeigt, im Komplexmedium dieser aber kompensiert werden kann. Bis auf eine Gruppe [Jansen *et al.*, 2014] erfolgte die Kultivierung der Kumarylalkoholproduzierenden Stämme aus der Literatur im LB-Medium [van Summeren-Wesenhagen *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017] oder im Minimalmedium, das mit Hefeextrakt versetzt wurde [Chen *et al.*, 2017], was bereits auf eine schwierige Minimalmediumkultivierung deutete. Jansen *et al.* zeigten eine sehr geringe Kumarylalkoholkonzentration bei Wachstum im Minimalmedium begründet durch eventuelle Nebenreaktionen des Tyrosins und/oder einen limitierten Tyrosinpool [Jansen *et al.*, 2014]. Eine mögliche Ursache für die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit könnte der undichte *lac*-Promotor im T7-Induktionssystem sein. Ein Effekt, der in der Literatur schon beschrieben wurde [Studier und Moffatt, 1986]. Durch eine so ausgelöste Basalexpression der heterologen Gene, ist es möglich, dass aromatische Aminosäuren, insbesondere Tyrosin, dem Metabolismus durch die Kaskade entzogen werden und die Zellen nicht überlebensfähig sind. Versuche zur Supplementierung des Minimalmediums mit den entsprechenden Aminosäuren führten allerdings nicht zum Wachstum. Mögliche Ursachen für das fehlende Wachstum können zum Beispiel eine Toxizität einer der drei möglichen Produkte der Kaskade oder ein Zusammenspiel mehrerer Ursachen sein. Die konstitutive Expression des T7-Lysozym soll durch Bindung und Inhibierung der T7-RNA-Polymerase die Basalexpression unterdrücken [Studier, 1991]. Aber auch das zeigte nicht den gewünschten Erfolg. Selbst die Abwesenheit des Gens der T7-RNA-Polymerase im Stamm BL21 pTCCN konnte das fehlende Wachstum nicht wiederherstellen, was auf eine Transkription durch eine *E. coli*-Polymerase unabhängig vom T7-Promotor hinweist. Sogenannte *read-through events* in Plasmiden ermöglichen die Transkription von Genen, die stromabwärts der betroffenen abgelesenen Region liegen [Friesen *et al.*, 1983; Proshkin *et al.*, 2010]. Wenn dies im hier verwendeten Plasmid pTCCN der Fall ist, wäre bereits eine sehr geringe Konzentration der Genprodukte toxisch. Anscheinend kann diese Toxizität durch die Bereitstellung von Peptiden oder gereinigter Aminosäuren kompensiert werden (Tabelle 13, S. 51). Die Gruppe um Rodriguez hat gezeigt, dass bei Kumarsäureüberproduktion in *Saccharomyces cerevisiae* (ca. 2 g/L) Gene, die in der Aminosäure- und Proteinbiosynthese involviert sind, runterreguliert werden [Rodriguez *et al.*, 2017]. Allerdings ist eine ähnliche Antwort auf Kumarsäure in *E. coli* nicht bekannt. Die publizierte Toxizität von Kumarsäure in *Saccharomyces cerevisiae* gibt lediglich einen möglichen Hinweis auf die Art der Toxizität hergerufen durch das Expressionskonstrukt. Weitere Untersuchungen bezüglich der fehlenden Kultivierung im Minimalmedium und deren Ursachen wären also erforderlich. Eine mögliche Methode, die Kultivierung von BL21 Gold (DE3) pTCCN im Minimalmedium zu umgehen, wäre eine Cokultivierung von Stämmen, die Teile des Konstrukts beinhalten. Erste Versuche liefen hierzu mit der getrennten Kultivierung der beiden Stämmen BL21 Gold (DE3) pTAL und BL21 Gold (DE3) pCCN im

Minimalmedium und anschließender Mischkultur zur Tyrosinumsetzung. Die Untersuchungen lieferten recht vielversprechende Ergebnisse mit einer Produktion von 500 μM Kumarylalkohol aus 2500 μM Tyrosin (Abbildung 15). Eine Optimierungsstrategie könnte die Produktkonzentration deutlich erhöhen. Zahlreiche Publikationen zeigen die Optimierung von Cokulturen zur heterologen Synthese verschiedener pflanzlicher Stoffe als eine aussichtsreiche Alternative zur herkömmlichen Monokultur mit bis zu 970-fach höheren Produktkonzentrationen auf [Zhang *et al.*, 2015; Jones *et al.*, 2016; Ganesan *et al.*, 2017]. Hierbei beschränkt sich die Kultivierung nicht nur auf *E. coli-E. coli*-Cokulturen, auch Multispezieskulturen wurden bereits beschrieben mit erstmaliger Synthese komplexer Moleküle in Mikroorganismen ausgehend von einfachen Zuckern [Zhou *et al.*, 2015]. Die Modularisierung und Aufteilung des heterologen Stoffwechselweges auf zwei verschiedene Organismen bieten die Vorteile der verminderten metabolischen Belastung und eine schnellere Stoffwechselwegoptimierung. Außerdem ermöglichen sie die Wahl eines geeigneten Expressionsorganismus für die verschiedenen Ansprüche der beteiligten Enzyme [Chen *et al.*, 2018; Jones und Wang, 2018]. Eine Reduktion von Nebenreaktionen konnte ebenfalls schon mit Hilfe von Cokultivierung erzielt werden [Chen *et al.*, 2017]. Allerdings erfordert sie die Überwachung und Kontrolle der Populationsdynamik (auch im großen Maßstab) und das Potential ausgewählte Intermediate zwischen den verwendeten Organismen zu transportieren [Jones und Wang, 2018].

4.6 Etablierung von ruhenden Zellen zur Bildung von Kumarylalkohol

Die Experimente zur Kultivierung im Minimalmedium haben gezeigt, dass ein Wachstum von Zellen, die die Kaskade enthalten, nicht möglich war. Um Wachstum und Produktionsphase voneinander zu trennen, wurden ruhende Zellen auf ihre Eignung zur Umwandlung von Tyrosin untersucht. Hierbei handelt es sich um intakte, metabolisch aktive Zellen, die aber aufgrund Depletion einer oder mehrerer essentieller Nährstoffe nicht proliferieren [Kadisich *et al.*, 2017]. Der Einsatz von ruhenden Zellen besitzt die Vorteile die erleichterten Produktisolierung, verringerte Nebenproduktbildung [Carballeira *et al.*, 2009] und erhöhte Produktausbeute aufgrund geringerer Biomassebildung [Julsing *et al.*, 2012]. Da in dem hier vorliegenden Prozess die Genexpression von der Tyrosinumwandlung abgekoppelt wurde, sollte zunächst ein Verfahren zur Lagerung der Zellen entwickelt werden. Die Notwendigkeit des Zusatzes von Glycerin während des Einfrierprozess und der Lagerung wird aus Abbildung 16 deutlich. Außerdem zeigte sich, dass der Einfrierprozess mit Glycerin keinen starken Aktivitätsverlust nach sich zieht. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass Wildtyp-*E. coli* nicht in der Lage ist, die gewünschten Phenylpropanoide zu synthetisieren und die beobachtete Aktivität eindeutig den heterologen Genprodukten zugeordnet werden kann.

Während der Atmung können in *E. coli* reaktive Sauerstoffspezies, wie Superoxidationradikale oder Hydrogenperoxid entstehen [Cabiscol *et al.*, 2000]. Diese können möglicherweise mit den

oxidationsanfälligen und reaktiven Verbindungen Kumaraldehyd oder Kumarylalkohol reagieren und die Ausbeute schmälern [Wei *et al.*, 2004]. *E. coli* ist in der Lage, anaeroben Metabolismus zu betreiben, wodurch die Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies ausbleibt. Zusätzlich zeigen anaerobe Kulturen oft höhere intrazelluläre NADH/H⁺-Konzentrationen [de Graef *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2010]. Der Organismus verfügt über Enzyme, die über eine Transhydrogenase- oder eine Kinasereaktion NADH/H⁺ zu NADPH/H⁺ umwandeln [Sauer *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2010]. Sowohl die Reaktion der CAR als auch die der CAD benötigen den reduzierten Cofaktor NADPH/H⁺ für die katalysierten Reaktionen. Zur Überprüfung, ob in diesem Fall die anaerobe Biotransformation zu höheren Produktkonzentrationen führt, wurden die Reaktionen der ruhenden Zellen in Gegenwart von Sauerstoff und unter Sauerstoffausschluss durchgeführt (Abbildung 17). Sowohl die aerobe als auch die anaerobe Kultivierung erzielten Kumarylalkohol als Hauptprodukt, wobei sich die Gegenwart von Sauerstoff als vorteilhafter herausstellte (95 % mehr Kumarylalkohol). Die etwaige Bildung reaktiver Sauerstoffspezies scheint offensichtlich keinen negativen Einfluss auf die Kumarylalkoholbildung zu haben. Der aerobe Metabolismus scheint besser für die Bildung von Kumarylalkohol geeignet zu sein als der anaerobe. Diese Schlussfolgerung könnte durch die effektivere ATP-Produktion während der Atmung zu sein [Voet *et al.*, 2010], da ATP ein notwendiger Cofaktor während der Reaktion der CAR ist. Unter aeroben Bedingungen und bei Verwendung von Glukose als Kohlenstoffquelle wird in *E. coli* NADPH/H⁺ über drei Stoffwechselwege regeneriert: (1) Pentosephosphatweg, (2) Citratzyklus und (3) Transhydrogenasesystem [Sauer *et al.*, 2004]. Die dabei entstehenden Mengen des reduzierten Cofaktors scheinen ausreichend für die heterologe Umwandlung von Tyrosin zu Kumarylalkohol zu sein.

Die ruhenden Zellen sind für die Bildung von Kumarylalkohol geeignet und werden für die folgenden Experimente eingesetzt.

4.6.1 Einfluss der Expressions- und Reaktionstemperatur auf die Kumarylalkoholbildung

Für die Expression heterologer Gene in *E. coli* kann die Temperatur während der Translation einen entscheidenden Effekt auf die Proteinproduktion haben [Baneyx, 1999; Rosano und Ceccarelli, 2014]. Insbesondere für die Expression pflanzlicher Gene in Bakterien werden oft verminderte Temperaturen nach der Induktion eingestellt [Hwang *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2016; Lv *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2017]. Auch die Reaktionstemperatur nimmt Einfluss auf die Produktbildung, da Enzyme am Temperaturoptimum ihre höchste Aktivität zeigen. In der Literatur erzielte die Genexpression der in der vorliegenden Arbeit verwendeten TAL nach Translation bei 25 – 30 °C in *E. coli* ein aktives Enzym [Vannelli *et al.*, 2007; Jendresen *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2016]. Für die Translation der heterologen Gene für die CAR und die NPT wurden in den bisherigen Publikationen Temperaturen im Bereich von

20 - 25 °C angewandt, um ein aktives Enzym zu erhalten [Duan *et al.*, 2015; Moura *et al.*, 2016; Finnigan *et al.*, 2017]. Auch während der Induktion des Gens für die CAD in *E. coli* wurden Temperaturen zwischen 16 – 28 °C für die Produktion des aktiven Enzyms gewählt [Kim *et al.*, 2004b; Zhao *et al.*, 2013b]. Für die in dieser Arbeit verwendete Kombination aller vier Gene wurde eine bevorzugte Expressions- und Reaktionstemperatur untersucht. Obwohl das Proteinlevel bei den untersuchten Temperaturen (16, 24 und 37 °C) mittels SDS-PAGE nicht unterschieden werden konnte, ist bei 16 und 24 °C eine höhere Aktivität aller vier Genprodukte zu verzeichnen (Abbildung 18). Hierfür sind vermutlich Aggregationen der Zielprotein bei höheren Temperaturen, die als *inclusion bodies* keine Aktivität aufweisen, verantwortlich [Leonard *et al.*, 2006]. Die Untersuchung der Reaktionstemperatur zeigt eindeutig eine höhere Aktivität bei 37 °C. Das ist durch die Temperaturoptima der TAL und der CAR bei 37 [MacDonald *et al.*, 2016] bzw. 42 °C [Finnigan *et al.*, 2017] begründet [MacDonald *et al.*, 2016; Finnigan *et al.*, 2017]. Die CAD aus *T. aestivum* ist bekanntermaßen temperatursensitiv und zeigt bei 16 °C eine höhere Aktivität als bei 37 °C [Ma, 2010]. Allerdings wird die Reduktion des Kumaradehyds zu Kumarylalkohol auch durch *E. coli*-eigene Enzyme katalysiert, sodass ein eventueller Aktivitätsverlust bei einer Inkubation bei 37 °C wahrscheinlich kompensiert werden konnte (Anhang 7, S. 118). Hierin zeigt sich ein Vorteil von ruhenden Zellen: Durch das Entkoppeln der Katalysator- von der Kumarylalkoholproduktion können beide Phasen separat voneinander optimiert werden, um die höchstmögliche Produktkonzentration zu erhalten. Mit den ermittelten Werten für die Expression und Reaktion wurde eine erfolgreiche Übertragung in den 400 mL-Bioreaktormaßstab unter Komplettumsatz von 1 mM Tyrosin zu Kumarylalkohol durchgeführt (Abbildung 19).

