Biosynthese von Carotinoiden mittels rekombinanten Mikroorganismen

Von der Fakultät Chemie
der Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines Doktors
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

vorgelegt von
Holger Beuttler
geboren in Böblingen

Hauptberichter: Professor Dr. Bernhard Hauer
Mitberichter: Professorin Dr. Vlada Urlacher

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Oktober 2010

Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart

2010

Erklärung

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

Stuttgart, den 18. Juni 2010

Holger Beuttler

Danksagung ***V***

Abkürzungen ***VII***

1 Zusammenfassung ***1***

2 Summary ***4***

3 Einleitung ***7***

3.1 Synthetische Biologie und Systembiologie **7**

3.2 *Pseudomonas* sp. und *Pseudomonas putida* **8**
3.2.1 *Pseudomonas putida* 8
3.2.2 Verwendung von *Pseudomonas putida* zur Synthese von chemischen Verbindungen 9

3.3 Terpene und Carotinoide **11**
3.3.1 Hemiterpene 12
3.3.2 Monoterpene 12
3.3.3 Sesquiterpene 13
3.3.4 Diterpene 13
3.3.5 Sesterterpene 14
3.3.6 Triterpene 14
3.3.7 Tetraterpene 14
3.3.8 Polyterpene 15
3.3.9 Tetraterpene oder Carotinoide 15
3.3.9.1 Nomenklatur 18
3.3.9.2 Natürliches Auftreten und Funktion der Carotinoide 19
3.3.9.3 Verwendung der Carotinoide im technischen Bereich 21

3.4 Biosynthese von Carotinoiden **22**
3.4.1 Generierung der Vorstufen bis Isopentenylpyrophosphat 22
3.4.1.1 Acetat-Mevalonat-Weg 23
3.4.1.2 Desoxyxylulosephosphat-Weg 23
3.4.2 Aufbau der Carotinoide bis zum β-Carotin 25
3.4.3 Hydroxylierung von β-Carotin 28
3.4.4 Synthese von Carotinoiden in rekombinanten bakteriellen Systemen 28

3.5 Chemische Synthese von Carotinoiden **30**

3.6 Chromatographische Methoden zur Untersuchung sekundärer Metabolite **31**
3.6.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie 33
3.6.2 Dünnschichtchromatographie 37
3.6.3 Gaschromatographie 38
3.6.4 Quantifizierung in der Chromatographie 39

3.7 Die Transkriptionsanalyse **41**

3.8 Aufgabenstellung **42**

4 Ergebnisse ***44***

4.1 Isolierung von Referenzsubstanzen **44**
4.1.1 Isolierung von Zeaxanthin und Physalien aus *Lycium barbarum* 44
4.1.2 Isolierung von Lycopin, Phytofluen, Phytoen und ζ-Carotin aus Tomatenmark 45

4.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie **46**
4.2.1 Methodenvergleich 46
4.2.1.1 Standardmethode 47
4.2.1.2 Methode nach Steel und Keller 47
4.2.1.3 Methode nach Breithaupt 47
4.2.2 Qualitative Untersuchungen 48
4.2.3 Eignung der Methode für Farnesol und Geraniol 50
4.2.4 Identifizierung von (*Z*)-Isomeren 50
4.2.5 Quantifizierung 52
4.2.6 Bestimmung der Nachweis- und der Bestimmungsgrenze 53

4.2.7 Massenspektrometrie 54

4.3 Dünnschichtchromatographie 55
4.3.1 Methodenentwicklung 55
4.3.2 Quantifizierung 59

4.4 Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden für Carotinoide aus bakterieller Matrix 59
4.4.1 Bestimmung der Wiederfindungsrate 61

4.5 Entwicklung einer Methode zur Dephosphorylierung von Geranylgeranylpyrophosphat 62

4.6 Vergleich der nicht-hämhaltigen β-Carotinhydroxylasen aus *Pantoea ananatis* und *Brevundimonas* sp. SD212 in *Escherichia coli* 64

4.7 Transformation in *Pseudomonas putida* mittels Elektroporation 65
4.7.1 Untersuchung der isolierten Plasmide 66
4.7.2 Untersuchung der Produktion der erhaltenen Klone 67

4.8 Vergleich verschiedener Mutanten von *Pseudomonas putida* 68
4.8.1 Auswahl eines geeigneten Mineralmedium 71

4.9 Ausschluss einer β-Carotinhydroxylase in *Pseudomonas putida* 72

4.10 Verlauf der Produktion im Schüttelkolben 73
4.10.1 Einfluss des Sauerstoffgehalts im Kolben auf die Zeaxanthinproduktion 77

4.11 Erhöhung der Zeaxanthinproduktion in *Pseudomonas putida* mit Additiven 79

4.12 *Escherichia coli* als Vergleichsorganismus 82

4.13 Herstellung anderer Carotinoide in *Pseudomonas putida* und *Escherichia coli* 83
4.13.1 Herstellung von Canthaxanthin und Astaxanthin in *Escherichia coli* 83
4.13.2 β-Carotin und Lycopin in *Pseudomonas putida* D7L3 84

4.14 Kultivierung von *Pseudomonas putida* im Bioreaktor 85
4.14.1 Vollmedium 85
4.14.1.1 Glucose als Kohlenstoffquelle 86
4.14.1.2 Glycerin als Kohlenstoffquelle 87
4.14.2 Kultivierung in Mineralmedium 89
4.14.3 Alginatbestimmung im Medium 91

4.15 Stereochemie des in *Pseudomonas putida* produzierten Zeaxanthins 92

4.16 Transkriptionsanalyse mit DNS-Microarrays 94
4.16.1 Versuchskonzeption 95
4.16.2 Kultivierung von *Pseudomonas putida* D7L3 und KT2440 für die Probennahme 95
4.16.3 Isolierung von Gesamt-RNS 97
4.16.4 Synthese von fluoreszenzmarkierter cDNS und Hybridisierung auf die Arrays 97

4.17 Transkriptionsanalyse mit Hilfe der quantitativen Real-Time-Polymerasekettenraktion 98

4.18 *Pantoea ananatis* als alternativer Produktionsstamm 101

5 Diskussion 105

5.1 Analytik 106
5.1.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie 106
5.1.1.1 Vergleich verschiedener Methoden 106
5.1.1.2 Kopplung mit der Massenspektrometrie 107
5.1.1.3 Quantifizierung 108
5.1.2 Dünnschichtchromatographie 108

5.2 Extraktion von Carotinoiden aus bakterieller Matrix 109

***5.3* Synthese von Carotinoiden in *Pseudomonas putida* und *Escherichia coli* 110**
5.3.1 Elektroporation 111

5.3.2 Zeaxanthinproduktion im *P. putida*-Wildtyp 111
5.3.3 Zeaxanthinproduktion in Mutanten von *P. putida* 112
5.3.4 Stereochemie des erhaltenen Zeaxanthins 113
5.3.5 Additive zur Erhöhung der Ausbeute 113
5.3.6 Synthese von β-Carotin und Lycopin in *P. putida* 114
5.3.7 Ausschluss einer β-Carotinhydroxylase 114
5.3.8 Synthesen von Carotinoiden in *E. coli* 115

