

**Carotinoid-Biosynthese und Carotinoid-Spaltung  
in *Escherichia coli* und *Pseudomonas putida*  
mittels heterologer Genexpression**

Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart zur  
Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

**Jana Hoffmann**

aus Bad Oldesloe

Hauptberichter: Prof. Dr. Ralf Mattes

Mitberichter: Prof. Dr. Bernhard Hauer

Tag der mündlichen Prüfung: 14.03.2012

Institut für Industrielle Genetik der Universität Stuttgart  
2012



# ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe.

Stuttgart, den 14.10.2011

Jana Hoffmann



# DANKSAGUNG

Bei Professor Ralf Mattes möchte ich mich für die mir zur Verfügung gestellten Mittel für die Bearbeitung des Themas, für die Erstellung des Erstgutachtens sowie die Korrektur meines Manuskriptes bedanken.

Professor Bernhard Hauer vom Institut für Technische Biochemie danke ich für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Josef Altenbuchner, der meine praktische Arbeit während der letzten Jahre begleitet und mit vielen hilfreichen Tipps und Diskussionen unterstützt und dadurch immer wieder vorangebracht hat. Ich möchte mich an dieser Stelle auch für die Korrektur meines Manuskriptes bedanken.

Dr. Holger Beuttler vom Institut für Technische Biochemie sowie Judit Bóna-Lovász und Marion Fleischer vom Institut für Systemdynamik danke ich für die Durchführung der LC-MS-Messungen und für die angenehme und produktive Zusammenarbeit.

Bei meinen Kolleginnen und Kollegen möchte ich mich ganz herzlich für die gute Zusammenarbeit, die vielfältige Unterstützung und alle schönen Momente bedanken, die ich in den letzten Jahren mit ihnen erlebt habe.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, meinen Freunden und allen anderen Wegbegleitern bedanken, die zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1 Zusammenfassungen</b> .....	<b>15</b>
1.1 Zusammenfassung .....	15
1.2 Summary .....	17
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>20</b>
2.1 Carotinoide und Apocarotinoide: Struktur, Verbreitung und Funktionen...20	
2.2 Biosynthese von Carotinoiden .....	29
2.3 Carotinoid-Spaltung durch Carotinoid-Oxygenasen .....	35
2.4 Wirtschaftliche Relevanz von Carotinoiden und Apocarotinoiden und ihre technischen Applikationen .....	39
2.5 Mikrobielle Produktion von Carotinoiden und Apocarotinoiden.....	43
2.6 Ziel dieser Arbeit.....	47
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>48</b>
3.1 Material .....	48
3.1.1 Stämme .....	48
3.1.2 Chromosomale DNA .....	49
3.1.3 Plasmide .....	49
3.1.4 Oligonukleotide .....	54
3.1.5 Nährmedien .....	58
3.1.6 Puffer und Lösungen.....	59
3.1.7 Carotinoid-Referenzsubstanzen .....	62
3.1.8 Antibiotika und andere Mediumszusätze .....	62
3.1.9 Kits.....	63
3.1.10 Chemikalien, Enzyme und sonstiges Material .....	63
3.1.11 Geräte.....	64

3.2	Kultivierung von Bakterienstämmen.....	67
3.3	Stammhaltung.....	68
3.4	Transformationsmethoden .....	69
3.4.1	Chemische Transformation von <i>Escherichia coli</i> (Chung <i>et al.</i> , 1989) .....	69
3.4.2	Elektroporation von <i>Pseudomonas</i> sp. (Dennis und Sokol, 1995).....	69
3.5	Konjugation von <i>Escherichia coli</i> S17-1 mit <i>Escherichia coli</i> JM109 oder <i>Pseudomonas</i> sp. ....	70
3.6	Zellaufschlussmethoden .....	71
3.6.1	Zellaufschluss mit dem Ultraschallhomogenisator .....	71
3.6.2	Zellaufschluss mit dem Hochdruckhomogenisator .....	71
3.7	Zelltrockenmassebestimmung .....	71
3.8	Methoden DNA .....	73
3.8.1	Agarose-Gelelektrophorese (Sharp <i>et al.</i> , 1973).....	73
3.8.2	PCR (Mullis <i>et al.</i> , 1986).....	73
3.8.2.1	Amplifikation von DNA für Klonierungen .....	73
3.8.2.2	Overlap Extension PCR (Higuchi <i>et al.</i> , 1988) .....	74
3.8.2.3	Kolonie-PCR.....	76
3.8.3	Plasmidisolierung (Lee und Rasheed, 1990, modifiziert) .....	77
3.8.4	Plasmidisolierung mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit.....	78
3.8.5	Isolierung von chromosomaler DNA .....	78
3.8.6	Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten.....	78
3.8.7	Isopropanol-Fällung .....	78
3.8.8	Restriktionsverdau .....	79
3.8.9	Modifikation von DNA-Enden.....	79
3.8.9.1	Dephosphorylierung .....	79
3.8.9.2	Klenow-Behandlung (Klenow und Henningsen, 1970).....	79
3.8.10	Ligation von DNA-Fragmenten .....	80
3.8.11	DNA-Sequenzierung.....	80
3.8.12	DNA-Quantifizierung.....	80
3.8.13	Herstellung von pJH79 durch Sequenzaustausch mit dem Lambda-Red System (Datsenko und Wanner, 2000) .....	80
3.9	Methoden Proteine.....	82
3.9.1	SDS-PAGE (Laemmli, 1970) .....	82
3.9.2	Proteinreinigung mit <i>Strep-Tactin</i> ® Sepharose.....	83

3.9.3	Proteinquantifizierung (Bradford, 1976).....	84
3.10	Methoden Carotinoide .....	85
3.10.1	Quantifizierung von Carotinoiden (Britton <i>et al.</i> , 2004) .....	85
3.10.2	Herstellung von Carotinoid-Mizellen.....	88
3.10.3	<i>In vitro</i> Umsetzungen von Carotinoiden.....	89
3.10.3.1	Umsetzungen mit gereinigtem Enzym.....	89
3.10.3.2	Umsetzungen mit ganzen Zellen.....	89
3.10.4	Extraktionsmethoden .....	90
3.10.4.1	Extraktion von Lycopin aus Tomatenmark.....	90
3.10.4.2	Präparation von Zeaxanthin aus Wolfsbeeren (Inbaraj <i>et al.</i> , 2008, modifiziert).....	90
3.10.4.3	Extraktion von Carotinoid-produzierenden Bakterienstämmen.....	91
3.10.4.4	Extraktion von Carotinoid-Umsetzungen mit ganzen Zellen .....	91
3.10.4.5	Extraktion von <i>in vitro</i> Carotinoid-Umsetzungen mit gereinigtem Enzym .....	92
3.11	Chromatographie.....	93
3.11.1	HPLC-Analytik.....	93
3.11.1.1	Trennsäule, Laufmittel und HPLC-Gradienten .....	93
3.11.1.2	Kalibrierung .....	94
3.11.2	Dünnschichtchromatographie.....	95
3.12	Massenspektrometrie .....	98
3.12.1	Equipment und Methode Institut für Technische Biochemie .....	98
3.12.2	Equipment und Methode Institut für Systemdynamik.....	99
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>100</b>
4.1	Heterologe Carotinoid-Biosynthese .....	100
4.1.1	Vektoren und Klonierungsstrategie .....	100
4.1.2	Heterologe Carotinoid-Biosynthese mit bakteriellen Enzymen .....	103
4.1.2.1	<i>Pantoea ananatis</i> : Lycopin, $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin .....	103
4.1.2.2	<i>Brevundimonas</i> sp. SD212: Astaxanthin, Canthaxanthin und Nostoxanthin.....	107
4.1.2.3	<i>Corynebacterium glutamicum</i> : C <sub>50</sub> -Carotinoide.....	111
4.1.2.4	<i>Sphingopyxis alaskensis</i> RB2256: Nostoxanthin .....	114
4.1.2.5	<i>Plesiocystis pacifica</i> SIR-1: $\beta$ -Carotin, Hydroxylycopin, Dihydroxylycopin und Isorenieratin.....	120
4.2	Produktionsstämme für Carotinoide.....	130
4.2.1	<i>Escherichia coli</i> JM109 und <i>Escherichia coli</i> WA66.1 $\Delta xthA$ .....	130

4.2.2	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440.....	136
4.2.2.1	Die Auswirkungen von heterologer Carotinoid-Produktion auf <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 .....	136
4.2.2.2	Identifizierung des toxischen Intermediates oder Genproduktes .....	138
4.2.2.3	Transposon-Mutagenese zur Identifizierung von Genen, durch deren Inaktivierung die Toxizität von Lycopin reduziert wird .....	141
4.2.2.4	Reproduktion der Ergebnisse durch gezielte Mutagenese .....	146
4.3	Bakterielle Carotinoid-Oxygenasen.....	152
4.3.1	Suche nach unbeschriebenen Carotinoid-Oxygenasen .....	152
4.3.2	Klonierung der Gene und Kontrolle der Genexpression mittels SDS-PAGE.....	153
4.3.3	Test auf Carotinoid-Spaltaktivität .....	155
4.3.4	Charakterisierung der Carotinoid-Oxygenase Sala_1698 .....	157
4.3.4.1	Entkopplung der Oxygenase-Synthese von der Carotinoid-Synthese und Untersuchung der Spaltung von verschiedenen Carotinoiden <i>in vivo</i> .....	157
4.3.4.2	Enzymaufreinigung von Sala_1698 mit <i>Strep-Tactin</i> <sup>®</sup> Sepharose.....	161
4.3.4.3	<i>In vitro</i> Carotinoid-Umsetzungen mit gereinigtem Sala_1698.....	163
4.3.4.4	Identifizierung der Apo-8'-carotinal-Spaltprodukte von Sala_1698 mittels LC-MS-Analyse .....	169
4.3.5	Charakterisierung der Carotinoid-Oxygenase Ppsir1_15490 .....	173
4.3.5.1	Untersuchung der Spaltung verschiedener Carotinoide <i>in vivo</i> .....	173
4.3.5.2	Verbesserung der Expression von <i>ppsir1_15490</i> .....	181
4.3.5.3	Carotinoid-Umsetzungen mit ganzen Zellen von <i>E. coli</i> JM109 pJH66.1 ..	185
4.3.5.4	Isolierung und LC-MS-Analyse der Carotinoid-Spaltprodukte von Ppsir1_15490.....	190
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>200</b>
5.1	Heterologe Carotinoid-Biosynthese .....	200
5.1.1	Herstellung von Vektoren für die heterologe Carotinoid-Biosynthese.....	200
5.1.2	Funktionelle Charakterisierung von Carotinoid-Biosyntheseenzymen.....	204
5.2	Produktionsstämme für Carotinoide.....	208
5.2.1	<i>Escherichia coli</i> JM109 und <i>Escherichia coli</i> WA66.1 $\Delta xthA$ .....	208
5.2.2	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440.....	211
5.3	Bakterielle Carotinoid-Oxygenasen.....	216
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>225</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
Amp <sup>r</sup>	Ampicillin-Resistenz
APCI	atmospheric pressure chemical ionization
Apr	Apramycin
Apr <sup>r</sup>	Apramycin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
Ara	L-(+)-Arabinose
<i>B. sp.</i>	<i>Brevundimonas sp. SD212</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
C	Cytosin
ca.	circa
c-di-GMP	bis-(3',5')-cyclisches di-Guanosinmonophosphat
CDL	curved desolvation line
Cml	Chloramphenicol
Cml <sup>r</sup>	Chloramphenicol-Resistenz
CoA	Coenzym A
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EK	Endkonzentration
ESI	electrospray ionization

<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FPP	Farnesylpyrophosphat
5-FU	5-Fluorouracil
G	Guanin
GC	Guanin/Cytosin
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GPP	Geranylpyrophosphat
Glc	$\alpha$ -D-Glucose
Gly	Glycerin
HABA	2-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
HF	high fidelity
His	Histidin
HPLC	high pressure liquid chromatography
LC	liquid chromatography
ID	Identität
IIG	Institut für Industrielle Genetik, Universität Stuttgart
IPP	Isopentenylpyrophosphat
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
ISYS	Institut für Systemdynamik, Universität Stuttgart
ITB	Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart
IUB	International Union of Biochemistry
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
Kan	Kanamycin
Kan <sup>r</sup>	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	lysogeny broth
MA	Maine
mAU	milli absorbance units
MTBE	<i>tert</i> -Butylmethylether
MS	Massenspektrometrie, Massenspektrometer
MZ	mitteleuropäische Zeit

Nal	Nalidixinsäure
Nal <sup>r</sup>	Nalidixinsäure-Resistenz
NaPP	Natriumphosphatpuffer
NC	North Carolina
NJ	New York
NMR	nuclear magnetic resonance
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
1 OD Zellen	1 x 10 <sup>9</sup> Zellen
<i>P. a.</i>	<i>Pantoea ananatis</i>
<i>P. p.</i>	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR(s)	Polymerasekettenreaktion(en)
PEG	Polyethylenglykol
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
Rha	L-(+)-Rhamnose
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
<i>S. a.</i>	<i>Sphingopyxis alaskensis</i> RB2256
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMEB	sucrose magnesium electroporation buffer
Spc <sup>r</sup>	Spectinomycin-Resistenz
Str	Streptomycin
Strep	Streptavidin
Str <sup>r</sup>	Streptomycin-Resistenz
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
TB	terrific broth
TCEP	Tris(2-Carboxyethyl)phosphin

TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethan-1,2-diamin
Tet	Tetracyclin
Tet <sup>r</sup>	Tetracyclin-Resistenz
<i>T<sub>m</sub></i>	Schmelztemperatur
Tmp <sup>r</sup>	Trimethoprim-Resistenz
Tris	Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	transformation and storage solution
TY	tryptone-yeast extract
U	Unit
UV/Vis	ultraviolett/sichtbar
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
Ztrm.	Zelltrockenmasse

# 1 ZUSAMMENFASSUNGEN

## 1.1 Zusammenfassung

Für die heterologe Produktion von Carotinoiden mit *Escherichia coli* wurde ein pBBR1MCS-2- und pBR322-basiertes Zwei-Plasmid-Expressionssystem mit L-Rhamnose-induzierbaren Promotoren konstruiert. Die verwendeten Carotinoid-Biosynthesegene stammen aus *Pantoea ananatis*, *Brevundimonas* sp. SD212 und *Corynebacterium glutamicum*. Mit den hergestellten Vektoren können die C<sub>40</sub>-Carotinoide Lycopin,  $\beta$ -Carotin, Zeaxanthin, Canthaxanthin und Astaxanthin sowie die C<sub>50</sub>-Carotinoide Sarcinaxanthin, Sarprenoxanthin und Decaprenoxanthin produziert werden. Die Carotinoid-Ausbeuten mit *Escherichia coli* JM109 betragen ca. 1 mg Carotinoid pro Gramm Zelltrockenmasse.

Durch den Einsatz des *Escherichia coli* Stammes WA66.1  $\Delta xthA$  konnte im Vergleich zu *Escherichia coli* JM109 die Carotinoid-Ausbeute beträchtlich gesteigert werden. Der Stamm produzierte 4,5 mg Lycopin pro Gramm Zelltrockenmasse. Die bessere Eignung des Stammes beruht möglicherweise auf seiner Unfähigkeit zur L-Rhamnose-Verwertung. Durch die heterologe Expression von Genen aus dem Mevalonat-Stoffwechselweg von *Saccharomyces cerevisiae* und eine gleichzeitige Mevalonat-Zugabe konnte die Carotinoid-Produktion mit *Escherichia coli* WA66.1  $\Delta xthA$  auf 11,4 mg Lycopin pro Gramm Zelltrockenmasse gesteigert werden.

*Pseudomonas putida* KT2440 wurde hinsichtlich seiner Eignung als Produktionsstamm für Carotinoide getestet. Die Untersuchungen zeigten, dass Lycopin auf *Pseudomonas putida* KT2440 toxisch wirkt und dieser Stamm daher grundsätzlich nicht besonders gut für die heterologe Carotinoid-Produktion geeignet ist. Durch eine Transposon-Mutagenese konnten Mutanten mit erhöhter Lycopin-Toleranz isoliert werden. Die Identifizierung der von der Integration der Transposons betroffenen Gene brachte jedoch keine ausreichenden Erkenntnisse für ein Ver-

ständnis der individuellen Mechanismen, die der Verringerung der Lycopin-Toxizität zugrunde liegen.

In der Genomsequenz von *Sphingopyxis alaskensis* RB2256 wurden durch eine Datenbanksuche die mutmaßlichen Carotinoid-Biosynthesegene *crtE*, *crtB*, *crtI*, *crtY*, *crtZ* und *crtG* gefunden. Die Analyse des von *Sphingopyxis alaskensis* RB2256 produzierten Hauptcarotinoide mittels HPLC, Massenspektrometrie und Photometrie ergab, dass es sich höchstwahrscheinlich um Nostoxanthin handelt. Die funktionelle Charakterisierung des mutmaßlichen CrtG von *Sphingopyxis alaskensis* RB2256 mittels HPLC konnte dessen Identität als  $\beta$ -Endgruppen-C2,C2'-Hydroxylase bestätigen. Die heterologe Produktion von Nostoxanthin als Hauptcarotinoid mit *Escherichia coli* ist jedoch nicht gelungen.

Die funktionelle Charakterisierung der mutmaßlichen Carotinoid-Biosynthesegene *crtC*, *crtU* und *crtY* von *Plesiocystis pacifica* SIR-1 mittels HPLC, Massenspektrometrie und Photometrie ergab, dass diese eine  $\psi$ -Engruppen-C1,C1'-Hydroxylase,  $\beta$ -Carotin-Desaturase und Lycopin- $\beta$ -Cyclase kodieren. Mit Hilfe von *crtC* und *crtU* wurde das Zwei-Plasmid-Expressionssystem erweitert. Dadurch konnten mit *Escherichia coli* JM109 zusätzlich Hydroxylycopin, Dihydroxylycopin und Isorenieratin produziert werden.

Die Carotinoid-Oxygenase Sala\_1698 aus *Sphingopyxis alaskensis* RB2256 spaltet monocyclische und acyclische Substrate. Durch die heterologe Expression von *sala\_1698* in Carotinoid-produzierenden *Escherichia coli* JM109 Stämmen wurde eine Spaltaktivität von Sala\_1698 für Lycopin, Hydroxylycopin und Dihydroxylycopin nachgewiesen. Das Enzym wurde mittels *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Sepharose aufgereinigt und durch *in vitro* Umsetzungen von Apo-8'-carotinal genauer charakterisiert. Sala\_1698 war in einem pH-Bereich von 7,0 bis 9,6 gleichbleibend aktiv. Das Temperaturoptimum des Enzyms liegt zwischen 30 und 40 °C. Durch die Analyse der Apo-8'-carotinal-Spaltprodukte mittels Massenspektrometrie und Photometrie wurden zwei Schnittpositionen an den 9'/10'- und 11'/12'-Doppelbindungen identifiziert. Es blieb jedoch ungeklärt, ob die Spaltung durch Sala\_1698 an den identifizierten Positionen unpräzise oder sukzessiv erfolgt.

Die Carotinoid-Oxygenase Ppsir1\_15490 aus *Plesiocystis pacifica* SIR-1 spaltet Carotinoide mit Hydroxygruppen und/oder Ketogruppen. Durch die heterologe Expression von *ppsir1\_15490* in Carotinoid-produzierenden *Escherichia coli*

JM109 Stämmen wurden die C<sub>40</sub>-Carotinoide Dihydroxylycopin und Zeaxanthin sowie die C<sub>50</sub>-Carotinoide Sarcinaxanthin, Sarprenoxanthin und Decaprenoxanthin als Substrate für Ppsir1\_15490 identifiziert. Die Expression des GC-reichen Gens in *Escherichia coli* wurde durch die Mutagenese der ersten vier Codons nach dem Startcodon verbessert (*ppsir1\_15490mut*). Durch die Umsetzung von verschiedenen Carotinoiden mit *ppsir1\_15490mut*-überexprimierenden, ganzen Zellen von *Escherichia coli* JM109 konnte die Spaltaktivität von Ppsir1\_15490 für Zeaxanthin bestätigt und darüber hinaus auch Spaltaktivitäten für Nostoxanthin, Canthaxanthin und Astaxanthin gemessen werden. Die Analyse der Spaltprodukte mittels Massenspektrometrie zeigte, dass das Enzym Zeaxanthin, Nostoxanthin und Canthaxanthin unpräzise an den 11'/12'- oder 13'/14'-Doppelbindungen spaltet. Astaxanthin hingegen wird von Ppsir1\_15490 präzise an der 13'/14'-Doppelbindung gespalten.

## 1.2 Summary

An L-rhamnose-inducible two plasmid expression system based on the replicons pBBR1MCS-2 and pBR322 was constructed for the heterologous production of carotenoids in *Escherichia coli*. The cloned carotenoid biosynthesis genes originate from *Pantoea ananatis*, *Brevundimonas* sp. SD212 and *Corynebacterium glutamicum*. The constructed vectors were applied for the production of the C<sub>40</sub> carotenoids lycopene,  $\beta$ -carotene, zeaxanthin, canthaxanthin and astaxanthin and also the C<sub>50</sub> carotenoids sarcinaxanthin, sarprenoxanthin and decaprenoxanthin. Plasmid-carrying *Escherichia coli* JM109 strains produced about 1 mg carotenoid per gramme cell dry weight.

Compared to *Escherichia coli* JM109, the carotenoid yields obtained with *Escherichia coli* WA66.1  $\Delta xthA$  were considerably higher. The strain produced 4.5 mg lycopene per gramme cell dry weight. The superior applicability of *Escherichia coli* WA66.1  $\Delta xthA$  for carotenoid production is possibly due to its inability to use L-rhamnose as a carbon source. Lycopene production with *Escherichia coli* WA66.1  $\Delta xthA$  was improved by heterologous expression of genes from the mevalonate pathway of *Saccharomyces cerevisiae* and

simultaneous addition of mevalonate, thereby producing 11.4 mg lycopene per gramme cell dry weight.

*Pseudomonas putida* KT2440 was tested as a host for heterologous carotenoid production. The investigations revealed that lycopene is toxic to *Pseudomonas putida* KT2440 and the strain is therefore generally not a proper host for the heterologous production of carotenoids. Lycopene-tolerant mutants could be isolated by employing transposon mutagenesis. However, the identification of the genes affected by the transposon integration gave no sufficient evidences for the comprehension of the individual mechanisms that underlie the reduction of lycopene toxicity.

A database search revealed the presence of the putative carotenoid biosynthesis genes *crtE*, *crtB*, *crtI*, *crtZ* and *crtG* in the genome sequence of *Sphingopyxis alaskensis* RB2256. Analyses with HPLC, mass spectrometry and photometry revealed that the major carotenoid pigment of *Sphingopyxis alaskensis* RB2256 is most likely nostoxanthin. Functional characterization of putative CrtG by HPLC could confirm its identity as a  $\beta$ -end group C2,C2' hydroxylase. However, the heterologous production of nostoxanthin as the predominant carotenoid in *Escherichia coli* JM109 failed.

Functional characterization of the putative carotenoid biosynthesis genes *crtC*, *crtU* and *crtY* from *Plesiocystis pacifica* SIR-1 with HPLC, mass spectrometry and photometry revealed that the genes encode a  $\psi$ -end group C1,C1' hydroxylase, a  $\beta$ -carotene desaturase and a lycopene  $\beta$ -cyclase, respectively. Extension of the two-plasmid expression system with *crtC* and *crtU* enabled the additional production of hydroxy lycopene, dihydroxy lycopene and isorenieratene with *Escherichia coli* JM109.

The carotenoid oxygenase Sala\_1698 from *Sphingopyxis alaskensis* RB2256 cleaves monocyclic and acyclic substrates. Heterologous expression of *sala\_1698* in carotenoid-producing *Escherichia coli* JM109 strains revealed cleavage activity of Sala\_1698 for lycopene hydroxy lycopene and dihydroxy lycopene. The enzyme was purified with Strep-Tactin<sup>®</sup> sepharose and further characterized by *in vitro* studies on apo-8'-carotenal cleavage. Enzyme activity was constant at pH values between 7.0 and 9.6. The temperature optimum of Sala\_1698 lies between 30 and 40 °C. By analysing the cleavage products of apo-8'-carotenal with mass spectro-

metry and photometry, two cleavage sites at the 9'/10' and 11'/12' double bonds could be identified. However, it remained unresolved whether the cleavage of apo-8'-carotenal by Sala\_1698 occurs imprecisely or successively.

The carotenoid oxygenase Ppsir1\_15490 from *Plesiocystis pacifica* SIR-1 cleaves substrates with hydroxy and/or keto groups. Heterologous expression of *ppsir1\_15490* in carotenoid-producing *Escherichia coli* JM109 strains revealed cleavage activity of Ppsir1\_15490 for the C<sub>40</sub> carotenoids dihydroxy lycopene and zeaxanthin and also the C<sub>50</sub> carotenoids sarcinaxanthin, sarprenoxanthin and decaprenoxanthin. The expression of the GC-rich *ppsir1\_15490* in *Escherichia coli* was improved by mutagenesis of the first four codons following the initiation codon (*ppsir1\_15490mut*). Whole cells of *ppsir1\_15490mut*-overexpressing *Escherichia coli* JM109 were applied for the conversion of different carotenoids. Thereby, cleavage activity of Ppsir1\_15490 for zeaxanthin was confirmed and furthermore cleavage activities for nostoxanthin, canthaxanthin and astaxanthin were detected. Analysis of the cleavage products with mass spectrometry revealed, that the enzyme cleaves zeaxanthin, nostoxanthin and canthaxanthin imprecisely at the 11'/12' or 13'/14' double bonds. Astaxanthin is cleaved precisely by Ppsir1\_15490 at the 13'/14' double bond.

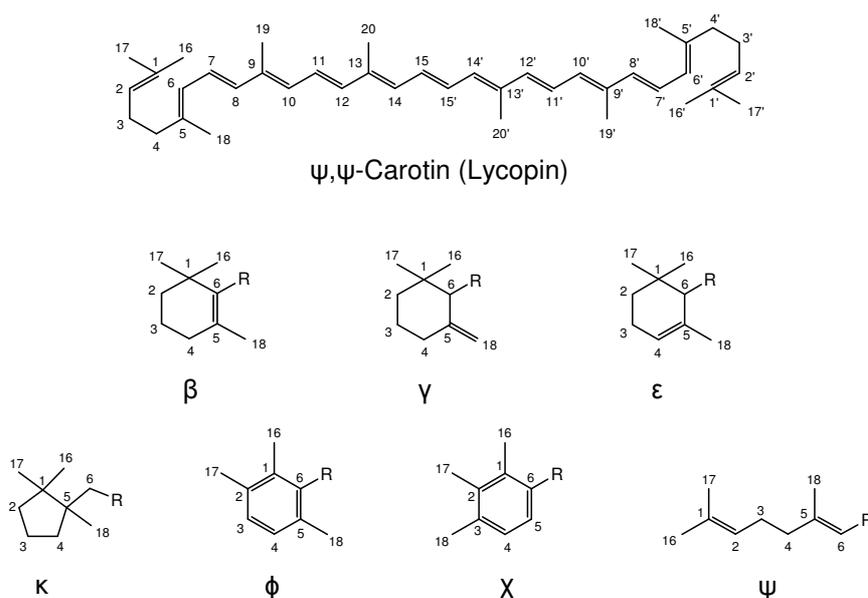
## 2 EINLEITUNG

### 2.1 Carotinoide und Apocarotinoide: Struktur, Verbreitung und Funktionen

Im Jahr 1831 isolierte der deutsche Chemiker Heinrich Wilhelm Ferdinand Wackenroder erstmals den orangen Farbstoff der Karotte (*Daucus carota*) (Russell, 1936). Die von ihm nach dem farbigen Wurzelgemüse mit Carotin benannte Substanz gab letztlich der ganzen Klasse der Carotinoide ihren Namen. Seit den Anfängen der Carotinoid-Forschung zu Beginn des 19. Jahrhunderts wurden über 700 der natürlichen, gelben bis roten Farbstoffe beschrieben (Britton *et al.*, 2004). Carotinoid-Produzenten sind in allen Domänen des Lebens zu finden; sie werden von allen photosynthetisch aktiven Organismen wie Pflanzen, Cyanobakterien und Anoxyphotobakterien, aber auch von vielen photosynthetisch inaktiven Pilzen und Bakterien sowie Archaeen synthetisiert.

Chemisch gesehen gehören Carotinoide zu den Terpenen. Die Verbindungen dieser Substanzklasse können auf eine Grundeinheit mit fünf C-Atomen, das Isopren, zurückgeführt werden. Je nachdem, wie viele Isopreneinheiten das Molekül bilden, unterscheidet man zwischen Mono-, Sesqui-, Di-, Tri-, Tetra-, und Polyterpenen. Alle Carotinoide leiten sich von einer aus acht Isopren-Einheiten bestehenden Grundstruktur mit vierzig C-Atomen ab und werden daher den Tetraterpenen zugeordnet. Bei Apocarotinoiden handelt es sich um Carotinoid-Spaltprodukte mit mehr oder weniger stark verkürztem Kohlenstoff-Gerüst. Trotz der Tatsache, dass diese Verbindungen meistens weniger als vierzig C-Atome haben, werden sie aufgrund ihrer strukturellen Ableitung von den Carotinoiden ebenfalls den Tetraterpenen zugeordnet. Die Nomenklatur für Carotinoide wurde von der IUPAC Commission on Nomenclature of Organic Chemistry und der IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1975) festgelegt. Grundsätzlich werden Carotinoide in zwei Gruppen unterteilt; die Carotine sind reine Kohlenwasserstoffe, während ihre Sauerstoff-haltigen Derivate als

Xanthophylle bezeichnet werden. Alle Carotinoide leiten sich formal vom Lycopin ab, dessen Grundstruktur durch Hydroxylierung, Dehydrierung, Cyclisierung, Oxidation sowie Verkürzung oder Verlängerung des Kohlenstoff-Gerüsts verändert sein kann. Die C-Atome werden wie in Abb. 1 dargestellt nummeriert. Mit Hilfe dieser Nummerierung wird die Position des Moleküls angegeben, an der eine von Lycopin abweichende Struktur vorliegt.



**Abb. 1:** Nummerierung der C-Atome von  $\psi,\psi$ -Carotin (Lycopin) und verschiedenen Endgruppen von Carotinoiden.

Der systematische Name von Lycopin, „Carotin“, ist der Stammname für die Bezeichnung aller Carotinoide. Die Molekülenden von Carotinoiden werden mit kleinen griechischen Buchstaben benannt, wobei jedes Ende separat bezeichnet wird. Die acyclische Form, wie sie bei Lycopin vorliegt, wird mit  $\psi$  bezeichnet, der systematische Name von Lycopin lautet also „ $\psi,\psi$ -Carotin“. Aus einer Cyclisierung von Lycopin können sechs verschiedenen Endstrukturen resultieren (Abb. 1). Ein Cyclohexenring wird je nach Lage der Doppelbindung mit  $\beta$  oder  $\epsilon$  bezeichnet. Ein Isomer dieser Endformen ist der Methylencyclohexanring, welcher mit  $\gamma$  benannt wird. Daneben kann als Endform ein Cyclopentanring,  $\kappa$  genannt, vorliegen oder auch arylische Endgruppen vom  $\phi$  oder  $\chi$ -Typ.



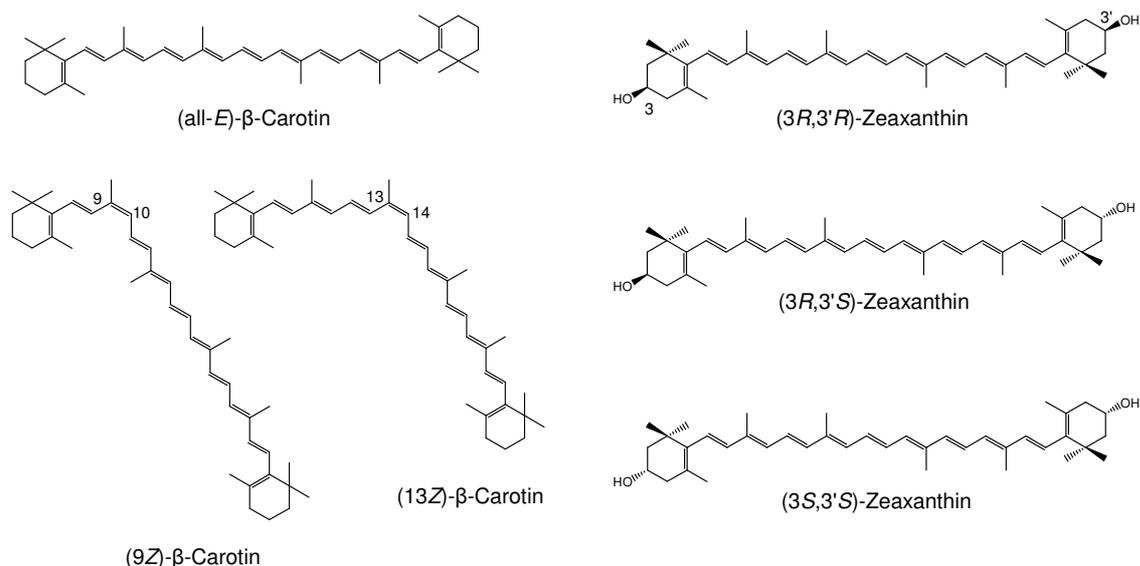
Trotz des Vorhandenseins einer Systematik für ihre Benennung (für Beispiele siehe Tab. 1) existieren für die meisten Carotinoide geläufige Trivialnamen, die sich häufig von den Namen der Organismen ableiten aus denen sie erstmals isoliert wurden. Beispielsweise leitet sich der Name „Capsanthin“ von der Paprika (*Capsicum annum*) ab, „Astaxanthin“ vom Hummer (*Astacus gammarus*) und „Isorenieratin“ vom dem marinen Schwamm *Reniera japonica* (Abb. 2).

**Tab. 1:** Trivialnamen und systematische Namen einiger ausgewählter Carotinoide nach der IUPAC Commission on Nomenclature of Organic Chemistry und der IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1975).

Trivialname	Systematischer Name
Lycopin	$\psi,\psi$ -Carotin
$\beta$ -Carotin	$\beta,\beta$ -Carotin
$\alpha$ -Carotin	(6' <i>R</i> )- $\beta,\epsilon$ -Carotin
Decaprenoxanthin	(2 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,2' <i>R</i> ,6' <i>R</i> )-2,2'-Bis(4-hydroxy-3-methyl-2-butenyl)- $\epsilon,\epsilon$ -carotin
Capsanthin	(3 <i>R</i> ,3' <i>S</i> ,5' <i>R</i> )-3,3'-Dihydroxy- $\beta,\kappa$ -carotin-6'-on
Isorenieratin	$\phi,\phi$ -Carotin
Crocetin	8,8'-Diapo-carotin-8,8'-disäure
Violaxanthin	(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,3' <i>S</i> ,5' <i>R</i> ,6' <i>S</i> )-5,6,5',6'-Diepoxy-5,6,5',6'-tetrahydro- $\beta,\beta$ -carotin-3,3'-diol

Für die Veranschaulichung ihrer strukturellen Vielfalt sind in Abb. 2 nur die vereinfachten planaren Strukturformeln von Carotinoiden und Apocarotinoiden dargestellt, jedoch sind diese Verbindungen in Wirklichkeit komplexe dreidimensionale Gefüge mit ausgeprägter Stereochemie. Für die Bezeichnung von geometrischen Isomeren wird die *E/Z*- oder *cis/trans*-Terminologie verwendet, welche die Position von Substituenten um eine planare C-C-Doppelbindung angibt. In den meisten Fällen können die Bezeichnungen *E* und *trans* bzw. *Z* und *cis* analog verwendet werden, allerdings ist zu beachten, dass es diesbezüglich Ausnahmen gibt und in diesen Fällen die *E/Z*-Terminologie die präzisere ist (IUPAC Commission on Nomenclature of Organic Chemistry und IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, 1975). In Abb. 3 sind drei Beispiele für geometrische Isomere von  $\beta$ -Carotin gezeigt. Die Umwandlung der energieärmeren und somit bevorzugten (all-*E*)-Form eines Carotinoids in (*Z*)-Isomere kann z. B. durch die Einwirkung von Iod, Säure, hohen Temperaturen oder Licht hervorgerufen werden (Carter und

Gillam, 1939; Polgár und Zechmeister, 1943; Zechmeister *et al.*, 1943; Zechmeister und Tuzson, 1939). Funktionelle *E/Z*-Isomerisierung von Apocarotinoiden kommt in lebenden Organismen z. B. im Sehcyclus vor (Britton *et al.*, 2008).

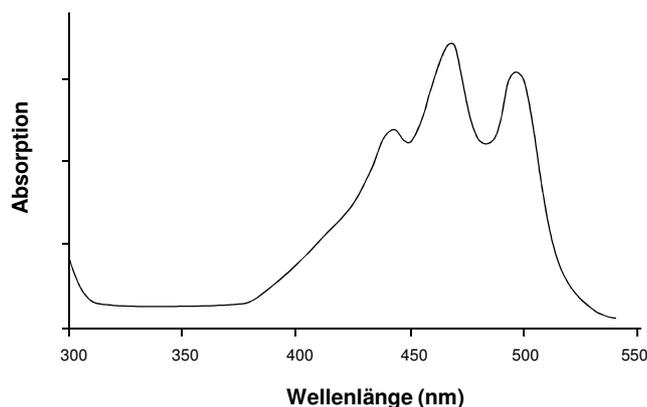


**Abb. 3:** Geometrische Isomere von β-Carotin und Diastereomere von Zeaxanthin.

Die Mehrzahl der natürlich vorkommenden Carotinoide besitzen ein oder mehrere chirale Zentren (Britton *et al.*, 2008). Für die Beschreibung der absoluten Konfiguration von Carotinoiden wird die *R/S*-Terminologie verwendet. Abb. 3 zeigt drei Diastereomere von Zeaxanthin. Dieses Carotinoid besitzt zwei chirale Zentren: die C-Atome 3 und 3'. In der Natur gibt es zahlreiche Organismen, die Carotinoide enantioselektiv synthetisieren, aber auch viele, die mehrere Isomere eines Carotinoids enthalten. Beispielsweise kommt in *Erwinia herbicola* ausschließlich (3*R*,3'*R*)-Zeaxanthindiglycosid vor (Hundle *et al.*, 1991). Aus Hummer (*Homarus gammarus*) wurden alle drei Astaxanthin-Isomere isoliert, wohingegen die Hefe *Phaffia rhodozyma* nur (3*R*,3'*R*)-Astaxanthin produziert und die Alge *Haematococcus pluvialis* nur (3*S*,3'*S*)-Astaxanthin (Andrewes und Starr, 1976; Renstrøm *et al.*, 1981; Renstrøm *et al.*, 1982).

Das Vorhandensein des konjugierten Doppelbindungssystems (Chromophor) ist der Grund für die starke Lichtabsorption von Carotinoiden. Mit Hilfe ihrer spezi-

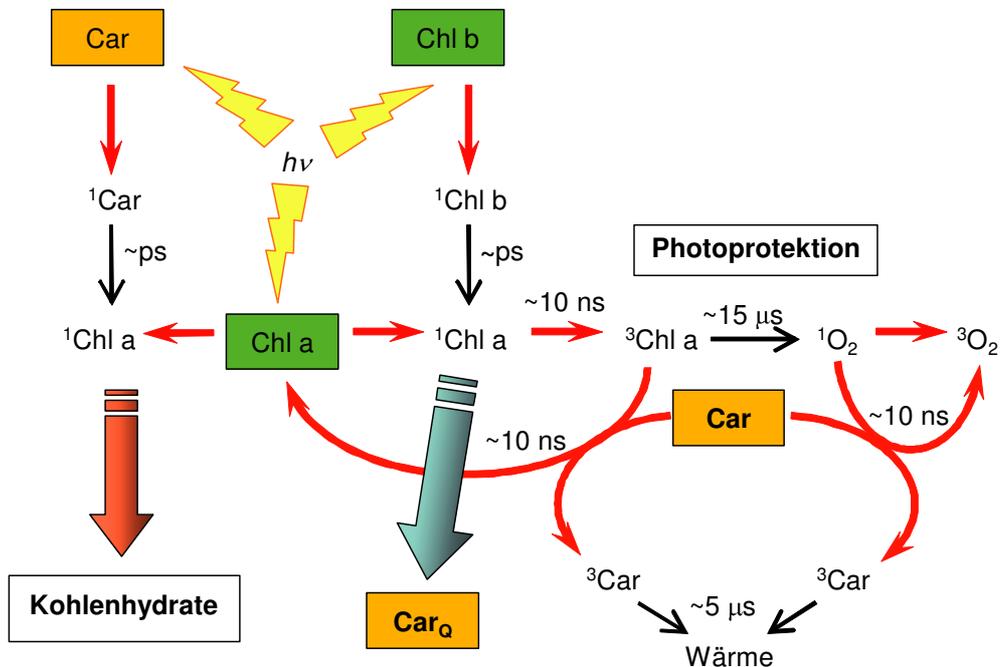
fischen Lichtabsorptionscharakteristika können Carotinoide identifiziert und quantifiziert werden. Die Lage der Absorptionsmaxima und ihre individuelle Ausprägung sind von dem jeweils vorhandenen Chromophor, funktionellen Gruppen sowie dem Lösungsmittel abhängig. Das typische Absorptionsspektrum von Lycopin hat eine charakteristische Form mit drei Hauptabsorptionsmaxima im Bereich von 400 bis 550 nm (Abb. 4).



**Abb. 4:** Schematische Darstellung des Absorptionsspektrums von Lycopin.

Die physikochemischen Eigenschaften von Carotinoiden stehen in unmittelbarem Zusammenhang mit ihren biologischen Funktionen. In photosynthetisch aktiven Organismen sind Carotinoide mit den membranständigen Lichtsammelkomplexen assoziiert und agieren dort als akzessorische Pigmente. Sie absorbieren das Licht in einem anderen Wellenlängenbereich als die Chlorophylle und erweitern dadurch das Absorptionsspektrum und somit den Wirkungsgrad des Lichtsammelkomplexes. Carotinoide erfüllen darüber hinaus eine zentrale Funktion bei dem Schutz vor Photooxidation. Mit steigender Lichtintensität kommt es zu einer Verringerung der photosynthetischen Leistung und letztlich zu einer vollständigen Inhibition der Photosynthese (Photoinhibition) (Adir *et al.*, 2003). Der Grund hierfür liegt in dem starken oxidativen Potential des Photosystems II. Die Sättigung der photosynthetischen Elektronentransportkette führt zur Bildung von Chlorophyll a (Chl a) im Triplettzustand und zu einer Akkumulation von reduzierten Elektronenakzeptormolekülen (Chinone, Eisen-Schwefel-Proteine), die bei Reaktion mit Sauerstoff zur Entstehung hochreaktiver zytotoxischer Sauerstoff-Spezies führen können

(Macpherson *et al.*, 1993; Telfer *et al.*, 1994a). Carotinoide können Tripletzustände von Chlorophyllmolekülen auflösen, bevor diese mit Sauerstoff reagieren und es zur Bildung von Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) kommt, aber sie können auch bereits entstandenen Singulett-Sauerstoff unschädlich machen (Telfer *et al.*, 1994b). Die dabei entstehenden Carotinoide im Tripletzustand zerfallen für die Zellen harmlos unter Wärmeabgabe (Abb. 5). Carotinoide sind außerdem an einem weiteren Mechanismus zur Photoprotektion beteiligt, dem so genannten „Nichtphotochemischen Quenching“, bei dem überschüssige Lichtenergie in Wärme umgewandelt wird (Kirilovsky, 2007).



**Abb. 5:** Modell für die Ableitung überschüssiger Energie im photosynthetischen Apparat von Pflanzen durch Carotinoide. Carotinoide (Car) können direkt als Antennenpigmente agieren und Lichtenergie auf Chlorophyll a (Chl a) übertragen und dadurch den Wirkungsgrad des Lichtsammelkomplexes erhöhen. Bei übermäßiger Lichteinstrahlung können sie Elektronen von angeregtem Chlorophyll a ( $^1\text{Chl a}$ ) übernehmen und im Prozess des „Nichtphotochemischen Quenchings“ ( $\text{Car}_Q$ ) die Lichtenergie in Wärme umwandeln. Außerdem können sie Chlorophyll a Tripletzustände ( $^3\text{Chl a}$ ) auflösen, bevor diese mit Sauerstoff zu Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) reagieren oder direkt mit bereits gebildetem Singulett-Sauerstoff reagieren (Abbildung aus Britton *et al.*, 2008, modifiziert).

Die antioxidativen Eigenschaften der Carotinoide spielen auch in photosynthetisch inaktiven Organismen eine wichtige Rolle. Zahlreiche Bakterien haben Licht-induzierbare Carotinoid-Biosynthesegene, die eine Schutzeinrichtung gegen photooxidative Schäden darstellen (Balsalobre *et al.*, 1987; Takano *et al.*, 2005; Takano *et al.*, 2011). Menschen und Tiere können Carotinoide nicht *de novo* synthetisieren, aufgrund der weiten Verbreitung von Carotinoiden nehmen sie diese aber ständig mit der Nahrung auf. Es gibt zahlreiche Studien über die Wirkungen von Nahrungscarotinoiden. Beispielsweise kann  $\beta$ -Carotin die Oxidation von humanen LDL-Lipoproteinen verhindern (Levy *et al.*, 1996). Im gelben Fleck (*macula lutea*) im menschlichen Auge sind die Xanthophylle Zeaxanthin und Lutein eingelagert und schützen dort das Gewebe vor oxidativem Stress (Sujak *et al.*, 1999). In einem Experiment mit Mäusen wurde eine präventive Wirkung von  $\beta$ -Carotin gegen vorzeitige Hautalterung gezeigt (Terao *et al.*, 2011). Bei Patienten mit erythropoetischer Porphyrie, einer Stoffwechselstörung die mit Lichtempfindlichkeit einhergeht, konnte durch die Gabe von  $\beta$ -Carotin die Lichttoleranz verbessert werden (Mathews-Roth, 1993). Auf Krebszellen können Carotinoide als Proliferationshemmer wirken, außerdem reduzieren sie DNA-Schäden und beeinflussen die Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions (Livny *et al.*, 2002; Matos *et al.*, 2001; Wertz *et al.*, 2004; Yeh und Hu, 2003; Zhang *et al.*, 2011).

Neben ihrer Funktion als Antioxidantien haben Carotinoide auch wichtige Funktionen als Farbstoffe. Carotinoid-basierte Farben sind meistens gelb, orange oder rot. In Pflanzen sind Carotinoide an der Ausprägung der Farben von Blüten, Früchten und auch Wurzeln beteiligt. Ihre Anwesenheit in grünen Blättern ist meistens nicht sichtbar, da hier die Farbe der Carotinoide durch die mengenmäßig überwiegenden Chlorophylle überlagert wird. Bei einigen Pflanzen können die Carotinoide der Blätter im Herbst beobachtet werden, wenn die Chlorophylle abgebaut werden und es dadurch zu der typischen gelben oder orangen Färbung kommt. Die Färbung von Pflanzenteilen dient vor allem der Anlockung von Organismen, die die Pflanzen bestäuben oder ihre Samen verbreiten sollen.

In Tieren können Carotinoide, die mit der Nahrung aufgenommen werden in Federn, Panzern oder Schuppen eingelagert werden und dadurch an deren Farbausprägung beteiligt sein. Carotinoid-bedingte Färbungen findet man vor allem bei Vögeln, Fischen, Insekten und marinen Invertebraten (Britton *et al.*, 2008). Ein be-

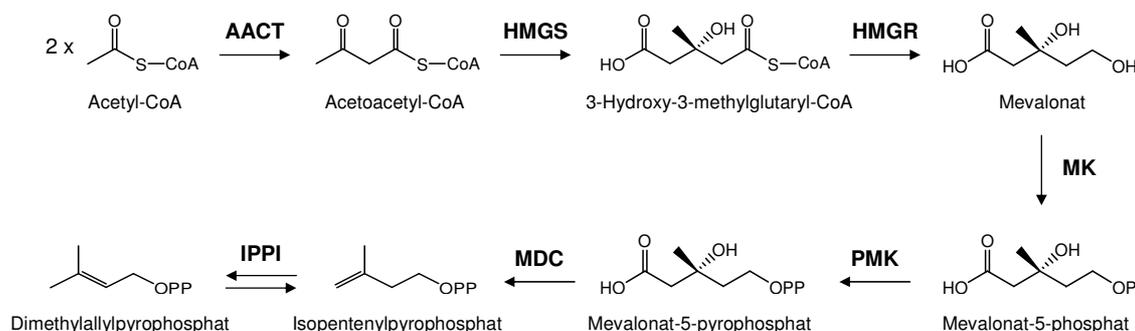
kanntes Beispiel ist die rosarote Farbe der Flamingos (z. B. *Phoenicopterus ruber*), die vom Verzehr Astaxanthin-reicher Krebstiere herrührt (Fox, 1955). In einigen Invertebraten kommen Carotinoid-basierte blaue, violette oder grüne Farbstoffe vor. Diese für Carotinoide ungewöhnlichen Farben kommen durch einen bathochromen Effekt zustande, der durch die kovalente Bindung von Carotinoiden an Proteine verursacht wird. Beispiele für diese Carotinoproteine sind das Crustacyanin in Hummerschalen (*Homarus gammarus*), das Ooverdin in Hummereiern und -ovarien oder das Linckiacyanin des Seesterns *Linckia laevigata* (Clark *et al.*, 1990; Stern und Salomon, 1937; Zagalsky, 2003).

Auch Apocarotinoide, bei denen es sich meistens um Carotinoid-Spaltprodukte handelt, haben wichtige Funktionen. Je nachdem, an welcher Molekülposition des Carotinoids die Spaltung geschieht, entstehen unterschiedlich große Fragmente. Die Spaltung eines C<sub>40</sub>-Carotinoids an der zentralen 15/15'-Doppelbindung ergibt zwei C<sub>20</sub>-Körper. Ein wichtiges Beispiel für diese Gruppe von Carotinoid-Spaltprodukten sind die Retinoide, zu denen auch das Vitamin A (Retinol, Abb. 2) gehört. Retinoide sind die Chromophore in den Photorezeptoren von Menschen und Tieren. Darüber hinaus erfüllen sie wichtige Funktionen bei der Embryogenese, Erhaltung der Reproduktionsfähigkeit und Zelldifferenzierung sowie bei der Regulation der Expression bestimmter Gene (Eggersdorfer *et al.*, 2000). In einigen Bakterienarten, wie z. B. *Halobacterium salinarum* oder *Salinibacter ruber*, sind Retinoide die Chromophore von lichtbetriebenen Protonenpumpen, die der ATP-Gewinnung dienen (Balashov *et al.*, 2005; Oesterhelt und Stoeckenius, 1973).

Die asymmetrische Spaltung von Carotinoiden an einer oder zwei exzentrischen Doppelbindungen führt zu unterschiedlich großen Fragmenten. Größere Spaltprodukte mit ausreichend konjugierten Doppelbindungen, wie z. B. Crocetin oder Bixin (Abb. 2), sind Farbstoffe und kommen in Früchten oder Blütenteilen vor. Kleinere Apocarotinoide, wie z. B.  $\beta$ -Ionon (Abb. 2), können flüchtig sein und Aroma-Eigenschaften haben. In Blüten dienen sie der Anlockung bestäubender Tiere. Andere Apocarotinoide, wie z. B. die pflanzlichen Signalmoleküle Abscisinsäure oder Strigolactone, haben eine hormonähnliche Wirkung (Booker *et al.*, 2004; Schwartz *et al.*, 1997).

## 2.2 Biosynthese von Carotinoiden

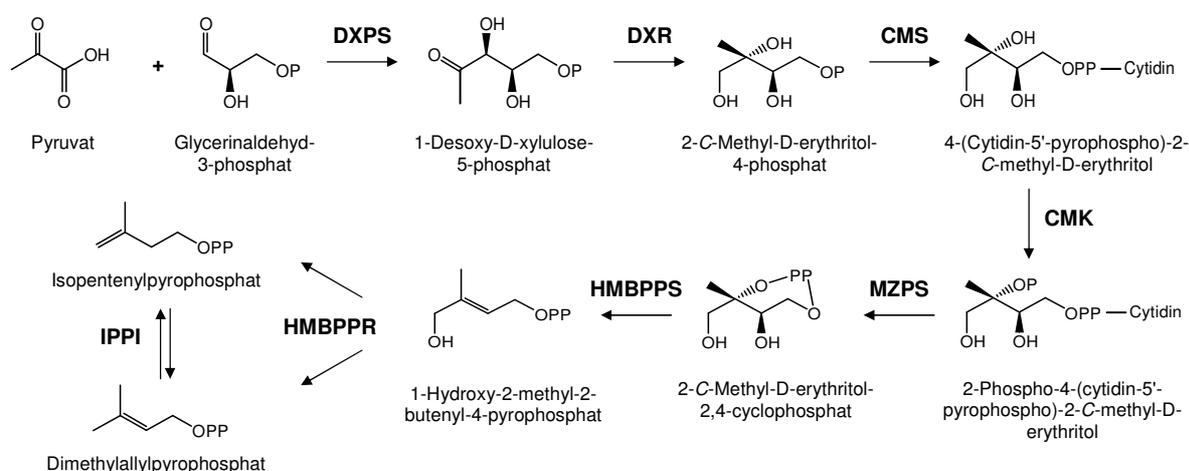
Alle Isoprenoide werden aus den Vorstufen Isopentenylpyrophosphat und dessen Isomer Dimethylallylpyrophosphat aufgebaut. Für ihre Synthese existieren in der Natur zwei unterschiedliche Stoffwechselwege; der Mevalonat-Weg und der Methylerythritolphosphat-Weg. Die beiden Stoffwechselwege sind unterschiedlich verbreitet. Den Mevalonat-Weg findet man in Archaeen, Pilzen und Tieren, während der Methylerythritolphosphat-Weg von den meisten Bakterien genutzt wird. Einige Ausnahmen sind z. B. *Myxococcus fulvus*, *Streptococcus carnosus* oder *Lactobacillus plantarum*, welche den Mevalonat-Weg nutzen sowie einige Streptomyceten, die beide Stoffwechselwege nutzen (Horbach *et al.*, 1993; Seto *et al.*, 1996). Einige Algen und höhere Pflanzen nutzen ebenfalls beide Stoffwechselwege, wobei eine kompartmentäre Trennung vorliegt. Die cytoplasmatischen Sterole und die Prenylketten von mitochondrialem Ubichinon Q10 werden über den Mevalonat-Weg synthetisiert. Isoprenoide, die eng mit der Photosynthese korreliert sind, z. B. Carotinoide, Prenylketten von Chlorophyllen und Plastochinonen sowie Mono- und Diterpene, werden über den Methylerythritolphosphat-Weg synthetisiert (Disch *et al.*, 1998).



**Abb. 6:** Synthese von Isopentenylpyrophosphat und Dimethylallylpyrophosphat über den Mevalonat-Weg. **AACT** = Acetoacetyl-CoA-Thiolase, **HMGs** = 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Synthase, **HMGR** = 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase, **MK** = Mevalonat-Kinase, **PMK** = Mevalonat-5-phosphat-Kinase, **MDC** = Mevalonat-5-pyrophosphat-Decarboxylase, **IPPI** = Isopentenylpyrophosphat-Isomerase.

Die Synthese von Isopentenylpyrophosphat und Dimethylallylpyrophosphat über den Mevalonat-Weg beginnt mit der Verknüpfung von zwei Molekülen Acetyl-CoA

zu Acetoacetyl-CoA (Abb. 6). Im nächsten Schritt wird ein weiteres Molekül Acetyl-CoA angefügt, wodurch 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA gebildet wird. Durch Reduktion von 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA wird Mevalonat gebildet, welches dann durch zwei aufeinanderfolgende Phosphorylierungen zu Mevalonat-5-pyrophosphat umgesetzt wird. Durch Decarboxylierung von Mevalonat-5-pyrophosphat wird schließlich Isopentenylpyrophosphat gebildet. Durch eine reversible Isomerisierungsreaktion kann dieses in Dimethylallylpyrophosphat umgewandelt werden.



**Abb. 7:** Synthese von Isopentenylpyrophosphat und Dimethylallylpyrophosphat über den Methylerythritolphosphat-Weg. **DXPS** = 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase, **DXR** = Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase, **CMS** = 4-(Cytidin-5'-pyrophospho)-2-C-methyl-D-erythritol-Synthase, **CMK** = 4-(Cytidin-5'-pyrophospho)-2-C-methyl-D-erythritol-Kinase, **MZPS** = 2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclophosphat-Synthase, **HMBPPS** = 1-Hydroxy-2-methyl-2-butenyl-4-pyrophosphat-Synthase, **HMBPPR** = 1-Hydroxy-2-methyl-2-butenyl-4-pyrophosphat-Reduktase, **IPPI** = Isopentenylpyrophosphat-Isomerase.

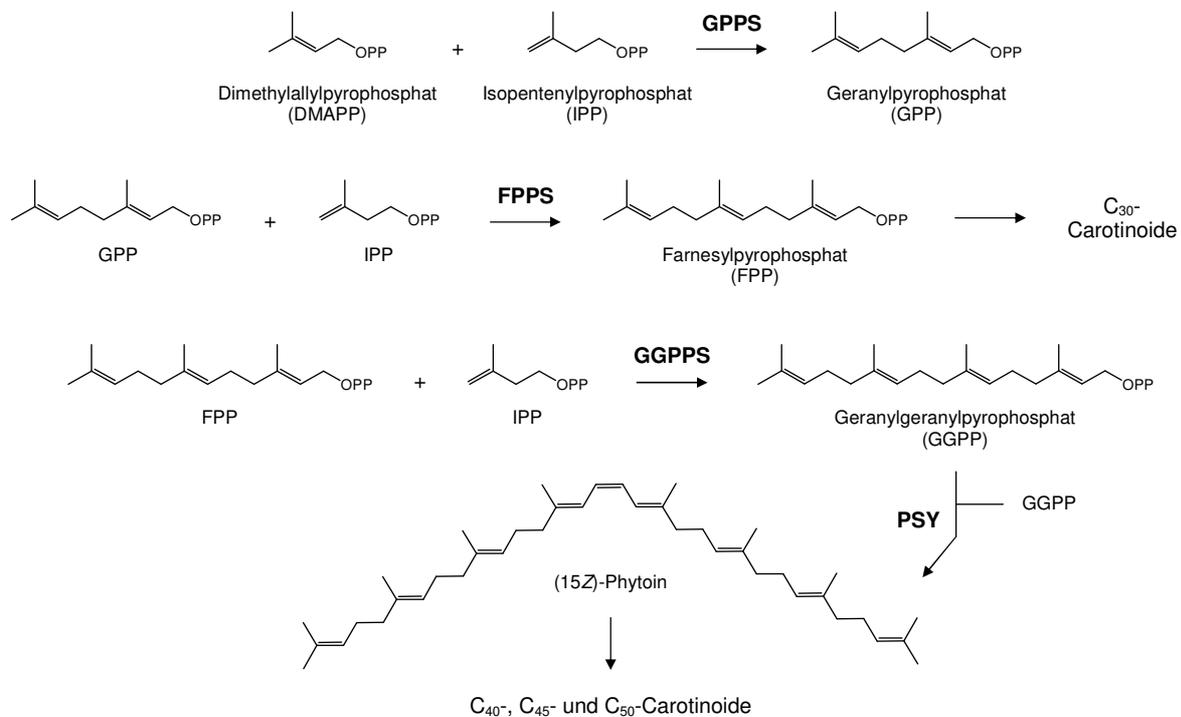
Der Methylerythritolphosphat-Weg wurde erstmals von Rohmer *et al.* (1993) beschrieben. Für die Synthese der Isoprenoid-Vorstufen Isopentenylpyrophosphat und Dimethylallylpyrophosphat dienen Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat als Ausgangsverbindungen (Abb. 7). Diese werden im ersten Schritt zu 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat verknüpft. Durch Reduktion und Umlagerung einer Hydroxygruppe entsteht 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat. Es folgen die Anlagerung von Cytidin-5'-triphosphat und eine weitere Phosphorylierung am C2-Atom, wodurch 2-Phospho-4-(cytidin-5'-pyrophospho)-2-C-methyl-D-erythritol synthetisiert wird. Durch die Abspaltung von Cytidin und eine Cyclisierung über die beiden

Phosphatgruppen wird 2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclophosphat gebildet, welches im Folgenden durch Reduktion und Abspaltung einer OH-Gruppe weiter zu 1-Hydroxy-2-methyl-2-butenyl-4-pyrophosphat umgesetzt wird. Im Gegensatz zum Mevalonat-Weg, bei dem durch die Decarboxylierung von Mevalonat-5-pyrophosphat nur Isopentenylpyrophosphat gebildet wird, entstehen im Methylerythritol-phosphat-Weg durch die Reduktion von 1-Hydroxy-2-methyl-2-butenyl-4-pyrophosphat sowohl Isopentenylpyrophosphat als auch Dimethylallylpyrophosphat, welche durch Isomerisierung ineinander umgewandelt werden können.

Die gemeinsame Vorstufe von C<sub>40</sub>-, C<sub>45</sub>- und C<sub>50</sub>-Carotinoiden ist Phytoin, dessen Synthese mit der Kondensation von jeweils einem Molekül Isopentenylpyrophosphat und Dimethylallylpyrophosphat zu Geranylpyrophosphat beginnt (Abb. 8). Die nächsten beiden Reaktionsschritte beinhalten eine weitere Verlängerung der Prenylkette durch das schrittweise Anfügen von zwei Molekülen Isopentenylpyrophosphat, wodurch zunächst Farnesylpyrophosphat und dann Geranylgeranylpyrophosphat gebildet wird. Durch die Verknüpfung von zwei Molekülen Geranylgeranylpyrophosphat wird Phytoin synthetisiert. Im Gegensatz zu den meisten Carotinoiden, die in der Natur vorwiegend in der (all-*E*)-Form vorkommen, wird Phytoin von den meisten Organismen in der (15*Z*)-Form gebildet (Armstrong, 1997; Iniesta *et al.*, 2007; Iwata-Reuyl *et al.*, 2003). Eine erwähnenswerte Besonderheit von C<sub>30</sub>-Carotinoiden, wie z. B. Staphyloxanthin (Abb. 2), ist, dass diese im Gegensatz zu den C<sub>40</sub>-, C<sub>45</sub>- und C<sub>50</sub>-Carotinoiden nicht aus Phytoin, sondern aus Farnesylpyrophosphat synthetisiert werden (Pelz *et al.*, 2005).

Für die Bildung der zahlreichen Carotinoide aus den Vorstufen Phytoin und Farnesylpyrophosphat sind vielfältige Enzymaktivitäten vorhanden. Bakterielle Gene, die an der Carotinoid-Biosynthese beteiligt sind, werden meistens mit „*crf*“ benannt (Misawa *et al.*, 1990; Netzer *et al.*, 2010; Yen und Marrs, 1976). Parallel gibt es auch die „*car*“-Benennung, die zuerst für den Pilz *Phycomyces blakesleeianus* und später auch für die Carotinoid-Biosynthesegene von *Myxococcus xanthus* verwendet wurde (Balsalobre *et al.*, 1987; Cerdá-Olmedo und Reau, 1970). Für die Carotinoid-Biosynthesegene von grünen Schwefelbakterien und Cyanobakterien wird auch die Bezeichnung „*cru*“ verwendet (Graham und Bryant, 2009; Maresca und Bryant, 2006). Die Benennung der entsprechenden Gene von Pflanzen erfolgt häufig mit einer Abkürzung des

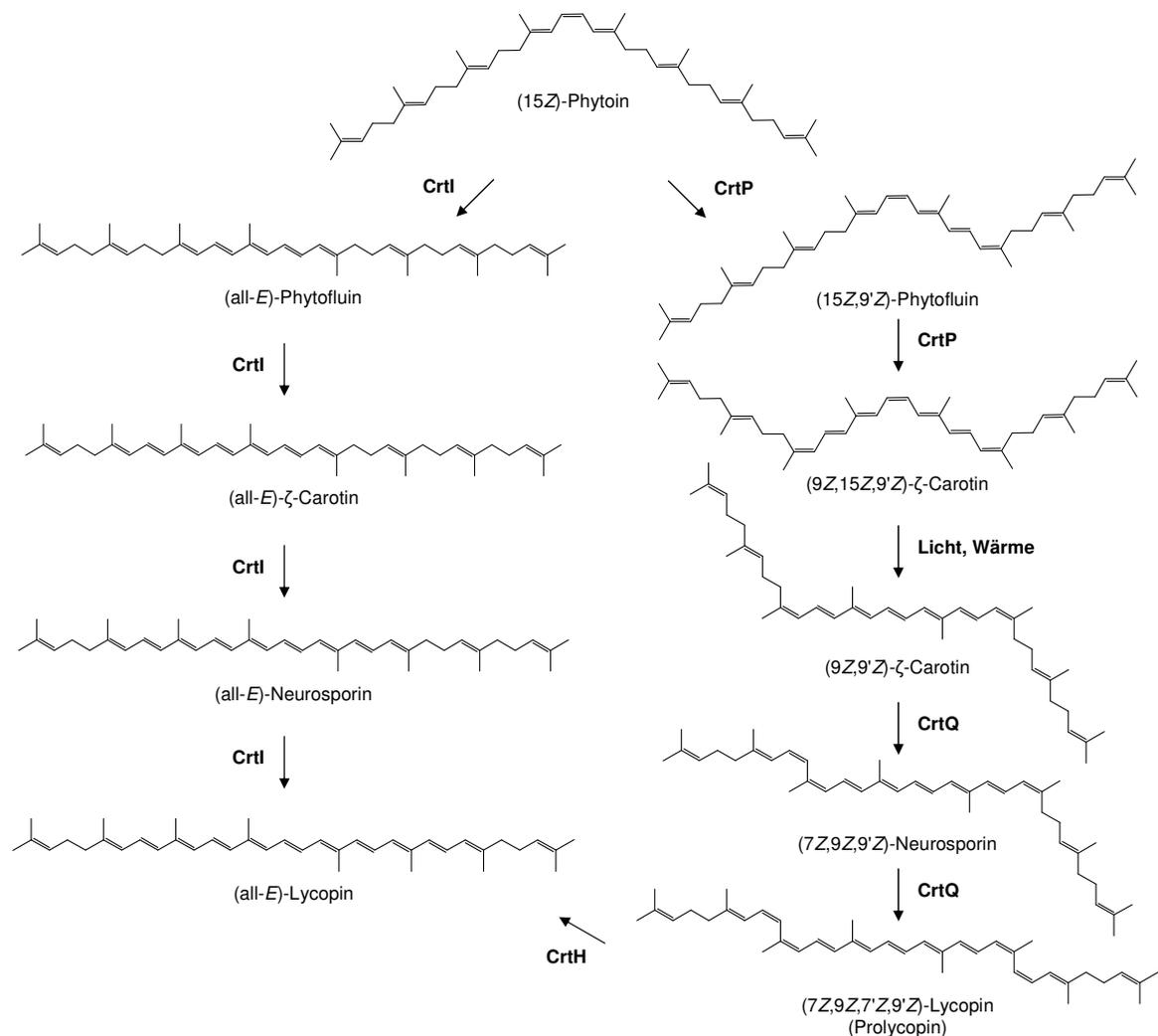
codierten Enzyms, z. B. GPPS6 für eine Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase von *Arabidopsis thaliana* oder LCYE für die Lycopin- $\epsilon$ -Cyclase der Tomate *Lycopersicon esculentum* (Namitha *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 1997).



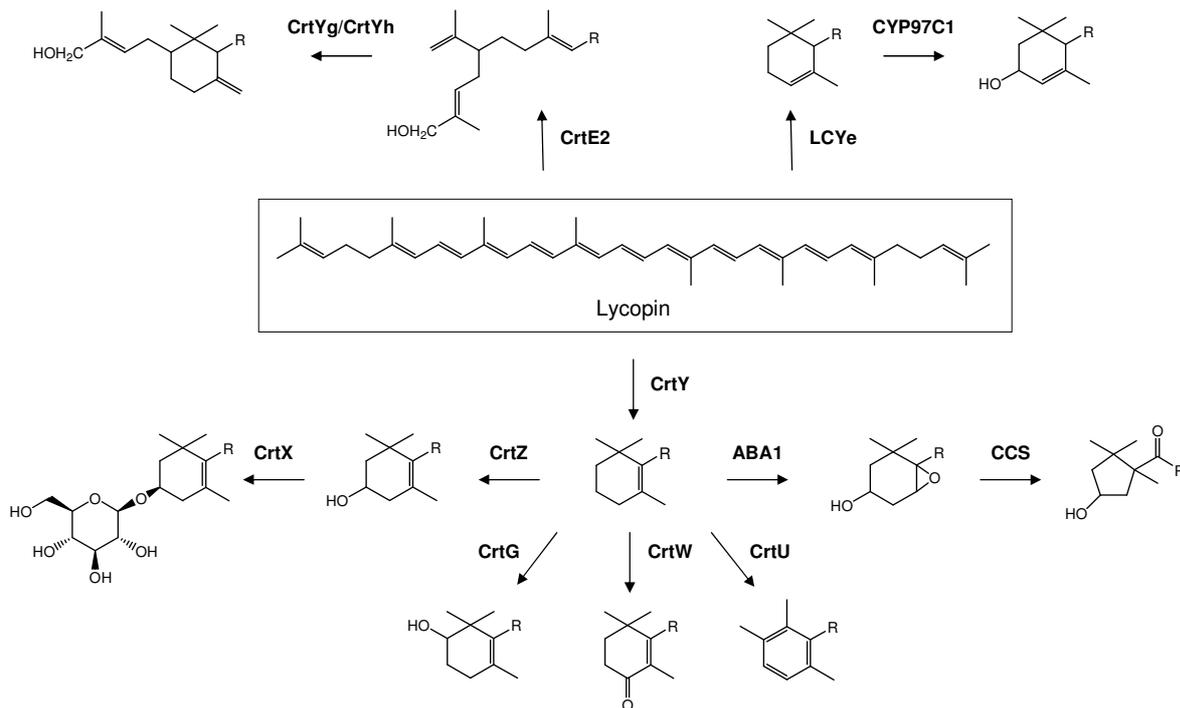
**Abb. 8:** Synthese von Phytoin. **GPPS** = Geranylpyrophosphat-Synthase, **FPPS** = Farnesylpyrophosphat-Synthase, **GGPPS** = Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase, **PSY** = Phytoin-Synthase.

Die Synthese von Lycopin aus Phytoin erfolgt durch die Einführung von vier Doppelbindungen und Isomerisierung zur (all-*E*)-Form. Dies wird von Phytoin-Desaturasen vermittelt. Hier gibt es zwei verschiedene Enzym-Typen, die CrtI-Desaturasen und die CrtP/CrtQ-Desaturasen, die unterschiedlichen phylogenetischen Ursprungs sind. CrtI-Desaturasen kommen in Archaeen, Bakterien und Pilzen vor und führen drei bis sechs Doppelbindungen in Phytoin ein, wobei alle Zwischenprodukte in der (all-*E*)-Form vorliegen (Abb. 9, links) (Fraser *et al.*, 1992; Harada *et al.*, 2001; Hausmann und Sandmann, 2000). In Cyanobakterien und Pflanzen wird die Desaturierung von Phytoin durch zwei verschiedene Enzyme vermittelt und ist mit einer Reihe von *cis/trans*-Isomerisierungen verbunden (Abb. 9, rechts). Die Reaktionsschritte die zur Bildung von Lycopin führen werden

zusammenfassend auch als „poly-*cis*-desaturation pathway“ bezeichnet (Breitenbach und Sandmann, 2005). CrtP katalysiert die ersten beiden Desaturierungsschritte und generiert dadurch (9Z,15Z,9'Z)- $\zeta$ -Carotin. Die *cis/trans*-Isomerisierung von (9Z,15Z,9'Z)- $\zeta$ -Carotin zu (9Z,9'Z)- $\zeta$ -Carotin geschieht Enzymunabhängig, z. B. durch die Einwirkung von Wärme oder Licht. (9Z,9'Z)- $\zeta$ -Carotin ist das Substrat von CrtQ, welches durch zwei weitere Desaturierungen Prolycopin synthetisiert. Für die Synthese des (all-*E*)-Endproduktes Lycopin ist zusätzlich eine Isomerase, z. B. Crth, notwendig (Masamoto *et al.*, 2001).



**Abb. 9:** Synthese von Lycopin durch Desaturierung von Phytoin. Links: Desaturierung von Phytoin in Archaeen, Bakterien und Pilzen, rechts: Desaturierung von Phytoin in Pflanzen und Cyanobakterien. **CrtI**, **CrtP**, **CrtQ** = Phytoin-Desaturasen, **Crth** = Prolycopin-Isomerase.



**Abb. 10:** Beispiele für Carotinoid-modifizierende Enzymaktivitäten. **CrtE2** = Lycopin-Elongase (*Micrococcus luteus*), **CrtYg/CrtYh** = C<sub>50</sub>-Carotinoid-γ-Cyclase (*Micrococcus luteus*), **LCYe** = Lycopin-ε-Cyclase (*Arabidopsis thaliana*), **CYP97C1** = Carotinoid-ε-Ring-C3-Hydroxylase (*Arabidopsis thaliana*), **CrtY** = Lycopin-β-Cyclase (*Pantoea ananatis*), **CrtZ** = Carotinoid-β-Ring-C3-Hydroxylase (*Pantoea ananatis*), **CrtX** = Carotinoid-Glucosyltransferase (*Pantoea ananatis*), **CrtG** = Carotinoid-β-Ring-C2-Hydroxylase (*Brevundimonas* sp. SD212), **CrtW** = Carotinoid-β-Ring-C4-Ketolase (*Brevundimonas* sp. SD212), **CrtU** = Carotinoid-β-Ring-Desaturase (*Streptomyces griseus*), **ABA1** = Carotinoid-β-Ring-Epoxidase (*Arabidopsis thaliana*), **CCS** = Capsanthin/Capsorubin-Synthase (*Capsicum annum*).

Ein wichtiger Verzweigungspunkt, der die große Diversität von Carotinoiden mitbedingt ist die Cyclisierung von Lycopin, welche durch verschiedene Klassen von Lycopin-Cyclasen vermittelt wird. Die Modifikation kann dabei entweder nur an einem Ende des Moleküls oder aber an beiden Enden gleichzeitig stattfinden (Misawa *et al.*, 1990; Tao *et al.*, 2004). Monomere CrtY-Typ Cyclasen generieren Endgruppen vom β-Typ (Abb. 10) und kommen z. B. in Proteobakterien und Streptomyceten vor (Krügel *et al.*, 1999; Matsumura *et al.*, 1997). Die Aktivität von Lycopin-Cyclasen vom CrtL-Typ führt zur Bildung von β- oder ε-Endgruppen. CrtL-Cyclasen kommen vor allem in Pflanzen und einigen Cyanobakterien vor (Mendes *et al.*, 2011; Stickforth *et al.*, 2003). Zu der Familie der CrtL-Cyclasen gehört auch

die Capsanthin/Capsorubin-Synthase (CCS) der Paprika (*Capsicum annum*), die durch einen Lycopin-Cyclase-ähnlichen Mechanismus eine  $\kappa$ -Endgruppe aus einem hydroxylierten 5,6-Epoxyring generiert (Bouvier *et al.*, 1997). Wie auch die  $\kappa$ -Endgruppe, entsteht die  $\phi$ -Endgruppe nicht direkt durch Cyclisierung von Lycopin, sondern durch die Desaturierung und Methylierung einer  $\beta$ -Endgruppe, z. B. durch CrtU von *Streptomyces griseus* (Krügel *et al.*, 1999). Ein Beispiel für ein  $\gamma$ -Endgruppen-generierendes Enzym ist die heterodimere Cyclase CrtYg/CrtYh von *Micrococcus luteus* (Netzer *et al.*, 2010). Das Enzym ist gemeinsam mit der Lycopin-Elongase CrtE2 an der Bildung des C<sub>50</sub>-Carotinoids Sarcinaxanthin beteiligt. Ausgehend von acyclischen, monocyclischen und bicyclischen Carotinoiden können eine Reihe von weiteren Modifikationen stattfinden, die die Diversität der Carotinoide nochmals beträchtlich erhöhen. Als Beispiele seien hier das Anfügen von Hydroxygruppen (CrtZ, CrtG, ABA1, CYP97C1), Ketogruppen (CrtW) oder Zuckerresten (CrtX) genannt (Barrero *et al.*, 2005; Misawa *et al.*, 1990; Nishida *et al.*, 2005).

### 2.3 Carotinoid-Spaltung durch Carotinoid-Oxygenasen

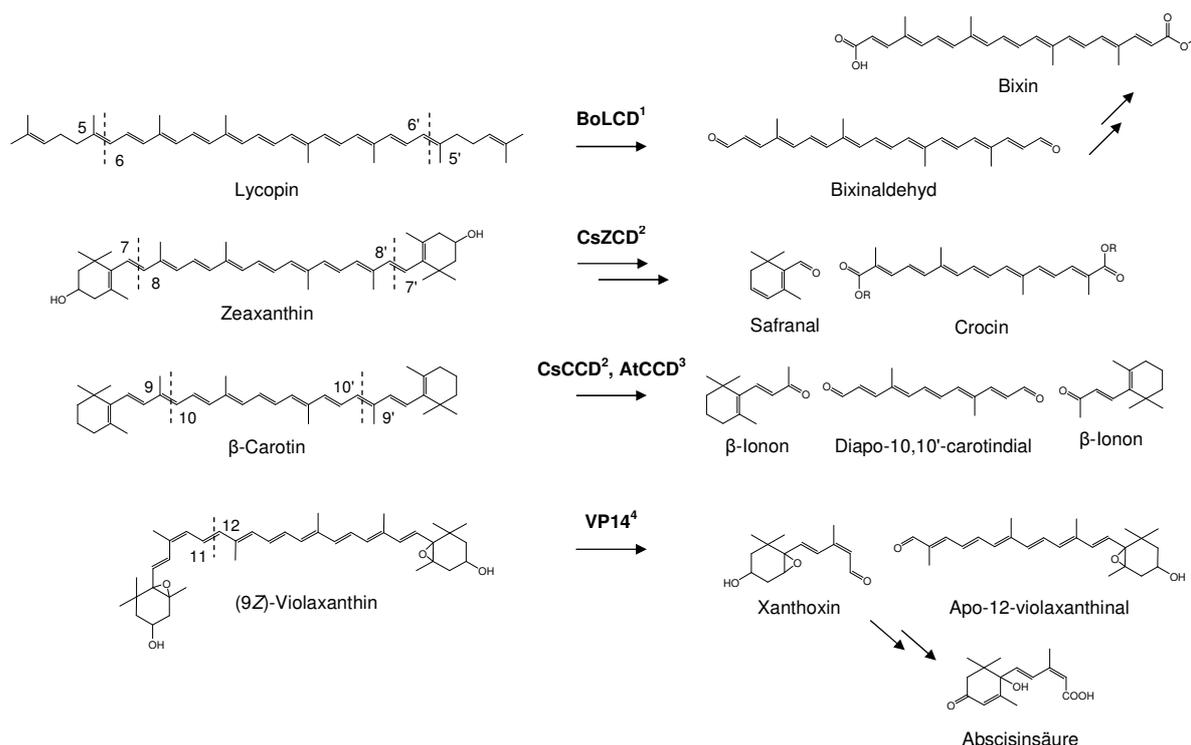
Die meisten Apocarotinoide werden nicht aus kleineren Vorstufen synthetisiert, sondern entstehen durch oxidative Spaltung von Carotinoiden. Neben unspezifischen Carotinoid-Spaltungen, die durch photochemische oder enzymatische Oxidation (z. B. Lipoxygenasen oder Peroxydasen) stattfinden, gibt es eine Gruppe von Nicht-Häm-Eisenenzymen, die Carotinoid-Oxygenasen, welche C-C-Doppelbindungen von Carotinoiden spezifisch spalten.

Jüttner und Höflacher (1985) beschrieben erstmals eine Carotinoid-Oxygenase aus dem Cyanobakterium *Microcystis aeruginosa*, die  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin simultan an den 7/8- und 7/8'- Doppelbindungen spaltet. Für die Untersuchungen wurden seinerzeit Protein-Rohextrakte eingesetzt, das Enzym selbst konnte nicht isoliert werden. Die erste heterolog in *E. coli* exprimierte Carotinoid-Oxygenase war die VP14 (viviparous14) aus Mais (*Zea mays*) (Schwartz *et al.*, 1997). Das Enzym vermittelt die Spaltung von (9Z)-Violaxanthin an der 11/12-Doppelbindung und katalysiert dadurch den ersten Schritt der Synthese des Phytohormons

Abscisinsäure (Abb. 11). Die erste isolierte bakterielle Carotinoid-Oxygenase war die ACO (apocarotenoid-15/15'-cleavage oxygenase) des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Ruch *et al.*, 2005). Das Enzym spaltet verschiedene monocyclische Apocarotinoide und acyclische Carotinoide an der 15/15'-Doppelbindung (Abb. 12).

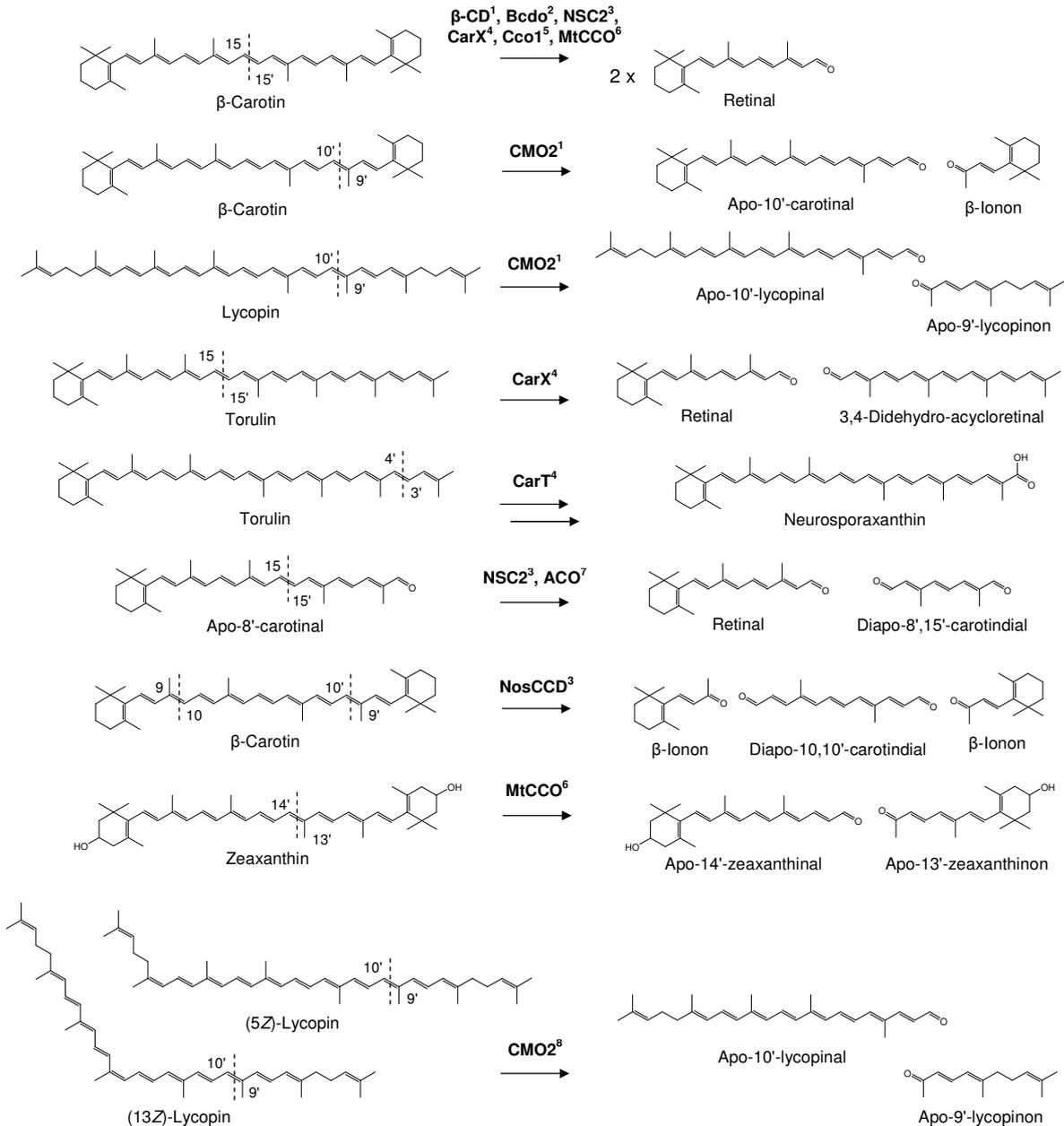
VP14 und ACO sind bisher die einzigen Carotinoid-Oxygenasen deren räumliche Struktur untersucht wurde (Kloer *et al.*, 2005; Messing *et al.*, 2010). Ein typisches Charakteristikum der Enzymfamilie der Carotinoid-Oxygenasen ist eine Domäne aus antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern, die sieben Propellerblatt-ähnliche Strukturen bilden. In dem von den Propellerblättern gebildeten Tunnel befindet sich das katalytische Zentrum mit einem  $\text{Fe}^{2+}$ -Ion, das von vier konservierten Histidin-Resten koordiniert wird. Die eukaryotische VP14 hat eine weitere Domäne, die hauptsächlich aus  $\alpha$ -Helices und einem Bereich mit hydrophoben Aminosäureresten besteht. Diese Domäne ist für pflanzliche Carotinoid-Oxygenasen charakteristisch und wahrscheinlich an der Substratextraktion aus der Thylakoid-Membran beteiligt. Die Untersuchungen an VP14 weisen ferner darauf hin, dass der Carotinoid-Spaltung durch Carotinoid-Oxygenasen ein Dioxygenase-Reaktionsmechanismus zugrunde liegt.

Neben VP14 und ACO wurden eine ganze Reihe anderer Carotinoid-Oxygenasen aus Pflanzen, Tieren, Bakterien und Pilzen isoliert und ihre Spaltaktivitäten für verschiedene Substrate *in vivo* und *in vitro* untersucht. Abb. 11 zeigt einige Beispiele für Carotinoid-Spaltungen durch pflanzliche Carotinoid-Oxygenasen. Die Synthese des Farbstoffes Bixin, der in den Früchten des Annatto-Strauches (*Bixa orellana*) vorkommt, beginnt mit der Spaltung von Lycopin an den 5/6- und 5'/6'-Doppelbindungen (Bouvier *et al.*, 2003a). Ein wichtiger Aromastoff des Safrans (*Crocus sativus*) ist das Aldehyd Safranal. Dieses und der Farbstoff von Safran, das Crocin, gehen auf eine Spaltung von Zeaxanthin an den 7/8- und 7'/8'-Doppelbindungen zurück (Bouvier *et al.*, 2003b). Die Spaltung von  $\beta$ -Carotin an den 9/10- und 9'/10'-Doppelbindungen führt zur Bildung von zwei Molekülen  $\beta$ -Ionon und einem  $\text{C}_{14}$ -Dialdehyd. Ein Beispiel für eine pflanzliche Carotinoid-Oxygenase dieses Typs ist AtCCD (*Arabidopsis thaliana* carotenoid cleavage dioxygenase), die neben  $\beta$ -Carotin auch eine Reihe anderer Substrate an den 9/10- und 9'/10'-Doppelbindungen spaltet (Schwartz *et al.*, 2001).



**Abb. 11:** Beispiele für Carotinoid-spaltende Enzymaktivitäten in Pflanzen. <sup>1</sup>*Bixa orellana*, <sup>2</sup>*Crocus sativus*, <sup>3</sup>*Arabidopsis thaliana*, <sup>4</sup>*Zea mays*.