4.7 Kumarylalkoholbildung in BL21 Gold (DE3) pTCCN

Obwohl der Komplettumsatz von 1 mM Tyrosin zu Kumarylalkohol mit ruhenden Zellen gelang, konnten keine höheren Produktkonzentrationen bei höheren Substratkonzentrationen (2,5 mM Tyrosin) trotz ausreichender Glycerinmengen als Energiequelle erzielt werden (Abbildung 20). Möglicherweise lag eine Cofaktorlimitierung der NADPH/H⁺-abhängigen CAR- und CAD-Reaktion vor, da beim Metabolismus von Glycerin ein Engpass an NADPH/H⁺ entstehen kann [Yao *et al.*, 2016]. Im Gegensatz zu Glycerin kann Glukose direkt in den Pentosephosphatweg zugeführt werden [Voet *et al.*, 2010]. In diesem Stoffwechselweg werden unter aeroben Bedingungen in *E. coli* 35 -45 % der intrazellulären NADPH/H⁺-Konzentration generiert [Sauer *et al.*, 2004]. Die Zugabe von Glukose zu den ruhenden Zellen, die mit Tyrosin inkubiert wurden, erzielte jedoch eine ähnliche Progresskurve (Abbildung 20). Auch über einen längeren Reaktionszeitraum nahm die Produktkonzentration im Kulturüberstand trotz genügender Substrat- und Kohlenstoffquelle nicht zu. Da während dieses Experiments die Abnahme der Glukosekonzentration sank, wurde geprüft, ob durch Veränderung des

Reaktionsmediums der Zellmetabolismus über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten und somit die Stagnation der Produktbildung verhindert werden kann (Abbildung 21). Die Verwendung von Minimalmedium ohne Stickstoffquelle erzielte keine Veränderung in der Bildung von Kumarylalkohol in BL21 Gold (DE3) pTCCN. Erst die Verwendung vom kompletten Minimalmedium erzielte leicht höhere Produktkonzentrationen. In Ganzzellkatalysatoren bestimmt die zelluläre Homöostase den intrazellulären pH-Wert und die Osmolarität, was wiederum Einfluss auf die Enzymstabilität hat [Kadisich *et al.*, 2017]. Demzufolge wird die Enzymstabilität aufrechterhalten, so lange die Zellintegrität und Vitalität gegeben sind. Es ist möglich, dass die hier gewählten Bedingungen der ruhenden Zellen einen negativen Einfluss auf die Zellvitalität und somit auf die Enzym- und Prozessstabilitäten hatten. Ein mögliches Indiz hierauf könnten die sinkenden OD₆₀₀-Werte sein, die auf ein Absterben der Kultur deuten können (Abbildung 19). Chen *et al.* beschreiben eine Abhängigkeit der Kumarsäureproduktion vom Wachstum [Chen *et al.*, 2017]. Es ist möglich, dass die Verwendung des vollständigen Minimalmediums (Abbildung 21) einen leicht positiven Effekt auf den Metabolismus und somit auf die Kumarsäure- und folglich auch auf die Kumarylalkoholproduktion hat. Unter Stressbedingungen, wie zum Beispiel Stickstofflimitierung, wie hier bei der Verwendung der ruhenden Zellen, akkumuliert Polyphosphat [Ault-Riché *et al.*, 1998], was wiederum die Aktivität der Lon-Protease initiiert [Kuroda *et al.*, 2001]. Zusammen mit Clp sind diese beiden Proteasen für 60 - 70 % der proteolytischen Aktivität im Cytoplasma von *E. coli* zuständig [Maurizi, 1992]. Der proteolytische Katalysatorabbau in Abwesenheit einer Stickstoffquelle könnte ebenfalls eine Ursache für niedrigere Produktkonzentrationen sein, verglichen zur Reaktion im Vollmedium. Diese Hypothese liefert auch eine mögliche Erklärung, warum die Verwendung des Minimalmediums ohne Stickstoffquelle die gleiche Progresskurve liefert wie Phosphatpuffer mit Glukose als Reaktionsmedium. Der gleiche Effekt konnte bereits bei der Produktion von Limonen in *E. coli* beobachtet werden [Willrodt *et al.*, 2016]. Ein Mediaustausch zur Entfernung putativ toxischer Verbindungen, die sich im Laufe der Reaktion ansammeln könnten, erzielte nur leicht höhere Produktkonzentration mit stetig sinkender Kumarylalkoholbildungsrate (Abbildung 22). Als Ursache für die Stagnation der Produktbildungsrate konnte das verwendete Reaktionsmedium nicht identifiziert werden.

Die Epoxidation von Styrol in ruhenden Zellen von *E. coli* hatte ebenfalls einen steten Abfall der Produktbildungsrate im Verlauf der Reaktion gezeigt. Als eine Ursache wurde die Instabilität der Reduktasekomponente der Styrolmonooxygenase identifiziert [Julsing *et al.*, 2012]. In der hier vorliegenden Arbeit konnte eine leichte Aggregation der Enzyme TAL und insbesondere CAR festgestellt werden. Anders als bei der TAL wurde zusätzlich ein Aktivitätsverlust der CAR/CAD nach 5 h Reaktion festgestellt. Dies würde eine geringere Produktbildungsrate über die Reaktionszeit erklären, allerdings nicht den kompletten Stillstand der Kumarylalkoholbildung. Eine Alternative für

die Erlangung ruhender Zellen ist die Depletion von Magnesium im Reaktionsmedium [Chubukov und Sauer, 2014]. So ist die Synthese von Aminosäuren und Proteinen möglich, während die zur Verfügung stehende Energie nicht zur Biomasseproduktion entzogen wird. Je nach Art des Mangels zeigt *E. coli* andere physiologische Merkmale. Bei Stickstoffmangel weisen die Zellen nur 5 % metabolische Aktivität verglichen zur exponentiellen Wachstumsphase auf. Dagegen entspricht bei Magnesiummangel die Glukoseaufnahme 50 % der in der exponentiellen Wachstumsphase. Nichtsdestotrotz konnte eine Kumarylalkoholkonzentration von 1,8 mM durch Inkubation von BL21 Gold (DE3) pTCCN in Minimalmedium mit 2,5 mM Tyrosin synthetisiert werden. Da Kumarylalkohol stets das Hauptprodukt darstellte, wurde zunächst von einer Optimierung des Expressionkonstrukts wie die Veränderung der Ribosombindestelle, Mutation und Austausch von Promotoren oder Veränderung der Genreihenfolge abgesehen.

4.8 Kumarylalkoholbildung in BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN

Aufgrund der beobachteten Stagnation der Produktivität trotz vorhandener Enzym- und Glukosestoffwechselaktivität und keiner Akkumulation der Zwischenprodukte wurde der Substratimport als Ursache für die Limitierung der maximalen Produktkonzentration angesehen. Die Deletionsmutante BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN, die die Gene der Tyrosintransporter TyrP und AroP unkontrolliert exprimiert [Pittard, 1996], erzielte im Minimalmedium unter Tyrosin- und Glukosezugabe den Komplettumsatz von 3,4 mM Substrat zum Kumarylalkohol (Abbildung 25). Die Identität des Produkts konnte mittels HPLC, Absorption und Massenspektrometrie eindeutig nachgewiesen werden (Abbildung 26). Der Import des Substrats stellte also den limitierenden Schritt der Reaktionskaskade im *E. coli*-Wildtyp dar. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Genprodukte der eingeführten Expressionskaskade in diesem Stamm, das Substrat effizient in Richtung des Produktes ohne Abgang in Nebenreaktionen oder Akkumulationen von Nebenprodukten leitet. Jedoch konnte keine weitere Erhöhung der Produktmenge durch höhere Tyrosin- (17 mM) und Glukosezugabe erzielt werden und wiederum stellte sich eine Stagnation der Produktivität nach 5 – 6 h Reaktion ein (Abbildung 27). Es musste also eine weitere Ursache für den Abfall der Produktbildungsrate bis auf null geben. In diesem Stamm konnte kein Abbau oder Aggregation der heterologen Enzyme festgestellt werden (Abbildung 28). Die TAL zeigte zwar kaum veränderte Aktivität über den Reaktionszeitraum, es wurde hingegen deutlich weniger Kumarsäure umgesetzt (Abbildung 29). Anders als im Stamm BL21 Gold (DE3) pTCCN scheint die CAR allerdings nicht die Reaktionsgeschwindigkeit der Kaskade zu bestimmen, sodass die Progresskurve der Kumarylalkoholbildung im Zellextrakt am Ende der Reaktion der am Anfang gleicht.

Es konnte die Produktion von Kumarylalkohol in BL21 Gold (DE3) pTCCN und BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN etabliert werden. In allen Experimenten konnte eine Stagnation der Produktbildungsrate nach 3 - 6 h

Reaktion festgestellt werden. Verschiedene Faktoren wie die Substrat- und Cofaktorlimitierung, inhibitorische Effekte im Kulturüberstand, Veränderungen des Zellstatus durch ein verändertes Reaktionsmedium und Inaktivierung der beteiligten Enzyme konnten als hauptsächliche Ursachen ausgeschlossen werden. Obwohl ein kumulativer Effekt all dieser Faktoren vorliegen könnte, wurde vermutet, dass es eine grundlegende Ursache für den Verlust der Produktbildungsrate gibt. Die Aufhebung der Substratlimitierung durch einen verbesserten Import bewies dies durch eine deutliche Erhöhung der Produktkonzentration im Deletionsstamm. Allerdings konnte keine höhere Produktkonzentration als 3,5 mM trotz höherer Substratkonzentrationen (bis zu 19 mM Tyrosin) erreicht werden, so dass weitere Limitierungen für die Bildung von Kumarylalkohol vermutet werden. Eine putative Ursache für den Verlust der Produktbildung ist eine Toxizität durch das Produkt bzw. die Intermediate (siehe Abschnitt 4.10). Es müsste sich um eine Art der Toxizität handeln, die nicht durch einen Austausch des Mediums behoben werden kann. Eine Möglichkeit wäre der Einbau von Kumarylalkohol in die Zellmembran.

Ziel dieser Arbeit war es, die Monolignole Kumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol mit Hilfe eines biologischen Systems zu synthetisieren und bereitzustellen. Die zuvor durchgeführten Experimente fokussierten sich darauf, die Produktion von Kumarylalkohol in *E. coli* ausgehend von Tyrosin zu etablieren. Die Auswertung der Kultivierungsexperimente im Minimalmedium zeigte eine Notwendigkeit der Verfügbarkeit von Aminosäuren für das Wachstum. Um den Prozess besser analysieren und kontrollieren zu können, wurde die Anzucht der Zellen inklusive Genexpression im Komplexmedium von der Tyrosinumsetzung im definierten Medium voneinander getrennt. Da ein Limit von 3,8 mM Kumarylalkohol nicht überschritten werden konnte, sollten die Erkenntnisse beider Experimentreihen vereint werden. Hierfür wurde die Umsetzung durch Zugabe von Pepton im Reaktionsmedium verbessert werden. Der positive Effekt der Aminosäurequelle auf das Wachstum konnte auch auf die Produktion von Kumarylalkohol gezeigt werden (Abbildung 30). Die deutliche Steigerung der Produktkonzentration auf 5 mM gibt einen Hinweis darauf, dass das Potential zur Kumarylalkoholbildung in den Zellen durch das Produkt gehemmt wird, das aber durch Unterstützung des Metabolismus durch Aminosäurezugabe bis zu einem gewissen Grad kompensiert werden kann. Der hier erzielte Kumarylalkoholwert übertrifft die in der Literatur publizierten um 14 bzw. 52 %. Ausgehend von Kumarsäure konnte die Literatur 4,4 mM Kumarylalkohol generieren, mit Glukose als Substrat in einem Komplexmedium unter Verwendung eines Tyrosinüberproduzenten wurde der Wert von 3,3 mM Kumarylalkohol erreicht [Chen *et al.*, 2017].

In dieser Arbeit wurde die bisher höchste Kumarylalkoholkonzentration im Kulturüberstand von *E. coli* erreicht. Diese Substanz wurde nach Extraktion des Überstands mit Hilfe einer *Flash-*

Chromatografie gereinigt und mit Hilfe der HPLC und NMR identifiziert. Die biotechnologische Herstellung und Isolierung von Kumarylalkohol war im Labormaßstab erfolgreich.

4.9 Synthese der Monolignole durch Zugabe von Zimtsäurederivaten mit BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN

Der in der vorliegenden Arbeit generierte Stamm sollte auch zu Herstellung von Coniferyl- und Sinapylalkohol dienen. Kinetische Werte der CAR für Ferula- und Sinapinsäure als Substrat sind nicht bekannt. Allerdings zeigt dieses Enzym ein sehr breites Substratspektrum, das sich von aliphatischen Verbindungen (C2 bis C18) über poly- und heterozyklischen hin zu aromatischen Verbindungen unter anderem Zimtsäure erstreckt, so dass eine Umsetzung dieser Verbindung nahe lag [Winkler, 2018]. Bekanntermaßen akzeptiert die hier verwendete CAD aus *T. aestivum* Coniferyl- und Sinapylaldehyd als Substrate und setzt diese effizient um [Ma, 2010]. Dementsprechend wurde für die Produktion von Coniferylalkohol Ferulasäure als Substrat zum Produktionsstamm zugegeben (Abbildung 35). Der Stamm BL21 Δ tyrR:T7 pTCCN konnte 11,6 mM Endprodukt aus insgesamt 17 mM Ferulasäure produzieren, welches wie Kumarylalkohol aus dem Kulturüberstand isoliert und mittels HPLC und NMR identifiziert wurde. In der vorliegenden Arbeit gelang eine 3,1-fache Erhöhung der maximalen, publizierten Coniferylalkoholkonzentration hergestellt mit Hilfe eines mikrobiellen Systems ausgehend von Ferulasäure. Das gleiche Protokoll wurde für die Synthese des Monolignols Sinapylalkohol angewandt (Abbildung 39). Es wurden 5,6 mM Endprodukt aus 17 mM Sinapinsäure generiert. Bislang gelang die mikrobielle Synthese von Sinapylalkohol nur im niedrigen Konzentrationsbereich (140 μ M) [Aschenbrenner *et al.*, 2019]. In dieser Arbeit ist also eine 40-fache Erhöhung der Produktkonzentration im Kulturüberstand gelungen. Auch hier war die Isolierung aus dem Kulturüberstand erfolgreich. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Stamm in der Lage ist, höhere Produktkonzentrationen als 5 mM zu erzielen und die maximale Produktkonzentration vom Produkt abhängt. Eine mögliche Erklärung für den Stillstand der Produktbildung liefert eine putativ unterschiedliche Toxizität der drei Monolignole. Die gängige Annahme besagt, dass organische Verbindungen mit einem $\log P_{o/w}$ -Wert (als Maß für die Polarität einer Verbindung) bis zu 4 eine hohe Toxizität auf biologische Systeme aufweisen [Laane *et al.*, 1987]. Die Monolignole zeigen mit zunehmender Anzahl der Methoxygruppe einen abnehmenden $\log P_{o/w}$ -Wert von 1,36; 1,19 bzw. 1,01 und könnten dementsprechend einen toxischen Effekt auf Biokatalysatoren ausüben [EPA, 2012]. Ein mathematischer Zusammenhang zwischen $\log P_{o/w}$ und Inhibierung der biologischen Aktivität ist allerdings in diesem Bereich nicht gegeben [Laane *et al.*, 1987]. Ein Indiz hierfür liefert auch eine Publikation von Barber, die einen ähnlich starken Effekt für Kumaryl- und Sinapylalkohol auf das Wachstum von *E. coli* zeigten. Bei der Inkubation mit Coniferylalkohol hingegen konnte keine Inhibierung des Zellwachstums festgestellt werden [Barber *et al.*, 2000]. Die ähnlich hohen

Maximalwerte von Kumaryl- und Sinapylalkohol und der deutlich höhere Wert für Coniferylalkohol im Kulturüberstand können durch diese unterschiedlichen Toxizitäten begründet sein.