5.4 Synthese von Geranylgeraniol und Dephosphorylierung des Produkts 116

5.5 Fermentation 116

5.6 Transkriptionsanalyse 117

5.7 Ausblick 118

6 Material und Methoden 119

6.1 Materialien 119
6.1.1 Geräte 119
6.1.2 Chemikalien 121
6.1.3 Kits 123
6.1.4 Plasmide und Gene 123
6.1.5 Primer 125
6.1.5.1 Primer für die Polymerase-Kettenraktion 125
6.1.5.2 Primer für die quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenraktion 125
6.1.6 Stämme 126

6.2 Mikrobiologische Methoden 126
6.2.1 Stammhaltung von Bakterien 126
6.2.2 Kultivierung von *Escherichia coli* und *Pseudomonas* sp. und Biotransformation 126
6.2.3 Bestimmung der Zelldichte (optische Dichte bei 600 nm) 127
6.2.4 Bestimmung von Feucht- und Trockenmasse 127
6.2.5 Berechnung von Trockenmassen aus optischen Dichten 127

6.3 Molekularbiologische Methoden 127
6.3.1 Isolierung genomischer DNS aus *Pseudomonas putida* 127
6.3.2 Isolierung von plasmidischer DNS aus *Escherichia coli* und *Pseudomonas putida* 127
6.3.3 Transformation in *Pseudomonas* sp. mittels Elektroporation 127
6.3.4 Agarosegelelektrophorese 128
6.3.5 Arbeiten mit RNS 128
6.3.6 Herstellung von RNase-freien Lösungen 129
6.3.7 Isolierung der Gesamt-RNS aus *Pseudomonas putida* KT2440 und D7L3 129
6.3.8 Bestimmung der RNS-Konzentration 129
6.3.9 Kapillargelelektrophorese von RNS 129
6.3.10 Polymerasekettenreaktion 130
6.3.10.1 Polymerasekettenreaktion mit genomischer DNS als Templat 131
6.3.10.2 Polymerasekettenreaktion zur reversen Transkription 131

6.4 Methoden der Transkriptionsanalyse 132
6.4.1 Synthese und Aufreinigung von fluoreszenzmarkierter cDNS 132
6.4.2 Bestimmung der Konzentration von cDNS und Einbaurate 132
6.4.3 Arbeiten mit DNS-Microarrays 133
6.4.3.1 Blocken des Arrays 133
6.4.3.2 Hydridisierung unter Verwendung von Geneframes 133
6.4.3.3 Hydridisierung unter Verwendung von Coverslips 134
6.4.3.4 Waschen des Arrays 134
6.4.3.5 Datenerfassung 134
6.4.4 Quantitative Real-Time-Polymerasekettenraktion 135

6.5 Fermentation 135

6.6 Methoden der Analytischen Chemie 136
6.6.1 Extraktion von Referenzsubstanzen für Carotinoide 136
6.6.1.1 Extraktion von Lycopin, seinen Vorstufen und Derivaten aus Tomatenmark 136
6.6.1.2 Extraktion von Zeaxanthin und Physalien aus Lycium barbarum (Gemeiner Bocksdorn) 137

6.6.1.3 Verseifung von Physalien 137
6.6.2 Extraktion von Carotinoiden aus bakteriellen Zellen für analytische Zwecke 137
6.6.3 Extraktion von Carotinoiden aus bakteriellen Zellen zur präparativen Zwecken 138
6.6.4 Extraktion und Verseifung von Geranylgeraniolpyrophosphat 138

6.7 Bestimmung der Carotinoidkonzentration über die Extinktion 138

6.8 Dünnschichtchromatographie 139
6.8.1 Methodenentwicklung 139
6.8.2 Qualitative Dünnschichtchromatographie 140
6.8.3 Quantitative Dünnschichtchromatographie 140
6.8.4 Reproduzierbarkeit 140
6.8.5 Berechnung der Auflösung 140

6.9 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie 141
6.9.1 Vergleich verschiedener hochleistungsflüssigkeitschromatographischer Trennmethoden für Carotinoide 141
6.9.1.1 Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie nach Breithaupt 141
6.9.1.2 Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie nach Steel und Keller 141
6.9.1.3 Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit einer Standardmethode 141
6.9.2 Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie von Carotinoiden 142
6.9.3 Präparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie zur Aufreinigung von Carotinoiden 142
6.9.4 Präparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie zur Aufreinigung von Phytoen 143
6.9.5 Bestimmung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze 143
6.9.6 Bestimmung der Wiederfindungsrate 145

6.10 Präparative Säulenchromatographie 145

6.11 Gaschromatographie 145

6.12 Bestimmung der absoluten Konfiguration von Zeaxanthin unter Ausnutzung des Circulardichronismus' 146

6.13 Chemische Methoden 146
6.13.1 *E/Z*-Isomerisierung von Carotinoiden mit elementarem Iod 146
6.13.2 *E/Z*-Isomerisierung von Carotinoiden mit konzentrierter Salzsäure 147
6.13.3 Bestimmung der Alginatkonzentration in der Fermentationsbrühe 147

6.14 Lösungen und Medien 148
6.14.1 Agar-Platten mit Kanamycin 148
6.14.2 Ansatz für die reverse Transkription mit Fluoreszenzmarkierung 148
6.14.3 Hybridisierungspuffer 148
6.14.4 Kanamycin-Lösung (30 mg/ml) 149
6.14.5 Ladepuffer für die Agarosegelelektrophorese 149
6.14.6 LB-Medium 149
6.14.7 MEK-Medium 149
6.14.8 Rhamnose-Lösung 150
6.14.9 SSC-Puffer (20 x) 150
6.14.10 SSPE-Puffer (20 x) 150
6.14.11 TAE-Puffer (50 x) 150
6.14.12 TB-Medium 150
6.14.13 TE-Puffer 151
6.14.14 Waschpuffer für DNS-Microarrays 151

7 Literaturverzeichnis 152

Lebenslauf 158

Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich Herrn Professor Dr. Bernhard Hauer für sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit, seine ständige Diskussionsbereitschaft, die kritische Durchsicht des Manuskripts und die Übernahme des Erstgutachtens. Auch trugen die guten Arbeitsbedingungen am Institut entscheidend zum Entstehen dieser Arbeit bei. Ferner bedanke ich mich für die Möglichkeit, an internationalen Tagungen teilnehmen zu können.

Sein Vorgänger, Herr Professor Dr. Rolf D. Schmid, überließ mir dankenswerter Weise dieses hochinteressante Thema. Auch er gab hilfreiche Anregungen und war stets einer Diskussion aufgeschlossen.

Frau Professorin Dr. Vlada Urlacher danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und für die hervorragende Betreuung in der Endphase dieser Arbeit. Ihre Anregungen und die vielen Diskussionen waren stets sehr hilfreich. Auch danke ich ihr für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Frau Professorin Dr. Cosima Stubenrauch hat dankenswerterweise den Prüfungsvorsitz übernommen.