Die wichtigen Funktionen von Retinoiden in Tieren wurden eingangs bereits erwähnt. Die ersten beiden klonierten und charakterisierten Carotinoid-Oxygenasen aus Säugetieren waren die  $\beta$ -CD ( $\beta$ -carotene-15,15'-dioxygenase) der Maus (*Mus musculus*) und die humane Bcdo ( $\beta$ -carotene-15,15'-dioxygenase) (Redmond *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2001). Die Enzyme spalten das Substrat  $\beta$ -Carotin an der 15/15'-Doppelbindung, woraus zwei Moleküle Retinal resultieren (Abb. 12). Retinal-bildende Carotinoid-Oxygenasen wurden auch aus den Pilzen *Fusarium fujikuroi* und *Ustilago maydis* sowie dem Cyanobakterium *Nostoc* sp. PCC 7120 isoliert. Die Enzyme unterscheiden sich hinsichtlich der umgesetzten Substrate (Abb. 12). Für Cco1 (carotenoid cleavage oxygenase 1) von *Ustilago maydis* wurde nur die Spaltaktivität für  $\beta$ -Carotin an der 15/15'-Doppelbindung nachgewiesen (Estrada *et al.*, 2009). CarX von *Fusarium fujikuroi* und NSC2 von *Nostoc* sp. PCC 7120 setzen zusätzlich auch monocyclische Substrate, wie z. B. Torulin und Apo-8'-carotinal, nicht aber acyclische Substrate wie Lycopin um (Marasco *et al.*, 2006; Prado-Cabrero *et al.*, 2007b).



**Abb. 12:** Beispiele für Carotinoid-spaltende Enzymaktivitäten in Tieren, Pilzen und Bakterien. <sup>1</sup>*Mus musculus*, <sup>2</sup>*Homo sapiens*, <sup>3</sup>*Nostoc* sp. PCC 7120, <sup>4</sup>*Fusarium fujikuroi*, <sup>5</sup>*Ustilago maydis*, <sup>6</sup>*Mycobacterium tuberculosis*, <sup>7</sup>*Synechocystis* sp. PCC 6803, <sup>8</sup>*Mustela putorius furo*.

Außer den Retinal-bildenden Carotinoid-Oxygenasen wurden aus Säugetieren, Pilzen und Cyanobakterien auch Enzyme isoliert, die Carotinoid-Substrate an einer oder mehreren anderen Positionen als der 15/15'-Doppelbindung spalten. Die CMO2 (carotene-9',10'-monooxygenase), eine weitere Carotinoid-Oxygenase der Maus, spaltet  $\beta$ -Carotin und Lycopin an der 9'/10'-Doppelbindung (Kiefer *et al.*,

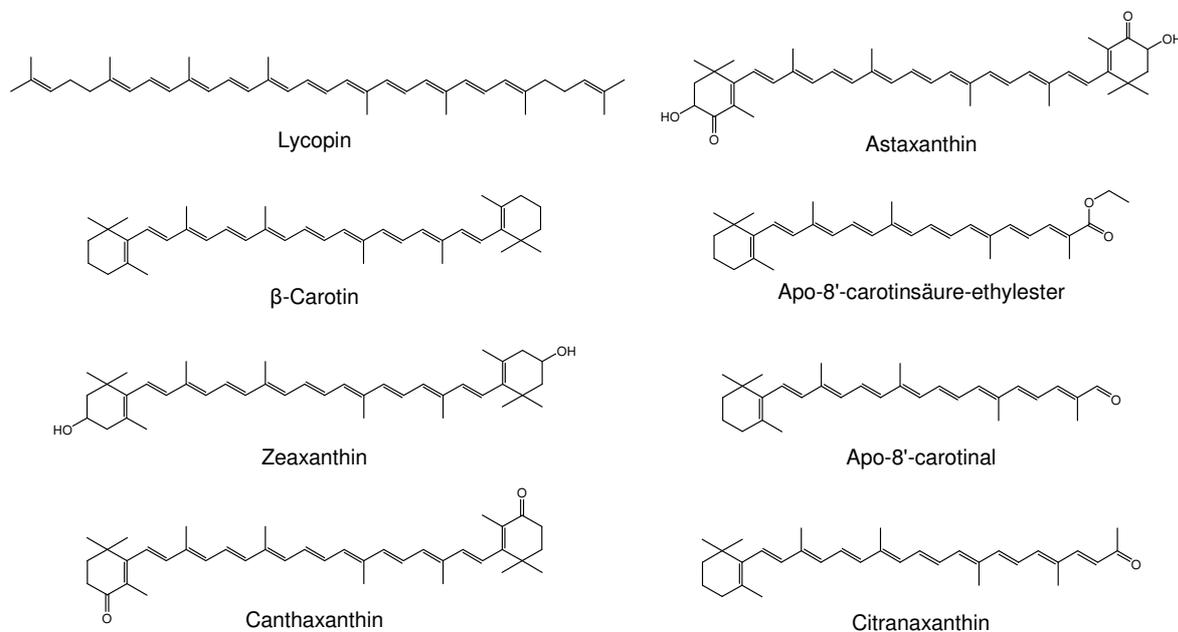
2001). Die gleichnamige Carotinoid-Oxygenase CMO2 aus dem Frettchen (*Mustela putorius furo*) spaltet nur (5Z)-Lycopin und (13Z)-Lycopin (Hu *et al.*, 2006). Neben der Retinal-bildenden Carotinoid-Oxygenase NSC2 wurden aus dem Cyanobakterium *Nostoc* sp. PCC 7120 noch zwei weitere Enzyme isoliert und charakterisiert. NosCCD (NSC1) spaltet verschiedene mono- und bicyclische Carotinoide sowie monocyclische Apocarotinoide an den 9/10- und 9'/10'-Doppelbindungen, während NSC3 nur acyclische Apocarotinoide an der 9/10-Doppelbindung spaltet (Marasco *et al.*, 2006; Scherzinger und Al-Babili, 2008). Eine weitere Carotinoid-Oxygenase von *Fusarium fujikuroi*, CarT, spaltet Torulin an der 3'/4'-Doppelbindung und katalysiert dadurch den ersten Schritt der Synthese des Apocarotinoids Neurosporaxanthin (Prado-Gabrero *et al.*, 2007a).

Bisher ist nur wenig über die Carotinoid-Oxygenasen von Bakterien bekannt, die nicht dem Phylum *Cyanobacteria* angehören. Die einzige nicht-cyanobakterielle Carotinoid-Oxygenase, die hinsichtlich ihrer Spaltaktivität untersucht wurde stammt aus dem Aktinobakterium *Mycobacterium tuberculosis*. MtCCO (*Mycobacterium tuberculosis* cleavage oxygenase) spaltet bicyclische und monocyclische Substrate sowie ihre 3-Hydroxyderivate. Bemerkenswert ist, dass die Spaltung von Substraten mit Hydroxygruppen durch MtCCO bevorzugt an der 15/15'-Doppelbindung stattfindet, während Substrate ohne Hydroxygruppen bevorzugt an der 13'/14'-Doppelbindung gespalten werden (Scherzinger *et al.*, 2010).

## 2.4 Wirtschaftliche Relevanz von Carotinoiden und Apocarotinoiden und ihre technischen Applikationen

Technische Anwendung finden Carotinoide vor allem als Lebensmittel-, Kosmetik- und Arzneifarbstoffe sowie als Nahrungsergänzungsmittel und Futtermittelzusatzstoffe. Nur fünf Carotinoide und drei Apocarotinoide werden im industriellen Maßstab chemisch synthetisiert; die C<sub>40</sub>-Carotinoide Lycopin,  $\beta$ -Carotin, Zeaxanthin, Canthaxanthin und Astaxanthin sowie die Apocarotinoide Apo-8'-carotinal, Apo-8'-carotinsäure-ethylester und Citranaxanthin (Abb. 13) (Ernst, 2002). Einige Carotinoide, die nicht kostendeckend synthetisiert werden können, werden durch Extraktion von Pflanzen gewonnen. Namentlich sind das die Apocarotinoide Bixin und

Norbixin, die aus den Früchten des Annatto-Strauches (*Bixa orellana*) gewonnen werden, Capsanthin und Capsorubin aus der Paprika (*Capsicum annum*) und Lutein aus der Studentenblume (*Tagetes erecta*) (Bouvier *et al.*, 2003a; Fernández-Sevilla *et al.*, 2010).



**Abb. 13:** Industriell durch chemische Synthese hergestellte Carotinoide und Apo-carotinoide.

Im Jahr 2004 wurde die jährliche Carotinoid-Produktion auf einen Wert von 886,9 Millionen US\$ geschätzt (Britton *et al.*, 2009) (Tab. 2). Den Hauptanteil machten β-Carotin, Astaxanthin, Canthaxanthin und Lutein aus. Im Jahr 2010 betrug der Wert der hergestellten Carotinoide 1,07 Milliarden US\$. Für das Jahr 2015 wurden 1,2 Milliarden US\$ prognostiziert. Die Hauptproduktion von Carotinoiden findet noch in Europa und den USA statt, wobei die Firmen DSM (Niederlande) und BASF (Deutschland) 55 % der Produktion tragen. Es wird jedoch erwartet, dass in den nächsten Jahren Firmen aus China, Indien, Japan und Malaysia vermehrt mit den etablierten Carotinoid-Produzenten aus Europa und den USA konkurrieren werden (Global Industry Analysts, 2010; Nutraceuticals World, 2010).

**Tab. 2:** Globaler Markt für Carotinoide des Jahres 2004 in Millionen US\$ (Britton *et al.*, 2009).

Carotinoid	Gesamt	Nahrungs- ergänzung	Lebensmittel	Kosmetik	Futter
β-Carotin	242,0	125,0	98,0	6,0	13,0
Astaxanthin	234,0	3,5	-	-	230,5
Canthaxanthin	148,0	3,0	7,0	-	138,0
Lutein	139,0	54,0	18,0	-	67,0
Lycopin	54,0	50,5	3,5	-	-
Annatto: Bixin, Norbixin	33,6	-	33,6	-	-
Zeaxanthin	22,0	22,0	-	-	-
Apo-8'-carotinal	8,7	-	-	-	8,7
Apo-8'-carotinsäure- ethylester	5,6	-	0,4	-	5,2
Summe	886,9	258,0	160,5	6,0	462,4

In Deutschland sind nur bestimmte Carotinoide für technische Anwendungen zugelassen. Die gesetzlichen Rahmenbedingungen sind in der Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln zu technologischen Zwecken (1998) und dem Verzeichnis der zugelassenen Futtermittel-Zusatzstoffe (2004) festgelegt. Für jeden Zusatzstoff gibt es eine individuelle Kennnummer, den so genannten „E“-Code. Die für die Färbung von Lebensmitteln zugelassenden Carotinoide dürfen auch für die Färbung von Arzneimitteln verwendet werden (Arzneimittelfarbstoffverordnung, 2009). Tab. 3 zeigt die betreffenden zugelassenen Carotinoide und ihre E-Nummern. Außer für β-Carotin, Lycopin und Paprikaextrakt gibt es für alle aufgeführten Zusatzstoffe Höchstgrenzen.

Die Farben von Fischen und Meeresfrüchten gehen meistens auf Carotinoide zurück, die von den Tieren mit der Nahrung aufgenommen werden. In den letzten Jahrzehnten hat die Produktion von Fischen und Meeresfrüchten mit Aquakulturen stetig zugenommen und deckte im Jahr 2008 ca. 50 % des globalen Bedarfes an Fischen, Crustaceen und Mollusken. Im Jahr 2010 betrug die Produktion 52,5 Millionen Tonnen und hatte einen Wert von 98,5 Milliarden US\$ (Bostock *et al.*, 2010). In Gefangenschaft gehen die Farben der Tiere verloren, wenn die Carotinoide nicht supplementiert werden. Von Bedeutung ist die Farbe vor allem bei

Nahrungsfischen wie Lachs und Forelle. Ein wichtiges Qualitätsmerkmal für Lachsfische ist die Farbe des Fleisches, welche bei der erfolgreichen Vermarktung von Produkten aus Aquakulturen von großer Bedeutung ist. Der Verbraucher schreibt dem gefärbten Fleisch eine bessere Qualität zu als ungefärbtem Fleisch. Daher werden der Nahrung dieser Nutztiere Carotinoide zugesetzt, um die natürliche Färbung zu erhalten. In Aquakulturen findet hauptsächlich Astaxanthin Anwendung, in geringerem Maße auch Canthaxanthin.

Der zweite wichtige Anwendungsbereich für Carotinoide als Futtermittelzusatzstoffe ist die Pigmentierung von Geflügelfleisch und Eiern. Hier kommen wegen ihrer besseren Färbereigenschaften hauptsächlich Xanthophylle zum Einsatz (Hencken, 1992).

**Tab. 3:** E-Nummern und Namen von Carotinoiden und Apocarotinoiden, die als Lebensmittel- und/oder Futtermittelzusatzstoffe zugelassen sind. Die Daten wurden aus der Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln zu technologischen Zwecken (1998) und dem Verzeichnis der zugelassenen Futtermittel-Zusatzstoffe (2004) zusammengestellt.

E-Nummer	Zusatzstoff	Lebensmittel	Futtermittel
E160a	Carotine (gemischte Carotine, $\beta$ -Carotin)	+	-
E160b	Annatto: Bixin, Norbixin	+	-
E160c	Paprikaextrakt: Capsanthin, Capsorubin	+	+
E160d	Lycopin	+	-
E160e	$\beta$ -Apo-8'-carotinal	+	+
E160f	$\beta$ -Apo-8'-Carotinsäure-Ethylester	+	+
E161b	Lutein	+	+
E161c	$\beta$ -Cryptoxanthin	-	+
E161g	Canthaxanthin	+	+
E161h	Zeaxanthin	-	+
E161i	Citranaxanthin	-	+
E161j	Astaxanthin	-	+
E161y	Astaxanthin-reiche <i>Phaffia rhodozyma</i> (ATCC SD5340)	-	+
E161z	Astaxanthin-reiche <i>Phaffia rhodozyma</i> (ATCC 74219)	-	+

## 2.5 Mikrobielle Produktion von Carotinoiden und Apocarotinoiden

Neben der chemischen Synthese von Carotinoiden und Apocarotinoiden bietet die Carotinoid-Produktion mit Mikroorganismen eine interessante und vielversprechende Alternative. Die wesentlichen Vorteile der mikrobiellen Carotinoid-Produktion sind die bessere Umweltverträglichkeit und die große Diversität an Carotinoid-produzierenden Enzymaktivitäten. Besonders die chemische Synthese von asymmetrischen Verbindungen, wie z. B. Lutein, ist schwierig und bisher nicht rentabel.

Die naheliegendste Strategie für die mikrobielle Produktion von Carotinoiden ist ihre Isolierung aus natürlichen Produzenten (Tab. 4). Die einzelligen Algen *Dunaliella salina* und *Haematococcus pluvialis* produzieren bei starker Lichteinstrahlung und zusätzlichen Stressfaktoren, wie z. B. Nährstoffmangel, erhöhter Salzkonzentration oder Temperatur, vermehrt Carotinoide, deren Gehalt dann bis zu 10 % der Zelltrockenmasse betragen kann (Olaizola, 2000; Prieto *et al.*, 2011). Die Carotinoid-Ausbeuten hängen stark von der angewendeten Kultivierungs-Form ab und sind in extensiv betriebenen offenen Systemen wesentlich geringer als in geschlossenen Bioreaktoren. Alle kommerziell betriebenen Einrichtungen zur  $\beta$ -Carotin-Produktion mit *Dunaliella salina* sind offene Systeme, die in geographischen Regionen mit ausreichender Lichteinstrahlung und Temperaturen nahe des Optimums der Alge lokalisiert sind (z. B. in China, Israel oder Australien). In den Anlagen, die sich trotz ihrer relativ geringen Produktion wirtschaftlich vor allem wegen der niedrigen Betriebskosten tragen, werden die Algen meistens in flachen, großflächigen Teichen mit oder ohne Turbulenz kultiviert (Del Campo *et al.*, 2007). Für *Haematococcus pluvialis* konnte kein offenes selektives System etabliert werden, das eine Kultivierung für die Astaxanthin-Produktion effizient ermöglicht. Gründe hierfür sind die höhere Sensitivität des Stammes gegenüber Temperatur- und Lichtschwankungen sowie eine geringere Durchsetzungsfähigkeit gegenüber konkurrierenden Organismen. Daher ist für *Haematococcus pluvialis* eine Zwei-Schritt-Kultivierung besser geeignet, bei der zunächst die Biomasse-Vermehrung in einem geschlossenen System erfolgt und anschließend die Carotinoid-Produktion mit der produzierten Biomasse unter den entsprechenden Bedingungen im

Freien. Mit *Haematococcus pluvialis* konnten so bis zu 25 mg Astaxanthin pro Gramm Zelltrockenmasse produziert werden (Olaizola, 2000). Eine von Li *et al.* (2011) veröffentlichte Kostenanalyse zeigte die potentielle wirtschaftliche Konkurrenzfähigkeit der Astaxanthin-Produktion mit *Haematococcus pluvialis* in einem Zwei-Stufen-System mit der chemischen Synthese.

Neben der Alge *Haematococcus pluvialis* ist die Hefe *Xanthophyllomyces dendrorhous* der zweite kommerziell genutzte Astaxanthin-Produzent, mit dem im Fermenter bis zu 4,7 mg Astaxanthin pro Gramm Zelltrockenmasse produziert wurden. Mit dem Carotinoid-produzierenden Pilz *Blakeslea trispora* konnten bis zu 15 mg  $\beta$ -Carotin und 24 mg Lycopin pro Gramm Zelltrockenmasse produziert werden (Tab. 4).

**Tab. 4:** Beispiele für die Produktion von Carotinoiden mit natürlichen Produzenten und die mit der entsprechenden Kultivierungsmethode erzielten Produkt-Ausbeuten.

Organismus	produzierte Carotinoide	Kultivierung	Ausbeute (mg/g Ztrm.)
<i>Dunaliella salina</i>	$\beta$ -Carotin	geschlossener Photobioreaktor	100 <sup>1</sup>
<i>Haematococcus pluvialis</i>	(3S,3'S)-Astaxanthin	zwei-Schritt-Kultivierung geschlossen/offen	25 <sup>2</sup>
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	(3R,3'R)-Astaxanthin	Fermenter	4,7 <sup>3</sup>
<i>Blakeslea trispora</i>	$\beta$ -Carotin	Schüttelkolben	15 <sup>4</sup>
	Lycopin	Schüttelkolben	24 <sup>5</sup>

<sup>1</sup>Prieto *et al.*, 2011; <sup>2</sup>Li *et al.*, 2011; <sup>3</sup>Rodríguez-Sáiz *et al.*, 2010; <sup>4</sup>Mantzouridou *et al.*, 2008; <sup>5</sup>Pegklidou *et al.*, 2008.

Außer den erwähnten natürlichen Produzenten werden auch Mikroorganismen für die Carotinoid-Produktion eingesetzt, die normalerweise keine Carotinoide produzieren. Hierfür wurden Carotinoid-Biosynthesegene heterolog in Stämmen wie *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Zymomonas mobilis*, *Agrobacterium tumefaciens* oder *Escherichia coli* exprimiert (Misawa *et al.*, 1990; Misawa *et al.*, 1991; Miura *et al.*, 1998; Yamano *et al.*, 1994). Die eingesetzten Organismen bieten den Vorteil, dass sie gut charakterisiert sind und für ihre genetische Manipulation und Fermentation die geeigneten Mittel zur Verfügung stehen. Besonders

durch die heterologe Expression von Carotinoid-Biosynthesegenen in *Escherichia coli* konnten viele Carotinoid-Biosyntheseenzyme funktionell charakterisiert werden. (z. B. Misawa *et al.*, 1990; Tao *et al.*, 2006b). Darüber hinaus wurden durch die Kombination von verschiedenen Enzymen oder deren Mutagenese Carotinoide hergestellt, die bisher nicht aus natürlichen Quellen isoliert wurden (Albrecht *et al.*, 2000; Osawa *et al.*, 2011; Schmidt-Dannert *et al.*, 2000).

**Tab. 5:** Beispiele für Strategien für die Steigerung der heterologen Carotinoid-Produktion mit verschiedenen Mikroorganismen im Schüttelkolben-Maßstab und die erzielten Ausbeuten.

Organismus	produziertes Carotinoid	Strategie	Ausbeute (mg/g Ztrm.)
<i>Candida utilis</i>	Lycopin	Überexpression von <i>tHMG1</i> ; Inaktivierung von <i>ERG9</i>	7,8 <sup>1</sup>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$\beta$ -Carotin	Überexpression von <i>BTS1</i> , <i>crtE</i> , <i>crtI</i> , <i>tHMG1</i>	5,9 <sup>2</sup>
<i>Escherichia coli</i>	Lycopin	Überexpression von <i>idi</i> , <i>dxs</i> , <i>ispF</i> , <i>ispD</i>	6 <sup>3</sup>
<i>Escherichia coli</i>	Lycopin	Überexpression von <i>idi</i> , <i>dxs</i> , <i>ispF</i> , <i>ispD</i> ; Inaktivierung von <i>gdhA</i> , <i>aceE</i> , <i>fdhF</i>	18 <sup>4</sup>
<i>Escherichia coli</i>	$\beta$ -Carotin	Überexpression von <i>idi</i> , <i>dxs</i> ; Einbringung des Mevalonat-Weges	49,3 <sup>5</sup>

<sup>1</sup>Shimada *et al.*, 1998; <sup>2</sup>Verwaal *et al.*, 2007; <sup>3</sup>Yuan *et al.*, 2006; <sup>4</sup>Alper *et al.*, 2005; <sup>5</sup>Yoon *et al.*, 2007a.

Um die heterologe Carotinoid-Produktion zu steigern und so mit der Produktion durch natürliche Produzenten konkurrenzfähig zu machen, wurden verschiedene Strategien verfolgt. Mit *Candida utilis* konnte die Lycopin-Produktion durch die Inaktivierung von *ERG9* (Squalen-Synthase) und gleichzeitiger Überexpression der katalytischen Domäne der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase (*tHMG1*) von 1,1 auf 7,8 mg Lycopin pro Gramm Zelltrockenmasse gesteigert werden. Durch die Inaktivierung von *ERG9* wurde die Bereitstellung der Vorstufe Farnesylpyrophosphat verbessert, welches nicht mehr durch die Ergosterol-Synthese verbraucht wurde. Die Überexpression von *tHMG1* verbesserte die Umsetzung von 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA zu Mevalonat (Shimada *et al.*, 1998).

Auch mit *Saccharomyces cerevisiae* konnte die Carotinoid-Produktion durch die Überexpression von *tHMG1* gesteigert werden. Von einigen anderen der chromosomal integrierten Carotinoid-Biosynthesegene waren jedoch ebenfalls zusätzliche Kopien notwendig, um auf eine  $\beta$ -Carotin-Produktion von bis zu 5,9 mg pro Gramm Zelltrockenmasse zu kommen. Als limitierend erwiesen sich in diesem Zusammenhang die Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase (*BTS1*, *crtE*) und die Phytoin-Desaturase (*crtI*) (Verwaal *et al.*, 2007).

Mit *Escherichia coli* konnte durch die Überexpression von Genen des Methylerythritolphosphat-Weges die Carotinoid-Ausbeute deutlich gesteigert werden. Durch den Austausch der chromosomalen Promotoren von *dxs* (1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase), *idi* (Isopentenylpyrophosphat-Isomerase), *ispD* (4-(Cytidin-5'-pyrophospho)-2-C-methyl-D-erythritol-Synthase) und *ispF* (2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclophosphat-Synthase) durch starke konstitutive Promotoren des Phagen T5 konnten bis zu 6 mg Lycopin pro Gramm Zelltrockenmasse produziert werden (Yuan *et al.*, 2006). Die zusätzliche Inaktivierung von *gdhA* (Glutamat-Dehydrogenase), *aceE* (Untereinheit E1p des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes) und *fdhF* (Formiat-Lyase) führte zu einer weiteren Steigerung der Lycopin-Produktion auf 18 mg pro Gramm Zelltrockenmasse (Alper *et al.*, 2005). Die besten Resultate wurden jedoch mit der Einbringung von Genen des Mevalonat-Weges in *E. coli* erzielt. Durch die dadurch erreichte verbesserte Bereitstellung der Vorstufe Isopentenylpyrophosphat konnten bis zu 49,3 mg  $\beta$ -Carotin pro Gramm Zelltrockenmasse produziert werden (Yoon *et al.*, 2007a).

Auch bei der funktionellen Charakterisierung von Carotinoid-Oxygenasen hat sich *Escherichia coli* als ein geeigneter Stamm erwiesen (z. B. Bouvier *et al.*, 2003a; Scherzinger und Al-Babili, 2008), jedoch gibt es über die heterologe Produktion von größeren Mengen Apocarotinoiden bisher nur wenige Veröffentlichungen. Durch den Einsatz eines  $\beta$ -Carotin-produzierenden *E. coli* Stammes, der gleichzeitig das Carotinoid-Oxygenasegen eines marinen Bakteriums exprimiert, wurden in einem Zwei-Phasen-System mit *in situ* Extraktion bis zu 136 mg/l Retinoide (Retinal, Retinol und Retinylacetat) produziert (Jang *et al.*, 2011). Zwei andere Publikationen beschreiben die *in vitro* Apocarotinoid-Produktion mit gereinigten Enzymen, durch die bis zu 181 mg/l Retinal und 43 mg/l Apo-10'-carotinal produziert werden konnten (Kim *et al.*, 2010b; Kim *et al.*, 2011).

## 2.6 Ziel dieser Arbeit

Für den Beitrag dieser Arbeit zur Kenntnis über die Biosynthese von Carotinoiden und ihre Spaltung durch Carotinoid-Oxygenasen sollte zunächst ein Expressionssystem für die heterologe Produktion von verschiedenen C<sub>40</sub>- und C<sub>50</sub>-Carotinoiden mit *Escherichia coli* hergestellt werden. Die Auswahl des pBBR1MCS-2-Replikons (Antoine und Locht, 1992; Kovach *et al.*, 1995), einem Plasmid mit breitem Wirtsspektrum, sollte neben der Untersuchung der Carotinoid-Produktion mit verschiedenen *Escherichia coli* Stämmen auch die Prüfung anderer Bakterienarten auf ihre Eignung als Carotinoid-Produzenten ermöglichen.

Als ein möglicher alternativer Carotinoid-Produktionsstamm wurde das  $\gamma$ -Proteobakterium *Pseudomonas putida* KT2440 ausgewählt. Die in der Literatur beschriebene Lösungsmittel-Resistenz einiger *Pseudomonas putida* Stämme (Faizal *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 1993) führte zu der theoretischen Annahme, dass *Pseudomonas putida* KT2440 aufgrund von erhöhter Toleranz gegenüber hydrophoben Substanzen besonders gut für die heterologe Carotinoid-Produktion geeignet sein könnte.

Das hergestellte Expressionssystem sollte außerdem dazu eingesetzt werden unbekannte Carotinoid-Biosynthesegene und Carotinoid-Oxygenasegene funktionell zu charakterisieren. Bis heute wurden über 2000 Genome von Eukaryoten, Archaeen und Bakterien sequenziert, unter denen sich zahlreiche Carotinoid-Produzenten befinden. Insbesondere über die Carotinoid-Oxygenasen von Proteobakterien ist bisher nur wenig bekannt. Durch eine Datenbanksuche mit Hilfe der Aminosäuresequenzen von bereits charakterisierten Enzymen mit bekannter Funktion sollten potentielle Carotinoid-Biosynthesegene und Carotinoid-Oxygenasegene mit bisher unbekannter Funktion identifiziert und anschließend funktionell charakterisiert werden.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Stämme

Tab. 6: Stämme.

Bezeichnung	Resistenz(en); Genotyp; Stammsammlungsnummer(n)	Referenz
<i>Brevundimonas</i> sp. SD212	Wildtyp; MBIC 03018	Nishida <i>et al.</i> , 2005
<i>Corynebacterium</i> <i>glutamicum</i>	Wildtyp; DSM 20300, ATCC 13032	Bröer und Krämer, 1990
<i>Escherichia coli</i> JM109	Nal <sup>r</sup> ; <i>recA1 endA1 gyrA96 thi</i> <i>hsdR17 supE44 relA1</i> λ <sup>-</sup> Δ( <i>lac-</i> <i>proAB</i> ) [F' <i>traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup></i> <i>lacZ</i> ΔM15]; DSM 3425, ATCC 53323	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
<i>Escherichia coli</i> S17-1	Tmp <sup>r</sup> Spc <sup>r</sup> Str <sup>r</sup> ; <i>recA pro hsdR</i> RP4-2-Tc::Mu-Kan::Tn7; ATCC 47055	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>Escherichia coli</i> WA66.1 Δ <i>xthA</i>	<i>rrnB3</i> Δ( <i>araD-araB</i> )567 <i>rpoS369</i> (Am) <i>rph-1</i> Δ( <i>rhaD-</i> <i>rhaB</i> )568 <i>xthA</i> ::FRT <i>hsdR514</i>	Wegerer, unveröffentlicht
<i>Pantoea ananatis</i>	Wildtyp; DSM 30080, ATCC 19321	Misawa <i>et al.</i> , 1990
<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i> Pf0-1	Wildtyp	Compeau <i>et al.</i> , 1988
<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i> PF5	Wildtyp; ARS NRRL B-23932, ATCC BAA-477	Paulsen <i>et al.</i> , 2005
<i>Pseudomonas putida</i> 0484	Tet <sup>r</sup> ; Δ <i>upp</i> Δ <i>pp_0484</i>	diese Arbeit
<i>Pseudomonas putida</i> 0980	Apr <sup>r</sup> ; Δ <i>upp</i> Δ <i>pp_0980</i>	diese Arbeit
<i>Pseudomonas putida</i> 0484/0980	Tet <sup>r</sup> Apr <sup>r</sup> ; Δ <i>upp</i> Δ <i>pp_0484</i> Δ <i>pp_0980</i>	diese Arbeit
<i>Pseudomonas putida</i> C7L	Tet <sup>r</sup> ; <i>pp_0980</i> ::mini-Tn5	Beuttler <i>et al.</i> , 2011
<i>Pseudomonas putida</i> D7L3	Tet <sup>r</sup> ; <i>pp_0484</i> ::mini-Tn5	Beuttler <i>et al.</i> , 2011

Bezeichnung	Resistenz(en); Genotyp; Stammsammlungsnummer(n)	Referenz
<i>Pseudomonas putida</i> D8L1	Tet <sup>r</sup> ; <i>pp_4235::mini-Tn5</i>	Beuttler <i>et al.</i> , 2011
<i>Pseudomonas putida</i> E3L2	Tet <sup>r</sup> ; <i>pp_3711::mini-Tn5</i>	Beuttler <i>et al.</i> , 2011
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Nal <sup>r</sup> ; <i>hsdRI hsdM<sup>r</sup></i> ; ATCC 47054	Franklin <i>et al.</i> , 1981
<i>Pseudomonas putida</i> $\Delta upp$	$\Delta upp$	Graf und Altenbuchner, 2011
<i>Pseudomonas</i> sp. K10206C	Wildtyp	Miki <i>et al.</i> , 1994
<i>Pseudomonas stutzeri</i> JM300	Wildtyp; DSM 10701	Carlson <i>et al.</i> , 1983
<i>Sphingopyxis</i> <i>alaskensis</i> RB2256	Wildtyp; DSM 13593	Vancanneyt <i>et al.</i> , 2001

### 3.1.2 Chromosomale DNA

**Tab. 7:** Chromosomale DNA.

Organismus	Stammsammlungs- nummer	Herkunft der DNA	Referenz
<i>Plesiocystis</i> <i>pacifica</i> SIR-1	DSM 14875	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig	Iizuka <i>et al.</i> , 2003

### 3.1.3 Plasmide

**Tab. 8:** Plasmide.

Plasmid	Beschreibung	Ursprungs- Replikon	Referenz
pACYC177	Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>	p15A	Chang und Cohen, 1978
pACYC184	Tet <sup>r</sup> , Cml <sup>r</sup>	p15A	Chang und Cohen, 1978
pBBR1MCS-2	Kan <sup>r</sup> , <i>P<sub>lac</sub></i> , <i>mob</i> , <i>lacZ</i>	pBBR1MCS-2	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pJeM1	Kan <sup>r</sup> , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>rhaRS</i> , <i>mob</i> , <i>eGFP</i>	pBBR1MCS-2	Jeske und Altenbuchner, 2010

Plasmid	Beschreibung	Ursprungs-Replikon	Referenz
pJOE4786.1	$Amp^r$ , <i>lacZ</i>	pUC18	Jeske und Altenbuchner, 2010
pJOE5275.26	$Amp^r$ , <i>araP<sub>BAD</sub></i> , <i>araC</i> , <i>eGFP</i>	pBR322	Altenbuchner, unveröffentlicht
pJOE5473.2	$Kan^r$ , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>rhaRS</i> , <i>mob</i> , <i>idi</i>	pBBR1MCS-2	Beuttler <i>et al.</i> , 2011
pJOE5559.1	$Kan^r$ , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>rhaRS</i> , <i>mob</i> , <i>idi</i> , <i>ispA</i> , <i>dxs</i>	pBBR1MCS-2	Beuttler <i>et al.</i> , 2011
pJOE5571.6	$Kan^r$ , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>rhaRS</i> , <i>mob</i> , <i>idi</i> , <i>ispA</i> , <i>dxs</i> , <i>crtE</i>	pBBR1MCS-2	Beuttler <i>et al.</i> , 2011
pJOE5573.3	$Kan^r$ , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>rhaRS</i> , <i>mob</i> , <i>idi</i> , <i>ispA</i> , <i>dxs</i> , <i>crtE</i> , <i>crtB</i> , <i>crtI</i>	pBBR1MCS-2	Beuttler <i>et al.</i> , 2011
pJOE5573.3mut11	$Kan^r$ , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>rhaRS</i> , <i>mob</i> , <i>idi</i> , <i>ispA</i> , <i>dxs</i> , $\Delta crtE$ , $\Delta crtB$ , $\Delta crtI$	pBBR1MCS-2	diese Arbeit
pJOE5573.3mut23	$Kan^r$ , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>rhaRS</i> , <i>mob</i> , <i>idi</i> , <i>ispA</i> , <i>dxs</i> , <i>crtE</i> , <i>crtB</i> , <i>crtI</i> , nicht identifizierte Insertionssequenz	pBBR1MCS-2	diese Arbeit
pJOE5607.5	$Kan^r$ , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>rhaRS</i> , <i>mob</i> , <i>idi</i> , <i>ispA</i> , <i>dxs</i> , <i>crtE</i> , <i>crtB</i> , <i>crtI</i> , <i>crtY</i> ( <i>P. a.</i> )	pBBR1MCS-2	Beuttler <i>et al.</i> , 2011
pJOE5653.5	$Kan^r$ , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>rhaRS</i> , <i>mob</i> , <i>idi</i> , <i>ispA</i> , <i>dxs</i> , <i>crtE</i> , <i>crtB</i> , <i>crtI</i> , <i>crtY</i> , <i>cyp175A1</i>	pBBR1MCS-2	Altenbuchner, unveröffentlicht
pJOE5653.5mut15	$Kan^r$ , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>rhaRS</i> , <i>mob</i> , <i>idi</i> , <i>ispA</i> , <i>dxs</i> , <i>crtE</i> , <i>crtB</i> , <i>crtI</i> , <i>crtY</i> , <i>cyp175A1</i> , <i>rep::ISPpu15</i>	pBBR1MCS-2	diese Arbeit
pJOE5621.3	$Amp^r$ , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>crtE</i> , <i>crtX</i> , <i>crtY</i> , <i>crtI</i> , <i>crtB</i> , <i>crtZ</i> ( <i>P. a.</i> )	pBR322	Altenbuchner, unveröffentlicht
pJOE5700.3	$Amp^r$ , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>crtEb</i> , <i>crtYe</i> , <i>crtYf</i>	pBR322	Altenbuchner, unveröffentlicht
pJOE5751.1	$Amp^r$ , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , His-tag- <i>eGFP</i>	pBR322	Altenbuchner, unveröffentlicht
pJOE5777.3	$Kan^r$ , $Tet^r$ , <i>mob</i> , <i>tnpA</i> , mini-Tn5	pACYC184	Beuttler <i>et al.</i> , 2011
pJOE5901.2	$Kan^r$ , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>rhaRS</i> , <i>mob</i> , <i>idi</i> , <i>ispA</i> , <i>dxs</i> , <i>crtE</i> , <i>crtI</i>	pBBR1MCS-2	Beuttler <i>et al.</i> , 2011
pJOE6038.1	$Cml^r$ , <i>araP<sub>BAD</sub></i> , <i>araC</i> , <i>recA</i> , <i>repA101</i> , <i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i>	pKD20*	Altenbuchner, unveröffentlicht

Plasmid	Beschreibung	Ursprungs-Replikon	Referenz
pJOE6089.4	Amp <sup>r</sup> , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>eGFP-Strep-tag<sup>®</sup>II</i>	pBR322	Altenbuchner, unveröffentlicht
pJOE6261.2	Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , <i>upp (P. p.)</i>	pUC18	Graf und Altenbuchner, 2011
pJOE6533.4	Apr <sup>r</sup>	pBBR1MCS-2	Altenbuchner, unveröffentlicht
pMevB	Tet <sup>r</sup> , <i>P<sub>lac</sub></i> , <i>mob</i> , <i>ERG12</i> , <i>ERG8</i> , <i>ERG19</i>	pBBR1MCS-3	Martin <i>et al.</i> , 2003
pNosCCD-CR2.1	Kan <sup>r</sup> , Amp <sup>r</sup> , <i>P<sub>lac</sub></i> , <i>nosCCD</i>	pUC, f1	Scherzinger und Al-Babili, 2008

\*Armstrong *et al.*, 1984; Datsenko und Wanner, 2000; Hasan *et al.*, 1994.

**Tab. 9:** Eigene Plasmide.

Plasmid	Beschreibung	Ursprungs-Replikon	Vektor	Insert*
pJH4	Tet <sup>r</sup> , mini-Tn5, ' <i>pp_0484</i> '	pACYC184	-	siehe Kapitel 4.2.2.3
pJH5	Tet <sup>r</sup> , mini-Tn5, ' <i>pp_4235</i> '	pACYC184	-	siehe Kapitel 4.2.2.3
pJH6	Tet <sup>r</sup> , mini-Tn5, ' <i>pp_3711</i> '	pACYC184	-	siehe Kapitel 4.2.2.3
pJH8	Tet <sup>r</sup> , mini-Tn5, ' <i>pp_0980</i> '	pACYC184	-	siehe Kapitel 4.2.2.3
pJH10	Amp <sup>r</sup> , <i>crtZ (P. a.)</i>	pUC18	pJOE4786.1	S4960, S4961
pJH11	Amp <sup>r</sup> , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>crtZ (P. a.)</i>	pBR322	pJOE5751.1	pJH10
pJH13.1**	Kan <sup>r</sup> , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>rhaRS</i> , <i>mob</i> , <i>idi</i> , <i>ispA</i> , <i>dxs</i> , <i>crtE</i> , <i>crtB</i>	pBBR1MCS-2	pJOE5571.6	S4954, S4955
pJH14.1**	Kan <sup>r</sup> , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>rhaRS</i> , <i>mob</i> , <i>idi</i> , <i>ispA</i> , <i>dxs</i> , <i>crtE</i> , <i>crtB</i> , <i>crtI</i> , <i>crtY</i> , <i>crtZ (P. a.)</i>	pBBR1MCS-2	pJOE5607.5	S4958, S4959
pJH15.3	Kan <sup>r</sup> , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>rhaRS</i> , <i>mob</i> , <i>idi</i> , <i>ispA</i> , <i>dxs</i> , <i>crtE</i> , <i>crtB</i> , <i>crtI</i> , <i>crtY</i> , <i>crtZ (P. a.)</i> , <i>crtW</i>	pBBR1MCS-2	pJH14.1	S5000, S5001
pJH16.3	Amp <sup>r</sup> , <i>crtW</i>	pUC18	pJOE4786.1	S5000, S5001

Plasmid	Beschreibung	Ursprungs-Replikon	Vektor	Insert*
pJH20.1	Kan <sup>r</sup> , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>rhaRS</i> , <i>mob</i> , <i>idi</i> , <i>ispA</i> , <i>dxs</i> , <i>crtE</i> , <i>crtB</i> , <i>crtI</i> , <i>crtY</i> , <i>crtZ</i> ( <i>B. sp.</i> )	pBBR1MCS-2	pJOE5607.5	S4998, S4999
pJH21.1	Amp <sup>r</sup> , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>crtZ</i> ( <i>P. a.</i> ), <i>crtW</i>	pBR322	pJH11	pJH16.3
pJH22.1	Amp <sup>r</sup> , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>crtW</i>	pBR322	pJH21.1	-
pJH29.10	Kan <sup>r</sup> , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>rhaRS</i> , <i>mob</i> , <i>idi</i> , <i>ispA</i> , <i>dxs</i> , <i>crtE</i> , <i>crtB</i> , <i>crtI</i> , <i>crtEb</i> , <i>crtYe</i> , <i>crtYf</i>	pBBR1MCS-2	pJOE5573.3	S5186, S5187
pJH33.1	Amp <sup>r</sup> , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>crtG</i> ( <i>B. sp.</i> )	pBR322	pJOE5751.1	S5370, S5371
pJH41.1	Amp <sup>r</sup> , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>sala_1008</i>	pBR322	pJOE5751.1	S5633, S5634
pJH42.1	Amp <sup>r</sup> , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>sala_1698</i>	pBR322	pJOE5751.1	S5631, S5632
pJH43.1	Kan <sup>r</sup> , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , $\Delta$ <i>eGFP</i>	pBR322	pJOE5751.1	-
pJH55.1	Amp <sup>r</sup> , <i>araP<sub>BAD</sub></i> , <i>araC</i> , <i>sala_1698</i>	pBR322	pJOE5275.26	pJH42.1
pJH58.2	Amp <sup>r</sup> , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>sala_1698-Strep-tag</i> <sup>®</sup> II	pBR322	pJOE6089.4	S5631, S5915
pJH59.1	Amp <sup>r</sup> , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>ppsir1_15490</i>	pBR322	pJOE6089.4	S5635; S5636
pJH60.2	Amp <sup>r</sup> , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>ppsir1_17230</i>	pBR322	pJOE5751.1	S5637, S5638
pJH62.1	Amp <sup>r</sup> , <i>araP<sub>BAD</sub></i> , <i>araC</i> , <i>ppsir1_15490</i>	pBR322	pJOE5275.26	pJH59.1
pJH63.3	Amp <sup>r</sup> , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>ppsir1_36107 (crtU)</i>	pBR322	pJOE5751.1	S6055, S6056
pJH64.2	Amp <sup>r</sup> , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>ppsir1_19284 (crtY)</i>	pBR322	pJOE5751.1	S6057, S6058
pJH65.1	Amp <sup>r</sup> , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>ppsir1_30569 (crtC)</i>	pBR322	pJOE5751.1	S6059, S6060
pJH66.1	Amp <sup>r</sup> , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>ppsir1_15490mut</i>	pBR322	pJOE5751.1	S5636, S6169
pJH74.1	Amp <sup>r</sup> , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>crtG</i> ( <i>S. a.</i> )	pBR322	pJOE5751.1	S6524, S6525
pJH77	Tet <sup>r</sup> , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>rhaRS</i> , <i>mob</i> , <i>idi</i> , <i>ispA</i> , <i>dxs</i> , <i>crtE</i> , <i>crtB</i> , <i>crtI</i>	pBBR1MCS-2	pJOE5573.3	S6619, S6620

Plasmid	Beschreibung	Ursprungs-Replikon	Vektor	Insert*
pJH79	Kan <sup>r</sup> , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>rhaRS</i> , <i>idi</i> , <i>ispA</i> , <i>dxs</i> , <i>crtE</i> , <i>crtB</i> , <i>crtI</i>	pACYC177	pJH77	S6757, S6758
pJH84.1	Amp <sup>r</sup> , <i>ppsir1_30569</i> ( <i>crtC</i> )	pUC18	pJOE4786.1	S7026, S7027
pJH88.1	Kan <sup>r</sup> , <i>rhaP<sub>BAD</sub></i> , <i>rhaRS</i> , <i>mob</i> , <i>idi</i> , <i>ispA</i> , <i>dxs</i> , <i>crtE</i> , <i>crtB</i> , <i>crtI</i> , <i>crtC</i>	pBBR1MCS-2	pJOE5573.3	pJH84.1
pJH90.2	Amp <sup>r</sup> , <i>pp_0486'</i> , <i>pp_0485'</i> , <i>pp_0484'</i> , <i>pp_0483'</i>	pUC18	pJOE4786.1	S7032, S7033, S7034, S7035
pJH91.1	Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , <i>upp</i> , <i>pp_0486'</i> , <i>pp_0485'</i> , <i>pp_0484'</i> , <i>pp_0483'</i>	pUC18	pJOE6261.2	pJH90.2
pJH93.1	Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup> , <i>upp</i> , <i>pp_0486'</i> , <i>pp_0485'</i> , <i>pp_0484'</i> , <i>pp_0483'</i>	pUC18	pJH91.1	S7105, S7106
pJH94.2	Amp <sup>r</sup> , <i>pp_0982'</i> , <i>pp_0980'</i> , <i>pp_0979'</i> , <i>pp_0978'</i>	pUC18	pJOE4786.1	S7107, S7108, S7109, S7110
pJH95.1	Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , <i>upp</i> , <i>pp_0982'</i> , <i>pp_0980'</i> , <i>pp_0979'</i> , <i>pp_0978'</i>	pUC18	pJOE6261.2	pJH94.2
pJH98.1	Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , Apr <sup>r</sup> , <i>upp</i> , <i>pp_0982'</i> , <i>pp_0980'</i> , <i>pp_0979'</i> , <i>pp_0978'</i>	pUC18	pJH95.1	S7127, S7181

\* Entweder ist der Vektor angegeben aus dem das Insert stammt oder es sind die Oligonukleotide angegeben mit denen das integrierte PCR-Fragment amplifiziert wurde.

\*\* Beuttler *et al.*, 2011.

## 3.1.4 Oligonukleotide

Tab. 10: Oligonukleotide.

Oligonukleotid	Beschreibung	$T_m$
<b>SP6</b>	SP6 Promotor in pJOE4786.1, für DNA-Sequenzierung 5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA-3'	52 °C
<b>T7</b>	T7 Promotor in pJOE4786.1 und pJOE5751.1, für DNA-Sequenzierung 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'	56 °C
<b>S4417</b>	<i>rrnB</i> in pJOE5751.1 und seinen Derivaten, für DNA-Sequenzierung 5'-TCA CTT CTG AGT TCG GCA T-3'	56 °C
<b>S4896</b>	IR-I von Mini-Tn5, für DNA-Sequenzierung 5'-CTA GCC GGG TCC TCA ACG AC-3'	66 °C
<b>S4901</b>	<i>cyp175A1</i> 5'-terminal in pJOE5653.5, für DNA-Sequenzierung 5'-GCG CGG CCT AGG GAG GAG GT-3'	70 °C
<b>S4954</b>	<i>crtB</i> 3'-terminal in pJOE5573.3, In-Fusion-Klonierung* 5'-CCG TCA GTT AAG TTT TCC GTC GTT ACT CAA TCA TGC GGT-3'	72 °C
<b>S4955</b>	<i>crtB</i> 5'-terminal in pJOE5573.3, In-Fusion-Klonierung*, <i>Pmel</i> 5'-TTA CTT GTA CAG TTT AAA CTA GAG CGG GCG CTG CCA GAG-3'	72 °C
<b>S4958</b>	<i>crtZ</i> ( <i>P. a.</i> ) 3'-terminal in pJOE5621.3, In-Fusion-Klonierung* 5'-CTC ATC GTT AAG TTT ACC GGA GAA ATT ATG TTG TGG ATT T-3'	68 °C
<b>S4959</b>	<i>crtZ</i> ( <i>P. a.</i> ) 3'-terminal in pJOE5621.3, In-Fusion-Klonierung*, <i>Pmel</i> 5'-TTA CTT GTA CAG TTT AAA CTT ACT TCC CGG ATG CGG GCT CA-3'	68 °C
<b>S4960</b>	<i>crtZ</i> ( <i>P. a.</i> ) 3'-terminal in pJOE5621.3, <i>NdeI</i> 5'-CAG CAT ATG CTA CCG GAG AAA TTA TGT TG-3'	66 °C
<b>S4961</b>	<i>crtZ</i> ( <i>P. a.</i> ) 5'-terminal in pJOE5621.3, <i>HindIII</i> 5'-GTC AAG CTT TTA CTT CCC GGA TGC G-3'	66 °C
<b>S4998</b>	<i>crtZ</i> ( <i>B. sp.</i> ) 3'-terminal, In-Fusion-Klonierung* 5'-CTC ATC GTT AAG TTT AAG GAG ATA TAC ATA TGG CCT GGC TGA CGT GGA TCG-3'	72 °C
<b>S4999</b>	<i>crtZ</i> ( <i>B. sp.</i> ) 5'-terminal, In-Fusion-Klonierung*, <i>Pmel</i> 5'-TTA CTT GTA CAG TTT AAA CGC TCA GGC GCC GCT GCT GG -3'	72 °C

Oligonukleotid	Beschreibung	$T_m$
<b>S5000</b>	<i>crtW</i> 3'-terminal, In-Fusion-Klonierung*	74 °C
	5'-CCG GGA AGT AAG TTT AAG GAG ATA TAC ATA TGA CCG CCG CCG TCG CCG AG-3'	
<b>S5001</b>	<i>crtW</i> 5'-terminal, In-Fusion-Klonierung*, <i>PmeI</i>	74 °C
	5'-TTA CTT GTA CAG TTT AAA CGA TCA AGA CTC GCC GCG CCA CAA-3'	
<b>S5186</b>	<i>crtEb crtYe crtYf</i> 3'-terminal, In-Fusion-Klonierung*	56 °C
	5'-CGC CCG CTC TAG TTT AAT AAT TTT CTT AAG AAG GAG AT-3'	
<b>S5187</b>	<i>crtEb crtYe crtYf</i> 5'-terminal, In-Fusion-Klonierung*, <i>PmeI</i>	56 °C
	5'-TTA CTT GTA CAG TTT AAA CGT TTG GGG ATA TCT TAC GG-3'	
<b>S5370</b>	<i>crtG</i> ( <i>B. sp.</i> ) 3'-terminal, <i>NdeI</i>	62 °C
	5'-AAA AAA CAT ATG TTG AGG GAT CTG CTC ATC-3'	
<b>S5371</b>	<i>crtG</i> ( <i>B. sp.</i> ) 5'-terminal, <i>BsrGI</i>	62 °C
	5'-AAA AAA TGT ACA TCA CCG AAG AGG CGC TGA G-3'	
<b>S5631</b>	<i>sala_1698</i> 3'-terminal, <i>NdeI</i>	56 °C
	5'-AAA AAA CAT ATG GCA AGC CAG GTC GAA-3'	
<b>S5632</b>	<i>sala_1698</i> 5'-terminal, <i>HindIII</i>	56 °C
	5'-AAA AAA AAG CTT TCA GTC CGC GAC CCA ATT-3'	
<b>S5633</b>	<i>sala_1008</i> 3'-terminal, <i>Asel</i>	58 °C
	5'-AAA AAA ATT AAT ATG ACC GCC CAG CTT GTC-3'	
<b>S5634</b>	<i>sala_1008</i> 5'-terminal, <i>HindIII</i>	60 °C
	5'-AAA AAA AAG CTT TCA GGC GGC CAG CAC GC-3'	
<b>S5635</b>	<i>ppsir1_15490</i> 3'-terminal, <i>NdeI</i>	60 °C
	5'-AAA AAA CAT ATG CAG GCG CCC CGC AC-3'	
<b>S5636</b>	<i>ppsir1_15490</i> 5'-terminal, <i>HindIII</i>	60 °C
	5'-AAA AAA AAG CTT CTA CCC GAC CCA CGC CC-3'	
<b>S5637</b>	<i>ppsir1_17230</i> 3'-terminal, <i>NdeI</i>	60 °C
	5'-AAA AAA CAT ATG GCC GGC GCG CGC GA-3'	
<b>S5638</b>	<i>ppsir1_17230</i> 5'-terminal, <i>HindIII</i>	60 °C
	5'-AAA AAA AAG CTT TCA CTG CGC CGC CTC GC-3'	
<b>S5720</b>	<i>sala_1698</i> 3'-terminal, <i>BamHI</i>	56 °C
	5'-AAA AAA GGA TCC GCA AGC CAG GTC GAA ACA-3'	
<b>S5915</b>	<i>sala_1698</i> 5'-terminal, <i>BamHI</i>	56 °C
	5'-AAA AAA GGA TCC GTC CGC GAC CCA ATT GC-3'	
<b>S6055</b>	<i>ppsir1_36107</i> ( <i>crtU</i> ) 3'-terminal, <i>NdeI</i>	60 °C
	5'-AAA AAA CAT ATG GCG AGT GAG GCG CGC-3'	

Oligonukleotid	Beschreibung	$T_m$
<b>S6056</b>	<i>ppsir1_36107 (crtU)</i> 5'-terminal, <i>BsrGI</i> 5'-AAA AAA TGT ACA TCA GGC CAG GAT GCC GCG-3'	62 °C
<b>S6057</b>	<i>ppsir1_19284 (crtY)</i> 3'-terminal, <i>NdeI</i> 5'-AAA AAA CAT ATG ACC GAT CTC GAC CGA G-3'	60 °C
<b>S6058</b>	<i>ppsir1_19284 (crtY)</i> 5'-terminal, <i>BsrGI</i> 5'-AAA AAA TGT ACA TCA GCG ACG CCG CAA GCC-3'	62 °C
<b>S6059</b>	<i>ppsir1_30569 (crtC)</i> 3'-terminal, <i>NdeI</i> 5'-AAA AAA CAT ATG AGC GCG GCC ATG AAC G-3'	60 °C
<b>S6060</b>	<i>ppsir1_30569 (crtC)</i> 5'-terminal, <i>HindIII</i> 5'-AAA AAA AAG CTT TCA CCC TCG CCG GGT CTT-3'	60 °C
<b>S6169</b>	<i>ppsir1_15490</i> 3'-terminal, <i>NdeI</i> 5'-AAA AAA CAT ATG CAR GCN CCN CGN ACC GAC CGT CCC CAC GC-3'	60 °C
<b>S6524</b>	<i>sala_3136 (crtG)</i> 3'-terminal, <i>Asel</i> 5'-AAA AAA ATT AAT ATG ACC GGC TGG GCG ATC-3'	62 °C
<b>S6525</b>	<i>sala_3136 (crtG)</i> 5'-terminal, <i>HindIII</i> 5'-AAA AAA AAG CTT TCA ACC GTC GGC GGC GG-3'	60 °C
<b>S6619</b>	40 bp in pBBR1MCS-2 Plasmiden; Tet <sup>r</sup> in pACYC184 5'-AGA CTG GGC GGT TTT ATG GAC AGC AAG CGA ACC GGA ATT GGT CAG CCC CAT ACG ATA TAA-3'	58 °C
<b>S6620</b>	40 bp in pBBR1MCS-2 Plasmiden; Tet <sup>r</sup> in pACYC184 5'-CGG CAT CAG CAC CTT GTC GCC TTG CGT ATA ATA TTT GCC CGT GAA TCC GTT AGC GAG GT-3'	58 °C
<b>S6757</b>	40 bp in pJH77; Kan <sup>r</sup> , <i>ori</i> in pACYC177 5'-CGG CAT CAG CAC CTT GTC GCC TTG CGT ATA ATA TTT GCC CGT TAC AAC CAA TTA ACC AAT TC-3'	58 °C
<b>S6758</b>	40 bp in pJH77; Kan <sup>r</sup> , <i>ori</i> in pACYC177 5'-TAA GCT TAC CGG TTT ATT GAC TAC CGG AAG CAG TGT GAC CCT GTC AGA CCA AGT TTA CTC-3'	58 °C
<b>S7026</b>	<i>ppsir_30569 (crtC)</i> 3'-terminal in pJH65, <i>BsrGI</i> 5'-AAA AAA TGT ACA AAT AAT TTT CTT AAG AAG GAG ATA-3'	58 °C
<b>S7027</b>	<i>ppsir_30569 (crtC)</i> 5'-terminal in pJH65, <i>BsrGI</i> 5'-AAA AAA TGT ACA TCA CCC TCG CC-3'	38 °C
<b>S7032</b>	<i>pp_0483 (P. p.)</i> Richtung <i>pp_0484</i> 5'-GTC TCT TCG CCT TGT TCG-3'	56 °C

Oligonukleotid	Beschreibung	$T_m$
<b>S7033</b>	<i>pp_0484</i> ( <i>P. p.</i> ) Richtung <i>pp_0483</i> , 19 bp Überlappung mit 5'-Ende von <i>pp_0484</i>	56 °C
	5'-GGG CCA TAA CGT TCT CCT ACA TGG ATT AAC CTC GTG TG-3'	
<b>S7034</b>	<i>pp_0484</i> ( <i>P. p.</i> ) Richtung <i>pp_0485</i> , 19 bp Überlappung mit 3'-Ende von <i>pp_0484</i>	56 °C
	5'-CAC ACG AGG TTA ATC CAT GTA GGA GAA CGT TAT GGC CC-3'	
<b>S7035</b>	<i>pp_0486</i> ( <i>P. p.</i> ) Richtung <i>pp_0485</i>	58 °C
	5'-AGC TGC CAG AAC CGT GG-3'	
<b>S7105</b>	Tet <sup>r</sup> in pACYC184, <i>Ascl</i>	58 °C
	5'-AAA AAA GGC GCG CCG TCA GCC CCA TAC GAT ATA A-3'	
<b>S7106</b>	Tet <sup>r</sup> in pACYC184, <i>Ascl</i>	58 °C
	5'-AAA AAA GGC GCG CCG TGA ATC CGT TAG CGA GGT-3'	
<b>S7107</b>	<i>pp_0978</i> ( <i>P. p.</i> ) Richtung <i>pp_0979</i>	58 °C
	5'-TCA GCC GCT CGA TCC GC-3'	
<b>S7108</b>	<i>pp_0980</i> ( <i>P. p.</i> ) Richtung <i>pp_0979</i> , 19 bp Überlappung mit 3'-Ende von <i>pp_0980</i>	58 °C
	5'-TGG AAC TGG TTG TAA GGC GCG CCT GAA GCC GTG AAG CCG GT-3'	
<b>S7109</b>	<i>pp_0980</i> ( <i>P. p.</i> ) Richtung <i>pp_0981</i> , 19 bp Überlappung mit 5'-Ende von <i>pp_0980</i>	56 °C
	5'-GGC TTC ACG GCT TCA GGC GCG CCT TAC AAC CAG TTC CAT GTC A-3'	
<b>S7110</b>	<i>pp_0982</i> ( <i>P. p.</i> ) Richtung <i>pp_0981</i>	58 °C
	5'-GAT GCG GTC ATC CGA CAG-3'	
<b>S7127</b>	Apr <sup>r</sup> in pJOE6533.4, <i>Ascl</i>	56 °C
	5'-AAA AAA GGC GCG CC A GAG AAT AGG AAC TTC GGA A-3'	
<b>S7181</b>	Apr <sup>r</sup> in pJOE6533.4, <i>Ascl</i>	56 °C
	5'-AAA AAA GGC GCG CC T GCA GCT CAC GGT AAC TG-3'	

\*In-Fusion 2.0 Dry Down PCR Cloning Kit (Tab. 15).

## 3.1.5 Nährmedien

Tab. 11: Nährmedien.

Medium	Komponenten	Menge	Bemerkungen
LB (Bertani, 1951)	Trypton	10 g	pH-Wert mit NaOH auf 7,2 (bzw. pH 6,5 für TSS) einstellen, autoklavieren
	Hefeextrakt	5 g	
	NaCl	5 g	
	H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 1 l	
LB Agar	European Agar	15 g	autoklavieren
	LB (pH 7,2)	<i>ad</i> 1 l	
LB Gly NaPP	20 % (w/v) Glycerin	5 ml	nach dem Autoklavieren mischen
	1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,8)	10 ml	
	LB (pH 7,2)	200 ml	
M9-Agar mit Fluorouracil	1,5 % (w/v) Bacto™ Agar	450 ml	Agarwasser autoklavieren, restliche Lösungen nach dem Autoklavieren hinzufügen
	10 x M9-Salze	50 ml	
	1 M MgSO <sub>4</sub>	500 µl	
	1 M CaCl <sub>2</sub>	50 µl	
	20 % (w/v) Glucose	5 ml	
	100 mg/ml 5-Fluorouracil in DMSO	100 µl	
Marine Broth (Difco Medium 2216, modifiziert)	Pepton	5 g	autoklavieren
	Hefeextrakt	1 g	
	Eisen-III-citrat·H <sub>2</sub> O	0,1 g	
	NaCl	19,45 g	
	MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	5,9 g	
	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	3,24 g	
	CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	1,8 g	
	KCl	0,55 g	
	NaHCO <sub>3</sub>	0,16 g	
	NaBr	0,08 g	
	Borsäure	22 mg	
	NaF	2,4 mg	
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	8 mg	
	H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 1 l	
	Marine Agar	European Agar	
Marine Broth		<i>ad</i> 1 l	

Medium	Komponenten	Menge	Bemerkungen
TB (Sambrook <i>et al.</i> , 1989, modifiziert)	Trypton	12 g	autoklavieren, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - und K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - Lösungen nach dem Autoklavieren hinzufügen
	Hefeextrakt	24 g	
	Glycerin (≥ 99,5 %)	5 ml	
	1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	70 ml	
	1 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	70 ml	
	H <sub>2</sub> O	1 l	
TSS (Chung <i>et al.</i> , 1989)	PEG6000	10 g	autoklavieren
	DMSO	5 ml	
	2 M MgCl <sub>2</sub>	2,5 ml	
	LB (pH 6,5)	82,5 ml	
TY	Trypton	10 g	pH-Wert mit NaOH auf 7,2 einstellen, autoklavieren
	Hefeextrakt	5 g	
	H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 1 l	
TY-Glycerin	TY (pH 7,2)	50 ml	nach dem Autoklavieren mischen
	Glycerin (≥ 99,5 %)	50 ml	

### 3.1.6 Puffer und Lösungen

Tab. 12: Puffer und Lösungen.

Pufferbezeichnung	Komponenten	Menge	Bemerkungen
Entfärber	Methanol	250 ml	
	Essigsäure	100 ml	
	H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 1 l	
Färbelösung I	Coomassie R250	0,2 g	
	Coomassie G250	0,2 g	
	Methanol	40 ml	
	Essigsäure	20 ml	
	H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 200 ml	
Färbelösung II	Coomassie R250	0,4 g	
	Coomassie G250	0,1 g	
	Ethanol	85 ml	
	Methanol	10 ml	
	Essigsäure	20 ml	
	H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 200 ml	

## MATERIAL UND METHODEN

Pufferbezeichnung	Komponenten	Menge	Bemerkungen
2 x Inkubationspuffer I	250 mM HEPES-NaOH (pH 7,4)	800 µl	FeSO <sub>4</sub> -Lösung immer frisch ansetzen
	50 mM Tris(2-Carboxyethyl)phosphin	40 µl	
	50 mM FeSO <sub>4</sub>	12 µl	
	H <sub>2</sub> O	148 µl	
2 x Inkubationspuffer II	250 mM HEPES-NaOH (pH 7,0)	800 µl	FeSO <sub>4</sub> -Lösung immer frisch ansetzen
	50 mM Tris(2-Carboxyethyl)phosphin	40 µl	
	50 mM FeSO <sub>4</sub>	100 µl	
	H <sub>2</sub> O	60 µl	
Lysepuffer	0,5 M EDTA (pH 8,0)	10 ml	autoklavieren, Lysozym und RNase frisch hinzufügen
	20 % (w/v) Glucose	22,7 ml	
	1 M Tris-HCl (pH 8,0)	12,5 ml	
	H <sub>2</sub> O	ad 500 ml	
	RNase A	0,25 mg/ml	
	Lysozym	10 mg/ml	
10 x M9-Salze	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	85,02 g	autoklavieren
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30 g	
	NaCl	5 g	
	NH <sub>4</sub> Cl	10 g	
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l	
Mevalonatlösung (Martin <i>et al.</i> , 2003)	1 M Mevanololacton	500 µl	30 min bei 37 °C inkubieren
	1 M KOH	510 µl	
NaOH/SDS	0,2 M NaOH	7,6 ml	
	20 % (w/v) SDS	0,4 ml	
1 M Natriumphosphatpuffer	1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> mit NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> titrieren bis der gewünschte pH-Wert erreicht ist, dann autoklavieren	
1 x PBS	NaCl	8 g	pH-Wert mit NaOH auf 7,4 einstellen, autoklavieren
	KCl	0,2 g	
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	1,44 g	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g	
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l	
10 x Probenpuffer	Bromphenolblau	62,5 mg	
	Glycerin (≥ 99,5 %)	50 ml	
	Xylencyanol FF	0,25 g	
	0,5 M EDTA (pH 8,0)	ad 100 ml	

<b>Pufferbezeichnung</b>	<b>Komponenten</b>	<b>Menge</b>	<b>Bemerkungen</b>
Puffer E	Desthiobiotin	8,571 mg	
	Puffer W	<i>ad</i> 10 ml	
Puffer R	HABA	7,267 mg	
	Puffer W	<i>ad</i> 30 ml	
Puffer W	50 mM TCEP	2 ml	
	1 x PBS	<i>ad</i> 100 ml	
10 x SDS- Laufpuffer	Tris	30,2 g	
	Glycin	188 g	
	20 % (w/v) SDS	100 ml	
	H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 1 l	
SDS-Laufpuffer	10 x SDS-Laufpuffer	100 ml	
	H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 1 l	
5 x SDS- Probenpuffer	0,1 % (w/v) Bromphenolblau	0,2 ml	
	87 % (v/v) Glycerin	4,6 ml	
	β-Mercaptoethanol	0,4 ml	
	10 % (w/v) SDS	1,6 ml	
	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	1 ml	
	H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 8 ml	
SMEB (Dennis und Sokol, 1995)	Saccharose	20,538 g	autoklavieren
	HEPES	52,06 mg	
	1 M MgCl <sub>2</sub>	200 µl	
	H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 200 ml	
50 x TAE	Tris	242 g	
	Essigsäure	57 ml	
	EDTA	18,6 g	
	H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 1 l	
TAE	50 x TAE	40 ml	
	H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 2 l	
TAE-Laufpuffer	10 mg/ml Ethidiumbromid	100 µl	
	50 x TAE	40 ml	
	H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> 2 l	

### 3.1.7 Carotinoid-Referenzsubstanzen

**Tab. 13:** Carotinoid-Referenzsubstanzen und ihre Herkunft.

Substanz	Herkunft
Apo-8'-carotinal	Sigma-Aldrich, Steinheim
Astaxanthin	Holger Beuttler, Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart
Canthaxanthin	Holger Beuttler, Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart
Decaprenoxanthin	Extraktion aus <i>Pseudomonas</i> sp. KK10206C
Lycopin	Extraktion aus Tomatenmark
Zeaxanthin	Extraktion aus Wolfsbeeren ( <i>Lycium barbarum</i> Linnaeus)
β-Carotin	Sigma-Aldrich, Steinheim

### 3.1.8 Antibiotika und andere Mediumszusätze

**Tab. 14:** Antibiotika und andere Mediumszusätze.

Antibiotikum/Zusatz	Abkürzung	Lösungsmittel	Endkonzentration
Ampicillin	Amp	50 % (v/v) Ethanol	100 µg/ml
Apramycin	Apr	H <sub>2</sub> O	50 µg/ml
Chloramphenicol	Cml	50 % (v/v) Ethanol	25 µg/ml
Eisenlösung	FeSO <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> O	1 – 2,5 mM
5-Fluorouracil	5-FU	DMSO	20 µg/ml
IPTG	-	50 % (v/v) Ethanol	0,1 – 1 mM
Kanamycin	Kan	H <sub>2</sub> O	50 µg/ml
L-Arabinose	Ara	H <sub>2</sub> O	0,2 % (w/v)
L-Rhamnose	Rha	H <sub>2</sub> O	0,2 % (w/v)
Nalidixinsäure	Nal	0,1 M NaOH	10, 20 oder 50 µg/ml
Streptomycin	Str	H <sub>2</sub> O	200 µg/ml
Tetracyclin	Tet	50 % (v/v) Ethanol	15 oder 20 µg/ml
Tween80®	-	H <sub>2</sub> O	0,5 % (w/v)

### 3.1.9 Kits

**Tab. 15:** Kits.

Name	Hersteller
DNeasy <sup>®</sup> Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden
GFX <sup>™</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE Healthcare, München
In-Fusion 2.0 Dry Down PCR Cloning Kit	Clontech Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
QIAprep <sup>®</sup> Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden

### 3.1.10 Chemikalien, Enzyme und sonstiges Material

**Tab. 16:** Chemikalien, Enzyme und sonstiges Material.

Firma	Produkt(e)
Difco Laboratories, Augsburg	Bacto <sup>™</sup> Agar, Bacto <sup>™</sup> Trypton, Bacto <sup>™</sup> Hefeextrakt, Bacto <sup>™</sup> Pepton
BD; Becton, Dickinson and Company, NJ USA	European Agar
Bio-Rad Laboratories, München	Bio-Rad Reagenz: Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, BSA für Kalibrierung von Proteinbestimmungen
Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf	Agarose (low electroendosmosis), PCR-Reaktionsgefäße
Carl Roth, Karlsruhe	Ammoniumacetat, Ampicillinnatriumsalz, Apramycinsulfat, APS, Borsäure, Dichlormethan, EDTA, Essigsäure, Ethanol, Ethidiumbromid, Glucose, Glycerin (≥ 99,5 %, wasserfrei), Glycin, HCl, <i>n</i> -Hexan, HPLC-Probenspritze: Exmire Microsyringe 25 µl, IPTG, Isopropanol, Kanamycinsulfat, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O, NaCl, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 1 H <sub>2</sub> O, Nalidixinsäure, NaOH, Natriumacetat · 3H <sub>2</sub> O, Roti <sup>®</sup> -Mark Standard, dNTPs: Roti Mix PCR 3, Acrylamidlösung: Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30, Saccharose, 20 % (w/v) SDS, TEMED, Tetracyclinhydrochlorid, Tris
Deliwelt, Berlin	Wolfsbeeren, getrocknet
Eppendorf, Hamburg	1,5 ml und 2,0 ml PP-Reaktionsgefäße
Eurofins MWG Operon, Ebersberg	Oligonukleotide
Fermentas, St. Leon-Rot	GeneRuler <sup>™</sup> 1 kb Plus, DreamTaq <sup>™</sup> Green DNA-Polymerase und Puffer
Finnzymes	Phusion <sup>®</sup> Hot Start DNA-Polymerase und Puffer, DMSO für PCR
Fluka, Buchs, Schweiz	Diethylether, NaHCO <sub>3</sub> , Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Tween80 <sup>®</sup> , Petroleum

Firma	Produkt(e)
Greiner Bio-One, Frickenhausen	15 ml und 50 ml PP-Zentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss
Hellma, Müllheim	Küvetten aus Quarzglas Suprasil® 10 mm Schichtdicke
IBA, Göttingen	<i>Strep-Tactin</i> ® Sepharose, 5 ml gravity flow column
Kaufland, Neckarsulm	K-Classic Tomatenmark
Merck®, Darmstadt	Aktivkohle, CaCl <sub>2</sub> , CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O, Eisen-(III)-citrat · H <sub>2</sub> O, FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O, HABA, KCl, KOH, MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O, NaBr, Na <sub>4</sub> Cl, NaF, Kieselgel 60 F <sub>254</sub>
Millipore, MA USA	Probenfilter: Millipore HV 0,45 µm Porengröße
nerbe plus, Winsen	Pipettenspitzen
New England Biolabs, Frankfurt am Main	BSA für Restriktionsverdau, Restriktionsendonukleasen und Puffer
ratiolab®, Dreieich	PS Halbmikroküvetten 10 mm Schichtdicke
Roche, Grenzach-Wyhlen	Alkalische Phosphatase, Klenow DNA-Polymerase und Puffer, Restriktionsendonukleasen und Puffer, RNase A, T4 DNA-Ligase
Sarstedt, Nümbrecht	5 ml PS-Zentrifugenröhrchen, Pipettenspitzen, Probenfilter: Filtropur S 0,2 µm Porengröße
Serva, Heidelberg	Bromphenolblau, Coomassie G250, Coomassie R250, HEPES, PEG6000, Triton® X-100, Xylencyalnlol FF
Sigma-Aldrich, Steinheim	Aceton Chromasolv®, L-(+)-Arabinose, <i>α</i> -Desthiobiotin, DMSO, 5-Fluorouracil, Lysozym, Mevanololacton, MTBE Chromasolv®, <i>n</i> -Octyl-β-D-glucopyranosid, Streptomycinsulfat, TCEP
Trentec, Rutesheim	HPLC-Trennsäule: Outstanding C <sub>18</sub> 5 µm endcapped 250 x 4,6 mm mit Vorsäule: Outstanding C <sub>18</sub> 5 µm endcapped 10 x 4,6 mm
VWR International, Darmstadt	β-Mercaptoethanol, Methanol Chromanorm, L-(+)-Rhamnose

### 3.1.11 Geräte

Tab. 17: Geräte.

Gerät	Modell, Spezifikation	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese-Kammern und Zubehör	Horizontalkammern, Füllvolumen ca. 200 oder 800 ml, Gelschlitten 8 x 8 cm oder 16 x 16 cm, Geldicke ca. 1 cm, Taschenvolumen 10 oder 20 µl	Renner, Dannstadt

Gerät	Modell, Spezifikation	Hersteller
DC-Kammern	Abmessungen (H x B x T): groß: 20 x 20 x 8 cm klein: 12 x 10,5 x 5,5 cm	Desaga, Heidelberg
DNA-Messgerät	GeneQuant Modell 80-2104-98	Amersham Pharmacia Biotech (GE Healthcare, Uppsala, Schweden)
Elektrophorese-Netzgerät	Gene Power Supply GPS 200/400	Amersham Pharmacia Biotech (GE Healthcare, Uppsala, Schweden)
Elektroporationsgerät	Gene Pulser® I	Bio-Rad Laboratories, München
Geldokumentationsanlage	IDA Gel Documentation System: Transilluminator: UVT 2035, 302 nm Dunkelkammer: IDA1_2 Digitalkamera: Computar H6Z0812M Monitor:CTM 9 Drucker: P61B	Raytest, Straubenhardt Herolab, Wiesloch Raytest, Straubenhardt CBC, Düsseldorf Hantarex, Mammelzen Mitsubishi Electric, Ratingen
Heizblock	Modell 92333	Bioblock Scientific, Frenkendorf
Hochdruckhomogenisator	EmulsiFlex®-C5	Avestin Europe, Mannheim
HPLC-Anlage	Entgaser: L7612 Gradientenpumpe: L6200A Interface Modul: D-6000A UV/Vis-Detektor: L4200 LC Organizer mit Rheodyne Injektor 7125 und 100 µl Probenschleife Software: D-7000 HPLC System Manager	Merck®-Hitachi, Darmstadt
Kühlzentrifuge	RC 5B Plus, Rotoren SS-34 und GSA (auf 4 °C temperiert)	Sorvall (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA)
Magnetrührer	IKAMAG Typ RH oder Typ KMO2	IKA Labortechnik, Staufen
Megafuge	Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau
Mikropipetten	2 – 20 µl, 20 – 200 µl, 200 – 1000 µl	Gilson International, Limburg
Mikrowelle	Typ HF1612, 700 W	Siemens, München

Gerät	Modell, Spezifikation	Hersteller
PCR-Gerät	PTC-200	MJ Research, MA USA
pH-Messgerät	pH-Meter 766	Knick, Berlin
Photometer	Ultrospec 3000	Amersham Pharmacia Biotech, Nümbrecht
Rad	Typ R-01	Rottberg Laborgeräte Glasapparatebau, Göttingen
Reagenzglasschüttler	Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Roller	TC-7	New Brunswick Scientific, Edison, NJ USA
Schüttler I	GIO Gyrotory Shaker	New Brunswick Scientific, Edison, NJ USA
Schüttler II	KS-10	Edmund Bühler, Hechingen
SDS-PAGE Kammern und Zubehör	Minigel-Twin Vertikalkammern, Glasplatten 10,5 x 9,8 cm mit 1 mm Spacern, Gelgröße 8,6 x 7,7 cm x 1mm, 10 µl Taschen-volumen	Biometra, Göttingen
Thermomixer	Typ 5350	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad	Sonorex RK100	Bandelin, Berlin
Ultraschallhomogenisator	Generator: Sonoplus HD200 Wandler: UW200 Sonotrode mit Mikrospitze Schallschutzkammer	Bandelin, Berlin
UV-Sterilisation	UV Stratalinker 1800	Stratagene, Waldbronn
Vakuumzentrifuge	Speedvac Concentrator 100H	Thermo Scientific, Karlsruhe
Waagen	R200D	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Typ W350 (65 °C) Typ WB22 (37 °C)	Memmert, Schwabach
Wasserbad	Typ1002 (42 °C, 99 °C)	GFL; Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Wasserbadschüttler	Gyrotory® Water Bath Shaker G76	New Brunswick Scientific, Edison, NJ USA
Wasserfilteranlage	Modulab® Bioscience Research Grade UF/Polishing System	Continental, Australien

### 3.2 Kultivierung von Bakterienstämmen

Abhängig von dem kultivierten Bakterienstamm und dem durchgeführten Experiment wurden unterschiedliche Kultivierungsparameter gewählt. Tab. 18 zeigt die für die verschiedenen Stämme verwendeten Medien und Kultivierungstemperaturen.

Für die Herstellung einer Vorkultur wurde ein kleines Volumen Flüssigmedium mit einer Einzelkolonie beimpft. Vorkulturen von *E. coli* und *P. ananatis* Stämmen wurden in 5 ml Medium in Glaszentrifugenröhrchen angelegt und über Nacht im Roller inkubiert. Die Vorkulturen aller anderen Stämme wurden in 5 oder 10 ml Medium in 100 ml Erlenmeyerkolben angelegt und über Nacht auf dem Schüttler mit 200 rpm inkubiert. Falls es nicht anders beschrieben wird, wurden die Vorkulturen am nächsten Tag 1:100 mit frischem Medium verdünnt und in Erlenmeyerkolben und auf dem Schüttler mit 200 rpm inkubiert. Die Größe der Kolben wurde dabei so gewählt, dass die in ihnen enthaltene Kultur nicht mehr als 1/8 des Gesamtvolumens betrug.

**Tab. 18:** Verwendete Medien und Temperaturen für die Kultivierung verschiedener Bakterienstämme.

Stamm	Medium	Temperatur
<i>Brevundimonas</i> sp. SD212	Marine Broth, Marine Agar	25 °C
<i>Escherichia coli</i>	LB, LB Agar, TB	30 °C, 37 °C
<i>Pantoea ananatis</i>	LB, LB Agar	30 °C
<i>Pseudomonas</i> sp.	LB, LB Agar	30 °C
<i>Sphingopyxis alaskensis</i> RB2256	LB, LB Agar, Marine Broth, Marine Agar	30 °C

Die Zunahme der Zelldichte in der Kultur wurde im Photometer durch die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm ( $OD_{600}$ ) gemessen. Die Induktion der Genexpression erfolgte bei bestimmten  $OD_{600}$ -Werten durch Zugabe des jeweiligen Induktors. Je nach Experiment wurden die Kulturen danach unterschiedlich lange weiter inkubiert (Tab. 19). Weitere Details zur Kultivierung sind den jeweiligen Kapiteln des Ergebnisteils zu entnehmen.

**Tab. 19:** Generelle Kultivierungsparameter für verschiedene Applikationen.

Verwendung	Kulturvolumen	Temperatur, Zeitpunkt der Probenentnahme*
SDS-PAGE	10 ml	30 °C, 5 h
Carotinoid-Synthese	12 ml, 20 ml, 50 ml, 100 ml	30 °C, ein bis zwei Tage
Doppelinduktion	20 ml, 100 ml	30 °C, über Nacht
Proteinreinigung	40 ml	30 °C, über Nacht
Ganzzellumsetzung	50 ml	30 °C, 5 h

\* bezogen auf den Zeitpunkt der Induktor-Zugabe.

### 3.3 Stammhaltung

Für eine kurzzeitige Lagerung der Stämme wurde ein Vereinzelausstrich auf einem geeigneten Agar-Nährmedium hergestellt und dieses bei der für den Stamm optimalen Temperatur inkubiert bis Kolonien gewachsen waren. Anschließend wurden die Kulturen für einige Wochen im Kühlschrank gelagert.

Für eine längere Lagerung der Stämme wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierfür wurde jeweils eine Einzelkolonie des betreffenden Stammes über Nacht in einem geeigneten Medium kultiviert (Tab. 18). *E. coli* und *P. ananatis* Stämme wurden in 5 ml Medium in Glaszentrifugenröhrchen im Roller bei 37 °C inkubiert. Alle anderen Stämme wurden in 10 ml Medium in 100 ml Erlenmeyerkolben auf dem Schüttler bei 30 °C und 200 rpm kultiviert. 2 - 3 ml der Kulturen wurden am nächsten Morgen zentrifugiert (Glaszentrifugenröhrchen, Megafuge, 5 min, 4.500 rpm), der Überstand verworfen und die Zellen in 1 ml TY-Glycerin resuspendiert. Die Suspension wurde auf zwei Reaktionsgefäße mit Schraubdeckel verteilt und jeweils bei -70 °C und -20 °C gelagert.

## 3.4 Transformationsmethoden

### 3.4.1 Chemische Transformation von *Escherichia coli* (Chung *et al.*, 1989)

Der zu transformierende *E. coli* Stamm wurde aus einer Vorkultur 1:100 in LB umgesetzt und auf dem Schüttler bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Sobald die Kultur eine OD<sub>600</sub> von 0,25 – 0,3 erreicht hatte, wurden die Zellen durch Zentrifugation (Kühlzentrifuge, Rotor SS-34, 10 min, 4.500 rpm) sedimentiert und in kaltem TSS (Tab. 11) resuspendiert (1/20 Volumen der Ausgangskultur). Jeweils 200 µl der Zellsuspension wurden mit 20 µl Ligationsansatz oder 1 – 5 µl Plasmid-DNA gemischt und für mindestens 30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Ansätze für 90 s bei 42 °C im Wasserbad inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurde die Zellsuspension in ein Glaszentrifugenröhrchen mit 2 ml LB pipettiert und dieses dann 1 h bei 37 °C im Roller inkubiert. Jeweils 100 µl der Zellsuspension wurden danach auf einem geeigneten Selektivmedium ausplattiert. Falls erforderlich, wurden die Zellen des restlichen Transformationsansatzes durch Zentrifugation (Megafuge, 5 min, 4.500 rpm) sedimentiert, in 100 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und ebenfalls auf dem verwendeten Selektivmedium ausplattiert.

### 3.4.2 Elektroporation von *Pseudomonas sp.* (Dennis und Sokol, 1995)

Eine Vorkultur wurde 1:25 in frisches Medium umgesetzt und bei 30 °C auf dem Schüttler mit 200 rpm inkubiert. Sobald die Kultur eine OD<sub>600</sub> von 0,7 - 0,8 erreicht hatte, wurden  $9 \times 10^9$  Zellen durch Zentrifugation (Megafuge, 5 min, 4.500 rpm) geerntet. Die Zellen wurden dreimal mit jeweils 1 ml SMEB (Tab. 12) gewaschen (zwischen durch Zentrifugation; Tischzentrifuge, 5 min, 6.000 rpm) und anschließend in 600 µl SMEB resuspendiert. 30 oder 50 µl der Zellsuspension wurden dann mit 5 – 10 µl DNA gemischt und in eine sterile Elektroporationsküvette überführt. Die Küvette wurde für 30 min auf Eis inkubiert, dann erfolgte die Elektroporation (Geräteeinstellungen: 25 µF, 200 Ω, 2,5 kV). Anschließend wurde sofort 1 ml LB in die Küvette pipettiert, die Suspension in ein Glaszentrifugenröhrchen überführt und für 2 h bei 30 °C im Roller inkubiert. 100 µl der Kultur wurden dann auf einem geeigneten Selektivmedium ausplattiert. Falls erforderlich, wurden die

Zellen des restlichen Ansatzes durch Zentrifugation (Tischzentrifuge, 5 min, 6.000 rpm) sedimentiert, in 100 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und auf dem gleichen Selektivmedium ausplattiert.

### **3.5 Konjugation von *Escherichia coli* S17-1 mit *Escherichia coli* JM109 oder *Pseudomonas* sp.**

Zunächst wurde *E. coli* S17-1 (Simon *et al.*, 1983) mit dem zu übertragenden Plasmid chemisch transformiert (siehe Kapitel 3.4.1). Die transformierten *E. coli* S17-1 Stämme (Donorstämme) und die Rezipientenstämme, die das jeweilige Plasmid durch Konjugation mit den *E. coli* S17-1 Stämmen erhalten sollten, wurden über Nacht in 5 oder 10 ml Medium kultiviert. Morgens wurden jeweils  $5 \times 10^9$  Zellen durch Zentrifugation (Megafuge, 5 min, 4.500 rpm) geerntet und in 1 ml 0,9 % (w/v) NaCl resuspendiert. Jeweils 100 µl Donor- und Rezipientensuspension wurden gemischt und auf LB Agar getropft. Für die Durchführung der Kontrollen wurden 50 µl Donor- und Rezipientensuspension einzeln auf LB Agar getropft. Die Platten wurden dann über Nacht bei 30°C inkubiert. Der Zellrasen auf den Konjugationsplatten wurde am nächsten Tag mit 5 ml 0,9 % (w/v) NaCl abgeschwemmt und die erhaltene Suspension auf  $1 \times 10^9$  Zellen/ml verdünnt. Von dieser verdünnten Suspension ausgehend wurde dann eine Verdünnungsreihe mit 0,9 % (w/v) NaCl angelegt. Jeweils 100 µl einer geeigneten Verdünnungsstufe wurden auf die Selektivmedien ausplattiert. Zur Kontrolle wurde etwas Zellmasse von der Platte mit den einzeln aufgetropften Donor- und Rezipientenstämmen auf jedes der verwendeten Selektivmedien ausgestrichen. Die Platten wurden dann für 1 – 2 Tage bei 30 oder 37 °C inkubiert.

## 3.6 Zellaufschlussmethoden

### 3.6.1 Zellaufschluss mit dem Ultraschallhomogenisator

Für den Zellaufschluss mit dem Ultraschallhomogenisator wurden  $5 \times 10^9$  bis  $1 \times 10^{10}$  Zellen pro Ansatz verwendet. Die Zellen wurden einmal mit 0,5 bzw. 1 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) gewaschen, zentrifugiert (Tischzentrifuge, 5 min, 13.000 rpm) und danach mit 0,5 ml des gleichen Puffers überschichtet. Die Zellen wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgeschlossen (Geräteeinstellungen: Power: MS73/D, Cycle: 50, 30 s, timed output). Während des Zellaufschlusses befand sich die Probe in Eiswasser. Die Behandlung der Probe mit Ultraschall erfolgte zweimal hintereinander, wobei eine Pause zwischen den beiden Durchgängen eingelegt wurde. Während der Pause wurde die Probe zwecks Abkühlung auf Eis gelagert.

### 3.6.2 Zellaufschluss mit dem Hochdruckhomogenisator

Für den Zellaufschluss mit dem Hochdruckhomogenisator wurden 40 ml Zellkultur verwendet. Die Zellen wurden einmal mit 10 ml 1 x PBS (Tab. 12) mit 1 mM TCEP gewaschen und dann in 10 ml des gleichen Puffers resuspendiert. Der Hochdruckhomogenisator wurde vor dem Zellaufschluss in eine Wanne mit Eis gestellt und vorgekühlt. Nachdem das Gerät mit 70 % (v/v) Ethanol, H<sub>2</sub>O und dem verwendeten Puffer gespült worden war, wurde die Zellsuspension eingefüllt. Der Zellaufschluss erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (Druck ca. 17.000 psi bzw. 125 MPa).