Aufgrund der erfolgreichen Experimente mit der Zugabe der Zimtsäurederivate sollte zum Vergleich Kumarylalkohol ausgehend von Kumarsäure synthetisiert werden. Frühere Publikationen erzielten bereits durch Kumarsäurezugabe höhere Produkttiter als bei der Produktion ausgehend von Tyrosin oder Glukose [Jansen *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2017]. Entgegen der Erwartung akkumulierten nur sehr geringe Mengen des Endprodukts (Abbildung 43). Zwar wirkt sich die Kumarsäure bekanntermaßen negativ auf das Zellwachstum von *E. coli* aus [Watts *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2015; Liang *et al.*, 2016], was sich hier aus den sinkenden OD₆₀₀-Werten und der sich akkumulierenden Glukose ableiten lässt. Allerdings liegen die detektierten Konzentrationen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Säuren Kumar-, Ferula- und Sinapinsäure über den minimal inhibitorischen Konzentrationen für *E. coli*, die alle in im Bereich von 2 - 4 mM anzusiedeln sind und dementsprechend eine ähnliche Toxizität aufweisen [Parkar *et al.*, 2008; Ergün *et al.*, 2011; Engels *et al.*, 2012]. Demzufolge kann die bloße Toxizität des Substrats nicht die Ursache für die unterschiedlichen Produktkonzentrationen sein. Im Vergleich zu Experimenten mit Tyrosin als Substrat konnten hier relativ hohe Kumaraldehydkonzentrationen detektiert werden (bis zu 2 mM). Aufgrund der bereits bekannten starken Produktinhibition der TAL aus *Rhodotorula glutinis* ($k_i = 20 \mu\text{M}$ bei pH 7,0 [Sariaslani, 2007]) wurden in den bisherigen Experimenten mit Tyrosinzugabe nur niedrige Kumarsäurekonzentrationen detektiert, wodurch die Umwandlung zum Kumaraldehyd durch die CAR ebenfalls eingeschränkt war. Durch die Zugabe hoher Konzentrationen an Kumarsäure zu der Kultur wurde die Substratlimitierung der CAR aufgehoben, sodass sich erstmals Kumaraldehyd akkumulieren konnte. Für die CAD aus Eukalyptus ist eine Substratüberschusshemmung bei bereits geringen Coniferylaldehydkonzentrationen beschrieben [Lauvergeat *et al.*, 1995]. Ein ähnlicher Mechanismus für die hier verwendete CAD aus *T. aestivum* ist denkbar, wobei in diesem Fall eine starke Inhibition durch Kumaraldehyd und weniger durch Coniferyl- oder Sinapylaldehyd anzunehmen wäre. Eine weitere mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Aldehydkonzentrationen bei Fütterung der entsprechenden Säure sind unterschiedliche Affinitäten bzw. katalytische Umsatzraten der CAR zu den verschiedenen Substraten. Da es sich beim Aldehyd um eine reaktive Verbindung handelt, die durch die Reaktion mit Aminogruppen zelluläre Proteine inaktivieren kann, kann möglicherweise dadurch eine toxische Wirkung und damit die verringerte Produktbildung begründet werden [Vollhardt und Schore, 2005; Moura *et al.*, 2016; Winkler, 2018]. Eine putative Weiterreaktion des Kumaraldehyds mit Metaboliten des Stoffwechsels von *E. coli* erklärt auch die geringe Wiederfindungsrate der Kumarsäure. Ferner wurde der Kumaraldehyd bereits als stark antibakteriell mit einer minimal inhibitorischen Konzentration von 2 mM, allerdings als nicht bakterizid beschrieben [Barber *et al.*, 2000]. Nichtsdestotrotz könnte die antibakterielle

Wirkung des Aldehyds einen negativen Einfluss auf die heterologe Expressionskaskade haben, woraus die niedrigen Produktkonzentrationen resultieren. Die strukturähnlichen Verbindungen Zimt-, Coniferyl- und Sinapylaldehyd haben ebenfalls wachstumshemmende Eigenschaften auf *E. coli*, wobei die minimale inhibitorische Konzentrationen je nach Stamm und verwendeter Analyseverfahren zwischen 1,5 μM und 4 mM teilweise stark schwanken und nicht als Ursache für die unterschiedliche Produktbildung herangezogen werden können [Barber *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2001; Cox und Markham, 2007; Domadia *et al.*, 2007]. Die maximale Produktkonzentration scheint von unterschiedlich hohen Akkumulationen der unterschiedlich toxischen Intermediate und Endprodukte aufgrund verschiedener kinetischer Konstanten der heterologen Enzyme zu den jeweiligen Substraten abhängig zu sein. Weiterhin kann ein synergistischer Effekt zwischen den jeweiligen Säuren, Aldehyden und Alkoholen nicht ausgeschlossen werden [Nićiforović und Abramovič, 2014].

Die heterologen Gene der TAL, CAR und CAD wurden in aktiver Form im Stamm BL21 $\Delta\text{tyrR:T7 pTCCN}$ in ausreichenden Mengen exprimiert. Diese Enzyme eignen sich, die Umsetzung der verschiedenen Substrate in die entsprechende Produkte Kumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol zu katalysieren. Die biokatalytische Produktion der drei Monolignole erzielte hohe Konzentrationen mit einer effektiven Umsetzung bis zum Endprodukt. Die erzielten Produktkonzentrationen übersteigen die Literaturwerte.

4.10 Toxizität von Kumarylalkohol

Die vorhergehenden Experimente zeigten bei der Produktion der drei Monolignole unterschiedliche Produktkonzentrationen, die auch auf unterschiedliche Toxizität der entstehenden Substanzen zurückgeführt werden könnten. Da ein Großteil der Experimente auf die Produktion von Kumarylalkohol zielte und die Zwischenprodukte Kumarsäure und -aldehyd kaum akkumulierten, wurde der Effekt von Kumarylalkohol auf die Produktionskaskade untersucht. In Gegenwart des Monolignols ($c_{\text{Start}}(\text{K-OH}) = 2,5 \text{ mM}$) zeigten die Zellen eine deutlich geringere Progresskurve mit einer Zunahme von 0,3 mM Kumarylalkohol, wohingegen die unbehandelten Zellen in der gleichen Zeit 3,5 mM Kumarylalkohol produzierten (Abbildung 44). Dieser negative Effekt von Kumarylalkohol kann entweder durch den Einfluss auf die rekombinanten Enzyme oder auf den Zellmetabolismus begründet sein. Das Wachstum beider hier verwendeter Expressionsstämme wurde bei zunehmender Kumarylalkoholkonzentration im Medium drastisch gehemmt (Abbildung 45). Bei einer Konzentration von 7,5 mM Kumarylalkohol konnte kaum eine Zunahme der OD_{600} beobachtet werden. Bereits bei 1,3 mM ist bei beiden Stämmen eine Verringerung der maximalen Wachstumsrate von 40 % zu erkennen. Beide Stämme zeigen eine vergleichbare Beeinträchtigung im Wachstum. Wie in Abschnitt 4.9 bereits erwähnt, existiert ein Zusammenhang zwischen der Toxizität

einer Substanz und ihrem $\log P_{O/W}$ -Wert. Der $\log P_{O/W}$ -Wert von Kumarylalkohol ist 1,01. Substanzen mit einem $\log P_{O/W}$ -Wert zwischen 1 und 4 zeigen eine ausreichend hohe Wasserlöslichkeit, um in Kontakt zur Zellmembran zu treten, gleichzeitig aber können sie sich in diese integrieren [de Bont, 1998]. Durch die dadurch veränderte Permeabilität ist die natürliche Barrierefunktion gestört, wodurch der Zellmetabolismus nicht aufrechterhalten werden kann [Kusumawardhani *et al.*, 2018]. Hierbei kann es zum Austritt vom Metaboliten (RNA, Proteine, ATP) und zum Aufhebung des Protonen- und Kaliumgradienten kommen [Heipieper *et al.*, 1991; Sikkema *et al.*, 1995]. Bei der Inkubation von *E. coli* mit Zimtaldehyd konnte verglichen zu unbehandelten Zellen eine stark beschädigte Zelloberfläche identifiziert werden (Abbildung 47), eine Wachstumsinhibierung konnte bereits bei 1,9 mM Zimtaldehyd festgestellt werden [Kim *et al.*, 2004a].

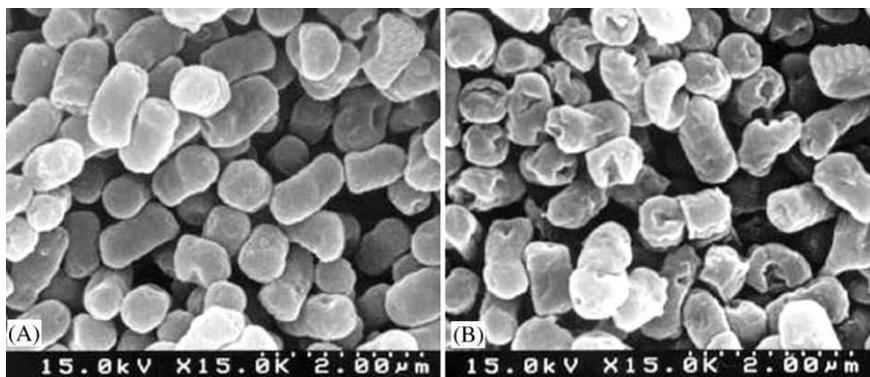


Abbildung 47: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von (A) unbehandelten *E. coli* und (B) *E. coli* inkubiert mit 7,6 mM Zimtaldehyd. Kultivierungsbedingungen: LB-Medium, Inokulation mit einer Zellkonzentration von 10^7 cfu · mL⁻¹ exponentiell gewachsener Zellen, 37 °C, 2 h [Kim *et al.*, 2004a].

Eine Wachstumshemmung von *E. coli* durch Kumarylalkohol ist bereits veröffentlicht. Die minimale inhibitorische Konzentration wurde nicht genau bestimmt, soll aber über 8 mM liegen [Barber *et al.*, 2000]. Der Mechanismus der Toxizität von Kumarylalkohol ist vermutlich, wie bereits für Zimtaldehyd und andere Phenole beschrieben, ebenfalls durch eine Beeinträchtigung der Membranfunktion verursacht, da die strukturähnlichen Verbindungen im gleichen $\log P_{O/W}$ -Bereich liegen (1,4 – 1,9). Die gestörte Membranfunktion und damit zusammenhängend der eingeschränkte Metabolismus könnten ein Grund für das Abnehmen der Produktbildungsrate in Gegenwart von Kumarylalkohol sein. Ein gestörter Metabolismus ist nicht in der Lage Cofaktoren wie NADPH/H⁺ und ATP, die für die Reaktion der CAR und der CAD notwendig sind, in ausreichenden Mengen zu produzieren. Zusätzlich könnte die Stabilität der rekombinanten Enzyme durch die Stresssituation aufgrund des gestörten Metabolismus abnehmen [Kadisch *et al.*, 2017]. Das sind beide möglichen Faktoren, die die Bildung von Kumarylalkohol limitieren. Außerdem wurde untersucht, ob das Endprodukt einen Einfluss auf die Aktivität der rekombinanten Enzyme hat (Abbildung 46). Bei 2 mM Kumarylalkohol konnte nur eine leichte Inhibition der TAL im Zellextrakt festgestellt werden und stellt somit vermutlich nicht die

hauptsächliche Ursache der Stagnation der Produktivität dar. Eine Inhibition der Enzyme CAR und CAD konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden.

5 Zusammenfassung

Monolignole zeigen als Ausgangsstoffe der Ligninbiosynthese und verschiedener pflanzlicher Sekundärmetabolite einen weiten Anwendungsbereich. Als Ersatz für Ligninverbindungen ist der Einsatz bei der Herstellung von Bindemittel und Polymermaterialien mit strenger Kontrolle der Produkteigenschaften denkbar. Pharmazeutische Relevanz erhalten die Monolignole in der Schmerz- und Krebstherapie, da sie die Vorläufer natürlicher schmerzlindernder und antikarzinogener Stoffe bilden. Die Monolignole Kumaryl, Coniferyl- und Sinapylalkohol sollten in einem biotechnologischen Prozess, der auf erneuerbaren Rohstoffen basiert, synthetisiert werden. In der hier vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein dreistufiger Stoffwechselweg ausgehend von Tyrosin zum Kumarylalkohol in *E. coli* etabliert. Ein polycistronisches Konstrukt, das die Gene der TAL, CAR und CAD mit abnehmender katalytischer Effizienz der Genprodukte beinhaltet, wurde generiert. Nach dem eine reproduzierbare Probenaufbereitungs- und Analysemethode der möglichen Verbindungen während der Tyrosinumwandlung zu Kumarylalkohol etabliert wurde, konnte eine erfolgreiche Transformation gefolgt von der Genexpression gezeigt werden. Die effiziente Umwandlung von Tyrosin zu Kumarylalkohol bestätigte die Aktivität der Genprodukte und die Eignung der Konstruktion der Gene. Da die Kultivierung im Minimalmedium aufgrund eines vermuteten *read-through*, der auf das Plasmidrückgrat zurückzuführen ist, nicht möglich war, wurde ein Prozess mit ruhenden Zellen etabliert. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Zusammenfassung der Experimente zur Umsetzung von Tyrosin zu Kumarylalkohol in *E. coli*.