Für die vielen Ratschläge und Diskussionen in der Anfangsphase dieser Arbeit danke ich Herrn Dr. Steffen Maurer.

Ebenso bin ich Herrn Dr. Thomas Reichart für die Einweisung in die Arbeit mit RNS und Microarrays und für die vielen Diskussionen zum Dank verpflichtet. Leider durfte er den weiteren Verlauf der Arbeit zu verfolgen. Mein besonderer Dank geht auch an Frau Susanne Münch, die mir viele hilfreiche Ratschläge zur Arbeit mit Microarrays gab.

Bei der Fermentation war Herr Sven Richter ein unverzichtbarer Ratgeber. Sein schier unerschöpfliches Wissen auf diesem Gebiet, sein Engagement und viele Diskussionen trugen zur zügigen Etablierung eines Fermentationsverfahrens für *Pseudomonas putida* bei.

Diese Arbeit wäre ohne die molekularbiologischen Arbeiten, die am Institut für Industrielle Genetik durchgeführt wurden, nicht zu realisieren gewesen. Hierfür und für „unzählige“ Diskussionen, Hilfestellungen und Anregungen möchte ich mich bei Frau Jana Hoffmann und Herrn Dr. Josef Altenbuchner bedanken.

Frau Constanze Stiefel und Herrn Clemens Hummel vom Institut für Lebensmittelchemie an der Universität Hohenheim, danke ich für die Bereitstellung zahlreicher Carotinoide.

Ohne die Hilfe von Herrn Dr. Uwe Gerken vom Institut für Mikrobiologie an der Universität Hohenheim wären die CD-spektroskopischen Untersuchungen des Zeaxanthins nicht möglich gewesen.

Für die kritische Durchsicht von Teilen des Manuskripts bedanke ich mich bei Herrn Dr. Michael Widmann und Dr. Janosch Klebensberger. Für die Korrektur der englischen Zusammenfassung danke ich Frau Dr. Sandra Facey.

Meinen derzeitigen und ehemaligen Kollegen am Institut, besonders in den Arbeitsgruppen Biokatalyse und Biosensorik, danke ich für die stete Unterstützung und Hilfestellung bei Fragen und Problemen und für die gute Arbeitsatmosphäre.

Die Arbeit wurde im Rahmen des Zentrums Systembiologie von der Landesstiftung Baden-Württemberg finanziell unterstützt.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meinen Eltern, die meine Vorhaben in vielfältiger Weise unterstützt haben.

Abkürzungen

Apocarotinal	β-Apo-8'-carotinal
ATP	Adenosintriphosphat
BTM	Biotrockenmasse
cDNS	komplementäre DNS
CIAP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (*calf intestine alkaline phosphatase*)
CoA	Coenzym A
DC	Dünnschichtchromatographie
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure oder Ethylendiamintetraacetat
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s²)
GC/MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*High Performance Liquid Chromatography*)
IPP	Isopentenylpyrophosphat
KPi-Puffer	Kaliumphosphat-Puffer
LB-Medium	*Lysogeny Broth*-Medium
LC/MS	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
MTBE	*tert*-Butylmethylether
NAD^+	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid
NADH	reduziertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid
OD_{600}	optische Dichte bei 600 nm
P. ananatis	*Pantoea ananatis*
P. putida	*Pseudomonas putida*
PCR	Polymerasekettenraktion (*Polymerase Chain Reaction*)
qRT-PCR	quantitative Real-Time-PCR
R_f	Retentionsfaktor
RNS	Ribonukleinsäure
SDBS	*Spectral Database for Organic Compounds* des *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology*, Japan

SDS	Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecylsulfate*)
SSC-Puffer	Citratpuffer mit Natriumchlorid (*Standard Saline Citrate*)
SSPE-Puffer	Phosphatpuffer mit Natriumchlorid und EDTA (*Standard Saline Phosphate EDTA*)
TB-Medium	*Terrific Broth*-Medium
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Maßangaben wurden, wenn nicht anders angegeben, in den gesetzlich vorgeschriebenen Einheiten gemacht.

1 Zusammenfassung

Diese Arbeit entstand aus einem gemeinsamen Projekt des Instituts für technische Biochemie (ITB) und des Instituts für Industrielle Genetik (IIG) an der Universität Stuttgart im Rahmen des Zentrums für Systembiologie. Während das Institut für Industrielle Genetik für die molekularbiologischen Arbeiten zuständig war, oblagen dem Institut für Technische Biochemie, die Kultivierung und die Analytik.

In dieser Arbeit sollte die Möglichkeit der Synthese von Carotinoiden in rekombinanten *Pseudomonas putida* KT2440 untersucht werden. Dabei wurde Zeaxanthin als Modellprodukt verwendet. Insbesondere sollten limitierende Schritte bei der Biosynthese identifiziert werden. Die Synthese der Carotinoide erfolgt dabei aus der zugefütterten Kohlenstoffquelle, meist Glucose. Diese wird im Entner-Doudoroff-Weg zu Pyruvat und Glycerinaldehy-3-phosphat metabolisiert. Aus diesen Stoffen kann dann im 1-Desoxy-D-xylulosephosphat-Weg (DXP-Weg) die Vorstufen des Isoprens, das Isopentenylpyrophosphat (IPP) und das Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) gebildet werden. Diese werden auch „aktiviertes Isopren“ genannt. Aus den beiden Vorstufen wird im bakteriellen Isoprenkatabolismus nun über die Zwischenstufen Geranylpyrophosphat und Farnesylpyrophosphat, Geranylgeranylpyrophosphat gebildet. Die zur Synthese der Carotinoide nötigen Enzyme werden durch Expression von einem Plasmid gebildet. Dabei kamen die Gene aus dem natürlichen Carotinoidproduzenten *Pantoea ananatis* zum Einsatz. Mit Hilfe dieser Enzyme wird dann das Tetraterpen Phytoen und aus diesem, nach einer mehrstufigen Einführung von Unsättigungen, das erste farbige Tetraterpen, das acylclische Lycopin gebildet. In weiteren Modifikationen können die Enden zum β-Carotin zyklisiert und die Ringe schließlich zum Zeaxanthin hydroxyliert werden. Zur Hydroxylierung des β-Carotins wurden mehrere Enzyme verglichen. Es handelte sich dabei um die Cytochrom-P450-Monooxygenase CYP175A1 aus *Thermus thermophilus* und die beiden β-Carotinhydroxylasen aus *Pantoea ananatis* (CrtZ) und *Brevundimonas* sp. SD212 ($CrtZ_{Brev}$). $CrtZ_{Brev}$ wurde nur in *E. coli* geprüft. Die Zeaxanthinmenge, die mit CrtZ erhalten wurde, war fünf Mal höher als die mit $CrtZ_{Brev}$ erhaltene. Diese Hydroxylase wurde daher nicht weiter verwendet.

Zur Analyse der gebildeten Produkte wurde eine Methode der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie etabliert und so angepasst, dass eine gute Trennung der Substanzen möglich war. Ferner wurde zur schnellen Untersuchung einer großen Zahl von Proben eine Methode der Dünnschichtchromatographie neu entwickelt.