## 3.7 Zelltrockenmassebestimmung

Für die Bestimmung der Zelltrockenmasse wurde eine Vorkultur des jeweiligen Stammes 1:100 in frisches Medium (Tab. 20) umgesetzt und auf dem Schüttler bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Bei *E. coli* und *P. putida* Stämmen wurde die Genexpression bei OD<sub>600</sub>-Werten von 0,2 - 0,6 mit 0,2 % (w/v) L-Rhamnose induziert.

Die Kulturen wurden anschließend über Nacht weiter inkubiert. Am nächsten Tag wurde zunächst die OD<sub>600</sub> der Kultur gemessen. Anschließend wurden drei bis vier Parallelproben (jeweils 10 ml) aus der Kultur entnommen und in PP Zentrifugenröhrchen (15 ml) überführt. Die Proben wurden zentrifugiert (Megafuge, 20 min, 4.500 rpm), die Überstände verworfen und die Zellen in 1 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert. Nach der Überführung der Proben in PS-Zentrifugenröhrchen (5 ml) wurden die PP-Zentrifugenröhrchen zweimal mit 1 ml und zweimal mit 0,5 ml H<sub>2</sub>O gespült, wobei unter Verwendung derselben Pipettenspitze nach jedem Durchgang das Spülwasser zu der jeweiligen Probe in das PS-Zentrifugenröhrchen mit der Zellsuspension pipettiert wurde. Die Proben wurden dann erneut zentrifugiert (Megafuge, 20 min, 4.500 rpm) und die Überstände verworfen.

Die Trocknung der Proben erfolgte durch Calciumchlorid im Exsikkator bis zur Massenkonstanz (ca. 1 Woche). Die PS-Zentrifugenröhrchen mit den getrockneten Zellen wurden gewogen und die Differenz zum Leergewicht des jeweiligen PS-Zentrifugenröhrchens berechnet. Von den erhaltenen Messwerten der Parallelproben wurde der arithmetische Mittelwert berechnet. Die Mittelwerte der Zelltrockenmassen der Proben wurden dann mit der gemessenen OD<sub>600</sub> in Beziehung gesetzt und auf ein Volumen von 1 l bezogen. Tab. 20 zeigt die Ergebnisse der Zelltrockenmassebestimmung für verschiedene Stämme.

**Tab. 20:** Zelltrockenmassen von verschiedenen Bakterienstämmen.

Bakterienart	Stamm	Medium	Zelltrockenmasse (g/l/OD <sub>600</sub> )
<i>Escherichia coli</i>	JM109 pJOE5573.3	LB mit 0,46 % (v/v) Glycerin, 46 mM NaPP (pH 7,8) und 50 µg/ml Kanamycin	0,380
<i>Pseudomonas putida</i>	D8L1 pJH14.1	LB mit 0,2 % (w/v) Glucose und 50 µg/ml Kanamycin	0,496
<i>Pseudomonas putida</i>	E3L2 pJH14.1	LB mit 0,2 % (w/v) Glucose und 50 µg/ml Kanamycin	0,490
<i>Sphingopyxis alaskensis</i>	Wildtyp	LB	0,441

## 3.8 Methoden DNA

### 3.8.1 Agarose-Gelelektrophorese (Sharp *et al.*, 1973)

Für die Herstellung eines Agarosegels wurde die Agarose durch aufkochen in der Mikrowelle in TAE (Tab. 12) gelöst (0,8 oder 1,2 % (w/v) Agarose). Zum Anfärben der DNA wurde Ethidiumbromid hinzugefügt (Endkonzentration im Agarosegel 0,17 - 0,2 µg/ml). Nach dem Mischen auf dem Magnetrührer wurde die Lösung in einen Gelschlitten mit Auslaufsperrern und Probenkamm gegossen. Nachdem das Gel erstarrt war, wurden der Kamm und die Auslaufsperrern wieder entfernt und das fertige Gel in die mit TAE-Laufpuffer (Tab. 12) gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt. Die Proben wurden mit 1/10 Volumen 10 x Probenpuffer (Tab. 12) gemischt und anschließend in die Taschen pipettiert. Zur Größenbestimmung der Proben-DNA wurden bei jedem Lauf 3 µl DNA-Standard mit aufgetragen (GeneRuler™ 1 kb Plus). Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 6 – 8 V/cm Gel. Nach dem Lauf erfolgte die Dokumentation über UV-Licht mittels Photographie (Geldokumentationsanlage, Tab. 17).

### 3.8.2 PCR (Mullis *et al.*, 1986)

#### 3.8.2.1 Amplifikation von DNA für Klonierungen

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten, die für Klonierungen verwendet werden sollten, wurde die Phusion® Hot Start DNA-Polymerase benutzt. Tab. 21 zeigt die Komponenten des PCR-Ansatzes. Das jeweilige PCR-Profil wurde nach dem Prinzip in Tab. 22 erstellt. Die Berechnung der Schmelztemperatur der Oligonukleotide erfolgte nach der Wallace-Regel (Brown *et al.*, 1981) (Formel 1), wobei nur die zur Matrize komplementären, zusammenhängenden Nukleotide für die Berechnung herangezogen wurden.

$$\text{(Formel 1)} \quad T_m = 2^\circ\text{C (A/T)} + 4^\circ\text{C (G/C)}$$

**Tab. 21:** Zusammensetzung von PCR-Ansätzen für Amplifikationen mit der Phusion® Hot Start DNA-Polymerase.

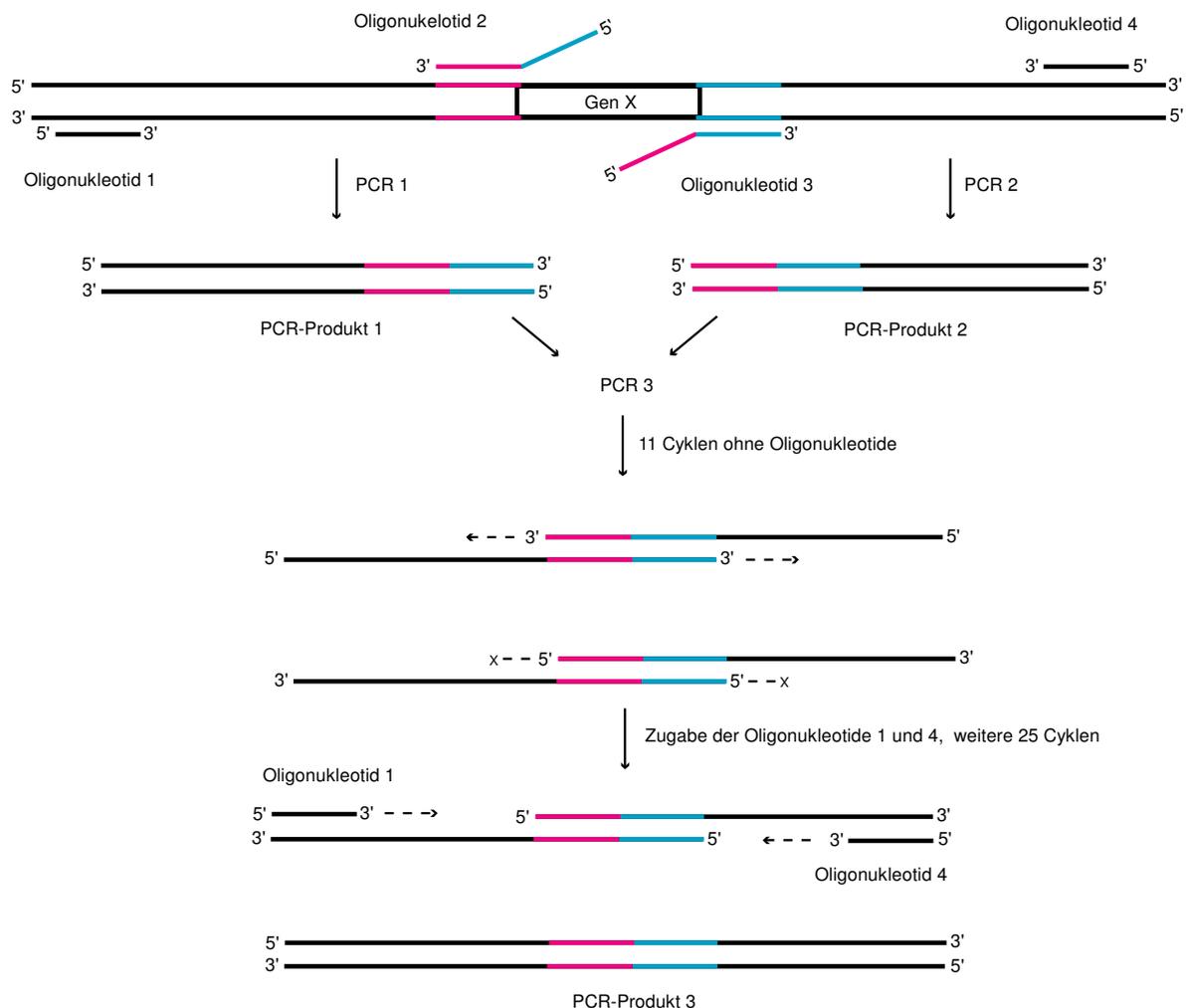
Komponente	Menge
Matrizen-DNA	Plasmid-DNA ca. 4 ng, chromosomale DNA ca. 100 ng
Oligonukleotide (100 pmol/μl)	0,5 μl (EK 1 pmol/μl)
5 x HF- oder GC-Puffer	10 μl
dNTPs (10 mM pro dNTP)	1 μl (EK 0,2 mM pro dNTP)
DMSO	0 – 5 μl (0 – 10 % (v/v) im fertigen PCR-Ansatz)
Phusion® Hot Start DNA-Polymerase	0,5 μl (1 U)
H <sub>2</sub> O	ad 50 μl

**Tab. 22:** PCR-Profil für Amplifikationen mit der Phusion® Hot Start DNA-Polymerase.

Nr.	Synthese-Schritt	Temperatur	Dauer
1	erste Denaturierung	98 °C	30 s
2	Denaturierung	98 °C	10 s
3	Annealing	$T_m - 5$ °C	20 s
4	Elongation	72 °C	30 s/kb
5	weiter mit Nr. 2	-	25 x
6	letzte Elongation	72 °C	7 min
7		4 °C	bis zur Weiterbearbeitung

### 3.8.2.2 *Overlap Extention PCR (Higuchi et al., 1988)*

Die Overlap Extention PCR wurde angewendet, um aus einer Ziel-DNA ein Fragment definierter Länge zu deletieren. Abb. 14 zeigt das Prinzip dieser Methode. Zunächst werden in zwei separaten PCRs (PCR 1 und 2) die beiden Sequenzabschnitte amplifiziert, die das zu deletierende Gen unmittelbar flankieren (jeweils ca. 800 bp). Die Oligonukleotide 2 und 3 haben an ihren 5'-Enden 19 zusätzliche Nukleotide. Die Nukleotidfolge entspricht dabei der Sequenz der Matrizen-DNA, die direkt hinter dem zu deletierenden Abschnitt beginnt. Die PCR-Fragmente 1 und 2 weisen dadurch eine 38 Nukleotide umfassende Homologie zueinander auf. Es kann darüber hinaus sinnvoll sein, die Nukleotide des Start- und Stoppcodons des zu deletierenden Gens zu erhalten oder zusätzlich noch eine Restriktionschnittstelle einzufügen, dementsprechend müssen die Oligonukleotide 2 und 3 gestaltet werden.



**Abb. 14:** Prinzip der Gendeletion durch Overlap Extension PCR. Zunächst werden die flankierenden Sequenzen des zu deletierenden Gens (Gen X) amplifiziert (PCR 1 und 2). Bedingt durch das Design der Oligonucleotide 2 und 3 sind die PCR-Produkte 1 und 2 über einen terminalen Sequenzbereich zueinander homolog. Die PCR-Produkte 1 und 2 dienen dann als Matrizen in PCR 3, welche zunächst 11 Cyclen ohne Oligonucleotide 1 und 4 durchläuft. Dabei kommt zu einer Zusammenlagerung der homologen Sequenzen der beiden Matrizen und zur Elongation der freien 3'-OH-Enden durch die Polymerase. Die Zugabe der Oligonucleotide 1 und 4 ermöglicht die Amplifikation dieser neuen Matrize und die Vervollständigung von Fragmenten ohne freie 3'-OH-Enden.

Während der PCR 3 dienen PCR 1 und 2 als Matrize. Die PCR 3 wird zunächst ohne Oligonucleotide gestartet und 11 Cyclen laufen gelassen. In dieser Zeit wird die neue Matrize hergestellt. Die homologen Bereiche der beiden PCR-Matrizen 1 und 2 lagern sich beim Annealing-Schritt aneinander. Fragmente mit freien 3'-OH-Enden können nun durch die Polymerase verlängert werden, wodurch eine neue Matrize entsteht. Nach den ersten 11 Cyclen werden die Oligonucleotide 1 und 4

hinzugegeben. Mit ihrer Hilfe kann die hergestellte Matrize amplifiziert werden. Außerdem können mit den beiden Oligonukleotiden auch zusammengelagerte Stränge ohne freie 3'-OH-Enden vervollständigt werden.

Für Overlap Extension PCRs wurde die Phusion<sup>®</sup> Hot Start Polymerase verwendet. Die PCR-Produkte 1 und 2 wurden zunächst mit dem GFX<sup>™</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit gereinigt, bevor jeweils 0,5 µl als Template für PCR 3 eingesetzt wurden. Für den Annealing-Schritt wurde die Schmelztemperatur der Oligonukleotide 1 und 2 verwendet. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze und das PCR-Profil entsprachen, bis auf die erläuterten Besonderheiten, denen in Tab. 21 und Tab. 22.

### 3.8.2.3 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR wurde angewendet, um den Genotyp bestimmter Stämme zu verifizieren. Die zu testenden Klone wurden hierfür strichförmig auf Selektiv-Agar ausgestrichen (ca. 1 cm) und über Nacht bebrütet. Die gewachsenen Zellen wurden mit einer sauberen, sterilen Impföse von der Platte gekratzt und in jeweils 100 µl H<sub>2</sub>O in 1,5 ml Reaktionsgefäßen suspendiert. Die Ansätze wurden dann für 10 min im Wasserbad bei 99 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden die Zellen durch Zentrifugation (Tischzentrifuge, 5 min, 13.000 rpm) sedimentiert und die Überstände als Matrize für die PCR eingesetzt. Für die PCR wurde die DreamTaq<sup>™</sup> DNA-Polymerase benutzt. Tab. 23 und Tab. 24 zeigen die Zusammensetzung der PCR-Ansätze und das PCR-Profil.

**Tab. 23:** Zusammensetzung von PCR-Ansätzen für Amplifikationen mit der DreamTaq<sup>™</sup> DNA-Polymerase.

Komponente	Menge
Matrizen-DNA	10 µl Überstand der gekochten Zellsuspension
Oligonukleotide (100 pmol/µl)	0,5 µl (EK 1 pmol/µl)
10 x DreamTaq <sup>™</sup> Green Buffer	5 µl
dNTPs (10 mM pro dNTP)	1 µl (EK 0,2 mM pro dNTP)
DMSO	0 – 5 µl (0 – 10 % (v/v) im fertigen PCR-Ansatz)
DreamTaq <sup>™</sup> DNA Polymerase	0,5 µl (2,5 U)
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

**Tab. 24:** PCR-Profil für Amplifikationen mit der DreamTaq™ DNA-Polymerase.

Nr.	Synthese-Schritt	Temperatur	Dauer
1	erste Denaturierung	95 °C	2 min
2	Denaturierung	95 °C	30 s
3	Annealing	$T_m - 5$ °C	30 s
4	Elongation	72 °C	1 min/kb
5	weiter mit Nr. 2	-	25 - 35 x
6	letzte Elongation	72 °C	7 min
7		4 °C	bis zur Weiterbearbeitung

### 3.8.3 Plasmidisolierung (Lee und Rasheed, 1990, modifiziert)

Abhängig von der Kopienzahl des zu isolierenden Plasmids wurden entweder 2 oder 5 ml Bakterienkultur abzentrifugiert (Megafuge, 5 min, 4.500 rpm), das Zellsediment in 200 µl Lysepuffer (Tab. 12) resuspendiert und für 5 bis 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 300 µl NaOH/SDS (Tab. 12) hinzugefügt, der Ansatz gemischt und für 5 bis 10 min bei RT inkubiert bis die Lösung klar wurde. Es folgte die Zugabe von 400 µl 7,5 M Ammoniumacetat und erneutes Mischen. Das entstehende weiße Präzipitat wurde durch Zentrifugation (Tischzentrifuge, 10 min, 13.000 rpm) sedimentiert, der klare Überstand abpipettiert, mit 600 µl Isopropanol gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Die ausgefallene Plasmid-DNA wurde durch Zentrifugation (Tischzentrifuge, 10 min, 13.000 rpm) sedimentiert und der Überstand verworfen. Die Plasmid-DNA wurde mit 100 µl 70 % (v/v) Ethanol überschichtet und der Ansatz erneut zentrifugiert (Tischzentrifuge, 3 min, 13.000 rpm). Der Überstand wurde verworfen, die Plasmid-DNA mit 100 µl 99,8 % (v/v) Ethanol überschichtet und der Ansatz wieder zentrifugiert (Tischzentrifuge, 3 min, 13.000 rpm). Der Überstand wurde verworfen und die Probe bei RT getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde dann in 30 – 50 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

### **3.8.4 Plasmidisolierung mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit**

Die Präparation von Plasmid-DNA mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit (Tab. 15) aus *E. coli* Stämmen erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die DNA wurde jedoch meistens mit H<sub>2</sub>O anstelle von dem mitgelieferten Puffer von der Säule eluiert.

Für Plasmidpräparationen aus *Pseudomonas* sp. wurde der Puffer P1 mit 10 mg/ml Lysozym versetzt und die Zellen nach der Zugabe des modifizierten Puffers P1 für 10 bis 15 min bei 37 °C inkubiert, bevor nach dem Protokoll des Herstellers weiterverfahren wurde.

### **3.8.5 Isolierung von chromosomaler DNA**

Für die Isolierung chromosomaler DNA wurde das DNeasy® Blood & Tissue Kit (Tab. 15) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet.

### **3.8.6 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten**

Für die Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten wurde das GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Tab. 15) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet.

### **3.8.7 Isopropanol-Fällung**

Die zu fällende DNA wurde zunächst mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 6,3) versetzt. Danach wurde 1 Volumen Isopropanol hinzugefügt. Der Ansatz wurde gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Die ausgefallene DNA wurde dann durch Zentrifugation (Tischzentrifuge, 10 min, 13.000 rpm) sedimentiert und der Überstand verworfen. Die DNA wurde mit 100 µl 70 % (v/v) Ethanol überschichtet und zentrifugiert (Tischzentrifuge, 3 min, 13.000 rpm). Der Überstand wurde verworfen, die DNA mit 100 µl 99,8 % (v/v) Ethanol überschichtet und er-

neut zentrifugiert (Tischzentrifuge, 3 min, 13.000 rpm). Der Überstand wurde verworfen, die DNA bei RT getrocknet und in einem geeigneten Volumen H<sub>2</sub>O gelöst.

### **3.8.8 Restriktionsverdau**

Etwa 0,2 – 0,5 µg DNA wurden mit 5 bis 20 U Restriktionsendonuklease verdaut. Die Restriktionsansätze hatten ein Gesamtvolumen von 20, 50 oder 100 µl und enthielten 1/10 Volumen des entsprechenden 10 x Restriktionspuffers. Bei einem Doppelverdau mit zwei Enzymen, die unterschiedliche Puffer benötigen, wurde die DNA zwischen den einzelnen Reaktionen einer Isopropanol-Fällung unterzogen. Die Inkubation der Restriktionsansätze erfolgte bei der für die jeweilige Restriktionsendonuklease optimalen Temperatur für mindestens eine Stunde.

### **3.8.9 Modifikation von DNA-Enden**

#### *3.8.9.1 Dephosphorylierung*

Für die Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden wurde die alkalische Phosphatase aus Kälberdarm benutzt. Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl. Die DNA wurde mit H<sub>2</sub>O und 2 µl 10 x Reaktionspuffer versetzt. Danach wurde 1 µl (1 U) alkalische Phosphatase hinzugefügt und der Ansatz für 1 h bei 37 °C inkubiert.

#### *3.8.9.2 Klenow-Behandlung (Klenow und Henningsen, 1970)*

Die Klenow-Behandlung von DNA-Enden fand in einem Reaktionsvolumen von 20 µl statt. Die DNA wurde mit H<sub>2</sub>O, 2 µl 10 x Puffer B (Puffer für Restriktionsendonukleasen, Roche) und, falls es sich um 5'-DNA-Überhänge handelte, 2 µl dNTPs (EK pro dNTP 1 mM) auf ein Volumen von 19 µl gebracht. Dann wurde 1 µl (2 U) Klenow Enzym hinzupipettiert und der Ansatz für 10 min bei 37°C inkubiert.

### **3.8.10 Ligation von DNA-Fragmenten**

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden mit H<sub>2</sub>O und 2 µl 10 x Ligasepuffer auf ein Volumen von 19 µl gebracht. Anschließend wurde 1 µl (1 U) T4 DNA-Ligase hinzupipettiert und der Ansatz über Nacht im Kühlschrank (ca. 8 °C) inkubiert.

### **3.8.11 DNA-Sequenzierung**

DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma GATC Biotech, Konstanz durchgeführt. Für die Sequenzierung von pJOE4786.1-Derivaten wurden die Oligonukleotide SP6 und T7 (Tab. 10) verwendet. Für die Sequenzierung von pJOE5751.1-Derivaten wurden die Oligonukleotide T7 und S4417 verwendet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der GATCViewer<sup>TM</sup> (GATC Biotech, Konstanz) und der Clone Manager Basic 8 Software (Sci-Ed Software, Cary, NC USA).

### **3.8.12 DNA-Quantifizierung**

Die Quantifizierung von DNA erfolgte mit Hilfe des GeneQuant. Die Messung der Extinktion der Testlösung erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Das Messvolumen betrug 200 µl. Für eine DNA-Lösung mit einem DNA-Gehalt von 50 µg/ml wurde ein theoretischer Extinktionswert von 1 zugrunde gelegt. Der DNA-Gehalt der Testlösung wurde mit Hilfe der experimentell ermittelten Extinktion berechnet.

### **3.8.13 Herstellung von pJH79 durch Sequenzaustausch mit dem Lambda-Red System (Datsenko und Wanner, 2000)**

Das Lambda-Red System wurde benutzt, um das Tetracyclin-Resistenzgen und den pBBR1MCS-2 Replikationsursprung von pJH77 (Tab. 9) gegen das Kanamycin-Resistenzgen und den Replikationsursprung von pACYC177 auszutauschen. Hierfür wurde zunächst die entsprechende Sequenz von pACYC177 mittels PCR amplifiziert. Die für die PCR verwendeten Oligonukleotide S6757 und

S6758 (Tab. 10) enthalten neben der für die Amplifikation der Sequenz benötigten Nukleotidfolge an ihren 5'-Enden 40 zusätzliche Nukleotide, die zu jenen Sequenzbereichen von pJH77 komplementär sind, welche die auszutauschende Sequenz unmittelbar flankieren. Für den eigentlichen Fragmentaustausch durch homologe Rekombination wurde der Stamm *E. coli* WA66.1  $\Delta xthA$  pJOE6038.1 mit pJH77 chemisch transformiert. pJOE6038.1 enthält die Lambda-Red Gene und *recA*. Die Expression der Lambda-Red Gene steht unter der Kontrolle eines L-Arabinose-induzierbaren Promotors, *recA* wird konstitutiv exprimiert. Die Replikation von pJOE6038.1 ist temperatursensitiv. Der Stamm *E. coli* WA66.1  $\Delta xthA$  pJOE6038.1/pJH77 wurde in LB mit 15  $\mu\text{g/ml}$  Tetracyclin und 25  $\mu\text{g/ml}$  Chloramphenicol für drei Stunden bei 30 °C kultiviert. Die Expression der Lambda-Red-Gene von pJOE6038.1 wurde dann mit 0,2 % (w/v) L-Arabinose induziert und die Kultur danach noch eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Das PCR-Fragment mit dem Kanamycin-Resistenzgen und dem Replikationsursprung von pACYC177 wurde dann mittels Elektroporation in die Zellen eingebracht. Durch die Aktivität der Red-Proteine und RecA wurden in einigen pJH77 Plasmiden das Resistenzgen und der Replikationsursprung durch homologe Rekombination mit den terminalen Sequenzen des PCR-Produktes ausgetauscht. Diese Plasmide wurden durch Kultivierung auf Kanamycin-haltigem Medium selektiert. Durch die Kultivierung bei 37 °C wurde die Replikation von pJOE6038.1 gehemmt. Die Klone, die pJOE6038.1 verloren hatten konnten aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber Chloramphenicol identifiziert werden. Aus einem Kanamycin-resistenten und Chloramphenicol-sensitiven Klon wurde das Plasmidgemisch isoliert und mit diesem dann *E. coli* JM109 transformiert. Es folgte eine erneute Selektion auf die Kanamycin-Resistenz. Aus einem Klon wurde dann das Plasmid mit der neuen Resistenz und dem neuen Replikationsursprung isoliert ( $\rightarrow$ pJH79).

## 3.9 Methoden Proteine

### 3.9.1 SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

Für die SDS-PAGE wurden zunächst die Glasplatten mit H<sub>2</sub>O und 99,8 % (v/v) Ethanol gereinigt. Zwischen die beiden Glasplatten wurde eine Dichtung eingelegt und diese mit Klammern fixiert. Dann wurde das Trenngel (Tab. 25) gegossen (6,5 cm Füllhöhe, gemessen vom unteren Rand) und mit 1 ml Isopropanol überschichtet. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde das Isopropanol entfernt, der verbleibende Hohlraum zwischen den Glasplatten mit H<sub>2</sub>O gespült und mit Zellstoff getrocknet. Anschließend wurde das Sammelgel (Tab. 25) gegossen und der Probenkamm eingesetzt. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde der Probenkamm wieder entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Pufferkammern der Elektrophorese-Apparatur wurden mit SDS-Laufpuffer (Tab. 12) gefüllt und die Probenaschen des Gels mit Puffer gespült.

Die Proben wurden mit 1/5 Volumen 5 x SDS Probenpuffer (Tab. 12) gemischt und für 10 min bei 95 °C im Heizblock inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden 2 – 10 µl in die Probenaschen pipettiert. Zur Größenbestimmung der Proteine wurde bei jedem Lauf 5 µl Proteinstandard (Roti<sup>®</sup>-Mark Standard) mit aufgetragen.

Zunächst wurde eine Stromstärke von 10 mA pro Gel angelegt. Sobald die Bromphenolblau-Bande in das Trenngel übergang, wurde die Stromstärke auf 20 mA pro Gel erhöht. Nachdem die Bromphenolblau-Bande gerade aus dem Gel herausgelaufen war, wurde dieses aus der Apparatur genommen und das Sammelgel mit einem Skalpell abgeschnitten. Das Trenngel wurde in Färbelösung I oder II (Tab. 12) überführt und für 45 bis 60 min auf dem Schüttler II inkubiert. Danach wurde die Färbelösung durch Entfärber (Tab. 12) ausgetauscht und das Gel wieder auf dem Schüttler II inkubiert. Der Entfärber wurde mehrfach gewechselt, bis der Hintergrund des Gels ausreichend entfärbt war und die angefärbten Proteinbanden gut sichtbar waren. Danach wurde das Gel in 7 % (v/v) Essigsäure überführt. Der Entfärber wurde mit Aktivkohle von den Coomassie-Farbstoffen gereinigt, filtriert und wiederverwendet.

**Tab. 25:** Zusammensetzung von SDS-Gelen (Mengenangaben für zwei Gele).

Komponenten	Trenngel 12 %*	Sammelgel 4 %*
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	5,0 ml	-
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	-	1,25 ml
10 % (w/v) SDS	0,2 ml	50 µl
Rotiphorese® Gel 30	8,0 ml	0,67 ml
10 % (w/v) Ammoniumpersulfat	0,2 ml	50 µl
TEMED	8 µl	5 µl
H <sub>2</sub> O	6,6 ml	3,0 ml

\* % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid

### 3.9.2 Proteinreinigung mit *Strep-Tactin*® Sepharose

Für die Aufreinigung von *Strep Tag*®II (Skerra und Schmidt, 1999) Fusionsproteinen wurden 40 ml Zellkultur verwendet. Die Zellen wurden zunächst durch Zentrifugation sedimentiert (Megafuge, 5 min, 4.500 rpm), einmal mit 10 ml Puffer W (Tab. 12) gewaschen und anschließend in 10 ml Puffer W resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Hochdruckhomogenisator (siehe Kapitel 3.6.2). Das erhaltene Zellhomogenat wurde zentrifugiert (Kühlzentrifuge, Rotor SS-34, 15 min, 15.000 rpm), der Überstand (Protein-Rohextrakt) abpipettiert und für die Aufreinigung verwendet. Hierfür wurde eine 5 ml Säule mit 2 ml *Strep-Tactin*® Sepharose (5 mg/ml Sepharose) gefüllt. Die Matrix wurde zunächst mit 10 ml Puffer W äquilibriert. Dann wurde der Protein-Rohextrakt in 2 ml Schritten auf die Säule gegeben. Die Säule wurde danach fünfmal mit jeweils 2 ml Puffer W gewaschen. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte in sechs Schritten mit jeweils 1 ml Puffer E (Tab. 12). Die Regeneration der Säule erfolgte mit 10 ml Puffer R (Tab. 12). Nach dem Protokoll des Herstellers wird Puffer R durch waschen mit Puffer W wieder von der Säule entfernt. Die verwendeten, in ihrer Zusammensetzung von dem Protokoll des Herstellers abweichenden Puffer führten aber zu einer veränderten Bindung von HABA an die Sepharose-Matrix, welches durch das Waschen mit Puffer W nicht vollständig entfernt werden konnte (Die Sepharose-Matrix blieb leicht gelblich gefärbt). Daher wurde ein zusätzlicher Waschschrift mit 10 ml 0,5 M NaOH durchgeführt. Dies ermöglichte die

vollständige Entfernung von HABA. Die Säule wurde anschließend mit 20 ml Puffer W reäquilibriert. Die verschiedenen Fraktionen (Durchflussfraktionen, Waschfraktionen, Elutionsfraktionen) wurden aufgefangen und für Proteinquantifizierungen, SDS-PAGE und Carotinoid-Umsetzungen verwendet.

### 3.9.3 Proteinquantifizierung (Bradford, 1976)

Um den unbekanntem Proteingehalt in einer Testlösung bestimmen zu können, wurde zunächst eine Kalibriergerade mit BSA angefertigt. Hierfür wurde eine BSA-Lösung mit bekanntem Proteingehalt (1,38 mg/ml) eingesetzt. Die Lösung wurde 1:10 verdünnt und von dieser Verdünnung wurden jeweils 10, 20, 30, 40 und 50 µl für die Proteinbestimmung eingesetzt. Die fünf Ansätze wurden mit H<sub>2</sub>O auf 800 µl aufgefüllt und gemischt. Außerdem wurde eine Probe ohne Protein angefertigt (800 µl H<sub>2</sub>O). Die Proben wurden dann nacheinander mit jeweils 200 µl Bio-Rad Reagenz versetzt, gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Extinktion im Photometer bei 595 nm. Die Messungen erfolgten jeweils dreifach, von den erhaltenen Messwerten wurde der arithmetische Mittelwert berechnet. Von den Mittelwerten der Kalibrierlösungen wurde jeweils der Mittelwert von der Probe ohne Protein subtrahiert und die Differenzen dann gegen die Proteingehalte graphisch aufgetragen (Abb. 15). Mit Hilfe der Geradengleichung der Ausgleichsgeraden wurde die Formel 2 für die Berechnung des Proteingehaltes einer Testlösung abgeleitet.

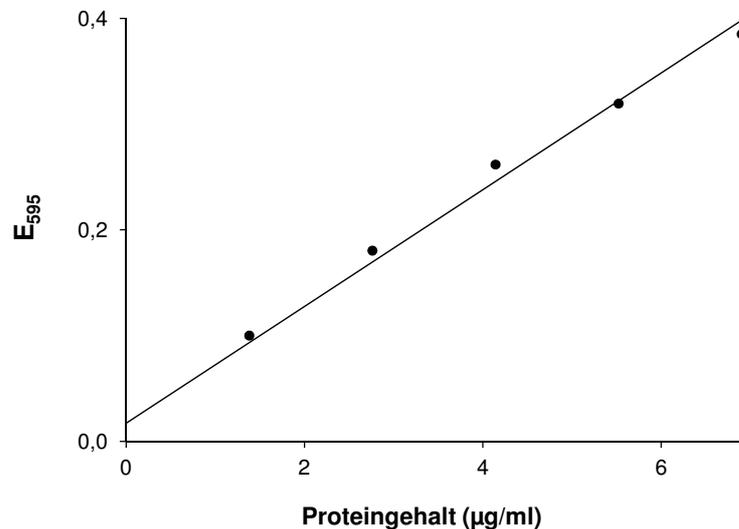
$$\text{(Formel 2)} \quad y = 17,958 x - 0,2793$$

$$y = \text{Proteingehalt } (\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$$

$$x = \text{Extinktion bei 595 nm}$$

Für die Bestimmung des Proteingehaltes einer Testlösung wurden die Ansätze nach dem oben beschriebenen Prinzip angefertigt. Das eingesetzte Probenvolumen wurde dabei so gewählt, dass die Extinktion bei 595 nm im Bereich der Kalibriergerade lag. Falls dies nicht der Fall war, wurde die Probe verdünnt. Parallel wurde auch hier eine Probe ohne Protein mit gemessen. Es wurden jeweils

drei Parallelproben gemessen und deren arithmetischer Mittelwert berechnet. Der Mittelwert von der Probe ohne Protein wurde von dem Mittelwert der Testlösung subtrahiert und deren Proteingehalt mit Hilfe von Formel 2 berechnet.



**Abb. 15:** BSA-Kalibriergerade für Proteinquantifizierungen.

### 3.10 Methoden Carotinoide

#### 3.10.1 Quantifizierung von Carotinoiden (Britton *et al.*, 2004)

Aufgrund ihres langen, konjugierten Doppelbindungs-Systems, welches das individuelle Chromophor darstellt, zeigen Carotinoide eine starke Lichtabsorption und charakteristische UV/Vis-Spektren. Individuelle Lichtabsorptionscharakteristika, wie die Wellenlängen der Absorptionsmaxima, die Feinstruktur des Absorptionsspektrums und die Intensität der Absorption eignen sich, um Carotinoide zu identifizieren und zu quantifizieren. Für verdünnte Carotinoid-Lösungen gilt das Lambert-Beersche Gesetz (Formel 3).

$$\text{(Formel 3)} \quad E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

$E$ : Extinktion

$\varepsilon$ : molarer dekadischer Extinktionskoeffizient ( $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

$c$ : Stoffmengenkonzentration ( $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ )

$d$ : Schichtdicke der Messküvette (cm)

Der spezifische Absorptionskoeffizient  $A_{1\text{cm}}^{1\%}$  ist definiert als die theoretische Absorption einer 1 %igen (w/v) Lösung in einer Küvette mit einer Messkammer von 1 cm Länge. Bei bekanntem  $A_{1\text{cm}}^{1\%}$  kann mit Hilfe der gemessenen Extinktion direkt die Massenkonzentration  $\beta$  berechnet werden (Formel 4).

$$\text{(Formel 4)} \quad \beta = \frac{E}{A_{1\text{cm}}^{1\%}} \cdot 10$$

$\beta$ : Massenkonzentration ( $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ )

$A_{1\text{cm}}^{1\%}$ : spezifischer Absorptionskoeffizient

Der molare dekadische Absorptionskoeffizient  $\varepsilon$  ist die theoretische Absorption einer Carotinoid-Lösung mit einer Konzentration von 1 mol/l. Er steht zu  $A_{1\text{cm}}^{1\%}$  in der in Formel 5 dargestellten Beziehung.

$$\text{(Formel 5)} \quad \varepsilon = \frac{A_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot M}{10}$$

$M$ : molare Masse ( $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ )

Für die Quantifizierung von Carotinoid-Lösungen mit bekanntem  $\varepsilon$  wird die Formel des Lambert-Beerschen Gesetzes nach der Stoffmengenkonzentration  $c$  aufgelöst (Formel 6).

$$\text{(Formel 6)} \quad c = \frac{E}{\varepsilon \cdot d}$$

Um die Massenkonzentration  $\beta$  zu berechnen, muss die molare Masse  $M$  mit einbezogen werden (Formel 7).

$$\text{(Formel 7)} \quad \beta = c \cdot M$$

**Tab. 26:** Parameter für die Quantifizierung verschiedener Carotinoide. Unterstrichen: der für die Berechnung der Konzentration verwendete Wert, (eingeklammert): von der Referenz abweichend verwendetes Lösungsmittel.

Carotinoid	Lösungs- mittel	$\lambda$ (nm)	$A_{1\text{cm}}^{1\%}$	$\epsilon$	Referenz
Apo-8'-carotinal	<i>n</i> -Hexan	457	2640	<u>109.800</u>	Britton <i>et al.</i> , 2004
Astaxanthin	<i>n</i> -Hexan (Aceton)	470	<u>2100</u>	125.100	Britton <i>et al.</i> , 2004
Canthaxanthin	<i>n</i> -Hexan (Aceton)	466	<u>2200</u>	124.100	Britton <i>et al.</i> , 2004
$\beta$ -Carotin	<i>n</i> -Hexan	450	2592	<u>138.900</u>	Britton <i>et al.</i> , 2004
Dihydroxylycopin	Aceton	472	<u>2980</u>		
Decaprenoxanthin	Aceton	443	<u>2340</u>	165.000	Liaaen-Jensen <i>et al.</i> , 1968
Hydroxylycopin (Rhodopin)	Aceton	472	<u>2980</u>		Ryvarden und Jensen, 1964
Lycopin	<i>n</i> -Hexan	470	3450	<u>184.900</u>	Britton <i>et al.</i> , 2004
Nostoxanthin	Aceton	452	<u>2340</u>	132.900	
Zeaxanthin	Aceton	452	2340	<u>132.900</u>	Britton <i>et al.</i> , 2004

Für viele Carotinoide gibt es bereits experimentell ermittelte Werte für  $\epsilon$  und  $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ . Tab. 26 zeigt die verschiedenen relevanten Parameter für die Quantifizierung der verwendeten Carotinoide. Die Messung der Extinktion der jeweiligen Lösung erfolgte bei der in Tab. 26 angegebenen Wellenlänge in Quarzküvetten. Der für die Berechnung des Gehaltes herangezogene  $\epsilon$ - oder  $A_{1\text{cm}}^{1\%}$ -Wert ist unterstrichen. Bei den Xanthophyllen Astaxanthin und Canthaxanthin erfolgte wegen ihrer schlechten Löslichkeit in Hexan die Messung der Extinktion in Aceton. Für Nostoxanthin wurden die Werte von Zeaxanthin verwendet. Bei den Experimenten wurden Hydroxylycopin und Dihydroxylycopin nur als Gemisch eingesetzt, für die Berechnung des Carotinoid-Gehaltes wurden die Werte von Hydroxylycopin herangezogen.

### 3.10.2 Herstellung von Carotinoid-Mizellen

In einem geeigneten Lösungsmittel wurde zunächst eine Carotinoid-Stammlösung hergestellt und deren Gehalt bestimmt (Tab. 26). Die Stammlösung wurde danach in 1,5 ml Reaktionsgefäße portioniert. Die abgefüllte Menge Carotinoid wurde dabei so berechnet, dass wenn der erhaltene Rückstand in 200  $\mu$ l Lösungsmittel gelöst wurde, diese Lösung eine Carotinoid-Konzentration von 80  $\mu$ M hatte (Tab. 27). Hydroxylycopin und Dihydroxylycopin wurden in den Experimenten nur als Gemisch eingesetzt. Für die Berechnung der einzusetzenden Menge wurde die molare Masse von Hydroxylycopin herangezogen. Das Lösungsmittel wurde anschließend in der Vakuumzentrifuge bei 200 mbar verdampft. Für die Herstellung der Mizellen wurden die portionierten Carotinoid-Substrate in 50  $\mu$ l des angegebenen Lösungsmittels (Tab. 27) gelöst (Ultraschallbad, 1 min) und anschließend mit 50  $\mu$ l 4 % (w/v) *n*-Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid in Ethanol gemischt. Für die Herstellung von  $\beta$ -Carotin- und Lycopin-Mizellen wurden 50  $\mu$ l 3 % (v/v) Triton<sup>®</sup> X-100 in Ethanol verwendet. Das Lösungsmittel wurde in der Vakuumzentrifuge bei 200 mbar für 4 – 6 h verdampft. Der erhaltene Rückstand wurde in 100  $\mu$ l 2-fach Inkubationspuffer I oder II (Tab. 12) suspendiert (Ultraschallbad, 1- 10 s).

**Tab. 27:** Für die Herstellung von Carotinoid-Mizellen verwendete Mengen und Lösungsmittel.

Carotinoid	Menge für 80 $\mu$ M in 200 $\mu$ l	Lösungsmittel
Apo-8'-carotinal	6,7 $\mu$ g	Ethanol
Astaxanthin	9,6 $\mu$ g	Dichlormethan
$\beta$ -Carotin	8,6 $\mu$ g	<i>n</i> -Hexan
Canthaxanthin	9,0 $\mu$ g	Dichlormethan
Decaprenoxanthin	11,3 $\mu$ g	Ethanol
Hydroxylycopin/Dihydroxylycopin	8,9 $\mu$ g	Dichlormethan
Lycopin	8,6 $\mu$ g	Dichlormethan
Nostoxanthin	9,6 $\mu$ g	Ethanol
Zeaxanthin	9,1 $\mu$ g	Ethanol

### 3.10.3 *In vitro* Umsetzungen von Carotinoiden

#### 3.10.3.1 *Umsetzungen mit gereinigtem Enzym*

Die Carotinoid-Mizellen (siehe Kapitel 3.10.2) wurden in 100 µl 2x Inkubationspuffer I suspendiert (Tab. 12). Für die Umsetzung wurden 20 µg gereinigtes Sala\_1698 eingesetzt (siehe Kapitel 3.9.2). Das Volumen wurde mit H<sub>2</sub>O auf 200 µl aufgefüllt. Die Reaktionsansätze enthielten 80 µM Carotinoid-Substrat, 100 mM HEPES-NaOH (pH 7,4), 1 mM Tris(2-Carboxyethyl)phosphin und 0,3 mM FeSO<sub>4</sub>. Die Inkubation erfolgte bei 25 °C und 500 rpm im Thermomixer. Für das Abstoppen der Enzymreaktion wurden 200 µl Aceton zu dem Ansatz pipettiert.

#### 3.10.3.2 *Umsetzungen mit ganzen Zellen*

Für die Umsetzung von Carotinoiden mit ganzen Zellen wurde der Stamm *E. coli* JM109 pJH66.1 verwendet. Die Kultivierung erfolgte in LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 1 mM FeSO<sub>4</sub>. Die Vorkultur wurde 1:100 mit frischem Medium verdünnt und für 2 - 2,5 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Bei OD<sub>600</sub> Werten zwischen 0,25 und 0,3 erfolgte die Induktion der Genexpression von *ppsir1\_15490mut* durch die Zugabe von 0,2 % (w/v) L-Rhamnose. Parallel wurde eine Kultur ohne L-Rhamnose mit inkubiert. Nach der Induktorzugabe wurden die Kulturen für 5 h bei 30 °C und 200 rpm weiter inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (Megafuge, 10 min, 4.500 rpm) geerntet und einmal mit 1/5 Volumen der Ausgangskultur H<sub>2</sub>O gewaschen. Für die Umsetzungen von Zeaxanthin, Nostoxanthin und Canthaxanthin wurden pro Ansatz 20 OD Zellen eingesetzt, die in 80 µl H<sub>2</sub>O suspendiert waren, für die Umsetzung von Astaxanthin wurden pro Ansatz 10 OD Zellen eingesetzt, die in 90 µl H<sub>2</sub>O suspendiert waren. Als Kontrollen wurden die jeweils gleiche Zahl Zellen aus uninduzierten Kulturen eingesetzt. Die Carotinoid-Mizellen (siehe Kapitel 3.10.2) wurden in 100 µl 2x Inkubationspuffer II (Tab. 12) suspendiert und dann mit 100 µl Zellsuspension gemischt. Die Reaktionsansätze enthielten 80 µM Carotinoid-Substrat, 100 mM HEPES-NaOH (pH 7,0), 1 mM Tris(2-Carboxyethyl)phosphin und 2,5 mM FeSO<sub>4</sub>. Die Inkubation der Ansätze erfolgt über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Rad.

### 3.10.4 Extraktionsmethoden

#### 3.10.4.1 *Extraktion von Lycopin aus Tomatenmark*

Zunächst wurden 5 g Tomatenmark mit 10 ml Aceton versetzt und kräftig geschüttelt. Der Ansatz wurde zentrifugiert (Megafuge, 5 min, 4.500 rpm) und der Überstand verworfen. Das Zentrifugationssediment wurde dann dreimal mit jeweils 5 ml Hexan durch Schütteln extrahiert. Zwischen den Extraktionsschritten wurde die Probe zentrifugiert (Megafuge, 5 min, 4.500 rpm). Die Hexanextrakte wurden vereinigt. Um das Lösungsmittel zu verdampfen, wurde mit einem Schlauch ein Stickstoffstrom in das Probengefäß geleitet. Der erhaltene Rückstand wurde in 10 ml Aceton gelöst und bis zu seiner weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### 3.10.4.2 *Präparation von Zeaxanthin aus Wolfsbeeren* (Inbaraj et al., 2008, modifiziert)

Vier bis fünf getrocknete Beeren wurden für 10 min bei -70 °C eingefroren und danach im Mörser zerstoßen. Falls nötig, wurde die Prozedur wiederholt. Die Beerensplitter wurden dann in ein 100 ml Becherglas überführt und mit 40 ml Aceton versetzt. Der Mörser wurde mit 10 ml Aceton gespült und das Aceton anschließend ebenfalls in das Becherglas gegeben. Der Ansatz wurde auf dem Magnetprüher für 1 h abgedeckt gerührt. Der Extrakt wurde in ein neues Becherglas dekantiert und der Beerenbrei mit weiteren 40 ml Aceton versetzt und wieder 1 h gerührt. Die Extrakte wurden vereinigt und das Lösungsmittel unter dem Stickstoffstrom verdampft. Das erhaltene Zeaxanthindipalmitat wurde dann verseift. Hierfür wurde der getrocknete Rückstand in 10 ml Dichlormethan gelöst, mit 10 ml 40 % (w/v) KOH in Methanol gemischt und über Nacht auf dem Magnetprüher abgedeckt gerührt. Am nächsten Morgen wurde der Ansatz in ein PP-Zentrifugenröhrchen (50ml) überführt, mit jeweils 10 ml Wasser und Hexan versetzt und geschüttelt. Nach der Zentrifugation (Megafuge, 1 min, 4.500 rpm) wurde die obere Phase abgenommen und der verbleibende Ansatz noch mehrere Male mit 5 bis 10 ml Hexan extrahiert. Die Hexanextrakte wurden jeweils dreimal mit einem äquivalenten Volumen Wasser gewaschen, anschließend vereinigt, mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter dem Stickstoffstrom verdampft. Der

Rückstand wurde in 10 ml Aceton gelöst und für 20 min zentrifugiert (Megafuge, 4.500 rpm). Bis zu ihrer weiteren Bearbeitung wurde die fertige Zeaxanthinlösung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### *3.10.4.3 Extraktion von Carotinoid-produzierenden Bakterienstämmen*

Die Zellen wurden zunächst durch Zentrifugation sedimentiert und der Überstand verworfen. Dann erfolgte die Extraktion mit kleinen Portionen Aceton bis zur vollständigen Entfärbung der Zellen. Um eine vollständige Extraktion zu erreichen, wurden die Zellen bei jedem Extraktionsdurchgang mit einem Glasstab oder Plastikstempel immer feiner zerrieben. Zu dem erhaltenen Acetonextrakt wurden  $2/5$  Volumen  $\text{H}_2\text{O}$  und  $2/5$  Volumen Hexan gegeben, der Ansatz geschüttelt und anschließend zentrifugiert (Tischzentrifuge, 1 min, 13.000 rpm oder Megafuge, 1 min, 4.500 rpm). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der restliche Ansatz weiter mit kleinen Portionen Hexan extrahiert, bis der Hexanextrakt farblos blieb. Die Hexanextrakte wurden vereinigt und das Lösungsmittel entweder unter dem Stickstoffstrom oder in der Vakuumzentrifuge bei 200 mbar verdampft. Bis zu ihrer weiteren Bearbeitung wurden die Proben bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### *3.10.4.4 Extraktion von Carotinoid-Umsetzungen mit ganzen Zellen*

Bei Ganzzellumsetzungen wurden Zellen und Überstände separat extrahiert. Zunächst wurden die Zellen durch Zentrifugation (Tischzentrifuge, 5 min, 13.000 rpm) sedimentiert und die Überstände in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Die Überstände wurden dann mit 200  $\mu\text{l}$  Aceton gemischt, was die Bildung eines Präzipitates zur Folge hatte. Dieses wurde durch Zentrifugation (Tischzentrifuge, 5 min, 13.000 rpm) sedimentiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde mit 200  $\mu\text{l}$  Hexan versetzt, geschüttelt und zentrifugiert (Tischzentrifuge, 1 min, 13.000 rpm). Die obere Hexanphase wurde isoliert

und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Hexanextraktion wurde solange wiederholt, bis die Hexanphase farblos blieb.

Das Präzipitat der Überstände wurde mit 100 µl-Portionen Aceton extrahiert, bis es farblos war (ein- bis zweimal). Der Acetonextrakt wurde gesammelt und später mit dem Acetonextrakt der Zellen vereinigt.

Die Zellen wurden zunächst mit kleinen Portionen Aceton extrahiert, bis sie farblos waren. Die Zellrümpfer wurden währenddessen mit einem Glasstab oder Plastikstempel zerrieben. Die Acetonextrakte von Zellen und Präzipitaten wurden vereinigt. Dann wurden 200 µl Hexan und 2/5 Volumen des Acetonextraktes H<sub>2</sub>O hinzugefügt. Nach dem Schütteln wurden die Ansätze zentrifugiert (Tischzentrifuge, 1 min, 13.000 rpm). Der Hexanüberstand wurde isoliert und die Hexanextraktion wiederholt bis der Überstand farblos blieb.

Die Hexanextrakte der Zellen wurden mit den Hexanextrakten der Überstände vereinigt, in der Vakuumzentrifuge bei 200 mbar getrocknet und bis zu ihrer Weiterbearbeitung bei -20 °C gelagert.

### *3.10.4.5 Extraktion von in vitro Carotinoid-Umsetzungen mit gereinigtem Enzym*

Die Ansätze wurden mit jeweils 200 µl Aceton und Hexan versetzt, geschüttelt und zentrifugiert (Tischzentrifuge, 1 min, 13.000 rpm). Die obere Hexanphase wurde isoliert und der verbleibende Ansatz so lange mit weiteren Portionen Hexan extrahiert, bis der Hexanextrakt farblos blieb. Die Hexanextrakte wurden vereinigt, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und bis zu ihrer Weiterbearbeitung bei -20 °C gelagert.

## 3.11 Chromatographie

### 3.11.1 HPLC-Analytik

#### 3.11.1.1 Trennsäule, Laufmittel und HPLC-Gradienten

Für die chromatographische Trennung von Carotinoiden wurde eine RP-18 Säule (250 x 4,6 mm, 5 µm Partikelgröße) mit Vorsäule (10 x 4,6 mm, Partikelgröße 5 µm) verwendet. Sofern es nicht anders vermerkt ist, erfolgte die Detektion der Carotinoide bei einer Wellenlänge von 450 nm. Das Injektionsvolumen der Proben betrug 20 µl. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der D-7000 HPLC System Manager Software (Merck®-Hitachi, Darmstadt).

Bei der HPLC-Methode 1 (Breithaupt, 2004, modifiziert) wurden zwei Laufmittel eingesetzt. Laufmittel A bestand aus Methanol und H<sub>2</sub>O im Verhältnis 9:1, Laufmittel B bestand aus MTBE und Methanol im Verhältnis 9:1. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. Der HPLC-Gradient ist in Tab. 28 angegeben.

Bei der HPLC-Methode 2 (Scherzinger *et al.*, 2006, modifiziert) bestand das Laufmittel A aus Methanol, H<sub>2</sub>O und MTBE im Verhältnis 30:10:1. Das Laufmittel B war ein Gemisch aus Methanol und MTBE im Verhältnis 1:1. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. Der HPLC-Gradient ist in Tab. 29 angegeben.

**Tab. 28:** Laufmittel-Gradient für die HPLC-Methode 1.

Zeit (min)	% Laufmittel A	% Laufmittel B
0	94	6
34	0	100
38	94	6
47	94	6

**Tab. 29:** Laufmittel-Gradient für die HPLC-Methode 2.

Zeit (min)	% Laufmittel A	% Laufmittel B
0	100	0
30	0	100
35	0	100
36	100	0
51	100	0

Die Identitäten der produzierten Carotinoide wurden durch Vergleiche mit Referenzsubstanzen bestätigt; es wurden die Retentionszeiten und Absorptionsspektren und z. T. auch die Massenspektren verglichen. Die Aufnahme der Absorptionsspektren erfolgte teilweise am Institut für Technische Biochemie (Holger Beuttler). Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte am Institut für Technische Biochemie und am Institut für Systemdynamik (siehe Kapitel 3.12).

### 3.11.1.2 Kalibrierung

Für die Kalibrierung der jeweiligen HPLC-Methode für die verschiedenen Carotinoide wurde zunächst eine Stammlösung der betreffenden Substanz angefertigt und deren Gehalt photometrisch bestimmt (siehe Kapitel 3.10.1). Die Stammlösung wurde dann verdünnt. Es zeigte sich, dass ein Volumen von 4 ml pro Verdünnungsstufe gut geeignet war, da hier eine, durch die relativ hohe Flüchtigkeit des Lösungsmittels verursachte, Konzentrationsänderung nicht zu stark ins Gewicht fiel. Die Stammlösung wurde auf 30, 20, 10, 5, 1 und 0,5 µg/ml Carotinoid verdünnt. Der tatsächliche Carotinoid-Gehalt jeder Verdünnungsstufe wurde photometrisch gemessen. Jeweils 20 µl der Kalibrierlösung wurden dann in die HPLC-Anlage eingespritzt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der D-7000 HPLC System Manager Software (Merck®-Hitachi, Darmstadt). Die experimentell ermittelten Konzentrationen der Kalibrierlösungen wurden in die dafür vorgesehene Maske der betreffenden Programmfunktion eingetragen. Das Programm trug dann die jeweilige Peakfläche der gemessenen Substanz gegen deren Gehalt graphisch auf. Die Geradengleichung der Kalibriergerade wurde von dem Programm durch die Koeffizienten  $a_0$  und  $a_1$  angegeben (Formel 8). Tab. 30 und Tab. 31 zeigen die Koeffizienten  $a_1$  der Kalibriergeraden von verschiedenen Carotinoiden sowie deren Bestimmtheitsmaß  $R^2$  für die beiden verwendeten HPLC-Methoden. Die Koeffizienten  $a_0$  betragen null und sind in den Tabellen nicht gesondert aufgeführt.

$$\text{(Formel 8)} \quad f(x) = a_1 x + a_0$$

$$\begin{aligned} f(x) &= \text{Carotinoid-Gehalt } (\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}) \\ x &= \text{Peakflächeneinheiten} \end{aligned}$$

**Tab. 30:** Kalibrierdaten für verschiedene Substanzen für die HPLC-Methode 1.

Carotinoid	Herkunft	Reinheit*	Koeffizient $a_1$	$R^2$
$\beta$ -Carotin	Sigma Aldrich	93 %	$6,558 \times 10^{-6}$	0,9992
Zeaxanthin	Wolfsbeeren	82 %	$1,012 \times 10^{-5}$	0,9977
Lycopin	Tomatenmark	81 %	$1,150 \times 10^{-5}$	0,9972

\* Prozentualer Anteil der Fläche des jeweiligen Produkt-Peaks an der Summe der Flächen aller Peaks im HPLC-Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 450 nm.

**Tab. 31:** Kalibrierdaten für verschiedene Substanzen für die HPLC-Methode 2.

Carotinoid	Herkunft	Reinheit*	Koeffizient $a_1$	$R^2$
Apo-8'-carotinal	Sigma Aldrich	98 %	$9,762 \times 10^{-6}$	0,9997
Astaxanthin	Institut für Technische Biochemie	97 %	$1,628 \times 10^{-5}$	0,9897
$\beta$ -Carotin	Sigma Aldrich	93 %	$1,005 \times 10^{-5}$	0,9991
Canthaxanthin	<i>E. coli</i> JM109 pJOE5607.5/pJH22.1	82 %	$1,250 \times 10^{-5}$	0,9997
Decaprenoxanthin	<i>Pseudomonas</i> sp. KK10206C	81 %	$1,482 \times 10^{-5}$	0,9996
Lycopin	Tomatenmark	82 %	$1,391 \times 10^{-5}$	0,9969
Nostoxanthin	<i>Sphingopyxis alaskensis</i> RB2256	81 %	$1,055 \times 10^{-5}$	0,9953
Zeaxanthin	Wolfsbeeren	82 %	$1,076 \times 10^{-5}$	0,9958

\* Prozentualer Anteil der Fläche des jeweiligen Produkt-Peaks an der Summe der Flächen aller Peaks im HPLC-Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 450 nm.

### 3.11.2 Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden hauptsächlich Carotinoid-Extrakte von Ganzzellumsetzungen mit *E. coli* JM109 pJH66.1 (siehe Kapitel 3.10.3.2) verwendet. Die Methode diente der Präparation der Carotinoid-Spaltprodukte sowie ihrer Dokumentation mittels Photographie. Als stationäre Phase wurde Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (20 x 20 cm) eingesetzt. Die Extrakte der Ganzzellumsetzungen wurden in 50  $\mu$ l Aceton gelöst und in 0,5  $\mu$ l Portionen punkt- oder strichförmig 1,5 cm vom unteren Rand auf die DC-Platte aufgetragen. Nach dem Auftragen wurde die Platte mit Stickstoff bepusht, um die aufgetragene Probe vollständig zu trocknen. Abhängig von dem umgesetzten Substrat, wurden für die Entwicklung der DC-

Platten verschiedene Laufmittel eingesetzt (Tab. 32). Bei Verwendung des jeweiligen Laufmittels 1 wurde die große DC-Kammer benutzt (20 x 20 x 8 cm, 80 ml Laufmittel, gesättigt). Für die Chromatographie von Astaxanthin-Umsetzungen mit Laufmittel 2 wurde die kleine DC-Kammer benutzt (12 x 10,5 x 5,5 cm, 15 ml Laufmittel, ungesättigt, Deckel 45° schräg aufgelegt), für die Chromatographie aller anderen Proben mit dem jeweiligen Laufmittel 2 wurde die große DC-Kammer verwendet (siehe oben). Die Entwicklung der Platten erfolgte für 15 bis 40 min. Bei der Verwendung von Laufmittel 1 für die Präparation von Astaxanthin-Spaltprodukten wurde die DC-Platte zweimal entwickelt, wobei die Platte vor dem zweiten Entwickeln getrocknet wurde. Nach dem Trocknen wurde die Platte knapp unterhalb der Astaxanthin-Bande abgeschnitten und dann ein weiteres Mal entwickelt. Die Distanz vom Auftragspunkt der Proben bis zur Laufmittelfront sowie die Laufstrecken der verschiedenen aufgetrennten Substanzen wurden gemessen und mit den Daten der jeweilige  $R_f$ -Wert ermittelt (Formel 9, Tab. 33).

$$\text{(Formel 9)} \quad R_f = \frac{\text{Laufstrecke des Analyten (cm)}}{\text{Laufstrecke der Laufmittelfront (cm)}}$$

Der Bereich des Kieselgels, welcher die jeweiligen Spaltprodukte des umgesetzten Carotinoids enthielt, wurde mit einem Spatel von der Platte gekratzt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Spaltprodukte wurden dann mit Ethanol aus dem Kieselgel extrahiert. Für die MS-Analyse wurde der Ethanolextrakt filtriert (Millipore HV 0,45 µm Porengröße) und das Lösungsmittel in der Vakuumzentrifuge bei 200 mbar verdampft.

**Tab. 32:** Für die Dünnschichtchromatographie von Carotinoiden und ihren Spaltprodukten verwendete DC-Laufmittel.

Carotinoid	Laufmittel 1	Laufmittel 2
Zeaxanthin	Hexan/Aceton 7:3	Petroleum/Diethylether/Aceton 40:10:10
Nostoxanthin	Hexan/Aceton 1:1	Petroleum/Aceton/Diethylether 30:20:10
Astaxanthin	Hexan/Aceton 8:2*	Methanol/Aceton/H <sub>2</sub> O/MTBE 30:24,6:10:1
Canthaxanthin	Hexan/Aceton 7:3	-

\* zweimal entwickeln

**Tab. 33:** R<sub>f</sub>-Werte von verschiedenen Carotinoiden und ihren Spaltprodukten bei Dünnschichtchromatographie mit verschiedenen Laufmitteln und Kieselgel 60 F<sub>254</sub>.

<b>Substanz</b>	<b>Rf-Werte Laufmittel 1</b>	<b>Rf-Werte Laufmittel 2</b>
Zeaxanthin	0,27 ± 0,07	0,15 ± 0,01
Zeaxanthin-Spaltprodukte	0,33 ± 0,09	0,21 ± 0,01
Nostoxanthin	0,51 ± 0,18	0,209
Nostoxanthin-Spaltprodukte	0,53 ± 0,19	0,269
Canthaxanthin	0,48 ± 0,11	-
Canthaxanthin-Spaltprodukte	0,40 ± 0,10	-
Astaxanthin	-	0,76 ± 0,05
Astaxanthin-Spaltprodukte	-	0,90 ± 0,04

## 3.12 Massenspektrometrie

### 3.12.1 Equipment und Methode Institut für Technische Biochemie

Die Messungen wurden von Holger Beuttler durchgeführt. Das Probenvolumen betrug 20 µl. Nachstehend sind die für die Messungen verwendeten Materialien, Geräte und Analyse-Parameter aufgelistet.

#### LC-MS-Apparatur (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg)

Controller SLC-10Avp, Pumpen LC-20, Photodiodenarray-Detektor SPD-M10Avp, Massenspektrometer LCMS-2010, LCMSsolution Software.

#### Trennsäule (YMC Europe GmbH, Dinslaken)

YMC-Pack YMC<sub>30</sub> Säule (250 x 4,6 mm, Partikelgröße 3 µm) mit Vorsäule (10 x 4 mm, Partikelgröße 3 µm).

#### HPLC-Einstellungen

Fließgeschwindigkeit 1 ml/min, bei MS-Kopplung 0,5 ml/min, Wellenlänge 450 nm, Referenzwellenlänge 600 nm.

#### MS-Einstellungen

Ionisierung durch ESI und APCI im positiven Modus, Modus Scan, Event Time 0,15 s, Detektorspannung 1,5 kV, Interfacespannung 3,5 kV, CDL-Spannung -43 V, CDL-Temperatur 230 °C, Heizblocktemperatur 200 °C, *m/z*-Bereich 350 – 1000.

**Tab. 34:** HPLC-Gradienten für die LC-MS-Messungen von Carotinoiden am Institut für Technische Biochemie.

Zeit (min) (MS-Kopplung)	Zeit (min) (UV/Vis Detektion)	% Laufmittel A*	% Laufmittel B**
0	0	93,5	6,5
60	38	0	100
65	42	93,5	6,5
70	47	93,5	6,5

\*Methanol:H<sub>2</sub>O (9:1), \*\*MTBE:Methanol (9:1).

### 3.12.2 Equipment und Methode Institut für Systemdynamik

Die Messungen wurden von Judit Bóna-Lovász und Marion Fleischer durchgeführt. Das Probenvolumen betrug 20 µl. Nachstehend sind die für die Messungen verwendeten Materialien, Geräte und Analyse-Parameter aufgelistet.

#### LC-MS-Apparatur (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA)

HPLC-Anlage Dionex Ultimate 3000, Massenspektrometer Dionex MSQ™, Chromeleon™ 6.0 Software.

#### Trennsäule(VDS optilab Chromatographie Technik GmbH, Berlin)

Spherisorb ODS-2 C<sub>18</sub> (250 mm x 4.6 mm, Partikelgröße 5µm) .

#### HPLC-Einstellungen

Fließgeschwindigkeit 1 ml/min, Wellenlänge 475 nm.

#### MS-Einstellungen

Ionisierung durch APCI im positiven Modus, Corona-Entladung 7.5 µA, Temperatur 450 °C, Corona-Spannung 75 V, *m/z*-Bereich 250 -1000.

**Tab. 35:** HPLC-Gradient für die LC-MS-Messungen von Carotinoiden am Institut für Systemdynamik.

Zeit (min)	% Laufmittel A*	% Laufmittel B**	Gradienteneinstellung***
0	50	50	5
35	0	100	3
40	50	50	5
45	50	50	5

\* H<sub>2</sub>O, \*\*Aceton, \*\*\*Einstellung der Chromeleon™ 6.0 Software für einen nicht-linearen HPLC-Gradienten.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Heterologe Carotinoid-Biosynthese

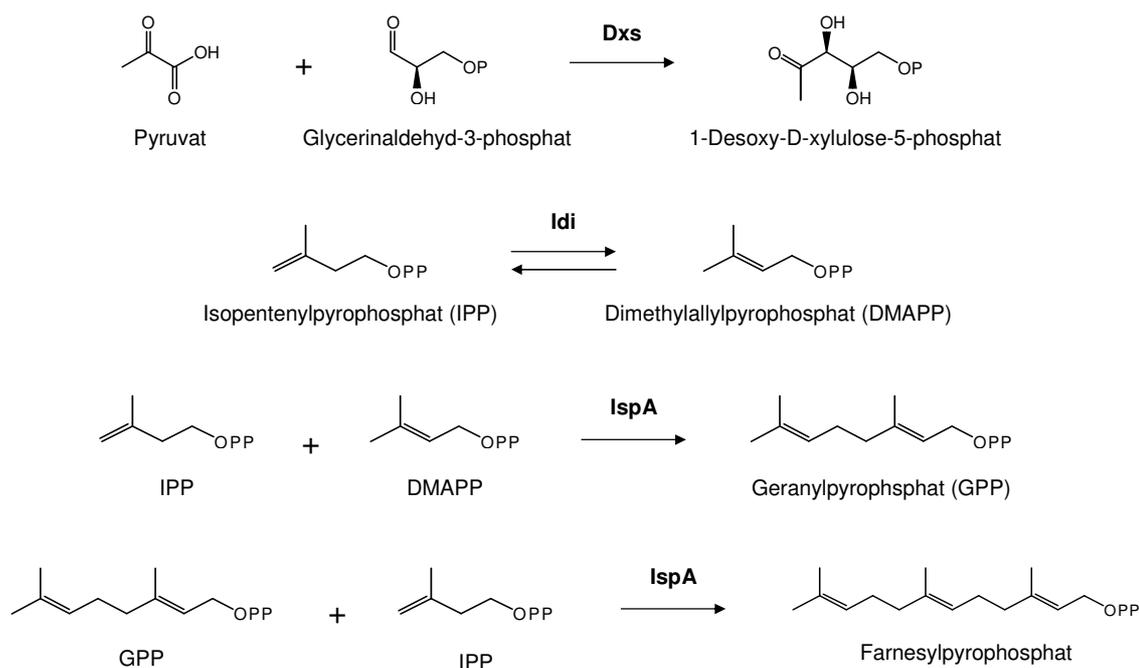
#### 4.1.1 Vektoren und Klonierungsstrategie

Für die Expression der verschiedenen Carotinoid-Biosynthesegene wurde der auf dem pBBR1MCS-2 Replikon (Kovach *et al.*, 1995) basierende, mobilisierbare Expressionsvektor pJeM1 (Jeske und Altenbuchner, 2010) verwendet (Abb. 17). Der Promotor *rhaP<sub>BAD</sub>* ermöglicht die L-Rhamnose-induzierbare Genexpression in *E. coli* (Stumpp *et al.*, 2000). Durch die zusätzliche Anwesenheit der Aktivatorgene *rhaR* und *rhaS* kann der Vektor auch in Stämmen eingesetzt werden, die diese Gene im Gegensatz zu *E. coli* nicht chromosomal kodieren (z. B. *Pseudomonas* sp.).

Bevor die eigentlichen Carotinoid-Biosynthesegene hinzugefügt wurden, erfolgte zunächst die Klonierung der drei Gene *idi*, *ispA* und *dxs*. Ihre Genprodukte katalysieren geschwindigkeitsbestimmende Schritte der Isoprenoid-Biosynthese in *E. coli*. Durch die Überexpression der Gene kann die Bereitstellung der Vorstufen von Carotinoiden verbessert und dadurch deren Ausbeute gesteigert werden (Lee und Schmidt-Dannert, 2002; Matthews und Wurtzel, 2000). Abb. 16 zeigt die von den Enzymen katalysierten Reaktionen. Die 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase (Dxs) synthetisiert 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat aus Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat. Die Isopentenylpyrophosphat-Isomerase (Idi) katalysiert die Isomerisierung von Isopentenylpyrophosphat zu Dimethylallylpyrophosphat und umgekehrt. Die Geranyl-/Farnesylpyrophosphat-Synthase (IspA) synthetisiert Geranylpyrophosphat aus Isopentenylpyrophosphat und Dimethylallylpyrophosphat. IspA katalysiert außerdem die Synthese von Farnesylpyrophosphat aus Geranylpyrophosphat und Isopentenylpyrophosphat.

Die Gene *idi*, *ispA* und *dxs* wurden zunächst mittels PCR amplifiziert. Mit Hilfe der dabei verwendeten Oligonukleotide wurden an die Enden der PCR-Produkte Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen angefügt. Die PCR-Fragmente wur-

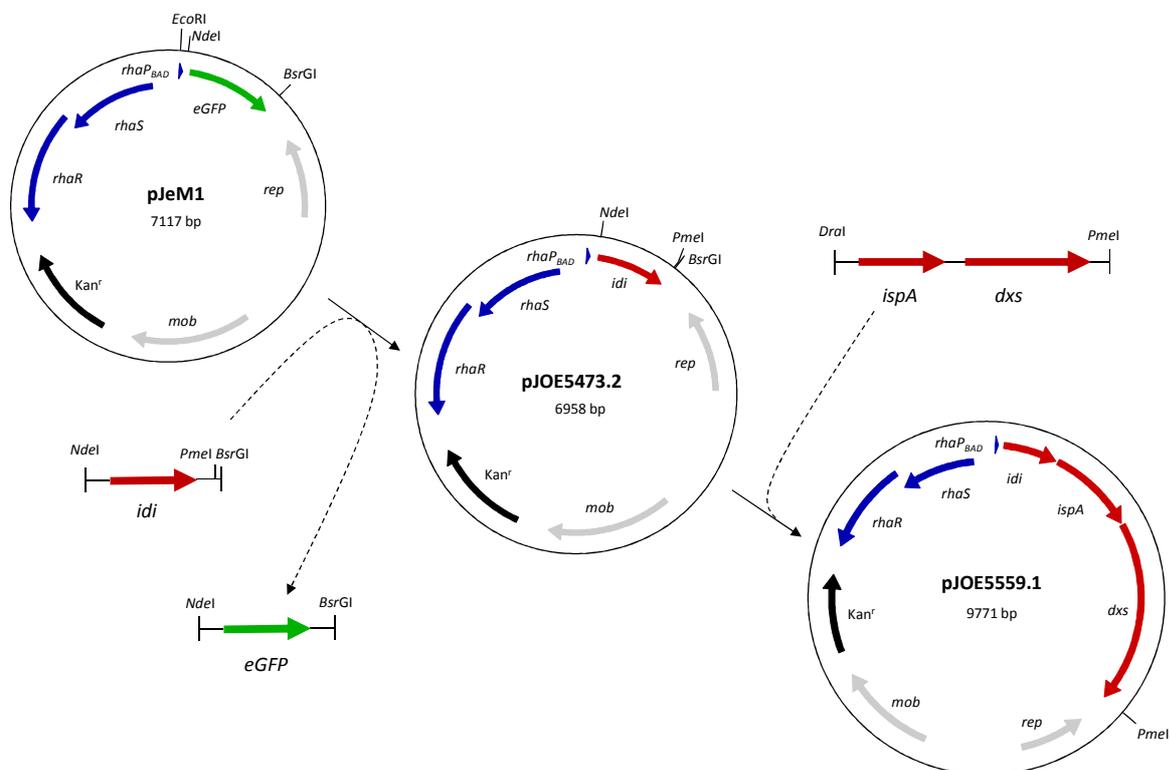
den gereinigt und ungeschnitten in den mit *Sma*I linearisierten Vektor pJOE4786.1 (Jeske und Altenbuchner, 2010) integriert. Nach der DNA-Sequenzierung wurden Fragmente mit korrekter Nukleotidsequenz mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen aus pJOE4786.1 herausgeschnitten, gereinigt und für die Konstruktion der Carotinoid-Biosynthesevektoren verwendet.



**Abb. 16:** Geschwindigkeitsbestimmende Reaktionen der Isoprenoid-Biosynthese in *E. coli*. **Dxs** = 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase, **Idi** = Isopentenylpyrophosphat-Isomerase, **IspA** = Geranyl-/Farnesylpyrophosphat-Synthase.

Abb. 17 zeigt die Klonierungsstrategie. Das *Nde*I/*Bsr*GI Fragment mit *eGFP* von pJeM1 wurde zunächst durch ein *Nde*I/*Bsr*GI-Fragment mit *idi* ausgetauscht, wodurch pJOE5473.2 entstand. Neben der beiden für die Klonierung verwendeten Schnittstellen befand sich auf dem DNA-Fragment hinter *idi* noch eine *Pme*I-Schnittstelle, mit deren Hilfe im nächsten Schritt die Konstruktion von pJOE5559.1 erfolgte. Das in pJOE5473.2 integrierte DNA-Fragment enthielt die Gene *ispA* und *dxs* sowie eine *Dra*I- und *Pme*I-Schnittstelle. Bei *Dra*I und *Pme*I handelt es um Restriktionsendonukleasen, die DNA-Enden ohne Überhänge generieren. Nach der Ligation von pJOE5473.2 und dem Fragment blieb nur die *Pme*I-Schnittstelle hinter *dxs* erhalten. Unter Ausnutzung der *Pme*I-Schnittstelle von pJOE5559.1

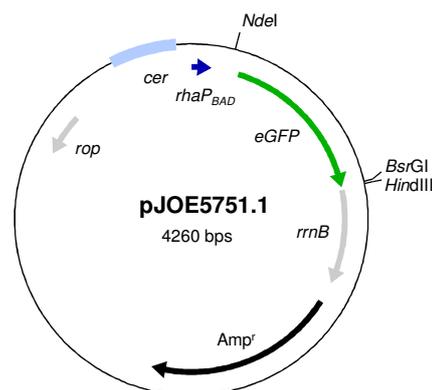
wurde dann das erste Carotinoid-Biosynthesegen integriert. Bei jedem neu hinzugefügten Fragment wurde hinter dem jeweiligen Carotinoid-Biosynthesegen stets eine *PmeI*-Schnittstelle eingefügt, die dann für den darauffolgenden Klonierungsschritt verwendet werden konnte.



**Abb. 17:** Klonierungsstrategie für Carotinoid-Biosynthesevektoren.

Im Zuge der Untersuchungen erwies es sich als sinnvoll einen zweiten Vektor einzusetzen. Hierbei handelt es sich um den auf pBR322 (Bolivar *et al.*, 1977) basierenden Vektor pJOE5751.1, welcher ebenfalls den L-Rhamnose-abhängigen Promotor *rhaP<sub>BAD</sub>*, jedoch nicht die Aktivatorgene *rhaR* und *rhaS* besitzt. Das Replikon ist mit pBBR1MCS-2-Derivaten kompatibel. Der Einsatz eines zweiten Vektors bietet zwei wesentliche Vorteile. Zum einen kann die Synthese eines neuen Produktes von unterschiedlichen Ausgangsverbindungen ausgehend getestet werden, indem ein unbekanntes neues Gen in pJOE5751.1 integriert und anschließend mit den bereits vorhandenen pBBR1MCS-2-Vektoren kombiniert wird. Zum anderen kann nachträglich noch Einfluss auf die Expression eines bestimmten Gens genommen werden. In den Carotinoid-Biosynthesevektoren bilden

die Gene ein mehr oder weniger großes Operon. Je weiter ein bestimmtes Gen innerhalb des Operons vom Promotor entfernt liegt, desto schwächer wird dieses exprimiert (Nishizaki *et al.*, 2007). Die daraus resultierende geringere Enzymmenge kann sich negativ auf die Produktmodifikation und somit auf die Ausbeute an gewünschtem Produkt auswirken. Mit Hilfe des zweiten Vektors können diese kritischen Gene stärker exprimiert werden. Die zu klonierenden Gene wurden mittels PCR amplifiziert und dann direkt in pJOE5751.1 integriert. Hierfür wurden die *NdeI*-, *BsrGI*- oder *HindIII*-Schnittstellen des Vektors benutzt. Die Nukleotidsequenzen der integrierten Gene wurden mittels DNA-Sequenzierung überprüft.



**Abb. 18:** pJOE5751.1

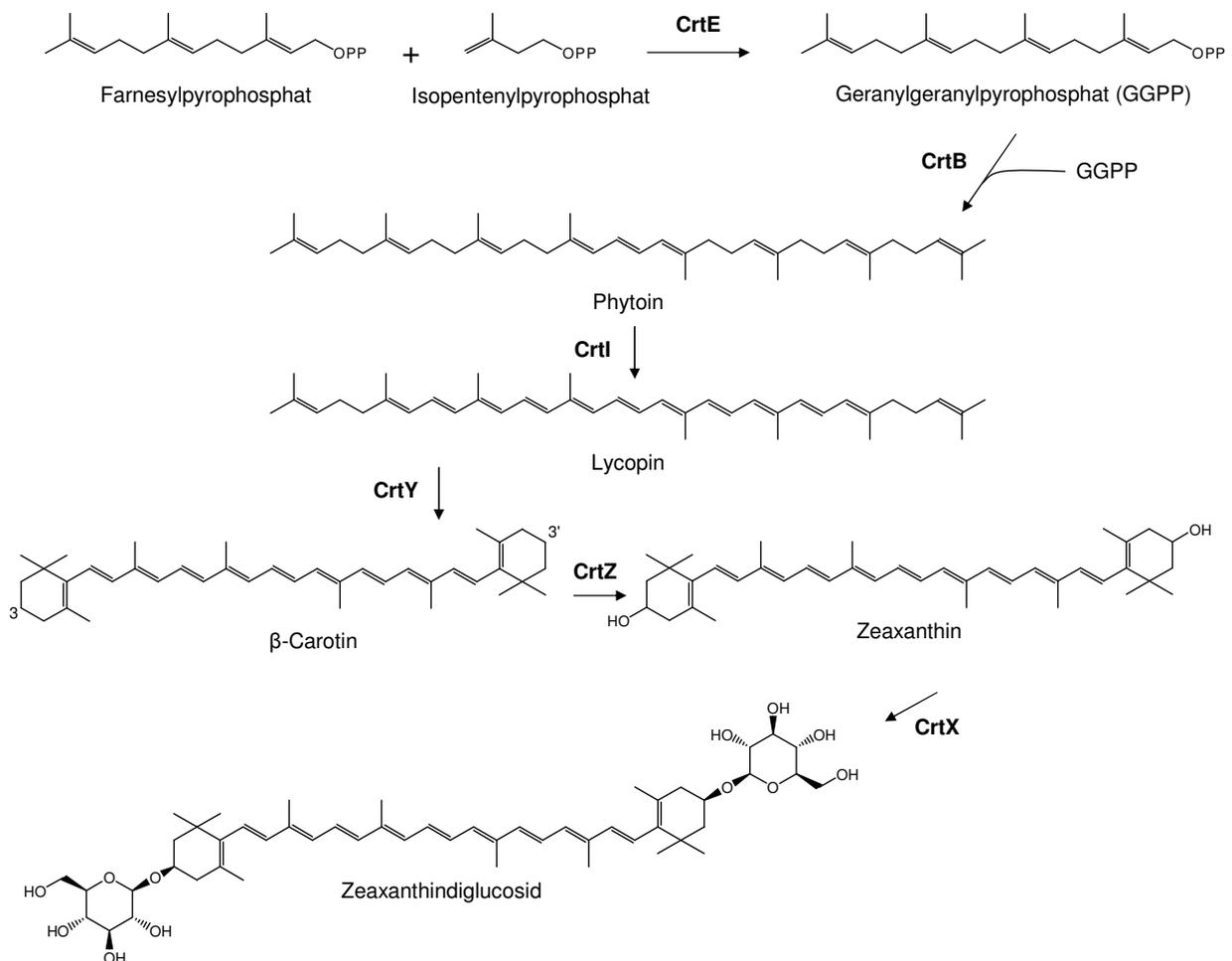
#### 4.1.2 Heterologe Carotinoid-Biosynthese mit bakteriellen Enzymen

##### 4.1.2.1 *Pantoea ananatis*: Lycopin, $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin

*Pantoea ananatis* gehört zur Klasse der  $\gamma$ -Proteobacteria und zur Familie der Enterobacteriaceae. Der Stamm produziert hauptsächlich ZeaxanthindiglucoSID. Die für die Synthese dieser Verbindung verantwortlichen Gene wurden bereits identifiziert und charakterisiert (Misawa *et al.*, 1990). Abb. 19 zeigt den Ausschnitt des Syntheseweges von ZeaxanthindiglucoSID in *Pantoea ananatis*, der durch die Enzyme Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase (CrtE), Phytoin-Synthase (CrtB), Phytoin-Desaturase (CrtI), Lycopin- $\beta$ -Cyclase (CrtY),  $\beta$ -Carotin-3,3'-Hydroxylase (CrtZ) und Zeaxanthin-Glucosyltransferase (CrtX) vermittelt wird. CrtE synthetisiert Geranylgeranylpyrophosphat aus Farnesylpyrophosphat und Isopentenylpyrophosphat. Zwei Moleküle Geranylgeranylpyrophosphat werden dann durch CrtB zu Phytoin verknüpft. CrtI fügt vier Doppelbindungen in Phytoin ein, wodurch das erste gefärbte Carotinoid Lycopin entsteht. Durch CrtY werden die Enden von Lycopin cyclisiert. CrtZ katalysiert die Hydroxylierung von  $\beta$ -Carotin am C3- bzw.

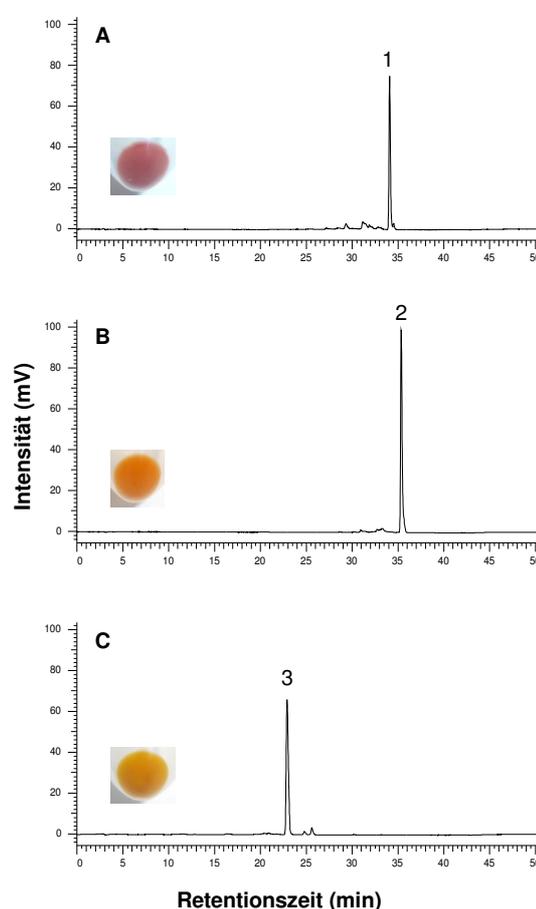
C3'-Atom und CrtX knüpft schließlich die glycosidische Bindung zwischen Glucose und Zeaxanthin.

Für die Konstruktion von Carotinoid-Biosynthesevektoren für die Produktion von Lycopin,  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin wurden die fünf Gene *crtE*, *crtB*, *crtI*, *crtY* und *crtZ* nacheinander in pJOE5559.1 (Abb. 17) bzw. die folgenden Vektoren integriert. Bei der Konstruktion von pJOE5573.3 und pJOE5607.5 wurde dabei so vorgegangen, wie es in Kapitel 4.1.1 beschrieben wurde. Für die Konstruktion von pJH14.1 (Beuttler *et al.*, 2011) wurde das In-Fusion 2.0 Dry Down PCR Cloning Kit verwendet. Tab. 36 fasst die Eigenschaften der Vektoren zusammen.



**Abb. 19:** Ausschnitt aus der Carotinoid-Biosynthese in *Pantoea ananatis*. **CrtE** = Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase, **CrtB** = Phytoin-Synthase, **CrtI** = Phytoin-Desaturase, **CrtY** = Lycopin- $\beta$ -Cyclase, **CrtZ** =  $\beta$ -Carotin-3,3'-Hydroxylase, **CrtX** = Zeaxanthin-Glucosyltransferase

Die Funktionalität des Systems wurde mit *E. coli* JM109 überprüft. Der Stamm wurde zunächst mit dem jeweiligen Plasmid transformiert. Die Kultivierung erfolgte in LB mit 46 mM Natriumphosphatpuffer, 0,46 % (v/v) Glycerin (LB Gly NaPP) und 50 µg/ml Kanamycin. Nach der Induktorzugabe wurden die Kulturen für zwei Tage bei 30 °C weiter inkubiert. Die Bildung von Lycopin, β-Carotin und Zeaxanthin konnte bereits optisch durch die unterschiedliche Färbung der Zellen beobachtet werden (Abb. 20). Die von den Stämmen produzierten Carotinoide wurden extrahiert (siehe Kapitel 3.10.4.3) und mittels HPLC analysiert. Abb. 20 zeigt die HPLC-Chromatogramme von Extrakten der *E. coli* JM109 Stämme mit pJOE5573.3, pJOE5607.5 oder pJH14.1. Für die chromatographische Trennung der Carotinoide wurde eine C<sub>18</sub>-Phase benutzt (siehe Kapitel 3.11.1.1). Die Detektion der Carotinoide erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die Retentionszeiten der aus den *E. coli* JM109 Stämmen extrahierten Carotinoide wurden mit denen von Referenz-Carotinoiden verglichen (Tab. 13). Lycopin und β-Carotin können mit C<sub>18</sub>-Phasen nicht getrennt werden. Die Aufnahme von Absorptionsspektren war mit dem verwendeten UV/Vis-Detektor (Tab. 17) ebenfalls nicht möglich. Daher wurden die Identitäten aller Substanzen durch HPLC-Messungen mit einer C<sub>30</sub>-Phase und Photodiodenarray-Detektion bestätigt (Messdaten nicht gezeigt, Durchführung der Messungen: Holger Beuttler, ITB). Die Identitäten von Zeaxanthin und β-Carotin wurden darüber hinaus durch massenspektrometrische Messungen bestätigt (Messdaten nicht gezeigt, Durchführung der Messungen:



**Abb. 20:** HPLC-Chromatogramme (Methode 2) von *E. coli* JM109 Extrakten und Bilder der gefärbten Zellen. **A** pJOE5573.3, **B** pJOE5607.5, **C** pJH14.1. Peaks: **1** Lycopin, **2** β-Carotin, **3** Zeaxanthin.

Judit Bóna-Lovász, ISYS). In Tab. 36 ist der prozentuale Anteil der Fläche des jeweiligen Produkt-Peaks an der Summe der Flächen aller Peaks angegeben, außerdem die Menge des jeweiligen Produktes, die mit *E. coli* JM109 produziert wurde. Je nach Plasmid produzierten die Stämme zwischen 0,97 und 1,27 mg Produkt pro Gramm Zelltrockenmasse.