Stamm	Maßstab	Veränderter Parameter	eingesetzte [Tyrosin] [mM]	maximale [K-OH] [mM]
<i>E. coli</i> BL21 Gold (DE3) pTCCN	4 mL-Kulturröhrchen	aerobe/anaerobe Inkubation	0,5	0,4 (aerob) 0,3 (anaerob)
		verschiedene Expressions- und Reaktionstemperaturen	1,0	0,8 mM ($T_{\text{Expression}} = 24\text{ °C}$, $T_{\text{Reaktion}} = 37\text{ °C}$)
	400 mL-Bioreaktor	Bioreaktor mit konstantem pH und konstanter Belüftung	1,0	1,0
		schrittweise Tyrosinzugabe	2,5	1,5
		schrittweise Tyrosinzugabe Glukosezugabe	2,5	1,0
		Wechsel des Reaktionsmediums vom Phosphatpuffer zum Minimalmedium ohne Stickstoffquelle	2,5	1,5
		Wechsel des Reaktionsmediums vom Phosphatpuffer zum Minimalmedium	2,5	1,8
		Austausch des Reaktionsmedium nach 2,5 h Reaktion	2,5	1,8
		Minimalmedium ohne Stickstoffquelle als Reaktionsmedium	3,4	3,5
		schrittweise Tyrosinzugabe	19,0	3,0
<i>E. coli</i> Δ _{tyrR} :T7 pTCCN	schrittweise Tyrosinzugabe Glukosezugabe	17,0	3,8	
	schrittweise Tyrosinzugabe Glukosezugabe Aminosäurezugabe	17,0	5,0	

Es fand eine Trennung der Katalysatorproduktion von der Umwandlung von Tyrosin statt, sodass beide Vorgänge unabhängig voneinander optimiert werden konnten. Niedrige Expressions- (16 bzw. 24 °C) und erhöhte Reaktionstemperaturen (37 °C) erwiesen sich als vorteilhaft für die Kumarylalkoholproduktion. Der Prozess konnte erfolgreich in einen Bioreaktor übertragen werden. In allen Experimenten wurde stets eine Produktivitätsstagnation festgestellt. Eine Substrat- und Cofaktorlimitation und der Verlust der Katalysatorenaktivität konnten als Ursache ausgeschlossen werden. Auch die Entfernung putativer Akkumulationen toxischer Verbindungen und die Unterstützung des Metabolismus durch das Anreichern des Mediums führten nicht zur drastischen Steigerung der Produktkonzentration. Die Verwendung eines Stamms, der in der Genexpression der Tyrosintransporter dereguliert war, zeigte eine Limitierung in der Substrataufnahme. Als eine weitere Einschränkung des Prozesses wurde die Toxizität durch das Produkt Kumarylalkohol identifiziert. Es

gelang die Produktion von 5,0 mM Kumarylalkohol aus Tyrosin, 11,6 mM Coniferylalkohol aus Ferulasäure und 5,6 mM Sinapylalkohol aus Sinapinsäure. Diese Werte entsprechen den bis jetzt höchsten Produktkonzentrationen, die mit Hilfe von Mikroorganismen erzielt wurden. Auch übersteigen diese Werte, die in Pflanzen detektiert werden. Außerdem fand eine Isolierung und Reinigung der Monolignole mit Hilfe der Extraktion und Chromatografie statt. Es konnten 248 mg Kumarylalkohol aus 1,2 g Tyrosin, 451 mg Coniferylalkohol aus 1,3 g Ferulasäure und 366 mg Sinapylalkohol aus 1,5 g Sinapinsäure gewonnen werden. Diese Substanzen können nun zum Beispiel dem Einsatz in Bindemittel dienen oder nach weiteren Reinigungsschritten in pharmazeutischen Untersuchungen eingesetzt werden.

6 Ausblick

Da die Kultivierung in einem definierten Medium nur durch Zugabe zahlreicher Aminosäure gelang, wäre eine Verhinderung des *read-through*, die bei der Plasmid-basierten Expression beobachtet wurde, erstrebenswert. Eine Möglichkeit besteht darin, einen Terminator vor das Expressionkonstrukt einzufügen und somit die Polymerase am Weiterlesen zu hindern. Eine Alternative ist die Integration des gesamten Expressionskonstruktes in das Chromosom von *E. coli*. Dies hätte zusätzlich den Vorteil, dass die Notwendigkeit eines Antibiotikums entfiel und die Stabilität der eingefügten Gene gewährleistet wäre. Ein möglicher Nachteil ist die geringere Kopienzahl der eingebrachten Gene, wodurch eine erneute Optimierung der Genexpression notwendig werden könnte. Die chromosomale Integration kann jedoch gleichzeitig dafür genutzt werden, um unerwünschte Nebenreaktionen durch Geninaktivierung zu unterbinden. Zum Beispiel könnte dies für die Generierung eines Tyrosinüberproduzenten genutzt werden. Durch weitere Modifikationen im Biosyntheseweg von Tyrosin könnten die Monolignole ausgehend von einfachen Kohlenstoffverbindungen wie Glukose oder Glycerin synthetisiert werden. Eine Veränderung des Promotorsystems zu einem induzierbaren Arabinosepromotor wäre eine Möglichkeit, die Genexpression zu verbessern. Für die heterologe Expression der Gene für die TAL und die CAR wurde gezeigt, dass eine schwache Induktion zu höheren Aktivitäten führen kann [Venkitasubramanian *et al.*, 2007; Xue *et al.*, 2007; Zhang und Stephanopoulos, 2013].

Durch den Verbrauch an Glukose wurde davon ausgegangen, dass der Metabolismus aktiv war und somit die Zellen in der Lage waren, die notwendigen Cofaktoren ATP und NADPH/H⁺ zu regenerieren. Eine Messung wäre trotzdem von Vorteil, da es durch die Toxizitätswirkung des Kumarylalkohols und die damit einhergehende putative veränderte Membranpermeabilität zu Verlusten der Metabolite gekommen sein könnte. Ergänzend hat eine Manipulation der Cofaktorregeneration bereits vielfach zu einer Erhöhung der Produktkonzentration geführt. Da sich die Modulation der intrazellulären ATP-

Konzentration als schwierig, verbunden mit vielen Nebenwirkungen, erwiesen hat [Zhao *et al.*, 2013a], sollte sich auf die gut untersuchte Erhöhung des NADPH/H⁺-Spiegels fokussiert werden. Das Reduktionsäquivalent NADPH/H⁺ wird in zwei Reaktionsschritten der hier verwendeten Kaskade benötigt. Ein gerichteter Fluss in Richtung Pentosephosphatweg führt zur Erhöhung der Konzentration an NADPH/H⁺. Zum einen besteht die Möglichkeit der Coexpression der Glukose-6-phosphatdehydrogenase oder der Glukosedehydrogenase [Lee *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007]. Zum anderen kann die Glykolyse durch Deletion der Gene *pgi* (Phosphoglukoisomerase) oder *pfkA* und *pfkB* (Phosphofruktokinase) vermindert werden. Allerdings kann dies auch zu einem verzögerten Wachstum der Kultur führen [Chemler *et al.*, 2010; Siedler *et al.*, 2011]. Die Umwandlung von NADH zu NADPH/H⁺ mit Hilfe der Überexpression einer Transhydrogenase oder einer NAD(H)-Kinase zeigte ebenfalls eine Verbesserung der Produktkonzentrationen [Sauer *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2013]. Die Coexpression einer NADP-abhängigen Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase erhöht auch den intrazellulären NADPH/H⁺-Spiegel [Martínez *et al.*, 2008].

Aufgrund der Produkttoxizität stellt die *in situ*-Produktentfernung eine naheliegende Lösung dar. Bei der Produktion der Monolignole bieten sich die Adsorption oder die Zweiphasenfermentation an [Bühler *et al.*, 2003; Van Hecke *et al.*, 2014]. Das Zweiphasensystem kann eine Verbesserung der Lösungsmittelresistenz des Produktionsstamms erfordern, welche durch heterologe Produktion bestimmter Lösungsmittelpumpen oder Veränderung der Membranzusammensetzung herbeigeführt werden kann [de Bont, 1998; Janardhan Garikipati und Peebles, 2015]. Ferner zeigen immobilisierte *E. coli*-Zellen eine höhere Resistenz gegenüber bestimmten Lösungsmitteln als frei in Suspension wachsende Zellen [Heipieper *et al.*, 1991]. Um zu überprüfen, inwiefern die Toxizität von Kumarylalkohol tatsächlich Einfluss auf die Membranzusammensetzung und -permeabilität nimmt, kann zum einen die Zellmorphologie nach Inkubation mit Kumarylalkohol beobachtet werden. Zum anderen können intrazelluläre Substanzen wie Proteine, Lipide und ATP im Kulturüberstand nach Kumarylalkoholinkubation analysiert werden [Helander *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2004a].

In der Natur werden die Monolignole in Form von Glykosiden gespeichert, wodurch sich einerseits die Löslichkeit erhöht, andererseits sinkt die Toxizität. Die verantwortlichen Enzyme der Glykosylierung sind bereits bekannt und in *E. coli* produziert wurden [Lim *et al.*, 2001; Lim *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2016]. Die Übertragung dieses Stoffwechselwegs in *E. coli* scheint aussichtsreich.

7 Literatur

Akhtar, M. K., Turner, N. J. und Jones, P. R. (2013). "Carboxylic acid reductase is a versatile enzyme for the conversion of fatty acids into fuels and chemical commodities." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 87-92.

- Alonso, M. V., Oliet, M., Rodríguez, F., Astarloa, G. und Echeverría, J. M. (2004). "Use of a methylolated softwood ammonium lignosulfonate as partial substitute of phenol in resol resins manufacture." *Journal of Applied Polymer Science*, 94, 643-650.
- Aschenbrenner, J., Marx, P., Pietruszka, J. und Marienhagen, J. (2019). "Microbial Production of Natural and Unnatural Monolignols with *Escherichia coli*." *ChemBioChem*, 20, 949-954.
- Atkinson, R. G. (2018). "Phenylpropenes: occurrence, distribution, and biosynthesis in fruit." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 2259-2272.
- Ault-Riché, D., Fraley, C. D., Tzeng, C.-M. und Kornberg, A. (1998). "Novel Assay Reveals Multiple Pathways Regulating Stress-Induced Accumulations of Inorganic Polyphosphate in *Escherichia coli*." *Journal of Bacteriology*, 180, 1841-1847.
- Baneyx, F. (1999). "Recombinant protein expression in *Escherichia coli*." *Current Opinion in Biotechnology*, 10, 411-421.
- Barber, M. S., McConnell, V. S. und DeCaux, B. S. (2000). "Antimicrobial intermediates of the general phenylpropanoid and lignin specific pathways." *Phytochemistry*, 54, 53-56.
- Beuerle, T. und Pichersky, E. (2002). "Enzymatic synthesis and purification of aromatic coenzyme A esters." *Analytical Biochemistry*, 302, 305-312.
- Boerjan, W., Ralph, J. und Baucher, M. (2003). "Lignin Biosynthesis." *Annual Review of Plant Biology*, 54, 519-546.
- Bornscheuer, U. T., Huisman, G. W., Kazlauskas, R. J., Lutz, S., Moore, J. C. und Robins, K. (2012). "Engineering the third wave of biocatalysis." *Nature*, 485, 185.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Bühler, B., Bollhalder, I., Hauer, B., Witholt, B. und Schmid, A. (2003). "Use of the two-liquid phase concept to exploit kinetically controlled multistep biocatalysis." *Biotechnology and Bioengineering*, 81, 683-694.
- Burlingame, R. und Chapman, P. J. (1983). "Catabolism of phenylpropionic acid and its 3-hydroxy derivative by *Escherichia coli*." *Journal of Bacteriology*, 155, 113-121.
- Cabiscol, E., Tamarit, J. und Ros, J. (2000). "Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species." *INTERNATL MICROBIOL*, 3, 3-8.
- Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, M. J. und Martínez, Á. T. (2005). "Lignin-derived compounds as efficient Laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes." *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 1775-1784.
- Carballeira, J. D., Quezada, M. A., Hoyos, P., Simeó, Y., Hernaiz, M. J., Alcantara, A. R. und Sinisterra, J. V. (2009). "Microbial cells as catalysts for stereoselective red-ox reactions." *Biotechnology Advances*, 27, 686-714.
- Carrico, C. S., Fraga, T. und Pasa, V. M. D. (2016). "Production and characterization of polyurethane foams from a simple mixture of castor oil, crude glycerol and untreated lignin as bio-based polyols." *European Polymer Journal*, 85, 53-61.
- Carter, A. D., Morris, C. E. und McAllister, W. T. (1981). "Revised transcription map of the late region of bacteriophage T7 DNA." *Journal of Virology*, 37, 636-642.
- Çetin, N. S. und Özmen, N. (2002). "Use of organosolv lignin in phenol-formaldehyde resins for particleboard production: II. Particleboard production and properties." *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 22, 481-486.
- Chang, S.-T., Chen, P.-F. und Chang, S.-C. (2001). "Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*." *Journal of Ethnopharmacology*, 77, 123-127.