Es wurden mehrere Extraktionsmethoden für Carotinoide aus bakterieller Matrix verglichen. Als bei guter Ausbeute am einfachsten durchführbar erwies sich die Extraktion mit Aceton. Für Lycopin wurde eine Wiederfindungsrate von 98,1 %, für Zeaxanthin von 97,3 % und für Apocarotinal von 98,0 % erhalten.

Erste Transkonjugationsversuche der Plasmide in *P. putida* KT2440 am IIG waren nicht erfolgreich. Dagegen konnte mit Hilfe der Elektroporation am ITB Klone erhalten werden. Diese wiesen aber einen sehr heterologen Phänotyp auf. Bei der Transformation kam es zu Mutationen auf dem Plasmid und wahrscheinlich auch im Genom.

Die Produktionsleistung der Klone war sehr unterschiedlich. Wurde die Hydroxylierung mit CrtZ katalysiert, schwankte die Ausbeute zwischen 3,5 µg/g Biotrockenmasse und 49,3 µg/g Biotrockenmasse. Der Anteil des Zeaxanthins betrug zwischen 58 % und 91 %. Mit CYP175A1 wurde dagegen β-Carotin als Hauptprodukt erhalten. Der Anteil von Zeaxanthin war niedriger als 10 %.

Am IIG wurden mit Hilfe der Transposonmutagenese mehrere Mutanten hergestellt. Diese wurden nach ihrer Konjugationseffizienz selektiert. Die Mutanten zeigten ebenfalls sehr unterschiedliche Ausbeuten. Die Mutanten D8L1 und D7L3 wiesen mit 1,51 mg/g beziehungsweise 1,20 mg/g Biotrockenmasse die höchsten Werte für Zeaxanthin auf. Die Mutante D7L3 wurde trotz ihrer geringeren Produktionsmenge an Zeaxanthin für die weiteren Untersuchungen gewählt, da hier, im Gegensatz zu den anderen Mutanten, nahezu kein β-Carotin, β-Cryptoxanthin und Lycopin. Die Zeaxanthinmenge war hier zweieinhalb Mal so hoch wie im Wildtyp.

Beim Vergleich der beiden Vollmedien LB- und TB-Medium sowie dem Mineralmedium MEK zeigte sich, dass in TB-Medium mit Glycerin als zusätzlicher Kohlenstoffquelle mit 7,0 mg/g die mit Abstand höchste Zeaxanthinmenge hergestellt werden konnte. In LB-Medium lag die Ausbeute bei 1,3 mg/g und in MEK-Medium mit Glucose bei 2,5 mg/g. Die volumetrische Ausbeute war ebenfalls in TB-Medium mit 51,3 mg/l am höchsten. Bei LB- und MEK-Medium lag sie mit 2,2 mg/l beziehungsweise 1,7 mg/l deutlich niedriger.

Während der Produktion stieg die Zeaxanthinmenge kontinuierlich an. Es wurden weiterhin β-Carotin und β-Cryptoxanthin in sehr geringen Mengen gefunden. Es konnten 0,1 mg/g β-Carotin beziehungsweise 0,6 mg/g β-Cryptoxanthin in TB-Medium gemessen werden. In LB- und MEK-Medium waren die Mengen noch niedriger. Andere Carotinoidvorstufen konnten nicht nachgewiesen werden.

Aus den erhaltenen Daten kann abgeleitet werden, dass die Hydroxylierung den Engpass bei der Zeaxanthinsynthese darstellt, da hier die Zwischenstufen gefunden werden konnten, wäh-

rend die anderen Reaktionen ohne Akkumulierung von Zwischenstufen abliefen. Es konnte durch CD-Spektroskopie und chirale Dünnschichtchromatographie gezeigt werden, dass es sich bei dem in *P. putida* gebildeten Zeaxanthin um das (3*R*,3'*R*)-Isomer handelt.

Das Expressionssystem wurde auch in *E. coli* verwendet. Die Ausbeute im besten Fall war hier aber deutlich niedriger und lag bei 2,4 mg/g.

Zur weiteren Erhöhung der Ausbeute in *P. putida* D7L3 wurden verschiedene Additive zum Medium geprüft. Am vielversprechendsten erwiesen sich Lecithin und Ölsäure. Ein Zusatz von 10 % Lecithin vermochte innerhalb von 24 Stunden die Zeaxanthinmenge um das 10,4fache zu steigern. Nach 48 Stunden betrug die Steigerung immer noch das 4,7fache. Die Erhöhung der Zeaxanthinausbeute mit Ölsäure war nicht so deutlich ausgeprägt und betrug bei 1 %igem Zusatz nach 24 Stunden das 2,3fache und nach 48 Stunden das 1,2fache. Der Zusatz von größeren Mengen Ölsäure brachte keine Verbesserung der Ausbeute.

Die Hochskalierung vom Schüttelkolben in den 5 l-Fermenter war erfolgreich. Die Ausbeute blieb jedoch hinter der im Schüttelkolben deutlich zurück. Außerdem wurde die Bildung von Alginat beobachtet. Dies führte dazu, dass die Kultivierung nach spätestens zwei Tagen abgebrochen werden musste. In TB-Medium wurden Zeaxanthinausbeuten von 20 mg/l beziehungsweise 1 mg/g Trockenmasse gefunden. In Mineralmedium wurde im besten Fall eine Ausbeute von 1,2 mg/l erreicht. Wurden Teilernten durchgeführt, bei welchem die Hälfte des Mediums einmal täglich gegen frisches Medium getauscht wurde, konnte die Ausbeute auf 5,1 mg/l gesteigert und die Kultivierung über drei Tage geführt werden. Bei Teilernten war das Produkt auch mit Lycopin verunreinigt.

Untersuchungen der Transkription zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene während der Isoprenoidsynthese führten zu keinem eindeutigen Ergebnis. Die Untersuchung mit Microarrays wurde wegen technischer Schwierigkeiten ohne Ergebnis abgebrochen. Untersuchungen der Gene des DXP-Weg zeigten, dass die Gene für die Geranyltransferase (*ispA*) und für die (*E*)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphat-Synthase (*ispG*) deutlich von den anderen Genen abweichen. Für *ispA* wurde in *E. coli* bereits beschrieben, dass es einen Engpass darstellt. Von *ispG* ist dies in *E. coli* nicht bekannt.

Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Mutante *P. putida* D7L3 zur Herstellung von Carotinoiden geeignet ist. Es konnte ferner erstmals die Synthese von Lycopin, β-Carotin und Zeaxanthin in *P. putida* KT2440 und seinen Mutanten gezeigt werden. Als Engpass bei der Synthese von Zeaxanthin erwies sich die Hydroxylierung. Mit Lecithin als Additiv konnte die Ausbeute deutlich gesteigert werden.

2 Summary

This work is the result of a collaboration between the Institutes of Technical Biochemistry (ITB) and Industrial Genetics (IIG) within the Centre of Systems Biology at the University of Stuttgart. The Institute of Industrial Genetics was responsible for the molecular biology work and the Institute of Technical Biochemistry investigated the cultivation conditions and the analytical methods for carotenoids.