**Tab. 36:** Carotinoid-Biosynthesevektoren mit *crt*-Genen von *Pantoea ananatis*.

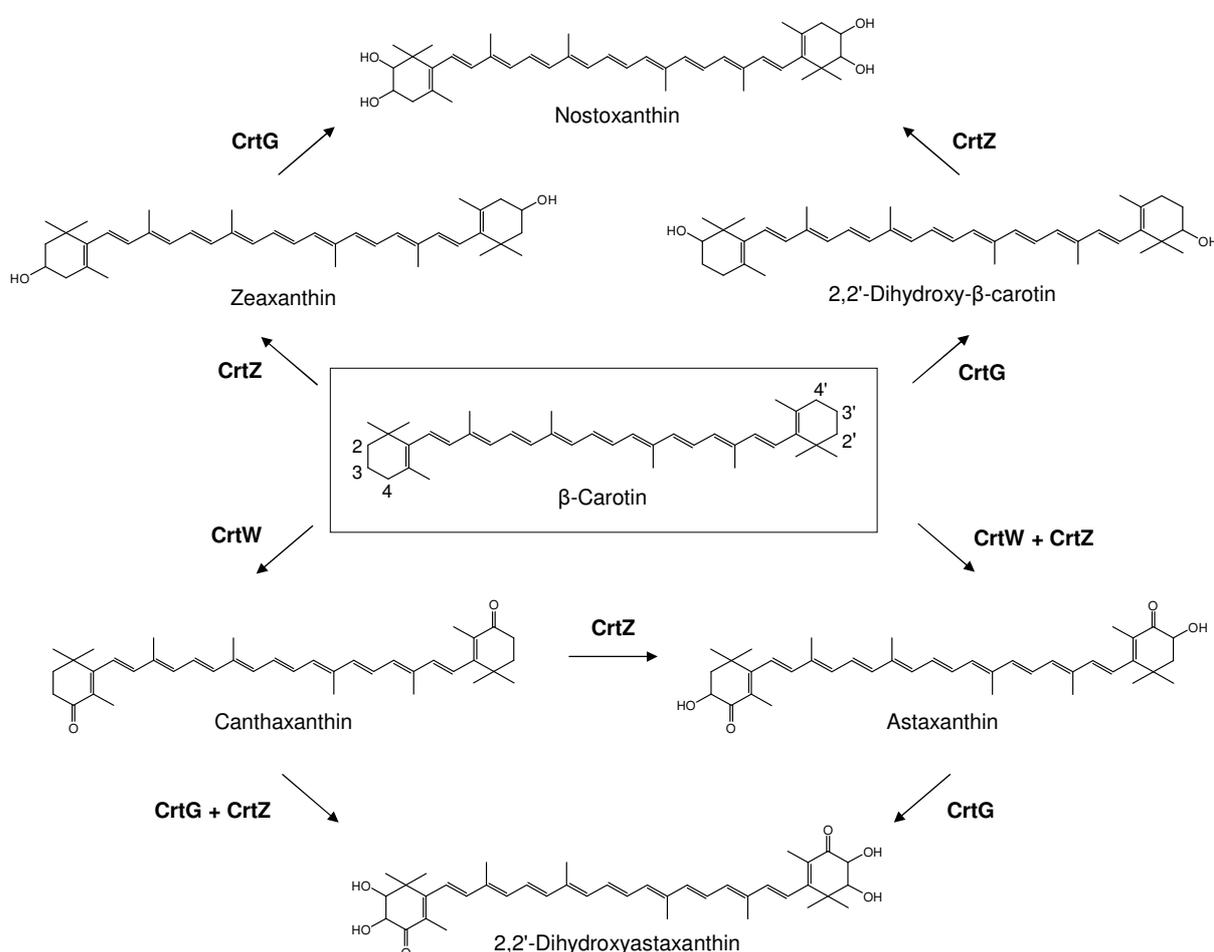
Plasmid	<i>crt</i> -Gene	Produkt	Anteil*	Gehalt (mg/g Ztrm.)**
pJOE5573.3	<i>crtE, crtB, crtI</i>	Lycopin	74 %	1,27
pJOE5607.5	<i>crtE, crtB, crtI, crtY</i>	β-Carotin	90 %	1,07
pJH14.1	<i>crtE, crtB, crtI, crtY, crtZ</i>	Zeaxanthin	91 %	0,97

\* Prozentualer Anteil der Fläche des jeweiligen Produkt-Peaks an der Summe der Flächen aller Peaks im HPLC-Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 450 nm.

\*\* Mit *E. coli* JM109 in LB Gly NaPP produzierte Menge an Produkt.

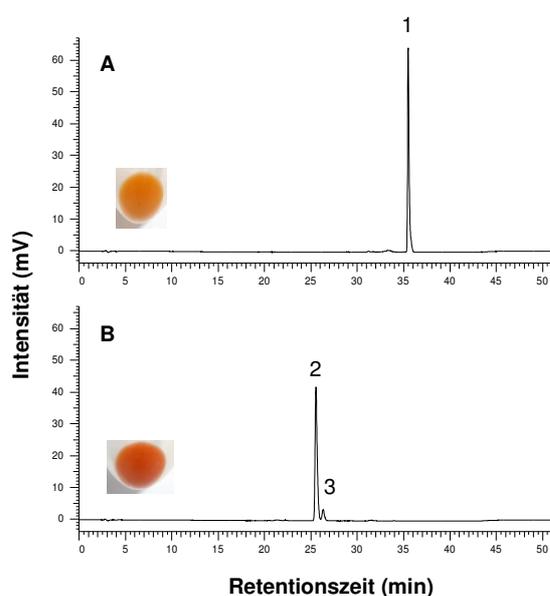
4.1.2.2 *Brevundimonas* sp. SD212: Astaxanthin, Canthaxanthin und Nostoxanthin

*Brevundimonas* sp. SD212 gehört zur Klasse der  $\alpha$ -Proteobacteria und zur Familie der *Caulobacteraceae*. Der Stamm produziert unter anderem 2,2'-Dihydroxyastaxanthin. Auch die Carotinoid-Biosynthesegene von *Brevundimonas* sp. SD212 wurden bereits kloniert und charakterisiert (Nishida *et al.*, 2005). Abb. 21 zeigt eine Auswahl an Xanthophyllen, die durch Reaktionen der  $\beta$ -Carotin-2,2'-Hydroxylase (CrtG),  $\beta$ -Carotin-3,3'-Hydroxylase (CrtZ) und der  $\beta$ -Carotin-Ketolase (CrtW) aus  $\beta$ -Carotin synthetisiert werden können.



**Abb. 21:** Ausschnitt aus der Carotinoid-Biosynthese in *Brevundimonas* sp. SD212. **CrtG** =  $\beta$ -Carotin-2,2'-Hydroxylase, **CrtW** =  $\beta$ -Carotin-Ketolase, **CrtZ** =  $\beta$ -Carotin-3,3'-Hydroxylase.

Für die Produktion von **Canthaxanthin** wurde *crtW* in pJOE5751.1 (Abb. 18Abb. 18) integriert (→pJH22.1). Anschließend wurde *E. coli* JM109 mit pJOE5607.5 ( $\beta$ -Carotin) und pJH22.1 transformiert. Um vergleichbare Bedingungen für die Messung der Carotinoid-Produktion eines Kontrollstammes zu schaffen, wurde ein „leerer“ pJOE5751.1 Vektor konstruiert, indem *eGFP* aus der Nukleotidsequenz deletiert wurde (→pJH43.1). Der Kontrollstamm *E. coli* JM109 pJOE5607.5/pJH43.1 wurde dann parallel zu *E. coli* JM109 pJOE5607.5/pJH22.1 kultiviert. Die

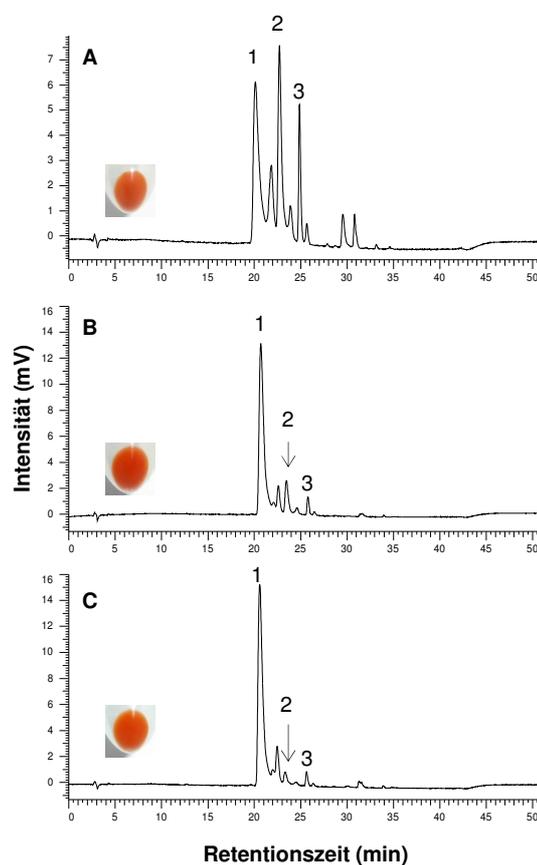


**Abb. 22:** HPLC-Chromatogramme (Methode 2) von *E. coli* JM109 Extrakten und Bilder der gefärbten Zellen. **A** pJOE5607.5/pJH43.1, **B** pJOE5607.5/pJH22.1. Peaks: **1**  $\beta$ -Carotin, **2** Canthaxanthin, **3** Canthaxanthin-(Z)-Isomer.

Farbe des Stammes mit pJOE5607.5/pJH22.1 wechselte durch die zusätzliche Expression von *crtW* im Vergleich zum Kontrollstamm von orange zu orangerot (Abb. 22). Die HPLC-Analyse ergab, dass es sich bei dem von *E. coli* JM109 pJOE5607.5/pJH22.1 produzierten Xanthophyll um Canthaxanthin handelt. *E. coli* JM109 pJOE5607.5/pJH22.1 produzierte ca. 0,77 mg Canthaxanthin pro Gramm Zelltrockenmasse (Tab. 37). Die  $\beta$ -Carotin-Ausbeute mit *E. coli* JM109 pJOE5607.5/pJH43.1 (Tab. 36) war im Vergleich zu *E. coli* JM109 pJOE5607.5 (Tab. 37) etwas geringer (0,76 bzw. 1,07 mg/g Ztrm.).

Die effiziente heterologe Biosynthese von **Astaxanthin** ist prinzipiell eine größere Herausforderung als die heterologe Biosynthese von Canthaxanthin, weil für die Herstellung von Astaxanthin aus  $\beta$ -Carotin zwei verschiedene Enzymreaktionen notwendig sind, die Hydroxylierungen an den C3- und C3'-Atomen durch *CrtZ* und die Einführung zweier Ketogruppen an den C4- und C4'-Atomen durch *CrtW* (Abb. 21). Je nachdem, welche der beiden Enzymreaktionen zuerst stattfindet, kommt es zur Bildung von unterschiedlichen Intermediaten. Die Prozessierung der bereits durch das erste Enzym modifizierten Verbindung ist jedoch nur dann möglich,

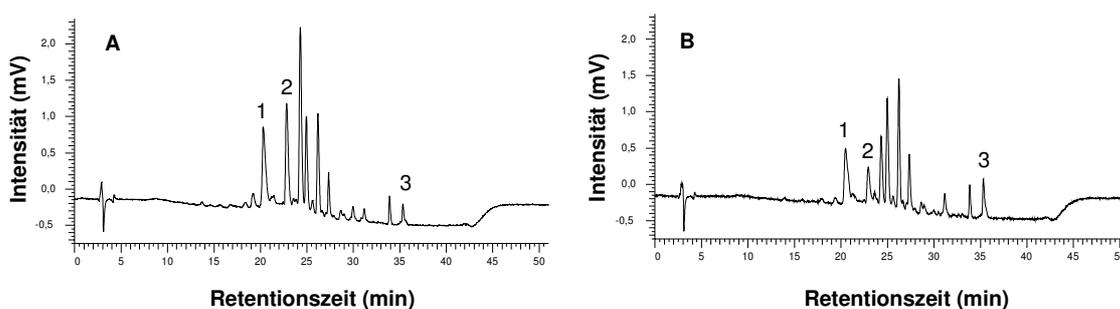
wenn das zweite Enzym diese als Substrat nutzen kann. In diesem Zusammenhang kommt der Auswahl der  $\beta$ -Carotin-Ketolase eine besondere Bedeutung zu. Es gibt so genannte CrtO- und CrtW-Typ  $\beta$ -Carotin-Ketolasen. Im Gegensatz zu CrtO-Typ Ketolasen, können Ketolasen vom CrtW-Typ Zeaxanthin als Substrat nutzen und sind daher prinzipiell besser für die Produktion von Astaxanthin geeignet (Choi *et al.*, 2007). Für die Konstruktion eines Vektors für die Astaxanthin-Produktion wurde *crtW* von *Brevundimonas* sp. SD212 amplifiziert und in pJH14.1 (Zeaxanthin) integriert ( $\rightarrow$ pJH15.3, In-Fusion 2.0 Dry Down PCR Cloning Kit). Die HPLC-Analyse der von *E. coli* JM109 pJH15.3 produzierten Carotinoide ergab, dass der Stamm ein Gemisch aus Astaxanthin (32 %), Zeaxanthin (30 %), Canthaxanthin (13 %) und anderen, nicht identifizierten Carotinoiden (25 %) produzierte (Abb. 23). Der Astaxanthin-Gehalt betrug 0,27 mg pro Gramm Zelltrockenmasse (Tab. 37). Um die Ausbeute sowie den prozentualen Anteil an Astaxanthin zu erhöhen, wurde *E. coli* JM109 mit pJH22.1 (*crtW*) und pJH14.1 (Zeaxanthin) transformiert. In der Literatur wurde beschrieben, dass CrtZ von *Brevundimonas* sp. SD212 besser für die Astaxanthin-Produktion geeignet ist als CrtZ von *Pantoea ananatis* (Makino *et al.*, 2008). Daher wurde ein weiteres Plasmid für die Zeaxanthin-Produktion konstruiert, indem *crtZ* von *Brevundimonas* sp. SD212 in pJOE5607.5 (Tab. 36) integriert wurde ( $\rightarrow$ pJH20.1, In-Fusion 2.0 Dry Down PCR Cloning Kit). Die HPLC-Analyse der von *E. coli* JM109 pJH14.1/pJH22.1 und *E. coli* JM109 pJH20.1/pJH22.1 synthetisierten Ca-



**Abb. 23:** HPLC-Chromatogramme (Methode 2) von *E. coli* JM109 Extrakten und Bilder der gefärbten Zellen. **A** pJH15.3, **B** pJH14.1/pJH22.1, **C** pJH20.1/pJH22.1. Peaks: **1** Astaxanthin, **2** Zeaxanthin, **3** Canthaxanthin.

rotinoide ergab, dass durch die Expression von *crtW* mit dem zweiten Replikon der prozentuale Anteil von Astaxanthin am Gesamtcarotinoid mit beiden Stämmen etwa gleich gut gesteigert werden konnte (Abb. 23, Tab. 37). *E. coli* JM109 pJH14.1/pJH22.1 produzierte 1,43 mg Astaxanthin pro Gramm Zelltrockenmasse. Der Anteil an Astaxanthin betrug 80 %. Neben Astaxanthin produzierte der Stamm 10 % Zeaxanthin, 4 % Canthaxanthin und 6 % nicht identifizierte Carotinoide. *E. coli* JM109 pJH20.1/ pJH22.1 produzierte 85 % Astaxanthin, 1 % Zeaxanthin, 3 % Canthaxanthin und 11% nicht identifizierte Carotinoide. Der Gehalt an Astaxanthin betrug 1,56 mg pro Gramm Zelltrockenmasse.

Für die Produktion von **Nostoxanthin** (Abb. 21) wurde *crtG* amplifiziert und in pJOE5751.1 integriert (→pJH33.1). Es zeigte sich, dass eine Koexpression der Carotinoid-Biosynthesegene von pJH14.1 und pJH33.1 sowie pJH20.1 und pJH33.1 keine besonders gute Produktion von Nostoxanthin ermöglicht. Abb. 24 zeigt die HPLC-Chromatogramme der *E. coli* JM109 Extrakte. In beiden Fällen ließen sich zahlreiche Peaks beobachten. Von diesen konnten drei als Nostoxanthin, Zeaxanthin und  $\beta$ -Carotin identifiziert werden. Der Nostoxanthin-Anteil betrug 13 % (pJH14.1/pJH33.1) oder 15 % (pJH20.1/pJH33.1). Die Carotinoid-Produktion der Stämme war insgesamt verhältnismäßig gering (Tab. 37).



**Abb. 24:** HPLC-Chromatogramme (Methode 2) von *E. coli* JM109 Extrakten. **A** pJH14.1/pJH33.1, **B** pJH20.1/pJH33.1. Peaks: **1** Nostoxanthin, **2** Zeaxanthin, **3**  $\beta$ -Carotin.

**Tab. 37:** Carotinoid-Biosynthesevektor-Kombinationen mit *crt*-Genen von *Pantoea ananatis* und *Brevundimonas* sp. SD212.

Plasmid(e)	<i>crt</i> -Gene	Produkt	Anteil*	Gehalt (mg/g Ztrm.)**
pJH15.3	<i>crtE, crtB, crtI, crtY, crtZ, crtW</i>	Astaxanthin	32 %	0,27
pJH20.1	<i>crtE, crtB, crtI, crtY, crtZ</i>	Zeaxanthin	92 %	1,01
pJOE5607.5/ pJH43.1	<i>crtE, crtB, crtI, crtY</i>	β-Carotin	90 %	0,76
pJOE5607.5/ pJH22.1	<i>crtE, crtB, crtI, crtY / crtW</i>	Canthaxanthin	91 %	0,77
pJH14.1/pJH22.1	<i>crtE, crtB, crtI, crtY, crtZ / crtW</i>	Astaxanthin	80 %	1,43
pJH20.1/pJH22.1	<i>crtE, crtB, crtI, crtY, crtZ / crtW</i>	Astaxanthin	85 %	1,56
pJH14.1/pJH33.1	<i>crtE, crtB, crtI, crtY, crtZ / crtG</i>	Nostoxanthin	13 %	2,78 x 10 <sup>-3</sup>
pJH20.1/pJH33.1	<i>crtE, crtB, crtI, crtY, crtZ / crtG</i>	Nostoxanthin	15 %	3,56 x 10 <sup>-3</sup>

\* Prozentualer Anteil der Fläche des jeweiligen Produkt-Peaks an der Summe der Flächen aller Peaks im HPLC-Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 450 nm.

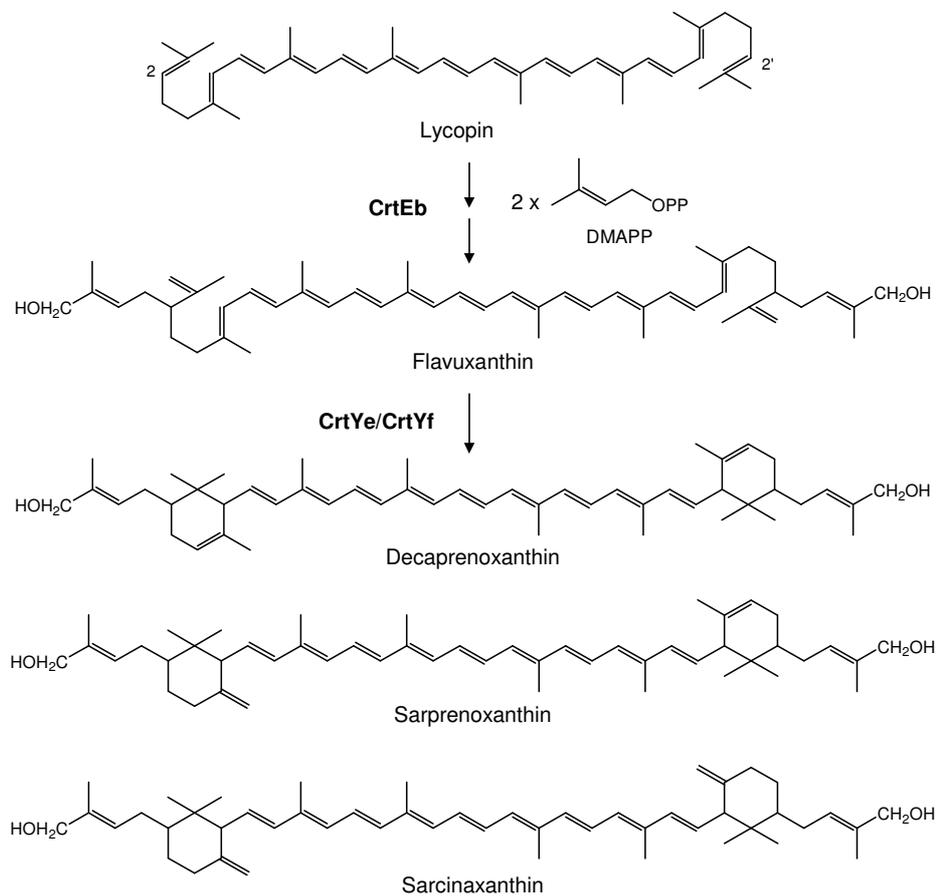
\*\* Mit *E. coli* JM109 in LB Gly NaPP produzierte Menge an Produkt.

#### 4.1.2.3 *Corynebacterium glutamicum*: C<sub>50</sub>-Carotinoide

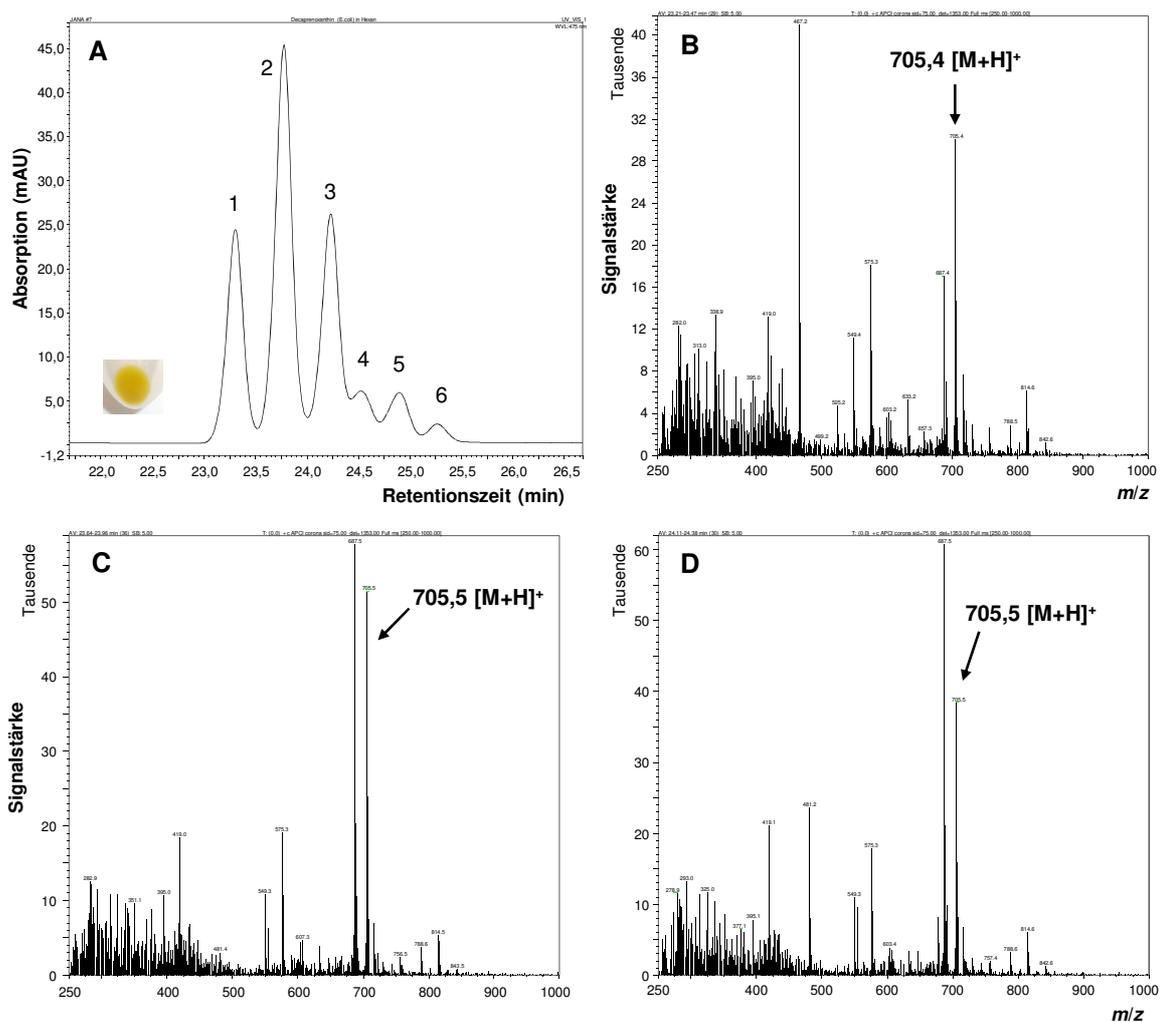
*Corynebacterium glutamicum* gehört zur Klasse der *Actinobacteria* und zur Familie der *Corynebacteriaceae*. Die Gene, die für die Synthese von C<sub>50</sub>-Carotinoiden in *Corynebacterium glutamicum* verantwortlich sind, wurden bereits kloniert und charakterisiert (Krubasik *et al.*, 2001; Netzer *et al.*, 2010). Abb. 25 zeigt die Synthese von Decaprenoxanthin, Sarprenoxanthin und Sarcinaxanthin aus Lycopin. Die Lycopin-Elongase CrtEb verknüpft jeweils ein Molekül Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) mit den C2- und C2'-Atomen von Lycopin, wodurch das acyclische Flavuxanthin gebildet wird. Bei CrtYe/CrtYf handelt es sich um eine heterodimere γ/ε-Cyclase. Durch die Anwesenheit des Enzyms kommt es zur Bildung von drei Hauptprodukten aus Flavuxanthin. Durch einen Vergleich der Retentionszeiten und Absorptionsspektren mit denen von Referenzsubstanzen wurden diese zunächst als Decaprenoxanthin, Decaprenoxanthin-Monoglucosid und Decapreno-

xanthin-DiglucoSID identifiziert (Krubasik *et al.*, 2001). Spätere Untersuchungen mittels Massen- und NMR-Spektrometrie zeigten aber, dass es sich um Sarcina-xanthin, Sarprenoxanthin und Decaprenoxanthin handelt (Netzer *et al.*, 2010). Die drei Substanzen haben identische Massen und Absorptionsmaxima.

Für die Produktion der genannten C<sub>50</sub>-Carotinoide wurden *crtEb*, *crtYe* und *crtYf* mittels PCR amplifiziert, wobei pJOE5700.3 als Matrize eingesetzt wurde. Das PCR-Produkt wurde dann in pJOE5573.3 integriert (→pJH29.10, In-Fusion 2.0 Dry Down PCR Cloning Kit). *E. coli* JM109 wurde mit pJH29.10 transformiert und für die Carotinoid-Produktion kultiviert. Die Expression der Gene führte zu einer gelb-grünen Färbung der Zellen (Abb. 26).



**Abb. 25:** Synthese von Decaprenoxanthin, Sarprenoxanthin und Sarcinaxanthin ausgehend von Lycopin in *Corynebacterium glutamicum*. **CrtEb** = Lycopin-Elongase, **CrtYe/CrtYf** = Flavuxanthin-γ/ε-Cyclase.



**Abb. 26:** LC-MS-Analyse eines Extraktes von *E. coli* JM109 pJH29.10. **A** HPLC-Chromatogramm und ein Bild der gefärbten Zellen, **B** Massenspektrum der Substanz von Peak 1, **C** Massenspektrum der Substanz von Peak 2, **D** Massenspektrum der Substanz von Peak 3. Peaks: **1** Sarcinaxanthin, **2** Sarprenoxanthin, **3** Decaprenoxanthin. Durchführung der Messungen: Judit Bóna-Lovász und Marion Fleischer, ISYS.

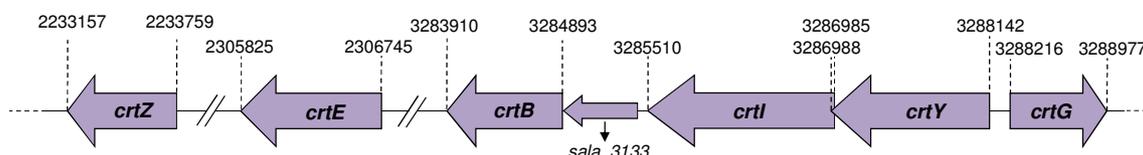
Das HPLC-Chromatogramm des Extraktes von *E. coli* JM109 pJH29.10 zeigte drei Hauptpeaks und drei kleinere Peaks. Peak 3 hatte die gleiche Retentionszeit wie der aus *Pseudomonas* sp. KK10206C isolierte Decaprenoxanthin-Standard. In der Probe war kein Lycopin nachweisbar. Die Massenspektren der Peaks 1 bis 5 zeigten alle ein  $m/z$ -Signal bei 705,4 oder 705,5., welches mit den Massen der  $[M+H]^+$ -Ionen von Decaprenoxanthin, Sarprenoxanthin und Sarcinaxanthin übereinstimmt. Netzer *et al.* (2010) verwendeten im Rahmen ihrer Messungen ebenfalls eine  $C_{18}$ -Phase. Als Laufmittel benutzten sie ein Gemisch aus Methanol und Acetonitril im Verhältnis 7:3. Decaprenoxanthin hatte bei diesem Versuchsaufbau

die längste Retentionszeit, Sarcinaxanthin die geringste. Sarprenoxanthin eluierte zwischen Decaprenoxanthin und Sarcinaxanthin. Die relative Peakfläche von Sarcinaxanthin betrug 30 %, die von Sarprenoxanthin 46 % und die von Decaprenoxanthin 19 %. Der Peak 2 in Abb. 26 A hat die größte Fläche und kann daher Sarprenoxanthin zugeordnet werden. Durch den Vergleich der Retentionszeit von Decaprenoxanthin, welches aus *Pseudomonas* sp. KK10206C extrahiert wurde, konnte Peak 3 als Decaprenoxanthin identifiziert werden. Demnach muss es sich bei Peak 1 um Sarcinaxanthin handeln. Bei Peak 4 bis Peak 6 könnte es sich um (Z)-Isomere der Substanzen handeln.

#### 4.1.2.4 *Sphingopyxis alaskensis* RB2256: Nostoxanthin

*Sphingopyxis alaskensis* RB2256 gehört zur Klasse der  $\alpha$ -Proteobacteria und zur Familie der *Sphingomonadaceae*. Bisher gab es bezüglich *S. alaskensis* RB2256 keine Publikationen, die die Carotinoide dieses Stammes oder die für deren Biosynthese verantwortlichen Gene behandeln. Andere Vertreter der Familie, wie z. B. *Sphingomonas paucimobilis*, *Sphingomonas jaspsi*, *Sphingomonas echinoides* oder *Sphingomonas astaxanthinifaciens*, produzieren Nostoxanthin und Zeaxanthin oder Astaxanthin (Asker *et al.*, 2007a; Asker *et al.*, 2007b; Rowe *et al.*, 2000). Das Genom von *S. alaskensis* RB2256 wurde sequenziert und die Sequenz in der GenBank® (Benson *et al.*, 2008) veröffentlicht. Für die Suche nach Carotinoid-Biosynthesegenen wurde die BLAST-Software (Altschul *et al.*, 1990) benutzt. Als Ausgangspunkt für die Suche wurden die Aminosäuresequenzen von bekannten Carotinoid-Biosynthesenzymen verwendet (Tab. 38). Die Suche ergab, dass *S. alaskensis* RB2256 mehrere mutmaßliche Carotinoid-Biosynthesegene besitzt. In Tab. 39 sind diejenigen Enzyme angegeben, für die es in *S. alaskensis* RB2256 einen Fund gab. Der Wert „Identität“ gibt den prozentualen Anteil der identischen Aminosäurereste der beiden verglichenen Proteine an. Der Wert „Ähnlichkeit“ gibt den prozentualen Anteil der identischen Aminosäurereste plus der konservativ substituierten Aminosäurereste an. Wenn man sich die Lokalisierung der in Tab. 39 aufgelisteten Gene im Genom von *S. alaskensis* RB2256 ansieht, so stellt man fest, dass einige von ihnen dicht beieinander liegen (Abb. 27). Dies betrifft *crtB*, *crtI*, *crtY* und *crtG*. Die Gene *crtE* und *crtZ* liegen

voneinander und von den übrigen Genen weiter entfernt. Zwischen *crtB* und *crtI* befindet sich noch ein weiteres Gen, *sala\_3133*, bei dem es sich um ein konserviertes Protein der Superfamilie cl00695 („DNA processing chain A“) handelt, welches keine Ähnlichkeit mit Carotinoid-Biosyntheseenzymen aufweist.



**Abb. 27:** Lokalisierung und Organisation von mutmaßlichen Carotinoid-Biosynthesegenen im Genom von *Shingopyxis alaskensis* RB2256.

**Tab. 38:** Für die BLAST-Suche nach Carotinoid-Biosyntheseenzymen in *Shingopyxis alaskensis* RB2256 verwendete Enzyme.

Protein	Funktion	Herkunft	Protein-ID
CrtA	Spheroidin-Monooxygenase	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	ABA79445.1
CrtB	Phytoin-Synthase	<i>Pantoea ananatis</i>	BAA14128.1
CrtC	Hydroxyneurosporin-Synthase	<i>Rhodobacterales</i>	ZP_05075447.1
CrtD	C3',C4'-Desaturase	<i>Prochlorococcus marinus</i>	ZP_05138833.1
CrtE	Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase	<i>Pantoea ananatis</i>	BAA14124.1
CrtF	Hydroxyneurosporin-O-Methyltransferase	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	YP_353339.1
CrtG	$\beta$ -Carotin-2,2'-Hydroxylase	<i>Brevundimonas</i> sp. SD212	BAD99415.1
CrtI	Phytoin-Desaturase	<i>Pantoea ananatis</i>	BAA14127.1
CrtO	$\beta$ -Carotin-Ketolase	<i>Synechocystis</i> sp.	NP_442491.1
CrtU	$\beta$ -Carotin-Desaturase	<i>Streptomyces griseus</i>	YP_001828338.1
CrtW	$\beta$ -Carotin-Ketolase	<i>Brevundimonas</i> sp. SD212	BAD99406.1
CrtX	Zeaxanthin-Glucosyltransferase	<i>Pantoea ananatis</i>	P21686.1
CrtY	Lycopin- $\beta$ -Cyclase	<i>Pantoea ananatis</i>	BAA14126.1
CrtZ	$\beta$ -Carotin-3,3'-Hydroxylase	<i>Pantoea ananatis</i>	BAA14129.1

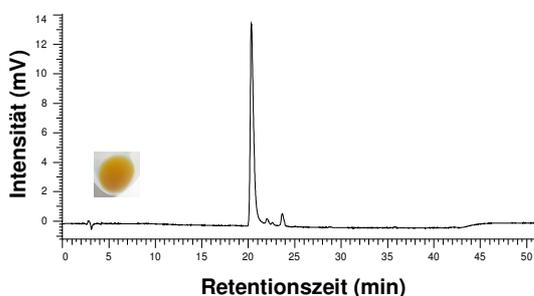
**Tab. 39:** Mutmaßliche Carotinoid-Biosyntheseenzyme von *Sphingopyxis alaskensis* RB2256.

Enzym	Suchergebnis für <i>Sphingopyxis</i>	Annotation des kodierenden Gens	Identität (%) <sup>*</sup>	Ähnlichkeit (%) <sup>**</sup>
CrtB	Sala_3132	squalene/phytoene synthase	41	54
CrtE	Sala_2194	polyprenyl synthetase	36	51
CrtG	Sala_3136	sterol desaturase	44	61
CrtI	Sala_3134	amine oxydase	55	70
CrtY	Sala_3135	lycopene cyclase	44	59
CrtZ	Sala_2128	carotene hydroxylase	50	65

\* Prozentualer Anteil der identischen Aminosäurereste der beiden verglichenen Proteine.

\*\* Prozentualer Anteil der identischen Aminosäurereste plus der konservativ substituierten Aminosäurereste der beiden verglichenen Proteine.

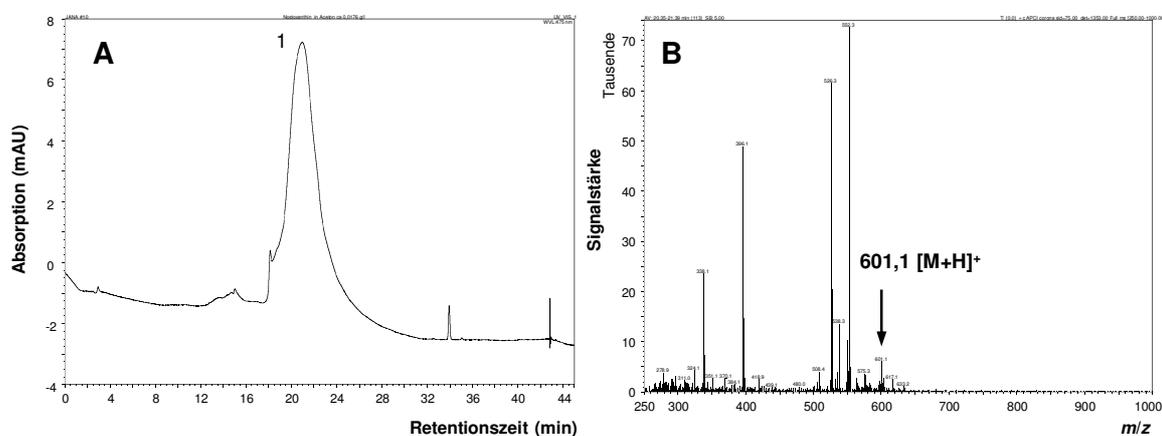
Anhand der identifizierten Gene lässt sich postulieren, dass *S. alaskensis* RB2256 wahrscheinlich Nostoxanthin (Abb. 21) produziert. Das Bakterium lässt sich einfach in LB bei 30 °C kultivieren. Ein Extrakt der gelb gefärbten Zellen wurde mittels HPLC analysiert. Abb. 28 zeigt das HPLC-Chromatogramm. Der erste und größte Peak hatte eine Retentionszeit von 20,5 min. Zeaxanthin hatte bei der durchgeführten Methode eine Retentionszeit von 23 min (vgl. Abb. 20 C). Das Hauptcarotinoid von *S. alaskensis* RB2256 ist also hydrophiler als Zeaxanthin. Im Massenspektrum der Substanz wurde ein schwaches *m/z*-Signal bei 601,1 gemessen, welches mit der Masse des  $[M+H]^+$ -Ions von Nostoxanthin (exakte Masse 600,42)



**Abb. 28:** HPLC-Chromatogramm (Methode 2) eines Extraktes von *Sphingopyxis alaskensis* RB2256 und ein Bild der gefärbten Zellen.

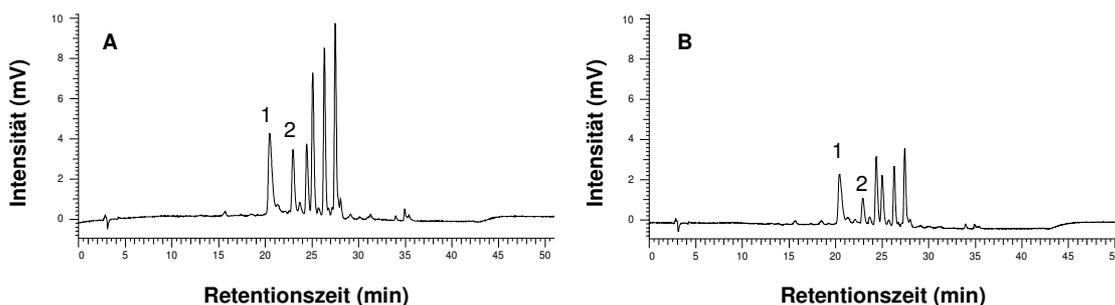
übereinstimmt (Abb. 29). Das Hauptcarotinoid von *S. alaskensis* RB2256 wurde mittels präparativer Dünnschichtchromatographie isoliert und dessen Absorptionsmaxima in verschiedenen Lösungsmitteln photometrisch bestimmt. In Aceton wurden Maxima bei 453,0 und 479,7 gemessen, in Ethanol bei 451,0 und 477,2 nm und in Dichlormethan bei

459,1 und 487,5 nm. Die Messdaten stimmen mit den in der Literatur angegebenen Werten für Nostoxanthin überein, welche in Aceton bei 453,0 und 480 nm und in Ethanol bei 449 und 477 nm angegeben wurden (Britton *et al.*, 2004).



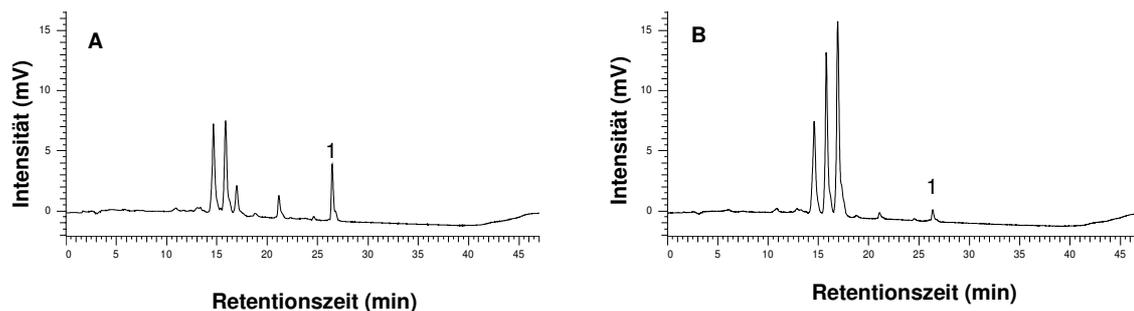
**Abb. 29:** LC-MS-Analyse eines Extraktes von *Shingopyxis alaskensis* RB2256. **A** HPLC-Chromatogramm, **B** Massenspektrum der Substanz von Peak 1. Durchführung der Messungen: Judit Bóna-Lovász und Marion Fleischer, ISYS.

Von den Genen von *S. alaskensis* RB2256 ist *crtG* besonders interessant. Es wurde bereits *crtG* von *Brevundimonas* sp. SD212 mit den Zeaxanthin-Biosynthesegenen von pJH14.1 und pJH20.1 koexprimiert. Dabei konnten nur sehr geringe Mengen Nostoxanthin produziert werden (Tab. 37). Um die Identität des mutmaßlichen CrtG von *S. alaskensis* RB2256 als  $\beta$ -Endgruppen-C2,C2'-Hydroxylase zu bestätigen, wurde *crtG* in pJOE5751.1 integriert ( $\rightarrow$ pJH74.1). *E. coli* JM109 wurde dann mit jeweils einem der Zeaxanthin-Biosynthesepasmide und pJH74.1 transformiert. Die HPLC-Chromatogramme der Extrakte von *E. coli* JM109 pJH14.1/pJH74.1 und *E. coli* JM109 pJH20.1/pJH74.1 (Abb. 30) zeigten die gleichen Peaks wie die Chromatogramme in Abb. 24. Das heißt, dass durch die Aktivität von CrtG von *Brevundimonas* sp. SD212 die gleichen Produkte gebildet werden wie durch CrtG von *S. alaskensis* RB2256. Die Carotinoid-Gehalte der beiden *E. coli* JM109 Stämme, die *crtG* von *S. alaskensis* RB2256 koexprimierten waren im Vergleich zu den *E. coli* JM109 Stämmen, die *crtG* von *Brevundimonas* sp. SD212 koexprimierten, deutlich höher (vgl. Tab. 37 und Tab. 40).



**Abb. 30:** HPLC-Chromatogramme (Methode 2) von *E. coli* JM109 Extrakten. **A** pJH14.1/pJH74.1, **B** pJH20.1/pJH74.1. Peaks: **1** Nostoxanthin, **2** Zeaxanthin.

Es blieb die Frage offen, welches der beiden Enzyme die Nostoxanthin-Synthese limitiert, CrtZ oder CrtG. Es wurde deshalb noch untersucht, ob und wie gut CrtG das Substrat  $\beta$ -Carotin umsetzt. Hierfür wurde die Carotinoid-Produktion von *E. coli* JM109 pJOE5607.5/pJH33.1 und *E. coli* pJOE5607.5/pJH74.1 untersucht. Auch in diesem Fall war die Gesamtcarotinoid-Produktion des Stammes, welcher *crtG* von *S. alaskensis* RB 2256 exprimiert im Vergleich zu dem Stamm, welcher *crtG* von *Brevundimonas* sp. SD212 exprimiert deutlich höher. In der Literatur hieß es, dass CrtG von *Brevundimonas* sp. SD212 hydroxylierte  $\beta$ -Endgruppen als Substrat benötigt und  $\beta$ -Carotin nicht umsetzt (Nishida *et al.*, 2005). Dies konnte jedoch nicht bestätigt werden. Abb. 31 zeigt die HPLC-Chromatogramme von Extrakten der beiden Stämme. In beiden Fällen wurde  $\beta$ -Carotin umgesetzt. Es sind jeweils vier neue Peaks zu sehen. Neben diesen neuen Produkten war in der Probe auch noch  $\beta$ -Carotin vorhanden, wobei der relative  $\beta$ -Carotin-Anteil in der Probe von *E. coli* JM109 pJOE5607.5/pJH33.1 höher war als in der Probe von *E. coli* JM109 pJOE5607.5/pJH74.1. Im Gegensatz zu CrtZ, welches hauptsächlich Zeaxanthin aus  $\beta$ -Carotin synthetisiert, kam es durch die zusätzliche Expression von *crtG* zu den Genen für die  $\beta$ -Carotin-Synthese nicht zur Bildung eines Hauptproduktes, sondern zur Bildung von mehreren Produkten. Da es sich bei CrtG-Enzymen um  $\beta$ -Ring-C2,C2'-Hydroxylasen handelt, könnte es sich bei zwei der drei Substanzen um 2-Hydroxy- $\beta$ -carotin und 2,2'-Dihydroxy- $\beta$ -carotin (Abb. 21) handeln.



**Abb. 31:** HPLC-Chromatogramme von *E. coli* JM109 Extrakten (Methode 1). **A** pJOE5607.5/pJH33.1, **B** pJOE5607.5/pJH74.1. Peaks: **1**  $\beta$ -Carotin.

**Tab. 40:** Carotinoid-Biosynthesevektor-Kombinationen mit *crt*-Genen von *Pantoea ananatis*, *Brevundimonas* sp. SD212 und *Sphingopyxis alaskensis* RB2256.

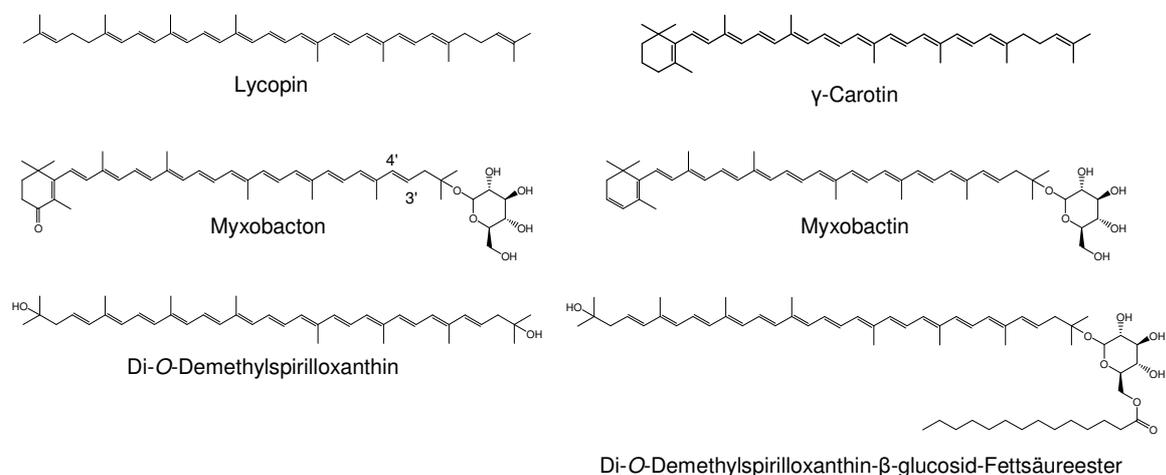
Plasmid(e)	<i>crt</i> -Gene	Produkt	Anteil*	Gehalt (mg/g Ztrm.)**
pJH14.1/pJH74.1	<i>crtE</i> , <i>crtB</i> , <i>crtI</i> , <i>crtY</i> , <i>crtZ</i> / <i>crtG</i>	Nostoxanthin	16 %	$40,46 \times 10^{-3}$
pJH20.1/pJH74.1	<i>crtE</i> , <i>crtB</i> , <i>crtI</i> , <i>crtY</i> , <i>crtZ</i> / <i>crtG</i>	Nostoxanthin	20 %	$24,28 \times 10^{-3}$

\* Prozentualer Anteil der Fläche des jeweiligen Produkt-Peaks an der Summe der Flächen aller Peaks im HPLC-Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 450 nm.

\*\* Mit *E. coli* JM109 in LB Gly NaPP produzierte Menge an Produkt.

4.1.2.5 *Plesiocystis pacifica* SIR-1:  $\beta$ -Carotin, Hydroxylicopin, Dihydroxylicopin und Isorenieratin

*Plesiocystis pacifica* SIR-1 gehört zur Klasse der  $\delta$ -Proteobacteria und zur Ordnung der Myxococcales (Familie Nannocystaceae). Das Genom von *P. pacifica* SIR-1 wurde sequenziert und bisher gab es noch keine Veröffentlichungen bezüglich der Carotinoide oder Carotinoid-Biosynthesegene dieses Bakteriums. Myxobakterien produzieren acyclische oder monocyclische C<sub>40</sub>-Carotinoide. Charakteristischerweise liegen diese zum Teil als Glucoside oder Glucosid-Fettsäureester vor. Abb. 32 zeigt einige Beispiele für Carotinoide von Myxobakterien. *Chondromyces apiculatus* produziert hauptsächlich Lycopin und  $\gamma$ -Carotin sowie ihre Hydroxyderivate und deren Glucosid-Fettsäureester (Kleinig und Reichenbach, 1973). In *Stigmatella aurantiaca* kommen vor allem Myxobacton, Myxobactin und ihre Fettsäureester vor (Kleinig *et al.*, 1970). *Polyangium fumosum* produziert Di-O-Demethylspirilloxanthin sowie dessen Glucosid und Glucosid-Fettsäureester (Jansen *et al.*, 1995).



**Abb. 32:** Beispiele für Carotinoide von Myxobakterien.

Für die Suche nach Carotinoid-Biosynthesegenen im Genom von *P. pacifica* SIR-1 wurden die Aminosäuresequenzen von bekannten Carotinoid-Biosynthesenzymen verwendet (Tab. 41). Die GenBank<sup>®</sup>-Suche erfolgte wieder mit der BLAST-Software.

**Tab. 41:** Für die BLAST-Suche nach Carotinoid-Biosyntheseenzymen in *Plesiocystis pacifica* SIR-1 verwendete Enzyme.

Protein	Funktion	Herkunft	Protein-ID
CrtA	Spheroidin-Monooxygenase	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	ABA79445.1
CrtB	Phytoin-Synthase	<i>Myxococcus xanthus</i>	YP_629157.1
CrtC	Hydroxyneurosporin-Synthase	<i>Myxococcus xanthus</i>	YP_629159.1
CrtD	Hydroxyneurosporin-Desaturase	<i>Myxococcus xanthus</i>	YP_629158.1
CrtE	Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase	<i>Myxococcus xanthus</i>	YP_629155.1
CrtF	Hydroxyneurosporin-O-Methyltransferase	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	YP_003576857.1
CrtG	$\beta$ -Carotin-2,2'-Hydroxylase	<i>Brevundimonas</i> sp. SD212	BAD99415.1
CrtIa	Phytoin-Desaturase a	<i>Myxococcus xanthus</i>	YP_629156.1
CrtIb	Phytoin-Desaturase b	<i>Myxococcus xanthus</i>	YP_635055.1
CrtO	$\beta$ -Carotin-Ketolase	<i>Synechocystis</i> sp.	NP_442491.1
CrtU	$\beta$ -Carotin-Desaturase	<i>Streptomyces griseus</i>	YP_001828338.1
CrtW	$\beta$ -Carotin-Ketolase	<i>Brevundimonas</i> sp. SD212	BAD99406.1
CrtX	Zeaxanthin-Glucosyltransferase	<i>Pantoea ananatis</i>	P21686.1
CrtY	Lycopin- $\beta$ -Cyclase	<i>Pantoea ananatis</i>	BAA14126.1
CrtZ	$\beta$ -Carotin-3,3'-Hydroxylase	<i>Pantoea ananatis</i>	BAA14129.1

Die Recherche ergab kein so eindeutiges Ergebnis wie bei *S. alaskensis* RB2256. Für die meisten getesteten Enzyme kommen bei *P. pacifica* SIR-1 gleich mehrere Gene in Frage. Tab. 42 zeigt das jeweils beste Ergebnis mit den höchsten „Identität“- und „Ähnlichkeit“-Werten. In Klammern ist außerdem die Anzahl der Suchergebnisse angegeben. Vor allem die Suche nach den Desaturasen CrtD, CrtIa und CrtIb ergab zahlreiche Ergebnisse. Das beste Ergebnis ist bei allen drei dasselbe, nämlich Ppsir1\_32944. Bei CrtD-Enzymen handelt es sich um Dehydrogenasen, die eine Doppelbindung zwischen dem C3'- und dem C4'-Atom einführen (Abb. 32). Die Doppelbindung an dieser Stelle ist für Carotinoid-Glucoside von Myxobakterien charakteristisch (Kleinig und Reichenbach, 1973). Für *Myxococcus xanthus* wurden die zwei Desaturasen CrtIa und CrtIb beschrieben, von denen eine jeweils zwei Doppelbindungen in Phytoin einführt. Für die Synthese von

Lycopin müssen beide Desaturasen vorhanden sein (Iniesta *et al.*, 2007). Möglicherweise gibt es auch in *P. pacifica* SIR-1 mehrere Desaturasen mit jeweils spezifischer Funktion.

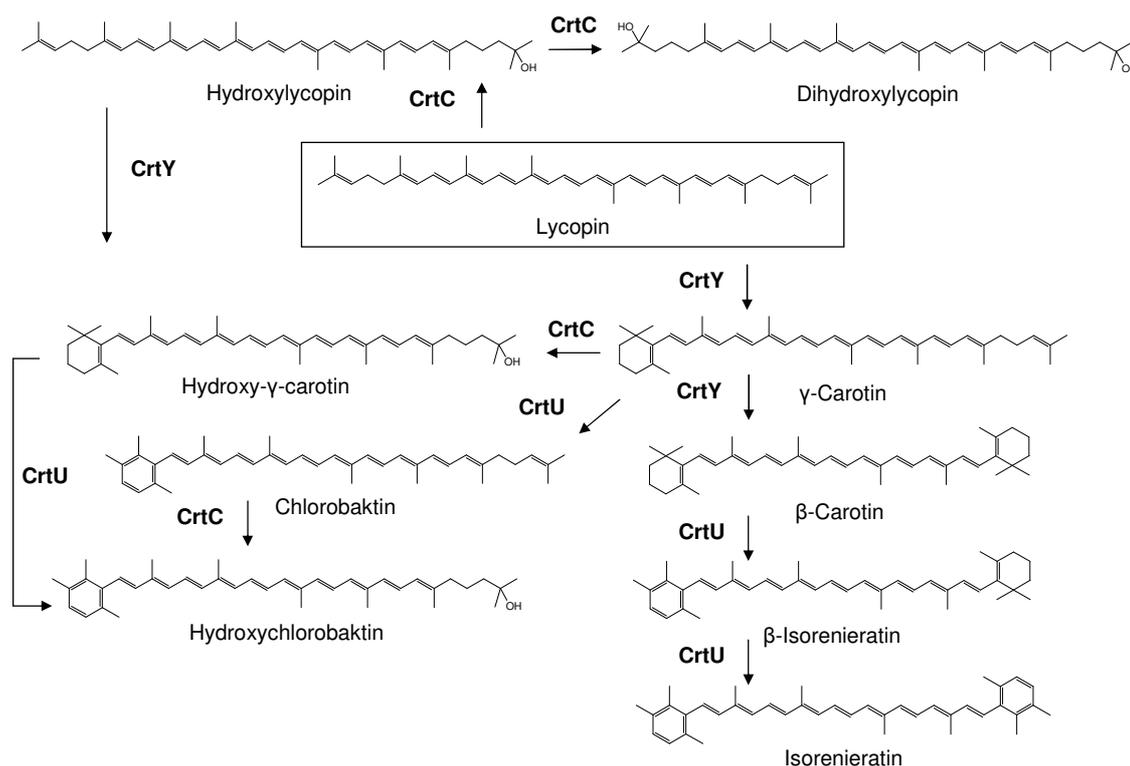
Da von *P. pacifica* SIR-1 nur die chromosomale DNA und nicht der Stamm selbst zur Verfügung stand, wurden die von diesem Bakterium natürlicherweise produzierten Carotinoide nicht analysiert. Für die Untersuchungen wurden die mutmaßlichen Gene *crtU* (*ppsir1\_36107*), *crtY* (*ppsir1\_19284*) und *crtC* (*ppsir1\_30569*) ausgewählt. Abb. 33 zeigt eine Übersicht der Carotinoide, die sich möglicherweise mit den entsprechenden Enzymen synthetisieren lassen. Neben der Bestätigung ihrer Identitäten war aufgrund der Tatsache, dass alle bisher bekannten Carotinoide von Myxobakterien acyclisch oder monocyclisch sind auch die Klärung der Frage interessant, ob die Enzyme ihre Substrate asymmetrisch oder symmetrisch modifizieren.

**Tab. 42:** Mutmaßliche Carotinoid-Biosyntheseenzyme in *Plesiocystis pacifica* SIR-1.

Enzym	Bestes Ergebnis (Anzahl Ergebnisse)	Annotation des kodierenden Gens	Identität (%)*	Ähnlichkeit (%)**
CrtB	Ppsir1_11195 (3)	phytoene/squalene synthetase	32	48
CrtC	Ppsir1_30569 (1)	hydroxyneurosporene synthase	31	42
CrtD	Ppsir1_32944 (5)	phytoene desaturase and related proteins	29	42
CrtE	Ppsir1_10480 (6)	geranylgeranyl pyrophosphate synthase	35	50
CrtF	Ppsir1_26388 (1)	hypothetical protein	26	39
CrtG	Ppsir1_06256 (4)	sterol desaturase family protein	31	50
CrtIa	Ppsir1_32944 (5)	phytoene desaturase and related proteins	36	55
CrtIb	Ppsir1_32944 (4)	phytoene desaturase and related proteins	31	51
CrtU	Ppsir1_36107 (2)	hypothetical protein	35	49
CrtY	Ppsir1_19284 (1)	lycopene cyclase, beta and epsilon	21	39

\* Prozentualer Anteil der identischen Aminosäurereste der beiden verglichenen Proteine.

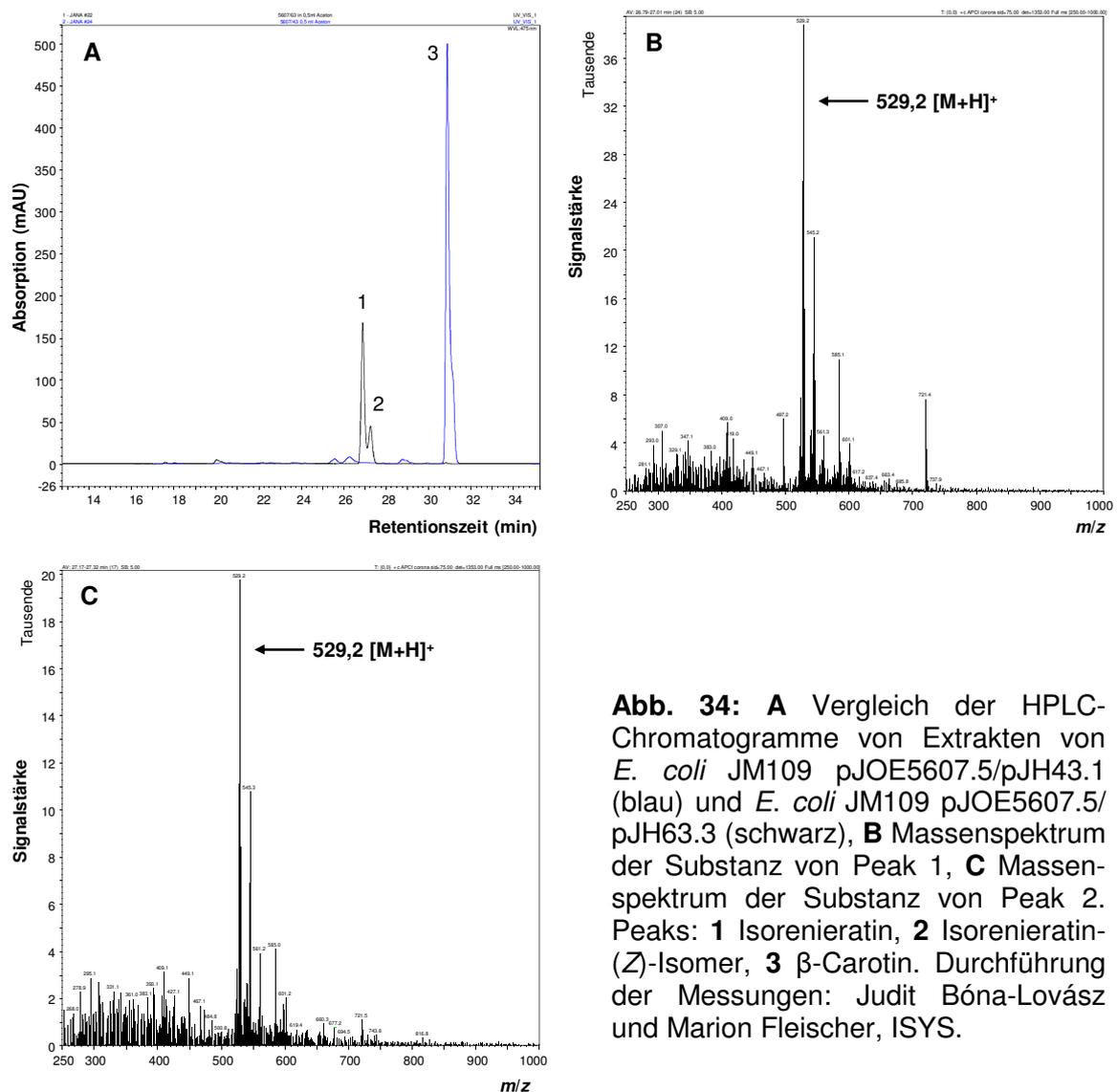
\*\* Prozentualer Anteil der identischen Aminosäurereste plus der konservativ substituierten Aminosäurereste der beiden verglichenen Proteine.



**Abb. 33:** Hypothetische Carotinoid-Biosynthese mit Enzymen von *Plesiocystis pacifica* SIR-1. **CrtC** =  $\psi$ -Engruppen-C1,C1'-Hydroxylase, **CrtU** =  $\beta$ -Carotin-Desaturase, **CrtY** = Lycopin- $\beta$ -Cyclase.

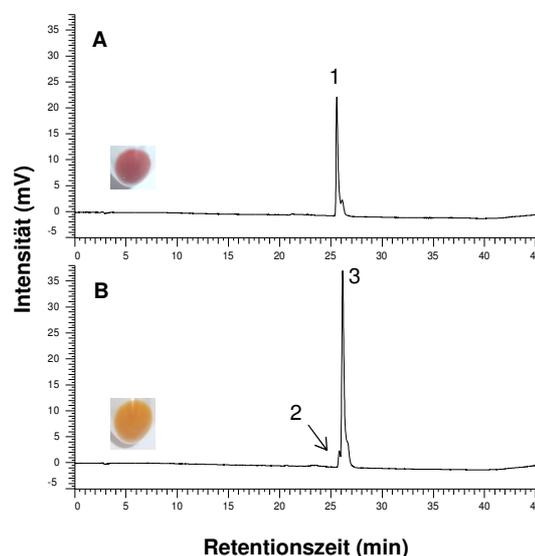
Für die funktionelle Charakterisierung der mutmaßlichen  $\beta$ -Carotin-Desaturase **CrtU** von *P. pacifica* SIR-1 wurde *ppsir1\_36107* mittels PCR amplifiziert und in pJOE5751.1 integriert ( $\rightarrow$ pJH63.3). *E. coli* JM109 wurde dann mit pJOE5607.5 ( $\beta$ -Carotin) und pJH63.3 transformiert und für die Carotinoid-Produktion kultiviert. Im Vergleich zum Kontrollstamm *E. coli* JM109 pJOE5607.5/pJH43.1 waren die Zellen von *E. coli* JM109 pJOE5607.5/pJH63.3 eher gelblich als orange gefärbt (Bilder nicht gezeigt). Extrakte der beiden Stämme wurden mittels LC-MS analysiert (Durchführung der Messungen: Judit Bóna-Lovász und Marion Fleischer, ISYS). Das von *E. coli* JM109 pJOE5607.5/pJH63.3 produzierte Carotinoid ist hydrophiler als das vom Kontrollstamm *E. coli* JM109 pJOE5607.5/pJH43.1 produzierte  $\beta$ -Carotin (Abb. 34, A). Im HPLC-Chromatogramm des Extraktes von *E. coli* JM109 pJOE5607.5/pJH63.3 zeigten sich zwei Peaks mit Retentionszeiten von 26,90 und 27,25 min. Die exakte Masse von Isorenieratin beträgt 528,38. Im Massenspektrum der Substanz von Peak 1 konnte ein  $m/z$ -Signal bei 529,2

gemessen werden, welches wahrscheinlich dem  $[M+H]^+$ -Ion von Isorenieratin entspricht. Die Substanz von Peak 2 zeigte im Massenspektrum ebenfalls ein  $m/z$ -Signal bei 529,2. Die Absorptionsmaxima von der Substanz von Peak 1 lagen bei 452 und 479 nm (Durchführung der Messungen: Holger Beuttler, ITB). In der Literatur wurden für Isorenieratin Absorptionsmaxima bei 427, 453 und 481 nm angegeben (Kim *et al.*, 2010a). Bei der Substanz von Peak 1 handelt es sich wahrscheinlich um Isorenieratin. Die Substanz von Peak 2 könnte ein (*Z*)-Isomer von Isorenieratin sein. Durch die Messungen konnte die Identität von Ppsir1\_36107 als  $\beta$ -Carotin-Desaturase (CrtU) bestätigt werden. In der Probe war kein  $\beta$ -Isorenieratin (Abb. 33) nachweisbar, was bedeutet, dass das Enzym beide Endgruppen von  $\beta$ -Carotin modifiziert.



**Abb. 34:** **A** Vergleich der HPLC-Chromatogramme von Extrakten von *E. coli* JM109 pJOE5607.5/pJH43.1 (blau) und *E. coli* JM109 pJOE5607.5/pJH63.3 (schwarz), **B** Massenspektrum der Substanz von Peak 1, **C** Massenspektrum der Substanz von Peak 2. Peaks: **1** Isorenieratin, **2** Isorenieratin-(*Z*)-Isomer, **3**  $\beta$ -Carotin. Durchführung der Messungen: Judit Bóna-Lovász und Marion Fleischer, ISYS.

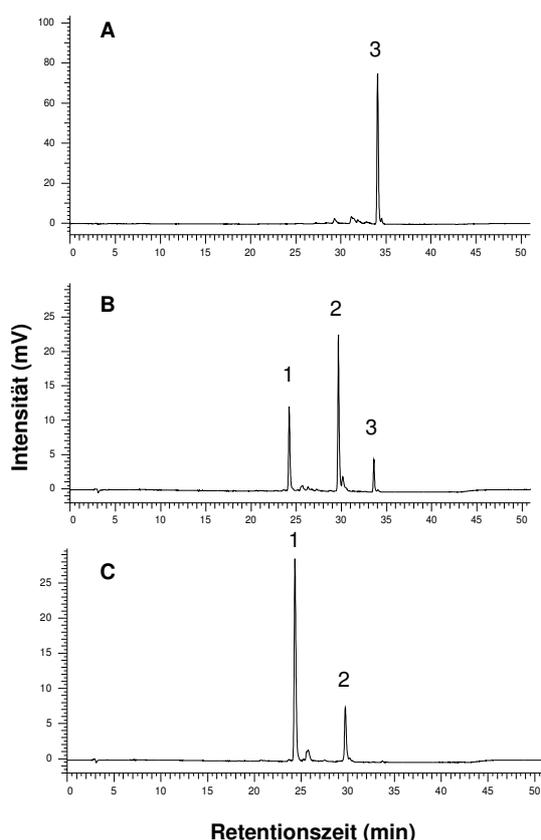
Für Untersuchung der Enzymaktivität des mutmaßlichen **CrtY** wurde *ppsir1\_19284* amplifiziert und in pJOE5751.1 integriert ( $\rightarrow$ pJH64.2). Anschließend wurde die Carotinoid-Produktion von *E. coli* JM109 pJOE5573.3/pJH64.2 untersucht. Im Vergleich zum Lycopin-produzierenden Kontrollstamm mit pJOE5573.3/pJH43.1 wechselte die Farbe der Zellen durch die zusätzliche Expression von *ppsir1\_19284* durch pJH64.2 von rosa zu orange (Abb. 35). In dem Chromatogramm (Abb. 35 B) war vor dem Hauptpeak (3) noch ein kleinerer Peak (2) sichtbar. Kleine Peaks nach einem großen Peak, die mit diesem zum Teil überlappen, sind meistens (*Z*)-Isomere des betreffenden Carotinoide. Ein Peak vor dem Hauptpeak war bei der angewendeten HPLC-Methode normalerweise nicht zu beobachten. Wie bereits erwähnt, kann mit einer  $C_{18}$ -Phase keine Trennung von Lycopin und  $\beta$ -Carotin erreicht werden. Für die weitere Charakterisierung der von *E. coli* JM109 pJOE5573.3/pJH64.2 produzierten Carotinoide wurde ein Extrakt mittels HPLC mit einer  $C_{30}$ -Phase und Absorptions-Messung mittels Photodiodenarray-Detektor untersucht (Durchführung der Messungen: Holger Beuttler, ITB). Für die Substanz von Peak 2 wurden Absorptionsmaxima bei 435, 461 und 488 nm gemessen. In der Literatur wurden für  $\gamma$ -Carotin in Ethanol Maxima bei 440, 460 und 489 nm angegeben (Britton *et al.*, 2004). Für die Substanz von Peak 3 wurden Absorptionsmaxima bei 452 und 479 nm gemessen. In der Literatur wurden für  $\beta$ -Carotin in Aceton Maxima bei 429, 452 und 478 nm angegeben (Britton *et al.*, 2004). Die Probe wurde mit  $\beta$ -Carotin aufgestockt und erneut gemessen. Dies bewirkte eine Vergrößerung von Peak 3. Bei der Substanz von Peak 2 handelt es sich sehr wahrscheinlich um  $\gamma$ -Carotin und bei der Substanz von Peak 3 um  $\beta$ -Carotin. Mit Hilfe der durch *Ppsir1\_19283* aus



**Abb. 35:** HPLC-Chromatogramme (Methode 1) von *E. coli* JM109 Extrakten und Bilder der gefärbten Zellen. **A** pJOE5573.3/pJH43.1, **B** pJOE5573.3/pJH64.2. Peaks: **1** Lycopin, **2**  $\gamma$ -Carotin, **3**  $\beta$ -Carotin.

Lycopin gebildeten Produkte konnte das Enzym als Lycopin- $\beta$ -Cyclase (CrtY) identifiziert werden. CrtY von *P. pacifica* SIR-1 modifiziert den überwiegenden Teil des Carotinoid-Substrates Lycopin symmetrisch. Allerdings gab es hier einen nachweisbaren Anteil von  $\gamma$ -Carotin. Eine Verlängerung der Kultivierungsdauer auf drei Tage konnte den Anteil an  $\gamma$ -Carotin nicht verringern (Messdaten nicht gezeigt).

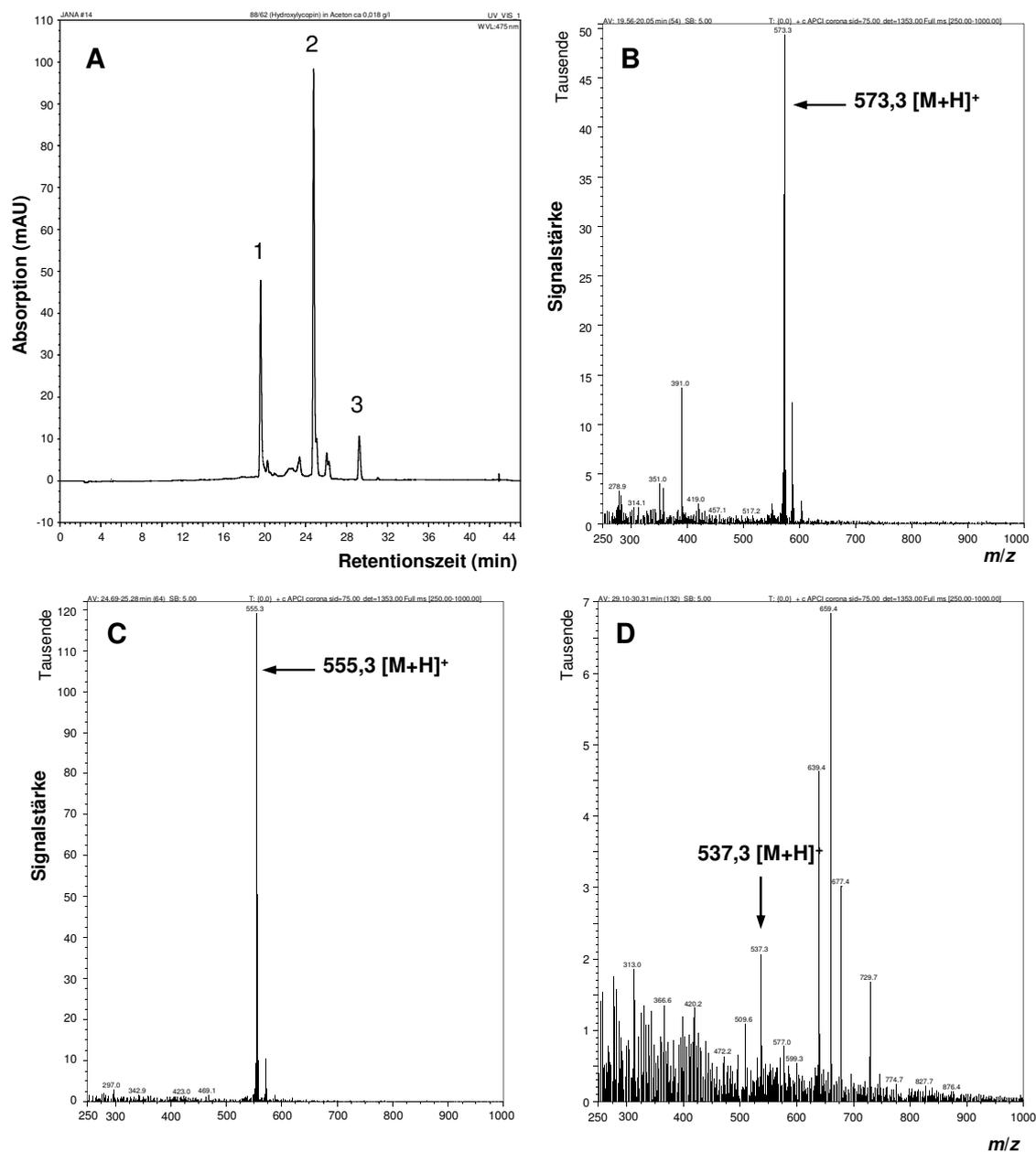
Als drittes wurde die Enzymaktivität des mutmaßlichen **CrtC** untersucht. Hierfür wurde *ppsir1\_30569* mittels PCR amplifiziert und in pJOE5751.1 integriert ( $\rightarrow$ pJH65.1). Außerdem wurde noch ein weiterer Vektor konstruiert, indem *ppsir1\_30569* direkt hinter die Lycopin-Biosynthesegene in pJOE5573.3 integriert wurde ( $\rightarrow$ pJH88.1). *E. coli* JM109 wurde dann mit pJH88.1 oder mit pJOE5573.3 (Lycopin) und pJH65.1 transformiert und für die Carotinoid-Produktion kultiviert.



**Abb. 36:** HPLC-Chromatogramme (Methode 2) von *E. coli* JM109 Extrakten. **A** pJOE5573.3, **B** pJH88.1, **C** pJOE5573.3/pJH65.1. Peaks: **1** Dihydroxylycopin, **2** Hydroxylycopin, **3** Lycopin.

Bezüglich der Färbung der Zellen war durch die zusätzliche Expression von *ppsir1\_30569* im Vergleich zum Lycopin-produzierenden Kontrollstamm nur eine leichte Veränderung im Farbton festzustellen (Bilder nicht gezeigt). Extrakte der Zellen wurden mittels HPLC untersucht. Abb. 36 zeigt die HPLC-Chromatogramme. Der Kontrollstamm *E. coli* JM109 pJOE5573.3 produzierte Lycopin (Peak 3). Das Chromatogramm des Extraktes von *E. coli* JM109 pJH88.1 zeigte außer dem Lycopin-Peak noch zwei weitere Peaks (1, 2). Beide Substanzen hatten eine deutlich geringere Retentionszeit als Lycopin. Peak 2 hatte von den drei Peaks die größte Fläche. In dem Extrakt von *E. coli* JM109 pJOE5573.3/pJH65.1 (C) war kein Lycopin nachweisbar. In dem HPLC-Chromatogramm hatte Peak 1

die größte Fläche. Die Expression von *ppsir1\_30569* mit dem zweiten Replikon führte demnach zu einer besseren Umsetzung von Lycopin. Eine Verlängerung der Kultivierungsdauer auf drei Tage brachte keine weitere Steigerung des Anteils von Peak 1 (Messdaten nicht gezeigt).



**Abb. 37:** LC-MS-Analyse eines Extraktes von *E. coli* JM109 pJH88.1. **A** HPLC-Chromatogramm, **B** Massenspektrum der Substanz von Peak 1, **C** Massenspektrum der Substanz von Peak 2, **D** Massenspektrum der Substanz von Peak 3. Peaks: **1** Dihydroxylycopin, **2** Hydroxylycopin, **3** Lycopin. Durchführung der Messungen: Judit Bóna-Lovász und Marion Fleischer, ISYS.

Für die Identifizierung der beiden unbekanntenen Carotinoide wurde ein Extrakt von *E. coli* JM109 pJH88.1 mittels LC-MS analysiert (Durchführung der Messungen: Judit Bóna-Lovász und Marion Fleischer, ISYS). Abb. 37 zeigt das HPLC-Chromatogramm des Extraktes und die Massenspektren der Substanzen von Peak 1-3. Im Massenspektrum der Substanz von Peak 1 konnte ein  $m/z$ -Signal bei 573,3 gemessen werden, welches mit der Masse des  $[M+H]^+$ -Ions von Dihydroxylycopin (exakte Masse 572,46) übereinstimmt. Das Massenspektrum der Substanz von Peak 2 hatte ein starkes  $m/z$ -Signal bei 555,3, welches mit der Masse des  $[M+H]^+$ -Ions von Hydroxylycopin (exakte Masse 554,45) übereinstimmt. Das Massenspektrum der Substanz von Peak 3 zeigte ein etwas schwächeres Signal bei 537,3, welches dem  $[M+H]^+$ -Ion von Lycopin (exakte Masse 536,44) entspricht.

Die Messung der Absorptionsmaxima mittels HPLC mit Photodiodenarray-Detektion (Durchführung der Messungen: Holger Beuttler, ITB) ergab für die Substanz von Peak 1 Maxima bei 445, 473 und 503 nm und für die Substanz von Peak 2 Maxima bei 442, 472 und 503 nm. Die gemessenen Absorptionsmaxima stimmen mit den Literaturwerten für Hydroxylycopin und Dihydroxylycopin überein (Literaturwerte: Hydroxylycopin in Aceton 445, 472 nm; Dihydroxylycopin in Petrolether: 446, 473 und 504 nm, Dihydroxylycopin in Aceton: 448, 474 und 507 nm; Ryvarden und Jensen, 1964). Wahrscheinlich handelt es sich also bei der Substanz von Peak 1 um Dihydroxylycopin und bei der Substanz von Peak 2 um Hydroxylycopin.

Durch die Identifizierung der durch die Aktivität von Ppsir1\_30569 aus Lycopin produzierten Substanzen konnte die Identität des Enzyms als  $\psi$ -Endgruppen-C1,C1'-Hydroxylase (CrtC) bestätigt werden. Wie zuvor bei CrtU und CrtY konnte auch bei CrtC beobachtet werden, dass das Enzym sein Substrat Lycopin zum Teil symmetrisch modifiziert. Verglichen mit CrtU und CrtY entstand jedoch bei der Carotinoid-Modifikation durch CrtC die größte Menge an einseitig modifiziertem Carotinoid.

**Tab. 43:** Carotinoid-Biosynthesevektor-Kombinationen mit *crt*-Genen von *Pantoea ananatis* und *Plesiocystis pacifica* SIR-1.

Plasmid(kombination)	<i>crt</i> -Gene	Produkte	Anteil*
pJOE5607.5/pJH63.3	<i>crtE, crtB, crtI, crtY / crtU</i>	Isorenieratin	70 %
		Isorenieratin ( <i>Z</i> )-Isomer	30 %
pJOE5573.3/pJH64.2	<i>crtE, crtB, crtI / crtY</i>	β-Carotin	95 %
		γ-Carotin	5 %
pJOE5573.3/pJH65.1	<i>crtE, crtB, crtI / crtC</i>	Dihydroxylycopin	72 %
		Hydroxylycopin	21 %
pJH88.1	<i>crtE, crtB, crtI, crtC</i>	Dihydroxylycopin	29 %
		Hydroxylycopin	54 %
		Lycopin	10 %

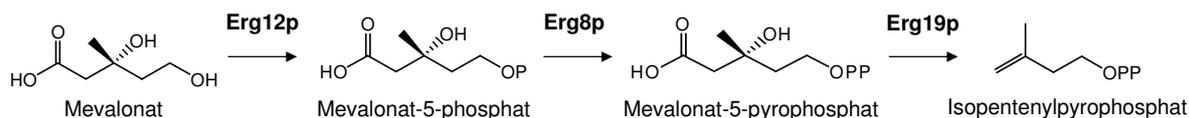
\* Prozentualer Anteil der Fläche des jeweiligen Produkt-Peaks an der Summe der Flächen aller Peaks im HPLC-Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 450 nm.

## 4.2 Produktionsstämme für Carotinoide

### 4.2.1 *Escherichia coli* JM109 und *Escherichia coli* WA66.1 $\Delta xthA$

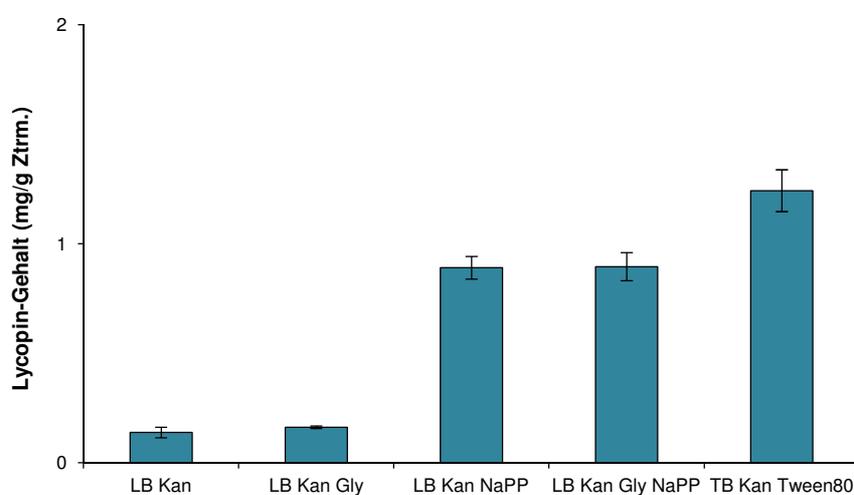
Die mit *E. coli* JM109 und den vorgestellten Vektoren produzierten Carotinoid-Mengen waren im Vergleich zu den besten Literaturwerten relativ gering (siehe Kapitel 4.1). Im Schüttelkolben-Maßstab wurden mit *E. coli* bis zu 49,3 mg  $\beta$ -Carotin pro Gramm Zelltrockenmasse produziert (Yoon *et al.*, 2007a). Für Lycopin wurde mit *E. coli* eine maximale Ausbeute von 22 mg pro Gramm Zelltrockenmasse erzielt (Yoon *et al.*, 2006). In beiden Fällen wurden Gene aus dem Mevalonat-Stoffwechselweg eingesetzt, um die Bereitstellung der Vorstufe Isopentenylpyrophosphat zu verbessern. Martin *et al.* (2003) haben alle für die Synthese von Isopentenylpyrophosphat aus Acetyl-CoA notwendigen Gene des Mevalonat-Stoffwechselweges von *Saccharomyces cerevisiae* kloniert. Hierfür teilten sie die Gene in zwei Operons auf. Das „top operon“ enthält die Gene, die für die Umwandlung von Acetyl-CoA in Mevalonat benötigt werden. Das „bottom operon“ enthält die Gene, die für die Umwandlung von Mevalonat in Isopentenylpyrophosphat benötigt werden (Abb. 6).

Um zu untersuchen, inwiefern die Carotinoid-Produktion mit *E. coli* JM109 und *E. coli* WA66.1  $\Delta xthA$  durch den Einsatz von Genen aus dem Mevalonat-Stoffwechselweg gesteigert werden kann, wurde das Plasmid pMevB (Firma Addgene, Cambridge, MA USA) verwendet. Das Plasmid enthält die Gene des „bottom operons“. Die Expression der drei Gene *ERG12*, *ERG8* und *ERG19* aus *S. cerevisiae* steht unter der Kontrolle des *lac*-Promotors. Die Gene kodieren für die Enzyme Mevalonat-Kinase (Erg12p), Mevalonat-5-phosphat-Kinase (Erg8p) und Mevalonat-5-pyrophosphat-Decarboxylase (Erg19p) (Abb. 38).



**Abb. 38:** Durch Erg12p, Erg8p und Erg19p katalysierte Reaktionen des Mevalonat-Stoffwechselweges in *Saccharomyces cerevisiae*.

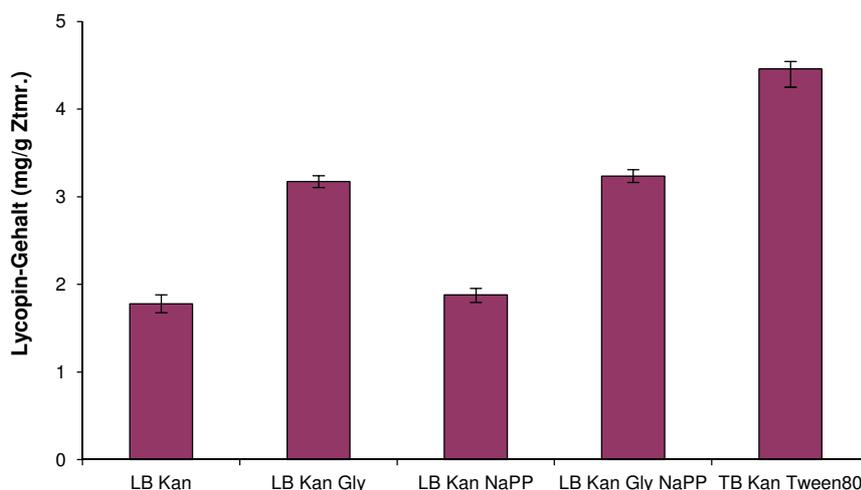
Da es sich bei pMevB um ein pBBR1MCS-2-Derivat handelt, konnte dieses nicht mit den Carotinoid-Biosynthesevektoren des gleichen Typs kombiniert werden. Deshalb wurde ein Lycopin-Vektor hergestellt, der auf pACYC177 basiert. Mit Hilfe des Lambda-Red Systems wurden der Replikationsursprung und das Resistenzgen eines pBBR1MCS-2-basierten Lycopin-Biosyntheseplasmids gegen die von pACYC177 ausgetauscht. (→pJH79, Kapitel 3.8.13). Zunächst wurde die Lycopin-Produktion mit pJH79 alleine untersucht, bevor dieses mit pMevB kombiniert wurde.