- Charan Raja, M. R., Srinivasan, V., Selvaraj, S. und Mahapatra, S. K. (2015). "Versatile and synergistic potential of eugenol: a review." *Pharmaceutica Analytica Acta*, 6, 367-373.
- Chávez-Béjar, M. I., Lara, A. R., López, H., Hernández-Chávez, G., Martínez, A., Ramírez, O. T., Bolívar, F. und Gosset, G. (2008). "Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for Tyrosine Production by Expression of Genes Coding for the Chorismate Mutase Domain of the Native Chorismate Mutase-Prephenate Dehydratase and a Cyclohexadienyl Dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*." *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 3284-3290.
- Chemler, J. A., Fowler, Z. L., McHugh, K. P. und Koffas, M. A. G. (2010). "Improving NADPH availability for natural product biosynthesis in *Escherichia coli* by metabolic engineering." *Metabolic Engineering*, 12, 96-104.
- Chen, T., Zhou, Y., Lu, Y. und Zhang, H. (2018). "Advances in heterologous biosynthesis of plant and fungal natural products by modular co-culture engineering." *Biotechnology Letters*.
- Chen, Z., Sun, X., Li, Y., Yan, Y. und Yuan, Q. (2017). "Metabolic engineering of *Escherichia coli* for microbial synthesis of monolignols." *Metabolic Engineering*, 39, 102-109.
- Chubukov, V. und Sauer, U. (2014). "Environmental dependence of stationary phase metabolism in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*." *Applied and Environmental Microbiology*.
- Collins, L. A. und Thune, R. L. (1996). "Development of a Defined Minimal Medium for the Growth of *Edwardsiella ictaluri*." *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 848-852.
- Cox, S. D. und Markham, J. L. (2007). "Susceptibility and intrinsic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to selected plant volatile compounds." *Journal of Applied Microbiology*, 103, 930-936.
- Cui, J., Liang, L., Han, C. und Lin Liu, R. (2015). "Stabilization of Phenylalanine Ammonia Lyase from *Rhodotorula glutinis* by Encapsulation in Polyethyleneimine-Mediated Biomimetic Silica." *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176, 999-1011.
- Daubresse, N., Francesch, C., Mhamdi, F. und Rolando, C. (1994). "A mild synthesis of coumaryl, coniferyl, sinapyl aldehydes and alcohols." *Synthesis*, 1994, 369-371.
- de Bont, J. A. M. (1998). "Solvent-tolerant bacteria in biocatalysis." *Trends in Biotechnology*, 16, 493-499.
- de Graef, M. R., Alexeeva, S., Snoep, J. L. und Teixeira de Mattos, M. J. (1999). "The Steady-State Internal Redox State (NADH/NAD) Reflects the External Redox State and Is Correlated with Catabolic Adaptation in *Escherichia coli*." *Journal of Bacteriology*, 181, 2351-2357.
- Domadia, P., Swarup, S., Bhunia, A., Sivaraman, J. und Dasgupta, D. (2007). "Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde." *Biochemical Pharmacology*, 74, 831-840.
- Duan, Y., Yao, P., Chen, X., Liu, X., Zhang, R., Feng, J., Wu, Q. und Zhu, D. (2015). "Exploring the synthetic applicability of a new carboxylic acid reductase from *Segniliparus rotundus* DSM 44985." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 115, 1-7.
- Eiteman, M. A. und Altman, E. (2006). "Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations." *Trends in Biotechnology*, 24, 530-536.
- Engels, C., Schieber, A. und Gänzle, M. G. (2012). "Sinapic acid derivatives in defatted Oriental mustard (*Brassica juncea* L.) seed meal extracts using UHPLC-DAD-ESI-MS and identification of compounds with antibacterial activity." *European Food Research and Technology*, 234, 535-542.
- EPA, U. (2012). "Estimation Programs Interface Suite™ for Microsoft® Windows." United States Environmental Protection Agency,, Washington, DC, USA.

- Ergün, B. Ç., Çoban, T., Onurdag, F. K. und Banoglu, E. (2011). "Synthesis, antioxidant and antimicrobial evaluation of simple aromatic esters of ferulic acid." *Archives of Pharmacal Research*, 34, 1251.
- Fackler, K., Kuncinger, T., Ters, T. und Srebotnik, E. (2008). "Laccase-catalyzed functionalization with 4-hydroxy-3-methoxybenzylurea significantly improves internal bond of particle boards." *Holzforschung*, 62, 223-229.
- Felby, C., Hassingboe, J. und Lund, M. (2002). "Pilot-scale production of fiberboards made by laccase oxidized wood fibers: board properties and evidence for cross-linking of lignin." *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 736-741.
- Felby, C., Nielsen, B. R., Olesen, P. O. und Skibsted, L. H. (1997). "Identification and quantification of radical reaction intermediates by electron spin resonance spectrometry of laccase-catalyzed oxidation of wood fibers from beech (*Fagus sylvatica*)." *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48, 459-464.
- Felby, C., Thygesen, L. G., Sanadi, A. und Barsberg, S. (2004). "Native lignin for bonding of fiber boards—evaluation of bonding mechanisms in boards made from laccase-treated fibers of beech (*Fagus sylvatica*)." *Industrial Crops and Products*, 20, 181-189.
- Field, C. M. und Summers, D. K. (2011). "Multicopy plasmid stability: Revisiting the dimer catastrophe." *Journal of Theoretical Biology*, 291, 119-127.
- Finnigan, W., Thomas, A., Cromar, H., Gough, B., Snajdrova, R., Adams, J. P., Littlechild, J. A. und Harmer, N. J. (2017). "Characterization of Carboxylic Acid Reductases as Enzymes in the Toolbox for Synthetic Chemistry." *ChemCatChem*, 9, 1005-1017.
- Friesen, J. D., An, G. und Fiil, N. (1983). "The lethal effect of a plasmid resulting from transcriptional readthrough of rplJ from the rplKA operon in *Escherichia coli*." *Molecular and General Genetics MGG*, 189, 275-281.
- Furuya, T., Arai, Y. und Kino, K. (2012). "Biotechnological production of caffeic acid by bacterial cytochrome P450 CYP199A2." *Applied and Environmental Microbiology*.
- Ganesan, V., Li, Z., Wang, X. und Zhang, H. (2017). "Heterologous biosynthesis of natural product naringenin by co-culture engineering." *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2, 236-242.
- Gelfand, D. H. und Rudo, N. (1977). "Mapping of the aspartate and aromatic amino acid aminotransferase genes *tyrB* and *aspC*." *Journal of Bacteriology*, 130, 441-444.
- Gordaliza, M., García, P. A., Miguel del Corral, J. M., Castro, M. A. und Gómez-Zurita, M. A. (2004). "Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives." *Toxicon*, 44, 441-459.
- Griffini, G., Passoni, V., Suriano, R., Levi, M. und Turri, S. (2015). "Polyurethane coatings based on chemically unmodified fractionated lignin." *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 3, 1145-1154.
- Gurujeyalakshmi, G. und Mahadevan, A. (1987). "Dissimilation of ferulic acid by *Bacillus subtilis*." *Current Microbiology*, 16, 69-73.
- Gustafsson, C., Govindarajan, S. und Minshull, J. (2004). "Codon bias and heterologous protein expression." *Trends in Biotechnology*, 22, 346-353.
- Guzman, J. (2014). "Natural cinnamic acids, synthetic derivatives and hybrids with antimicrobial activity." *Molecules*, 19, 19292.
- Heipieper, H. J., Keweloh, H. und Rehm, H. J. (1991). "Influence of phenols on growth and membrane permeability of free and immobilized *Escherichia coli*." *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1213-1217.

- Helander, I. M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G. M. und von Wright, A. (1998). "Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3590-3595.
- Hu, L., Pan, H., Zhou, Y. und Zhang, M. (2011). "Methods to improve lignin's reactivity as a phenol substitute and as replacement for other phenolic compounds: A brief review." *BioResources*, 6, 3515.
- 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.
- Hwang, E. I., Kaneko, M., Ohnishi, Y. und Horinouchi, S. (2003). "Production of plant-specific flavanones by *Escherichia coli* containing an artificial gene cluster." *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 2699-2706.
- Janardhan Garikipati, S. V. B. und Peebles, T. L. (2015). "Solvent resistance pumps of *Pseudomonas putida* S12: Applications in 1-naphthol production and biocatalyst engineering." *Journal of Biotechnology*, 210, 91-99.
- Jansen, F., Gillissen, B., Mueller, F., Commandeur, U., Fischer, R. und Kreuzaler, F. (2014). "Metabolic engineering for p-coumaryl alcohol production in *Escherichia coli* by introducing an artificial phenylpropanoid pathway." *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 61, 646-654.
- Jendresen, C. B., Stahlhut, S. G., Li, M., Gaspar, P., Siedler, S., Förster, J., Maury, J., Borodina, I. und Nielsen, A. T. (2015). "Novel highly active and specific tyrosine ammonia-lyases from diverse origins enable enhanced production of aromatic compounds in bacteria and yeast." *Applied and Environmental Microbiology*.
- Jenzsch, M., Gnoth, S., Kleinschmidt, M., Simutis, R. und Lübbert, A. (2007). "Improving the batch-to-batch reproducibility of microbial cultures during recombinant protein production by regulation of the total carbon dioxide production." *Journal of Biotechnology*, 128, 858-867.
- Jones, J. A., Vernacchio, V. R., Sinkoe, A. L., Collins, S. M., Ibrahim, M. H. A., Lachance, D. M., Hahn, J. und Koffas, M. A. G. (2016). "Experimental and computational optimization of an *Escherichia coli* co-culture for the efficient production of flavonoids." *Metabolic Engineering*, 35, 55-63.
- Jones, J. A. und Wang, X. (2018). "Use of bacterial co-cultures for the efficient production of chemicals." *Current Opinion in Biotechnology*, 53, 33-38.
- Julsing, M. K., Kuhn, D., Schmid, A. und Bühler, B. (2012). "Resting cells of recombinant *E. coli* show high epoxidation yields on energy source and high sensitivity to product inhibition." *Biotechnology and Bioengineering*, 109, 1109-1119.
- Juminaga, D., Baidoo, E. E. K., Redding-Johanson, A. M., Batth, T. S., Burd, H., Mukhopadhyay, A., Petzold, C. J. und Keasling, J. D. (2012). "Modular Engineering of Tyrosine Production in *Escherichia coli*." *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 89-98.
- Kadisich, M., Willrodt, C., Hillen, M., Bühler, B. und Schmid, A. (2017). "Maximizing the stability of metabolic engineering-derived whole-cell biocatalysts." *Biotechnology Journal*, 12, 1600170.
- Kane, J. F. (1995). "Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*." *Current Opinion in Biotechnology*, 6, 494-500.
- Kaneko, T., Thi, T. H., Shi, D. J. und Akashi, M. (2006). "Environmentally degradable, high-performance thermoplastics from phenolic phytomonomers." *Nature Materials*, 5, 966.
- 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.

- Karapinar, M. (1990). "Inhibitory effects of anethole and eugenol on the growth and toxin production of *Aspergillus parasiticus*." *International Journal of Food Microbiology*, 10, 193-199.
- Kharazipour, A., Huettermann, A. und Luedemann, H. D. (1997). "Enzymatic activation of wood fibres as a means for the production of wood composites." *Journal of Adhesion Science and Technology*, 11, 419-427.
- Kim, B., Binkley, R., Kim, H. U. und Lee, S. Y. (2018). "Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the enhanced production of L-tyrosine." *Biotechnology and Bioengineering*, 115, 2554-2564.
- Kim, H. und Ralph, J. (2005). "Simplified preparation of coniferyl and sinapyl alcohols." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3693-3695.
- Kim, H. O., Park, S. W. und Park, H. D. (2004a). "Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 by cinnamic aldehyde purified from *Cinnamomum cassia* shoot." *Food Microbiology*, 21, 105-110.
- Kim, S.-J., Kim, M.-R., Bedgar, D. L., Moinuddin, S. G. A., Cardenas, C. L., Davin, L. B., Kang, C. und Lewis, N. G. (2004b). "Functional reclassification of the putative cinnamyl alcohol dehydrogenase multigene family in *Arabidopsis*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 1455-1460.
- Klumbys, E., Zebec, Z., Weise, N. J., Turner, N. J. und Scrutton, N. S. (2018). "Bio-derived production of cinnamyl alcohol via a three step biocatalytic cascade and metabolic engineering." *Green Chemistry*, 20, 658-663.
- Koeduka, T., Fridman, E., Gang, D. R., Vassão, D. G., Jackson, B. L., Kish, C. M., Orlova, I., Spassova, S. M., Lewis, N. G., Noel, J. P., Baiga, T. J., Dudareva, N. und Pichersky, E. (2006). "Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 10128-10133.
- Koeduka, T., Louie, G. V., Orlova, I., Kish, C. M., Ibdah, M., Wilkerson, C. G., Bowman, M. E., Baiga, T. J., Noel, J. P., Dudareva, N. und Pichersky, E. (2008). "The multiple phenylpropene synthases in both *Clarkia breweri* and *Petunia hybrida* represent two distinct protein lineages." *The Plant Journal*, 54, 362-374.
- Kram, K. E. und Finkel, S. E. (2015). "Rich Medium Composition Affects *Escherichia coli* Survival, Glycation, and Mutation Frequency during Long-Term Batch Culture." *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 4442-4450.
- Kreye, O., Oelmann, S. und Meier, M. A. R. (2013). "Renewable aromatic-aliphatic copolyesters derived from rapeseed." *Macromolecular Chemistry and Physics*, 214, 1452-1464.
- Kuroda, A., Nomura, K., Ohtomo, R., Kato, J., Ikeda, T., Takiguchi, N., Ohtake, H. und Kornberg, A. (2001). "Role of Inorganic Polyphosphate in Promoting Ribosomal Protein Degradation by the Lon Protease in *E. coli*." *Science*, 293, 705-708.
- Kusumawardhani, H., Hosseini, R. und de Winde, J. H. (2018). "Solvent Tolerance in Bacteria: Fulfilling the Promise of the Biotech Era?" *Trends in Biotechnology*, 36, 1025-1039.
- Laane, C., Boeren, S., Vos, K. und Veeger, C. (1987). "Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents." *Biotechnology and Bioengineering*, 30, 81-87.
- Lauvergeat, V., Kennedy, K., Feuillet, C., McKie, J. H., Gorrichon, L., Baltas, M., Boudet, A. M., Grima-Pettenati, J. und Douglas, K. T. (1995). "Site-Directed Mutagenesis of a Serine Residue in Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase, a Plant NADPH-Dependent Dehydrogenase, Affects the Specificity for the Coenzyme." *Biochemistry*, 34, 12426-12434.
- Lee, H. C., Kim, J. S., Jang, W. und Kim, S. Y. (2010). "High NADPH/NADP+ ratio improves thymidine production by a metabolically engineered *Escherichia coli* strain." *Journal of Biotechnology*, 149, 24-32.