In this work, *Pseudomonas putida* KT2440 was established as a production host for carotenoids using zeaxanthin as a model system. Limiting steps in biosynthesis should be identified. Biosynthesis of carotenoids starts with the carbon source, usually glucose. It was metabolised to pyruvate and glycerol-3-aldehyde following the Entner Doudoroff pathway. The two substances were catabolised in the 1-deoxy-D-xylulosephosphate pathway to the building blocks of the isoprenoids, isopentenyl pyrophosphate (IPP) and dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP), which are called "activated isoprene". Bacteria form geranylgeranyl pyrophosphate via the intermediates geranyl pyrophosphate and farnesyl pyrophosphate. The genes encoding these enzymes were cloned at IIG from the naturally carotenoid producing bacterium *Pantoea ananatis*. These enzymes produce the tetraterpene phytoen, which forms in four steps the first coloured tetraterpene, lycopene. This molecule is then cyclised and hydroxylated to form β-carotene and zeaxanthin, respectively. For the hydroxylation of β-carotene three enzymes were compared, the cytochrome P450 monooxygenase CYP175A1 from *Thermus thermophilus*, the β-carotene hydroxylases from *Pantoea ananatis* (CrtZ) and *Brevundimonas* sp. SD212 ($CrtZ_{Brev}$).

For analysis of the formed carotenoids a method using high performance liquid chromatography was established and modified for optimal separation of the produced substances. For fast and simultaneous analysis of a high number of samples a method using thin layer chromatography was developed.

Several methods for the extraction of carotenoids from bacteria were compared. The extraction with acetone combines a high yield and an easy procedure. The recovery for zeaxanthin was 97.3 %, for lycopene 98.1 % and for apocarotenal 98.0 %, respectively.

The clones showed a heterologous phenotype. The transformation led to mutations on the plasmids and probably also on the genome. The productivity of the clones differed. Yields between 3.5 µg/g cell dry weight (CDW) and 49.3 µg/g CDW were observed using CrtZ for hydroxylation. Also the ratio of zeaxanthin differs from 58 to 91 %. The main product from CYP175A1 is β-carotene while the ratio of zeaxanthin was lower than 10 %.

The yields of zeaxanthin reached with these mutants using transposon mutagenesis differed from mutant to mutant. Mutants D8L1 and D7L3 showed the highest values with 1.51 mg/g CDW and 1.20 mg/g CDW, respectively. Although mutant D7L3 had a lower yield it was selected for further investigation due to the lower amount of lycopene (< 10 µg/g CDW) as well as the two intermediates β-carotene and β-cryptoxanthin. The amount of zeaxanthin was two and a half times higher than in the wildtype strain KT2440.

$CrtZ_{Brev}$ was only tested in *E. coli*. The amount of zeaxanthin obtained with CrtZ in *E. coli* was five times higher, so no further investigations in *P. putida* were undertaken.

A comparison of the two full media, LB and TB, and the mineral medium, MEK, showed that the amount of zeaxanthin in TB medium supplemented with glycerol was higher with 7.0 mg/g than the other media. The yield in LB medium was 1.3 mg/g and in MEK with glucose as carbon source was 2.5 mg/g. The volumetric yield in TB medium was with 51.3 mg/l the highest. In LB and MEK medium, the volumetric yield was 2.2 mg/l and 1.7 mg/l, respectively. The amount of zeaxanthin increased continuously during the cultivation, while β-carotene and β-cryptoxanthin stayed at a low level. The maximum yield of β-carotene and β-cryptoxanthin in TB medium was 0.1 mg/g β-carotene and 0.6 mg/g, respectively. In LB and MEK medium the amount was even lower. No other precursors were found in the samples.

From this data, it was assumed that the hydroxylation is the bottleneck of zeaxanthin synthesis. For the other reactions, e.g. the desaturation and cyclisation, no intermediates were accumulated. The synthesized zeaxanthin was investigated with chiral thin layer chromatography and CD spectroscopy to solve its stereochemistry. It was found the CrtZ was selective for (3*R*,3'*R*)-zeaxanthin in *P. putida*.

The expression system was also used in *E. coli* for comparison. In the best case 2.4 mg/g zeaxanthin was found with CrtZ in TB medium.

To enhance the yield in *P. putida* D7L3 different additives were tested. Both lecithin and oleic acid show an effect. The addition of 10 % lecithin increases the produced amount by a factor of 10.4 within 24 h and by a factor of 4.7 within 48 h. With oleic acid the increase was lower than with lecithin. 1 % oleic acid increased the amount by a factor of 2.3 in 24 h and by a factor of 1.2 in 48 h. Higher amounts of oleic acid gave no enhancement.

The upscaling from a shaking flask to a 5 l fermenter scale was successful, but the yield was lower than the one reached in flasks and the formation of alginate was observed. This led to a decreased oxygen input in the medium. For this reason the process was stopped after two days. In TB medium the amount of zeaxanthin was up to 20 mg/l but only 1 mg/g CDW could be obtained. In mineral medium 1.2 mg/l of zeaxanthin was reached. With a harvest of half of

the fermenter volume and refill with fresh media every day 5.1 mg/l of zeaxanthin were obtained and the process time could be extended to three days. Unfortunately, in this case a contamination of zeaxanthin with lycopene could be observed.

Investigations of the genes of the DXP pathway using quantitative real time PCR showed that the expression level of the genes for geranyltransferase (*ispA*) and (*E*)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphate synthase (*ispG*) were different from the others genes in the DXP pathway. In *E. coli* it is known that *ispA* is a bottleneck however it has not been described for *ispG* yet.

In this work, it was shown that the mutant *P. putida* D7L3 is able to produce carotenoids. The synthesis of lycopene, β-carotene and zeaxanthin in *P. putida* KT2440 and D7L3 is shown for the first time. A bottleneck in the synthesis of zeaxanthin is the hydroxylation. The medium additive lecithin could increase the yield significantly.

3 Einleitung

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen einer Zusammenarbeit der Institute für Industrielle Genetik und Technische Biochemie im Rahmen des Zentrums Systembiologie an der Universität Stuttgart. Während das Institut für Industrielle Genetik molekularbiologische Arbeiten durchführte, wurden am Institut für Technische Biochemie Kultivierung der Stämme optimiert, die Analyse von Produkten vorgenommen und die Transkription untersucht.
In dieser Arbeit wurde die Möglichkeit *Pseudomonas putida* KT 2440 zur rekombinanten Synthese von Carotinoiden auf limitierende Reaktionen untersucht und die Produktion optimiert werden.