**Abb. 39:** Lycopin-Produktion mit *E. coli* JM109 pJH79 in verschiedenen Medien.

Abb. 39 zeigt die Lycopin-Ausbeuten, die mit *E. coli* JM109 pJH79 in verschiedenen Medien erzielt wurden. Die höchste Lycopin-Produktion von 1,20 mg pro Gramm Zelltrockenmasse (Ztrm.) konnte in TB mit 50 µg/ml Kanamycin und 0,5 % (v/v) Tween80<sup>®</sup> („TB Kan Tween80“) gemessen werden. Bei Tween80<sup>®</sup> handelt es sich um ein nichtionisches Detergenz. Dieses wurde dem Medium zugesetzt, um ein Verklumpen der Zellen, welches vor allem bei der Lycopin-Produktion zu beobachten war, zu reduzieren (Yoon *et al.*, 2006). In LB Medium mit 50 µg/ml Kanamycin („LB Kan“) produzierte *E. coli* JM109 pJH79 nur 0,14 mg Lycopin pro Gramm Zelltrockenmasse. In der Literatur wurde beschrieben, dass die Zugabe von Glycerin als C-Quelle die Carotinoid-Produktion steigern kann (Lee *et al.*, 2004). Die Zugabe von 0,46 % (v/v) Glycerin („LB Kan Gly“) hatte jedoch keinen

Effekt auf die Lycopin-Produktion von *E. coli* JM109 pJH79 (0,16 mg Lycopin pro Gramm Ztrm.). Erst die Zugabe von 46 mM Natriumphosphatpuffer („LB Kan NaPP“) konnte die Lycopin-Produktion auf 0,89 mg pro Gramm Zelltrockenmasse steigern. Das gleichzeitige Vorhandensein von Glycerin und Natriumphosphatpuffer im Medium („LB Kan Gly NaPP“) brachte keine weitere Steigerung der Produktion (0,90 mg Lycopin pro Gramm Ztrm.).



**Abb. 40:** Lycopin-Produktion mit *E. coli* WA66.1  $\Delta xthA$  pJH79 in verschiedenen Medien.

Eine erhebliche Steigerung der Lycopin-Produktion konnte durch den Einsatz des *E. coli* Stammes WA66.1  $\Delta xthA$  erreicht werden (Abb. 40). Ein wichtiger Unterschied zwischen *E. coli* WA66.1  $\Delta xthA$  und *E. coli* JM109 ist die Fähigkeit zur Verwertung von L-Rhamnose. *E. coli* WA66.1  $\Delta xthA$  weist bezüglich der Gene *rhaBAD* eine Deletion auf und kann daher L-Rhamnose nicht verstoffwechseln (vgl. Tab. 6). *E. coli* WA66.1  $\Delta xthA$  pJH79 produzierte in „TB Kan Tween80“ bis zu 4,5 mg Lycopin pro Gramm Zelltrockenmasse. Wie auch bei *E. coli* JM109 pJH79, war die Lycopin-Produktion mit *E. coli* WA66.1  $\Delta xthA$  pJH79 in LB Medium geringer als in TB Medium („LB Kan“: 1,78 mg Lycopin pro Gramm Ztrm.). Die Zugabe von Natriumphosphatpuffer hatte keinen Effekt auf die Lycopin-Produktion in LB Medium („LB Kan NaPP“: 1,88 mg Lycopin pro Gramm Ztrm.). Allerdings konnte die Produktion mit *E. coli* WA66.1  $\Delta xthA$  pJH79 durch die Zugabe von Glycerin gesteigert werden („LB Kan Gly“: 3,17 mg Lycopin pro Gramm Ztrm.). Die

gleichzeitige Zugabe von Glycerin und Natriumphosphatpuffer hatte keine weitere Steigerung der Lycopin-Ausbeute zur Folge („LB Kan Gly NaPP“: 3,24 mg Lycopin pro Gramm Ztrm.).

Eine Messung der pH-Werte der Medien vor und nach der Kultivierung von *E. coli* JM109 pJH79 bzw. *E. coli* WA66.1  $\Delta xthA$  pJH79 zeigte, dass eine Ansäuerung des Mediums durch *E. coli* JM109 pJH79 die Ursache für dessen geringere Lycopin-Produktion sein könnte. Für die pH-Wert Messungen nach der Kultivierung wurden 3 ml Kultur zentrifugiert (Megafuge, 5 min, 4.500 rpm) und der pH-Wert des Überstandes gemessen. Tab. 44 zeigt die Ergebnisse der pH-Wert-Messungen. Bei *E. coli* WA66.1  $\Delta xthA$  pJH79 hatten alle Medien nach der Kultivierung einen höheren pH-Wert als vorher. Im Gegensatz dazu hatten die Medien, in denen *E. coli* JM109 pJH79 gewachsen war nach der Kultivierung einen geringeren pH-Wert als vorher. Besonders stark war die Ansäuerung ausgeprägt, wenn das Medium Glycerin enthielt. In dem Medium „TB Kan Tween80“ fand die geringste Ansäuerung statt. Gleichzeitig war in diesem Medium auch die Lycopin-Produktion am höchsten (vgl. Abb. 39). Durch die Zugabe von Natriumphosphatpuffer zu den LB Medien konnte das Absinken des pH-Wertes etwas abgemildert werden. In den Natriumphosphatpuffer-haltigen Medien war auch die Lycopin-Produktion höher. Möglicherweise führte der Abbau der L-Rhamnose durch *E. coli* JM109 zur Bildung von Säuren, die ein Absinken des pH-Wertes verursachten und dadurch die Lycopin-Produktion verringerten.

**Tab. 44:** pH-Werte von Medien vor und nach der Kultivierung von *E. coli* JM109 pJH79 und *E. coli* WA66.1  $\Delta xthA$  pJH79 für die Lycopin-Produktion.

Medium	pH-Werte vor der Kultivierung	pH-Werte nach der Kultivierung* von	
		JM109 pJH79	WA66.1 $\Delta xthA$ pJH79
TB Kan Tween80	6,7	6,58	7,55
LB Kan	7,2	5,13	8,77
LB Kan Gly	7,2	4,67	8,61
LB Kan NaPP	7,6	7,46	8,83
LB Kan Gly NaPP	7,6	5,72	8,23

\* Gemessen wurde der Überstand von 3 ml abzentrifugierter Kultur.

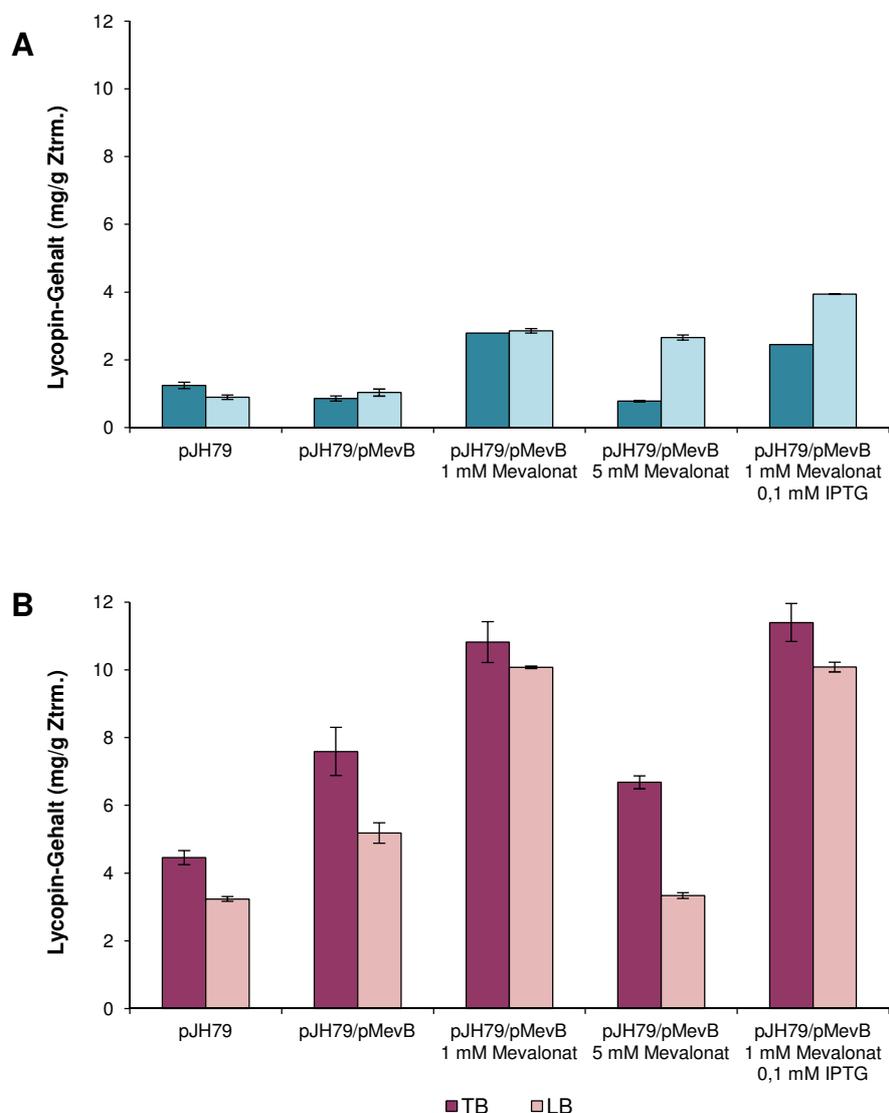
Für die weiteren Untersuchungen wurden *E. coli* JM109 und *E. coli* WA66.1  $\Delta xthA$  mit pMevB und pJH79 transformiert. Die Kultivierung erfolgte in 12 ml TB mit 50  $\mu\text{g/ml}$  Kanamycin, 15  $\mu\text{g/ml}$  Tetracyclin und 0,5 % (v/v) Tween80<sup>®</sup> (im Folgenden als „TB“ bezeichnet) und in 12 ml LB mit 50  $\mu\text{g/ml}$  Kanamycin, 15  $\mu\text{g/ml}$  Tetracyclin, 0,46 % (v/v) Glycerin und 46 mM Natriumphosphatpuffer (im Folgenden als „LB“ bezeichnet). Die Vorkulturen wurden 1:100 in frisches Medium umgesetzt und bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Nach zwei Stunden wurde Expression der Gene von pJH79 durch die Zugabe von 0,2 % (w/v) L-Rhamnose induziert. Die Zugabe von Mevalonat (1 mM oder 5 mM) und IPTG (0,1 mM, für die Induktion der Expression der Mevalonat-Gene von pMevB) erfolgte weitere zwei Stunden später. Nach der Zugabe der Zusätze wurden die Kulturen für zwei Tage bei 30 °C weiter inkubiert, anschließend wurden die Zellen von 2 ml Kultur extrahiert und der Lycopin-Gehalt mittels HPLC gemessen. Die zeitlich versetzte Zugabe von L-Rhamnose und Mevalonat/IPTG war bei diesem Experiment sehr wichtig, weil das *idi* Gen von pJH79 unbedingt vor den Mevalonat-Genen induziert werden musste, um eine toxisch wirkende, intrazelluläre Anhäufung von Isopentenylpyrophosphat zu vermeiden (Martin *et al.*, 2003).

Ohne die Zugabe von Mevalonat produzierte *E. coli* JM109 pJH79/pMevB in TB Medium 0,85 mg Lycopin pro Gramm Zelltrockenmasse und in LB Medium 1,03 mg Lycopin pro Gramm Zelltrockenmasse (Abb. 41 A). Durch die Zugabe von 1 mM Mevalonat und 0,1 mM IPTG konnte die Lycopin-Ausbeute in TB Medium auf 2,45 mg pro Gramm Zelltrockenmasse und in LB Medium auf 3,94 mg pro Gramm Zelltrockenmasse gesteigert werden.

*E. coli* WA66.1  $\Delta xthA$  pJH79/pMevB produzierte 5,18 mg Lycopin pro Gramm Zelltrockenmasse in LB Medium und 7,59 mg pro Gramm Zelltrockenmasse in TB Medium. Durch die Zugabe von 1 mM Mevalonat und 0,1 mM IPTG konnte die Lycopin-Produktion in LB Medium auf 10,08 mg pro Gramm Zelltrockenmasse und in TB Medium auf 11,40 mg pro Gramm Zelltrockenmasse gesteigert werden.

Auch ohne die Zugabe von IPTG, welches die Genexpression der Mevalonat-Gene induziert, konnte bei beiden Stämmen und in beiden Medien bei Anwesenheit von 1 mM Mevalonat eine Steigerung der Lycopin-Produktion beobachtet werden. Das liegt an der hohen Basalexpression des *lac*-Promotors in *E. coli*. Eine IPTG-Zugabe von mehr als 0,1 mM hatte einen negativen Effekt auf die Lycopin-

Produktion (Messdaten nicht gezeigt). Auch eine Erhöhung der Mevalonat-Stoffmengenkonzentration auf 5 mM verursachte eine Verringerung der Lycopin-Ausbeuten (Abb. 41).



**Abb. 41:** Lycopin-Produktion mit *E. coli* JM109 und *E. coli* WA66.1  $\Delta xthA$  mit pJH79 oder pJH79/pMevB in verschiedenen Medien mit und ohne Zusatz von Mevalonat und IPTG. **A** Produktion mit *E. coli* JM109, **B** Produktion mit *E. coli* WA66.1  $\Delta xthA$ . **TB** = TB Medium mit 50  $\mu\text{g/ml}$  Kanamycin, 15  $\mu\text{g/ml}$  Tetracyclin und 0,5 % (v/v) Tween80<sup>®</sup>, **LB** = LB Medium mit 50  $\mu\text{g/ml}$  Kanamycin, 15  $\mu\text{g/ml}$  Tetracyclin, 0,46 % (v/v) Glycerin und 46 mM Natriumphosphatpuffer.

## 4.2.2 *Pseudomonas putida* KT2440

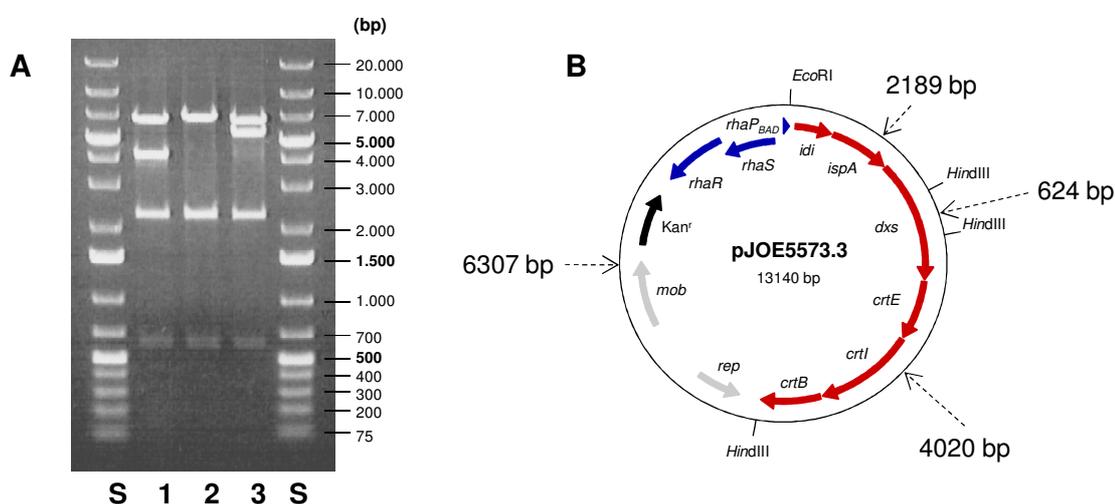
### 4.2.2.1 Die Auswirkungen von heterologer Carotinoid-Produktion auf *Pseudomonas putida* KT2440

*Pseudomonas putida* KT2440 gehört zur Klasse der  $\gamma$ -Proteobacteria und zur Familie der Pseudomonadaceae. *Pseudomonas putida* KT2440 ist der am besten charakterisierte Vertreter seiner Gattung. Die Genomsequenz wurde 2002 veröffentlicht (Nelson *et al.*, 2002). Der Stamm wird bereits für die Produktion von verschiedenen Substanzen eingesetzt, z. B. Butanol, *p*-Hydroxystyrol, *p*-Hydroxybenzoat oder Myxochromid (Nielsen *et al.*, 2009; Ramos-Gonzalez *et al.*, 2003; Stephan *et al.*, 2006; Verhoef *et al.*, 2009). Die für einige *Pseudomonas putida* Stämme beschriebene Lösungsmittel-Toleranz (Faizal *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 1993) gab Grund zu der Annahme, dass Pseudomonaden besonders gut für die Produktion von hydrophoben Substanzen, wie Carotinoiden, geeignet sein könnten.

Für die Experimente wurde das Plasmid pJOE5573.3 ausgewählt, welches die Gene für die Produktion von Lycopin enthält (Abb. 42 B). Das Plasmid sollte durch Konjugation mit dem Plasmid-tragenden *E. coli* S17-1 Stamm in *P. putida* KT2440 eingebracht werden. Durch diese Methode konnten immer nur sehr wenige Transkonjuganden erhalten werden (siehe Kapitel 3.5, 100  $\mu$ l unverdünnter abgeschwemmter Konjugationsansatz enthielt zwischen 0 und 10 vermehrungsfähige Transkonjuganden). Die wenigen gewachsenen Kolonien waren unterschiedlich groß und unterschiedlich gefärbt. Weiße Kolonien waren stets größer als gefärbte. Auch die wenigen, durch Elektroporation (siehe Kapitel 3.4.2) erzeugten Transformanden zeigten diese heterogenen Phänotypen.

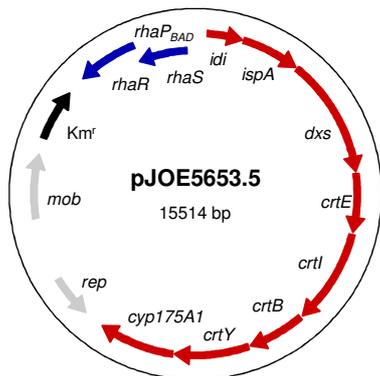
Die Plasmide der Transformanden wurden extrahiert und mittels Restriktionsverdau analysiert. Immer wieder konnten dabei Plasmide gefunden werden, welche im Vergleich zum Ausgangsplasmid Veränderungen aufwiesen. Typischerweise äußerten sich diese in einer Veränderung der Plasmidgröße und/oder -kopienzahl. Abb. 42 A zeigt ein Elektrophoretogramm von pJOE5573.3 Plasmid-DNA, die mit den Restriktionsendonukleasen *Eco*RI und *Hind*III verdaut wurde. Spur 1 zeigt die Kontrolle mit dem normalen Spaltungsmuster von pJOE5573.3, welches aus vier Fragmenten mit den Größen 624, 2189, 4020 und 6307 bp besteht.

Die Plasmide in den Spuren 2 und 3 wurden aus *P. putida* KT2440 Transkonjuganden isoliert. Da die Plasmide im Vergleich zum Ausgangsvektor verändert sind, wurden sie mit pJOE5573.3mut11 und pJOE5573.3mut23 benannt. Das Plasmid pJOE5573.3mut11 in Spur 2 ist erheblich kleiner als die Kontrolle. Das Fragment mit 4020 bp, welches die Gene *crtE*, *crtI* und *crtB* enthält, fehlt vollständig. Das zweite Fragment ist größer als das 6307 bp große Fragment der Kontrolle. Das Plasmid pJOE5573.3mut23 in Spur 3 ist größer als das Kontrollplasmid. Auch hier ist das ursprünglich 4020 bp große Fragment mit den Genen *crtE*, *crtI* und *crtB* von der Veränderung betroffen. Im Vergleich zu dem korrespondierenden Fragment der Kontrolle in Spur 1 ist dieses ca. 1,5 - 2 kb größer.



**Abb. 42:** **A** Elektrophoretogramm von pJOE5573.3 Plasmid-DNA, die mit *EcoRI* und *HindIII* verdaut wurde. Spuren: **S** GeneRuler™ 1 kb Plus, **1** pJOE5573.3 (Kontrolle), **2** pJOE5573.3mut11, **3** pJOE5573.3mut23. **B** Plasmidkarte von pJOE5573.3 mit den eingezeichneten Erkennungssequenzen für die relevanten Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *HindIII* sowie die Größen der durch einen Verdau mit den Enzymen entstehenden DNA-Fragmente.

Bei Plasmiden von pJOE5653.5, welche aus *P. putida* KT2440 Transformanden isoliert wurden, traten ganz ähnliche Veränderungen auf. Das Plasmid pJOE5653.5 enthält zusätzlich die Gene *crtY* und *cyp175A1* (Abb. 43). Bei *cyp175A1* handelt es sich um ein Gen aus *Thermus thermophilus* HB27, welches für eine P450 Monooxygenase mit  $\beta$ -Carotin-Hydroxylaseaktivität kodiert (Blasco *et al.*, 2004). Veränderte Plasmide von pJOE5653.5 aus *P. putida* KT2440



**Abb. 43:** pJOE5653.5

Transformanten wurden ebenfalls mittels Restriktionsanalyse untersucht. Auch hier waren im Vergleich zum Ausgangsvektor verkleinerte oder vergrößerte Plasmide zu finden. Bei einem im Vergleich zur Kontrolle deutlich vergrößerten Plasmid (pJOE5653.5mut15, Tab. 8) wurde mittels Restriktionsanalyse die Lage des Inserts ermittelt und dieses sequenziert (Oligonukleotid S4896, Tab. 10). Es zeigte sich, dass es sich bei dem integrierten DNA-Fragment um das IS-Element ISPpu15 handelt. Dieses inte-

griierte zwischen bp 527 und 528 des *rep* Gens von pJOE5653.5. Da die DNA-Ausbeuten bei Plasmidpräparationen von pJOE5653.5mut15 stets sehr gering waren, kann man davon ausgehen, dass die Integration von ISPpu15 in das *rep* Gen zu einer drastischen Reduktion der Kopienzahl des Plasmids führte.

Es wurden auch Konjugationsexperimente mit anderen Pseudomonaden durchgeführt. Getestet wurden *Pseudomonas stutzeri* JM300, *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 und *Pseudomonas fluorescens* Pf5. Im Vergleich zu *P. putida* KT2440 zeigte keiner der Stämme eine wesentlich höhere Ausbeute an Transformanten (Messdaten nicht gezeigt). Die geringen Ausbeuten an Transformanten und das Auftreten der beschriebenen Plasmid-Veränderungen gaben Hinweise darauf, dass die Carotinoid-Biosynthesevektoren für die getesteten Pseudomonaden eine erhebliche Bürde darstellen oder sogar toxisch auf die Zellen wirken. Durch Deletion der schädlichen Gene oder deren Inaktivierung durch Integration von IS-Elementen wurde der negative Effekt vermutlich verringert und ermöglichte das Überleben der Zellen und somit das Wachsen von Transformanten.

#### 4.2.2.2 Identifizierung des toxischen Intermediates oder Genproduktes

Für ein besseres Verständnis der beobachteten Auswirkungen der Carotinoid-Produktion auf *P. putida* KT2440 sollte das dafür verantwortliche Genprodukt oder Intermediat identifiziert werden. Bei der Konstruktion der Carotinoid-Biosynthesevektoren wurden die Gene der verschiedenen Carotinoid-Biosyntheseenzyme

schrittweise integriert (siehe Kapitel 4.1.1). Durch diese Vorgehensweise entstanden eine Reihe von Vektoren, von denen jeder einzelne ein bestimmtes Repertoire an Genen enthält, welche für die Enzyme kodieren, die einen spezifischen Reaktionsschritt der Carotinoid-Biosynthese katalysieren. Dies ermöglichte eine Untersuchung der Auswirkungen des Vorhandenseins eines spezifischen Genproduktes und der durch dieses hergestellten Verbindung auf *P. putida* KT2440. Als Maß für die Verträglichkeit eines Vektors diente die relative Ausbeute an *P. putida* KT2440 Transkonjuganden, die durch Konjugation mit dem entsprechenden *E. coli* S17-1 Stamm erhalten wurde.

Nach der Konjugation (siehe Kapitel 3.5) wurden die Zellen von der Konjugationsplatte abgeschwemmt. In der erhaltenen Zellsuspension befanden sich dann drei verschiedenen Zelltypen. Zelltyp 1 sind die Donorzellen, also der *E. coli* S17-1 Stamm mit dem jeweiligen Plasmid. Zelltyp 2 sind die Rezipientenzellen, das heißt *P. putida* KT2440 ohne Plasmid. Zelltyp 3 sind Transkonjugandenzellen, also *P. putida* KT2440 Zellen, die durch Konjugation mit *E. coli* S17-1 ein Plasmid erhalten haben. Für die Bestimmung der Anzahl des jeweiligen Zelltyps in der Suspension wurde diese verdünnt und auf verschiedene Selektivmedien ausplattiert (Tab. 45).

*P. putida* KT2440 ist natürlicherweise gegen das Antibiotikum Nalidixinsäure resistent. Auf LB Agar mit Nalidixinsäure wurden daher Rezipientenzellen und Transkonjugandenzellen selektiert. Das zweite Selektivmedium enthielt Kanamycin. Da die Kanamycin-Resistenz durch das jeweilige Plasmid vermittelt wurde, konnten auf diesem Medium sowohl die *E. coli* S17-1 Donorzellen als auch die *P. putida* KT2440 Transkonjugandenzellen wachsen. Die Koloniemorphologie von *E. coli* und *P. putida* unterscheidet sich erheblich und ermöglichte eine eindeutige Zuordnung zum jeweiligen Zelltyp. Durch die ausgewählte Verdünnungsstufe waren Transkonjuganden-Kolonien auf den Kanamycin-haltigen Platten ohnehin nur selten anzutreffen. Auf LB Agar mit Nalidixinsäure und Kanamycin wurden ausschließlich *P. putida* KT2440 Transkonjuganden selektiert. Bei jedem Konjugationsexperiment wurde zur Kontrolle parallel eine Konjugation zwischen *E. coli* JM109 und dem jeweiligen *E. coli* S17-1 Stamm durchgeführt. Für die Selektion der Donorzellen wurde Streptomycin-haltiger LB Agar verwendet. Die Rezipientenzellen und Transkonjugandenzellen wurden auf Nalidixinsäure-haltigem LB

Agar selektiert. Die Transkonjugandenzellen wurden auf LB Agar mit Nalidixinsäure und Kanamycin selektiert. Für die Berechnung der relativen Transkonjuganden-Ausbeute wurde die Anzahl der Transkonjugandenzellen zu der Anzahl aller Rezipientenzellen in Beziehung gesetzt (Formel 10).

**Tab. 45:** Antibiotika für die Selektion der verschiedenen Zelltypen bei Konjugationsexperimenten mit *E. coli* S17-1 Stämmen.

Konjugations-partner	Rezipienten + Transkonjuganden	Donoren + Transkonjuganden	Transkonjuganden
<i>E. coli</i> JM109	Nalidixinsäure (50 µg/ml)	Streptomycin (200 µg/ml)	Nalidixinsäure (50 µg/ml) + Kanamycin (50 µg/ml)
<i>P. putida</i> KT2440	Nalidixinsäure (10 µg/ml)	Kanamycin (50 µg/ml)	Nalidixinsäure (10 µg/ml) + Kanamycin (50 µg/ml)

(Formel 10)

$$\text{relative Transkonjuganden-Ausbeute (\%)} = \frac{\text{Transkonjuganden}}{\text{Rezipienten + Transkonjuganden}} \times 100$$

Tab. 46 zeigt die Ergebnisse der Konjugations-Experimente. Generell war festzustellen, dass Konjugationen zwischen *E. coli* JM109 und den verschiedenen *E. coli* S-17 Stämmen zu höheren relativen Transkonjuganden-Ausbeuten führten als Konjugationen zwischen *P. putida* KT2440 und den *E. coli* S-17 Stämmen. Bei *E. coli* JM109 war des Weiteren kein Zusammenhang zwischen dem übertragenen Plasmid und der relativen Transkonjuganden-Ausbeute festzustellen. Ganz anders sah es bei *P. putida* KT2440 aus. Konjugationen mit *E. coli* S17-1 pJeM1 und pJOE5473.2 ergaben den höchsten relativen Anteil an Transkonjuganden. Bei den folgenden Vektoren war ein Absinken der relativen Transkonjuganden-Ausbeute um das 4- bis 24-fache zu erkennen. Eine weitere gravierende Reduktion der Transkonjuganden-Ausbeute war bei Konjugation mit *E. coli* S17-1 pJOE5573.3 zu beobachten. Das Plasmid enthält alle Gene, die für die Produktion von Lycopin notwendig sind. Im Vergleich dazu waren die relativen Transkonjuganden-Ausbeuten bei Konjugationen mit *E. coli* S17-1 pJH13 (Phytoin) oder *E. coli* S17-1 pJOE5901.2 (Geranylgeranylpyrophosphat) 49.600-fach bzw. 16.500-fach höher. Demnach führte das separate Vorhandensein der Gene *crtI* oder *crtB* nicht zu ei-

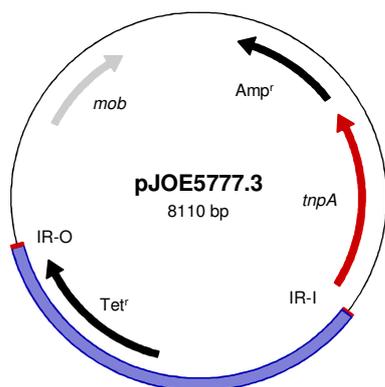
ner Reduktion der relativen Transkonjuganden-Ausbeute, erst wenn die beiden Gene zusammen auf dem Vektor vorlagen, war eine beträchtliche Verringerung der relativen Transkonjuganden-Ausbeute zu beobachten. Hierdurch konnte das Carotinoid-Produkt Lycopin als Ursache für die Unverträglichkeit von pJOE5573.3 identifiziert werden. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den beobachteten Plasmidveränderungen, die oft den Sequenzbereich betrafen, in dem die Carotinoid-Biosynthesegene lokalisiert sind (vgl. Kapitel 4.2.2.1).

**Tab. 46:** Relative Transkonjuganden-Ausbeuten bei Konjugationsexperimenten mit *E. coli* JM109 und *P. putida* KT2440 mit verschiedenen Plasmid-tragenden *E. coli* S-17 Stämmen.

Plasmid	Gene	<i>E. coli</i> JM109	<i>P. putida</i> KT2440
pJeM1	<i>eGFP</i>	23,23 ± 3,21	0,34 ± 0,11
pJOE5473.2	<i>idi</i>	37,34 ± 2,67	0,48 ± 0,26
pJOE5559.1	<i>idi, dxs, ispA</i>	21,44 ± 7,33	0,09 ± 0,06
pJOE5571.1	<i>idi, dxs, ispA, crtE</i>	43,18 ± 20,09	0,03 ± 0,01
pJH13.1	<i>idi, dxs, ispA, crtE, crtB</i>	28,36 ± 17,59	0,06 ± 0,06
pJOE5901.2	<i>idi, dxs, ispA, crtE, crtI</i>	28,48 ± 12,52	0,02 ± 0,03
pJOE5573.3	<i>idi, dxs, ispA, crtE, crtB, crtI</i>	41,63 ± 28,12	1,21 × 10 <sup>-6</sup> ± 7,59 × 10 <sup>-7</sup>

#### 4.2.2.3 Transposon-Mutagenese zur Identifizierung von Genen, durch deren Inaktivierung die Toxizität von Lycopin reduziert wird

Um Gene zu identifizieren, durch deren Inaktivierung eine Verbesserung der Lycopin-Verträglichkeit von *P. putida* KT2440 erreicht werden kann und dadurch Erkenntnisse bezüglich der Ursache der Lycopin-Toxizität gewinnen zu können, wurde eine Transposon-Mutagenese durchgeführt (Durchführung der Mutagenese und Isolierung der Mutanten: Marcel Jeske, IIG). Hierfür wurde der Mini-Tn5-Vektor pJOE5777.3 (Beuttler *et al.*, 2011, Abb. 44) eingesetzt. Der pACYC184-basierte Vektor verfügt über das *mob* Gen von RP4 und ist dadurch mobilisierbar. Weitere wichtige Strukturelemente von pJOE5777.3 sind das Mini-Tn5 (blau), welches von seinen beiden Inverted Repeats IR-O und IR-I (rot) flankiert wird, und das Gen *tpnA*, welches für die Transposase kodiert. Der Replikationsursprung des Plasmids befindet sich innerhalb der Sequenz des Mini-Tn5. Als Selektionsmarker sind ein Ampicillin- und ein Tetracyclin-Resistenzgen vorhanden.



**Abb. 44:** pJOE5777.3

Zunächst wurde *E. coli* S17-1 mit dem Plasmid transformiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Konjugation mit *P. putida* KT2440. pACYC184-basierte Plasmide können in *P. putida* KT2440 nicht replizieren. Eine Tetracyclin-Resistenz von *P. putida* KT2440 Transkonjuganden kann daher nur durch eine Transposition des Mini-Tn5 in das Chromosom entstehen. Die Selektion dieser Zellen erfolgte auf LB Agar mit 20 µg/ml Tetracyclin und 10 µg/ml Nalidixinsäure (für die Hemmung des Wachstums von *E. coli* S17-1

pJOE5777.3). Der Konjugationsansatz wurde dabei so verdünnt, dass 150 – 200 Transkonjuganden pro Platte wuchsen. Die erhaltene Transposon-Mutanten-Bibliothek wurde im nächsten Schritt nach solchen Mutanten durchsucht, die für Lycopin eine erhöhte Toleranz aufweisen. Hierfür wurde zunächst *E. coli* S17-1 mit pJOE5573.3 transformiert. Eine Zellsuspension des Stammes wurde anschließend auf LB Agar ohne Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Auf den erhaltenen Zellrasen wurden dann die *P. putida* KT2440 Transposon-Mutanten gestempelt. Die Platten wurden über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die Zellen der Platten wurden dann auf LB-Agar mit 10 µg/ml Nalidixinsäure und 50 µg/ml Kanamycin gestempelt. Hier konnten nur *P. putida* KT2440 Klone wachsen, welche pJOE5573.3 durch Konjugation mit *E. coli* S17-1 erhalten hatten. Es wurden ca. 6.000 *P. putida* KT2440 Transposon-Mutanten getestet. Mit vier von ihnen konnten durch die oben beschriebene Prozedur Transkonjuganden erzeugt werden. Durch das Stempeln konnten die entsprechenden Klone auf den Platten der Transposon-Mutanten-Bibliothek identifiziert werden. Die vier isolierten Mutanten wurden *P. putida* C7L, D7L3, D8L1 und E3L2 genannt.

Für die Identifizierung der Transposon-Integrationsorte wurde die chromosomale DNA der vier Mutanten isoliert und mit den in Tab. 47 angegebenen Restriktionsendonukleasen verdaut. Die erhaltenen Fragmente wurden dann religiert. Einige der Fragmente enthielten das Mini-Tn5 mit der Tetracyclin-Resistenz. Da sich in der Sequenz des Mini-Tn5 der pACYC184-Replikationsursprung befindet, konnten diese Moleküle durch Transformation von *E. coli* JM109 und Selektion auf Tetra-

cyclin-haltigem Medium als autonom replizierende Plasmide isoliert werden. Die erhaltenen Plasmide wurden mit der gleichen Restriktionsendonuklease verdaut, mit der auch die chromosomale DNA der jeweiligen Mutante verdaut wurde. Plasmide, welche nur eine Schnittstelle enthielten und durch den Verdau linearisiert wurden, wurden für die weitere Untersuchung benutzt. Mit Hilfe des Oligonukleotids S4896 (Tab. 10), welches zu einem Sequenzabschnitt innerhalb des IR-I des Mini-Tn5 komplementär ist und aus dem Transposon herausliest, konnte durch DNA-Sequenzierung die dem Transposon benachbarte chromosomale Sequenz der jeweiligen *P. putida* Mutante und somit der Integrationsort des Transposons ermittelt werden (Tab. 48).

**Tab. 47:** Für den Restriktionsverdau der chromosomalen DNA von *P. putida* Transposon-Mutanten verwendeten Restriktionsendonukleasen und Namen der durch die Religation der chromosomalen DNA-Fragmente entstandenen Mini-Tn5-Plasmide.

Mutante	Restriktionsendonuklease	Plasmidbezeichnung
C7L	<i>NcoI</i>	pJH8
D7L3	<i>AatII</i>	pJH4
D8L1	<i>KpnI</i>	pJH5
E3L2	<i>KpnI</i>	pJH6

**Tab. 48:** Integrationsorte des Mini-Tn5 im Genom von *P. putida* Transposon-Mutanten.

Mutante	Transposon-Integrationsort	Annotation	Genlänge (bp)	Position des Mini-Tn5 (bp)
C7L	<i>pp_0980</i>	<i>pepA</i> , leucyl aminopeptidase	1493	1083, 1084
D7L3	<i>pp_0484</i>	major facilitator family transporter	1394	263, 264
D8L1	<i>pp_4235</i>	<i>dsbD-2</i> , protein-disulfide reductase	1715	1586, 1587
E3L2	<i>pp_3711</i>	sensory box protein	1511	1355, 1356

Bei Konjugation mit *E. coli* S17-1 pJOE5573.3 konnte von den vier isolierten Transposon-Mutanten mit *P. putida* D7L3 die höchste Ausbeute an Transkonjuganden erzielt werden (Messdaten nicht gezeigt). Mit dieser Mutante wurden ebenfalls detaillierte Konjugationsstudien durchgeführt. Die für die Selektion der verschiedenen Zelltypen verwendeten Antibiotika sind in Tab. 49 angegeben.

**Tab. 49:** Antibiotika für die Selektion verschiedener Zelltypen bei Konjugationsexperimenten mit *E. coli* S17-1 Stämmen und *P. putida* D7L3.

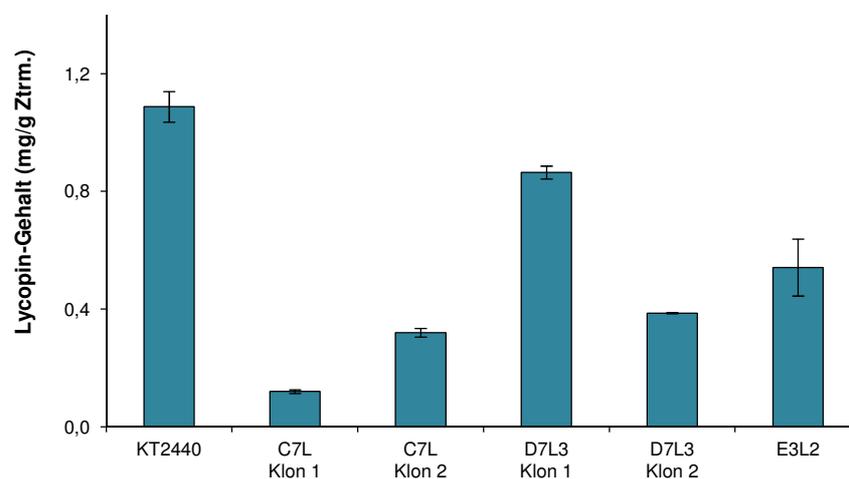
Konjugations-partner	Rezipienten + Transkonjuganden	Donoren + Transkonjuganden	Transkonjuganden
<i>P. putida</i> D7L3	Tetracyclin (20 µg/ml)	Kanamycin (50 µg/ml)	Tetracyclin (20 µg/ml) + Kanamycin (50 µg/ml)

Tab. 50 zeigt die Ergebnisse der Konjugationsexperimente mit verschiedenen *E. coli* S17-1 Stämmen und *P. putida* D7L3 oder *P. putida* KT2440. Im Vergleich zu *P. putida* KT2440 zeigte *P. putida* D7L3 eine 16.500-fache Verbesserung der relativen Transkonjuganden-Ausbeute bei Konjugation mit *E. coli* S17-1 pJOE5573.3. Die Phänotypen der *P. putida* D7L3 pJOE5573.3 Transkonjuganden waren im Vergleich zu den entsprechenden *P. putida* KT2440 Transkonjuganden wesentlich homogener. Die Transkonjuganden-Kolonien von *P. putida* D7L3 pJOE5573.3 waren rosa gefärbt und hatten alle etwa die gleiche Größe. Allerdings tauchten bei den Konjugationsexperimenten auch vereinzelt weiße Kolonien auf, die erheblich größer waren als die gefärbten Kolonien.

Verschiedene *P. putida* Stämme mit pJOE5573.3 wurden hinsichtlich ihrer Lycopin-Produktion untersucht. Abb. 45 zeigt die Ergebnisse der Messungen. Die Lycopin-Produktion der Stämme war sehr unterschiedlich. Erstaunlicherweise war die Produktion eines gefärbten *P. putida* KT2440 pJOE5573.3 Transkonjuganden am höchsten (1,08 mg Lycopin pro Gramm Ztrm.). Die getesteten *P. putida* Transposon-Mutanten produzierten weniger Lycopin als *P. putida* KT2440 pJOE5573.3. Von *P. putida* C7L und D7L3 wurden jeweils zwei verschiedene Klone untersucht. Die beiden Klone des jeweiligen Stammes unterschieden sich hinsichtlich ihrer Lycopin-Produktion. Nach *P. putida* KT2440 war die Produktion mit einem D7L3 Klon am höchsten.

**Tab. 50:** Relative Transkonjuganden-Ausbeuten bei Konjugationsexperimenten mit *P. putida* KT2440 und *P. putida* D7L3 mit verschiedenen Plasmid-tragenden *E. coli* S-17 Stämmen.

Plasmid	Gene	<i>P. putida</i> KT2440	<i>P. putida</i> D7L3
pJeM1	<i>eGFP</i>	0,34 ± 0,11	0,52 ± 0,38
pJOE5473.2	<i>idi</i>	0,48 ± 0,26	0,85 ± 0,45
pJOE5559.1	<i>idi, dxs, ispA</i>	0,09 ± 0,06	0,16 ± 0,17
pJOE5571.1	<i>idi, dxs, ispA, crtE</i>	0,03 ± 0,01	0,16 ± 0,06
pJH13.1	<i>idi, dxs, ispA, crtE, crtB</i>	0,06 ± 0,06	0,05 ± 0,02
pJOE5901.2	<i>idi, dxs, ispA, crtE, crtI</i>	0,02 ± 0,03	0,03 ± 0,02
pJOE5573.3	<i>idi, dxs, ispA, crtE, crtB, crtI</i>	$1,21 \times 10^{-6} \pm 7,59 \times 10^{-7}$	0,02 ± 0,02

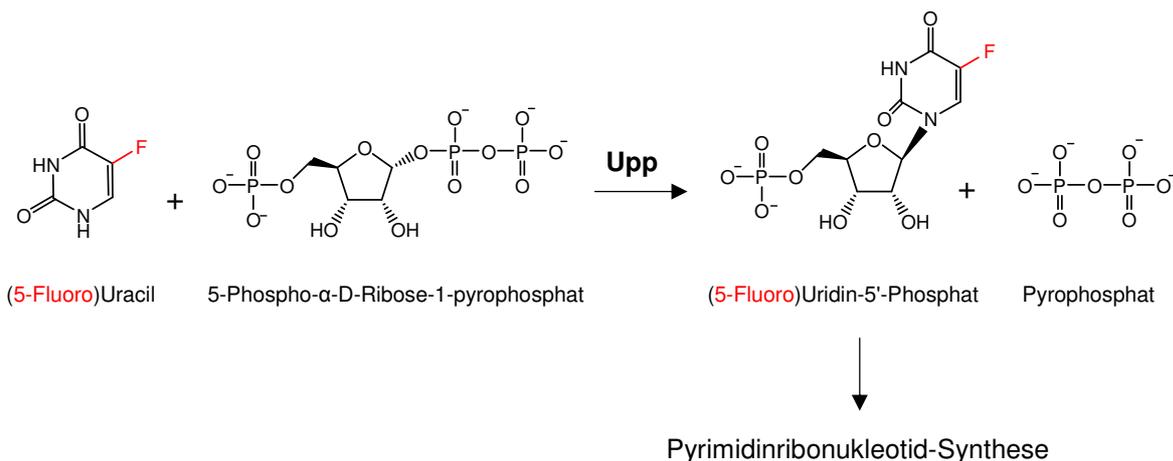


**Abb. 45:** Lycopin-Produktion von verschiedenen *P. putida* Stämmen mit pJOE5573.3 in LB Medium mit 50 µg/ml Kanamycin.

4.2.2.4 Reproduktion der Ergebnisse durch gezielte Mutagenese

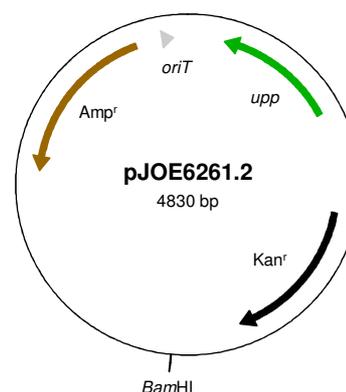
Um die durch Transposon-Mutagenese erzielten Ergebnisse zu reproduzieren, wurden zwei der identifizierten Gene durch gezielte Mutagenese aus der Genomsequenz von *P. putida* deletiert. Es wurde ferner untersucht, ob die gleichzeitige Deletion beider Gene einen additiven Effekt bezüglich der Reduktion der Lycopin-Toxizität hat.

Hierfür wurde das Upp-Deletionssystem (Graf und Altenbuchner, 2011) verwendet. Der eingesetzte *P. putida* Stamm hat einen Defekt bezüglich des Gens *upp*. Das Gen kodiert für die Uracilphosphoribosyl-Transferase, welche die in Abb. 46 gezeigte Reaktion katalysiert. Durch die Aktivität von Upp kann freies Uracil recycelt und der Pyrimidinribonukleotid-Synthese zugeführt werden (Andersen *et al.*, 1992; Blakley *et al.*, 1963). Neben Uracil kann auch 5-Fluorouracil von Upp umgesetzt werden. Das dadurch entstehende 5-Fluorouridin-5'-Phosphat hemmt die Thymidylat-Synthetase auf irreversible Weise, wodurch die Thymin-Synthese verhindert wird. Das Fehlen von Thymin führt letztlich zu einer Inhibition der DNA-Synthese und somit zum Verlust der Vermehrungsfähigkeit der Zellen (Cohen *et al.*, 1958). Fehlt das *upp* Gen, wird 5-Fluorouracil nicht mehr zu 5-Fluorouridin-5'-Phosphat umgesetzt und der toxische Effekt auf die Thymidylat-Synthetase bleibt aus. Daher ist *P. putida*  $\Delta upp$  gegen 5-Fluorouracil resistent.



**Abb. 46:** Reaktionen der Uracilphosphoribosyl-Transferase (Upp) mit Uracil und 5-Fluorouracil.

Für die Deletion wurden die Gene *pp\_0484* (Mutation von *P. putida* D7L3) und *pp\_0980* (Mutation von *P. putida* C7L) ausgewählt. Zunächst wurden die Deletionsvektoren konstruiert. Die Vektoren basieren auf dem pUC18-Derivat pJOE6261.2 (Abb. 47), welcher das *upp* Gen von *P. putida* KT2440, ein Ampicillin-Resistenzgen und ein Kanamycin-Resistenzgen enthält. In den Vektor wurde ein DNA-Fragment integriert, welches jeweils zwei ca. 800 bp lange Sequenzen enthielt, die das zu deletierende Gen 5' bzw. 3' flankieren, aber ohne das betreffende Gen in der Mitte (Abb. 48). Für die Amplifikation der flankierenden Sequenzen und eine gleichzeitige Deletion des jeweiligen Gens aus dem PCR-Produkt wurde eine Overlap Extension PCR (siehe Kapitel 3.8.2.2) durchgeführt. Für die Herstellung des PCR-Produktes für die Deletion von *pp\_0484* wurden die Oligonukleotide S7032, S7033, S7034 und S7035 verwendet, für die Deletion von *pp\_0980* wurden die Oligonukleotide S7107, S7108, S7109 und S7110 verwendet (Tab. 10). Die PCR-Produkte wurden zunächst ungeschnitten in den mit *SacI* geschnittenen und Klenow-behandelten Vektor pJOE4786.1 integriert und sequenziert (→pJH90.2 und pJH94.2). Korrekte Fragmente wurden dann mit *BglII* aus pJOE4786.1 herausgeschnitten und in die *Bam*HI-Schnittstelle von pJOE6261.1 integriert (→pJH91.1 und pJH95.1). Die Nutzung der *BglII*-Schnittstellen war erforderlich, weil sich in den Sequenzen der beiden PCR-Produkte *Bam*HI-Schnittstellen befanden. Da bei der Durchführung des Deletionsexperimentes ohne zusätzlichen Selektionsmarker keine Deletionsmutanten isoliert werden konnten (Gendeletion *pp\_0483*, 100 Klone mittels Kolonie-PCR getestet), wurde zusätzlich ein Resistenzgen zwischen die beiden flankierenden Sequenzen eingefügt. Bei pJH91.1 befand sich zwischen den flankierenden Sequenzen bereits eine *Ascl*-Schnittstelle. Mit den Oligonukleotiden S7105 und S7106 wurde das Tetracyclin-Resistenzgen von pACYC184 amplifiziert und gleichzeitig die Erkennungssequenzen für *Ascl* an die Enden des PCR-Produktes angefügt. Dieses wurde dann in die *Ascl*-Schnittstelle von pJH91.1 integriert (→pJH93.1). Für die Konstruktion von pJH98.1 wurde das Apramycin-Resistenz-



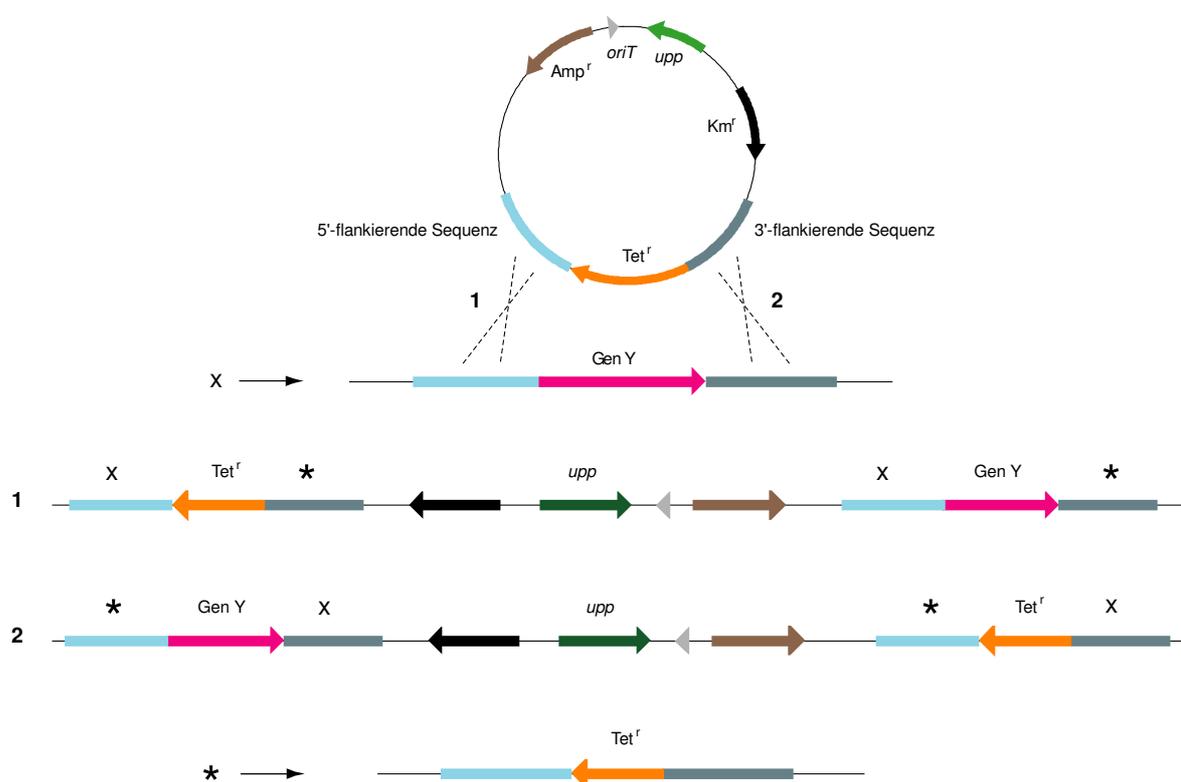
**Abb. 47:** pJOE6261.2

gen von pJOE6433.4 amplifiziert und gleichzeitig die *Ascl*-Schnittstellen an die Enden angefügt (Oligonukleotide S7127 und S7181). Das PCR-Produkt wurde dann in die *Ascl*-Schnittstelle von pJH95.1 integriert ( $\rightarrow$ pJH98.1, die *Ascl*-Schnittstelle von pJH95.1 wurde während der Overlap Extension PCR zwischen die flankierenden Sequenzen eingefügt).

Die Deletionsvektoren pJH93.1 (für die Deletion von *pp\_0484*) bzw. pJH98.1 (für die Deletion von *pp\_0980*) wurden durch Elektroporation in *P. putida*  $\Delta upp$  eingebracht (siehe Kapitel 3.4.2). Da pUC18-Derivate in *P. putida* nicht replizieren, konnten Klone mit Plasmid-vermittelten Antibiotika-Resistenzen nur durch eine Integration des Vektors in das Genom entstehen. Je nachdem, mit welcher der beiden flankierenden Sequenzen des Vektors die homologe Rekombination mit der entsprechenden Sequenz im Genom stattfand, kam es zu einer Integration des Vektors nach Schema 1 oder 2 (Abb. 48). Die Klone, bei denen pJH93.1 bzw. pJH95.1 in das Genom integrierten, wurden auf LB Agar mit 50  $\mu\text{g/ml}$  Kanamycin selektiert (es wurden hierbei zwischen 0 und 24 Kolonien erhalten). Die erhaltenen Klone wurden im nächsten Schritt auf LB Agar mit 50  $\mu\text{g/ml}$  Kanamycin und M9 Agar mit 20  $\mu\text{g/ml}$  5-Fluorouracil ausgestrichen. Ein Kanamycin-resistenter und 5-Fluorouracil-sensitiver Klon wurde ausgewählt und über Nacht in 10 ml LB ohne Antibiotikum im Erlenmeyerkolben kultiviert (30 °C, 200 rpm). Währenddessen kam es bei einigen Klonen erneut zu einer homologen Rekombination (Abb. 48). Fand diese an den mit „X“ markierten Sequenzen statt, kam es wieder zur Herstellung des Ausgangszustandes. Bei einer homologen Rekombination der mit „\*“ gekennzeichneten Sequenzen wurde das betreffende Gen deletiert. Gleichzeitig blieb das zwischen die flankierenden Sequenzen integrierte Resistenzgen zurück. Die Kulturen wurden 1:100 mit H<sub>2</sub>O verdünnt und jeweils 100  $\mu\text{l}$  wurden auf M9 Agar mit 20  $\mu\text{g/ml}$  5-Fluorouracil und dem entsprechenden Antibiotikum (Apramycin oder Tetracyclin) ausplattiert (es wuchsen 150 bis 200 Kolonien pro Platte).

Die erhaltenen Klone wurden auf Kanamycin-Sensitivität getestet. Der Genotyp der Kanamycin-sensitiven Klone wurde dann zusätzlich durch Kolonie-PCR (siehe Kapitel 3.8.2.3) bestätigt. Für die Kolonie-PCR zur Überprüfung der Deletion von *pp\_0484* wurden die Oligonukleotide S7032 und S7075 verwendet und für die Überprüfung der Deletion von *pp\_0980* die Oligonukleotide S7107 und S7110.

Das PCR-Produkt der *pp\_0484* Deletion wurde aufgrund seiner ähnlichen Größe zu dem Wildtyp-Fragment zusätzlich mittels Restriktionsverdau analysiert. Die Deletionsmutanten wurden *P. putida* 0484 und *P. putida* 0980 genannt. Für die Herstellung der Doppelmutante wurde der Stamm *P. putida* 0484 verwendet, bei dem die Deletion von *pp\_0980* nach dem oben beschriebenen Prinzip erzeugt wurde. Die Doppelmutante wurde *P. putida* 0484/0980 genannt.



**Abb. 48:** Prinzip der Gendeletion mit dem Upp-System. Der Deletionsvektor mit 5'- und 3'-flankierenden Sequenzen des zu deletierenden Gens (Gen Y) und einem Resistenzmarker ( $Tet^r$ ) in deren Mitte integriert durch homologe Rekombination mit den entsprechenden Sequenzen in das Genom von *P. putida*  $\Delta upp$ . Je nachdem, an welcher der beiden Sequenzen die Rekombination stattfindet, kann diese Integration entweder nach Schema 1 oder 2 erfolgen. Die korrekten Klone können durch die Plasmid-kodierten Resistenzmarker und ihrer Sensitivität gegenüber 5-Fluorouracil identifiziert werden. Eine erneute homologe Rekombination der mit \* oder x bezeichneten Sequenzen führt entweder zur Herstellung des Ausgangszustandes (Rekombination x) oder aber zur Deletion des Gens und zu einem Verbleiben des Resistenzgens ( $Tet^r$ ) im Genom (Rekombination \*). Die entsprechenden Klone können anhand ihrer Resistenz gegenüber 5-Fluorouracil und dem Antibiotikum (hier Tetracyclin) identifiziert werden.

Mit den drei hergestellten Mutanten *P. putida* 0484, *P. putida* 0980 und *P. putida* 0483/0980 wurden Konjugationsexperimente mit *E. coli* S17-1 pJOE5573.3 durchgeführt. Darüber hinaus wurden auch Konjugationsexperimente mit dem Ausgangsstamm *P. putida*  $\Delta upp$  und *E. coli* S17-1 pJOE5573.3 durchgeführt. Tab. 51 zeigt die für die Selektion der verschiedenen Zelltypen verwendeten Antibiotika, Tab. 52 zeigt die relativen Transkonjuganden-Ausbeuten, die bei Konjugationen mit *E. coli* S17-1 pJOE5573.3 und dem jeweiligen *P. putida* Stamm erzielt wurden.

**Tab. 51:** Antibiotika für die Selektion verschiedener Zelltypen bei Konjugationsexperimenten mit *E. coli* S17-1 Stämmen.

Konjugations-partner	Rezipienten + Transkonjuganden	Donoren + Transkonjuganden	Transkonjuganden
<i>P. putida</i> $\Delta upp$	Nalidixinsäure (10 µg/ml)	Kanamycin (50 µg/ml)	Nalidixinsäure (10 µg/ml) + Kanamycin (50 µg/ml)
<i>P. putida</i> 0484	Tetracyclin (20 µg/ml)	Kanamycin (50 µg/ml)	Tetracyclin (15 µg/ml) + Kanamycin (50 µg/ml)
<i>P. putida</i> 0980	Apramycin (50 µg/ml)	Kanamycin (50 µg/ml)	Apramycin (50 µg/ml) + Kanamycin (50 µg/ml)
<i>P. putida</i> 0484/0980	Apramycin (50 µg/ml)	Kanamycin (50 µg/ml)	Apramycin (50 µg/ml) + Kanamycin (50 µg/ml)

**Tab. 52:** Relative Transkonjuganden-Ausbeuten bei Konjugationen von *E. coli* S17-1 pJOE5573.3 mit verschiedenen *P. putida* Stämmen.

<i>P. putida</i> $\Delta upp$	<i>P. putida</i> 0484	<i>P. putida</i> 0980	<i>P. putida</i> 0484/0980
$1,15 \times 10^{-5} \pm 1,63 \times 10^{-6}$	$0,049 \pm 0,03$	$0,024 \pm 0,0043$	$0,027 \pm 0,01$

*P. putida*  $\Delta upp$  zeigte bei Konjugation mit *E. coli* S17-1 pJOE5573.3 eine ähnlich niedrige Transkonjuganden-Ausbeute wie *P. putida* KT2440 (vgl. Tab. 46). Die relative Transkonjuganden-Ausbeute der Deletionsmutante *P. putida* 0484 war in der Größenordnung der relativen Transkonjuganden-Ausbeute, die mit der korrespondierenden Transposon-Mutante D7L3 erzielt wurde. Die Deletionsmutante *P. putida* 0980 zeigte ebenfalls eine deutlich höhere relative Transkonjuganden-Ausbeute als *P. putida* KT2440 und *P. putida*  $\Delta upp$ . Die gleichzeitige Deletion von *pp\_0484* und *pp\_0980* hatte keinen additiven Effekt auf die relative Transkonjuganden-Ausbeute.

Die pJOE5573.3 Transkonjuganden der beiden, durch gezielte Gendeletion erzeugten Mutanten *P. putida* 0484 und *P. putida* 0980 zeigten im Vergleich zu den Transkonjuganden der jeweiligen Transposon-Mutanten *P. putida* D7L3 und C7L einige Unterschiede. Die durch die Konjugationsexperimente erhaltenen Transkonjuganden-Kolonien von *P. putida* 0484, *P. putida* 0980 und *P. putida* 0484/0980 mit pJOE5573.3 waren sehr klein und intensiv rosa gefärbt. Viele Transkonjuganden wuchsen bei einem erneuten Ausstreichen auf dem Selektivmedium entweder nur sehr schwach oder aber gar nicht mehr. Auch die Kultivierung in Flüssigkultur unter selektiven Bedingungen erwies sich als schwierig.

## 4.3 Bakterielle Carotinoid-Oxygenasen

### 4.3.1 Suche nach unbeschriebenen Carotinoid-Oxygenasen

Die Suche nach bisher unbeschriebenen Carotinoid-Oxygenasen erfolgte mit Hilfe der BLAST-Software. Als Ausgangspunkt für die Suche nach homologen Enzymen in der Datenbank diente die Aminosäuresequenz von NosCCD, einer bereits charakterisierten Carotinoid-Oxygenase des Cyanobakteriums *Nostoc* sp. PCC 7120 (Scherzinger und Al-Babili, 2008).

Über die Carotinoid-Oxygenasen von Proteobakterien ist bisher nur wenig bekannt. Daher wurden für die Untersuchungen das  $\alpha$ -Proteobakterium *Sphingopyxis alaskensis* RB2256 und das  $\delta$ -Proteobakterium *Plesiocystis pacifica* SIR-1 ausgewählt (siehe auch Kapitel 4.1.2.4 und 4.1.2.5). Neben ihrer Zugehörigkeit zur Klasse der *Proteobacteria*, war auch die Verfügbarkeit der Stämme über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig) ein Auswahlkriterium. In den beiden Genomen wurden bei der Datenbank-Suche jeweils zwei mutmaßliche Carotinoid-Oxygenasegene gefunden. Tab. 53 zeigt die Spezifikationen der vier Enzyme und ihre jeweilige Ähnlichkeit zu NosCCD.

**Tab. 53:** Mutmaßliche Carotinoid-Oxygenasen von *Sphingopyxis alaskensis* RB2256 und *Plesiocystis pacifica* SIR-1 sowie deren jeweilige Ähnlichkeit zu der Carotinoid-Oxygenase NosCCD von *Nostoc* sp. PCC 7120.

mutmaßliche Carotinoid-Oxygenase	Protein ID	Identität (%) <sup>*</sup>	Ähnlichkeit (%) <sup>**</sup>
Ppsir1_15490	ZP_01913312.1	27	41
Ppsir1_17230	ZP_01912480.1	36	55
Sala_1008	YP_616058.1	38	59
Sala_1698	YP_616744.1	37	53

\* Prozentualer Anteil der identischen Aminosäurereste der beiden verglichenen Proteine.

\*\* Prozentualer Anteil der identischen Aminosäurereste plus den Anteil der konservativ substituierten Aminosäurereste der beiden verglichenen Proteine.

### 4.3.2 Klonierung der Gene und Kontrolle der Genexpression mittels SDS-PAGE

Die Gene der mutmaßlichen Carotinoid-Oxygenasen wurden mittels PCR amplifiziert, die verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 54 angegeben. Als Matrize diente die chromosomale DNA des jeweiligen Bakterienstammes. Die PCR-Produkte wurden mit den in Tab. 54 angegebenen Enzymen geschnitten und in den mit *NdeI* und *HindIII* linearisierten Vektor pJOE5751.1 (Abb. 18) integriert. Die DNA-Sequenzen der klonierten Gene wurden mittels DNA-Sequenzierung überprüft (Oligonukleotide S4417 und T7, Tab. 10).

**Tab. 54:** Plasmide mit Genen von mutmaßlichen Carotinoid-Oxygenasen und die für ihre Amplifikation verwendeten Oligonukleotide sowie die für die Integration in pJOE5751.1 verwendeten Restriktionsschnittstellen.

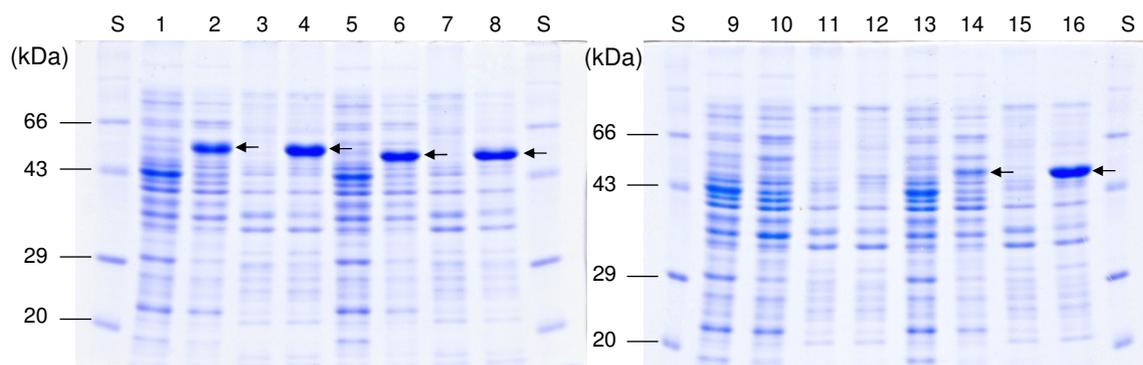
Plasmid	integriertes Gen	Oligonukleotide	Restriktionsschnittstellen
pJH41.1	<i>sala_1008</i>	S5633, S5634	<i>Asel</i> / <i>HindIII</i>
pJH42.1	<i>sala_1698</i>	S5631, S5632	<i>NdeI</i> / <i>HindIII</i>
pJH59.1	<i>ppsir1_15490</i>	S5635; S5636	<i>NdeI</i> / <i>HindIII</i>
pJH60.2	<i>ppsir1_17230</i>	S5637, S5638	<i>NdeI</i> / <i>HindIII</i>

Nach der Klonierung der Gene wurde ihre Expression überprüft. Hierfür wurden die Plasmid-tragenden *E. coli* JM109 Stämme in LB mit 100 µg/ml Ampicillin kultiviert. Die Vorkulturen wurden 1:100 mit frischem Medium verdünnt und bei 37 °C und 200 rpm auf dem Schüttler inkubiert, bis die OD<sub>600</sub> einen Wert von ca. 0,3 erreichte. Die Induktion der Genexpression erfolgte durch die Zugabe von 0,2 % (w/v) L-Rhamnose. Zur Kontrolle wurde von jedem Stamm parallel eine Kultur ohne L-Rhamnose mit inkubiert. Nach der Induktorzugabe wurden die Kulturen für 5 h bei 30 °C und 200 rpm weiter inkubiert. Anschließend wurden 10 OD Zellen geerntet (Zentrifugation, Megafuge, 4.500 rpm, 10 min), mit 1 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) gewaschen und in 0,5 ml des gleichen Puffers resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschallhomogenisator (siehe Kapitel 3.6.1). Die Proben wurden zentrifugiert (Tischzentrifuge, 10 min, 13.000 rpm) und die Überstände isoliert (lösliche Proteinfractionen). Die Zentrifugationssedimente (unlösliche Proteinfractionen) wurden in 0,5 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer

(pH 7,0) resuspendiert. 40 µl jeder Probe wurden mit 10 µl 5 x SDS-Probenpuffer (Tab. 12) vermischt und für 10 min bei 95 °C im Heizblock inkubiert. 8 µl der Proben wurden mittels SDS-PAGE (siehe Kapitel 3.9.1) analysiert. Abb. 49 zeigt die SDS-Gele, in Tab. 55 sind die Molekulargewichte der mutmaßlichen Carotinoid-Oxygenasen angegeben. Außer bei *E. coli* JM109 pJH59.1 war bei den Proben der induzierten Kulturen im Vergleich zu den Proben der jeweiligen uninduzierten Kulturen eine zusätzliche Proteinbande zu sehen (Abb. 49). Ein Teil des Proteins befand sich bei allen Proben in der unlöslichen Fraktion. Bei *E. coli* pJH60.2 war der überwiegende Teil des Proteins in der unlöslichen Fraktion lokalisiert.

**Tab. 55:** Molekulargewichte der mutmaßlichen Carotinoid-Oxygenasen von *Sphingopyxis alaskensis* RB2256 und *Plesiocystis pacifica* SIR-1.

mutmaßliche Carotinoid-Oxygenase	Molekulargewicht (kDa)
Sala_1008	56,7
Sala_1698	53,4
Ppsir1_15490	52,5
Ppsir1_17230	54,1

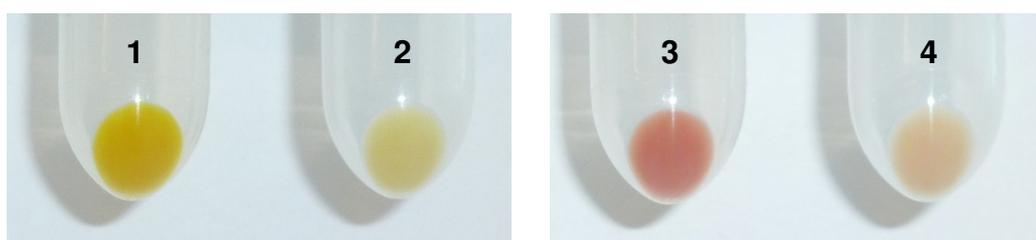


**Abb. 49:** SDS-PAGE-Analyse der Expression von mutmaßlichen Carotinoid-Oxygenasen in *E. coli* JM109. Spuren mit ungeraden Zahlen: Proben von Kulturen ohne L-Rhamnose; Spuren mit geraden Zahlen: Kulturen mit 0,2 % (w/v) L-Rhamnose. **S:** Roti®-Mark Standard (8 µl); **1, 2:** lösliche Fraktionen pJH41.1 (*sala\_1008*); **3, 4:** unlösliche Fraktionen pJH41.1; **5, 6:** lösliche Fraktionen pJH42.1 (*sala\_1698*); **7, 8:** unlösliche Fraktionen pJH42.1; **9, 10:** lösliche Fraktionen pJH59.1 (*ppsir1\_15490*); **11, 12:** unlösliche Fraktionen pJH59.1; **13, 14:** lösliche Fraktionen pJH60.2 (*ppsir1\_17230*); **15, 16:** unlösliche Fraktionen pJH60.2. Mit Pfeilen markiert: Proteinbanden, bei denen es sich wahrscheinlich um Sala\_1008, Sala\_1698 bzw. Ppsir1\_17230 handelt.

### 4.3.3 Test auf Carotinoid-Spaltaktivität

Für den Test auf Carotinoid-Spaltaktivität wurden die verschiedenen Oxygenase-Vektoren mit den in Kapitel 4.1 vorgestellten, kompatiblen Carotinoid-Biosynthesevektoren kombiniert. *E. coli* JM109 wurde zunächst mit jeweils einem Oxygenase- und einem Carotinoid-Biosyntheseplasmid transformiert. Für die Herstellung der Kontrollstämme wurde *E. coli* JM109 mit dem jeweiligen Carotinoid-Plasmid und einem „leeren“ Vektor ohne Oxygenase-Gen (pJH43.1) transformiert.

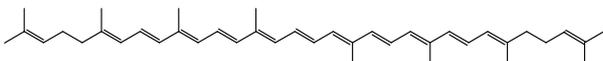
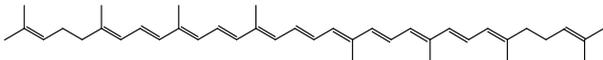
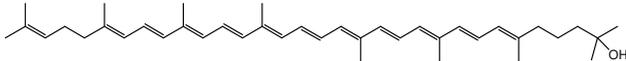
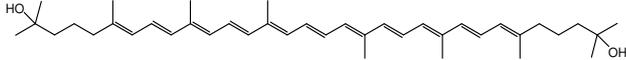
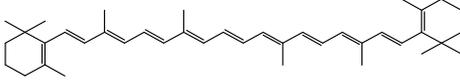
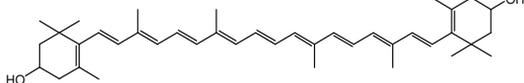
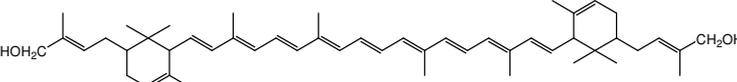
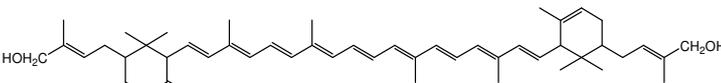
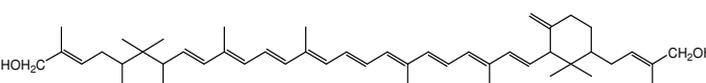
Die Stämme wurden in 10 ml LB mit 100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin, 46 mM Natriumphosphatpuffer und 0,46 % (v/v) Glycerin kultiviert. Die Vorkulturen wurden 1:100 mit frischem Medium verdünnt und bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Bei OD<sub>600</sub>-Werten zwischen 0,25 und 0,3 erfolgte die Zugabe von 0,2 % (w/v) L-Rhamnose. Nach der Induktorzugabe wurden die Kulturen über Nacht bei 30 °C weiter inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen von 2 ml Kultur durch Zentrifugation sedimentiert (Tischzentrifuge, 5 min, 4.500 rpm) und die Überstände verworfen. Die Farben der Zentrifugationssedimente der Carotinoid-produzierenden Stämme, welche die Oxygenase-Gene exprimierten wurden mit den jeweiligen Kontrollstämmen ohne Oxygenase-Gene verglichen. Eine im Vergleich zum Kontrollstamm hellere Färbung wurde als Carotinoid-Spaltaktivität der jeweiligen Oxygenase für das getestete Carotinoid-Substrat aufgefasst. Beispiele für das Aussehen der Zentrifugationssedimente sind in Abb. 50 gezeigt.



**Abb. 50:** Carotinoid-Spaltung durch Ppsir1\_15490. Gezeigt sind die Zentrifugationssedimente von 2 ml *E. coli* JM109 Kulturen mit verschiedenen Plasmid-Kombinationen. Die Genexpression wurde mit 0,2 % (w/v) L-Rhamnose induziert. **1** pJH29.10/pJH43.1 (Kontrolle), **2** pJH29.10/pJH59.1, **3** pJH88.1/pJH43.1 (Kontrolle), **4** pJH88.1/pJH59.1.

Tab. 56 zeigt die für die Tests eingesetzten Carotinoid-Biosynthesevektoren und die von den entsprechenden *E. coli* JM109 Stämmen produzierten Carotinoide. Tab. 57 zeigt die Ergebnisse der Tests. Die zusätzliche Expression von Sala\_1698 führte bei allen getesteten Carotinoid-produzierenden *E. coli* JM109 Stämmen zu einer Verringerung der Farbintensität. Man kann bei dieser Art Experiment allerdings nicht sagen, ob Sala\_1698 alle Carotinoid-Substrate umsetzte oder ob eventuell schon eine gemeinsame Vorstufe abgebaut wurde und es so gar nicht erst zur Synthese der Carotinoide kam, die aus dieser Vorstufe synthetisiert werden. Würde beispielsweise Lycopin abgebaut werden, bliebe auch die Bildung von  $\beta$ -Carotin aus, weil dieses durch die Cyclisierung von Lycopin entsteht. Im Folgenden könnte auch kein Zeaxanthin entstehen, weil dieses durch die Hydroxylierung von  $\beta$ -Carotin gebildet wird. Dieses Szenario würde daher bei dem durchgeführten Experiment zu den gleichen Ergebnissen führen, wie eine Spaltaktivität von Sala\_1698 für alle getesteten Carotinoid-Substrate.

**Tab. 56:** Für Doppelinduktionsexperimente eingesetzte Carotinoid-Biosynthesevektoren und die von den entsprechenden *E. coli* JM109 Stämmen produzierten Carotinoide sowie deren Strukturformeln.

Plasmid	Produkt(e)	Strukturformeln
pJOE5573.3	Lycopin	
pJH88.1	Lycopin	
	Hydroxylycopin	
	Dihydroxylycopin	
pJOE5607.5	$\beta$ -Carotin	
pJH14.1	Zeaxanthin	
pJH29.10	Decaprenoxanthin	
	Sarprenoxanthin	
	Sarcinaxanthin	

Die Anwesenheit von Ppsir1\_15490 führte nur bei den Stämmen zu einer Verringerung der Farbintensität, die hydroxylierte Carotinoide produzierten, also den Stämmen mit pJH14.1 (Zeaxanthin), pJH29.10 (Decapreno-, Sarpreno- und Sarcinaxanthin) und pJH88.1 (Lycopin, Hydroxylycopin und Dihydroxylycopin). Eine Farbveränderung von Stämmen mit pJOE5607.5 ( $\beta$ -Carotin) und pJOE5573.3 (Lycopin) blieb hingegen aus (vgl. Tab. 56). Offenbar setzt das Enzym ausschließlich Substrate mit Hydroxygruppen um, wobei es keine Rolle zu spielen scheint, ob das Carotinoid acyclisch oder bicyclisch ist.

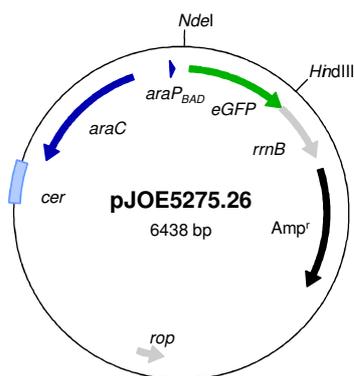
**Tab. 57:** Spaltaktivitäten der getesteten Carotinoid-Oxygenasen für verschiedene Carotinoide bei Doppelinduktionsexperimenten mit *E. coli* JM109 Stämmen. „+“ bedeutet eine im Vergleich zum Kontrollstamm hellere Färbung der Zellen und somit einen Hinweis auf Carotinoid-Spaltaktivität, „-“ bedeutet keinen Unterschied zum Kontrollstamm.

<u>Oxygenase-Plasmide</u>	<u>Carotinoid-Biosyntheseplasmide</u>				
	pJOE5573.3	pJH88.1	pJOE5607.5	pJH14.1	pJH29.10
pJH41.1 (Sala_1008)	-	-	-	-	-
pJH42.1 (Sala_1698)	+	+	+	+	+
pJH59.1 (Ppsir1_15490)	-	+	-	+	+
pJH60.2 (Ppsir1_17230)	-	-	-	-	-

#### 4.3.4 Charakterisierung der Carotinoid-Oxygenase Sala\_1698

##### 4.3.4.1 Entkopplung der Oxygenase-Synthese von der Carotinoid-Synthese und Untersuchung der Spaltung von verschiedenen Carotinoiden *in vivo*

Die Koexpression von *sala\_1698* führte bei allen getesteten Carotinoid-produzierenden Stämmen zu einer Verringerung der Farbintensität. Dadurch konnten keine differenzierten Erkenntnisse bezüglich der Spezifität des Enzyms für ein bestimmtes Carotinoid-Substrat gewonnen werden. Daher sollte die Carotinoid-Synthese von der Oxygenase-Synthese entkoppelt werden. Hierfür wurde *sala\_1698* mit *Nde*I und *Hind*III aus pJH42.1 (Tab. 54) herausgeschnitten und unter Ausnutzung der gleichen Schnittstellen in pJOE5275.26 (Abb. 51) integriert ( $\rightarrow$ pJH55.1). Der Vektor pJOE5275.26 enthält den *E. coli* L-Arabinose-Promotor



**Abb. 51:** pJOE5275.26

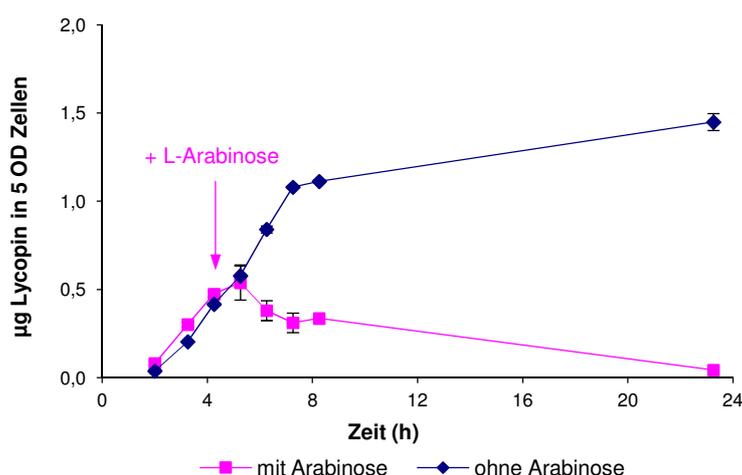
*araP<sub>BAD</sub>* sowie das Gen *araC*, welches für den Transkriptionsaktivator des Promotors kodiert. Die Genexpression von *sala\_1698* mit pJH55.1 ist daher L-Arabinose-induzierbar. Im Gegensatz zu den bisherigen Experimenten, bei denen die Expression der Carotinoid- und Oxygenase-Gene gleichzeitig induziert wurde, konnte nun die Zugabe der beiden Induktoren L-Rhamnose (Induktion der Carotinoid-Synthese) und L-Arabinose (Induktion der Oxygenase-Synthese) zu unterschiedlichen Zeitpunkten

erfolgen. Dadurch war es möglich zunächst die Carotinoid-Produktion mit L-Rhamnose zu induzieren und bis zu dem Zeitpunkt der L-Arabinose-Zugabe und somit dem Beginn der Oxygenase-Genexpression Carotinoide zu synthetisieren. Falls eine Spaltaktivität von *Sala\_1698* für ein bestimmtes Substrat vorliegt, sollte der Carotinoid-Gehalt der Zellen nach der L-Arabinose-Zugabe wieder sinken bzw. falls keine spezifische Spaltaktivität für das getestete Substrat vorliegt, der Gehalt an dem jeweiligen Carotinoid weiter steigen oder, im Falle des Abbaus seiner Vorstufe, zumindest stabil bleiben. Damit sollte die Frage geklärt werden, ob die durch *Sala\_1698* hervorgerufene Entfärbung der Stämme, welche Lycopin-basierte Carotinoide produzieren, durch den Abbau ihrer Vorstufe Lycopin verursacht wurde (siehe Kapitel 4.3.3).

Für die Untersuchungen wurden die Carotinoid-Biosynthesevektoren pJOE5573.3 (Lycopin) und pJH88.1 (Lycopin, Hydroxylycopin und Dihydroxylycopin) eingesetzt (Tab. 56). *E. coli* JM109 wurde mit pJH55.1 und verschiedenen Carotinoid-Biosynthesevektoren transformiert. Die Stämme wurden in 100 ml LB mit 100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin, 46 mM Natriumphosphatpuffer und 0,46 % (v/v) Glycerin kultiviert. Die Vorkulturen wurden so umgesetzt, dass die Hauptkultur eine OD<sub>600</sub> von 0,022 – 0,025 hatte und diese dann bei 30 °C und 200 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Die Induktion der Carotinoid-Produktion erfolgte nach 1 h und 50 min durch die Zugabe von 0,2 % (w/v) L-Rhamnose. Die Expression von *sala\_1698* wurde weitere 4,25 Stunden später durch die Zugabe von 0,2 % (w/v) L-Arabinose induziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden 5 OD Zellen geerntet, einmal mit 0,5 ml H<sub>2</sub>O gewaschen und dann sofort mit

200 µl Aceton versetzt und geschüttelt, um die Enzymreaktionen zu stoppen. Die Proben wurden wie in Kapitel 3.10.4.3 beschrieben extrahiert. Die Extrakte wurden in 100 µl Aceton gelöst und 20 µl der Lösungen wurden mittels HPLC (siehe Kapitel 3.11.1, HPLC-Methode 2) analysiert.

Abb. 52 zeigt die Messergebnisse für *E. coli* JM109 pJOE5573.3/pJH55.1. Der Zeitpunkt 0 entspricht dem Zeitpunkt der L-Rhamnose-Zugabe (Induktion der Lycopin-Produktion). Der Lycopin-Gehalt der Kontrollkultur, bei der keine L-Arabinose hinzugefügt wurde, stieg kontinuierlich an und erreichte nach 23,25 h einen Wert von 1,45 µg Lycopin pro 5 OD Zellen. Der Lycopin-Gehalt der Kultur mit L-Rhamnose und L-Arabinose stieg zunächst ebenfalls an. Der höchste Lycopin-Gehalt von 0,47 µg pro 5 OD Zellen wurde eine Stunde nach der L-Arabinose-Zugabe (5,25 h) gemessen, danach sank der Lycopin-Gehalt wieder ab. Nach 23,25 h waren nur noch 0,04 µg Lycopin pro 5 OD Zellen messbar. Das bedeutet, dass das bereits synthetisierte Lycopin durch Sala\_1698 wieder abgebaut wurde. Die Tatsache, dass der Lycopin-Gehalt unmittelbar nach der L-Arabinose-Zugabe zunächst noch weiter anstieg, kann damit erklärt werden, dass es nach der Induktorzugabe einige Zeit braucht, bis die Zellen das Protein Sala\_1698 synthetisiert haben und daher die Lycopin-Spaltung nicht sofort nach der L-Arabinose-Zugabe beginnen kann.

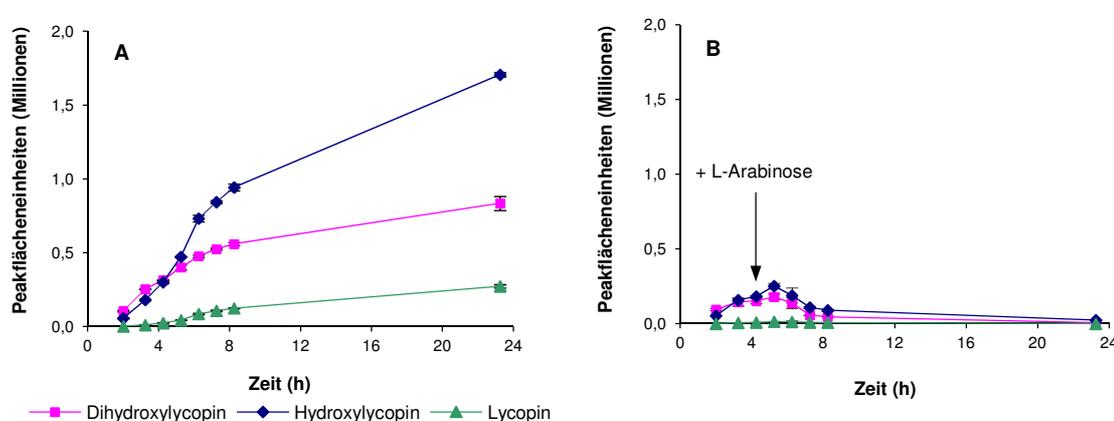


**Abb. 52:** Zeitabhängige Veränderung des Lycopin-Gehaltes von 5 OD Zellen von *E. coli* JM109 pJOE5573.3/pJH55.1 mit und ohne Induktion der Expression von *sala\_1698* mit L-Arabinose. Der Zeitpunkt 0 entspricht dem Zeitpunkt der L-Rhamnose-Zugabe (Induktion der Lycopin-Produktion).