- Lee, J. W., Na, D., Park, J. M., Lee, J., Choi, S. und Lee, S. Y. (2012). "Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals." *Nature Chemical Biology*, 8, 536.
- Lee, W.-H., Kim, J.-W., Park, E.-H., Han, N. S., Kim, M.-D. und Seo, J.-H. (2013). "Effects of NADH kinase on NADPH-dependent biotransformation processes in *Escherichia coli*." *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 1561-1569.
- Lee, W.-H., Park, J.-B., Park, K., Kim, M.-D. und Seo, J.-H. (2007). "Enhanced production of ϵ -caprolactone by overexpression of NADPH-regenerating glucose 6-phosphate dehydrogenase in recombinant *Escherichia coli* harboring cyclohexanone monooxygenase gene." *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76, 329-338.
- Leonard, E., Yan, Y. und Koffas, M. A. G. (2006). "Functional expression of a P450 flavonoid hydroxylase for the biosynthesis of plant-specific hydroxylated flavonols in *Escherichia coli*." *Metabolic Engineering*, 8, 172-181.
- Lerari, D. (2015). "Synthesis and characterization of new copolymer based cinnamyl methacrylate monomer: determination of monomer reactivity ratio and statistical sequence." *Materials Research*, 18, 1008-1014.
- Li, Z.-J., Cai, L., Wu, Q. und Chen, G.-Q. (2009). "Overexpression of NAD kinase in recombinant *Escherichia coli* harboring the phbCAB operon improves poly(3-hydroxybutyrate) production." *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83, 939-947.
- Liang, J.-I., Guo, L., Sun, P., Jiang, B., Lin, J., Guo, W. und Wan, H. (2016). "A novel process for obtaining phenylpropanoic acid precursor using *Escherichia coli* with a constitutive expression system." *Food Science and Biotechnology*, 25, 795-801.
- Lim, E.-K., Jackson, R. G. und Bowles, D. J. (2005). "Identification and characterisation of *Arabidopsis* glycosyltransferases capable of glucosylating coniferyl aldehyde and sinapyl aldehyde." *FEBS Letters*, 579, 2802-2806.
- Lim, E.-K., Li, Y., Parr, A., Jackson, R., Ashford, D. A. und Bowles, D. J. (2001). "Identification of glucosyltransferase genes involved in sinapate metabolism and lignin synthesis in *Arabidopsis*." *Journal of Biological Chemistry*, 276, 4344-4349.
- Lin, J.-S., Huang, X.-X., Li, Q., Cao, Y., Bao, Y., Meng, X.-F., Li, Y.-J., Fu, C. und Hou, B.-K. (2016). "UDP-glycosyltransferase 72B1 catalyzes the glucose conjugation of monolignols and is essential for the normal cell wall lignification in *Arabidopsis thaliana*." *The Plant Journal*, 88, 26-42.
- Lindsay, R. F. und Priest, F. G. (1975). "Decarboxylation of substituted cinnamic acids by Enterobacteria: the influence on beer flavour." *J. appl. Bact.*, 39, 181-187.
- Liu, N., Shi, S., Gao, Y. und Qin, M. (2009). "Fiber modification of kraft pulp with laccase in presence of methyl syringate." *Enzyme and Microbial Technology*, 44, 89-95.
- Liu, S., Liu, J., Hou, J., Chao, N., Gai, Y. und Jiang, X. (2017). "Three steps in one pot: biosynthesis of 4-hydroxycinnamyl alcohols using immobilized whole cells of two genetically engineered *Escherichia coli* strains." *Microbial Cell Factories*, 16, 104.
- Ludley, F. H. und Ralph, J. (1996). "Improved Preparation of Coniferyl and Sinapyl Alcohols." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2942-2943.
- Lütke-Eversloh, T. und Stephanopoulos, G. (2008). "Combinatorial pathway analysis for improved L-tyrosine production in *Escherichia coli*: Identification of enzymatic bottlenecks by systematic gene overexpression." *Metabolic Engineering*, 10, 69-77.
- Lv, Y., Cheng, X., Du, G., Zhou, J. und Chen, J. (2017). "Engineering of an H₂O₂ auto-scavenging in vivo cascade for pinoresinol production." *Biotechnology and Bioengineering*, 114, 2066-2074.
- Lyakhov, D. L., He, B., Zhang, X., Studier, F. W., Dunn, J. J. und McAllister, W. T. (1998). "Pausing and termination by bacteriophage T7 RNA polymerase 11 Edited by M. Gottesman." *Journal of Molecular Biology*, 280, 201-213.

- Ma, Q.-H. (2010). "Functional analysis of a cinnamyl alcohol dehydrogenase involved in lignin biosynthesis in wheat." *Journal of Experimental Botany*, 61, 2735-2744.
- Macdonald, L. E., Durbin, R. K., Dunn, J. J. und McAllister, W. T. (1994). "Characterization of Two Types of Termination Signal for Bacteriophage T7 RNA Polymerase." *Journal of Molecular Biology*, 238, 145-158.
- MacDonald, M. C., Arivalagan, P., Barre, D. E., MacInnis, J. A. und D’Cunha, G. B. (2016). "Rhodotorula glutinis Phenylalanine/Tyrosine Ammonia Lyase Enzyme Catalyzed Synthesis of the Methyl Ester of para-Hydroxycinnamic Acid and its Potential Antibacterial Activity." *Frontiers in Microbiology*, 7.
- MacRae, W. D. und Towers, G. H. N. (1984). "Biological activities of lignans." *Phytochemistry*, 23, 1207-1220.
- Mairhofer, J., Wittwer, A., Cserjan-Puschmann, M. und Striedner, G. (2015). "Preventing T7 RNA Polymerase Read-through Transcription—A Synthetic Termination Signal Capable of Improving Bioprocess Stability." *ACS Synthetic Biology*, 4, 265-273.
- Mansouri, N.-E. E., Pizzi, A. und Salvado, J. (2007). "Lignin-based polycondensation resins for wood adhesives." *Journal of Applied Polymer Science*, 103, 1690-1699.
- Marienhagen, J. und Bott, M. (2013). "Metabolic engineering of microorganisms for the synthesis of plant natural products." *Journal of Biotechnology*, 163, 166-178.
- Martínez, I., Zhu, J., Lin, H., Bennett, G. N. und San, K.-Y. (2008). "Replacing *Escherichia coli* NAD-dependent glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) with a NADP-dependent enzyme from *Clostridium acetobutylicum* facilitates NADPH dependent pathways." *Metabolic Engineering*, 10, 352-359.
- Maurizi, M. R. (1992). "Proteases and protein degradation in *Escherichia coli*." *Experientia*, 48, 178-201.
- Mears, L., Feldman, H., Falco, F. C., Wu, M., Nørregaard, A. und Gernaey, K. V. (2017). "Continuous Manufacturing of Pharmaceuticals - Chapter 6", John Wiley & Sons,, 632, 1.
- Mialon, L., Pemba, A. G. und Miller, S. A. (2010). "Biorenewable polyethylene terephthalate mimics derived from lignin and acetic acid." *Green Chemistry*, 12, 1704-1706.
- Mialon, L., Vanderhenst, R., Pemba, A. G. und Miller, S. A. (2011). "Polyalkylenehydroxybenzoates (PAHBs): Biorenewable aromatic/aliphatic polyesters from lignin." *Macromolecular Rapid Communications*, 32, 1386-1392.
- Moleyar, V. und Narasimham, P. (1992). "Antibacterial activity of essential oil components." *International Journal of Food Microbiology*, 16, 337-342.
- Moura, M., Pertusi, D., Lenzini, S., Bhan, N., Broadbelt, L. J. und Tyo, K. E. J. (2016). "Characterizing and predicting carboxylic acid reductase activity for diversifying bioaldehyde production." *Biotechnology and Bioengineering*, 113, 944-952.
- Mukai, N., Masaki, K., Fujii, T., Kawamukai, M. und Iefuji, H. (2010). "PAD1 and FDC1 are essential for the decarboxylation of phenylacrylic acids in *Saccharomyces cerevisiae*." *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109, 564-569.
- 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.
- Nierop Groot, M. N. und de Bont, J. A. M. (1998). "Conversion of Phenylalanine to Benzaldehyde Initiated by an Aminotransferase in *Lactobacillus plantarum*." *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3009-3013.
- Norström, E., Demircan, D., Fogelström, L., Khabbaz, F. und Malmström, E. (2018). "Applied adhesive bonding in Science and technology." IntechOpen.

- Olsson, L. und Hahn-Hägerdal, B. (1996). "Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production." *Enzyme and Microbial Technology*, 18, 312-331.
- Orosz, A., Boros, I. und Venetianer, P. (1991). "Analysis of the complex transcription termination region of the *Escherichia coli* rrn B gene." *European Journal of Biochemistry*, 201, 653-659.
- Oulame, M. Z., Pion, F., Allauddin, S., Raju, K. V. S. N., Ducrot, P.-H. und Allais, F. (2015). "Renewable alternating aliphatic-aromatic poly(ester-urethane)s prepared from ferulic acid and bio-based diols." *European Polymer Journal*, 63, 186-193.
- Pandey, R. P., Parajuli, P., Koffas, M. A. G. und Sohng, J. K. (2016). "Microbial production of natural and non-natural flavonoids: pathway engineering, directed evolution and systems/synthetic biology." *Biotechnology Advances*, 34, 634-662.
- Panzella, L., DellaGreca, M. und Longobardo, L. (2018). "A facile preparation of hydroxycinnamyl alcohols with simultaneous protection of phenol groups as carbonate." *ChemistrySelect*, 3, 10637-10640.
- Parkar, S. G., Stevenson, D. E. und Skinner, M. A. (2008). "The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health." *International Journal of Food Microbiology*, 124, 295-298.
- Patient, M. E. und Summers, D. K. (1993). "ColE1 multimer formation triggers inhibition of *Escherichia coli* cell division." *Molecular Microbiology*, 9, 1089-1095.
- Patnaik, R., Zolanz, R. R., Green, D. A. und Kraynie, D. F. (2008). "L-Tyrosine production by recombinant *Escherichia coli*: Fermentation optimization and recovery." *Biotechnology and Bioengineering*, 99, 741-752.
- Pitt, B. M. (1962). "Oxidation of Phenylpyruvates to Aromatic Aldehydes and Oxalate." *Nature*, 196, 272.
- Pittard, J. (1996). "The various strategies within the TyrR regulon of *Escherichia coli* to modulate gene expression." *Genes to Cells*, 1, 717-725.
- Pizzi, A. (2006). "Recent developments in eco-efficient bio-based adhesives for wood bonding: opportunities and issues." *Journal of Adhesion Science and Technology*, 20, 829-846.
- Pizzi, A. (2016). "Wood products and green chemistry." *Annals of Forest Science*, 73, 185-203.
- Prasad, N. S., Raghavendra, R., Lokesh, B. R. und Naidu, K. A. (2004). "Spice phenolics inhibit human PMNL 5-lipoxygenase." *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*, 70, 521-528.
- Prieto, M. A., Galán, B., Torres, B., Ferrández, A., Fernández, C., Miñambres, B., García, J. L. und Díaz, E. (2004). "Aromatic metabolism versus carbon availability: the regulatory network that controls catabolism of less-preferred carbon sources in *Escherichia coli*." *FEMS Microbiology Reviews*, 28, 503-518.
- Proshkin, S., Rahmouni, A. R., Mironov, A. und Nudler, E. (2010). "Cooperation Between Translating Ribosomes and RNA Polymerase in Transcription Elongation." *Science*, 328, 504-508.
- Quideau, S. und Ralph, J. (1992). "Facile large-scale synthesis of coniferyl, sinapyl, and p-coumaryl alcohol." *J. Agrlc. Food Chem.*, 40, 1108-1110.
- Rinaldi, R., Jastrzebski, R., Clough, M. T., Ralph, J., Kennema, M., Bruijninx, P. C. A. und Weckhuysen, B. M. (2016). "Wege zur Verwertung von Lignin: Fortschritte in der Biotechnik, der Bioraffination und der Katalyse." *Angewandte Chemie*, 128, 8296-8354.
- Rodrigues, J. L., Araújo, R. G., Prather, K. L. J., Kluskens, L. D. und Rodrigues, L. R. (2015). "Heterologous production of caffeic acid from tyrosine in *Escherichia coli*." *Enzyme and Microbial Technology*, 71, 36-44.
- Rodriguez, A., Chen, Y., Khoomrung, S., Özdemir, E., Borodina, I. und Nielsen, J. (2017). "Comparison of the metabolic response to over-production of p-coumaric acid in two yeast strains." *Metabolic Engineering*, 44, 265-272.

- Rosano, G. L. und Ceccarelli, E. A. (2014). "Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges." *Frontiers in Microbiology*, 5.
- Rose, F. A. und Powell, G. M. (1963). "Studies on l-tyrosine O-sulphate. 1. Preparation and properties of potassium p-hydroxyphenylpyruvic acid [(35S)sulphate." *Biochemical Journal*, 87, 541-545.
- Sangwan, N. K., Verma, B. S., Verma, K. K. und Dhindsa, K. S. (1990). "Nematicidal activity of some essential plant oils." *Pesticide Science*, 28, 331-335.
- Santos, C. N. S., Koffas, M. und Stephanopoulos, G. (2011). "Optimization of a heterologous pathway for the production of flavonoids from glucose." *Metabolic Engineering*, 13, 392-400.
- 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.
- Sauer, U., Canonaco, F., Heri, S., Perrenoud, A. und Fischer, E. (2004). "The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli*." *Journal of Biological Chemistry*, 279, 6613-6619.
- Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M. und Witholt, B. (2001). "Industrial biocatalysis today and tomorrow." *Nature*, 409, 258.
- Shiloach, J., Kaufman, J., Guillard, A. S. und Fass, R. (1996). "Effect of glucose supply strategy on acetate accumulation, growth, and recombinant protein production by *Escherichia coli* BL21 (λ DE3) and *Escherichia coli* JM109." *Biotechnology and Bioengineering*, 49, 421-428.
- Siedler, S., Bringer, S. und Bott, M. (2011). "Increased NADPH availability in *Escherichia coli*: improvement of the product per glucose ratio in reductive whole-cell biotransformation." *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92, 929-937.
- Sikkema, J., de Bont, J. A. und Poolman, B. (1995). "Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons." *Microbiological Reviews*, 59, 201-222.
- Still, C. W., Kahn, M. und Mitra, A. (1978). "Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution." *J. Org. Chem.*, 43, 2923 - 2925.
- Studier, F. W. (1991). "Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system." *Journal of Molecular Biology*, 219, 37-44.
- Studier, F. W. und Moffatt, B. A. (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." *Journal of Molecular Biology*, 189, 113-130.
- Summers, D. (1998). "Timing, self-control and a sense of direction are the secrets of multicopy plasmid stability." *Molecular Microbiology*, 29, 1137-1145.
- Sutherland, J. B., Crawford, D. L. und Pometto lii, A. L. (1983). "Metabolism of cinnamic, p-coumaric, and ferulic acids by *Streptomyces setonii*." *Canadian Journal of Microbiology*, 29, 1253-1257.
- Suzuki, S. und Umezawa, T. (2007). "Biosynthesis of lignans and norlignans." *Journal of Wood Science*, 53, 273-284.
- Tachon, N., Benjelloun Mlayah, B. und Delmas, M. (2016). "Organosolv Wheat Straw Lignin as a Phenol Substitute for Green Phenolic Resins." *BioResources*, 11, 5797.
- Teponno, R., Kusari, S. und Spiteller, M. (2016). "Recent advances in research on lignans and neolignans." *Natural Product Reports*, 33, 1044-1092.