3.1 Synthetische Biologie und Systembiologie

Die Systembiologie (Systomik) untersucht Organismen oder Teile davon und unternimmt den Versuch sie in ihrer Gesamtheit zu verstehen. Es gibt zwei prinzipielle Ansätze auf diesem Gebiet, den sogenannten *Top-down*-Ansatz und den *Bottom-up*-Ansatz.
Beim *Top-down*-Ansatz werden zunächst die experimentellen Daten erzeugt, ausgewertet und nach neuen Zusammenhängen gesucht, die dann wiederum im Experiment bestätigt werden.
Hierzu werden mittels unterschiedlichster Methoden Daten zum Beispiel über

- die Gensequenz und die Funktion der Gene (Genomik), über die Proteine in der Zelle (Proteomik),
- die Anordnung der Organellen innerhalb der Zelle (Toponomik),
- die Genregulation auf RNS-Ebene (Transkriptomik),
- die Stoffwechselintermediate in der Zelle (Metabolomik),
- die Interaktion von Xenobiotika oder Proteinen mit anderen Proteinen in oder auf der Zelle (Interaktomik) und
- die dynamische Verteilung von Stoffströmen in der Zelle (Fluxomik)

erhoben. Mit diesen Daten wird dann versucht ein Mechanismus innerhalb der Zelle zu entdecken und zu charakterisieren
Nachteilig an diesem Ansatz ist die Tatsache, dass in der Auswertung alle wichtigen Ergebnisse erkannt werden müssen. Dies ist oft mangels genauer Kenntnis der genauen Vorgänge in der Zelle nicht möglich.
Der *Bottom-up*-Ansatz dagegen geht von einem mathematischen Modell aus. Das Modell wird aus bekannten Daten zusammengestellt. Aus dem Modell werden Zusammenhänge vorhergesagt, die wieder im Experiment geprüft werden können oder zu neuen Fragestellungen

führen. Eine weitere Anwendung dieses Ansatzes ist die synthetische Biologie, also das Erstellen von Organismen die passgenau auf eine bestimmte Anwendung ausgerichtet sind. Dies kann zum Beispiel durch Einführen künstlicher Stoffwechselwege geschehen.
Bei diesem Ansatz liegen die Nachteile darin, dass unter Umständen eine enorme Rechenleistung benötigt wird und dass die Vielzahl der Kombinationsmöglichkeiten eine genaue Beschreibung des Zusammenwirkens unmöglich machen kann.

3.2 *Pseudomonas* sp. und *Pseudomonas putida*

Bakterien der Gattung Pseudomonadacae sind Gram-negative, polar begeißelte Stäbchen der γ-Klasse der Proteobacteria.[1] Sie bilden keine Sporen. Die meisten Arten sind mesophil einige leben psychrophyl. Sie leben streng anaerob und sind nicht zur Gärung fähig. Dagegen können einige alternative Elektronenakzeptoren, wie zum Beispiel die Nitratatmung, verwenden. In der Regel sind sie, wie die Mehrzahl der Mikroorganismen, chemoorganotroph und leben als Saprophyten. Für den Glucosestoffwechsel nutzen einige Vertreter, zum Beispiel *P. saccharophila*[2] und *P. putida*[3] anstelle der Glycolyse den Entner-Doudoroff-Weg[2] (2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat-Weg, KDPG-Weg).

3.2.1 *Pseudomonas putida*

Der Lebensraum von *P. putida* ist weit gefasst; man findet sie in nahezu allen gemäßigten aeroben Lebensräumen. Dabei kommen sie sowohl im Boden als auch im Wasser vor.[4]
P. putida ist ein äußerst anpassungsfähiges Bakterium.[5], welches wie andere Pseudomonadacae schnell wächst, niedrige Ansprüche an die Nahrungsquellen hat und einen äußerst anpassungsfähigen Metabolismus besitzt. Auch sein Genom und seine Physiologie sind sie sehr wandlungsfähig.[4] Einige Arten akzeptieren mehr als 100 verschiedene Kohlenstoffquellen.[4] Viele tolerieren nach einer Eingewöhnung organische Lösungsmittel, außerdem haben einige Stämme Toleranzen gegenüber Antibiotika, Desinfektionsmittel, Detergentien oder Schwermetalle.[4] Die Toleranzen sind oft auf Plasmiden, wie beispielsweise dem TOL-Plasmid pWW0 für den Abbau von Toluol und Xylol[6], dem NAH7-Plasmid für die Abbau von Naphthalin[7] oder dem CAM-Plasmid für den Campher-Abbau[8] kodiert.
P. putida KT2440[9] ist ein spontan entstandener Abkömmling des Stammes *P. putida* mt-2 (vormals *P. arvilla* mt-2).[6] Der Stamm mt-2 besitzt das für den Abbau von Toluol und Xylol verantwortliche TOL-Plasmid, während der Stamm KT2440 plasmidfrei ist. Der Stamm KT2440 ist zudem im Restriktionsverhalten abgeschwächt.[4] Für Anwendungen von *P. putida* in der Biotechnologie ist besonders das schnelle Wachstum[5] und die Einordnung in die Risikogruppe 1 von Vorteil.

P. putida KT2440 wurde im Jahr 2002 vollständig sequenziert (GenBank: AE015451)[1], 2007 folgte der Stamm F1 (GenBank: CP000712)[10] und 2008 die Stämme W619 (GenBank: CP000949)[11] und GB-1 (GenBank: CP000926)[12]. Außerdem wurden seitdem einige Plasmide verschiedener Stämme von *P. putida* sequenziert. Diese Ergebnisse eröffnen neue Möglichkeiten des *Metabolic Engineering* und der Modellierung von Zellvorgängen.

Die Kombination von hoher Toleranz gegen verschiedene Xenobiotika, die Akzeptanz verschiedener Kohlenstoffquellen, die hoher Anpassungsfähigkeit und die Akzeptanz von fremder DNS verhalfen *Pseudomonas* sp. zu vielfältigen Anwendungen bei der biologischen Altlastensanierung von verschiedenen organischen, vor allem aromatischen Verbindungen[13]

So wurde von Li *et al.* zum Beispiel *P. putida* LY1 zum vollständigen Abbau von bis zu 200 mg/l Phenol über einen großen Temperaturbereich von 2,5 bis 30 °C eingesetzt.[14] Janke und Fritsche zeigten, dass der Abbau von 4-Chlorphenol mittels *P. putida* möglich ist.[15]

Auch Schwermetalle können von *P. putida* gebunden werden, wie von Canstein und Kollegen zeigten. Sie konnten mittels *P. putida* Spi3 den Quecksilbergehalt von Abwasser aus der Chloralkalielektrolyse deutlich verringern. Beim Stamm Spi3 handelt es sich um ein Isolat aus dem Sediment des Flusses Spittelwasser in Sachsen-Anhalt, der bis 1989 stark mit organischen und anorganischen Quecksilberverbindungen belastet wurde. In Abwasserproben aus drei Anlagen, die eine Gesamtquecksilberkonzentration zwischen 1,56 mg/l und 7,61 mg/l aufwiesen, konnten 90 bis 98 % des Quecksilbers aus der Lösung entfernt werden.[16]

3.2.2 Verwendung von *Pseudomonas putida* zur Synthese von chemischen Verbindungen

Obwohl *P. putida* in der Vergangenheit hauptsächlich zum Abbau von Substanzen verwendet wurde, finden sich in der Literatur auch Beispiele für die Biosynthese. In Tabelle 3.1 sind einige literaturbekannte Beispiele für die Verwendung von *P. putida* als Biokatalysator oder direkt zur Biotransformation aus der Kohlenstoffquelle angegeben.