Mit Hilfe des durchgeführten Experimentes konnte gezeigt werden, dass Sala\_1698 Lycopin spaltet. Wahrscheinlich beruht also der Farbverlust der Stämme, die Lycopin-basierte Carotinoide produzieren auf der Spaltung ihrer gemeinsamen Vorstufe. Es ist in diesem Zusammenhang auch denkbar, dass Sala\_1698 neben Lycopin auch Phytoin spaltet. Mit dem durchgeführten Experiment kann diese Frage nicht geklärt werden, weil im Falle der Spaltung von Phytoin das gleiche Ergebnis erzielt werden würde. Ab dem Zeitpunkt der Spaltung von Lycopin durch Sala\_1698 würde auch dessen Vorstufe Phytoin gespalten werden. Damit würde das bereits vorhandene Lycopin abgebaut werden und gleichzeitig kein neues Lycopin mehr synthetisiert werden. Das hätte den gleichen Verlauf des Lycopin-Gehaltes der Kultur zur Folge wie eine kontinuierliche Spaltung von neu gebildetem Lycopin. In den HPLC-Chromatogrammen der Proben von der Kultur mit L-Arabinose waren im Vergleich zu den HPLC-Chromatogrammen der Proben von der Kontrollkultur ohne L-Arabinose keine zusätzlichen Peaks sichtbar, die möglichen Lycopin-Spaltprodukten hätten zugeordnet werden können.

Als nächstes wurde die Spaltaktivität von Sala\_1698 für die Substrate Hydroxy- und Dihydroxylycopin untersucht. Da die beiden Substanzen mit den eingesetzten Vektoren und *E. coli* JM109 nur als Gemisch produziert werden können (vgl. Kapitel 4.1.2.5) und diese daher einzeln nicht in ausreichender Reinheit für die Durchführung einer Kalibrierung zur Verfügung standen, wird ihr Gehalt im Folgenden in Peakflächeneinheiten pro 5 OD Zellen angegeben und nicht in  $\mu\text{g}$  pro 5 OD Zellen. Abb. 53 zeigt die Messergebnisse. Bei der Kultur ohne L-Arabinose stieg der Gehalt an allen drei Carotinoiden in 5 OD Zellen stetig an. Nach 23,25 h betrug die Fläche des Peaks von Hydroxylycopin 1,72 Millionen Einheiten, die Fläche des Peaks von Dihydroxylycopin 0,84 Millionen Einheiten und die Fläche des Lycopin-Peaks 0,27 Millionen Einheiten. Der Carotinoid-Gehalt der Kultur mit L-Arabinose stieg zunächst ebenfalls an. Die höchsten Werte wurde eine Stunde nach der L-Arabinose-Zugabe gemessen. Die Fläche des Peaks von Hydroxylycopin betrug zu diesem Zeitpunkt 0,25 Millionen Einheiten, der Peak von Dihydroxylycopin hatte eine Fläche von 0,18 Millionen Einheiten und der Lycopin-Peak eine Fläche von 0,014 Millionen Einheiten. Danach kam es zu einer Verringerung der Flächen der drei Peaks. Nach 23,25 h betrug die Fläche des

Hydroxylycopin-Peaks noch 0,024 Millionen Einheiten und die Fläche des Dihydroxylycopin-Peaks 0,008 Millionen Einheiten. Lycopin war zu diesem Zeitpunkt gar nicht mehr nachweisbar. Da die Peakflächeneinheiten von Hydroxylycopin und Dihydroxylycopin nach der Zugabe von L-Arabinose wieder abnahmen, kann man davon ausgehen, dass Sala\_1698 diese Carotinoide ebenfalls spaltet. Auch bei *E. coli* JM109 pJH88.1/pJH55.1 waren in den HPLC-Chromatogrammen der Proben von der Kultur mit L-Arabinose im Vergleich zu den Chromatogrammen der Proben von der Kontrollkultur ohne L-Arabinose keine zusätzlichen Peaks zu beobachten.



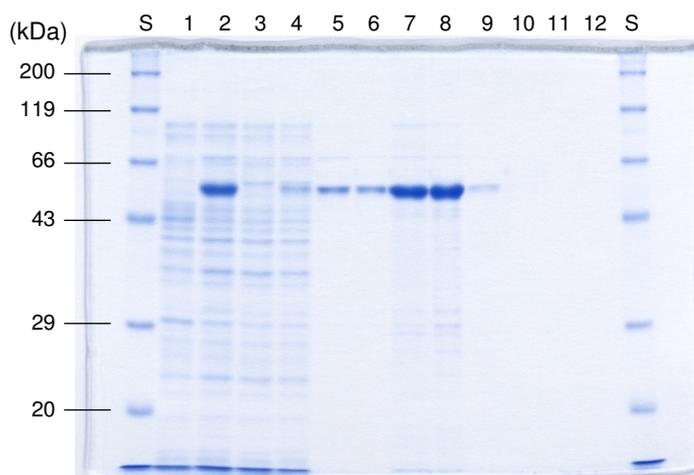
**Abb. 53:** Zeitabhängige Veränderung des Dihydroxylycopin-, Hydroxylycopin- und Lycopin-Gehaltes in 5 OD Zellen von *E. coli* JM109 pJH88.1/pJH55.1 mit und ohne Induktion der Expression von *sala\_1698* mit L-Arabinose. **A** Kultur ohne L-Arabinose, **B** Kultur mit L-Arabinose. Der Zeitpunkt 0 entspricht dem Zeitpunkt der L-Rhamnose-Zugabe (Induktion der Carotinoid-Produktion).

#### 4.3.4.2 Enzymaufreinigung von Sala\_1698 mit Strep-Tactin® Sepharose

Mit Hilfe der in Kapitel 4.3.4.1 beschriebenen Doppelinduktionsexperimente konnte gezeigt werden, dass Sala\_1698 für Lycopin, Hydroxylycopin und Dihydroxylycopin eine Spaltaktivität besitzt. In den HPLC-Chromatogrammen waren aber keine zusätzlichen Peaks zu beobachten, die möglichen Spaltprodukten hätten zugeordnet werden können. Dadurch konnte nicht geklärt werden wo die Carotinoid-Substrate von Sala\_1698 geschnitten werden und welche Spaltprodukte dabei entstehen. Um diesbezüglich weitere Erkenntnisse zu gewinnen, sollte Sala\_1698 aufgereinigt und anschließend für *in vitro* Studien eingesetzt werden.

Als Aufreinigungsmethode für Sala\_1698 wurde das *Strep-tag*<sup>®</sup>II/*Strep-Tactin*<sup>®</sup> System der Firma IBA (Göttingen) verwendet. Für die Herstellung des *Strep-tag*<sup>®</sup>II-Sala\_1698 Fusionsproteins wurde *sala\_1698* zunächst mit den Oligonukleotiden S5631 und S5915 (Tab. 10) amplifiziert. Als Matrize diente pJH42.1 (Tab. 54). Durch das Oligonukleotid S5915 wurde das Stoppcodon von *sala\_1698* aus der Sequenz des PCR-Produktes deletiert und gleichzeitig eine *Bam*HI-Schnittstelle an das 3'-Ende von *sala\_1698* angefügt. Durch den Einsatz des Oligonukleotids S5631 wurde an das 5'-Ende von *sala\_1698* eine *Nde*I-Schnittstelle angefügt. Das PCR-Produkt wurde gereinigt, mit *Nde*I und *Bam*HI geschnitten und in den mit *Nde*I und *Bam*HI linearisierten Vektor pJOE6089.4 (Tab. 8) integriert (→pJH58.2). Der Vektor enthält die Nukleotidsequenz für den acht Aminosäuren langen *Strep-tag*<sup>®</sup>II und ein Stoppcodon, welche durch die Verwendung der *Bam*HI-Schnittstelle translational an das 3'-Ende von *sala\_1698* fusioniert wurden. Die DNA-Sequenz von *sala\_1698* wurde mittels DNA-Sequenzierung überprüft (Oligonukleotide T7 und S4417, Tab. 10).

Als nächstes wurde *E. coli* JM109 mit pJH58.2 transformiert und in LB mit 100 µg/ml Ampicillin kultiviert. Die Vorkultur wurde 1:100 mit frischem Medium verdünnt (40 ml) und bei 37 °C und 200 rpm auf dem Schüttler inkubiert bis die Kultur einen OD<sub>600</sub>-Wert von ca. 0,3 erreichte. Die Genexpression wurde dann mit 0,2 % (w/v) L-Rhamnose induziert und die Kultur über Nacht bei 30 °C weiter inkubiert. Als Kontrolle wurde parallel eine Kultur ohne Induktorzugabe mit inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen geerntet (Kühlzentrifuge, Rotor GSA, 10 min, 4.500 rpm), einmal mit 10 ml kaltem 1 x PBS mit 1 mM Tris(2-Carboxyethyl)phosphin gewaschen und in 10 ml des gleichen Puffers resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Hochdruckhomogenisator (siehe Kapitel 3.6.2). Die Proben wurden zentrifugiert (Kühlzentrifuge, Rotor SS-34, 15 min, 15.000 rpm) und der Überstand der induzierten Probe für die Aufreinigung verwendet. Die Enzymaufreinigung mittels *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Sepharose erfolgte wie in Kapitel 3.9.2 beschrieben. Abb. 54 zeigt die SDS-PAGE-Analyse der Protein-Rohextrakte der uninduzierten und induzierten Kultur sowie Proben von verschiedenen Fraktionen, die während der Enzymaufreinigung gesammelt wurden. Der Anteil von Sala\_1698 am Gesamtprotein betrug 8 – 12 %.

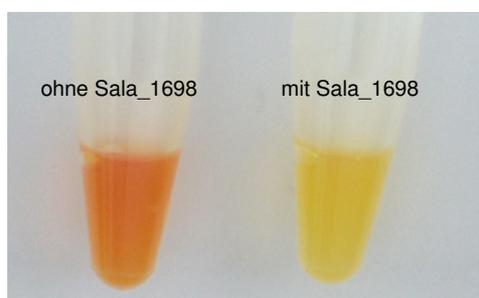


**Abb. 54:** SDS-PAGE-Analyse von Protein-Rohextrakten von *E. coli* JM109 pJH58.2 und verschiedenen Fraktionen, die während der Aufreinigung von Sala\_1698 mit *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Sepharose gesammelt wurden. **S** Roti<sup>®</sup>-Mark Standard, **1** Protein-Rohextrakt der uninduzierten Kultur (lösliche Fraktion), **2** Protein-Rohextrakt der induzierten Kultur (lösliche Fraktion), **3** Durchflussfraktion 2, **4** Durchflussfraktion 8, **5** Waschfraktion 2, **6** Waschfraktion 5, **7 – 12** Elutionsfraktionen 1 bis 6. Aufgetragene Volumina: Roti<sup>®</sup>-Mark Standard: 5 µl, Spur 8 (Elutionsfraktion 2): 2,5 µl, alle anderen Spuren: 10 µl.

#### 4.3.4.3 *In vitro* Carotinoid-Umsetzungen mit gereinigtem Sala\_1698

Das aufgereinigte Enzym Sala\_1698 wurde im nächsten Schritt für *in vitro* Umsetzungen von Carotinoiden eingesetzt. Als Substrate wurden Apo-8'-carotinal, β-Carotin, Lycopin und Zeaxanthin verwendet. Um die wasserunlöslichen Carotinoide dem Enzym für die Umsetzung im wässrigen Milieu zugänglich zu machen, wurde die Methode der Mizellierung angewendet (siehe Kapitel 3.10.2). Hierbei wird das jeweilige Carotinoid zunächst in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst (Tab. 27). Anschließend wird ein in Ethanol gelöstes Detergenz hinzugefügt (*n*-Octyl-β-D-glucopyranosid oder Triton<sup>®</sup> X-100) und die Ansätze gemischt. Das Lösungsmittel wird dann der Vakuumzentrifuge wieder verdampft. Die erhaltenen Rückstände können in Puffer suspendiert werden, wodurch eine Dispersion mit Carotinoid-haltigen Detergenz-Mizellen entsteht. Bei einer erfolgreichen Mizellierung ist die wässrige Dispersion relativ klar und intensiv gefärbt. Für Apo-8'-carotinal, β-Carotin und Zeaxanthin konnte dies erreicht werden. Die Herstellung von Lycopin-haltigen Mizellen konnte hingegen nicht optimiert werden. Nach der Trocknung in der Vakuumzentrifuge waren stets ein roter Niederschlag an der

Reaktionsgefäßwand und relativ große Lycopin-Partikel am Boden des Reaktionsgefäßes zu beobachten. Die erhaltene Puffer-Mizellen-Dispersion war dementsprechend nur sehr schwach gefärbt. Für die Umsetzungen wurden die Carotinoid-Detergenz-Rückstände in 100 µl 2 x Inkubationspuffer I (Tab. 12) suspendiert. Zu den Ansätzen wurden dann 20 µg gereinigtes Sala\_1698 und H<sub>2</sub>O gegeben, so dass ein Endvolumen von 200 µl erreicht wurde. Die Reaktionsansätze enthielten 80 µM Carotinoid-Substrat, 100 mM HEPES-NaOH (pH 7,4), 1 mM Tris(2-Carboxyethyl)phosphin und 0,3 mM FeSO<sub>4</sub>. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Thermomixer bei 25 °C und 500 rpm. Am nächsten Morgen wurde

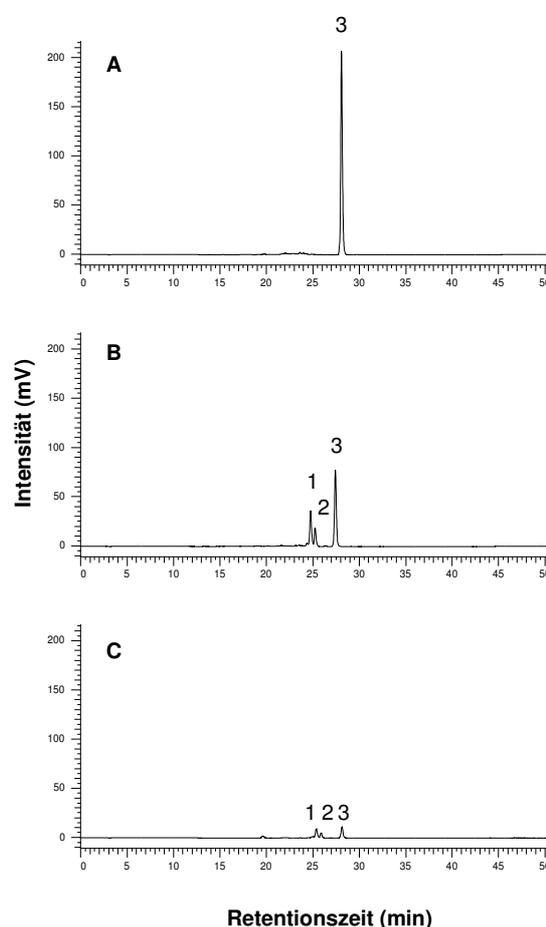


**Abb. 55:** Abbau von Apo-8'-carotinal durch Sala\_1698. Es wurden 80 µM Apo-8'-carotinal mit 20 µg gereinigtem Sala\_1698 über Nacht in Inkubationspuffer I bei 25 °C und 500 rpm umgesetzt. Links: Kontrolle ohne Enzym. Rechts: Umsetzung mit Sala\_1698.

die Enzymreaktion durch die Zugabe von 200 µl Aceton gestoppt und die Farbveränderung der Reaktionsansätze im Vergleich zu einer Kontrollprobe ohne Enzym beurteilt. Ausschließlich bei dem Ansatz mit Apo-8'-carotinal war eine Farbveränderung zu beobachten. Die Farbe des Ansatzes mit Sala\_1698 wechselte im Vergleich zu der Kontrolle von orange zu gelb (Abb. 55). Bei Zeaxanthin, β-Carotin und Lycopin war im Vergleich zu dem jeweiligen Kontrollansatz keine Farbveränderung zu beobachten.

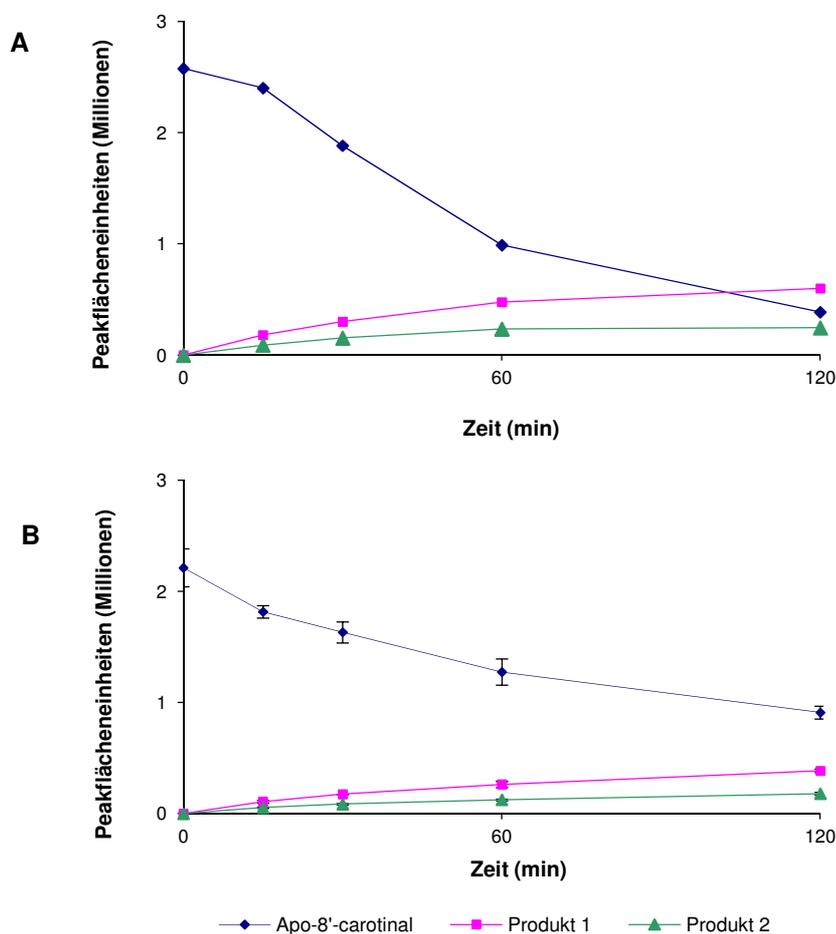
Im Folgenden wurde die Apo-8'-carotinal-Spaltung durch Sala\_1698 genauer untersucht. Es erfolgten mehrere parallele Umsetzungen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch die Zugabe von 200 µl Aceton gestoppt wurden. Es wurde außerdem eine Kontrolle ohne Sala\_1698 über Nacht mit inkubiert. Die Carotinoide der Reaktionsansätze wurden wie in Kapitel 3.10.4.5 beschrieben extrahiert, die Rückstände in 300 µl Aceton gelöst und 20 µl der jeweiligen Probe wurden mittels HPLC analysiert. Abb. 56 A zeigt das Chromatogramm des Extraktes von dem Kontrollansatz ohne Enzym. Hier ist nur der Apo-8'-carotinal Peak mit der Retentionszeit 28,07 min zu sehen. Der Apo-8'-carotinal-Gehalt betrug 5,03 µg. Nach einer Stunde Umsetzung konnte eine deutliche Verkleinerung des Apo-8'-

carotinal-Peaks beobachtet werden (Abb. 56 B). Der Apo-8'-carotinal-Gehalt der Probe betrug 1,93 µg. Neben dem Apo-8'-carotinal-Peak konnten zwei neue Peaks mit den Retentionszeiten 24,75 min (Peak 1) und 25,23 min (Peak 2) beobachtet werden, die in dem Chromatogramm der Kontrollprobe nicht zu sehen waren. In dem Chromatogramm der Probe, die über Nacht inkubiert wurde, war eine weitere Verkleinerung des Apo-8'-carotinal-Peaks zu beobachten (Abb. 56 C) Der Gehalt an Apo-8'-carotinal betrug noch 0,31 µg. Aber auch Peak 1 und 2 waren im Vergleich zu den Peaks in Abb. 56 B deutlich kleiner. Hierfür kommen zwei Ursachen in Frage. Entweder sind die entstehenden Verbindungen instabil oder Sala\_1698 kann diese Verbindungen ebenfalls als Substrat nutzen und baut sie weiter ab zu Verbindungen, die mit der angewendeten HPLC-Analytik nicht messbar waren. In Abb. 57 ist der zeitlichen Verlauf der Peakflächeneinheiten des Apo-8'-carotinal-Peaks und der beiden Produkt-Peaks 1 und 2 über einen Zeitraum von zwei Stunden dargestellt. Die Umsetzungen erfolgten für jeweils 15, 30, 60 und 120 min. Für die Umsetzungen in Diagramm A wurde 2 x Inkubationspuffer I verwendet, für die Umsetzungen in Diagramm B wurde das FeSO<sub>4</sub> im Puffer weggelassen. Man sieht deutlich, dass das Vorhandensein von FeSO<sub>4</sub> im Inkubationspuffer einen positiven Effekt auf die Enzymaktivität von Sala\_1698 hatte. Der Gehalt an Apo-8'-carotinal in den Proben von der Umsetzung mit FeSO<sub>4</sub> sank insgesamt schneller ab als in den Proben von der Umsetzung ohne FeSO<sub>4</sub>. In FeSO<sub>4</sub>-haltigem Puffer wurden innerhalb von



**Abb. 56:** HPLC-Chromatogramme (Methode 2) von *in vitro* Apo-8'-carotinal-Umsetzungen mit gereinigtem Sala\_1698. **A** Kontrolle ohne Sala\_1698, **B** Umsetzung für 1 h, **C** Umsetzung über Nacht. Peaks: **1** Apo-8'-carotinal-Spaltprodukt 1, **2** Apo-8'-carotinal-Spaltprodukt 2, **3** Apo-8'-carotinal.

zwei Stunden 85 % des Apo-8'-carotinals umgesetzt, wohingegen in dem Ansatz ohne Eisen innerhalb von zwei Stunden nur 59 % des Apo-8'-carotinals umgesetzt wurden. Bei der Verwendung des Puffers mit FeSO<sub>4</sub> waren nach 2 h Umsetzung auch größere Mengen Produkt 1 und 2 messbar. Die Flächen von Peak 1 und Peak 2 betragen 0,600 und 0,246 Millionen Einheiten, während die Flächen von Peak 1 und 2 nach 2 h Umsetzung in Puffer ohne FeSO<sub>4</sub> nur 0,385 bzw. 0,180 Millionen Einheiten betragen. Diese Ergebnisse zeigen, dass durch den Zusatz von FeSO<sub>4</sub> eine Verbesserung der Umsetzung von Apo-8'-carotinal durch Sala\_1698 erreicht werden kann, wobei das Vorhandensein von Eisen-Ionen im Inkubationspuffer aber nicht zwingend erforderlich ist.



**Abb. 57:** Zeitabhängiger Carotinoid-Gehalt von *in vitro* Apo-8'-carotinal-Umsetzungen mit gereinigtem Sala\_1698. **A** Umsetzung in Inkubationspuffer I (100 mM HEPES-NaOH, 1 mM Tris(2-Carboxyethylphosphin 0,3 mM FeSO<sub>4</sub>) **B** Umsetzung in Inkubationspuffer I ohne FeSO<sub>4</sub>.

Des Weiteren wurden die Effekte von Temperatur, pH-Wert und EDTA auf die Aktivität von Sala\_1698 untersucht. Hierfür wurde wieder Apo-8'-carotinal als Substrat eingesetzt. Die Umsetzungen erfolgten jeweils für zwei Stunden bei 500 rpm im Thermomixer. Für die Umsetzungen mit verschiedenen Stoffmengenkonzentrationen EDTA wurde 2 x Inkubationspuffer I verwendet, für die Umsetzungen bei verschiedenen Temperaturen und pH-Werten wurde 2 x Inkubationspuffer I ohne FeSO<sub>4</sub> verwendet. Die Umsatzraten wurden berechnet, indem die gemessene Apo-8'-carotinal Menge des jeweiligen Umsatzes zu der Apo-8'-carotinal-Menge eines Kontrollansatzes ohne Enzym in Relation gesetzt wurde:

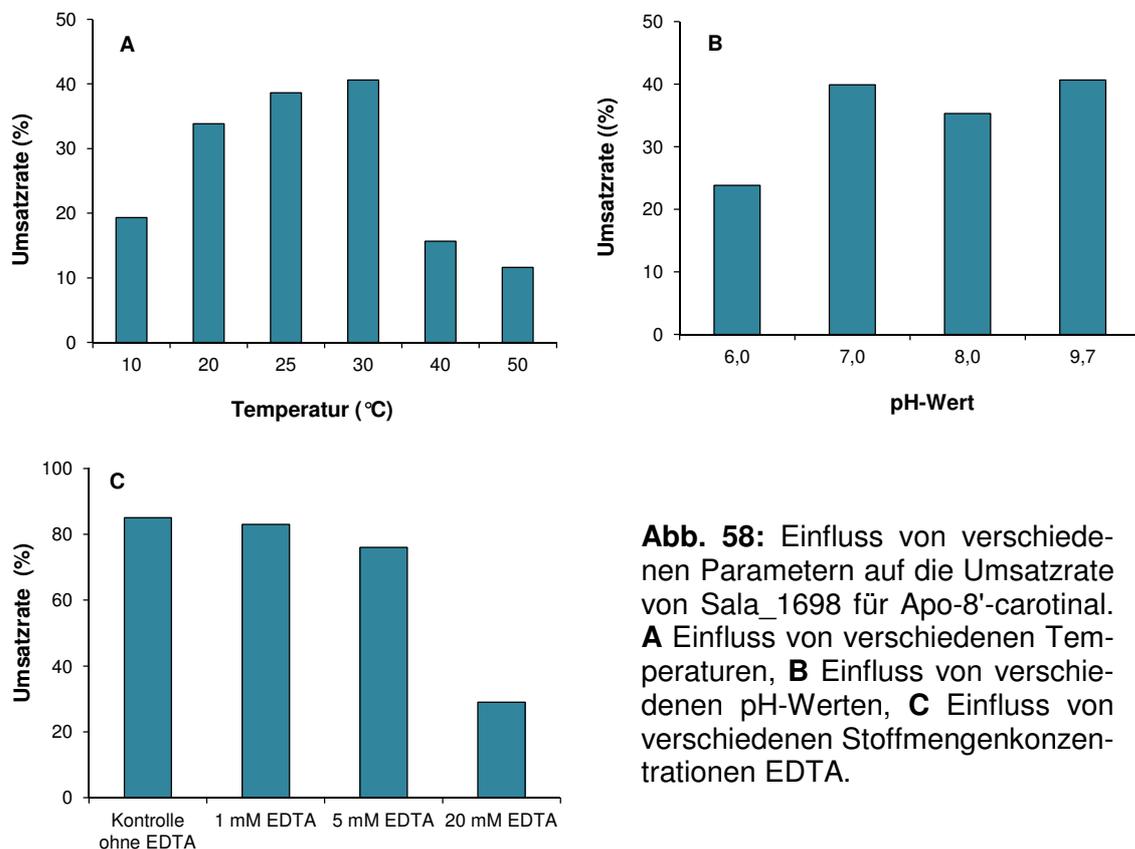
**(Formel 11)**

$$\text{Umsatzrate (\%)} = 100 - \frac{\text{Apo-8'-carotinal-Gehalt der Umsetzung (\mu\text{g})}}{\text{Apo-8'-carotinal-Gehalt der Kontrolle ohne Enzym (\mu\text{g})}} \times 100$$

Abb. 58 A zeigt den Effekt von verschiedenen Temperaturen auf die Umsatzrate von Sala\_1698 für Apo-8'-carotinal. Der Kontrollansatz wurde bei 50 °C inkubiert. Man sieht, dass die Umsatzrate bei Temperaturen von 10 °C bis 30 °C kontinuierlich anstieg und ab 40 °C wieder absank. Das Temperaturoptimum von Sala\_1698 liegt also zwischen 30 °C und 40 °C.

Abb. 58 B zeigt die Umsatzraten von Sala\_1698 für Apo-8'-carotinal bei verschiedenen pH-Werten. Es wurde jeweils ein Kontroll-Ansatz bei pH 6,0 und pH 9,7 mit inkubiert. Der Apo-8'-carotinal-Gehalt der beiden Proben unterschied sich um 4 %. Da dies im Bereich der normalen Messungengenauigkeit liegt, wurde angenommen, dass die pH-Werte bei dem durchgeführten Experiment keinen relevanten Einfluss auf die Stabilität von Apo-8'-carotinal hatten. Für die Berechnung der Umsatzraten wurde der Kontrollwert von der Umsetzung bei pH 9,7 herangezogen. pH-Werte zwischen 7,0 und 9,7 hatten keinen Effekt auf die Umsatzrate, welche zwischen 35 und 40 % lag. Bei einem pH-Wert von 6,0 hingegen wurden nur 27 % des Apo-8'-carotinals umgesetzt. Das Enzym Sala\_1698 ist offensichtlich empfindlich gegenüber sauren pH-Werten und unempfindlicher gegenüber alkalischen pH-Werten.

Abb. 58 C zeigt die Umsatzraten von Apo-8'-carotinal, die in Gegenwart von verschiedenen Stoffmengenkonzentrationen EDTA gemessen wurden. Ohne EDTA wurden nach zwei Stunden 85 % des Apo-8'-carotinals umgesetzt. Mit 1 mM EDTA betrug die Umsatzrate 83 %, mit 5 mM 76 % und mit 20 mM EDTA 29 %. Die Messdaten zeigen, dass EDTA einen negativen Effekt auf die Enzymaktivität von Sala\_1698 hat. Dieser beruht wahrscheinlich darauf, dass das EDTA mit den im Reaktionsansatz befindlichen Eisen-Ionen ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) Komplexe bildet und so den Anteil an freien Eisen-Ionen reduziert. Dies führte dann zu dem gleichen negativen Effekt wie ein Fehlen von  $\text{FeSO}_4$  im Inkubationspuffer (vgl. Abb. 57).



**Abb. 58:** Einfluss von verschiedenen Parametern auf die Umsatzrate von Sala\_1698 für Apo-8'-carotinal. **A** Einfluss von verschiedenen Temperaturen, **B** Einfluss von verschiedenen pH-Werten, **C** Einfluss von verschiedenen Stoffmengenkonzentrationen EDTA.

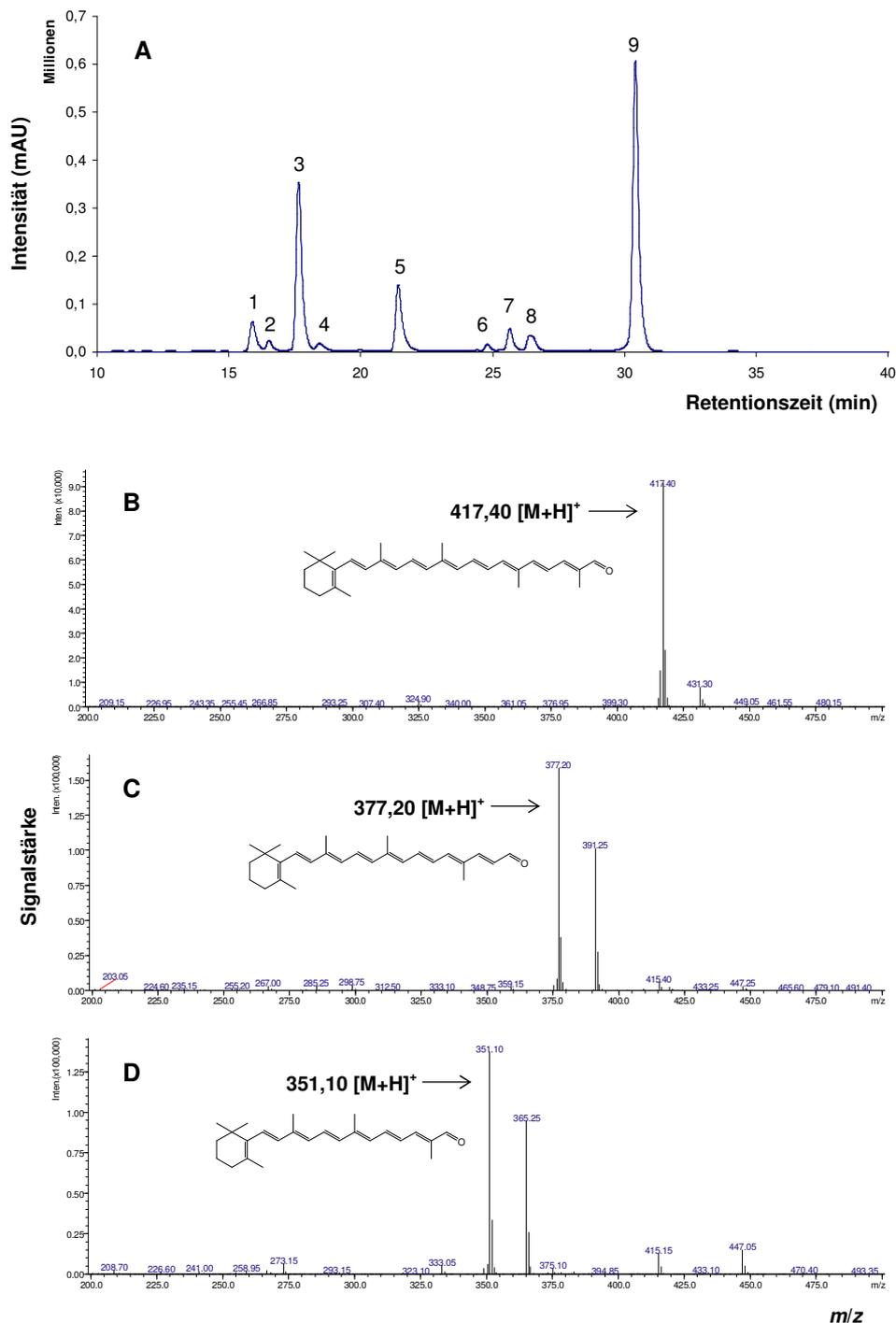
#### 4.3.4.4 Identifizierung der Apo-8'-carotinal-Spaltprodukte von Sala\_1698 mittels LC-MS-Analyse

Für eine Identifizierung der Spaltprodukte von Apo-8'-carotinal wurde der Extrakt einer *in vitro* Umsetzung durch Sala\_1698 sowie ein Kontrollansatz mittels LC-MS untersucht. Die Umsetzung erfolgte in Inkubationspuffer I ohne FeSO<sub>4</sub> für zwei Stunden bei 25 °C und 500 rpm im Thermomixer. Die Proben wurden wie in Kapitel 3.10.4.5 beschrieben extrahiert. Die LC-MS-Messungen wurden von Holger Beuttler am Institut für Technische Biochemie durchgeführt. Abb. 59 zeigt das HPLC-Chromatogramm des Extraktes von der Umsetzung sowie die Massenspektren der Substanzen der Peaks 3, 5 und 9. Im HPLC-Chromatogramm waren insgesamt 9 Peaks zu sehen (Abb. 59 A). Die Charakteristika dieser Peaks sind in Tab. 58 angegeben.

**Tab. 58:** Retentionszeiten, Absorptionsmaxima und detektierte Massensignale von den Substanzen der neun Peaks, die bei der LC-MS-Analyse des Extraktes einer *in vitro* Apo-8'-carotinal-Umsetzung mit Sala\_1698 gemessen wurden.

Peak Nr.	Retentionszeit (min)	Absorptionsmaxima (nm)	Massensignale <i>m/z</i>
1	15,9	296, 420	351,05; 365,20
2	16,5	295, 420	351,05; 365,20
3	17,6	426	351,10; 365,25
4	18,4	315, 440	377,20
5	21,4	448	377,20
6	24,8	334, 454	417,30
7	25,7	336, 453	417,10
8	26,4	336, 450	417,20
9	30,5	461	417,15; 431,20

In den Massenspektren der Peaks 6 bis 9 konnten *m/z*-Signale von 417,10 bis 417,30 gefunden werden. Abb. 59 B zeigt das Massenspektrum der Substanz von Peak 9. Die detektierte Masse 417,40 korrespondiert mit der Masse des [M+H]<sup>+</sup>-Ions von Apo-8'-carotinal (exakte Masse 416,31). In der Kontrollprobe ohne Enzym konnten die Peaks 6 bis 9 und die Massensignale ebenfalls detektiert werden (Messdaten nicht gezeigt). Bei Peak 9 handelt es sich um Apo-8'-carotinal.



**Abb. 59:** LC-MS-Analyse des Extraktes einer *in vitro* Apo-8'-carotinal-Umsetzung mit Sala\_1698. **A** HPLC-Chromatogramm, **B** Massenspektrum der Substanz von Peak 9 (Apo-8'-carotinal), **C** Massenspektrum der Substanz von Peak 5 (Apo-10'-carotinal), **D** Massenspektrum der Substanz von Peak 3 (Apo-12'-carotinal). Peaks: **1, 2** Apo-12'-carotinal-(Z)-Isomere; **3** Apo-12'-carotinal; **4** Apo-10'-carotinal-(Z)-Isomer; **5** Apo-10'-carotinal; **6, 7, 8** Apo-8'-carotinal-(Z)-Isomere; **9** Apo-8'-carotinal. Durchführung der Messungen: Holger Beuttler, ITB.

Die Substanzen der Peaks 6, 7 und 8 zeigten in ihren UV/Vis-Spektren zusätzliche Peaks bei 334 bzw. 336 nm, die so genannten *cis*-Peaks, und hypsochrome Verschiebungen der Absorptionsmaxima um 7 bis 11 nm (Tab. 58). Diese Charakteristika sind typische Merkmale von (*Z*)-Isomeren von Carotinoiden (Britton *et al.*, 2004; Zechmeister, 1944) und man kann daher davon ausgehen, dass es sich bei den Substanzen um Apo-8'-carotinal-(*Z*)-Isomere handelt.

In den Massenspektren der Substanzen von Peak 4 und 5 konnten *m/z*-Signale bei 377,20 beobachtet werden (Tab. 58, Abb. 59 C). Die detektierten *m/z*-Signale korrespondieren mit der Masse des [M+H]<sup>+</sup>-Ions von Apo-10'-carotinal (exakte Masse 376,28). In dem Absorptionsspektrum der Substanz von Peak 4 konnte ein *cis*-Peak und eine hypsochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums beobachtet werden, demnach handelt es sich wahrscheinlich um ein Apo-10'-carotinal-(*Z*)-Isomer.

In den Massenspektren der Peaks 1 bis 3 gab es *m/z*-Signale bei 351,05 bzw. 351,1 (Tab. 58, Abb. 59 D). Die *m/z*-Signale korrespondieren mit der Masse des [M+H]<sup>+</sup>-Ions von Apo-12'-carotinal (exakte Masse 350,26), wobei aufgrund der oben erläuterten Absorptionscharakteristika Peak 3 Apo-12'-carotinal und Peaks 1 und 2 Apo-12'-carotinal-(*Z*)-Isomeren zugeordnet werden konnten.

Durch einen Vergleich der gemessenen Absorptionsmaxima von Apo-8'-carotinal, Apo-10'-carotinal und Apo-12'-carotinal mit Literaturwerten (Wu *et al.*, 1999) konnten die Identitäten der Substanzen zusätzlich bestätigt werden (Tab. 59).

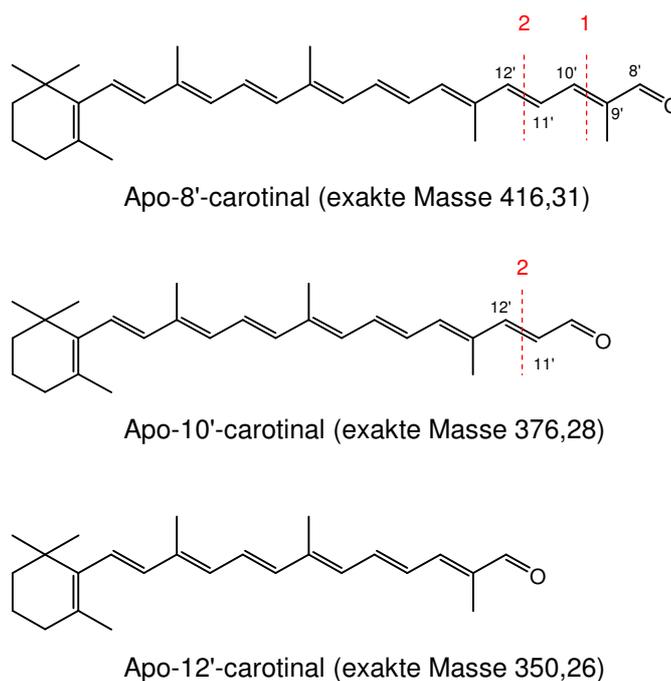
**Tab. 59:** Vergleich der gemessenen Absorptionsmaxima von Apo-8'-carotinal, Apo-10'-carotinal und Apo-12'-carotinal mit Literaturwerten.

Substanz	gemessene Maxima	Maxima laut Literatur*
Apo-8'-carotinal	461	460
Apo-10'-carotinal	448	445
Apo-12'-carotinal	426	429

\* Wu *et al.*, 1999, HPLC-Laufmittel aus Methanol, H<sub>2</sub>O, Acetonitril, Ethylacetat.

Die Messergebnisse zeigen, dass bei der *in vitro* Umsetzung von Apo-8'-carotinal durch Sala\_1698 die beiden Produkte Apo-10'-carotinal und Apo-12'-carotinal entstehen. Durch die Identifizierung dieser Substanzen konnten zwei Positionen ab-

geleitet werden, an denen die Spaltung von Apo-8'-carotinal durch Sala\_1698 stattfindet (Abb. 60). Die Bildung von Apo-10'-carotinal und Apo-12'-carotinal könnte auf zweierlei Weise geschehen. Entweder entstehen die beiden Produkte durch eine sukzessive Umsetzung, bei der zunächst Apo-8'-carotinal an der 9'/10'-Position geschnitten wird, wodurch Apo-10'-carotinal entsteht, welches im nächsten Schritt an der 11'/12'-Position weiter zu Apo-12'-carotinal abgebaut wird. Oder Sala\_1698 schneidet das Substrat Apo-8'-carotinal sowohl an der 9'/10'-Position als auch an der 11'/12'-Position und diese Ungenauigkeit führt zu der Bildung der beiden Produkte. Sollte das zutreffen, könnte man darüber hinaus feststellen, dass die Schnittposition an der 11'/12'-Position von dem Enzym bevorzugt wird, da die Peaks von Apo-12'-carotinal stets eine größere Fläche hatten als die Peaks von Apo-10'-carotinal.



**Abb. 60:** Zwei mögliche Mechanismen für die Bildung von Apo-10'-carotinal und Apo-12'-carotinal aus Apo-8'-carotinal durch enzymatische Spaltung mit der Carotinoid-Oxygenase Sala\_1698. **Möglichkeit 1:** Sukzessive Spaltung von Apo-8'-carotinal an der Schnittposition 1 und Apo-10'-carotinal an der Schnittposition 2. **Möglichkeit 2:** Unpräzise Spaltung von Apo-8'-carotinal sowohl an der Schnittposition 1 als auch an der Schnittposition 2.

### 4.3.5 Charakterisierung der Carotinoid-Oxygenase Ppsir1\_15490

#### 4.3.5.1 Untersuchung der Spaltung verschiedener Carotinoide *in vivo*

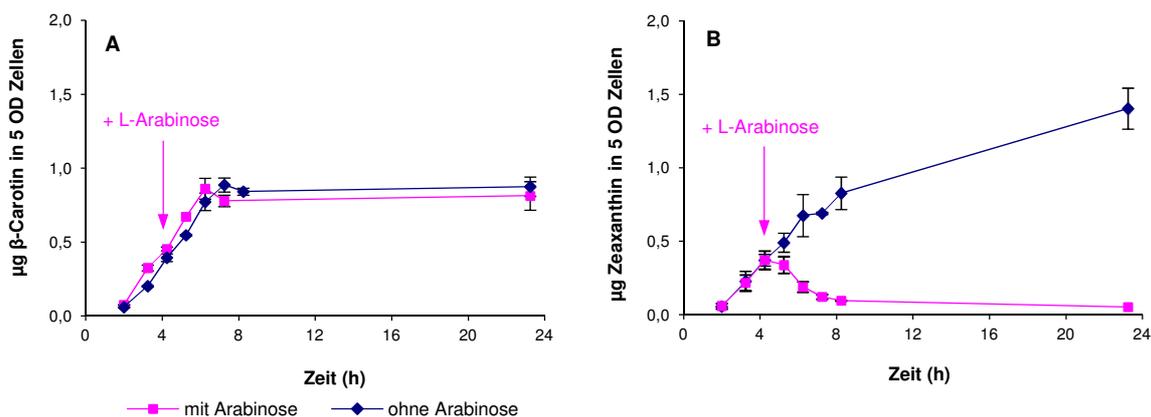
Für die Untersuchung der Spaltung verschiedener Carotinoide durch Ppsir1\_15490 *in vivo*, wurde wieder das Zwei-Plasmid-System verwendet, welches aus den Carotinoid-Biosynthesevektoren mit L-Rhamnose-induzierbarer Genexpression und einem Oxygenase-Vektor mit L-Arabinose-induzierbarer Genexpression besteht (siehe Kapitel 4.3.4.1). Für die Herstellung des Oxygenase-Vektors pJH62.1 wurde *ppsir1\_15490* mit den Enzymen *NdeI* und *HindIII* aus pJH59.1 (Tab. 54) herausgeschnitten und in den mit *NdeI* und *HindIII* geschnittenen Vektor pJOE5275.26 (Abb. 51) integriert. Für die Untersuchungen wurden die Carotinoid-Biosynthesevektoren pJOE5573.3 (Lycopin), pJH88.1 (Lycopin, Hydroxylycopin und Dihydroxylycopin), pJOE5607.5 ( $\beta$ -Carotin) und pJH14.1 (Zeaxanthin) verwendet. *E. coli* JM109 wurde zunächst mit jeweils einem Carotinoid-Biosynthesevektor und pJH62.1 transformiert. Die Kultivierung und die Probenentnahme erfolgte wie in Kapitel 4.3.4.1 beschrieben.

Die bisher beschriebenen Ergebnisse wiesen darauf hin, dass Ppsir1\_15490 nur hydroxylierte Substrate umsetzt. Um dies zu betätigen, wurde die Spaltung von **Zeaxanthin** und  **$\beta$ -Carotin** genauer untersucht. Abb. 61 zeigt die Messergebnisse von *E. coli* JM109 pJH14.1/pJH62.1 und *E. coli* JM109 pJOE5607.5/pJH62.1. Der Verlauf des  $\beta$ -Carotin-Gehaltes der beiden Kulturen von *E. coli* JM109 pJOE5607.5/pJH62.1 zeigte, dass das nicht-hydroxylierte Substrat von Ppsir1\_15490 nicht umgesetzt wird (Abb. 61 A). Sowohl bei der Kultur ohne L-Arabinose als auch bei der Kultur mit L-Arabinose stieg der  $\beta$ -Carotin-Gehalt bis 6,25 h nach der L-Rhamnose-Zugabe kontinuierlich an und blieb dann stabil. Nach 23,25 h wurden 0,81 bzw. 0,88  $\mu\text{g}$   $\beta$ -Carotin pro 5 OD Zellen gemessen.

Im Gegensatz dazu konnte eine Spaltaktivität von Ppsir1\_15490 für das Substrat Zeaxanthin beobachtet werden (Abb. 61 B). Man sieht, dass der Zeaxanthin-Gehalt der Kontrollkultur von *E. coli* JM109 pJH14.1/pJH62.1 ohne L-Arabinose kontinuierlich anstieg. Nach 23,25 h wurden 1,40  $\mu\text{g}$  Zeaxanthin pro 5 OD Zellen gemessen. Bei der Kultur von *E. coli* JM109 pJH14.1/pJH62.1 mit L-Arabinose hingegen, kam es nach der Zugabe des Induktors der Expression von

*ppsir1\_15490* zu einem Absinken des Zeaxanthin-Gehaltes pro 5 OD Zellen, welcher nach 23,25 h noch 0,05 µg betrug.

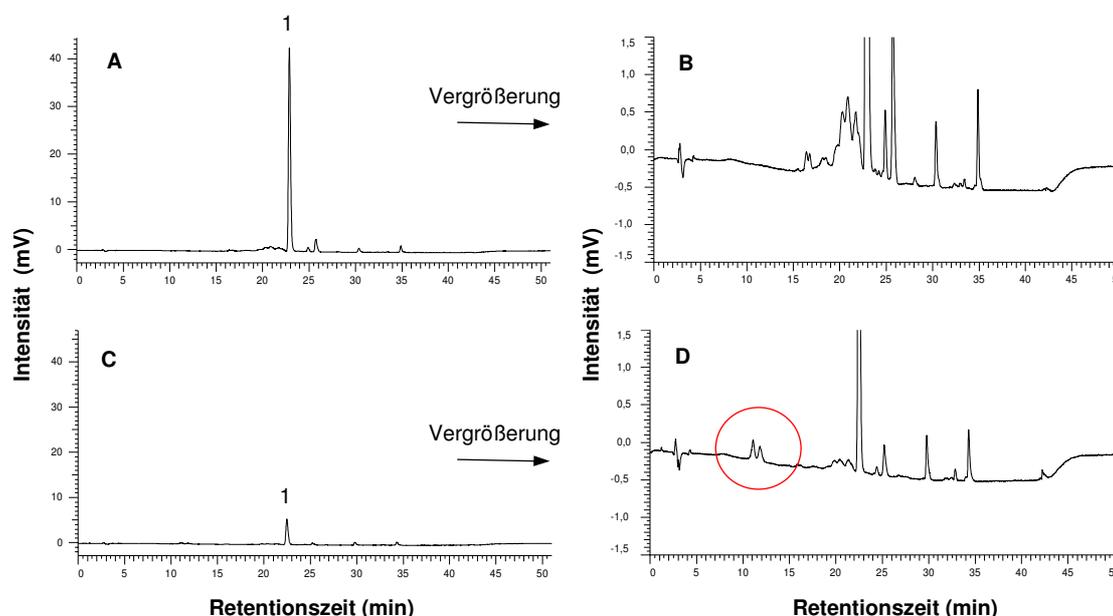
In den HPLC-Chromatogrammen der Proben von der Kultur von *E. coli* JM109 pJH14.1/pJH62.1 mit L-Arabinose konnten im Vergleich zu den Chromatogrammen der Proben von der Kontrollkultur zusätzliche Peaks beobachtet werden (Abb. 62). Die Proben wurden 8,25 h nach der L-Rhamnose-Zugabe bzw. 4 h nach der L-Arabinose-Zugabe entnommen. Bei der Probe der Kultur ohne L-Arabinose wurde ein Zeaxanthin-Gehalt von 0,83 µg pro 5 OD Zellen gemessen (Abb. 62 A). Der Peak in dem Chromatogramm der Probe von der Kultur mit L-Arabinose war zum gleichen Zeitpunkt deutlich kleiner (Abb. 62 B). Der Zeaxanthin-Gehalt betrug 0,10 µg pro 5 OD Zellen. In der vergrößerten Ansicht waren zwei zusätzliche Peaks mit den Retentionszeiten 11,1 und 11,9 min sichtbar, die in dem Chromatogramm der Kontrollprobe nicht vorhanden waren (Abb. 62 B, D).



**Abb. 61:** Zeitabhängige Veränderung des  $\beta$ -Carotin- bzw.- Zeaxanthin-Gehaltes von 5 OD Zellen Carotinoid-produzierender *E. coli* JM109 Stämme mit und ohne Induktion der Expression von *ppsir1\_15490* mit L-Arabinose. **A** Messdaten von *E. coli* JM109 pJOE5607.5 ( $\beta$ -Carotin)/pJH62.1, **B** Messdaten von *E. coli* JM109 pJH14.1 (Zeaxanthin)/pJH62.1. Der Zeitpunkt 0 entspricht dem Zeitpunkte der L-Rhamnose-Zugabe (Induktion der Carotinoid-Produktion).

Das Auftreten der beiden neuen Peaks war unmittelbar mit der L-Arabinose-Zugabe korreliert; wurde der Zeitpunkt der L-Arabinose-Zugabe verändert, veränderte sich auch der Zeitpunkt des ersten Auftretens der beiden Peaks. Die Peaks waren stets eine Stunde nach der L-Arabinose-Zugabe zum ersten Mal sichtbar (Messdaten nicht gezeigt). Man kann daher davon ausgehen, dass es sich bei den

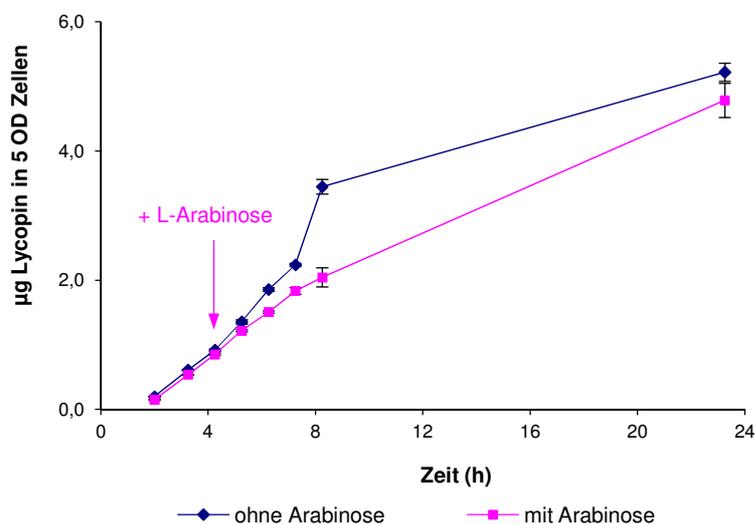
Substanzen der Peaks um Zeaxanthin-Spaltprodukte handelt. Bezüglich dieser beiden Peaks war außerdem zu beobachten, dass diese sich ab ihrem ersten Auftreten bis zu dem Messpunkt bei 8,25 h stetig vergrößerten. In den Proben, die nach 23,25 h entnommen wurden, konnte hingegen wieder eine Verringerung der Flächen der beiden Peaks beobachtet werden (Messdaten nicht gezeigt).



**Abb. 62:** HPLC-Chromatogramme (Methode 2) von Extrakten von *E. coli* JM109 pJH14.1/pJH62.1. Die Proben wurden 8,25 h nach der Zugabe von L-Rhamnose (Induktion der Zeaxanthin-Produktion) entnommen. **A** Kultur ohne L-Arabinose, **B** vergrößerte Ansicht von A, **C** Kultur mit L-Arabinose (Zugabe 4,25 h nach der L-Rhamnose-Zugabe), **D** vergrößerte Ansicht von C. Peak 1: Zeaxanthin. Rot gekennzeichnet: zusätzliche Peaks, die in Zusammenhang mit dem Zeaxanthin-Abbau in der Kultur mit L-Arabinose zu beobachten waren.

Als nächstes wurde die Spaltung von **Lycopin**, **Hydroxylycopin** und **Dihydroxylycopin** durch Ppsir1\_15490 untersucht. Bei dem in Kapitel 4.3.3 beschriebenen Experiment konnte bei Koexpression von *ppsir1\_15490* keine Farbveränderung des Lycopin-produzierenden Stammes *E. coli* JM109 JOE5573.3 beobachtet werden, wohingegen bei dem Stamm, welcher zusätzlich zu Lycopin auch Hydroxylycopin und Dihydroxylycopin produzierte, durch die zusätzliche Expression von *ppsir1\_15490* eine Verringerung der Farbintensität zu beobachten war. Für eine detailliertere Untersuchung wurde zunächst der Stamm *E. coli* JM109 pJOE5573.3/pJH62.1 verwendet. Abb. 63 zeigt die Messergebnisse. Die Lycopin-Gehalte beider Kulturen stiegen kontinuierlich an. Nach 23,25 h wurden 5,8 µg

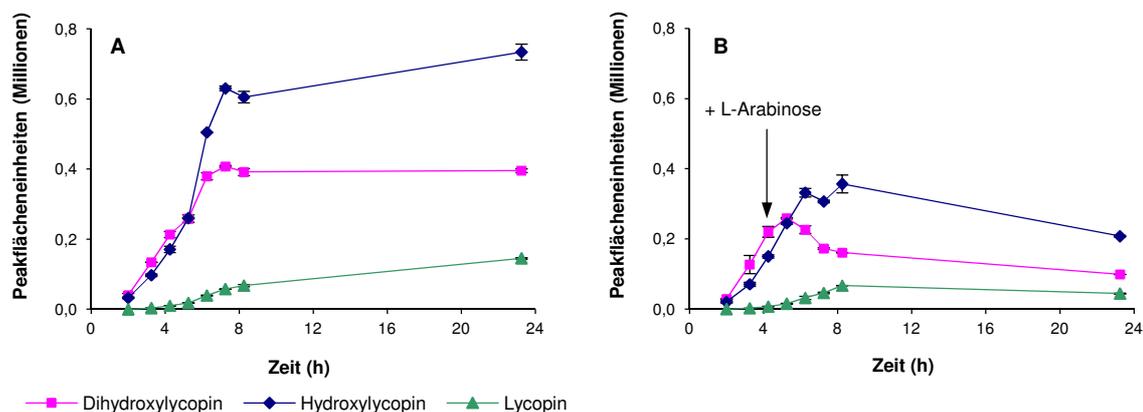
(ohne L-Arabinose) bzw. 4,7 µg (mit L-Arabinose) Lycopin pro 5 OD Zellen gemessen. Demnach kann man davon ausgehen, dass Ppsir1\_15490 das Substrat Lycopin nicht umsetzt.



**Abb. 63:** Zeitabhängige Veränderung des Lycopin-Gehaltes von 5 OD Zellen von *E. coli* JM109 pJOE5573.3/pJH62.1 mit und ohne Induktion der Expression von *ppsir1\_15490* mit L-Arabinose. Der Zeitpunkt 0 entspricht dem Zeitpunkt der L-Rhamnose-Zugabe (Induktion der Lycopin-Produktion).

Abb. 64 zeigt die Messergebnisse für *E. coli* JM109 pJH88.1/pJH62.1. Bis zu dem Messpunkt bei 5,25 h stiegen die Gehalte an Lycopin, Hydroxylycopin und Dihydroxylycopin in beiden Kulturen gleichermaßen an. Bei der Kultur mit L-Arabinose konnte zwei Stunden nach dessen Zugabe ein Absinken des Dihydroxylycopin-Gehaltes gemessen werden. Nach 23,25 h betrugen die Flächen der Dihydroxylycopin-Peaks 0,099 Millionen (mit L-Arabinose) bzw. 0,396 Millionen Einheiten (ohne L-Arabinose). Der Hydroxylycopin-Gehalt der Kultur mit L-Arabinose stieg nach der Zugabe des Induktors bis zu dem Messpunkt bei 8,25 h weiter an, aber in geringerem Maße als in der Kontrollkultur ohne L-Arabinose. Bis zu dem nächsten Messpunkt bei 23,25 h sank der Hydroxylycopin-Gehalt der Kultur mit L-Arabinose wieder ab. Nach 23,25 h betrugen die Flächen der Hydroxylycopin-Peaks 0,208 Millionen (mit L-Arabinose) bzw. 0,734 Millionen Einheiten (ohne L-Arabinose). Der Lycopin-Gehalt der beiden

Kulturen war bis zu dem Messpunkt bei 8,25 h etwa gleich, nach 23,25 h hingegen war in der Kultur mit L-Arabinose weniger Lycopin messbar. Die Peakflächen betragen 0,044 Millionen (mit L-Arabinose) bzw. 0,146 Millionen Einheiten (ohne L-Arabinose).

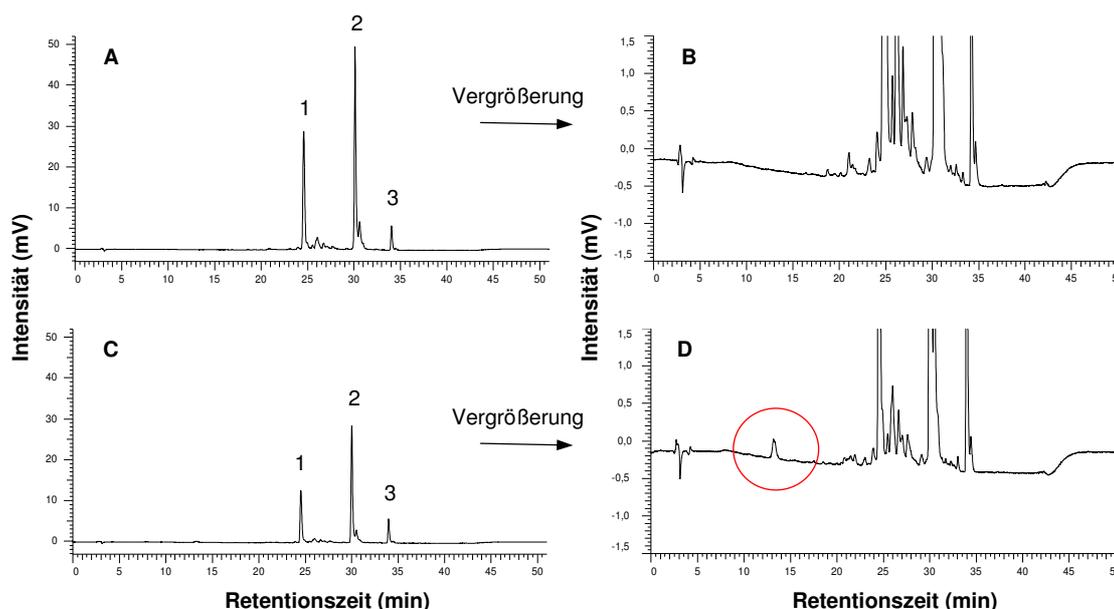


**Abb. 64:** Zeitabhängige Veränderung des Lycopin- Hydroxy- und Dihydroxylycopin-Gehaltes von *E. coli* JM109 pJH88.1/pJH62.1 mit und ohne Induktion der Expression von *ppsir1\_15490* mit L-Arabinose. **A** Kultur ohne L-Arabinose, **B** Kultur mit L-Arabinose. Der Zeitpunkt 0 entspricht dem Zeitpunkt der L-Rhamnose-Zugabe (Induktion der Carotinoid-Produktion).

Die Messdaten zeigen, dass *Ppsir1\_15490* zumindest für Dihydroxylycopin eine Spaltaktivität besitzt. Die Interpretation des Verlaufes des Hydroxylycopin-Gehaltes der Kultur mit L-Arabinose ist durch eine mögliche Interferenz der Enzymreaktion der Carotinoid-Oxygenase *Ppsir1\_15490* mit der Enzymreaktion der Lycopin-Hydroxylase *CrtC* nicht möglich. In Kapitel 4.1.2.5 wurde bereits beschrieben, dass die Umsetzung von Lycopin zu Hydroxy- und Dihydroxylycopin durch *CrtC* unvollständig erfolgt. Allerdings konnte der Anteil an Dihydroxylycopin durch eine stärkere Expression von *crtC* deutlich gesteigert werden. Dieser Umstand gibt einen Hinweis auf eine Aktivität von *CrtC* für Hydroxylycopin, denn wenn dieses nicht als Substrat genutzt werden könnte, sollte eine Erhöhung der Enzymkonzentration keinen Einfluss auf die relativen Mengen an Hydroxy- und Dihydroxylycopin haben. Da jedoch das Vorhandensein von mehr Enzym *CrtC* eine Erhöhung des Anteils von Dihydroxylycopin zur Folge hatte, kann man davon ausgehen, dass *CrtC* Hydroxylycopin umsetzen kann. Demnach kann für die Entstehung von Dihydroxylycopin eine sukzessive Modifikation von Lycopin und Hydroxy-

lycopin durch CrtC angenommen werden. Dadurch wäre die Verringerung des Hydroxylycopin-Gehaltes der Kultur von *E. coli* JM109 pJH88.1/pJH62.1 mit L-Arabinose außer mit einer Spaltung durch Ppsir1\_15490 auch dadurch erklärbar, dass CrtC ständig Hydroxylycopin zu Dihydroxylycopin umwandelt, welches dann von Ppsir1\_15490 gespalten wird. Bezieht man die Umwandlung von Lycopin zu Hydroxy- und Dihydroxylycopin durch CrtC in diese Überlegungen mit ein, könnte dadurch auch die Verringerung des Lycopin-Gehaltes der Kultur mit L-Arabinose erklärt werden, welche nicht auf einer Spaltaktivität von Ppsir1\_15490 für Lycopin beruhen kann, weil das Enzym dieses Substrat nachweislich nicht umsetzt. Diese, sich aus den Aktivitäten der beiden Enzyme Ppsir1\_15490 und CrtC ergebende Dynamik, macht eine Aussage bezüglich der Spezifität von Ppsir1\_15490 für das Substrat Hydroxylycopin nicht möglich. Da es sich bei Dihydroxylycopin um das Endprodukt des eingesetzten Stammes handelt, welches nicht weiter modifiziert wird, ist der beschriebene Effekt für die Verringerung des Gehaltes der Kultur an dieser Verbindung nicht relevant, welcher damit unmittelbar auf die Enzymaktivität der Carotinoid-Oxygenase Ppsir1\_15490 zurückgeführt werden kann.

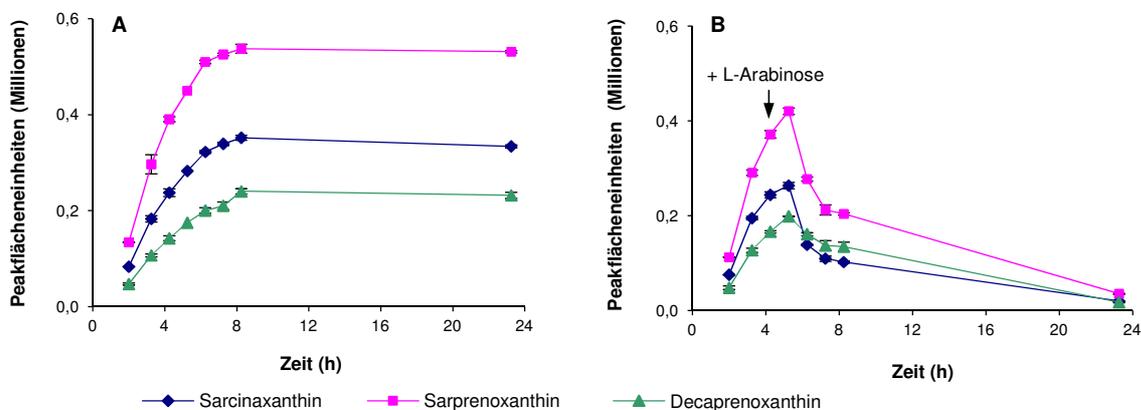
Abb. 65 zeigt die HPLC-Chromatogramme von Extrakten der beiden Kulturen von *E. coli* JM109 pJH88.1/pJH62.1. Die Proben wurden 8,25 h nach der L-Rhamnose-Zugabe bzw. 4 h nach der L-Arabinose-Zugabe entnommen. Die Peakflächen von Lycopin, Hydroxylycopin und Dihydroxylycopin in dem Chromatogramm der Probe von der Kontrollkultur betragen 0,068, 0,605 und 0,392 Millionen Einheiten (Abb. 65 A). Die Peakflächen von Lycopin, Hydroxylycopin und Dihydroxylycopin im Chromatogramm der Probe von der Kultur mit L-Arabinose betragen 0,067, 0,357 und 0,161 Millionen Einheiten (Abb. 65 C). In der vergrößerten Ansicht des HPLC-Chromatogramms der Probe von der Kultur mit L-Arabinose waren zwei unvollständig getrennte, zusätzliche Peaks sichtbar, die in der Kontrollprobe nicht vorhanden waren (Abb. 65 B, D). Der erste der beiden Peaks hatte eine Retentionszeit von 13,11 min. Bei den Substanzen könnte es sich um Dihydroxylycopin- oder Hydroxylycopin-Spaltprodukte handeln. Nach 23,25 h war im Vergleich zu der 8,25 h Probe eine Verkleinerung der zusätzlichen Peaks zu beobachten (Messdaten nicht gezeigt).



**Abb. 65:** HPLC-Chromatogramme (Methode 2) von Extrakten von *E. coli* JM109 pJH88.1/pJH62.1. Die Proben wurden 8,25 h nach der Zugabe von L-Rhamnose (Induktion der Carotinoid-Produktion) entnommen. **A** Kultur ohne L-Arabinose, **B** vergrößerte Ansicht von A, **C** Kultur mit L-Arabinose (Zugabe 4,25 h nach der L-Rhamnose-Zugabe), **D** vergrößerte Ansicht von C. Peaks: **1** Dihydroxylycopin, **2** Hydroxylycopin, **3** Lycopin. Rot gekennzeichnet: zusätzliche Peaks (unvollständig getrennt), die in Zusammenhang mit dem Hydroxy- und Dihydroxylycopin-Abbau in der Kultur mit L-Arabinose zu beobachten waren.

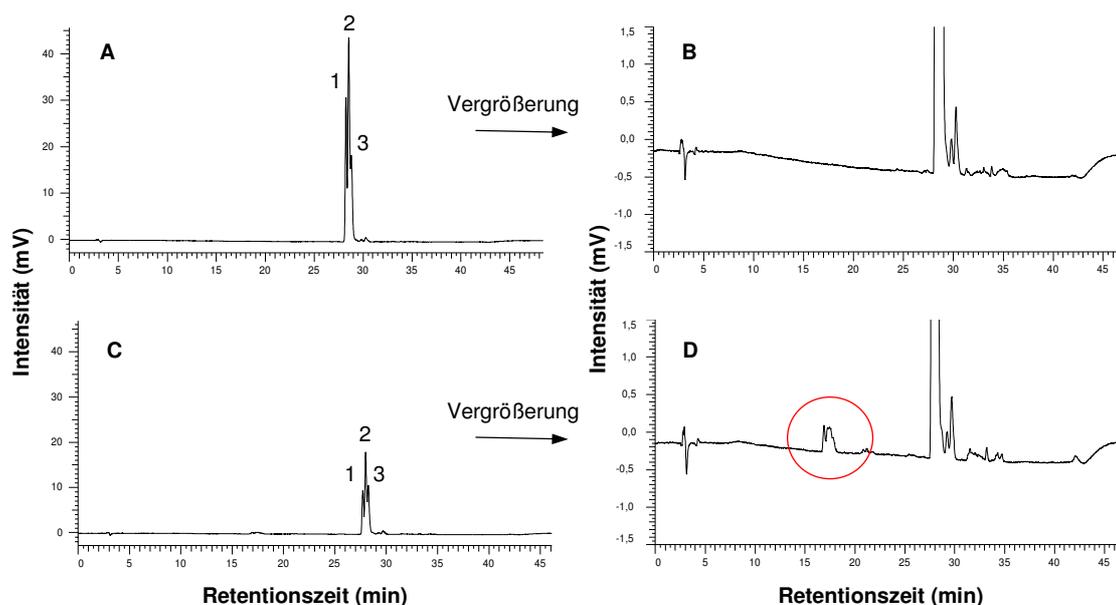
Bei dem **C<sub>50</sub>-Carotinoid**-produzierenden Stamm *E. coli* JM109 pJH29.10 konnte bei gleichzeitiger Expression von *ppsir1\_15490* im Vergleich zum Kontrollstamm ebenfalls eine Verringerung der Farbintensität beobachtet werden (siehe Kapitel 4.3.3). Daher wurde auch hier eine detaillierte Untersuchung der Carotinoid-Spaltung vorgenommen. Abb. 66 zeigt den zeitlichen Verlauf der Gehalte der drei C<sub>50</sub>-Carotinoide Sarcinaxanthin, Sarprenoxanthin und Decaprenoxanthin in 5 OD Zellen von *E. coli* JM109 pJH29.10/pJH62.1 mit und ohne die Zugabe von L-Arabinose. Der Carotinoid-Gehalt des Kontrollstammes stieg bis zu dem Messpunkt bei 8,25 h kontinuierlich an, danach war keine weitere Steigerung des Carotinoid-Gehaltes messbar. Nach 23,25 h betragen die Peakflächen von Sarcinaxanthin, Sarprenoxanthin und Decaprenoxanthin 0,334, 0,532 bzw. 0,232 Millionen Einheiten. Bei der Kultur mit L-Arabinose sanken die Peakflächeneinheiten zwei Stunden nach der L-Arabinose-Zugabe wieder ab. Nach 23,25 Stunden betragen die Flächen der Peaks von Sarcinaxanthin, Sarprenoxanthin und Decaprenoxanthin noch 0,02, 0,036 bzw. 0,018 Millionen Einheiten. Durch diese Messungen

konnte bestätigt werden, dass Ppsir1\_15490 die drei hydroxylierten C<sub>50</sub>-Carotinoide Sarcinaxanthin, Sarprenoxanthin und Decaprenoxanthin spaltet.



**Abb. 66:** Zeitabhängige Veränderung der Sarcina- Sarpreno- und Decaprenoxanthin-Gehalte von 5 OD Zellen von *E. coli* JM109 pJH29.10/pJH62.1 mit und ohne Induktion der Expression von *ppsir1\_15490* mit L-Arabinose. **A** Kultur ohne L-Arabinose, **B** Kultur mit L-Arabinose. Der Zeitpunkt 0 entspricht dem Zeitpunkt der L-Rhamnose-Zugabe (Induktion der Carotinoid-Produktion).

Abb. 67 zeigt die HPLC-Chromatogramme von Extrakten der beiden *E. coli* JM109 pJH29.10/pJH62.1 Kulturen. Die Proben wurden 8,25 h nach der L-Rhamnose-Zugabe entnommen. Die Flächen der Peaks im Chromatogramm der Kontrollprobe ohne L-Arabinose betragen 0,352 Millionen Einheiten für Sarcinaxanthin, 0,538 Millionen Einheiten für Sarprenoxanthin und 0,240 Millionen Einheiten für Decaprenoxanthin (Abb. 67 A). Die Flächen der Peaks im Chromatogramm der Probe von der Kultur mit L-Arabinose betragen 0,102 Millionen Einheiten für Sarcinaxanthin, 0,204 Millionen Einheiten für Sarprenoxanthin und 0,135 Millionen Einheiten für Decaprenoxanthin (Abb. 67 C). In der vergrößerten Ansicht des Chromatogramms C konnten mindestens drei unvollständig getrennte, zusätzliche Peaks beobachtet werden, welche in der Kontrollprobe nicht messbar waren. Der erste Peak hatte eine Retentionszeit von 16,91 min (Abb. 65 B, D). Nach 23,25 h waren die Produkt-Peaks wieder deutlich kleiner (Messdaten nicht gezeigt).



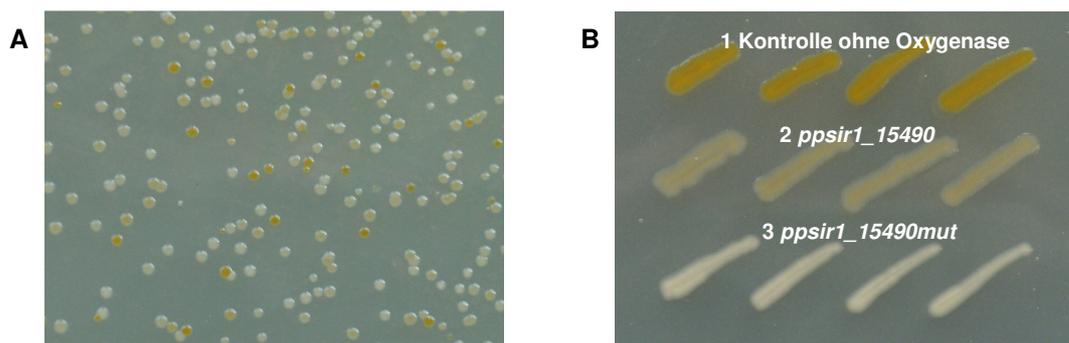
**Abb. 67:** HPLC-Chromatogramme (Methode 2) von Extrakten von *E. coli* JM109 pJH29.10/pJH62.1. Die Proben wurden 8,25 h nach der Zugabe von L-Rhamnose (Induktion der Carotinoid-Produktion) entnommen. **A** Kultur ohne L-Arabinose, **B** vergrößerte Ansicht von A, **C** Kultur mit L-Arabinose (Zugabe 4,25 h nach der L-Rhamnose-Zugabe), **D** vergrößerte Ansicht von C. Peaks: **1** Sarcinaxanthin, **2** Sarprenoxanthin, **3** Decaprenoxanthin. Rot gekennzeichnet: neue Peaks, die in Zusammenhang mit dem Sarcina-, Sarpreno- und Decaprenoxanthin-Abbau der Kultur mit L-Arabinose zu beobachten waren.

#### 4.3.5.2 Verbesserung der Expression von *ppsir1\_15490*

Bei der Untersuchung der Expression von *ppsir1\_15490* mittels SDS-PAGE fiel auf, dass das Gen in *E. coli* JM109 nur sehr schwach exprimiert wird (Abb. 49). Um mehr Enzym für die folgenden Umsetzungen bereitstellen zu können, sollte die Expression von *ppsir1\_15490* in *E. coli* JM109 verbessert werden. Es ist bekannt, dass besonders die Codons, die dem Translationsstartcodon unmittelbar folgen einen entscheidenden Einfluss auf die Genexpression haben können (Kim und Lee, 2006; Stenström und Isaksson, 2002; Thangadurai *et al.*, 2008).

Als Strategie für die Verbesserung der Expression von *ppsir1\_15490* in *E. coli* JM109 wurde daher eine Veränderung der ersten vier Codons nach dem Translationsstartcodon bei gleichzeitiger Erhaltung der Aminosäuresequenz gewählt. Dies wurde mit einer PCR erzielt, bei der das degenerierte Oligonukleotid S6169 eingesetzt wurde, welches eine Variabilität bezüglich der jeweils dritten Base der ersten vier Codons nach dem Startcodon hat (Tab. 60). Als zweites Oligonukleotid für die PCR wurde S5636 eingesetzt, als Matrize für die PCR diente pJH59.1.

Durch S6160 wurde an das 5'-Ende des PCR-Produktes eine *Nde*I-Schnittstelle angefügt, durch S5636 wurde an das 3'-Ende eine *Hind*III-Schnittstelle angefügt. Nach der Amplifikation und gleichzeitiger Mutagenese von *ppsir1\_15490* wurde das erhaltene PCR-Fragmentgemisch gereinigt, mit *Nde*I und *Hind*III geschnitten und in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen Vektor pJOE5751.1 (Abb. 18) integriert.

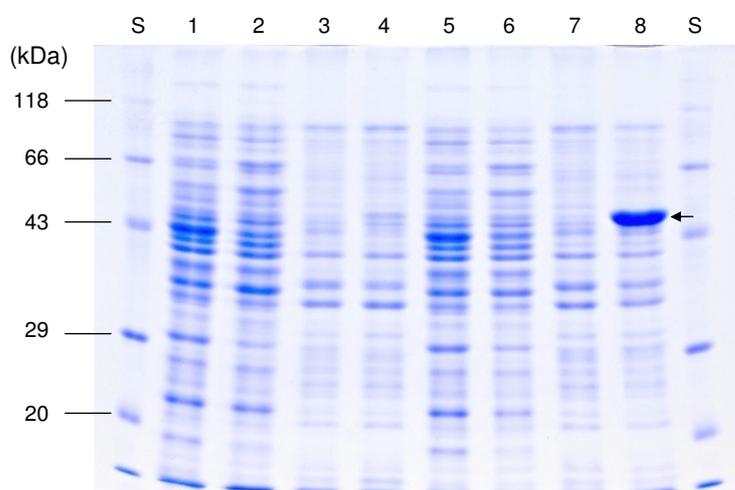


**Abb. 68:** Identifizierung von *E. coli* JM109 Klonen mit verbesserter Expression von *ppsir1\_15490* auf LB Agar mit 0,2 % (w/v) L-Rhamnose, 100 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin. **A** Aussehen der erhaltenen Kolonien nach Transformation von *E. coli* pJH14.1 mit dem Ligationsansatz mit Plasmiden von pJH66, **B** Aussehen von verschiedenen *E. coli* JM109 Stämmen auf LB Agar mit L-Rhamnose. **1** pJH14.1/pJH43.1 (Zeaxanthin/leerer Vektor), **2** *E. coli* JM109 pJH14.1/pJH59.1 (Zeaxanthin/*ppsir1\_15490* Wildtyp-Gen) **3** *E. coli* pJH14.1/pJH66.1 (Zeaxanthin/*ppsir1\_15490mut* mit verbesserter Expression).

Für die Identifizierung von Plasmiden mit verbesserter Expression von *ppsir1\_15490* wurde ein Farbttest herangezogen. Der Test beruht auf der Tatsache, dass der Zeaxanthin-produzierende *E. coli* JM109 Stamm, welcher das Wildtyp-Gen *ppsir1\_15490* koexprimiert auf L-Rhamnose-haltigem LB Agar nicht vollständig farblos ist (Abb. 68 B). Es wurde angenommen, dass eine Verbesserung der Expression von *ppsir1\_15490* zu einer stärkeren Entfärbung der entsprechenden Klone auf L-Rhamnose-haltigem Agar führt, die eine Identifizierung und Isolierung dieser Gene ermöglicht.

Für die Durchführung des Tests wurde der Ligationsansatz mit pJOE5751.1 und dem PCR-Fragmentgemisch für die Transformation von *E. coli* JM109 pJH14.1 eingesetzt. Die Selektion der Transformanden erfolgte auf LB Agar mit 100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin und 0,2 % (w/v) L-Rhamnose. Tatsächlich zeigten die gewachsenen Kolonien Unterschiede bezüglich ihrer Färbung; es waren

orange, hellorange und weiße Kolonien zu beobachten (Abb. 68 A). Für die weiteren Untersuchungen wurde eine weiße Kolonie isoliert. Die Plasmide wurden präpariert und auf ein Agarosegel aufgetragen. Das kleinere der beiden Plasmide wurde aus dem Gel ausgeschnitten und extrahiert. Mit der erhaltenen Plasmid-DNA wurde *E. coli* JM109 transformiert und aus einem Klon das Plasmid isoliert. Das Plasmid wurde mit pJH66.1 benannt, das veränderte Gen mit *ppsir1\_15490mut*. Die Überprüfung der Expression von *ppsir1\_15490mut* in *E. coli* JM109 mittels SDS-PAGE zeigte, dass diese im Vergleich zum Wildtyp-Gen deutlich verbessert ist (Abb. 69).



**Abb. 69:** SDS-PAGE Analyse der Expression von *ppsir1\_15490* (pJH59.1) und *ppsir1\_15490mut* (pJH66.1) in *E. coli* JM109. Spuren mit ungeraden Zahlen: Proben von Kulturen ohne L-Rhamnose; Spuren mit geraden Zahlen: Proben von Kulturen mit 0,2 % (w/v) L-Rhamnose. **S:** Roti<sup>®</sup>-Mark Standard (8 µl); **1, 2** lösliche Fraktionen pJH59.1; **3, 4:** unlösliche Fraktionen pJH59.1; **5, 6:** lösliche Fraktionen pJH66.1; **7, 8:** unlösliche Fraktionen pJH66.1. Die Protein-Bande, bei der es sich wahrscheinlich um Ppsir1\_15490 handelt ist mit einem Pfeil markiert.

Die Veränderungen in der Sequenz von *ppsir1\_15490mut* wurden durch DNA-Sequenzierung ermittelt (Tab. 60). Vergleicht man die durch die Mutagenese entstandenen, neuen Codons mit der *E. coli* Codon Usage, so stellt man fest, dass nicht unbedingt die in *E. coli* K12 für die jeweilige Aminosäure am häufigsten vorkommenden Codons in der Mutantensequenz zu finden sind.

**Tab. 60:** Vergleich eines Ausschnitts der Nukleotidsequenzen des degenerierten Oligonukleotids S6169, der Wildtyp-Sequenz von *ppsir1\_15490* und der mutierten Sequenz von *ppsir1\_15490mut*.

Plasmid	Sequenz
Oligonukleotid S6169	...A T G C A R G C N C C N C G N...
pJH59.1 (Wildtyp)	...A T G C A G G C G C C C C G C...
pJH66.1	...A T G C A A G C A C C T C G A...

\*R = A, G      \*\*N = A, G, T, C

**Tab. 61:** Codon Usage in *E. coli* K12 für die Aminosäuren Alanin, Arginin, Glutamin und Prolin (Nakamura *et al.*, 2000).

Aminosäure	Codons	Häufigkeit (‰)
Alanin	GCG	38,46
	GCA	21,09
	GCT	10,74
	GCC	31,63
Arginin	CGG	4,10
	CGA	4,30
	CGT	21,09
	CGC	25,97
Glutamin	CAG	27,72
	CAA	12,10
	CAT	15,81
	CAC	13,08
Prolin	CCG	26,75
	CCA	6,64
	CCT	8,40
	CCC	6,44

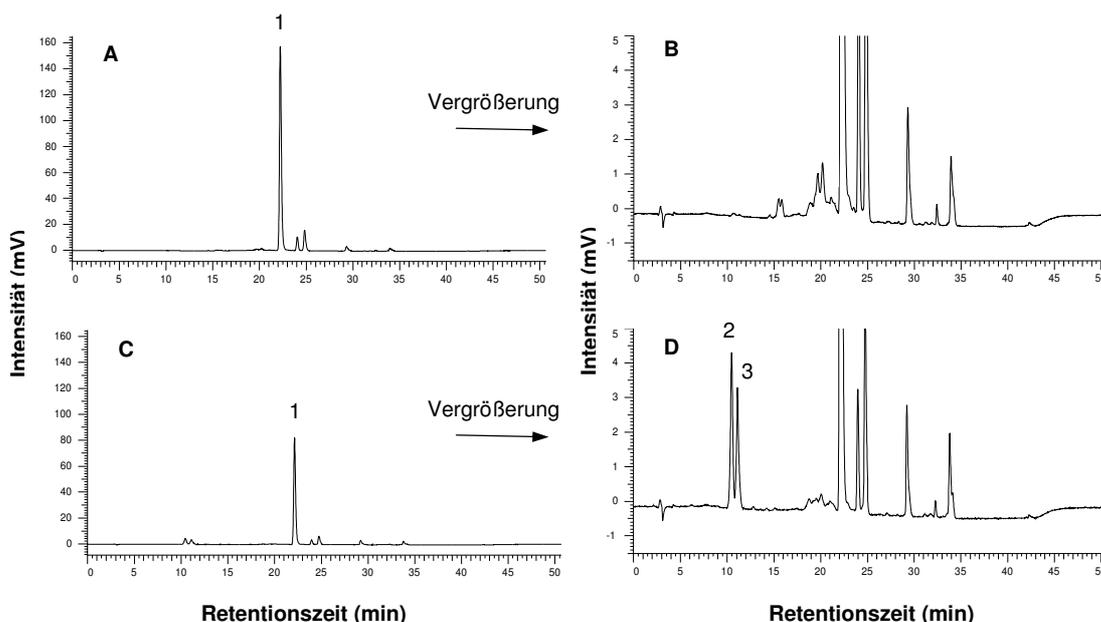
Tab. 61 zeigt die jeweilige Codon Usage von *E. coli* K12 für die vier relevanten Aminosäuren, Alanin, Arginin, Glutamin und Prolin, welche der Codon Usage Database (Nakamura *et al.*, 2000) entnommen wurden. Das Wildtyp-Codon CAG (27,72 ‰) für die Aminosäure Glutamin wurde in der Mutante durch das seltenere Codon CAA (12,1 ‰) ausgetauscht. Das zweite Wildtyp-Codon GCG (38,46 ‰) für die Aminosäure Alanin wurde durch das Codon GCA (21,09 ‰) ausgetauscht. Anstelle des dritten Codons CCC (6,44 ‰) des Wildtyps für die Aminosäure Prolin ist in der Mutante ein CCT Codon (8,40 ‰) vorhanden. Das Codon CGC (25,97 ‰) für die Aminosäure Arginin wurde durch das wesentlich seltenere CGA (4,30 ‰) ausgetauscht.