- Upton, B. M. und Kasko, A. M. (2016). "Strategies for the Conversion of Lignin to High-Value Polymeric Materials: Review and Perspective." *Chemical Reviews*, 116, 2275-2306.
- Van Hecke, W., Kaur, G. und De Wever, H. (2014). "Advances in *in-situ* product recovery (ISPR) in whole cell biotechnology during the last decade." *Biotechnology Advances*, 32, 1245-1255.
- van Summeren-Wesenhagen, P. V., Voges, R., Dennig, A., Sokolowsky, S., Noack, S., Schwaneberg, U. und Marienhagen, J. (2015). "Combinatorial optimization of synthetic operons for the microbial production of p-coumaryl alcohol with *Escherichia coli*." *Microbial Cell Factories*, 14, 79.
- Vannelli, T., Wei Qi, W., Sweigard, J., Gatenby, A. A. und Sariaslani, F. S. (2007). "Production of p-hydroxycinnamic acid from glucose in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* by expression of heterologous genes from plants and fungi." *Metabolic Engineering*, 9, 142-151.
- Venkatasubramanian, P., Daniels, L. und Rosazza, J. P. N. (2007). "Reduction of carboxylic acids by *Nocardia* aldehyde oxidoreductase requires a phosphopantetheinylated enzyme." *Journal of Biological Chemistry*, 282, 478-485.
- Voet, D., Voet, J. G. und Pratt, C. (2010). "Lehrbuch der Biochemie." (Beck-Sickinger, A. und Hahn, U., eds.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 1253, 2.
- Vogt, T. (2010). "Phenylpropanoid Biosynthesis." *Molecular Plant*, 3, 2-20.
- Vollhardt, K. P. C. und Schore, N. E. (2005). "Organische Chemie." WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 1542, 4.
- Wang, Q., Ou, M. S., Kim, Y., Ingram, L. O. und Shanmugam, K. T. (2010). "Metabolic Flux Control at the Pyruvate Node in an Anaerobic *Escherichia coli* Strain with an Active Pyruvate Dehydrogenase." *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 2107-2114.
- Wang, X., Li, X., Xue, J., Zhao, Y. und Zhang, Y. (2009). "A novel and efficient procedure for the preparation of allylic alcohols from α,β -unsaturated carboxylic esters using $\text{LiAlH}_4/\text{BnCl}$." *Tetrahedron Letters*, 50, 413-415.
- Wang, Y., Chantreau, M., Sibout, R. und Hawkins, S. (2013). "Plant cell wall lignification and monolignol metabolism." *Frontiers in Plant Science*, 4.
- Wang, Y., Chen, S. und Yu, O. (2011). "Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms." *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91, 949-956.
- Watts, K. T., Lee, P. C. und Schmidt-Dannert, C. (2004). "Exploring recombinant flavonoid biosynthesis in metabolically engineered *Escherichia coli*." *ChemBioChem*, 5, 500-507.
- Watts, K. T., Lee, P. C. und Schmidt-Dannert, C. (2006). "Biosynthesis of plant-specific stilbene polyketides in metabolically engineered *Escherichia coli*." *BMC Biotechnology*, 6, 22.
- Wei, K., Luo, S.-W., Fu, Y., Liu, L. und Guo, Q.-X. (2004). "A theoretical study on bond dissociation energies and oxidation potentials of monolignols." *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 712, 197-205.
- Whetten, R. und Sederoff, R. (1995). "Lignin Biosynthesis." *The Plant Cell*, 7, 1001-1013.
- Willrodt, C., Hoschek, A., Bühler, B., Schmid, A. und Julsing, M. K. (2016). "Decoupling production from growth by magnesium sulfate limitation boosts de novo limonene production." *Biotechnology and Bioengineering*, 113, 1305-1314.
- Winkler, M. (2018). "Carboxylic acid reductase enzymes (CARs)." *Current Opinion in Chemical Biology*, 43, 23-29.
- Wu, J., Du, G., Chen, J. und Zhou, J. (2015). "Enhancing flavonoid production by systematically tuning the central metabolic pathways based on a CRISPR interference system in *Escherichia coli*." *Scientific Reports*, 5, 13477.

- Wu, J., Zhang, X., Dong, M. und Zhou, J. (2016). "Stepwise modular pathway engineering of *Escherichia coli* for efficient one-step production of (2S)-pinocembrin." *Journal of Biotechnology*, 231, 183-192.
- Wu, J., Zhou, P., Zhang, X. und Dong, M. (2017). "Efficient *de novo* synthesis of resveratrol by metabolically engineered *Escherichia coli*." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 44, 1083-1095.
- Xu, C., Arancon, R. A. D., Labidi, J. und Luque, R. (2014). "Lignin depolymerisation strategies: towards valuable chemicals and fuels." *Chemical Society Reviews*, 43, 7485-7500.
- Xu, Z., Jing, K., Liu, Y. und Cen, P. (2007). "High-level expression of recombinant glucose dehydrogenase and its application in NADPH regeneration." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34, 83-90.
- Xue, Z., McCluskey, M., Cantera, K., Ben-Bassat, A., Sariaslani, F. S. und Huang, L. (2007). "Improved production of p-hydroxycinnamic acid from tyrosine using a novel thermostable phenylalanine/tyrosine ammonia lyase enzyme." *Enzyme and Microbial Technology*, 42, 58-64.
- Yao, R., Xiong, D., Hu, H., Wakayama, M., Yu, W., Zhang, X. und Shimizu, K. (2016). "Elucidation of the co-metabolism of glycerol and glucose in *Escherichia coli* by genetic engineering, transcription profiling, and 13C metabolic flux analysis." *Biotechnology for Biofuels*, 9, 175.
- Zhang, H., Li, Z., Pereira, B. und Stephanopoulos, G. (2015). "Engineering *E. coli*-*E. coli* cocultures for production of muconic acid from glycerol." *Microbial Cell Factories*, 14, 134.
- Zhang, H. und Stephanopoulos, G. (2013). "Engineering *E. coli* for caffeic acid biosynthesis from renewable sugars." *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 3333-3341.
- Zhao, J., Li, Q., Sun, T., Zhu, X., Xu, H., Tang, J., Zhang, X. und Ma, Y. (2013a). "Engineering central metabolic modules of *Escherichia coli* for improving β -carotene production." *Metabolic Engineering*, 17, 42-50.
- Zhao, Q., Tobimatsu, Y., Zhou, R., Pattathil, S., Gallego-Giraldo, L., Fu, C., Jackson, L. A., Hahn, M. G., Kim, H., Chen, F., Ralph, J. und Dixon, R. A. (2013b). "Loss of function of cinnamyl alcohol dehydrogenase 1 leads to unconventional lignin and a temperature-sensitive growth defect in *Medicago truncatula*." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 13660-13665.
- Zhou, K., Qiao, K., Edgar, S. und Stephanopoulos, G. (2015). "Distributing a metabolic pathway among a microbial consortium enhances production of natural products." *Nature Biotechnology*, 33, 377.
- Zhou, S., Liu, P., Chen, J., Du, G., Li, H. und Zhou, J. (2016). "Characterization of mutants of a tyrosine ammonia-lyase from *Rhodotorula glutinis*." *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 10443-10452.
- Zhu, L., Cui, W., Fang, Y., Liu, Y., Gao, X. und Zhou, Z. (2013). "Cloning, expression and characterization of phenylalanine ammonia-lyase from *Rhodotorula glutinis*." *Biotechnology Letters*, 35, 751-756.
- Zhu, Y., Liao, S., Ye, J. und Zhang, H. (2012). "Cloning and characterization of a novel tyrosine ammonia lyase-encoding gene involved in bagremycins biosynthesis in *Streptomyces sp.*" *Biotechnology Letters*, 34, 269-274.
- Zuker, M. (2003). "Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction." *Nucleic Acids Research*, 31, 3406-3415.

8 Anhang

1 Wässrige Phase nach organischer Extraktion

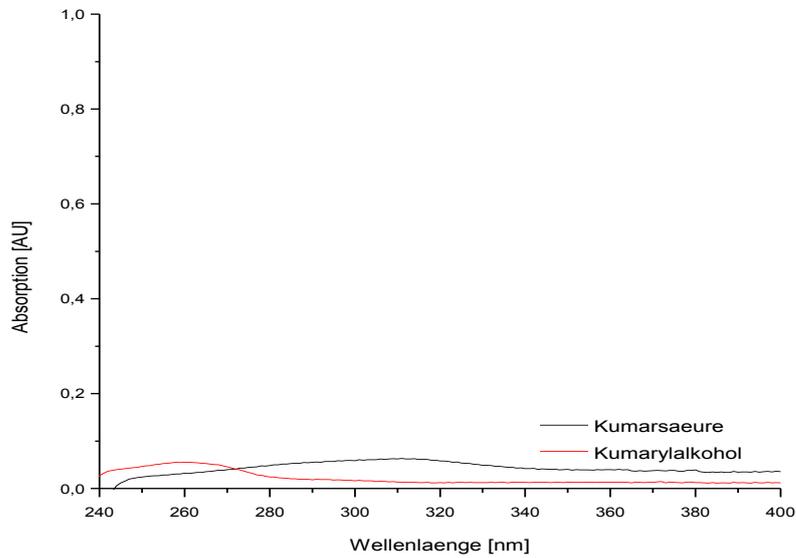
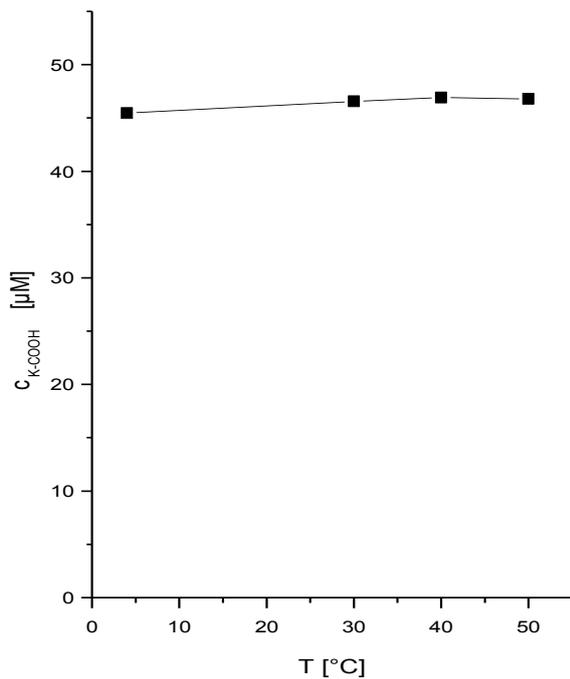


Abbildung 48: Absorptionsspektrum der wässrigen Phase nach organischer Extraktion von Kumarsäure und Kumarylalkohol.

2 Stabilität von Kumarsäure

A



B

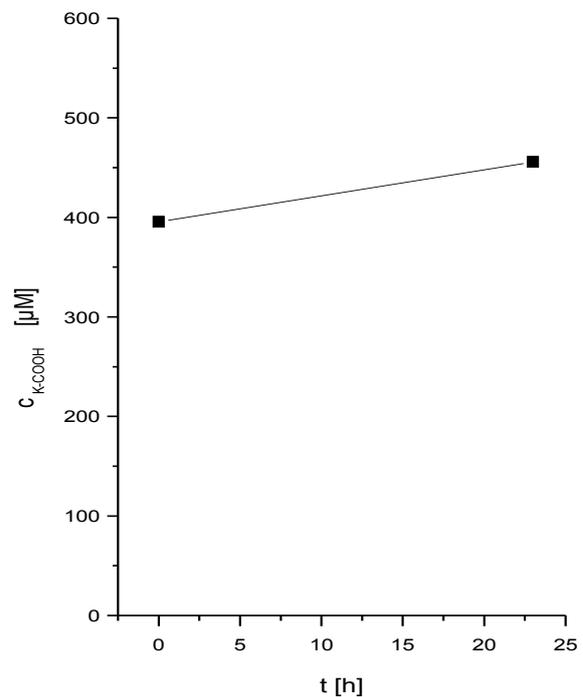


Abbildung 49: Untersuchungen zur Stabilität von Kumarsäure. A - Inkubation von Kumarsäure bei verschiedenen Temperaturen in dH_2O für 30 min; B - Inkubation von Kumarsäure in Gegenwart von lebenden *E. coli* BL21 Gold (DE3)-Zellen.

3 Anpassung von BL21 Gold (DE3) pTCCN an das Wachstum im Minimalmedium

Der Stamm *E. coli* BL21 Gold (DE3) pTCCN sollte an das Wachstum im Minimalmedium angepasst werden. Hierfür wurden 50 mL LB-Medium mit einer Einzelkolonie von einer LB-Agarplatte angeimpft und für 16 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden 100 mL Minimalmedium mit einer Start-OD von 0,2 angeimpft und bei 37°C schüttelnd inkubiert. Sobald eine OD von 2-6 erreicht wurde, wurden erneut 100 mL Minimalmedium mit einer Start-OD von 0,2 angeimpft und unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Diese Überimpfungsschritte wurden so lange fortgeführt, bis das Wachstumsverhalten der Kultur gleich bleibt (gleiche Wachstumsraten). Die Wachstumskurven inklusive Wachstumsraten sind in Abbildung 50 dargestellt.