Produziert werden in erster Linie aromatische Verbindungen wie Phenol, 3-Methylcatechol und Derivate des Styrols und der Benzoesäure. Es wurden aber auch einige bakterielle Sekundärmetabolite wie das Peptid Myxochromid S aus *Stigmatella aurantiaca* und Myxothiazol A in *P. putida* hergestellt.

Tabelle 3.1 Bioproduktion in *Pseudomonas putida*

Substanz	Stamm	Produktmenge	Referenz
3-Methylcatechol	*P. putida* MC2	bis zu 3,1 g/l	Hüsken *et al.*, 2001[17]
3-Methylcatechol	*P. putida* MC2	bis zu 3,9 g/l	Prpich *et al.*, 2007[18]
3-Methylcatechol	*P. putida* MC2	bis zu 5,5 g/l	Prpich *et al.*, 2007[19]
Myxochromid S	*P. putida* KT2440	40 mg/l	Wenzel *et al.*, 2005[20]
Myxothiazol A	*P. putida* FG2005::Pm-*mta*	600 µg/l	Gross *et al.*, 2006[21]
Phenol	*P. putida* S12	bis zu 0,86 g/l	Wierckx *et al.*, 2005[22]
p-Hydroxybenzoat	*P. putida* S12	1,8 g/l	Verhoef *et al.*, 2007[23]
p-Hydroxystyrol	*P. putida* S12	17,6 g/l	Verhoef *et al.*, 2008[24]

Intensiv untersucht wurde die Herstellung von 3-Methylcatechol in *P. putida* MC2.[17-19] Von Hüsken und Kollegen konnte 2001 die Synthese dieser Substanz mit *P. putida* MC2 als Biokatalysator gezeigt werden. Die Synthese erfolgte aus Toluol, welches dem Medium zugesetzt wurde. Da 3-Methylcatechol toxisch wirkt und damit die Produktmenge begrenzt, wurden Zweiphasensysteme etabliert, die eine Steigerung der Ausbeute erlaubte. Während im Einphasensystem Ausbeuten zwischen 0,925 g/l[19] und 1,2 g/l[17] erreicht wurden, konnten durch Zugabe von Octanol etwa 3,1 g/l[17], durch (2-Ethylhexyl)sebacat 5,5 g/l[19] und durch HYTREL bis zu 3,9 g/l[18] erreicht werden.

Um Biotransformationen ausgehend von einer Kohlenstoffquelle handelt es sich bei der Herstellung von Myxothiazol A und Myxochromid S in *P. putida* KT2440 beziehungsweise in einer Mutante dieses Stamms und von Phenol, *p*-Hydroxybenzoat, und *p*-Hydroxysterol in *P. putida* S12.

Zur Herstellung von Myxothiazol wurde der Gencluster aus *Sorangium cellulosum* So ce56 welcher die Herstellung von Methylmalonyl-CoA und der Gencluster aus *Stigmatella aurantiaca* DW4/3–1, welcher die Myxothiazolsynthese codiert, in *P. putida* KT2440 exprimiert. Es konnte sowohl Methylmalonyl-CoA als auch Myxothiazol in einer Menge bis zu 600 µg/l erhalten werden.[21] Auch die Herstellung von Myxochromid S gelang in *P. putida* in Ausbeuten von etwa 40 mg/l.[20]

Die Herstellung von Phenol aus Glucose in *P. putida* S12 wurde mittels der Tyrosin-Phenol-Lyase aus *Pantoea agglomerans* katalysiert. In Mutanten dieses Stammes wurde Phenol in Mengen zwischen 4,7 mg/l und 139 mg/l im Schüttelkolben und 0,47 g/l im Fermenter erreicht. Mittels Octanol als zweiter Phase konnte die Ausbeute im Fermenter nahezu auf 0,86 g/l Phenol verdoppelt werden.[22]

Auf derselben Mutante baute auch die Arbeit von Verhoef *et al.* zur Produktion von *p*-Hydroxybenzoat auf. In Mineralmedium mit Glucose oder Glycerin als Kohlenstoffquelle

konnte in einer Fed-Batch-Fermentation mit Glycerin als Kohlenstoffquelle eine Ausbeute von 1,8 g/l des Produkts erreicht werden.[23] Ebenfalls in *P. putida* S12 wurde *p*-Hydroxystyrol hergestellt. In einem zweiphasigen System aus einem Mineralmedium und 1-Decanol konnten 17,6 g/l des Produkts aus der organischen Phase isoliert werden.[24]

3.3 Terpene und Carotinoide

Terpene sind in der Natur eine weit verbreitete Strukturgruppe. Ihr Name leitet sich von Terpentin, dem Balsam, welcher beim Anschneiden von Rinde und jungem Holz verschiedener Kiefernarten, abgesondert wird, ab. Dieser Balsam enthält Harzsäuren und Kohlenwasserstoffe, die nach ihrer Herkunft als Terpene bezeichnet werden. Derzeit sind etwa 20.000 unterschiedliche Terpene bekannt.[25]

Die Gruppe der Terpene ist sehr heterogen aufgebaut. Man findet neben den Terpen-Kohlenwasserstoffen und ihren hydrierten und dehydrierten Derivaten, welche die Terpene im engeren Sinne darstellen, viele weitere, die funktionelle Gruppen tragen. Neben Alkoholen, Ketonen, Aldehyden und Estern wurden auch halogenierte Terpene in Algen und schwefelhaltige Terpene beschrieben. Stickstoffhaltige Terpene dagegen werden zu den Alkaloiden gezählt.

Terpene gehen alle auf das Isopren (Abbildung 3.1a) zurück und gehorchen der von Ružička 1953 aufgestellten (empirischen) Isoprenregel.[26] Nach dieser Regel kann das Kohlenstoffskelett in Isopreneinheiten zerlegt werden. Die Anzahl der Einheiten bestimmt über die Einordnung in eine Gruppe. Die Einteilung beginnt mit den Hemiterpenen (C_5). Es folgen die Mono- (C_{10}), Sesqui- (C_{15}), Di- (C_{20}), Sester- (C_{25}), Tri- (C_{30}) und Tetraterpene (C_{40}). Terpene mit mehr als acht Isopreneinheiten werden als Polyterpene bezeichnet. Einige sogenannte irreguläre Terpene, die nicht dieser Regel gehorchen, findet man ebenfalls in der Natur.

Die weiterentwickelte biogenetische Isoprenregel geht dagegen zusätzlich von der Biogenese der Substanzen aus und definiert, dass zunächst die aliphatischen Moleküle wie Geraniol entstehen und diese dann weiter modifiziert werden. Dabei gibt es Kopf-Kopf-, Kopf-Schwanz- und Schwanz-Schwanz-Verknüpfungen, wobei der Kopf an dem Ende des Moleküls liegt, an welchem das Isopren verzweigt ist.[27]

Die verschiedene Gruppen, die sich aus der Anzahl der Kohlenstoffatome ergeben, können weiter in die acyclischen und verschiedene cyclische (zum Beispiel bi-, tricyclisch) Terpene unterteilt werden.