Es ist demnach ist kein Zusammenhang zwischen der Codon Usage von *E. coli* K12 und den durch die Mutagenese entstandenen Codons festzustellen, die die Verbesserung der Expression von *ppsir1\_15490mut* verursachten. Vielmehr kann der Austausch der dritten Base durch ein A oder T Nukleotid und damit die allgemeine Erhöhung des AT-Gehaltes des Sequenzbereiches als Ursache für die Verbesserung der Genexpression angenommen werden.

#### 4.3.5.3 Carotinoid-Umsetzungen mit ganzen Zellen von *E. coli* JM109 pJH66.1

Mit dem hinsichtlich der Expression verbesserten *ppsir1\_15490mut* sollten *in vitro* Studien zur Carotinoid-Spaltung durchgeführt werden. Unzentrifugierte, aufgeschlossene Zellkulturen zeigten jedoch keinerlei Carotinoid-Spaltaktivität, daher wurden die Carotinoid-Umsetzungen für die Charakterisierung von Ppsir1\_15490 mit ganzen Zellen durchgeführt (siehe Kapitel 3.10.3.2). Hierfür wurde der Stamm *E. coli* JM109 pJH66.1 verwendet. Für die Umsetzungen wurden jeweils 10 oder 20 OD Zellen eingesetzt, welche für 5 h bei 30 °C mit L-Rhamnose induziert wurden. Als Kontrolle diente eine äquivalente Zellzahl einer uninduzierten Kultur ohne L-Rhamnose. Für die Umsetzungen wurden die Carotinoid-Substrate zunächst mizelliert (siehe Kapitel 3.10.2) und in Inkubationspuffer II suspendiert. Zu dem jeweiligen mizellierten Carotinoid-Substrat wurden 100 µl Zellsuspension in H<sub>2</sub>O hinzugefügt. Die Reaktionsansätze enthielten 10 oder 20 OD Zellen von *E. coli* JM109 pJH66.1, 80 µM Carotinoid-Substrat, 100 mM HEPES-NaOH (pH 7,0), 2,5 mM FeSO<sub>4</sub> und 1 mM Tris(2-Carboxyethyl)phosphin. Bei den Vorversuchen wurden die Stoffmengenkonzentrationen von FeSO<sub>4</sub> und Tris(2-Carboxyethyl)phosphin in dem Inkubationspuffer variiert. Es zeigte sich hierbei, dass eine Erhöhung der Tris(2-Carboxyethyl)phosphin-Stoffmengenkonzentration von 1 mM auf 2,5 mM keine Verbesserung der Carotinoid-Umsetzung zur Folge hatte. Im Gegensatz dazu konnte die Carotinoid-Umsetzung durch eine Erhöhung der FeSO<sub>4</sub>-Konzentration von 0,3 auf 2,5 mM verbessert werden (Messdaten nicht gezeigt). Die Inkubation der Ansätze erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Rad. Die Carotinoide wurden wie in Kapitel 3.10.4.4 beschrieben extrahiert, die Rückstände in 300 µl Aceton gelöst und jeweils 20 µl der Proben wurden mittels HPLC analysiert.

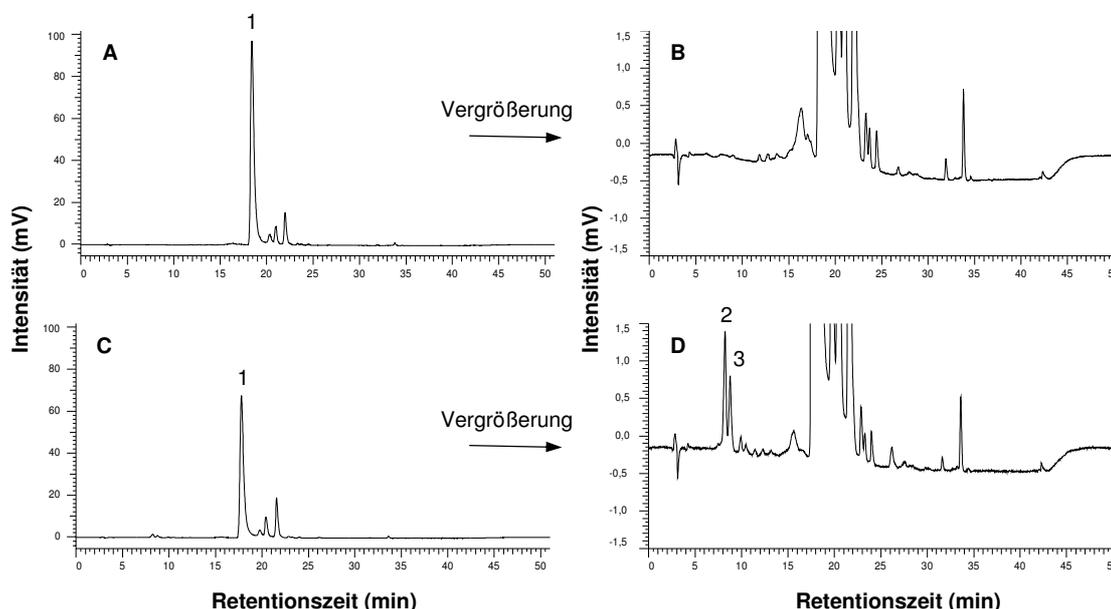
Abb. 70 zeigt die Messergebnisse einer **Zeaxanthin**-Umsetzung mit 20 OD Zellen von *E. coli* JM109 pJH66.1. In Abb. 70 A ist das Chromatogramm der Kontrollprobe zu sehen, bei der 20 OD uninduzierten Zellen eingesetzt wurden. Das Chromatogramm C zeigt die Umsetzung mit 20 OD induzierten Zellen. In der Kontrollprobe wurden 7,08 µg Zeaxanthin gemessen, in der Probe mit induzierten Zellen 3,68 µg. Demnach wurden durch die induzierten Zellen 48 % des Zeaxanthins umgesetzt. In der vergrößerten Ansicht des Chromatogramms C waren im Vergleich zu dem Chromatogramm der Kontrollprobe zwei zusätzliche Peaks mit den Retentionszeiten 10,49 und 11,12 min zu sehen. Diese Peaks konnten bereits bei der *in vivo* Umsetzung von Zeaxanthin beobachtet werden (vgl. Abb. 62 D). Im Vergleich zu den Peaks in Abb. 70 D waren die Peaks, die bei *in vivo* Umsetzungen beobachtet werden konnten deutlich kleiner. Durch die Umsetzung mit ganzen Zellen konnte also die Produktausbeute deutlich gesteigert werden.



**Abb. 70:** HPLC-Analyse (Methode 2) von Extrakten von Zeaxanthin-Umsetzungen mit 20 OD Zellen von *E. coli* JM109 pJH66.1. **A** Probe mit uninduzierten Zellen (Kontrolle), **B** vergrößerte Ansicht von A, **C** Probe mit induzierten Zellen, **D** vergrößerte Ansicht von C. Peaks: **1** Zeaxanthin, **2** Zeaxanthin-Spaltprodukt 1, **3** Zeaxanthin-Spaltprodukt 2.

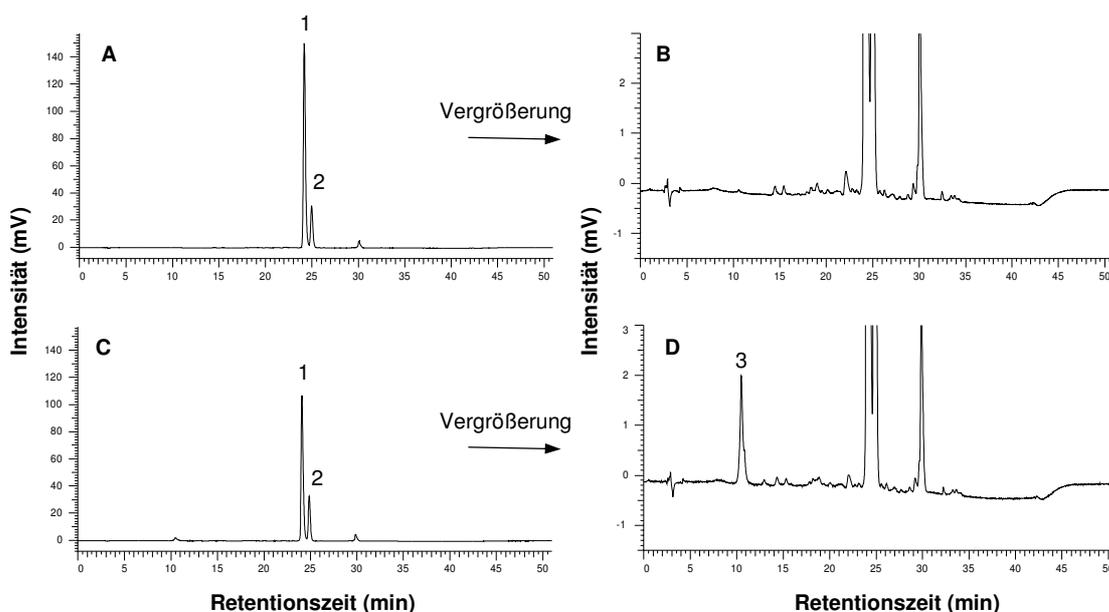
Durch den Einsatz von ganzen Zellen für die Carotinoid-Umsetzungen war es nun auch möglich die Spaltung von Carotinoiden zu untersuchen, für deren Produktion kein rekombinanter *E. coli* Stamm verfügbar stand.

Als nächstes mögliches Substrat für Ppsir1\_15490 wurde **Nostoxanthin** getestet, welches durch Extraktion von *Sphingopyxis alaskensis* RB2256 (siehe Kapitel 4.1.2.4) gewonnen wurde. Abb. 71 zeigt die Messergebnisse. In der Kontrollprobe mit 20 OD uninduzierten Zellen von *E. coli* JM109 pJH66.1 wurden 8,11  $\mu\text{g}$  Nostoxanthin gemessen. In der Probe von der Umsetzung mit 20 OD induzierten Zellen von *E. coli* JM109 pJH66.1 wurden 5,96  $\mu\text{g}$  Nostoxanthin gemessen. Es wurden also 27 % des Nostoxanthins umgesetzt. In der vergrößerten Ansicht des Chromatogramms C waren im Vergleich zu dem Chromatogramm der Kontrollprobe zwei zusätzliche Peaks mit den Retentionszeiten 8,24 und 8,77 min zu sehen, bei denen es sich wahrscheinlich um Nostoxanthin-Spaltprodukte handelt. Die im Vergleich zu den beiden Zeaxanthin-Spaltproduktion geringere Retentionszeit steht in Übereinstimmung mit den Polaritäten der beiden eingesetzten Substrate Zeaxanthin und Nostoxanthin (vgl. Abb. 70 D).



**Abb. 71:** HPLC-Analyse (Methode 2) von Extrakten von Nostoxanthin-Umsetzungen mit 20 OD Zellen von *E. coli* JM109 pJH66.1. **A** Probe mit uninduzierten Zellen (Kontrolle), **B** vergrößerte Ansicht von A, **C** Probe mit induzierten Zellen, **D** vergrößerte Ansicht von C. Peaks: **1** Nostoxanthin, **2** Nostoxanthin-Spaltprodukt 1, **3** Nostoxanthin-Spaltprodukt 2.

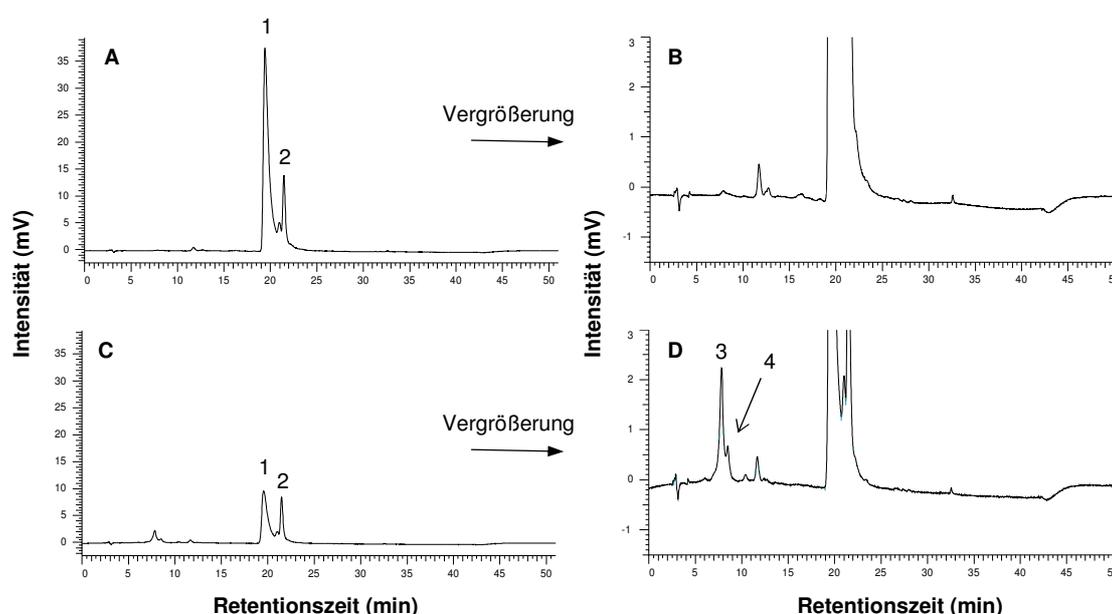
Durch den Einsatz von **Canthaxanthin** als Substrat sollte untersucht werden, ob Ppsir1\_15490 neben Substraten mit Hydroxygruppen auch Substrate mit Ketogruppen umsetzt. Abb. 72 zeigt die Messergebnisse. In der Probe von der Canthaxanthin-Umsetzung mit 20 OD induzierten Zellen von *E. coli* JM109 pJH66.1 konnte im Vergleich zur Kontrolle tatsächlich eine geringere Menge an Canthaxanthin gemessen werden. Der Canthaxanthin-Gehalt der Kontrolle betrug 8,29  $\mu\text{g}$ , wohingegen in der Probe der Umsetzung mit induzierten Zellen 5,87  $\mu\text{g}$  gemessen wurden. Es wurden also 29 % des Canthaxanthins umgesetzt. In der vergrößerten Ansicht von Chromatogramm C zeigte sich im Vergleich zu dem Chromatogramm des Extraktes der Kontrollprobe (Chromatogramm B) ein zusätzlicher Peak mit der Retentionszeit 10,50 min, bei dem es wahrscheinlich um ein Canthaxanthin-Spaltprodukt handelt.



**Abb. 72:** HPLC-Analyse (Methode 2) von Extrakten von Canthaxanthin-Umsetzungen mit 20 OD Zellen von *E. coli* JM109 pJH66.1. **A** Probe mit uninduzierten Zellen (Kontrolle), **B** vergrößerte Ansicht von A, **C** Probe mit induzierten Zellen, **D** vergrößerte Ansicht von C. Peaks: **1** Canthaxanthin, **2** Canthaxanthin-(Z)-Isomer, **3** Canthaxanthin-Spaltprodukte.

Als Substrat für die Untersuchung der Spaltaktivität von Ppsir1\_15490 für Carotinoide, die sowohl Hydroxy- als auch Ketogruppen haben wurde **Astaxanthin** eingesetzt. Abb. 73 zeigt die Messergebnisse. In der Kontrollprobe wurde ein Astaxanthin-Gehalt von 7,58  $\mu\text{g}$  gemessen. Nach der Umsetzung über Nacht mit

10 OD induzierten Zellen von *E. coli* JM109 pJH66.1 konnte noch ein Astaxanthin-Gehalt von 2,13 µg gemessen werden. Es wurden also 72 % des Astaxanthins abgebaut. In der vergrößerten Ansicht des Chromatogramms C zeigten sich zwei unvollständig getrennte, zusätzliche Peaks mit den Retentionszeiten 7,82 min und 8,50 min.



**Abb. 73:** HPLC-Analyse (Methode 2) von Extrakten von Astaxanthin-Umsetzungen mit 10 OD Zellen von *E. coli* JM109 pJH66.1. **A** Probe mit uninduzierten Zellen (Kontrolle), **B** vergrößerte Ansicht von A, **C** Probe mit induzierten Zellen, **D** vergrößerte Ansicht von C. Peaks: **1** Astaxanthin, **2** Astaxanthin-(Z)-Isomer, **3** Astaxanthin-Spaltprodukt 1, **4** Astaxanthin-Spaltprodukt 2.

Die in diesem Kapitel dargestellten Messdaten zeigen, dass bei Zeaxanthin-Umsetzungen mit ganzen Zellen von *E. coli* JM109 pJH66.1 die gleichen Produkte entstehen wie bei *in vivo* Umsetzungen mit *E. coli* JM109 pJH14.1/pJH62.1. Das bedeutet, dass die Umsetzung von Zeaxanthin durch Ppsir1\_15490 in beiden Experimenten gleich erfolgt. Im Vergleich zu den *in vivo* Zeaxanthin-Umsetzungen mit *E. coli* JM109 pJH14.1/pJH62.1 konnten durch die Umsetzung von Zeaxanthin mit ganzen Zellen von *E. coli* JM109 pJH66.1 größere Mengen an Spaltprodukten gewonnen werden. Es konnte ferner gezeigt werden, dass Ppsir1\_15490 neben Substraten mit zwei Hydroxygruppen auch das Substrat Nostoxanthin, welches vier Hydroxygruppen besitzt, umsetzt. Durch die Experimente, bei denen Canthaxanthin und Astaxanthin als Substrate eingesetzt wurden, konnte gezeigt werden,

dass Ppsir1\_15490 auch Carotinoide umsetzt, die Ketogruppen bzw. sowohl Keto- als auch Hydroxygruppen enthalten. Es zeigten sich Unterschiede bezüglich der umgesetzten Menge eines spezifischen Carotinoid-Substrates. Mit 10 OD induzierten Zellen konnten 72 % des Astaxanthins umgesetzt werden, wohingegen bei den Umsetzungen von gleichen Mengen der übrigen Carotinoide 20 OD Zellen eingesetzt wurden, mit denen nur 27 - 48 % des jeweiligen Substrates umgesetzt wurden. Demnach bedingte das gleichzeitige Vorhandensein von Hydroxy- und Ketogruppen am Substrat die beste Umsetzung durch Ppsir1\_15490.

Mit den in Kapitel 4.3.5.1 beschriebenen *in vivo* Experimenten konnte gezeigt werden, dass Ppsir1\_15490 Dihydroxylicopin und die C<sub>50</sub>-Carotinoide Sarcina-, Sarpreno- und Decaprenoxanthin umsetzt. Bei den Untersuchungen mit ganzen Zellen von *E. coli* JM109 pJH66.1 konnte jedoch kaum eine Umsetzung dieser Substrate gemessen werden; die Carotinoid-Gehalte der Proben mit induzierten Zellen und der jeweiligen Kontrolle mit uninduzierten Zellen unterschieden sich nur um wenige Prozent. Auch die in Kapitel 4.3.5.1 beschriebenen Produkt-Peaks konnten nicht beobachtet werden (Messdaten nicht gezeigt).

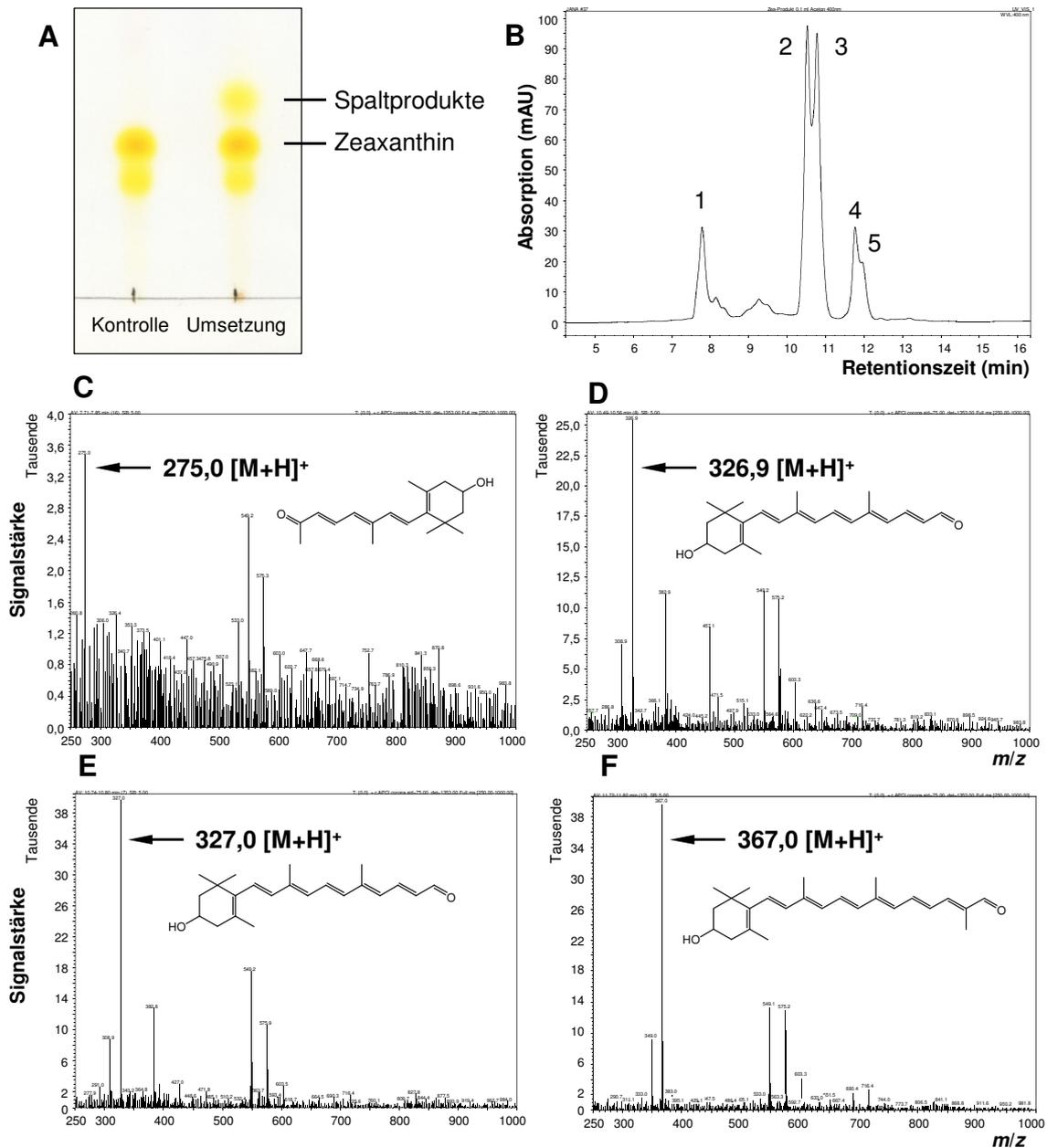
#### 4.3.5.4 *Isolierung und LC-MS-Analyse der Carotinoid-Spaltprodukte von Ppsir1\_15490*

Im Folgenden sollten die Spaltprodukte von Zeaxanthin, Nostoxanthin, Canthaxanthin und Astaxanthin mittels LC-MS-Analyse untersucht werden. Bei den in Kapitel 4.3.5.1 beschriebenen *in vivo* Carotinoid-Umsetzungen waren nur sehr geringe Mengen an Carotinoid-Spaltprodukten messbar, die für eine LC-MS-Analyse nicht ausreichten. Mit Hilfe der Umsetzungen mit ganzen Zellen von *E. coli* JM109 pJH66.1 konnte die Menge an Spaltprodukten von Zeaxanthin deutlich gesteigert werden. Darüber hinaus konnten auch Spaltprodukte von Nostoxanthin, Canthaxanthin und Astaxanthin gewonnen werden. Trotz der Steigerung der Mengen an Carotinoid-Spaltprodukten, waren diese insgesamt immer noch sehr gering. Um genug Substanz für die LC-MS-Analyse zu gewinnen, wurden die Spaltprodukte von drei bis zehn Umsetzungen mit ganzen Zellen von *E. coli* JM109 pJH66.1 isoliert. Dies erfolgte mittels präparativer Dünnschichtchromatographie mit Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (siehe Kapitel 3.11.2). Für jedes umgesetzte Carotinoid wurde ein speziel-

les Laufmittel eingesetzt, welches eine Trennung von Substrat und seiner Spaltprodukte ermöglichte (Tab. 32). Die Spaltprodukte wurden durch den Vergleich mit einer mitchromatographierten Kontrollprobe identifiziert. Der Bereich des Kieselgels, der die Spaltprodukte enthielt, wurde abgekratzt und die Substanzen mit Ethanol aus dem Kieselgel extrahiert. Die eingedampften Extrakte wurden in 100  $\mu$ l Aceton gelöst und 20  $\mu$ l wurden mittels LC-MS analysiert (siehe Kapitel 3.12.2). Die Messungen wurden von Judit Bóna-Lovász und Marion Fleischer am Institut für Systemdynamik durchgeführt.

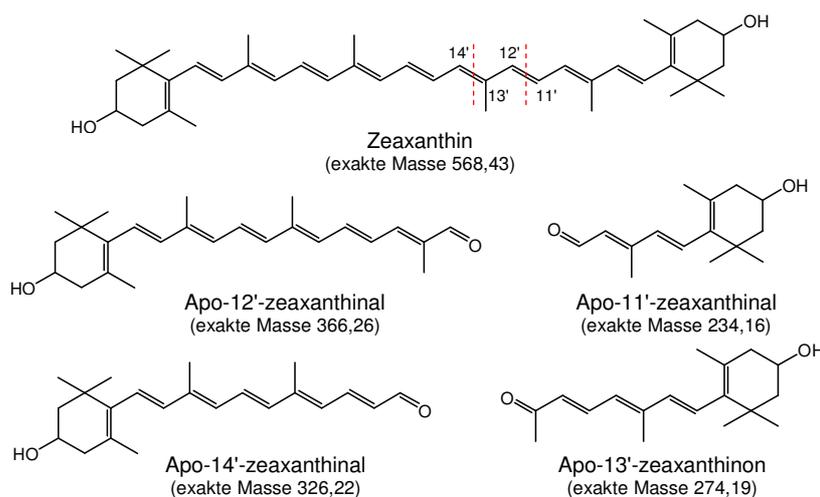
Zunächst wurden die Spaltprodukte von **Zeaxanthin** untersucht. Abb. 74 A zeigt ein Dünnschichtchromatogramm der Extrakte von Zeaxanthin-Umsetzungen mit ganzen Zellen von *E. coli* JM109 pJH66.1. Im Vergleich zu dem Extrakt der Kontrollprobe, bei der uninduzierte Zellen eingesetzt wurden (links), war bei dem Extrakt der Probe mit induzierten Zellen (rechts) eine zusätzliche Bande sehen. Dieser Bereich des Kieselgels wurde isoliert und extrahiert. Bei der etablierten LC-MS-Methode erfolgte die UV/Vis-Detektion normalerweise bei einer Wellenlänge von 475 nm (siehe Kapitel 3.12.2). Carotinoid-Spaltprodukte haben jedoch ein mehr oder weniger kürzeres Chromophor als die Carotinoid-Substrate und absorbieren Licht in einem kürzeren Wellenlängenbereich. Daher erfolgten die LC-MS-Messungen bei einer Wellenlänge von 400 nm. Durch die Reduktion der Wellenlänge konnten neben den beiden bereits detektierten Peaks weitere Peaks beobachtet werden. Die Peaks 2 und 3 in Abb. 74 B entsprechen den Peaks 2 und 3 in Abb. 70 D. Abb. 74 C bis F zeigen die Massenspektren der Substanzen der Peaks 1 bis 4. In dem Massenspektrum der Substanz von Peak 1 konnte ein  $m/z$ -Signal bei 275,0 gefunden werden. Dieses korrespondiert mit der Masse des  $[M+H]^+$ -Ions von Apo-13'-zeaxanthinon (Abb. 74 C). In den Massenspektren der unvollständig getrennten Peaks 2 und 3 konnten  $m/z$ -Signale bei 326,9 und 327,0 gemessen werden, welche mit der Masse des  $[M+H]^+$ -Ions von Apo-14'-zeaxanthinal übereinstimmen (Abb. 74 D und E). Da die Substanzen der Peaks 2 und 3 dieselbe Masse haben, handelt es sich wahrscheinlich um Isomere der gleichen Substanz. Die Substanzen der Peaks 4 und 5 wurden ebenfalls nur unvollständig getrennt. Das Massenspektrum der Substanz von Peak 4 zeigte ein  $m/z$ -Signal bei 367, welches dem  $[M+H]^+$ -Ion von Apo-12'-zeaxanthinal zugeordnet wurde (Abb. 74 F). In dem Massenspektrum der Substanz von Peak 5 konnte das

gleiche Signal detektiert werden (Messdaten nicht gezeigt). Wahrscheinlich handelt es sich bei den Substanzen von Peak 4 und 5 ebenfalls um Isomere.



**Abb. 74:** Dünnschichtchromatogramm von Zeaxanthin-Umsetzungen mit ganzen Zellen von *E. coli* JM109 pJH66.1 sowie die Daten der LC-MS-Analyse der isolierten Zeaxanthin-Spaltprodukte. **A** Dünnschichtchromatogramm, links: Extrakt einer Probe mit uninduzierten Zellen (Kontrolle), rechts: Extrakt einer Probe mit induzierten Zellen; **B** HPLC-Chromatogramm der isolierten Zeaxanthin-Spaltprodukte; **C** Massenspektrum der Substanz von Peak 1; **D** Massenspektrum der Substanz von Peak 2; **E** Massenspektrum der Substanz von Peak 3; **F** Massenspektrum der Substanz von Peak 4. Durchführung der Messungen: Judit Bóna-Lovász und Marion Fleischer, ISYS.

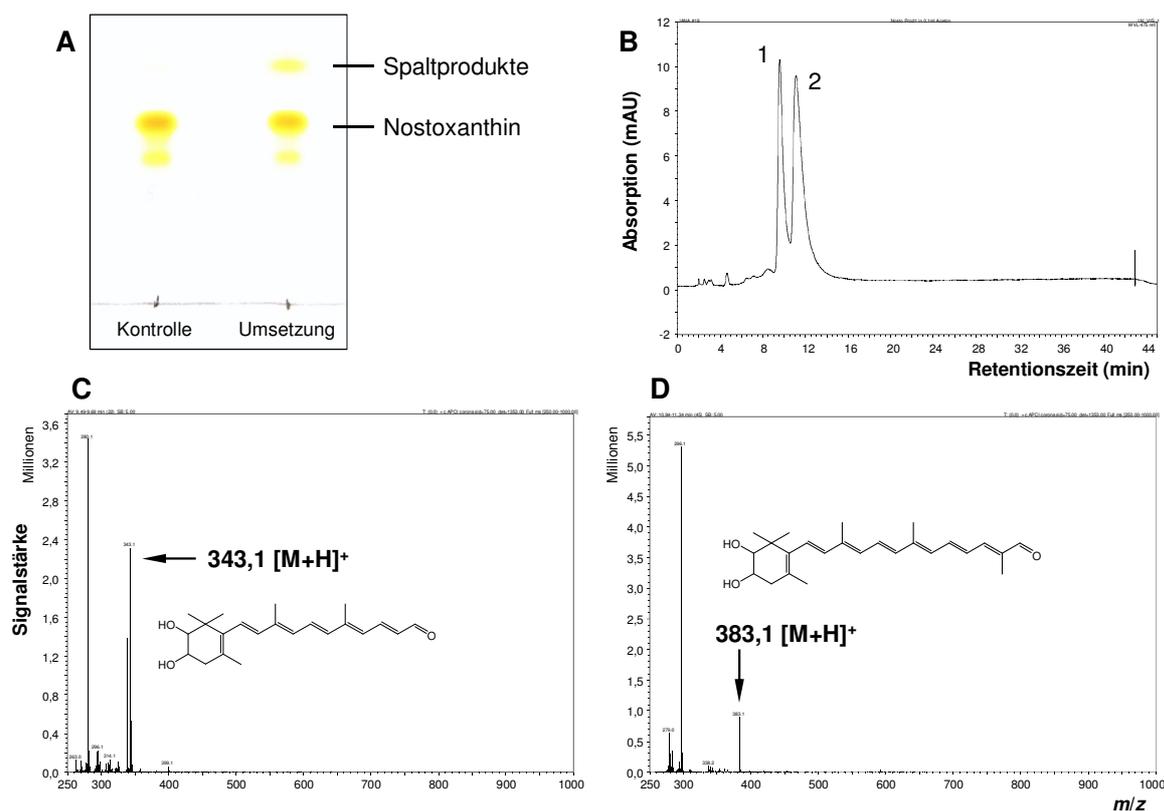
Mit Hilfe der detektierten Massen wurden zwei Schnittpositionen von Zeaxanthin für Ppsir1\_15490 abgeleitet (Abb. 75). Die Spaltprodukte Apo-14'-zeaxanthinal und Apo-13'-zeaxanthinon können einer Spaltung von Zeaxanthin an der 13'/14'-Doppelbindung zugeordnet werden. Das Produkt Apo-12'-zeaxanthinal entstand wahrscheinlich durch die Spaltung von Zeaxanthin an der 11'/12'-Doppelbindung. Hier konnte aber das Gegenstück, Apo-11'-zeaxanthinal, nicht detektiert werden.



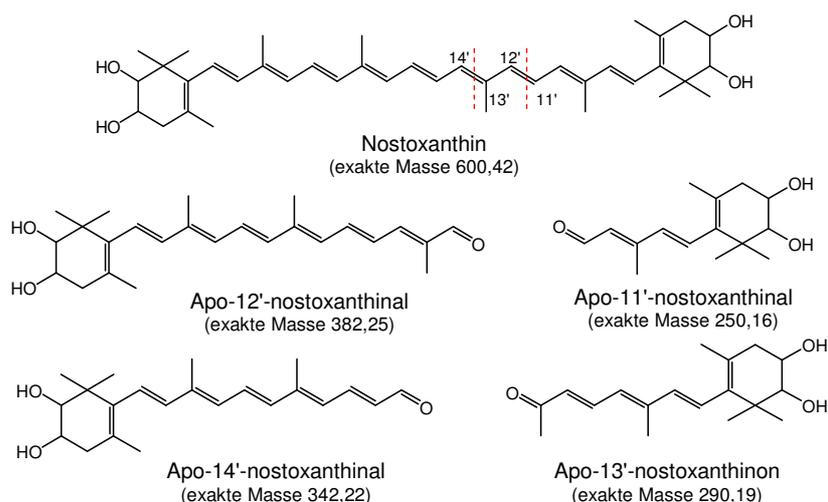
**Abb. 75:** Identifizierte Schnittpositionen von Ppsir1\_15490 für das Substrat Zeaxanthin und die entstehenden Spaltprodukte.

Als nächstes wurden die Spaltprodukte von **Nostoxanthin** untersucht. Abb. 76 A zeigt das Dünnschichtchromatogramm von Extrakten der Kontrollprobe (links) und der Umsetzung von Nostoxanthin mit ganzen Zellen von *E. coli* JM109 pJH66.1 (rechts). Die HPLC-Messung der isolierten Nostoxanthin-Spaltprodukte erfolgte bei einer Wellenlänge von 475 nm. Bis zur Fertigstellung der Arbeit konnten die Messungen nicht bei 400 nm wiederholt werden. In dem HPLC-Chromatogramm sind daher nur zwei Peaks zu sehen. Die Substanz von Peak 1 zeigte in ihrem Massenspektrum ein  $m/z$ -Signal bei 343,1, welches dem  $[M+H]^+$ -Ion von Apo-14'-nostoxanthinal zugeordnet wurde. In dem Massenspektrum der Substanz von Peak 2 konnte ein  $m/z$ -Signal bei 383,1 beobachtet werden, welches mit der Masse des  $[M+H]^+$ -Ions von Apo-12'-nostoxanthinal übereinstimmt.

Bei den beiden gefundenen Nostoxanthin-Spaltprodukten handelt es sich um das jeweils größere Fragment, das bei einer Spaltung des Moleküls an der 11'/12'- bzw. 13'/14'-Doppelbindung entsteht (Abb. 77). Die beiden Abgeleiteten Schnittpositionen von Ppsir1\_15490 für das Substrat Nostoxanthin stimmen mit denen von Zeaxanthin überein (vgl. Abb. 75).

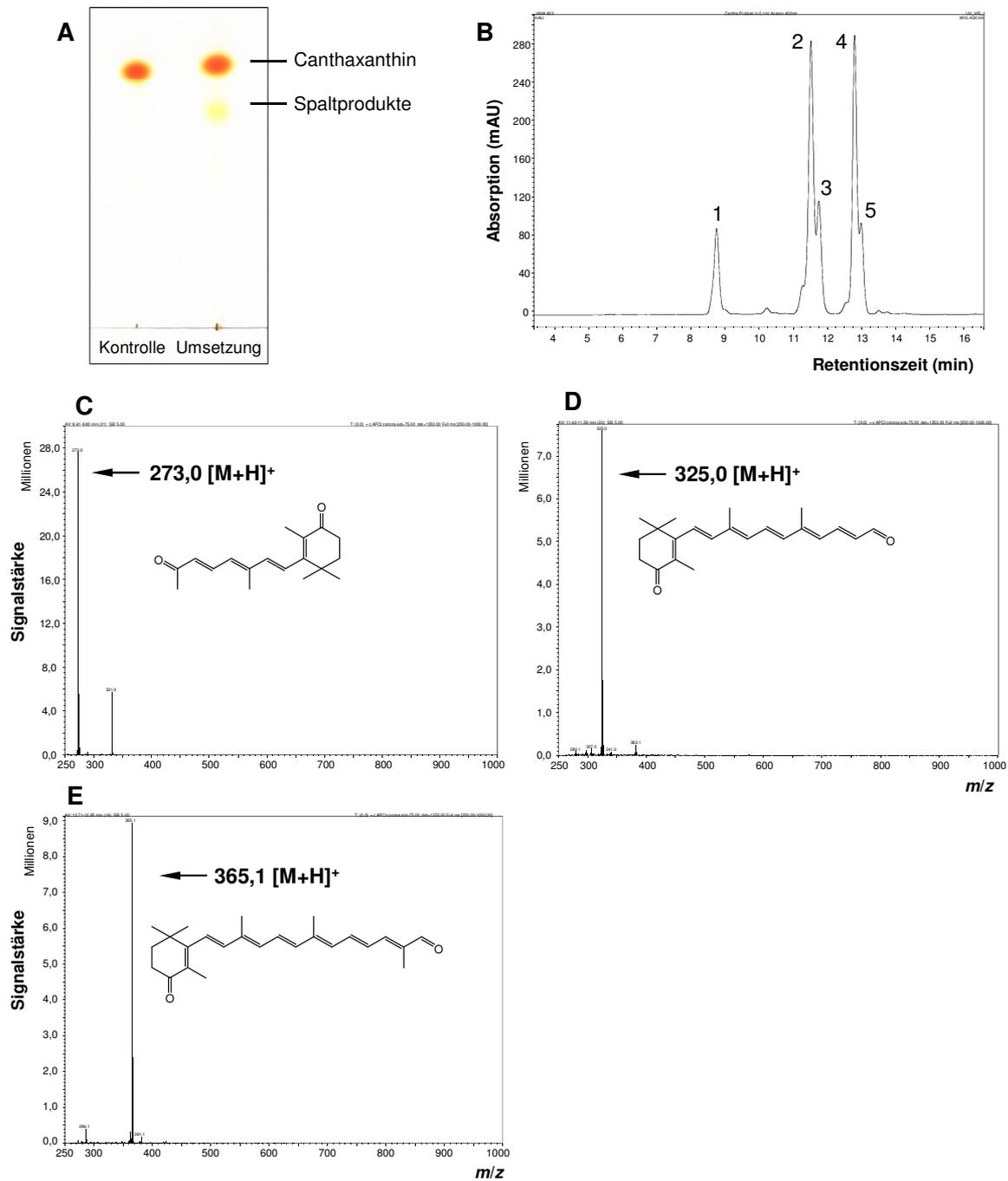


**Abb. 76:** Dünnschichtchromatogramm von Nostoxanthin-Umsetzungen mit ganzen Zellen von *E. coli* JM109 pJH66.1 sowie die Daten der LC-MS-Analyse der isolierten Nostoxanthin-Spaltprodukte. **A** Dünnschichtchromatogramm, links: Extrakt einer Probe mit uninduzierten Zellen (Kontrolle), rechts: Extrakt einer Probe mit induzierten Zellen; **B** HPLC-Chromatogramm; **C** Massenspektrum der Substanz von Peak 1; **D** Massenspektrum der Substanz von Peak 2. Durchführung der Messungen: Judit Bóna-Lovász und Marion Fleischer, ISYS.



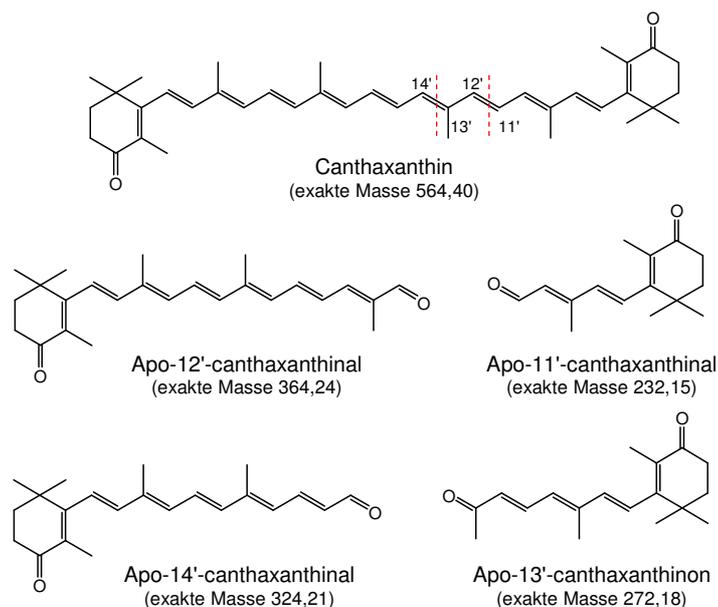
**Abb. 77:** Identifizierte Schnittposition von Ppsir1\_15490 für das Substrat Nostoxanthin und die entstehenden Spaltprodukte.

Abb. 78 A zeigt das Dünnschichtchromatogramm der Extrakte von einer **Canthaxanthin**-Umsetzung mit induzierten Zellen von *E. coli* JM109 pJH66.1 (rechts) sowie einer Kontrollprobe, bei der uninduzierte Zellen eingesetzt wurden (links). Abb. 78 B zeigt das HPLC-Chromatogramm der isolierten Spaltprodukte. Die Messung erfolgte bei 400 nm. In dem Massenspektrum der Substanz von Peak 1 (Abb. 78 C) war ein  $m/z$ -Signal bei 273,0 zu beobachten, welches dem  $[M+H]^+$ -Ion von Apo-13'-canthaxanthinon zugeordnet wurde. Die Substanz von Peak 2 zeigte in ihrem Massenspektrum ein  $m/z$ -Signal bei 325,0, welches mit der Masse des  $[M+H]^+$ -Ions von Apo-14'-canthaxanthinal korrespondiert (Abb. 78 D). Die Substanz des unvollständig von Peak 2 getrennten Peaks 3 zeigte ebenfalls ein Massensignal bei 325,0 und ist wahrscheinlich ein Isomer der Substanz von Peak 2 (Massenspektrum nicht gezeigt). Die Substanz von Peak 4 zeigte in ihrem Massenspektrum das  $m/z$ -Signal 365,1 (Abb. 78 E). Bei der Substanz könnte es sich um das  $[M+H]^+$ -Ion von Apo-12'-canthaxanthinal handeln. Die Substanz von Peak 5 hatte im Massenspektrum ebenfalls ein  $m/z$ -Signal bei 365,1 (Massenspektrum nicht gezeigt). Bei den unvollständig getrennten Substanzen der Peaks 4 und 5 handelt es sich demnach wahrscheinlich ebenfalls um Isomere der gleichen Substanz.



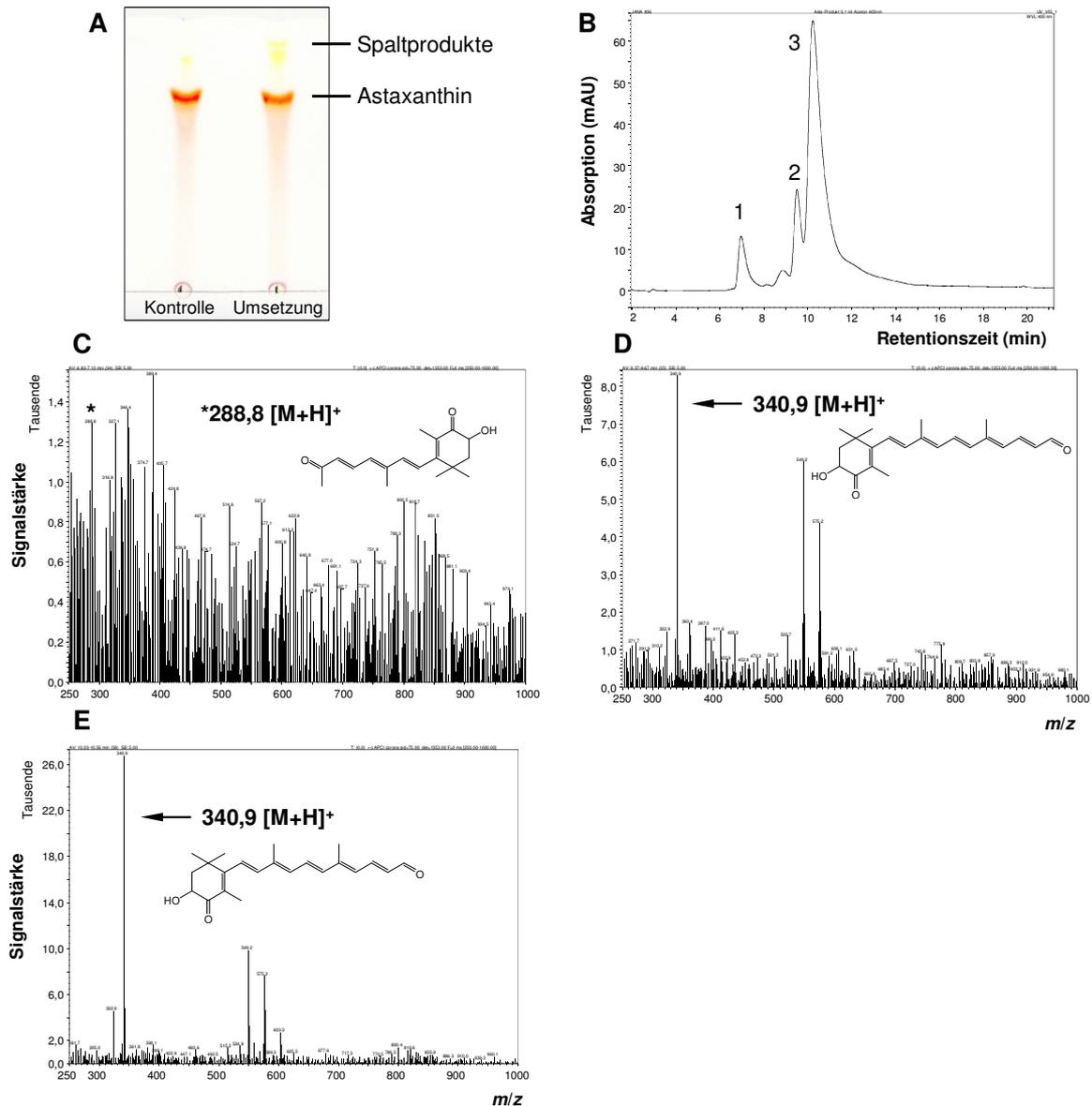
**Abb. 78:** Dünnschichtchromatogramm von Canthaxanthin-Umsetzungen mit ganzen Zellen von *E. coli* JM109 pJH66.1 sowie die Daten der LC-MS-Analyse der isolierten Canthaxanthin-Spaltprodukte. **A** Dünnschichtchromatogramm, links: Extrakt einer Probe mit uninduzierten Zellen (Kontrolle), rechts: Extrakt einer Probe mit induzierten Zellen; **B** HPLC-Chromatogramm; **C** Massenspektrum der Substanz von Peak 1; **D** Massenspektrum der Substanz von Peak 2; **E** Massenspektrum der Substanz von Peak 4. Durchführung der Messungen: Judit Bóna-Lovász und Marion Fleischer, ISYS.

Mit Hilfe der detektierten Massen konnten für Canthaxanthin die gleichen Schnittpositionen wie für Zeaxanthin und Nostoxanthin abgeleitet werden (Abb. 79). Auch dieses Substrat wird von Ppsir1\_15490 an der 11'/12'- oder 13'/14'-Doppelbindung gespalten. Wie auch bei den Proben der Zeaxanthin-Spaltprodukte konnte bei der Analyse der Canthaxanthin-Spaltprodukte das kleinste Spaltprodukt, Apo-11'-canthaxanthinal, nicht detektiert werden.



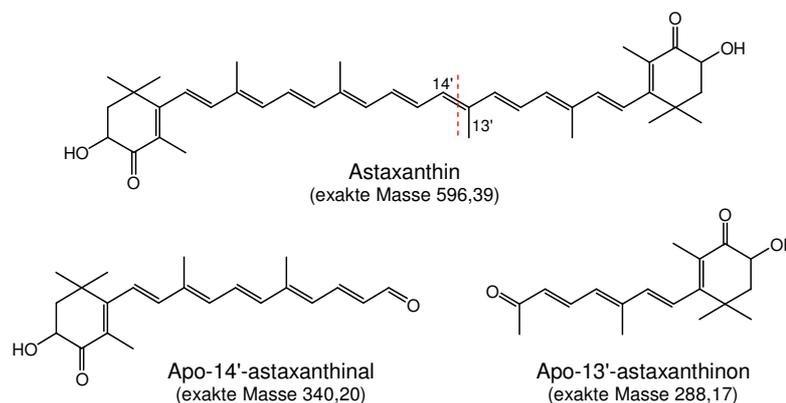
**Abb. 79:** Identifizierte Schnittpositionen von Ppsir1\_15490 für das Substrat Canthaxanthin und die entstehenden Spaltprodukte.

Die Messergebnisse der LC-MS-Analyse der Spaltprodukte von **Astaxanthin** sind in Abb. 80 dargestellt. Abb. 80 A zeigt das Dünnschichtchromatogramm. In dem HPLC-Chromatogramm der isolierten Spaltprodukte waren drei Hauptpeaks zu sehen (Abb. 80 B). Die Massenspektren der Substanzen der Peaks sind in Abb. 80 C bis E dargestellt. In dem Massenspektrum der Substanz von Peak 1 war neben zahlreichen anderen  $m/z$ -Signalen auch eines bei 288,8 zu sehen, welches mit der Masse des  $[M+H]^+$ -Ions von Apo-13'-astaxanthinon übereinstimmt. Die Substanzen der Peaks 2 und 3 zeigten in ihren Massenspektren wesentlich stärkere  $m/z$ -Signale bei 340,9, welche mit der Masse des  $[M+H]^+$ -Ions von Apo-14'-astaxanthinal übereinstimmen. Da die Substanzen der Peaks 2 und 3 in ihren Massenspektren dasselbe  $m/z$ -Signal zeigten, kann man davon ausgehen, dass es sich um Isomere der gleichen Substanz handelt.



**Abb. 80:** Dünnschichtchromatogramm von Astaxanthin-Umsetzungen mit ganzen Zellen von *E. coli* JM109 pJH66.1 sowie die Daten der LC-MS-Analyse der isolierten Astaxanthin-Spaltprodukte. **A** Dünnschichtchromatogramm, links: Extrakt einer Probe mit uninduzierten Zellen (Kontrolle), rechts: Extrakt einer Probe mit induzierten Zellen; **B** HPLC-Chromatogramm; **C** Massenspektrum der Substanz von Peak 1; **D** Massenspektrum der Substanz von Peak 2; **E** Massenspektrum der Substanz von Peak 3. Durchführung der Messungen: Judit Bóna-Lovász und Marion Fleischer, ISYS.

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Messergebnissen, mit deren Hilfe jeweils zwei Schnittpositionen für die Substrate Zeaxanthin, Nostoxanthin und Canthaxanthin identifiziert werden konnten, wurden für das Substrat Astaxanthin nur zwei Spaltprodukte gefunden, mit deren Hilfe die Schnittposition an der 13'/14'-Doppelbindung abgeleitet wurde (Abb. 81)



**Abb. 81:** Identifizierte Schnittposition von Ppsir1\_15490 für das Substrat Astaxanthin und die entstehenden Spaltprodukte.

Durch die Isolierung der Carotinoid-Spaltprodukte mittels präparativer Dünnschichtchromatographie war es möglich genug Substanz für die Durchführung von LC-MS-Messungen bereitzustellen. Durch die Messungen konnten verschiedene Spaltprodukte identifiziert werden, die übereinstimmend auf eine Spaltung der Substrate Zeaxanthin, Canthaxanthin und Nostoxanthin an der 11'/12' oder 13'/14'-Doppelbindung hinweisen. Die Spaltung dieser Substrate durch Ppsir1\_15490 geschieht also unpräzise. Das jeweils kleinste Spaltprodukt der drei Substrate konnte in keinem Fall detektiert werden. Durch die Analyse der Spaltprodukte von Astaxanthin wurde nur die Schnittposition an der 13'/14'-Doppelbindung identifiziert. Astaxanthin wird also von Ppsir1\_15490 nicht nur besonders gut umgesetzt (siehe Kapitel 4.3.5.3), es ist auch das einzige Substrat bei dem nur eine einzige Schnittposition identifiziert werden konnte.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Heterologe Carotinoid-Biosynthese

#### 5.1.1 Herstellung von Vektoren für die heterologe Carotinoid-Biosynthese

Im Rahmen dieser Arbeit wurden eine Reihe von pBBR1MCS-2- und pBR322-basierten Vektoren mit L-Rhamnose-induzierbaren Promotoren konstruiert, die die heterologe Produktion von verschiedenen Carotinoiden mit *E. coli* ermöglichen. Es ist bekannt, dass durch die Überexpression der Gene *idi* (Isopentenylpyrophosphat-Isomerase), *dxs* (1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase) und *ispA* (Geranyl-/Farnesylpyrophosphat-Synthase) die Carotinoid-Ausbeute gesteigert werden kann (Lee und Schmidt-Dannert, 2002; Matthews und Wurtzel, 2000). Daher wurden diese drei Gene als erstes in den pBBR1MCS-2-basierten Vektor integriert. Für die heterologe Biosynthese von Lycopin,  $\beta$ -Carotin und Zeaxanthin (Abb. 19, S. 104) wurden die Gene *crtE*, *crtI*, *crtY* und *crtZ* von *Pantoea ananatis* (Misawa *et al.*, 1990) stufenweise hinter *idi*, *ispA* und *dxs* in den pBBR1MCS-2-basierten Vektor integriert. Mit den entsprechenden Plasmid-tragenden *E. coli* JM109 Stämmen wurden 1,27 mg/g Ztrm. Lycopin (Anteil am Gesamtcarotinoid: 74 %), 1,07 mg/g Ztrm.  $\beta$ -Carotin (90 %) und 0,97 mg/g Ztrm. Zeaxanthin (91 %) produziert.

Für die Biosynthese von Canthaxanthin aus  $\beta$ -Carotin und Astaxanthin aus Zeaxanthin ist zusätzlich eine  $\beta$ -Endgruppen-C4,C4'-Ketolase notwendig (Abb. 21, S. 107). Hier gibt es zwei verschiedene Klassen von Enzymen, die CrtO-Typ-Ketolasen und die CrtW-Typ-Ketolasen. Beide Enzym-Typen unterscheiden sich strukturell und hinsichtlich ihrer Substratspezifität. Nur Enzyme vom CrtW-Typ können 3-Hydroxy- $\beta$ -Endgruppen als Substrat nutzen und sind somit für die Astaxanthin-Synthese prinzipiell besser geeignet. Die Untersuchungen an CrtW von dem marinen  $\alpha$ -Proteobakterium *Brevundimonas* sp. SD212 zeigten, dass dieses Enzym sowohl für die Astaxanthin- als auch für die Canthaxanthin-Produktion geeignet ist (Choi *et al.*, 2007). Für die Produktion von Astaxanthin wurde das bereits

vorhandene Zeaxanthin-Biosyntheseoperon mit *crtW* von *Brevundimonas* sp. SD212 erweitert. Der Plasmid-tragende *E. coli* JM109 Stamm produzierte ein Carotinoid-Gemisch aus 32 % Astaxanthin, 30 % Zeaxanthin 13 % Canthaxanthin und 25 % nicht identifizierten Carotinoiden. Für die Erhöhung des Astaxanthin-Anteils am Gesamtcarotinoid wurde *crtW* in einen zweiten, pBR322-basierten Vektor integriert und mit dem pBBR1MCS-2-basierten Zeaxanthin-Biosynthesevektor kombiniert. Der betreffende *E. coli* JM109 Stamm produzierte 80 % Astaxanthin, 10 % Zeaxanthin, 4 % Canthaxanthin und 6 % nicht identifizierte Carotinoide (1,43 mg/g Ztrm. Astaxanthin). Folglich konnte also durch die stärkere Expression von *crtW* mit dem zweiten Replikon der Astaxanthin-Anteil beträchtlich gesteigert werden. Trotzdem reichte die stärkere Expression von *crtW* nicht aus, um alles Zeaxanthin zu Astaxanthin umzusetzen. Auch die Umsetzung von Canthaxanthin zu Astaxanthin durch CrtZ erfolgte nur unvollständig. In der Literatur wurde beschrieben, dass CrtZ von *Brevundimonas* sp. SD212 für die Astaxanthin-Synthese besser geeignet ist als CrtZ von *Pantoea ananatis* (Makino *et al.*, 2008). Daher sollte überprüft werden, ob der Canthaxanthin-Anteil durch den Einsatz von CrtZ von *Brevundimonas* sp. SD212 verringert werden kann. Hierfür wurde ein zweiter pBBR1MCS-2-basierter Zeaxanthin-Biosynthesevektor konstruiert, indem *crtZ* von *Brevundimonas* sp. SD212 in den  $\beta$ -Carotin-Biosynthesevektor integriert wurde. Die Messungen zeigten, dass der Canthaxanthin-Gehalt des *E. coli* JM109 Stammes mit CrtZ von *Brevundimonas* sp. SD212 sich nicht von dem des *E. coli* JM109 Stammes mit CrtZ von *Pantoea ananatis* unterschied, was bedeutet, dass in dem hier verwendeten System beide Enzyme gleichermaßen für die Astaxanthin-Produktion geeignet sind.

Für die Produktion von Canthaxanthin wurde der pBR322-basierte Vektor mit *crtW* von *Brevundimonas* sp. SD212 mit dem pBBR1MCS-2-basierten  $\beta$ -Carotin-Biosynthesevektor kombiniert. Mit *E. coli* JM109 konnten so bis zu 0,76 mg/g Ztrm Canthaxanthin (91 %) produziert werden.

Für die Biosynthese der C<sub>50</sub>-Carotinoide Sarcinaxanthin, Sarprenoxanthin, Decaprenoxanthin (Abb. 25, S. 112) aus Lycopin können CrtYEb und CrtYe/CrtYf von *Corynebacterium glutamicum* eingesetzt werden (Netzer *et al.*, 2010). Durch die Integration von *crtEb*, *crtYe* und *crtYf* von *Corynebacterium glutamicum* in den pBBR1MCS-2-basierten Lycopin-Biosynthesevektor wurde ein Vektor für die Pro-

duktion der drei C<sub>50</sub>-Carotinoide konstruiert. Der entsprechende *E. coli* JM109 Stamm produzierte ein Gemisch aus 30 % Sarcinaxanthin, 46 % Sarprenoxanthin und 19 % Decaprenoxanthin. Lycopin war nicht mehr nachweisbar, was bedeutet, dass dieses von den Enzymen CrtEb und CrtYe/CrtYf vollständig umgesetzt wurde. Das Auftreten der drei Isomere und deren mengenmäßige Verteilung stimmen mit den Ergebnissen von Netzer *et al.* (2010) überein.

Zahlreiche Publikationen (z. B. Kim *et al.*, 2011; Osawa *et al.*, 2011) und nicht zuletzt auch die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, dass Plasmidbasierte Expressionssysteme gut geeignet sind, um verschiedene Carotinoide mit *E. coli* zu produzieren. Ein alternativer Ansatz für die Konstruktion von Stämmen für die Carotinoid-Produktion ist die chromosomale Integration der Biosynthesegene. Diese Strategie wurde von Albermann (2011) sowie von Lemuth *et al.* (2011) verfolgt. Auf letztere Arbeit soll im Folgenden näher eingegangen werden. Die von Lemuth *et al.* (2011) verwendeten Carotinoid-Biosynthesegene *crtE*, *crtI*, *crtB*, *crtY* und *crtZ* stammen aus *P. ananatis*, *crtW148* stammt aus *Nostoc punctiforme*. Außer *crtZ*, welches unter der Kontrolle des *E. coli* Rhamnose-Promotors stand, wurde für die Expression aller anderen Gene der *tac*-Promotor verwendet. Für die verbesserte Bereitstellung der Isoprenoid-Vorstufen wurde der natürliche Promotor von *dxs* (1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase) durch einen starken Promotor des Phagen T5 ausgetauscht. Außerdem wurde eine zusätzliche Kopie von *idi* (Isopentenylpyrophosphat-Isomerase) chromosomal integriert. Die Expression von *idi* stand ebenfalls unter der Kontrolle des *tac*-Promotors.

Mit dem rekombinanten *E. coli* Stamm konnten in LB Medium ohne Induktorzugabe bis zu 6,16 mg/g Ztrm.  $\beta$ -Carotin produziert werden. Dies ist deutlich mehr als die mit dem hier vorgestellten System und *E. coli* JM109 produzierte Menge (1,07 mg/g Ztrm.  $\beta$ -Carotin) und in einer vergleichbaren Größenordnung wie die mit *E. coli* WA66.1  $\Delta xthA$  produzierte Menge (4,5 mg/g Ztrm. Lycopin).

Von Lemuth *et al.* (2011) wurde beobachtet, dass die zusätzliche chromosomale Integration von *crtW148* zu einer deutlichen Verringerung der Gesamtcarotinoid-Produktion führte. Es wurden 1,085 mg/g Ztrm. Canthaxanthin produziert, der Anteil von Canthaxanthin am Gesamtcarotinoid betrug 85 %. Neben Canthaxanthin waren auch noch 10 %  $\beta$ -Carotin und geringe Mengen des einfach modifizierten

Echinenons nachweisbar. Eine Verringerung der Carotinoid-Produktion durch die zusätzliche Expression von *crtW* von *Brevundimonas* sp. SD212 konnte in unserem System nicht beobachtet werden. Ferner konnte mit dem hier vorgestellten System  $\beta$ -Carotin vollständig zu Canthaxanthin umgesetzt werden. Das deutet darauf hin, dass *crtW* von *Brevundimonas* sp. SD212 besser für die Canthaxanthin-Produktion geeignet ist als *crtW148* von *N. punctiforme*. Mit beiden Systemen konnten vergleichbare Canthaxanthin-Ausbeuten erzielt werden.

Des Weiteren zeigten Lemuth *et al.* (2011), dass die balancierte Expression von *crtW148* und *crtZ* entscheidend für die erfolgreiche Produktion von Astaxanthin als einzigem Carotinoid war. Dies gelang ihnen durch die Kultivierung ihres rekombinanten *E. coli* Stammes in Minimalmedium mit Glucose und einer Induktion mit IPTG. Unter diesen Bedingungen wurde die Expression von *crtZ* reprimiert. Die sehr niedrige Basal-Expression von *crtZ* mit dem Rhamnose-Promotor (weniger als ein Transkript pro Zelle) reichte aus, um die von *CrtW148* produzierten Ketocarotinoide vollständig zu Astaxanthin umzusetzen. Auch in dem hier vorgestellten, Plasmid-basierten System brachte erst die stärkere Expression von *crtW* eine Erhöhung des Astaxanthin-Anteils auf 80 - 85 %. Die produzierten Astaxanthin-Mengen betragen mit beiden Systemen ca. 1,40 mg/g Ztrm.

Sowohl das Plasmid-basierte System als auch das Plasmid-freie System sind für die Produktion von Astaxanthin als Hauptcarotinoid geeignet. Bezüglich der Reinheit des produzierten Produktes ist das Plasmid-freie System dem hier vorgestellten Plasmid-basierten System überlegen. Allerdings limitierte die für die Astaxanthin-Produktion mit dem Plasmid-freien System notwendige Kultivierung in Minimalmedium die Gesamtproduktion im Schüttelkolben-Maßstab, weil hier wesentlich geringere Zelldichten erreicht werden können als in Vollmedium. Anders sähe es bei einer Fed-Batch Fermentation aus, hier wäre das Minimalmedium dem Vollmedium deutlich überlegen. Nur ein direkter Vergleich würde zeigen, mit welchem System im Großmaßstab die größere Astaxanthin-Ausbeute erzielt werden kann. Ein Vorteil des Plasmid-basierten Systems ist definitiv die größere Flexibilität, mit der es eingesetzt werden kann. Durch einfache Mobilisierung, z. B. mit *E. coli* S17-1, könnten die pBBR1MCS-2-basierten Carotinoid-Biosyntheseplasmide in nahezu alle Proteobakterien eingebracht und so für die Suche nach neuen Carotinoid-Produzenten genutzt werden.

### 5.1.2 Funktionelle Charakterisierung von Carotinoid-Biosyntheseenzymen

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung von unbekanntem Carotinoid-Biosyntheseenzymen. Für die Untersuchungen wurden das  $\alpha$ -Proteobakterium *Sphingopyxis alaskensis* RB2256 und das  $\gamma$ -Proteobakterium *Plesiocystis pacifica* SIR-1 ausgewählt. Über die Carotinoid-Biosyntheseenzyme der beiden Bakterienarten gab es bisher keine Veröffentlichungen.

Verwandte Arten von ***Sphingopyxis alaskensis* RB2256**, wie z. B. *Sphingomonas paucimobilis*, *Sphingomonas jaspsi*, *Sphingomonas echinoides* oder *Sphingomonas astaxanthinifaciens*, produzieren Nostoxanthin und Zeaxanthin oder Astaxanthin (Asker *et al.*, 2007a; Asker *et al.*, 2007b; Rowe *et al.*, 2000). Durch eine GenBank<sup>®</sup>-Suche, bei der mit Hilfe der Aminosäuresequenzen von bekannten Carotinoid-Biosyntheseenzymen das Genom von *S. alaskensis* RB2256 nach homologen Enzymen durchsucht wurde, konnten die mutmaßlichen Carotinoid-Biosynthesegene *crtE*, *crtB*, *crtI*, *crtY*, *crtZ* und *crtG* gefunden werden (Tab. 39, S. 116). Die Gene *crtI*, *crtY* und *crtG* liegen im Genom dicht beieinander, die Gene *crtE* und *crtZ* liegen von den übrigen Genen und voneinander getrennt vor (Abb. 27, S. 115). Mit Hilfe der gefundenen Carotinoid-Biosynthesegene von *S. alaskensis* RB2256 wurde abgeleitet, dass das Bakterium wahrscheinlich Nostoxanthin (Abb. 21, S. 107) produziert. Die HPLC-Analyse eines Extraktes von *S. alaskensis* RB2256 zeigte ein Hauptcarotinoid mit geringerer Retentionszeit als Zeaxanthin. In dem Massenspektrum der Substanz konnte ein schwaches *m/z*-Signal bei 601,1 gemessen werden, was mit der Masse des  $[M+H]^+$ -Ions von Nostoxanthin übereinstimmt. Auch die experimentell ermittelten Absorptionsmaxima des Hauptcarotinoids von *S. alaskensis* RB2256 stimmen mit den von Britton *et al.* (2004) angegebenen Daten für Nostoxanthin überein. Für eine zweifelsfreie Identifizierung der Substanz als Nostoxanthin wäre eine Analyse mittels NMR-Spektrometrie sinnvoll.

Für die Synthese von Nostoxanthin aus Zeaxanthin ist eine  $\beta$ -Endgruppen-C2,C2'-Hydroxylase notwendig (Abb. 21, S. 107). Das erste charakterisierte Enzym dieses Typs war *CrtG* von *Brevundimonas* sp. SD212 (Nishida *et al.*, 2005). Für die heterologe Produktion von Nostoxanthin mit *E. coli* JM109 wurde *crtG* von *Brevundimonas* sp. SD212 in den pBR322-basierten Vektor integriert. Für die Bestätigung der Identität des mutmaßlichen *crtG* von *S. alaskensis* RB2256 wurde

parallel auch dieses Gen in den pBR322-basierten Vektor integriert. Die beiden Vektoren wurden dann mit den pBBR1MCS-2-basierten Zeaxanthin-Biosynthesevektoren kombiniert. Die HPLC-Analyse der *E. coli* JM109 Extrakte zeigte, dass die Koexpression beider *crtG*-Gene mit den Zeaxanthin-Biosynthesegenen nicht zur Synthese eines Hauptproduktes, sondern zur Bildung von mindestens sechs verschiedenen Substanzen führte (Abb. 24, S. 110 und Abb. 30, S. 118). Durch die Aktivität von CrtG von *S. alaskensis* RB2256 wurden aus Zeaxanthin die gleichen Produkte gebildet wie durch CrtG von *Brevundimonas* sp. SD212. Dadurch konnte gezeigt werden, dass *crtG* von *S. alaskensis* RB2256 höchstwahrscheinlich eine  $\beta$ -Endgruppen-C2,C2'-Hydroxylase kodiert. Ferner konnte kein Unterschied zwischen den beiden Zeaxanthin-Biosynthesevektoren beobachtet werden. Das bedeutet, dass die CrtZ-Enzyme von *Pantoea ananatis* und *Brevundimonas* sp. SD212 prinzipiell gleichermaßen für die Synthese von Nostoxanthin geeignet sind.

Das Auftreten der zahlreichen Produkte, die hier bei der Koexpression von *crtG* von *Brevundimonas* sp. SD212 mit den Zeaxanthin-Biosynthesegenen beobachtet wurden, stimmt nicht mit den Ergebnissen von Nishida *et al.* (2005) überein. Sie maßen in einem vergleichbaren Experiment nur drei Produkte, die als Nostoxanthin, 2-Hydroxyzeaxanthin (Caloxanthin) und Zeaxanthin identifiziert wurden. Für CrtG von *Brevundimonas* sp. SD212 beschrieben Nishida *et al.* (2005) außerdem, dass das Enzym  $\beta$ -Carotin nicht als Substrat nutzen kann. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen konnten auch dies nicht bestätigen. Die Koexpression der  $\beta$ -Carotin-Biosynthesegene mit *crtG* von *Brevundimonas* sp. SD212 führte zur Synthese von vier Substanzen mit geringeren Retentionszeiten als  $\beta$ -Carotin (Abb. 31, S. 119). Die Untersuchungen mit CrtG von *S. alaskensis* RB2256 ergaben das gleiche Ergebnis (Abb. 31, S. 119). Tao *et al.* (2006b) zeigten für die CrtG-Enzyme von *Brevundimonas vesicularis* DC263 und *Brevundimonas aurantiaca* ATCC 15266 eine, wenn auch geringe Aktivität für  $\beta$ -Carotin. Die von Tao *et al.* (2006b) veröffentlichten HPLC-Chromatogramme ähnelten stark denen in Abb. 31 (S. 119). Die Substanz mit der geringsten Retentionszeit identifizierten sie als 2,2'-Dihydroxy- $\beta$ -carotin (Abb. 21, S. 107). Demnach könnte es sich bei der Substanz mit der geringsten Retentionszeit in Abb. 31 um 2,2-Dihydroxy- $\beta$ -carotin handeln. Bei einer der anderen Substanzen könnte es sich um

2-Hydroxy- $\beta$ -carotin handeln. Das Auftreten weiterer Produkte gibt Hinweise darauf, dass CrtG nicht ausschließlich  $\beta$ -Ring-2,2'-Hydroxylase-Aktivität hat. Die mangelnde Spezifität von CrtG kann daher als ein Grund für die unzureichende heterologe Produktion von Nostoxanthin identifiziert werden. Möglicherweise ist auch die unzureichende Umsetzung von 2,2'-Dihydroxy- $\beta$ -carotin und 2-Hydroxy- $\beta$ -carotin durch CrtZ ein limitierender Faktor für die Nostoxanthin-Produktion. In den Chromatogrammen der Proben der *E. coli* Stämme mit den Zeaxanthin-Biosynthesegenen und *crtG* waren die Signale der Produkte, die bei einer Umsetzung von  $\beta$ -Carotin durch CrtG entstehen, ebenfalls zu sehen (vgl. Abb. 24, S. 110 und Abb. 31, S. 119). Daher könnte es sein, dass die CrtZ-Enzyme diese Substanzen nicht als Substrate nutzen können. Vielleicht wäre es in diesem Zusammenhang sinnvoll, *crtG* schwächer und *crtZ* stärker zu exprimieren. Dadurch könnte mehr  $\beta$ -Carotin zunächst zu Zeaxanthin umgesetzt werden und dieses dann durch CrtG zu Nostoxanthin. Auch durch eine Entkopplung der Induktion der Genexpression von *crtG* und *crtZ* könnte versucht werden, zunächst Zeaxanthin zu synthetisieren und später CrtG für die Produktion von Nostoxanthin hinzuschalten.

Als zweites wurde das Genom des Myxobakteriums ***Plesiocystis pacifica* SIR-1** nach möglichen Carotinoid-Biosynthesegenen durchsucht. Von den erhaltenen Ergebnissen wurden die drei mutmaßlichen Gene *crtY*, *crtU* und *crtC* für die Untersuchungen ausgewählt. Die Gene wurden in den pBR322-basierten Vektor integriert und anschließend mit verschiedenen pBBR1MCS-2-basierten Carotinoid-Biosynthesevektoren kombiniert. Die von den entsprechenden *E. coli* JM109 Stämmen produzierten Carotinoide wurden mittels HPLC, Photometrie und Massenspektrometrie untersucht.

Das mutmaßliche *crtY* von *P. pacifica* SIR-1 ist in der Datenbank mit „lycopene cyclase, beta and epsilon“ annotiert. Alle bisher bekannten Carotinoide von Myxobakterien sind acyclisch oder monocyclisch, daher war in diesem Zusammenhang neben der Klärung der Frage darüber, ob es sich bei dem kodierten Enzym um eine  $\beta$ - oder  $\epsilon$ -Cyclase handelt auch die Klärung der Frage interessant, ob die Lycopin-Cyclase von *P. pacifica* SIR-1 eine Mono- oder Bicyclase ist. Die Kombination des mutmaßlichen *crtY* mit den Lycopin-Biosynthesegenen führte zur Bildung von  $\beta$ -Carotin als Hauptprodukt. Außerdem waren geringe Mengen des

monocyclischen  $\gamma$ -Carotins messbar. Bei CrtY von *P. pacifica* SIR-1 handelt es sich also um eine  $\beta$ -Cyclase. Im Gegensatz zu der Lycopin-Cyclase seines Verwandten *Myxococcus xanthus* (Iniesta *et al.*, 2008), handelt es sich bei der Lycopin-Cyclase von *P. pacifica* SIR-1 um eine Bicyclase.

Das mutmaßliche *crtU* von *P. pacifica* SIR-1 ist in der Datenbank als „hypothetical protein“ annotiert. Darüber hinaus ist es erwähnenswert, dass bei der Suche zwei homologe Enzyme gefunden wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur das Enzym mit der größeren Homologie zu CrtU von *Streptomyces griseus* untersucht. Das Gen *crtU* von *Streptomyces griseus* kodiert eine  $\beta$ -Carotin-Desaturase, die die Synthese von Isorenieratin (Abb. 33, S. 123) aus  $\beta$ -Carotin katalysiert (Krügel *et al.*, 1999). Die Kombination von *crtU* von *P. pacifica* SIR-1 mit den  $\beta$ -Carotin-Biosynthesegenen führte zur Bildung von Isorenieratin als einzigem Carotinoid. Dies bestätigte, dass es sich bei dem von *crtU* kodierten Enzym um eine  $\beta$ -Carotin-Desaturase handelt. Auch hier konnte beobachtet werden, dass das Enzym beide Moleküle von  $\beta$ -Carotin modifiziert.

Als drittes wurde das mutmaßliche *crtC* untersucht. In der Datenbank ist das Gen als „hydroxyneurosporene synthase“ annotiert. Für *crtC* von *Rhodobacter capsulatus* wurde gezeigt, dass das Gen eine  $\psi$ -Endgruppen-C1,C1'-Hydroxylase kodiert, mit der verschiedene acyclische und monocyclische Hydroxycarotinoide synthetisiert werden können (Albrecht *et al.*, 2000). Durch die Kombination von *crtC* mit den Lycopin-Biosynthesegenen wurden Hydroxylycopin und Dihydroxylycopin produziert, daher handelt es sich bei CrtC von *P. pacifica* SIR-1 wahrscheinlich ebenfalls um eine  $\psi$ -Endgruppen-C1,C1'-Hydroxylase. Wie auch CrtY und CrtU modifiziert CrtC beide Moleküle, wobei aber im Vergleich zu den beiden anderen Enzymen ein größerer Anteil an einseitig modifiziertem Carotinoid nachweisbar war.

Durch die Untersuchungen an *crtY*, *crtU* und *crtC* konnte gezeigt werden, dass die Gene eine Lycopin- $\beta$ -Cyclase,  $\beta$ -Carotin-Desaturase und  $\psi$ -Endgruppen-C1,C1'-Hydroxylase kodieren. Mit Hilfe der Enzyme können  $\beta$ -Carotin, Isorenieratin sowie Hydroxylycopin und Dihydroxylycopin synthetisiert werden. Interessant ist, dass alle drei Enzyme ihre Substrate zumindest zum Teil symmetrisch modifizieren. Das steht nicht unbedingt im Widerspruch zu der Tatsache, dass alle bis jetzt bekannten Carotinoide von Myxobakterien mono- oder acyclisch sind. Beispiels-

weise wurde für das Bakterium *Algoriphagus* sp. (*Cyclobacteriaceae*), welches ebenfalls monocyclische Carotinoide produziert, eine Bicyclaseaktivität für sein Enzym CrtYcd beschrieben (Tao *et al.*, 2006a). Es wurde vermutet, dass die Bildung von monocyclischen Carotinoiden in diesem Fall durch die Konkurrenz von verschiedenen modifizierenden Enzymen um das Lycopin-Substrat zu ihrer Bildung führt und nicht die spezifische Aktivität des einzelnen modifizierenden Enzyms. Das Vorhandensein von mehr oder weniger großen Mengen an einseitig modifizierten Carotinoiden weist darauf hin, dass die Modifikation der beiden Molekülen durch CrtY und CrtC sukzessiv erfolgt und kann als ein Hinweis darauf gewertet werden, dass eine Konkurrenz von verschiedenen modifizierenden Enzymreaktionen ein relevanter Faktor für die Carotinoid-Biosynthese in *P. pacifica* SIR-1 ist.

## 5.2 Produktionsstämme für Carotinoide

### 5.2.1 *Escherichia coli* JM109 und *Escherichia coli* WA66.1 $\Delta xthA$

Die Carotinoid-Ausbeuten mit *E. coli* JM109 waren im Vergleich zu den besten Literaturwerten relativ gering. Daher sollte zum einen ein anderer Stamm für die Produktion gefunden werden, mit dem höhere Ausbeuten erzielt werden können und zum anderen sollte die Ausbeute durch die Einbringung von Genen des Mevalonat-Weges von *Saccharomyces cerevisiae* gesteigert werden. Hierfür wurde das Plasmid pMevB verwendet (Martin *et al.*, 2003). Das Plasmid enthält die drei Gene *ERG12* (Mevalonat-Kinase), *ERG8* (Mevalonat-5-phosphat-Kinase) und *ERG19* (Mevalonat-5-pyrophosphat-Decarboxylase), deren Genprodukte die Umwandlung von Mevalonat in Isopentenylpyrophosphat katalysieren (Abb. 38, S. 130). Die Expression der Gene steht unter der Kontrolle des *lac*-Promotors. Da es sich bei dem Plasmid um ein pBBR1MCS-2-Derivat handelt und die bis dahin hergestellten Carotinoid-Biosynthesevektoren ebenfalls auf diesem Replikon basieren, wurde mit Hilfe des Lambda-Red Rekombinationssystems zunächst der Replikationsursprung und das Tetracyclin-Resistenzgen eines pBBR1MCS-2-basierten Lycopin-Biosynthesevektors durch den Replikationsursprung und das Kanamycin-Resistenzgen von pACYC177 (Replikon p15A) ausgetauscht (siehe

Kapitel 3.8.13). Mit dem hergestellten p15A-basierten Lycopin-Biosynthesevektor wurde die Carotinoid-Produktion mit *E. coli* JM109 untersucht. Es wurde festgestellt, dass während der Kultivierung des Stammes für die Lycopin-Produktion der pH-Wert der Kultur erheblich absank. Besonders stark war der Effekt ausgeprägt, wenn dem Medium Glycerin zugesetzt wurde (Tab. 44, S. 133). Durch die Zugabe von Natriumphosphatpuffer zum Medium konnte das Absinken des pH-Wertes abgemildert und gleichzeitig die Lycopin-Produktion gesteigert werden. Mit *E. coli* JM109 wurden in TB Medium bis zu 1,20 mg/g Ztrm. Lycopin produziert.

In der Literatur wurde beschrieben, dass *E. coli* bei Glucose-Überschuss und hohen Wachstumsraten Acetat produziert. Als Ursache wurde eine unter diesen Bedingungen auftretende Auslastung des oxidativen Stoffwechsels angegeben, bei der die Acetat-Bildung zur Energiegewinnung hinzugeschaltet wird (Han *et al.*, 1992). Durch eine Verringerung der Glucose-Aufnahme konnte die Bildung von Acetat vermindert und gleichzeitig die Expression von Membranproteinen verbessert werden (Backlund *et al.*, 2011; Han *et al.*, 1992). Diese Ergebnisse sind interessant, da es sich bei vielen Carotinoid-Biosyntheseenzymen ebenfalls um membrangebundene oder Transmembranproteine handelt (Stickforth und Sandmann, 2011; Yu *et al.*, 2010). Möglicherweise war eine Acetat-Bildung des Lycopin-produzierenden *E. coli* JM109 Stammes die Ursache für die Ansäuerung des Mediums. Für die Induktion der Genexpression der Lycopin-Biosynthesegene wurde L-Rhamnose verwendet. Dieser Zucker kann von *E. coli* JM109 als C-Quelle genutzt werden. Möglicherweise wurde der Nährstoffüberschuss in Anwesenheit von Glycerin noch zusätzlich erhöht und es kam dadurch zu einer noch stärkeren Bildung von Acetat. Dies würde erklären, warum der pH-Wert bei Anwesenheit von Glycerin noch stärker absank. Möglicherweise führte dies gleichzeitig zu einer Verschlechterung der Expression der Carotinoid-Biosynthesegene, was die geringere Lycopin-Ausbeute mit bedingt haben könnte.

Der *E. coli* Stamm WA66.1  $\Delta xthA$  ist aufgrund einer Deletion im L-Rhamnose-Operon nicht in der Lage diesen Zucker als C-Quelle zu verwerten. Es zeigte sich, dass die Nährmedien nach der Kultivierung des Stammes nicht wie bei *E. coli* JM109 sauer, sondern alkalisch waren (Tab. 44, S. 133). Mit dem Stamm konnte gleichzeitig eine größere Menge Lycopin produziert werden, in TB Medium wurden bis zu 4,5 mg/g Ztrm. Lycopin gemessen. Für eine Bestätigung der Vermutung,

dass die bessere Produktion von *E. coli* WA66.1  $\Delta xthA$  auf der Unfähigkeit zur L-Rhamnose-Verwertung beruht, müssten allerdings noch zusätzliche Untersuchungen angestellt werden. *E. coli* WA66.1  $\Delta xthA$  und *E. coli* JM109 unterscheiden sich noch durch weitere Eigenschaften voneinander als der Fähigkeit zur L-Rhamnose-Verwertung (siehe Tab. 6, S. 48), daher sollte unbedingt geprüft werden, ob tatsächlich diese Eigenschaft der entscheidende Unterschied zwischen den beiden Stämmen ist. Für die Interpretation der durch die Lycopin-Produktion verursachten Effekte auf *E. coli* JM109 wäre auch der Nachweis darüber, dass die Ansäuerung tatsächlich durch Acetat verursacht wird von wichtiger Bedeutung.

Durch die Kombination des p15A-basierten Lycopin-Biosynthesevektors mit pMevB und gleichzeitiger Mevalonat-Zugabe sollte die Produktion weiter gesteigert werden. Mit 1 mM Mevalonat und 0,1 mM IPTG konnten in TB Medium mit *E. coli* WA66.1  $\Delta xthA$  bis zu 11,4 mg/g Ztrm. Lycopin produziert werden. Die Zugabe von 5 mM Mevalonat führte zu einer Verringerung der Lycopin-Produktion auf 6,68 mg/g Ztrm. Lycopin. Auch die Zugabe von mehr als 0,1 mM IPTG wirkte sich negativ auf die Lycopin-Produktion aus.

Die mit dem hier vorgestellten System produzierten Lycopin-Mengen sind im Bereich der meisten Publikationen zu diesem Thema. Im Schüttelkolbenmaßstab wurden mit *E. coli* Ausbeuten zwischen 6 und 18 mg Carotinoid pro Gramm Zelltrockenmasse produziert (Alper *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2010; Jin und Stephanopoulos, 2007; Yuan *et al.*, 2006). Von Yoon *et al.* (2007a) wurden erheblich höhere Ausbeuten von bis zu 49,3 mg  $\beta$ -Carotin pro Gramm Zelltrockenmasse publiziert. Sie setzten ebenfalls ein Zwei-Plasmid-Expressionssystem ein. Das pBR322-basierte Plasmid wurde für die Expression von *idi* (*Haematococcus pluvialis*), *crtE*, *crtI*, *crtB* (*Pantoea agglomerans*) und *crtY* (*Pantoea ananatis*) benutzt. Das pACYC184-basierte Plasmid wurde für die Expression der Gene *mvaK1*, *mvaK2*, *mvaD* (*Streptococcus pneumoniae*) und *idi* (*E. coli*) benutzt. Die Expression der Gene stand unter der Kontrolle des *tac*- oder *lac*-Promotors. Es erfolgte keine Induktion der Genexpression (Toxizität). Als Produktionsstamm diente *E. coli* DH5 $\alpha$ . Die Kultivierung erfolgte in 2YT Medium mit 2,5 % (v/v) Glycerin und 16,5 mM Mevalonat (250 rpm, 29 °C, 6 Tage).

Vor allem die hohe Mevalonat-Konzentration konnte in dem hier getesteten System nicht eingesetzt werden, da es bereits bei Anwesenheit von 5 mM Mevalonat

zu einer Beeinträchtigung der Lycopin-Produktion kam. Als Ursache hierfür muss eine mangelnde Umwandlung von Mevalonat in Lycopin angenommen werden. Da die Gene *idi* und *ispA* in dem hier verwendeten System ebenfalls überexprimiert wurden und im Carotinoid-Biosyntheseoperon dem Promotor am nächsten liegen, sollte die Umwandlung von Isopentenylpyrophosphat in Dimethylallylpyrophosphat und die Synthese von Farnesylpyrophosphat nicht limitierend sein. In der Literatur wurde beschrieben, dass auch die Expression von *crtE* kritisch sein kann (Wang *et al.*, 1999) und *crtE* von *Pantoea agglomerans* besser für die Carotinoid-Produktion geeignet ist als *crtE* von *Pantoea ananatis* (Yoon *et al.*, 2007b). In dem hier verwendeten System wurde *crtE* von *Pantoea ananatis* eingesetzt. Möglicherweise ist die mangelnde Bildung von Geranylgeranylpyrophosphat und die dadurch bedingte intrazelluläre Anhäufung der Vorstufe Farnesylpyrophosphat die Ursache für die geringe Produktion. Daher wäre es für das hier etablierte System sinnvoll zu testen, ob eine stärkere Expression von *crtE* zu einer Steigerung der Lycopin-Produktion führt.