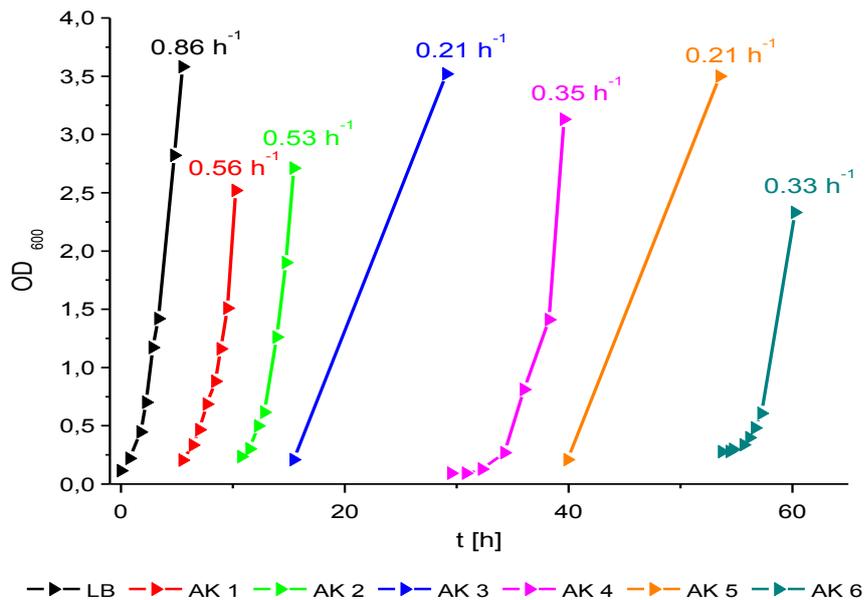


Abbildung 50: Anpassung des Stamms BL21 Gold (DE3) pTCCN an das Wachstum im Minimalmedium. Inkubation bei 37 °C. Wachstumsraten sind über den Wachstumskurven dargestellt. LB – LB-Medium, AK – Adaptationskultur.

Eine Plasmid-spezifische Kolonie-PCR ergab, dass die Adaptationskultur 6 das Plasmid pTCCN nicht mehr trug. Außerdem sind die Glycerinstocks, die von der Adaptationskultur 6 angefertigt wurden, nach der Lagerung bei -80 °C nicht mehr auf Agarplatten, die Chloramphenicol, beinhalten, angewachsen.

4 Vergleich der Expression in *E. coli* BL21 Gold (DE3) pTCCN in verschiedenen Chargen

Der Stamm *E. coli* BL21 Gold (DE3) wurde im TB-Medium bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Als eine OD von ca. 1 erreicht wurde, wurde 1 mM IPTG zugegeben und für 6 h bei 24 °C schüttelnd inkubiert. Die Genexpression wurde mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 51). Der Unterschied der hier gezeigten Kulturen liegt in der Vorkultur. Die Vorkultur in der Teilabbildung A wurde im LB-Medium angezogen. Wohingegen die Kultur in der Teilabbildung B im Minimalmedium, welches mit Pepton versetzt wurde, angezogen wurde.

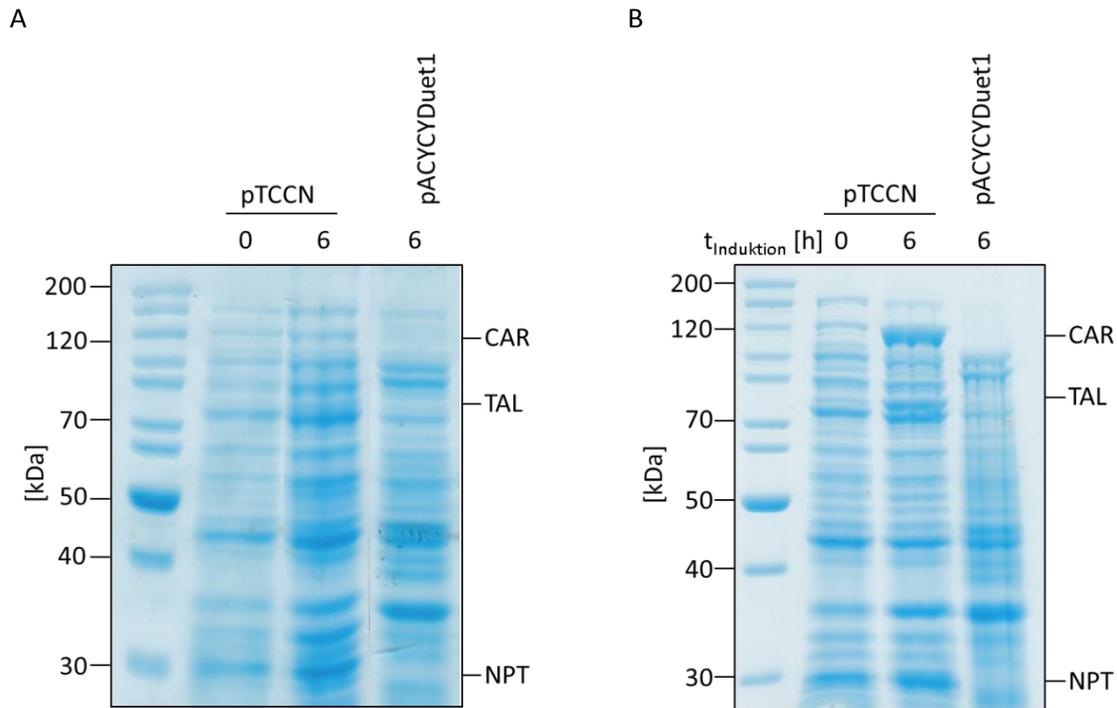


Abbildung 51: Vergleich der Genexpression in *E. coli* BL21 Gold (DE3) pTCCN mit verschiedener Verwendung des Mediums für die Vorkultur. Die Anzucht erfolgte im TB-Medium bei 37 °C. Die Genexpression erfolgte bei 24 °C für 6 h (1 mM IPTG-Zugabe bei OD = 1). A – Die Vorkultur für hier gezeigte Hauptkultur erfolgte im LB-Medium. B - Die Vorkultur für hier gezeigte Hauptkultur erfolgte im Minimalmedium, welches mit 0,1 % Pepton versetzt wurde.

5 Expression des Gens kodierend für CAD aus *Triticum aestivum* in *E. coli* BL21 Gold (DE3)

Die Expression des Gens, das für die CAD kodiert, wurde zum einen im Konstrukt pTCCN über die Zeit verfolgt, zum anderen im Konstrukt pET28_TaCAD. Beide Expressionen fanden im Stamm BL21 Gold (DE3) statt.

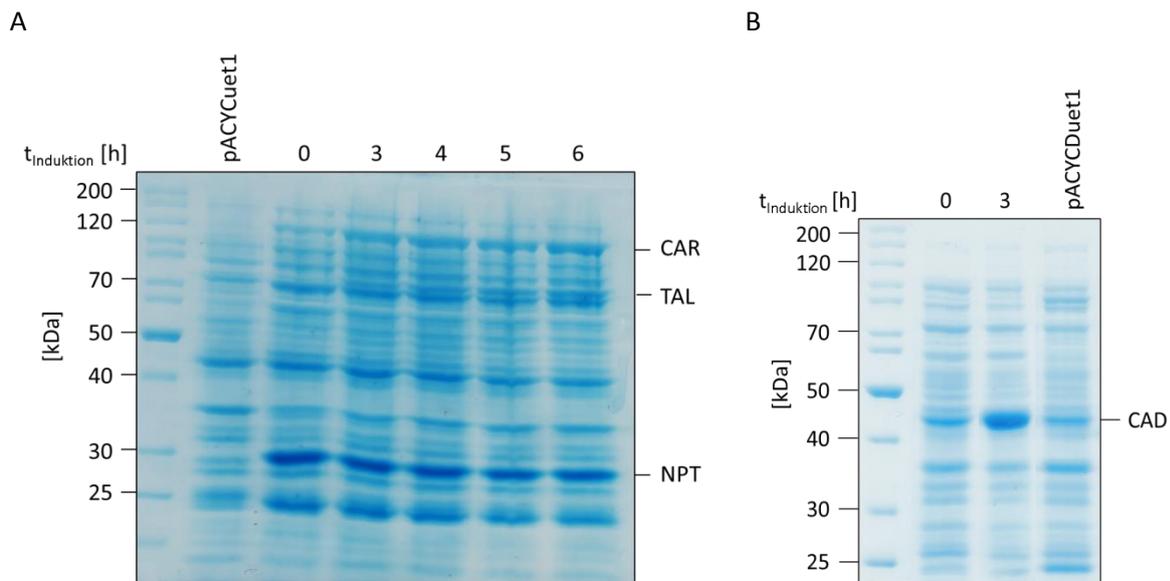
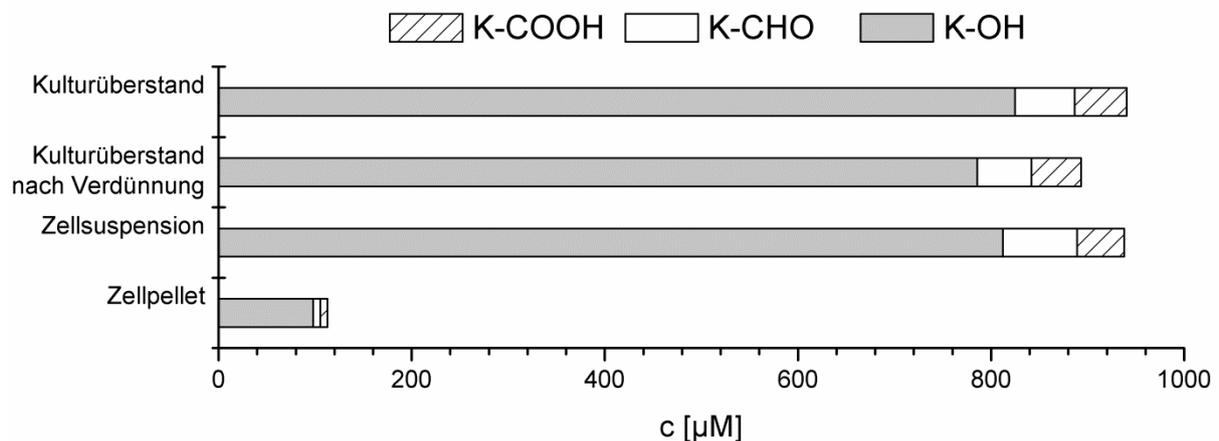


Abbildung 52: Untersuchung der Expression des Gens CAD. A - 10 %-iges SDS-PA-Gel (1 mm) zur Proteinverteilung nach Genexpression in BL21 Gold (DE3) pTCCN im Komplexmedium bei 24 °C, B - 10 %-iges SDS-PA-Gel (1 mm) zur Proteinverteilung nach Genexpression in BL21 Gold (DE3) pET28_TaCAD im Komplexmedium bei 37 °C.

6 Transport der Phenylpropanoide in den Kulturüberstand von *E. coli* BL21 Gold (DE3) pTCCN

Es wurde geprüft, ob die entstehenden Phenylpropanoide vollständig ins Medium abgegeben werden. Hierfür wurden verschiedene Proben nach Inkubation von BL21 Gold (DE3) pTCCN mit Tyrosin extrahiert und mittels HPLC analysiert.



7 Kumarylalkoholbildung in BL21 Gold (DE3) pTCN

Es wurde überprüft, ob *E. coli*-eigene Alkoholdehydrogenase die Reduktion des Kumaraldehyds zu Kumarylalkohol katalysieren. Hierfür wurde das verkürzte Konstrukt pTCN in BL21 Gold (DE3) transformiert. Nach Inkubation mit Tyrosin wurde die Produktbildung im Vergleich zum Vollängenkonstrukt pTCCN in BL21 Gold (DE3) analysiert.

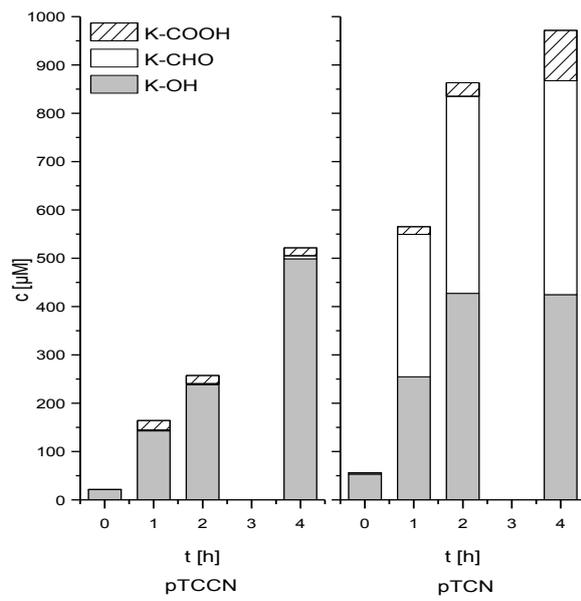


Abbildung 53: Kumarylalkoholbildung in BL21 Gold (DE3), transformiert mit 2 verschiedenen Konstrukten, im Komplexmedium mit 2 mM Tyrosin bei 37 °C.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Alwina Dillmann
Geburtsdatum / -ort: 06.06.1988 in Kransoarmejka (Kasachstan)
Nationalität: deutsch
Akademischer Grad: Master of Science in Biochemie

Schulischer und beruflicher Werdegang

03/15 – 12/18	Promotionsstudium an der Martin-Luther-Universität am Institut für Pharmazie (AG Aufarbeitung biotechnischer Produkte)
11/14 – 02/18	Wissenschaftliche Hilfskraft an der Martin-Luther-Universität am Institut für Pharmazie (AG Aufarbeitung biotechnischer Produkte)
10/12 – 10/14	Masterstudium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Masterarbeit am Institut für Pharmazie (AG Aufarbeitung biotechnischer Produkte) Thema: Kultivierung von <i>Ms. trichosporium</i> OB3b auf Methanol als C-Quelle und rekombinante Produktion des regulatorischen Proteins B aus <i>Ms. trichosporium</i> OB3b
12/11 – 01/12	Wissenschaftliche Hilfskraft an der Martin-Luther-Universität am Institut für Biochemie und Biotechnologie (AG Allgemeine Biochemie)
10/09 – 10/12	Bachelorstudium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Bachelorarbeit am Institut für Biochemie und Biotechnologie (AG Pflanzenbiochemie) Thema: MS-gestütztes <i>profiling</i> der <i>C. reinhardtii</i> -D1-Proteinmutante pseudo-Phytochelatin PC4
08/02 – 08/09	Allgemeine Hochschulreife am Wilhelm-von-Siemens-Gymnasium in Berlin