### 5.2.2 *Pseudomonas putida* KT2440

Die für einige *Pseudomonas putida* Stämme beschriebene Lösungsmitteltoleranz (Faizal *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 1993) führte zu der theoretischen Überlegung, dass diese Bakterienart besonders gut für die heterologe Produktion von hydrophoben Substanzen, wie Carotinoiden, geeignet sein könnte. Die im Rahmen dieser Arbeit angestellten Untersuchungen konnten dies jedoch nicht bestätigen. Bereits bei der Transformation von *Pseudomonas putida* KT2440 mit dem pBBR1MCS-2-basierten Lycopin-Biosynthesevektor traten Schwierigkeiten auf. Durch Konjugation mit Plasmid-tragenden *E. coli* S17 Stämmen und auch mittels Elektroporation konnten nur sehr wenige Transformanden erzeugt werden. Die wenigen erhaltenen Kolonien zeigten eine große Heterogenität bezüglich ihrer Phänotypen. Darüber hinaus wurden mutierte Plasmide aus den Transformanden isoliert. Die Beobachtungen legten die Vermutung nahe, dass die Carotinoid-Biosynthesevektoren auf *P. putida* KT2440 toxisch wirken. Für die Identifizierung des toxischen Intermediates wurden detaillierte Konjugationsstudien mit verschiedenen Plasmid-tragenden *E. coli* S17-1 Stämmen und *P. putida* KT2440 durchge-

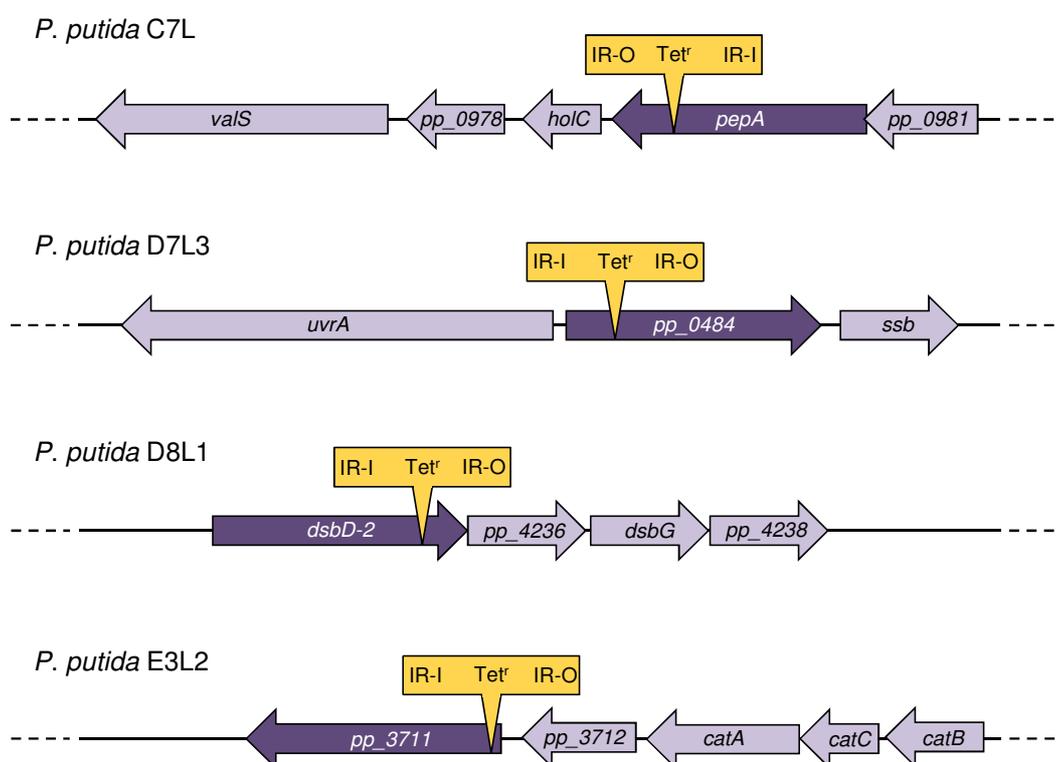
führt. Hierbei wurden Plasmide eingesetzt, die jeweils die Enzyme für einen individuellen Schritt des Lycopin-Biosyntheseweges kodieren. Es zeigte sich, dass die relative Transkonjuganden-Ausbeute des Lycopin-Biosynthesevektors im Vergleich zu allen anderen getesteten Vektoren drastisch reduziert war, wodurch Lycopin als das toxische Intermediat identifiziert werden konnte.

Durch eine Transposon-Mutagenese und Isolierung von Mutanten mit erhöhter Lycopin-Toleranz sollten Gene identifiziert werden, durch deren Inaktivierung die Toxizität von Lycopin reduziert werden kann. Hierbei konnten vier Mutanten isoliert werden (Abb. 82). Bei der Transposon-Mutante *P. putida* C7L integrierte das Mini-Tn5 in *pepA*. Dieses Gen kodiert für die Leucyl-Aminopeptidase PepA. Aminopeptidasen haben eine wichtige Funktion bei der Proteolyse von defekten und gealterten Proteinen. In *Pseudomonas aeruginosa* ist das PepA-Homolog, PhpA, an der Ausprägung der Virulenz und Zytotoxizität des Stammes beteiligt (Hauser *et al.*, 1998). Die Inaktivierung von *phpA* von *P. aeruginosa* führte zu einer verstärkten Transkription von *algD*, dem ersten Gen eines Operons, welches die Enzyme für die Produktion des Polysaccharides Alginate kodiert (Woolwine *et al.*, 2001).

Bei der Transposon-Mutante D7L3 integrierte das Mini-Tn5 in das Gen eines Proteins der Major Facilitator Superfamilie. Die Proteine dieser Superfamilie vermitteln sekundär aktiven Uniport, Symport oder Antiport von z. B. Ionen, Zuckern, Phosphaten, Aminosäuren oder Peptiden. Bei einer Blast-Suche der Aminosäure-Sequenz des Proteins PP\_0484 konnten in vielen Bakteriengattungen (z. B. *Pantoea*, *Yersinia*, *Azotobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*) homologe Proteine gefunden werden. Das homologe Protein in *E. coli* heißt YajR. Bisher gab es bezüglich YajR keine Publikationen.

Bei *P. putida* D8L1 ist das Gen *dsbD-2* von der Insertion des Mini-Tn5 betroffen. In *E. coli* vermitteln Dsb-Proteine die Bildung von Disulfid-Brücken, welche Bestandteil der Sekundärstruktur von periplasmatischen Proteinen sind. Hierbei kommt es zu einer sequenziellen Elektronenübertragung, indem die Disulfid-Gruppen der verschiedenen Dsb-Proteine oxidiert oder reduziert werden. DsbA knüpft die Disulfid-Brücken durch Oxidation der Sulfhydryl-Gruppen zweier Cystein-Reste des Zielproteins. Hierbei werden die Disulfid-Brücken von DsbA reduziert. Reduziertes DsbA wird durch das Membranprotein DsbB reoxidiert, welches die Elektronen weiter auf Chinone der inneren Membran überträgt und diese dadurch in

die Elektronentransportkette einschleust. Proteine, bei denen die Disulfid-Brücken fehlerhaft geknüpft wurden, werden von DsbC erkannt, welches die fehlerhaften Disulfid-Brücken reduziert und dadurch auflöst. Für die Regeneration von oxidiertem DsbC erhält dieses Elektronen von dem Transmembranprotein DsbD. DsbD wiederum erhält seine Elektronen von cytoplasmatischen Thioredoxin. Durch DsbD kommt es zu einem Elektronentransport über die Membran (Krupp *et al.*, 2001).



**Abb. 82:** Graphische Darstellung der Transposon-Integrationsorte von *Pseudomonas putida* KT2440 Mutanten mit erhöhter Lycopin-Toleranz.

Bei *P. putida* E3L2 integrierte das Mini-Tn5 in das Gen *pp\_3711*. Das kodierte Protein enthält die konservierten Domänen PAS, GGDEF und EAL. PAS-Domänen kommen in drei Gruppen von Proteinen vor: bei Sensor-Proteinen von Zwei-Komponenten-Systemen, bei transkriptionalen Aktivatoren (*Archaea* und *Eukaryota*) oder bei Ionenkanälen (*Eukaryota*). Die Sensor-Proteine dienen der

Messung von Licht, Sauerstoff oder dem Redox-Status der Zelle (Zhulin *et al.*, 1997). GGDEF-Domänen weisen eine Homologie zu Adenylyl-Cyclasen auf (Pei und Grishin, 2001). Zusammen mit EAL-Domänen sind sie an der Synthese und dem Abbau des globalen Second Messengers bis-(3',5')-cyclisches di-Guanosinmonophosphat (c-di-GMP) beteiligt, wobei die GGDEF-Domänen als c-di-GMP-Cyclase fungieren und EAL-Domänen als c-di-GMP-Phosphodiesterase (Simm *et al.*, 2004). c-di-GMP regelt den Übergang zwischen Sessilität und Motilität bei Bakterien (z. B. bei *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* und *Escherichia coli*). Ein hoher c-di-GMP-Spiegel aktiviert die Biosynthese von adhäsiven extrazellulären Matrixkomponenten, Exopolysacchariden sowie Fimbrien und trägt damit zu einer Erhöhung der Biofilmbildung bei. Ein niedriger c-di-GMP-Spiegel begünstigt dagegen die Motilität von Bakterien (Römling, 2007).

Die Mutationen der *P. putida* Transposon-Mutanten C7L und D7L3 wurden durch gezielte Gendeletion zunächst reproduziert und dann kombiniert. Die Reproduktion der Mutationen zeigte, dass mit den erhaltenen Deletionsmutanten bei Konjugation mit *E. coli* S17-1 pJOE5573.3 (Lycopin) im Vergleich zum *P. putida* Wildtyp deutlich höhere Transkonjugandenausbeuten erhalten werden konnten. Bei gleichzeitiger Deletion beider Gene konnte kein additiver Effekt bezüglich der Verbesserung der Lycopin-Verträglichkeit festgestellt werden. Obwohl mit der Transposon-Mutante *P. putida* D7L3 und der korrespondierenden Deletionsmutante *P. putida* 0484 bei Konjugation mit *E. coli* S17-1 pJOE5573.3 vergleichbare Transkonjuganden-Ausbeuten erhalten wurden, zeigten die durch gezielte Gendeletion erzeugte Mutante eine schlechtere Verträglichkeit für Lycopin. Die erhaltenen Transformandenkolonien der Deletionsmutante waren deutlich kleiner als die der Transposon-Mutante und wuchsen bei erneuter Kultivierung unter selektiven Bedingungen nur sehr schlecht oder aber gar nicht mehr. Auch die anderen, durch gezielte Gendeletion erzeugten Mutanten zeigten nach der Transformation mit dem Lycopin-Biosynthesevektor ein vergleichbar schlechtes Wachstum.

Möglicherweise wirkt sich die Inaktivierung des jeweiligen Gens durch Integration des Mini-Tn5 anders auf die Lycopin-Verträglichkeit aus als dessen Deletion. Denkbar wäre auch, dass die Transposon-Mutanten noch zusätzliche, unbekannte Mutationen haben, die bei der Selektion auf erhöhte Lycopin-Toleranz mitselektiert wurden. Oder aber es integrierte mehr als ein Transposon in das Chromosom der

Mutanten. Für die Bestimmung der Integrationsorte der Transposons wurde die chromosomale DNA verdaut und religiert. Die Transposons wurden als autonom replizierende Plasmide isoliert und der Integrationsort durch die Sequenzierung der dem Transposon benachbarten Sequenzen bestimmt (siehe Kapitel 4.2.2.3). Vielleicht wurde durch die Methode nur ein Integrationsort bestimmt, da nur ein jeweils ein Plasmid untersucht wurde.

Die Identifizierung der betroffenen Gene ermöglicht letztlich nur sehr begrenzte Rückschlüsse auf die Mechanismen, die der individuellen Reduktion der Lycopin-Toxizität zugrunde liegen. Drei von vier der betroffenen Gene kodieren für Membranproteine, von denen zwei einen Elektronen- oder Ionentransport über die Membran bewirken (DsbD und PP\_0483). Da Carotinoide ebenfalls in die Membran eingelagert werden, besteht hier möglicherweise ein Zusammenhang. Das Vorhandensein von Carotinoiden in der Membran verändert deren Fluidität (Strzalka und Gruszecki, 1994; Subczynski *et al.*, 1992) und Durchlässigkeit für verschiedene Verbindungen. Violaxanthin und Zeaxanthin verringerten beispielsweise die Durchlässigkeit von O<sub>2</sub> von Lipid-Doppelschichten (Subczynski *et al.*, 1991). Zeaxanthin und  $\beta$ -Carotin verringerten die Durchlässigkeit für Protonen in Digalactosyldiacylglycerin-Vesikeln (Berglund *et al.*, 1999).

Vielleicht verändert das eingelagerte Lycopin die Membranfluidität oder die Durchlässigkeit der Membran für bestimmte Stoffe in einer Weise, die für die Zellen toxisch ist. Lycopin könnte in der Membran auch mit bestimmten Proteinen oder Stoffwechselfvorgängen interagieren und dadurch toxisch wirken. Möglicherweise ist auch die Tatsache, dass es sich bei *P. putida* KT2440 um einen obligat aeroben Organismus handelt von Bedeutung. Im Gegensatz zu *E. coli*, welcher Lycopin wesentlich besser verträgt, kann *P. putida* KT2440 nicht auf einen anaeroben Stoffwechsel ausweichen, falls es zu einer Beeinträchtigung des oxidativen Stoffwechsels kommt. In diesem Zusammenhang wäre auch noch einmal auf die pH-Wert-Absenkung zu verweisen, welche bei der Lycopin-Produktion mit *E. coli* JM109 beobachtet wurde. Vielleicht trägt unter anderem auch Lycopin selbst durch eine Beeinträchtigung des oxidativen Stoffwechsels zu diesem Effekt bei.

### 5.3 Bakterielle Carotinoid-Oxygenasen

Mit Hilfe der Aminosäuresequenz der bereits charakterisierten Carotinoid-Oxygenase NosCCD des Cyanobakteriums *Nostoc* sp. PCC 7120 wurde eine Datenbanksuche nach bisher unbeschriebenen Carotinoid-Oxygenasen durchgeführt. Da es bisher noch keine Publikationen über die Carotinoid-Oxygenasen von Proteobakterien gab, wurden für die Untersuchungen das  $\alpha$ -Proteobakterium *Sphingopyxis alaskensis* RB2256 und das  $\gamma$ -Proteobakterium *Plesiocystis pacifica* SIR-1 ausgewählt.

In dem Genom von ***Sphingopyxis alaskensis* RB2256** wurden zwei mutmaßliche Carotinoid-Oxygenasegene gefunden. Beide Gene wurden amplifiziert und in einen pBR322-basierten Vektor mit L-Rhamnose-induzierbarem Promotor integriert. Für den Test auf Carotinoid-Spaltaktivität der Enzyme wurden die Plasmide mit den verschiedenen pBBR1MCS-2-basierten Carotinoid-Biosynthesevektoren kombiniert. Die Carotinoid-Spaltaktivität für ein bestimmtes Carotinoid wurde durch eine Verringerung der Farbintensitäten der Carotinoid-produzierenden *E. coli* JM109 Stämme identifiziert (siehe Kapitel 4.3.3). Bei den Stämmen, die *sala\_1008* koexprimierten konnten keinerlei Farbveränderungen festgestellt werden. Im Gegensatz dazu war bei allen Carotinoid-produzierenden *E. coli* JM109 Stämmen, die *sala\_1698* koexprimierten ein Farbverlust zu beobachten. Durch die Integration von *sala\_1698* in einen pBR322-basierten Vektor mit L-Arabinose-induzierbarem Promotor wurde die Induktion der Genexpression der Carotinoid-Biosynthesegene von der Induktion der Genexpression von *sala\_1698* entkoppelt. Durch detaillierte *in vivo* Studien konnte gezeigt werden, dass *Sala\_1698* Lycopin, Hydroxylycopin und Dihydroxylycopin spaltet. Allerdings konnten in den HPLC-Chromatogrammen keine zusätzlichen Peaks beobachtet werden, die den entstehenden Carotinoid-Spaltprodukten hätten zugeordnet werden können. Aufgrund des Nachweises der Spaltaktivität für Lycopin, konnte der Farbverlust von *E. coli* JM109 Stämmen, die Lycopin-basierte Carotinoide synthetisieren auf die Spaltung ihrer gemeinsamen Vorstufe zurückgeführt werden. Dies müsste allerdings noch durch weitere *in vivo* Studien zur Spaltung der entsprechenden Carotinoide durch *Sala\_1698* bestätigt werden. Eine in dieser Arbeit nicht dargestellte, aber bereits durchgeführte Untersuchung zur *in vivo* Spaltung von  $\beta$ -Carotin durch *Sala\_1698*

wies eindeutig darauf hin, dass das Carotinoid von dem Enzym nicht gespalten wird. Der  $\beta$ -Carotin-Gehalt blieb nach der Induktion der Genexpression von *sala\_1698* stabil (Messdaten nicht gezeigt).

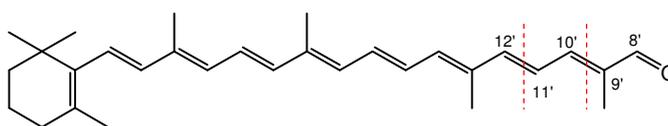
Für die weiteren Untersuchungen wurde eine Translationsfusion von *sala\_1698* mit *Strep*-tag<sup>®</sup>II hergestellt. Das markierte Enzym wurde mit *Strep*-Tactin<sup>®</sup> Sepharose aufgereinigt und für *in vitro* Studien eingesetzt. Für die *in vitro* Umsetzungen von Carotinoiden mussten diese wasserunlöslichen, hydrophoben Substanzen zunächst wasserlöslich gemacht werden. Als Methode wurde die Mizellierung mittels Detergenzien (*n*-Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid und Triton<sup>®</sup> X-100) angewendet (siehe Kapitel 3.10.2). Die Carotinoide wurden zunächst in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst und anschließend mit in Ethanol gelöstem Detergenz vermischt. Die Lösungsmittel wurden dann in der Vakuumzentrifuge verdampft und die erhaltenen Rückstände in Puffer dispergiert. Lycopin konnte mit dieser Methode nur unzureichend mizelliert werden. Dies war an einem Carotinoid-Niederschlag an der Reaktionsgefäßwand und der hellen Farbe der Mizellen-Puffer-Dispersion zu erkennen. Die mangelnde Mizellierung von Lycopin ist auch der wahrscheinlichste Grund dafür, dass die Spaltaktivität von *Sala\_1698* für Lycopin *in vitro* nicht bestätigt werden konnte. Möglicherweise war das Substrat *in vitro* für das Enzym nicht zugänglich und wurde daher nicht umgesetzt. Dieses Problem wurde auch in der Veröffentlichung von Scherzinger *et al.* (2010) beschrieben. Im Gegensatz zu Lycopin konnten Zeaxanthin,  $\beta$ -Carotin und Apo-8'-carotinal besser solubilisiert werden. Die Mizellen-Puffer-Dispersionen der drei Carotinoide waren intensiv gefärbt und es waren keine Carotinoid-Niederschläge an den Reaktionsgefäßwänden zu beobachten. Bei *in vitro* Umsetzungen der drei Carotinoide mit gereinigtem *Sala\_1698* war nur bei dem Ansatz mit Apo-8'-carotinal eine Farbveränderung zu beobachten.

Daher wurde die *in vitro* Umsetzung von Apo-8'-carotinal durch *Sala\_1698* genauer untersucht. Es zeigte sich, dass eine Erhöhung der Konzentration an freien Eisen-Ionen durch die Zugabe von FeSO<sub>4</sub> zum Inkubationspuffer die Umsatzrate von *Sala\_1698* für Apo-8'-carotinal erhöhte, wohingegen die Komplexbildung von freien Eisen-Ionen durch die Zugabe des Chelatbildners EDTA eine Verringerung der Umsatzrate bewirkte. Beide Effekte hängen höchstwahrscheinlich damit zusammen, dass *Sala\_1698*, wie andere Carotinoid-Oxygenasen

auch, ein Eisen-Ion im katalytischen Zentrum besitzt (Kloer *et al.*, 2005; Messing *et al.*, 2010). Das Temperaturoptimum von Sala\_1698 liegt zwischen 30 und 40 °C und somit eher in dem Bereich, der auch für die Carotinoid-Oxygenasen von Säugetieren bestimmt wurde (Kim *et al.*, 2011; Redmond *et al.*, 2001). Die Temperaturoptima von pflanzlichen Carotinoid-Oxygenasen liegen hingegen oft höher, beispielsweise wurde für eine Carotinoid-Oxygenase der Quitte (*Cydonia oblonga*) ein Temperaturoptimum von über 50 °C (Fleischmann *et al.*, 2002) bestimmt und für eine Carotinoid-Oxygenase der Sternfrucht (*Averrhoa carambola*) ein Optimum von 45 °C (Fleischmann *et al.*, 2003). Hinsichtlich des pH-Wertes konnte festgestellt werden, dass Sala\_1698 gegenüber alkalischen pH-Werten toleranter ist als gegenüber sauren. Von pH 7,0 bis pH 9,6 konnte keine Verringerung der Umsatzrate von Apo-8'-carotinal durch Sala\_1698 gemessen werden. In der Literatur wurden für die Carotinoid-Oxygenasen aus Säugetieren Optima von 7,8 bis 8,5 beschrieben (Fidge *et al.*, 1969; Kim *et al.*, 2011; Lakshmanan *et al.*, 1972). Bereits bei Erhöhung der jeweiligen pH-Werte um 0,5 wurden Verringerungen der Enzymaktivitäten gemessen. Im Gegensatz dazu wurde für Sala\_1698 eine gleichbleibende Aktivität über einen insgesamt größeren pH-Bereich und eine höhere Toleranz für alkalische pH-Werte beobachtet.

In den HPLC-Chromatogrammen der Apo-8'-carotinal-Umsetzungen konnten zwei zusätzliche Peaks mit geringeren Retentionszeiten als Apo-8'-carotinal beobachtet werden. Die massenspektrometrische und photometrische Analyse ergab, dass es sich um Apo-10'-carotinal und Apo-12'-carotinal handelt. Mit Hilfe der Spaltprodukte wurden die zwei Schnittpositionen an den 11'/12'- und 9'/10'-Doppelbindungen abgeleitet (Abb. 83). Mit Hilfe der durchgeführten Experimente konnte jedoch nicht zweifelsfrei geklärt werden, ob die beiden Spaltprodukte Apo-10'-carotinal und Apo-12'-carotinal durch eine sukzessive Spaltung von Apo-8'-carotinal bzw. Apo-10'-carotinal oder aber durch eine unpräzise Spaltung von Apo-8'-carotinal an der einen oder anderen Schnittposition entstehen. Aufgrund der Tatsache, dass für andere Carotinoid-Oxygenasen in der Literatur beschrieben wurde, dass diese ihre Substrate teilweise unpräzise spalten (Ilg *et al.*, 2009; Scherzinger *et al.*, 2010), kann für Sala\_1698 eine unpräzise Spaltung von Apo-8'-carotinal als wahrscheinlicher angenommen werden. Da der Peak des Spaltproduktes Apo-12'-carotinal in den HPLC-Chromatogrammen stets eine

größere Fläche hatte, als der Peak von Apo-10'-carotinal, kann man darüber hinaus feststellen, dass die Spaltung von Apo-8'-carotinal, so diese denn unpräzise erfolgt, bevorzugt an der 11'/12'-Doppelbindung geschieht.



**Abb. 83:** Schnittpositionen von Sala\_1698 für das Substrat Apo-8'-carotinal.

Bei den HPLC-Messungen konnte beobachtet werden, dass die Peaks der Spaltprodukte Apo-10'-carotinal und Apo-12'-carotinal bei Verlängerung der Inkubationszeit wieder kleiner wurden (Abb. 56, S. 165). Eine mögliche Ursache wäre eine weitere Umsetzung der Substanzen durch Sala\_1698 zu Verbindungen, die mit der angewendeten Analytik nicht nachweisbar waren. Eine in diesem Zusammenhang denkbare Spaltung durch Sala\_1698 an der nächsten Doppelbindung (13'/14') ist unwahrscheinlich, weil das dabei entstehende Spaltprodukt im HPLC-Chromatogramm sichtbar gewesen wäre. Das Chromophor von Apo-14'-carotinal ist dasselbe wie das der durch die Aktivität von Ppsir1\_15490 entstehenden Spaltprodukte, welche bei einer Wellenlänge von 450 nm noch sichtbar waren. Da aber das Absorptionsmaximum des Chromophors bei 400 nm liegt (Scherzinger *et al.*, 2010), wäre hier eine erneute Untersuchung mit angepasster Wellenlänge sinnvoll, um auch kleinere Mengen der Substanz detektieren zu können.

Auch eine Instabilität von Apo-10'-carotinal und Apo-12'-carotinal könnte die Ursache für die Verringerung ihrer Gehalte sein. In der Literatur wurde eine Instabilität von Apo-10'-carotinal bei *in vitro* Umsetzungen beschrieben (Kim *et al.*, 2011). Allerdings stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage nach der Ursache für die größere Stabilität von Apo-8'-carotinal. Die drei Substanzen Apo-8'-carotinal, Apo-10'-carotinal und Apo-12'-carotinal haben alle eine reaktive Aldehyd-Gruppe und unterscheiden sich nur hinsichtlich der Länge der Prenylketten. In der Kontrollprobe ohne Enzym konnte über Nacht keine messbare Verringerung des Apo-8'-carotinal-Gehaltes gemessen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich bei Sala\_1698 um eine Carotinoid-Oxygenase handelt, die monocyclische und acyclische Carotinoide spaltet. Es konnten singuläre Schnittpositionen an den 11'/12'- und 9'/10'-Doppelbindungen identifiziert werden. Die singuläre Spaltung von Carotinoiden an der 9'/10'-Doppelbindung wurde auch für Carotinoid-Oxygenasen aus Säugetieren und Pflanzen beschrieben (Kiefer *et al.*, 2001; Schwartz *et al.*, 2004). Singuläre Carotinoid-Spaltungen an der 11'/12'-Doppelbindung finden in Pflanzen bei der Abscisinsäure-Synthese statt, beispielsweise durch VP14 von *Zea mays* (Schwartz *et al.*, 1997). Bakterielle Carotinoid-Oxygenasen mit singulären 11'/12' oder 9'/10'-Schnittpositionen wurden bisher nicht beschrieben.

Bei dem von *S. alaskensis* RB2256 produzierten Hauptcarotinoid handelt es sich wahrscheinlich um das bicyclische Carotinoid Nostoxanthin. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach der Funktion von Sala\_1698 in *S. alaskensis* RB2256, die sehr wahrscheinlich nicht in einer Spaltung dieses Carotinoids besteht. Vielmehr könnte angenommen werden, dass die Spaltung von Nostoxanthin durch ein anderes Enzym geschieht und deren Spaltprodukte dann durch Sala\_1698 weiter gespalten werden. In dem Genom von *S. alaskensis* RB2256 wurde nur ein weiteres mögliches Carotinoid-Oxygenasegen gefunden, dessen Genprodukt bei den *in vivo* Tests mit *E. coli* JM109 keine Carotinoid-Spaltaktivität zeigte. Allerdings wurde die Spaltaktivität für Nostoxanthin nicht untersucht, da kein Nostoxanthin-produzierender *E. coli* JM109 Stamm zur Verfügung stand. Hier wären weiterführende Untersuchungen, z. B. *in vitro* Umsetzungen von Nostoxanthin, sinnvoll, um weitere Erkenntnisse über die Funktionen der beiden Enzyme in *S. alaskensis* RG2256 zu gewinnen.

In dem Genom von *Plesiocystis pacifica* SIR-1 konnten durch die Datenbank-suche ebenfalls zwei mutmaßliche Carotinoid-Oxygenasegene gefunden werden. Die Gene wurden in einen pBR322-basierten Vektor mit L-Rhamnose-induzierbarem Promotor integriert und mit den verschiedenen pBBR1MCS-2-basierten Carotinoid-Biosynthesevektoren kombiniert. Die Carotinoid-Spaltaktivität wurde durch den Farbverlust der betreffenden *E. coli* JM109 Stämme identifiziert. Die Koexpression von *ppsir1\_17230* führte bei keinem der getesteten Carotinoid-produzierenden *E. coli* JM109 Stämmen zu einer Verringerung der Farbintensität. Die Koexpression von *ppsir1\_15490* führte nur bei *E. coli* JM109 Stämmen zu

einem Farbverlust, die hydroxylierte Carotinoide produzierten. Auch *ppsir1\_15490* wurde in einen pBR322-basierten Vektor mit L-Arabinose-induzierbarem Promotor umklont, um die Induktion von dessen Genexpression von der Induktion der Carotinoid-Biosynthese zu entkoppeln. Detaillierte *in vivo* Messungen zur Spaltung von verschiedenen Carotinoiden konnten die Annahme bestätigen, dass Ppsir1\_15490 sowohl acyclische als auch bicyclische Carotinoid-Substrate mit Hydroxygruppen spaltet. Es wurde gezeigt, dass die C<sub>40</sub>-Carotinoide Zeaxanthin und Dihydroxylycopin sowie die C<sub>50</sub>-Carotinoide Sarcina- Sarpreno- und Decaprenoxanthin von Ppsir1\_15490 gespalten werden. In allen Fällen konnten in den HPLC-Chromatogrammen zusätzliche Peaks beobachtet werden, bei denen es sich wahrscheinlich um Spaltprodukte der Carotinoide handelt. Die Peaks der Spaltprodukte wurden mit zunehmender Kultivierungsdauer wieder kleiner. Auch von Jang *et al.*, 2011 wurde beobachtet, dass bei der Retinoid-Produktion mit *E. coli* ein beträchtlicher Teil der Carotinoid-Spaltprodukte intrazellulär abgebaut wurde. Daher könnte auch hier ein Abbau der Carotinoid-Spaltprodukte durch Enzyme von *E. coli* für deren geringe Ausbeuten verantwortlich sein. Darüber hinaus könnten die entstehenden Spaltprodukte instabil sein.

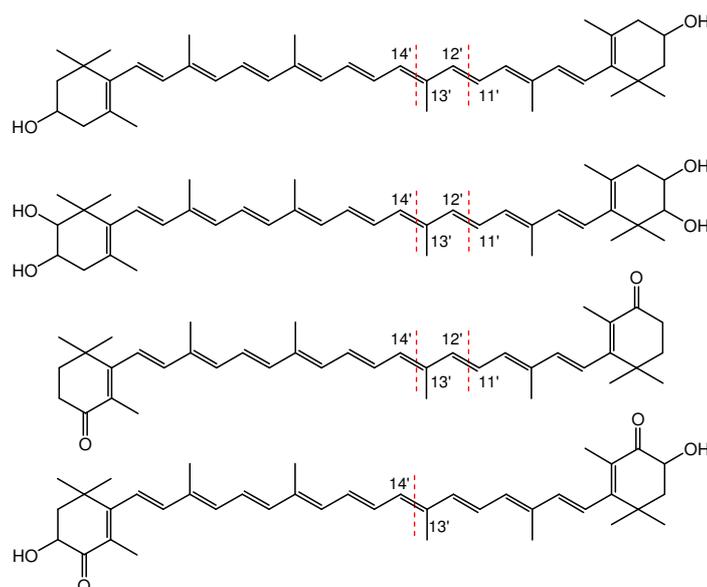
Die bei den *in vivo* Umsetzungen entstandenen Mengen an Carotinoid-Spaltprodukten reichten für massenspektrometrische Untersuchungen nicht aus. Für die Bereitstellung von größeren Mengen an Carotinoid-Spaltprodukten sollten mit *ppsir1\_15490 in vitro* Umsetzungen von Carotinoiden durchgeführt werden. Die SDS-PAGE-Analyse zeigte, dass das Gen in *E. coli* JM109 nur schwach exprimiert wird (Abb. 49, S. 154). Daher wurde zunächst die Expression von *ppsir1\_15490* verbessert. In der Literatur wurde beschrieben, dass das Vorhandensein von seltenen Codons im 5'-terminalen Sequenzbereich und deren spezifische Position die Genexpression maßgeblich beeinflussen können (Kim und Lee, 2006; Thangadurai *et al.*, 2008). Auch in der Nukleotidsequenz des GC-reichen Gens *ppsir1\_15490* konnten im 5'-terminalen Bereich für *E. coli* seltene Codons identifiziert werden. Daher wurde die jeweils dritte Base der ersten vier Codons nach dem Startcodon zufällig mutiert (siehe Kapitel 4.3.5.2). Die Identifizierung der generierten Mutationen, die die Verbesserung der Expression bedingten, zeigte, dass bei allen Codons ein Austausch von G- oder C-Nukleotiden gegen A- oder T-Nukleotide erfolgt war. Hierbei konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen den

durch die Mutagenese entstandenen Codons und der *E. coli* Codon Usage festgestellt werden. Vielmehr kann die generelle Erhöhung des AT-Gehaltes der Sequenz als Ursache für die Verbesserung der Expression angenommen werden.

Die unzentrifugierten Zellrohextrakte von *E. coli* JM109 Kulturen, die das hinsichtlich der Expression verbesserte *ppsir1\_15490mut* überexprimierten, zeigten keinerlei Carotinoid-Spaltaktivität. Die SDS-PAGE-Analyse ergab, dass das Protein in der unlöslichen Fraktion lokalisiert war. Da *in vivo* eine Spaltaktivität von Ppsir1\_15490 für verschiedene Carotinoide gemessen werden konnte, ist es unwahrscheinlich, dass die Bildung von Inclusion Bodies die Ursache für die fehlende Enzymaktivität war. Hierfür kommt eher eine Inaktivierung des Enzyms durch den Zellaufschluss als Erklärung in Frage. Die Lokalisierung in der unlöslichen Fraktion kann als ein Hinweis darauf aufgefasst werden, dass es sich bei Ppsir1\_15490 um ein membranständiges Enzym handelt. Die Gewinnung von größeren Mengen an Carotinoid-Spaltprodukten erfolgte hier durch Carotinoid-Umsetzungen mit *ppsir1\_15490mut*-überexprimierenden, ganzen Zellen von *E. coli* JM109. Dadurch konnten Spaltprodukte von Zeaxanthin, Nostoxanthin, Astaxanthin und Canthaxanthin gewonnen werden. Zusätzlich zu den Ergebnissen der *in vivo* Untersuchungen, durch die gezeigt werden konnte, dass Ppsir1\_15490 hydroxylierte Carotinoide umsetzt, konnte durch die Umsetzungen mit ganzen Zellen gezeigt werden, dass auch Substrate mit Ketogruppen (Canthaxanthin) oder mit Keto- und Hydroxygruppen (Astaxanthin) von Ppsir1\_15490 gespalten werden.

Die Spaltung von Dihydroxylycopin und den C<sub>50</sub>-Carotinoiden Sarcina-, Sarpreno und Decaprenoxanthin durch Ppsir1\_15490 konnte durch die Umsetzungen mit ganzen Zellen von *E. coli* JM109 nicht bestätigt werden. Es wurde bereits erwähnt, dass die Mizellierung von Lycopin nicht erfolgreich war und die *in vivo* gemessene Spaltaktivität von Sala\_1698 für Lycopin *in vitro* nicht bestätigt werden konnte. Hydroxylycopin und Dihydroxylycopin sind zwar deutlich polarer als Lycopin und die Mizellierung erfolgte etwas besser, war aber insgesamt immer noch nicht zufriedenstellend. Für die schlechte Umsetzung von Hydroxylycopin und Dihydroxylycopin könnte daher eine mangelnde Substrat-Verfügbarkeit verantwortlich sein. An der Mizellen-Puffer-Dispersion der C<sub>50</sub>-Carotinoide Sarcina-, Sarpreno- und Decaprenoxanthin war makroskopisch nichts auszusetzen, allerdings muss hier

berücksichtigt werden, dass diese Carotinoide sich deutlich von der Struktur der anderen eingesetzten C<sub>40</sub>-Carotinoide unterscheiden. Da *in vivo* eine Spaltaktivität für die drei C<sub>50</sub>-Carotinoide nachgewiesen wurde, ist auch hier eine mangelnde Substrat-Verfügbarkeit die wahrscheinlichste Ursache für die nicht erfolgte Spaltung durch Ppsir1\_15490 bei den Umsetzungen mit ganzen Zellen von *E. coli* JM109.



**Abb. 84:** Schnittpositionen von Ppsir1\_15490 für die Substrate (von oben nach unten) Zeaxanthin, Nostoxanthin, Canthaxanthin und Astaxanthin.

Die Carotinoid-Spaltprodukte von Zeaxanthin, Nostoxanthin, Canthaxanthin und Astaxanthin wurden mittels präparativer Dünnschichtchromatographie isoliert und massenspektrometrisch untersucht. Die identifizierten Spaltprodukte weisen übereinstimmend auf eine unpräzise Spaltung der Substrate Zeaxanthin, Nostoxanthin und Canthaxanthin an der 13'/14'- oder 11'/12'-Doppelbindung hin (Abb. 84). Das jeweils kleinste C<sub>15</sub>-Spaltprodukt konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Ein möglicher Grund hierfür ist die für die Detektion der Substanzen verwendete Wellenlänge. In Diethylether liegt das Absorptionsmaximum von Apo-11'-zeaxanthinal bei 300 nm (Maoka *et al.*, 2001). Die Messung erfolgte aber bei 400 nm, daher wären die C<sub>15</sub>-Spaltprodukte, sofern diese überhaupt mitisoliert wurden, im

UV/Vis-Chromatogramm nicht sichtbar gewesen. In diesem Zusammenhang wäre es sinnvoll die Messungen bei angepassten Parametern zu wiederholen.

Im Gegensatz zu Zeaxanthin, Nostoxanthin und Canthaxanthin konnte für das Substrat Astaxanthin nur eine Schnittposition an der 13'/14'-Doppelbindung identifiziert werden (Abb. 84). Der Unterschied zu den anderen Substraten zeigte sich auch bei den Umsetzungen mit ganzen Zellen, bei denen Astaxanthin am besten umgesetzt wurde. Anscheinend bedingt das gleichzeitige Vorhandensein von Hydroxy- und Ketogruppen die effizientere und präzisere Umsetzung durch Ppsir1\_15490.

Für Ppsir1\_15490 konnte hier gezeigt werden, dass das Enzym acyclische und bicyclische Carotinoid-Substrate mit Hydroxygruppen und/oder Ketogruppen spaltet. Neben C<sub>40</sub>-Carotinoiden setzt das Enzym auch C<sub>50</sub>-Carotinoide um. Die große Bandbreite an umgesetzten Substraten, die nur die Hydroxy- und/oder Ketogruppen gemeinsam haben ist dabei besonders bemerkenswert und ein im Vergleich zu allen anderen bisher beschriebenen Carotinoid-Oxygenasen für dieses Enzym einzigartiges Charakteristikum. Auch die identifizierten singulären Schnittpositionen sind ungewöhnlich. Eine singuläre Carotinoid-Spaltung an der 13'/14'-Doppelbindung wurde bisher nur für die Carotinoid-Oxygenase MtCCO von *Mycobacterium tuberculosis* (Scherzinger *et al.*, 2010) und die CCD8 von *Arabidopsis thaliana* (Schwartz *et al.*, 2004) beschrieben.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Adir N, Zer H, Shochat S und Ohad I (2003) Photoinhibition - a historical perspective. *Photosynth Res* 76, 343-370.
- Albermann C (2011) High versus low level expression of the lycopene biosynthesis genes from *Pantoea ananatis* in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett* 33, 313-319.
- Albrecht M, Takaichi S, Steiger S, Wang ZY und Sandmann G (2000) Novel hydroxycarotenoids with improved antioxidative properties produced by gene combination in *Escherichia coli*. *Nat Biotech* 18, 843-846.
- Alper H, Miyaoku K und Stephanopoulos G (2005) Construction of lycopene-overproducing *E. coli* strains by combining systematic and combinatorial gene knockout targets. *Nat Biotech* 23, 612-616.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW und Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403-410.
- Andersen PS, Smith JM und Mygind B (1992) Characterization of the *upp* gene encoding uracil phosphoribosyltransferase of *Escherichia coli* K12. *Eur J Biochem* 204, 51-56.
- Andrewes AG und Starr MP (1976) (3*R*,3'*R*)-astaxanthin from the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Phytochemistry* 15, 1009-1011.
- Antoine R und Locht C (1992) Isolation and molecular characterization of a novel broad-host-range plasmid from *Bordetella bronchiseptica* with sequence similarities to plasmids from gram-positive organisms. *Mol Microbiol* 6, 1785-1799.
- Armstrong GA (1997) Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colorful tale. *Annu Rev Microbiol* 51, 629-659.
- Armstrong KA, Acosta R, Ledner E, Machida Y, Pancotto M, McCormick M, Ohtsubo H und Ohtsubo E (1984) A  $37 \times 10^3$  molecular weight plasmid-encoded protein is required for replication and copy number control in the plasmid pSC101 and its temperature-sensitive derivative pHS1. *J Mol Biol* 175, 331-348.
- Arzneimittelfarbstoffverordnung AMFarbV von 17.10.2005. BGBl. I S3031, geändert durch Art. 8 G v. 17.07.2009 I 1990.

- Asker D, Beppu T und Ueda K (2007a) *Sphingomonas astaxanthinifaciens* sp. nov., a novel astaxanthin-producing bacterium of the family *Sphingomonadaceae* isolated from Misasa, Tottori, Japan. *FEMS Microbiol Lett* 273, 140-148.
- Asker D, Beppu T und Ueda K (2007b) *Sphingomonas jaspsi* sp. nov., a novel carotenoid-producing bacterium isolated from Misasa, Tottori, Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 1435-1441.
- Backlund E, Ignatushchenko M und Larsson G (2011) Suppressing glucose uptake and acetic acid production increases membrane protein overexpression in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* 10, 35.
- Balashov SP, Imasheva ES, Boichenko VA, Antón J, Wang JM und Lanyi JK (2005) Xanthorhodopsin: a proton pump with a light-harvesting carotenoid antenna. *Science* 309, 2061-2064.
- Balsalobre JM, Ruiz-Vazquez RM und Murillo FJ (1987) Light induction of gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 2359-2362.
- Barrero JM, Piqueras P, González-Guzmán M, Serrano R, Rodríguez PL, Ponce MR und Micol JL (2005) A mutational analysis of the *ABA1* gene of *Arabidopsis thaliana* highlights the involvement of ABA in vegetative development. *J Exp Bot* 56, 2071-2083.
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J und Wheeler DL (2008) GenBank. *Nucleic Acids Res* 36, D25-D30.
- Berglund AH, Nilsson R und Liljenberg C (1999) Permeability of large unilamellar digalactosyldiacylglycerol vesicles for protons and glucose - influence of alpha-tocopherol, beta-carotene, zeaxanthin and cholesterol. *Plant Physiol Biochem* 37, 179-186.
- Bertani G (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 62, 293-300.
- Beuttler H, Hoffmann J, Jeske M, Hauer B, Schmid RD, Altenbuchner J und Urlacher VB (2011) Biosynthesis of zeaxanthin in recombinant *Pseudomonas putida*. *Appl Microbiol Biotechnol* 89, 1137-1147.
- Blakley RL, Ramasastry BV und McDougall BM (1963) The biosynthesis of thymidylic acid. V. hydrogen isotope studies with dihydrofolic reductase and thymidylate synthetase. *J Biol Chem* 238, 3075-3079.
- Blasco F, Kauffmann I und Schmid RD (2004) CYP175A1 from *Thermus thermophilus* HB27, the first beta-carotene hydroxylase of the P450 superfamily. *Appl Microbiol Biotechnol* 64, 671-674.
- Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW, Crosa JH und Falkow S (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2, 95-113.

- Booker J, Auldrige M, Wills S, McCarty D, Klee H und Leyser O (2004) MAX3/CCD7 is a carotenoid cleavage dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signaling molecule. *Curr Biol* 14, 1232-1238.
- Bostock J, McAndrew B, Richards R, Jauncey K, Telfer T, Lorenzen K, Little D, Ross L, Handisyde N, Gatward I und Corner R (2010) Aquaculture: global status and trends. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365, 2897-2912.
- Bouvier F, D'Harlingue A und Camara B (1997) Molecular analysis of carotenoid cyclase inhibition. *Arch Biochem Biophys* 346, 53-64.
- Bouvier F, Dogbo O und Camara B (2003a) Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). *Science* 300, 2089-2091.
- Bouvier F, Suire C, Mutterer J und Camara B (2003b) Oxidative remodeling of chromoplast carotenoids: identification of the carotenoid dioxygenase *CsCCD* and *CsZCD* genes Involved in crocus secondary metabolite biogenesis. *Plant Cell* 15, 47-62.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Breitenbach J und Sandmann G (2005)  $\xi$ -Carotene *cis* isomers as products and substrates in the plant poly-*cis* carotenoid biosynthetic pathway to lycopene. *Planta* 220, 785-793.
- Breithaupt DE (2004) Simultaneous HPLC determination of carotenoids used as food coloring additives: applicability of accelerated solvent extraction. *Food Chem* 86, 449-456.
- Britton G, Liaaen-Jensen S und Pfander H (2004) Carotenoids Handbook, *Birkhäuser Verlag*, Basel, ISBN 3-7643-6180-8.
- Britton G, Liaaen-Jensen S und Pfander H (2008) Carotenoids Volume 4: Natural Functions, *Birkhäuser Verlag*, Basel, ISBN 3-7643-7498-3.
- Britton G, Liaaen-Jensen S und Pfander H (2009) Carotenoid Volume 5: Nutrition and Health, *Birkhäuser Verlag*, Basel, ISBN 978-3-7643-7501-0.
- Bröer S und Krämer R (1990) Lysine uptake and exchange in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* 172, 7241-7248.
- Brown DD, ICN Pharmaceuticals i, University of California LA und Molecular Biology Institute (1981) Developmental biology using purified genes, in ICN-UCLA Symposia on Developmental Biology. Vol. 23, *Academic Press*, New York, ISBN 0121374203.
- Carlson CA, Pierson LS, Rosen JJ und Ingraham JL (1983) *Pseudomonas stutzeri* and related species undergo natural transformation. *J Bacteriol* 153, 93-99.

- Carter GP und Gillam AE (1939) The isomerization of carotenes: reconsideration of the change beta-carotene to psialpha-carotene. *Biochem J* 33, 1325-1331.
- Cerdá-Olmedo E und Reau P (1970) Genetic classification of the lethal effects of various agents on heterokaryotic spores of *Phycomyces*. *Mutat Res* 9, 369-384.
- Chang AC und Cohen SN (1978) Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the p15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* 134, 1141-1156.
- Choi HS, Lee SY, Kim TY und Woo HM (2010) *In silico* identification of gene amplification targets for improvement of lycopene production. *Appl Environ Microbiol* 76, 3097-3105.
- Choi SK, Harada H, Matsuda S und Misawa N (2007) Characterization of two beta-carotene ketolases, CrtO and CrtW, by complementation analysis in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 75, 1335-1341.
- Chung CT, Niemela SL und Miller RH (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 2172-2175.
- Clark RJH, Rodley GA, Drake AF, Church RA und Zagalsky PF (1990) The carotenoproteins of the starfish *Linckia laevigata* (Echinodermata: Asteroidea): a resonance raman and circular dichroism study. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 95, 847-853.
- Cohen SS, Flaks JG, Barner HD, Loeb MR und Lichtenstein J (1958) The mode of action of 5-Fluorouracil and its derivatives. *Proc Natl Acad Sci USA* 44, 1004-1012.
- Compeau G, Al Achi BJ, Platsouka E und Levy SB (1988) Survival of rifampin-resistant mutants of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* in soil systems. *Appl Environ Microbiol* 54, 2432-2438.
- Datsenko KA und Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 6640-6645.
- Del Campo J, García-González M und Guerrero M (2007) Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 74, 1163-1174.
- Dennis JJ und Sokol PA (1995) Electrotransformation of *Pseudomonas*. *Methods Mol Biol* 47, 125-133.
- Disch A, Hemmerlin A, Bach TJ und Rohmer M (1998) Mevalonate-derived isopentenyl diphosphate is the biosynthetic precursor of ubiquinone prenyl side chain in tobacco BY-2 cells. *Biochem J* 331, 615-621.

- Eggersdorfer, M, Adam, G, John, M, Hähnlein, W, Labler, L, Baldenius, KU, von dem Bussche-Hünnefeld, L, Hilgemann, E, Hoppe, P, Stürmer, R, Weber, F, Rüttimann, A, Moine, G, Hohmann, HP, Kurth, R, Paust, J, Hähnlein, W, Pauling, H, Weimann, B-J, Kaesler, B, Oster, B, Fichtel, U, Kaiser, K, de Potzoli, B, Casutt, M, Koppe, T, Schwarz, M, Weimann, BJ, Hengartner, U, de Saizieu, A, Wehrli, C und Blum, R (2000) Kapitel Vitamins in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, ISBN 9783527306732.
- Ernst H (2002) Recent advances in industrial carotenoid synthesis. *Pure Appl Chem* 74, 1369-1382.
- Estrada AF, Brefort T, Mengel C, Díaz-Sánchez V, Alder A, Al-Babili S und Avalos J (2009) *Ustilago maydis* accumulates  $\beta$ -carotene at levels determined by a retinal-forming carotenoid oxygenase. *Fungal Genet Biol* 46, 803-813.
- Faizal I, Dozen K, Hong C, Kuroda A, Takiguchi N, Ohtake H, Takeda K, Tsunekawa H und Kato J (2005) Isolation and characterization of solvent-tolerant *Pseudomonas putida* strain T-57, and its application to biotransformation of toluene to cresol in a two-phase (organic-aqueous) system. *J Ind Microbiol Biotechnol* 32, 542-547.
- Fernández-Sevilla JM, Ación Fernández FG und Molina Grima E (2010) Biotechnological production of lutein and its applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 86, 27-40.
- Fidge NH, Smith FR und Goodman DS (1969) Vitamin A and carotenoids. The enzymic conversion of beta-carotene into retinal in hog. *Biochem J* 114, 689-694.
- Fleischmann P, Studer K und Winterhalter P (2002) Partial purification and kinetic characterization of a carotenoid cleavage enzyme from quince fruit (*Cydonia oblonga*). *J Agric Food Chem* 50, 1677-1680.
- Fleischmann P, Watanabe N und Winterhalter P (2003) Enzymatic carotenoid cleavage in star fruit (*Averrhoa carambola*). *Phytochemistry* 63, 131-137.
- Fox DL (1955) Astaxanthin in the American Flamingo. *Nature* 175, 916-917.
- Franklin FC, Bagdasarian M, Bagdasarian MM und Timmis KN (1981) Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta cleavage pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 7458-7462.
- Fraser PD, Misawa N, Linden H, Yamano S, Kobayashi K und Sandmann G (1992) Expression in *Escherichia coli*, purification, and reactivation of the recombinant *Erwinia uredovora* phytoene desaturase. *J Biol Chem* 267, 19891-19895.
- Global Industry Analysts, Inc. (2010) Internetquelle, 15.08.11, 16:41 MEZ. [http://www.strategyr.com/Carotenoids\\_Market\\_Report.asp](http://www.strategyr.com/Carotenoids_Market_Report.asp)

- Graf N und Altenbuchner J (2011) Development of a method for markerless gene deletion in *Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol* 77, 5549-5552.
- Graham JE und Bryant DA (2009) The biosynthetic pathway for myxol-2' fucoside (myxoxanthophyll) in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *J Bacteriol* 191, 3292-3300.
- Han K, Lim HC und Hong J (1992) Acetic acid formation in *Escherichia coli* fermentation. *Biotechnol Bioeng* 39, 663-671.
- Harada J, Nagashima KVP, Takaichi S, Misawa N, Matsuura K und Shimada K (2001) Phytoene desaturase, CrtI, of the purple photosynthetic bacterium, *Rubrivivax gelatinosus*, produces both neurosporene and lycopene. *Plant Cell Physiol* 42, 1112-1118.
- Hasan N, Koob M und Szybalski W (1994) *Escherichia coli* genome targeting I. Cre-lox-mediated in vitro generation of *ori* plasmids and their in vivo chromosomal integration and retrieval. *Gene* 150, 51-56.
- Hauser AR, Kang PJ und Engel JN (1998) PepA, a secreted protein of *Pseudomonas aeruginosa*, is necessary for cytotoxicity and virulence. *Mol Microbiol* 27, 807-818.
- Hausmann A und Sandmann G (2000) A single five-step desaturase is involved in the carotenoid biosynthesis pathway to  $\beta$ -carotene and torulene in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* 30, 147-153.
- Hencken H (1992) Chemical and Physiological Behavior of Feed Carotenoids and Their Effects on Pigmentation. *Poult Sci* 71, 711-717.
- Higuchi R, Krummel B und Saiki RK (1988) A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res* 16, 7351-7367.
- Horbach S, Sahm H und Welle R (1993) Isoprenoid biosynthesis in bacteria: Two different pathways? *FEMS Microbiol Lett* 111, 135-140.
- Hu KQ, Liu C, Ernst H, Krinsky NI, Russell RM und Wang XD (2006) The biochemical characterization of ferret carotene-9',10'-monooxygenase catalyzing cleavage of carotenoids *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* 281, 19327-19338.
- Hundle BS, Beyer P, Kleinig H, Englert G und Hearst JE (1991) Carotenoids of *Erwinia herbicola* and an *Escherichia coli* HB101 strain carrying the *Erwinia herbicola* carotenoid gene cluster. *Photochem Photobiol* 54, 89-93.
- Iizuka T, Jojima Y, Fudou R, Hiraishi A, Ahn JW und Yamanaka S (2003) *Plesiocystis pacifica* gen. nov., sp. nov., a marine myxobacterium that contains dihydrogenated menaquinone, isolated from the Pacific coasts of Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* 53, 189-195.

- Ilg A, Beyer P und Al Babili S (2009) Characterization of the rice carotenoid cleavage dioxygenase 1 reveals a novel route for geranial biosynthesis. *FEBS J* 276, 736-747.
- Inbaraj BS, Lu H, Hung CF, Wu WB, Lin CL und Chen BH (2008) Determination of carotenoids and their esters in fruits of *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC-DAD-APCI-MS. *J Pharm Biomed Anal* 47, 812-818.
- Iniesta AA, Cervantes M und Murillo FJ (2007) Cooperation of two carotene desaturases in the production of lycopene in *Myxococcus xanthus*. *FEBS J* 274, 4306-4314.
- Iniesta AA, Cervantes M und Murillo FJ (2008) Conversion of the lycopene monocyclase of *Myxococcus xanthus* into a bicyclase. *Appl Microbiol Biotechnol* 79, 793-802.
- IUPAC Commission on Nomenclature of Organic Chemistry und IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1975) Report of IUPAC Commission on Nomenclature of Organic Chemistry and IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature - Nomenclature of Carotenoids (Rules Approved 1974). *Pure Appl Chem* 41, 405-431.
- Iwata-Reuyl D, Math SK, Desai SB und Poulter CD (2003) Bacterial phytoene synthase: molecular cloning, expression, and characterization of *Erwinia herbicola* phytoene synthase. *Biochemistry* 42, 3359-3365.
- Jang HJ, Yoon SH, Ryu HK, Kim JH, Wang CL, Kim JY, Oh DK und Kim SW (2011) Retinoid production using metabolically engineered *Escherichia coli* with a two-phase culture system. *Microb Cell Fact* 10, 59.
- Jansen R, Nowak A, Kunze B, Reichenbach H und Hofle G (1995) Four new carotenoids from *Polyangium fumosum* (Myxobacteria) - 3,3',4,4'-tetrahydro-1,1',2,2'-tetrahydro-1,1'-dihydroxy- $\psi,\psi$ -carotene (di-*O*-demethylspirilloxanthin), its  $\beta$ -glucoside and glucoside fatty acid esters. *Liebigs Annalen*, 873-876.
- Jeske M und Altenbuchner J (2010) The *Escherichia coli* rhamnose promoter rhaP(BAD) is in *Pseudomonas putida* KT2440 independent of Crp-cAMP activation. *Appl Microbiol Biotechnol* 85, 1923-1933.
- Jin YS und Stephanopoulos G (2007) Multi-dimensional gene target search for improving lycopene biosynthesis in *Escherichia coli*. *Metab Eng* 9, 337-347.
- Jüttner F und Höflacher B (1985) Evidence of  $\beta$ -carotene 7,8 (7',8') oxygenase ( $\beta$ -cyclocitral, crocetindial generating) in *Microcystis*. *Arch Microbiol* 141, 337-343.
- Karrer P, Helfenstein A, Widmer R und van Itallie T (1929) Über Bixin. (XIII. Mitteilung über Pflanzenfarbstoffe.). *Helv Chim Acta* 12, 741-756.
- Karrer P und Salomon H (1927) Über Pflanzenfarbstoffe III. Zur Kenntnis der Safranfarbstoffe I. *Helv Chim Acta* 10, 397-405.

- Kiefer C, Hessel S, Lampert JM, Vogt K, Lederer MO, Breithaupt DE und von Lintig J (2001) Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A. *J Biol Chem* 276, 14110-14116.
- Kim S und Lee SB (2006) Rare codon clusters at 5'-end influence heterologous expression of archaeal gene in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 50, 49-57.
- Kim SH, Park YH, Schmidt-Dannert C und Lee PC (2010a) Redesign, reconstruction, and directed extension of the *Brevibacterium linens* C40 carotenoid pathway in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 76, 5199-5206.
- Kim YS, Park CS und Oh DK (2010b) Retinal production from  $\beta$ -carotene by  $\beta$ -carotene 15,15'-dioxygenase from an unculturable marine bacterium. *Biotechnology Letters* 32, 957-961.
- Kim YS, Yeom SJ und Oh DK (2011) Production of  $\beta$ -apo-10'-carotenal from  $\beta$ -carotene by human  $\beta$ -carotene-9',10'-oxygenase expressed in *E. coli*. *Biotechnology Letters* 33, 1195-1200.
- Kim YS, Lee JH, Kim NH, Yeom SJ, Kim SW und Oh DK (2011) Increase of lycopene production by supplementing auxiliary carbon sources in metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 90, 489-497.
- Kirilovsky D (2007) Photoprotection in cyanobacteria: the orange carotenoid protein (OCP)-related non-photochemical-quenching mechanism. *Photosynth Res* 93, 7-16.
- Kleinig H und Reichenbach H (1973) A new carotenoid glucoside ester from *Chondromyces apiculatus*. *Phytochemistry* 12, 2483-2485.
- Kleinig H, Reichenbach H und Achenbach H (1970) Carotenoid pigments of *Stigmatella aurantiaca* (Myxobacterales). II. Acylated carotenoid glucosides. *Arch Mikrobiol* 74, 223-234.
- Klenow H und Henningsen I (1970) Selective elimination of the exonuclease activity of the deoxyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* B by limited proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 65, 168-175.
- Kloer DP, Ruch S, Al-Babili S, Beyer P und Schulz GE (2005) The Structure of a Retinal-Forming Carotenoid Oxygenase. *Science* 308, 267-269.
- Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM und Peterson KM (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166, 175-176.
- Krubasik P, Kobayashi M und Sandmann G (2001) Expression and functional analysis of a gene cluster involved in the synthesis of decaprenoxanthin reveals the mechanisms for C50 carotenoid formation. *Eur J Biochem* 268, 3702-3708.

- Krügel H, Krubasik P, Weber K, Saluz HP und Sandmann G (1999) Functional analysis of genes from *Streptomyces griseus* involved in the synthesis of isorenieratene, a carotenoid with aromatic end groups, revealed a novel type of carotenoid desaturase. *Biochim Biophys Acta* 1439, 57-64.
- Krupp R, Chan C und Missiakas D (2001) DsbD-catalyzed transport of electrons across the membrane of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 276, 3696-3701.
- Kuhn R und Lederer E (1931) Zerlegung des Carotins in seine Komponenten. (Über das Vitamin des Wachstums, I. Mitteilung). *Ber dtsch Chem Ges A/B* 64, 1349-1357.
- Kuhn R und Lederer E (1933) Über die Farbstoffe des Hummers (*Astacus gammarus* L.) und ihre Stammsubstanz, das Astacin. *Ber dtsch Chem Ges A/B* 66, 488-495.
- Kuhn R und Winterstein A (1931) Viola-xanthin, das Xanthophyll des gelben Stiefmütterchens (*Viola tricolor*) (über konjugierte Doppelbindungen, XVI.). *Ber dtsch Chem Ges A/B* 64, 326-332.
- Kuhn R und Winterstein A (1934) Über die Konstitution des Pikro-crocins und seine Beziehung zu den Carotin-Farbstoffen des Safrans. *Ber dtsch Chem Ges A/B* 67, 344-357.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lakshmanan MR, Chansang H und Olson JA (1972) Purification and properties of carotene 15,15'-dioxygenase of rabbit intestine. *J Lipid Res* 13, 477-482.
- Lee PC, Mijts BN und Schmidt-Dannert C (2004) Investigation of factors influencing production of the monocyclic carotenoid torulene in metabolically engineered *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 65, 538-546.
- Lee PC und Schmidt-Dannert C (2002) Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 60, 1-11.
- Lee SY und Rasheed S (1990) A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA. *Biotechniques* 9, 676-679.
- Lemuth K, Steuer K und Albermann C (2011) Engineering of a plasmid-free *Escherichia coli* strain for improved *in vivo* biosynthesis of astaxanthin. *Microb Cell Fact* 10, 29-40.
- Levy Y, Kaplan M, Ben Amotz A und Aviram M (1996) Effect of dietary supplementation of beta-carotene on human monocyte-macrophage-mediated oxidation of low density lipoprotein. *Isr J Med Sci* 32, 473-478.

- Li J, Zhu D, Niu J, Shen S und Wang G (2011) An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol Adv* 29, 568-574.
- Liaaen-Jensen S, Hertzberg S, Weeks OB und Schwieter U (1968) Bacterial carotenoids XXVII. C50-carotenoids. 3. Structure determination of dehydrogenans-P439. *Acta Chem Scand* 22, 1171-1186.
- Livny O, Kaplan I, Reifen R, Polak-Charcon S, Madar Z und Schwartz B (2002) Lycopene inhibits proliferation and enhances gap-junction communication of KB-1 human oral tumor cells. *J Nutr* 132, 3754-3759.
- Macpherson AN, Telfer A, Barber J und Truscott TG (1993) Direct detection of singlet oxygen from isolated Photosystem II reaction centres. *Biochim Biophys Acta* 1143, 301-309.
- Makino T, Harada H, Ikenaga H, Matsuda S, Takaichi S, Shindo K, Sandmann G, Ogata T und Misawa N (2008) Characterization of cyanobacterial carotenoid ketolase CrtW and hydroxylase CrtR by complementation analysis in *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiol* 49, 1867-1878.
- Mantzouridou F, Naziri E und Tsimidou MZ (2008) Industrial glycerol as a supplementary carbon source in the production of  $\beta$ -carotene by *Blakeslea trispora*. *J Agric Food Chem* 56, 2668-2675.
- Maoka T, Fujiwara Y, Hashimoto K und Akimoto N (2001) Isolation of a series of apocarotenoids from the fruits of the red paprika *Capsicum annum* L. *J Agric Food Chem* 49, 1601-1606.
- Marasco EK, Vay K und Schmidt-Dannert C (2006) Identification of carotenoid cleavage dioxygenases from *Nostoc* sp. PCC 7120 with different cleavage activities. *J Biol Chem* 281, 31583-31593.
- Maresca JA und Bryant DA (2006) Two genes encoding new carotenoid-modifying enzymes in the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *J Bacteriol* 188, 6217-6223.
- Marshall JH und Wilmoth GJ (1981) Pigments of *Staphylococcus aureus*, a series of triterpenoid carotenoids. *J Bacteriol* 147, 900-913.
- Martin VJ, Pitera DJ, Withers ST, Newman JD und Keasling JD (2003) Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nat Biotechnol* 21, 796-802.
- Masamoto K, Wada H, Kaneko T und Takaichi S (2001) Identification of a gene required for *cis*-to-*trans* carotene isomerization in carotenogenesis of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol* 42, 1398-1402.

- Mathews-Roth MM (1993) Carotenoids in erythropoietic protoporphyria and other photosensitivity diseases. *Ann N Y Acad Sci* 691, 127-138.
- Matos HR, Capelozzi VL, Gomes OF, Mascio PD und Medeiros MHG (2001) Lycopene inhibits DNA damage and liver necrosis in rats treated with ferric nitrilotriacetate. *Arch Biochem Biophys* 396, 171-177.
- Matsumura H, Takeyama H, Kusakabe E, Burgess JG und Matsunaga T (1997) Cloning, sequencing and expressing the carotenoid biosynthesis genes, lycopene cyclase and phytoene desaturase, from the aerobic photosynthetic bacterium *Erythrobacter longus* sp. strain Och101 in *Escherichia coli*. *Gene* 189, 169-174.
- Matthews PD und Wurtzel ET (2000) Metabolic engineering of carotenoid accumulation in *Escherichia coli* by modulation of the isoprenoid precursor pool with expression of deoxyxylulose phosphate synthase. *Appl Microbiol Biotechnol* 53, 396-400.
- McCollum EV (1967) The paths to the discovery of vitamins A and D. *J Nutr* 91, 11-16.
- Mendes AFS, Chen C, Gmitter FG, Moore GA und Costa MGC (2011) Expression and phylogenetic analysis of two new lycopene  $\beta$ -cyclases from *Citrus paradisi*. *Physiol Plant* 141, 1-10.
- Messing SAJ, Gabelli SB, Echeverria I, Vogel JT, Guan JC, Tan BC, Klee HJ, McCarty DR und Amzel LM (2010) Structural insights into maize viviparous14, a key enzyme in the biosynthesis of the phytohormone abscisic acid. *Plant Cell* 22, 2970-2980.
- Miki W, Otaki N, Yokoyama A, Izumida H und Shimidzu N (1994) Okadaxanthin, a novel C50-carotenoid from a bacterium, *Pseudomonas* sp. KK10206C associated with marine sponge, *Halichondria okadae*. *Experientia* 50, 684-686.
- Misawa N, Nakagawa M, Kobayashi K, Yamano S, Izawa Y, Nakamura K und Harashima K (1990) Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 172, 6704-6712.
- Misawa N, Yamano S und Ikenaga H (1991) Production of beta-carotene in *Zymomonas mobilis* and *Agrobacterium tumefaciens* by introduction of the biosynthesis genes from *Erwinia uredovora*. *Appl Environ Microbiol* 57, 1847-1849.
- Miura Y, Kondo K, Shimada H, Saito T, Nakamura K und Misawa N (1998) Production of lycopene by the food yeast, *Candida utilis* that does not naturally synthesize carotenoid. *Biotechnol Bioeng* 58, 306-308.

- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G und Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-273.
- Nakamura Y, Gojobori T und Ikemura T (2000) Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Res* 28, 292-
- Namitha KK, Archana SN und Negi PS (2011) Expression of carotenoid biosynthetic pathway genes and changes in carotenoids during ripening in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Food Funct* 2, 168-173.
- Nelson KE, Weinel C, Paulsen IT, Dodson RJ, Hilbert H, Martins dS, V, Fouts DE, Gill SR, Pop M, Holmes M, Brinkac L, Beanan M, DeBoy RT, Daugherty S, Kolonay J, Madupu R, Nelson W, White O, Peterson J, Khouri H, Hance I, Chris LP, Holtzapple E, Scanlan D, Tran K, Moazzez A, Utterback T, Rizzo M, Lee K, Kosack D, Moestl D, Wedler H, Lauber J, Stjepandic D, Hoheisel J, Straetz M, Heim S, Kiewitz C, Eisen JA, Timmis KN, Dusterhoft A, Tummeler B und Fraser CM (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* 4, 799-808.
- Netzer R, Stafsnes MH, Andreassen T, Goksoyr A, Bruheim P und Brautaset T (2010) Biosynthetic pathway for gamma-cyclic sarcinaxanthin in *Micrococcus luteus*: heterologous expression and evidence for diverse and multiple catalytic functions of C50 carotenoid cyclases. *J Bacteriol* 192, 5688-5699.
- Neutraceuticals World (2010) Internetquelle, 15.08.11, 16:54 MEZ.  
[http://www.nutraceuticalsworld.com/contents/view\\_online-exclusives/2010-12-13/the-carotenoid-market-beyond-beta-carotene/](http://www.nutraceuticalsworld.com/contents/view_online-exclusives/2010-12-13/the-carotenoid-market-beyond-beta-carotene/)
- Nielsen DR, Leonard E, Yoon SH, Tseng HC, Yuan C und Prather KL (2009) Engineering alternative butanol production platforms in heterologous bacteria. *Metab Eng* 11, 262-273.
- Nishida Y, Adachi K, Kasai H, Shizuri Y, Shindo K, Sawabe A, Komemushi S, Miki W und Misawa N (2005) Elucidation of a carotenoid biosynthesis gene cluster encoding a novel enzyme, 2,2'-beta-hydroxylase, from *Brevundimonas* sp. strain SD212 and combinatorial biosynthesis of new or rare xanthophylls. *Appl Environ Microbiol* 71, 4286-4296.
- Nishizaki T, Tsuge K, Itaya M, Doi N und Yanagawa H (2007) Metabolic engineering of carotenoid biosynthesis in *Escherichia coli* by ordered gene assembly in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* 73, 1355-1361.
- Oesterhelt D und StoECKENIUS W (1973) Functions of a new photoreceptor membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 70, 2853-2857.
- Ohkuma K, Lyon JL, Addicott FT und Smith OE (1963) Abscisin II, an abscission-accelerating substance from young cotton fruit. *Science* 142, 1592-1593.

- Olaizola M (2000) Commercial production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using 25,000-liter outdoor photobioreactors. *J Appl Phycol* 12, 499-506.
- Osawa A, Harada H, Choi SK, Misawa N und Shindo K (2011) Production of caloxanthin 3'-beta-d-glucoside, zeaxanthin 3,3'-beta-d-diglucoside, and nostoxanthin in a recombinant *Escherichia coli* expressing system harboring seven carotenoid biosynthesis genes, including *crtX* and *crtG*. *Phytochemistry* 72, 711-716.
- Paulsen IT, Press CM, Ravel J, Kobayashi DY, Myers GS, Mavrodi DV, DeBoy RT, Seshadri R, Ren Q, Madupu R, Dodson RJ, Durkin AS, Brinkac LM, Daugherty SC, Sullivan SA, Rosovitz MJ, Gwinn ML, Zhou L, Schneider DJ, Cartinhour SW, Nelson WC, Weidman J, Watkins K, Tran K, Khouri H, Pierson EA, Pierson LS, Thomashow LS und Loper JE (2005) Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nat Biotechnol* 23, 873-878.
- Pegklidou K, Mantzouridou F und Tsimidou MZ (2008) Lycopene production using *Blakeslea trispora* in the presence of 2-methyl imidazole: yield, selectivity, and safety aspects. *J Agric Food Chem* 56, 4482-4490.
- Pei J und Grishin NV (2001) GGDEF domain is homologous to adenylyl cyclase. *Proteins* 42, 210-216.
- Pelz A, Wieland KP, Putzbach K, Hentschel P, Albert K und Götz F (2005) Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 280, 32493-32498.
- Polgár A und Zechmeister L (1943) Action of cold concentrated hydriodic acid on carotenes: structure and *cis-trans*-isomerization of some reaction products. *J Am Chem Soc* 65, 1528-1534.
- Prado-Cabrero A, Estrada AF, Al-Babili S und Avalos J (2007a) Identification and biochemical characterization of a novel carotenoid oxygenase: elucidation of the cleavage step in the *Fusarium* carotenoid pathway. *Mol Microbiol* 64, 448-460.
- Prado-Cabrero A, Scherzinger D, Avalos J und Al-Babili S (2007b) Retinal biosynthesis in fungi: characterization of the carotenoid oxygenase CarX from *Fusarium fujikuroi*. *Eukaryot Cell* 6, 650-657.
- Prieto A, Canavate PJ und García-González M (2011) Assessment of carotenoid production by *Dunaliella salina* in different culture systems and operation regimes. *J Biotechnol* 151, 180-185.
- Ramos-Gonzalez MI, Ben Bassat A, Campos MJ und Ramos JL (2003) Genetic engineering of a highly solvent-tolerant *Pseudomonas putida* strain for biotransformation of toluene to p-hydroxybenzoate. *Appl Environ Microbiol* 69, 5120-5127.

- Redmond TM, Gentleman S, Duncan T, Yu S, Wiggert B, Gantt E und Cunningham FX (2001) Identification, expression, and substrate specificity of a mammalian  $\beta$ -carotene 15,15'-dioxygenase. *J Biol Chem* 276, 6560-6565.
- Renstrøm B, Borch G, Skulberg OM und Liaaen-Jensen S (1981) Optical purity of (3S,3'S)-astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Phytochemistry* 20, 2561-2564.
- Renstrøm B, Rønneberg H, Borch G und Liaaen-Jensen S (1982) Animal carotenoids-27. Further studies on the carotenoproteins crustacyanin and ovooverdin. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 71, 249-252.
- Rodríguez-Sáiz M, de la Fuente J und Barredo J (2010) *Xanthophyllomyces dendrorhous* for the industrial production of astaxanthin. *Appl Microbiol Biotechnol* 88, 645-658.
- Rohmer M, Knani M, Simonin P, Sutter B und Sahn H (1993) Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J* 295, 517-524.
- Römling U (2007) c-di-GMP - ein neuer sekundärer Botenstoff in Bakterien. *Biospektrum* 2, 134-136.
- Rowe NJ, Tunstall J, Galbraith L und Wilkinson SG (2000) Lipid composition and taxonomy of *Pseudomonas echinoides*: transfer to the genus *Sphingomonas*. *Microbiology* 146, 3007-3012.
- Ruch S, Beyer P, Ernst H und Al-Babili S (2005) Retinal biosynthesis in Eubacteria: *in vitro* characterization of a novel carotenoid oxygenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol Microbiol* 55, 1015-1024.
- Russell WC (1936) Chemical nature of the vitamins. *Sigma Xi Quarterly* 24, 6-8.
- Ryvarden L und Jensen SL (1964) Bacterial Carotenoids XIV. Carotenoids of *Rhodospirillum rubrum*. *Acta Chem Scand* 18, 643-654.
- Sambrook J, Fritsch EF und Maniatis T (1989) Molecular cloning a laboratory manual. 2nd ed, *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor, N.Y, ISBN 0879693096.
- Scherzinger D und Al-Babili S (2008) *In vitro* characterization of a carotenoid cleavage dioxygenase from *Nostoc* sp. PCC 7120 reveals a novel cleavage pattern, cytosolic localization and induction by highlight. *Mol Microbiol* 69, 231-244.
- Scherzinger D, Ruch S, Kloer DP, Wilde A und Al-Babili S (2006) Retinal is formed from apo-carotenoids in *Nostoc* sp. PCC7120: *in vitro* characterization of an apo-carotenoid oxygenase. *Biochem J* 398, 361-369.

- Scherzinger D, Scheffer E, Bär C, Ernst H und Al-Babili S (2010) The *Mycobacterium tuberculosis* ORF Rv0654 encodes a carotenoid oxygenase mediating central and excentric cleavage of conventional and aromatic carotenoids. *FEBS J* 277, 4662-4673.
- Schmidt-Dannert C, Umeno D und Arnold FH (2000) Molecular breeding of carotenoid biosynthetic pathways. *Nat Biotech* 18, 750-753.
- Schwartz SH, Qin X und Loewen MC (2004) The biochemical characterization of two carotenoid cleavage enzymes from *Arabidopsis* indicates that a carotenoid-derived compound inhibits lateral branching. *J Biol Chem* 279, 46940-46945.
- Schwartz SH, Qin X und Zeevaart JAD (2001) Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants. *J Biol Chem* 276, 25208-25211.
- Schwartz SH, Tan BC, Gage DA, Zeevaart JAD und McCarty DR (1997) Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science* 276, 1872-1874.
- Seto H, Watanabe H und Furihata K (1996) Simultaneous operation of the mevalonate and non-mevalonate pathways in the biosynthesis of isopentenyl diphosphate in *Streptomyces aerioouvifer*. *Tetrahedron Lett* 37, 7979-7982.
- Sharp PA, Sugden B und Sambrook J (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12, 3055-3063.
- Shimada H, Kondo K, Fraser PD, Miura Y, Saito T und Misawa N (1998) Increased carotenoid production by the food yeast *Candida utilis* through metabolic engineering of the isoprenoid pathway. *Appl Environ Microbiol* 64, 2676-2680.
- Simm R, Morr M, Kader A, Nimtz M und Romling U (2004) GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol* 53, 1123-1134.
- Simon R, Prifer U und Puhler A (1983) A broad range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Nat Biotechnol* 1, 784-791.
- Skerra A und Schmidt TG (1999) Applications of a peptide ligand for streptavidin: the *Strep*-tag. *Biomol Eng* 16, 79-86.
- Stenström CM und Isaksson LA (2002) Influences on translation initiation and early elongation by the messenger RNA region flanking the initiation codon at the 3' side. *Gene* 288, 1-8.
- Stephan S, Heinzle E, Wenzel SC, Krug D, Müller R und Wittmann C (2006) Metabolic physiology of *Pseudomonas putida* for heterologous production of myxochromide. *Process Biochemistry* 41, 2146-2152.

- Stern KG und Salomon K (1937) Ovoverdin, a pigment chemically related to visual purple. *Science* 86, 310-311.
- Stickforth P und Sandmann G (2011) Structural and kinetics properties of a mutated phytoene desaturase from *Rubrivivax gelatinosus* with modified product specificity. *Arch Biochem Biophys* 505, 118-122.
- Stickforth P, Steiger S, Hess WR und Sandmann G (2003) A novel type of lycopene  $\epsilon$ -cyclase in the marine cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* MED4. *Arch Microbiol* 179, 409-415.
- Strzalka K und Gruszecki WI (1994) Effect of beta-carotene on structural and dynamic properties of model phosphatidylcholine membranes. I. An EPR spin label study. *Biochim Biophys Acta* 1194, 138-142.
- Stumpp T, Wilms B und Altenbuchner J (2000) Ein neues, L-Rhamnose-induzierbares Expressionssystem für *Escherichia coli*. *Biospektrum* 1, 33-36.
- Subczynski WK, Markowska E und Siewewiesiuk J (1991) Effect of polar carotenoids on the oxygen diffusion-concentration product in lipid bilayers. An EPR spin label study. *Biochim Biophys Acta* 1068, 68-72.
- Sujak A, Gabrielska J, Grudzinski W, Borc R, Mazurek P und Gruszecki WI (1999) Lutein and Zeaxanthin as protectors of lipid membranes against oxidative damage: the structural aspects. *Arch Biochem Biophys* 371, 301-307.
- Takano H, Obitsu S, Beppu T und Ueda K (2005) Light-induced carotenogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2): identification of an extracytoplasmic function sigma factor that directs photodependent transcription of the carotenoid biosynthesis gene cluster. *J Bacteriol* 187, 1825-1832.
- Takano H, Kondo M, Usui N, Usui T, Ohzeki H, Yamazaki R, Washioka M, Nakamura A, Hoshino T, Hakamata W, Beppu T und Ueda K (2011) Involvement of CarA/LitR and CRP/FNR family transcriptional regulators in light-induced carotenoid production in *Thermus thermophilus*. *J Bacteriol* 193, 2451-2459.
- Tao L, Picataggio S, Rouvière PE und Cheng Q (2004) Asymmetrically acting lycopene  $\beta$ -cyclases (CrtLm) from non-photosynthetic bacteria. *Mol Genet Genomics* 271, 180-188.
- Tao L, Yao H, Kasai H, Misawa N und Cheng Q (2006a) A carotenoid synthesis gene cluster from *Algoriphagus* sp. KK10202C with a novel fusion-type lycopene beta-cyclase gene. *Mol Genet Genomics* 276, 79-86.
- Tao L, Rouvière PE und Cheng Q (2006b) A carotenoid synthesis gene cluster from a non-marine *Brevundimonas* that synthesizes hydroxylated astaxanthin. *Gene* 379, 101-108.

- Telfer A, Bishop SM, Phillips D und Barber J (1994a) Isolated photosynthetic reaction center of photosystem II as a sensitizer for the formation of singlet oxygen. Detection and quantum yield determination using a chemical trapping technique.  
*J Biol Chem* 269, 13244-13253.
- Telfer A, Dhimi S, Bishop SM, Phillips D und Barber J (1994b)  $\beta$ -Carotene quenches singlet oxygen formed by isolated photosystem II reaction centers.  
*Biochemistry* 33, 14469-14474.
- Terao J, Minami Y und Bando N (2011) Singlet molecular oxygen-quenching activity of carotenoids: relevance to protection of the skin from photoaging.  
*J Clin Biochem Nutr* 48, 57-62.
- Thangadurai C, Suthakaran P, Barfal P, Anandaraj B, Pradhan SN, Ramalingam S und Murugan V (2008) Rare codon priority and its position specificity at the 5' of the gene modulates heterologous protein expression in *Escherichia coli*.  
*Biochem Biophys Res Commun* 376, 647-652.
- Tiemann F und Krüger P (1893) Über Veilchenaroma.  
*Ber Dtsch Chem Ges* 26, 2675-2708.
- Vancanneyt M, Schut F, Snauwaert C, Goris J, Swings J und Gottschal JC (2001) *Sphingomonas alaskensis* sp. nov., a dominant bacterium from a marine oligotrophic environment. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 73-79.
- Verhoef S, Wierckx N, Westerhof RG, de Winde JH und Ruijsenaars HJ (2009) Bioproduction of p-hydroxystyrene from glucose by the solvent-tolerant bacterium *Pseudomonas putida* S12 in a two-phase water-decanol fermentation. *Appl Environ Microbiol* 75, 931-936.
- Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln zu technologischen Zwecken. Anlage 1 (zu § 3 Abs. 1 und § 7). 29. Januar 1998. FNA: 2125-40-71/1.
- Verwaal R, Wang J, Meijnen JP, Visser H, Sandmann G, van den Berg JA und van Ooyen AJJ (2007) High-level production of  $\beta$ -carotene in *Saccharomyces cerevisiae* by successive transformation with carotenogenic genes from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Appl Environ Microbiol* 73, 4342-4350.
- Verzeichnis der zugelassenen Futtermittel-Zusatzstoffe, veröffentlicht gemäß Artikel 9t Buchstabe b) der Richtlinie 70/524/EWG des Rates über Zusatzstoffe in der Tierernährung. ABl. C 50 vom 25. Februar 2004.
- Wang Cw, Oh MK und Liao JC (1999) Engineered isoprenoid pathway enhances astaxanthin production in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 62, 235-241.
- Weber FJ, Ooijkaas LP, Schemen RM, Hartmans S und de Bont JA (1993) Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to high concentrations of styrene and other organic solvents. *Appl Environ Microbiol* 59, 3502-3504.

- Weeks OB und Garner RJ (1967) Biosynthesis of carotenoids in *Flavobacterium dehydrogenans* Arnaudi. *Arch Biochem Biophys* 121, 35-49.
- Wertz K, Siler U und Goralczyk R (2004) Lycopene: modes of action to promote prostate health. *Arch Biochem Biophys* 430, 127-134.
- Willstätter R und Escher HH (1910) Über den Farbstoff der Tomate. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 64, 47-61.
- Woolwine SC, Sprinkle AB und Wozniak DJ (2001) Loss of *Pseudomonas aeruginosa* PhpA aminopeptidase activity results in increased *algD* transcription. *J Bacteriol* 183, 4674-4679.
- Wu Z, Robinson DS, Hughes RK, Casey R, Hardy D und West SI (1999) Co-oxidation of beta-carotene catalyzed by soybean and recombinant pea lipoxygenases. *J Agric Food Chem* 47, 4899-4906.
- Yamaguchi M (1957) On Carotenoids of a Sponge "*Reniera japonica*". *Bull Chem Soc Jpn* 30, 111-114.
- Yamano S, Ishii T, Nakagawa M, Ikenaga H und Misawa N (1994) Metabolic engineering for production of  $\beta$ -carotene and lycopene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotechnol Biochem* 58, 1112-1114.
- Yan W, Jang GF, Haeseleer F, Esumi N, Chang J, Kerrigan M, Campochiaro M, Campochiaro P, Palczewski K und Zack DJ (2001) Cloning and characterization of a human  $\beta,\beta$ -carotene-15,15'-dioxygenase that is highly expressed in the retinal pigment epithelium. *Genomics* 72, 193-202.
- Yanisch-Perron C, Vieira J und Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.
- Yeh SL und Hu ML (2003) Oxidized  $\beta$ -carotene inhibits gap junction intercellular communication in the human lung adenocarcinoma cell line A549. *Food Chem Toxicol* 41, 1677-1684.
- Yen HC und Marrs B (1976) Map of genes for carotenoid and bacterichlorophyll biosynthesis in *Rhodospseudomonas capsulata*. *J Bacteriol* 126, 619-629.
- Yoon SH, Lee YM, Kim JE, Lee SH, Lee JH, Kim JY, Jung KH, Shin YC, Keasling JD und Kim SW (2006) Enhanced lycopene production in *Escherichia coli* engineered to synthesize isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate from mevalonate. *Biotechnol Bioeng* 94, 1025-1032.
- Yoon SH, Park HM, Kim JE, Lee SH, Choi MS, Kim JY, Oh DK, Keasling JD und Kim SW (2007a) Increased  $\beta$ -carotene production in recombinant *Escherichia coli* harboring an engineered isoprenoid precursor pathway with mevalonate addition. *Biotechnol Prog* 23, 599-605.

- Yoon SH, Kim JE, Lee SH, Park HM, Choi MS, Kim JY, Lee SH, Shin YC, Keasling J und Kim SW (2007b) Engineering the lycopene synthetic pathway in *E. coli* by comparison of the carotenoid genes of *Pantoea agglomerans* and *Pantoea ananatis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 74, 131-139.
- Yu Q, Schaub P, Ghisla S, Al Babili S, Krieger-Liszka A und Beyer P (2010) The lycopene cyclase CrtY from *Pantoea ananatis* (formerly *Erwinia uredovora*) catalyzes an FADred-dependent non-redox reaction. *J Biol Chem* 285, 12109-12120.
- Yuan LZ, Rouvière PE, LaRossa RA und Suh W (2006) Chromosomal promoter replacement of the isoprenoid pathway for enhancing carotenoid production in *E. coli*. *Metab Eng* 8, 79-90.
- Zagalsky P (2003)  $\beta$ -Crustacyanin, the blue-purple carotenoprotein of lobster carapace: consideration of the bathochromic shift of the protein-bound astaxanthin. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59, 1529-1531.
- Zechmeister L (1944) Cis-trans isomerization and stereochemistry of carotenoids and diphenyl-polyenes. *Chem Rev* 34, 267-344.
- Zechmeister L und Cholnoky L (1927) Untersuchungen über den Paprika-Farbstoff. I. *Justus Liebigs Ann Chem* 454, 54-71.
- Zechmeister L, LeRosen AL, Schroeder WA, Polgár A und Pauling L (1943) Spectral characteristics and configuration of some stereoisomeric carotenoids including prolycopene and pro- $\gamma$ -carotene. *J Am Chem Soc* 65, 1940-1951.
- Zechmeister L und Tuzson P (1939) Umkehrbare Isomerisierung von Carotinoiden durch Jod-Katalyse. *Ber dtsh Chem Ges A/B* 72, 1340-1346.
- Zhang X, Zhao We, Hu L, Zhao L und Huang J (2011) Carotenoids inhibit proliferation and regulate expression of peroxisome proliferators-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) in K562 cancer cells. *Arch Biochem Biophys* 512, 96-106.
- Zhu X, Suzuki K, Saito T, Okada K, Tanaka K, Nakagawa T, Matsuda H und Kawamukai M (1997) Geranylgeranyl pyrophosphate synthase encoded by the newly isolated gene GGPS6 from *Arabidopsis thaliana* is localized in mitochondria. *Plant Mol Biol* 35, 331-341.
- Zhulin IB, Taylor BL und Dixon R (1997) PAS domain S-boxes in *Archaea*, *Bacteria* and sensors for oxygen and redox. *Trends Biochem Sci* 22, 331-333.