3.3.1 Hemiterpene

Die Hemiterpene (Abbildung 3.1b) sind eine sehr kleine Gruppe mit nur etwa 30 Vertretern.[25] Beispielhafte Vertreter sind Prenol (3-Methyl-2-buten-1-ol) und 4-Methoxy-2-methyl-butanthiol. Prenol findet man im Hopfenöl und im Ylang-Ylang-Öl, welches aus dem Cananga-Baum (*Cananga odorata*) gewonnen wird. 4-Methoxy-2-methyl-butanthiol prägt das Aroma der schwarzen Johannisbeere. Ferner ist das in der Biosynthese der Isoprenoide vorkommende Isopentenylpyrophosphat ein Hemiterpen.[25]

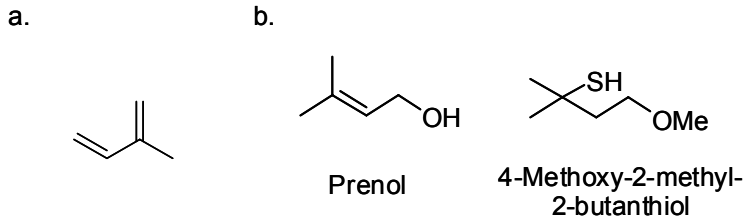


Abbildung 3.1 Isopren als Grundbaustein der Terpene (a) und Beispiele für Hemiterpene (b)

3.3.2 Monoterpene

Von den Monoterpene (Abbildung 3.2) sind etwa 1000 Stück bekannt.[25] Gemeinsam mit den aus drei Ispopreneinheiten bestehenden Sesquiterpenen mit 15 Kohlenstoffatomen sind sie Hauptbestandteil von ätherischen Ölen. Zu den acycliclischen Monoterpenen gehören unter anderem die das Geraniol und sein (*Z*)-Isomer, das Nerol, welche beide in Koriander gefunden werden. Geraniol bzw. Geranylpyrophosphat sind ein Synthesebaustein bei der biologischen Terpensynthese. Ein wichtiger monocyclischer Vertreter ist das Menthol und das Menthon, welche die Hauptbestandteile des aus der Pfefferminze (*Mentha piperita*) gewonnen Öl sind. Beide werden in der Aromastoffindustrie und im pharmazeutischen Bereich verwendet. Die unter anderem im Wermut (*Artemisia absinthium*) vorkommenden bicyclischen Isomere α- und β-Thujon sind der berauschende Wirkstoff des Absinth. Ein weiteres verbreitetes bicyclisches Monoterpen ist das Rosenoxid. Je nach Isomer riecht es nach Rose oder Geranie und wird in der Parfümherstellung verwendet.

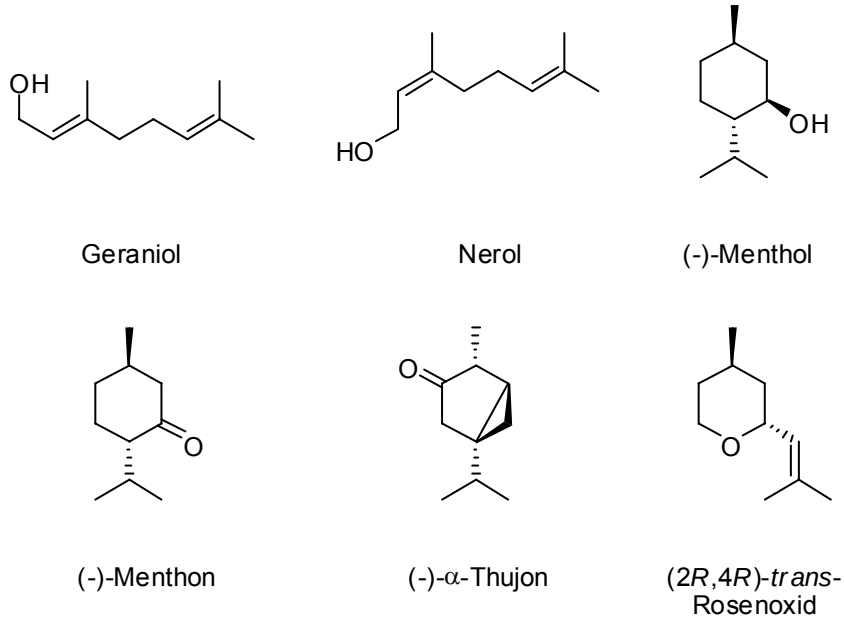


Abbildung 3.2 Beispiele für Monoterpene

Abgebildet sind die Stammverbindung der Monoterpene, das Geraniol, sein Isomer Nerol, (-)-Menthol und (-)-Menthon als Wirkstoffe aus der Pfefferminze, (-)-α-Tujon, welches den berauschenden Wirkstoff im Absinth darstellt und ein Isomer des Rosenoxids, das unter anderem in der Parfümindustrie Verwendung findet.

3.3.3 Sesquiterpene

Die Sesquiterpene bilden eine Gruppe mit rund 8000 acyclischen und mehreren hundert cyclischen Vertretern.[25] Wichtigster Vertreter und Stammverbindung der Sesquiterpene ist das Farnesol bzw. das während der Biosynthese vorkommende Farnesylpyrophopshat. Die Sesquiterpene sind ebenfalls weit verbreitet; eine wichtige Rolle spielen jedoch nur wenige Substanzen, wie zum Beispiel das entzündungshemmende Bisabolol aus der Kamille (*Matricaria chamomilla*) oder dem Bergamotteöl (*Citrus* × *limon*, Syn. *Citrus bergamia*).

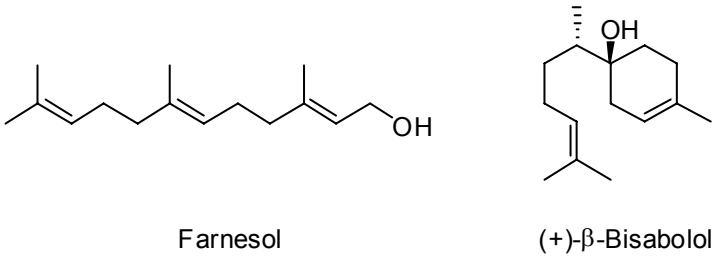


Abbildung 3.3 Beispiele für Sesquiterpene

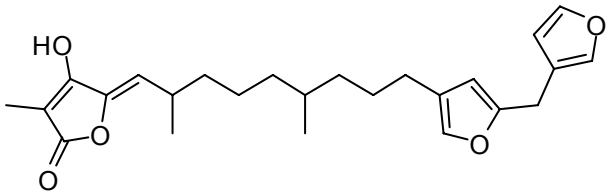
3.3.4 Diterpene

Die Diterpene leiten sich vom Phytan ab. In dieser Gruppe gibt es etwa 3000 Vertreter[25], darunter mehrere Carotinoide (siehe 3.3.9) wie das Retinol und das entsprechende Aldehyd Retinal. Beide spielen für den Sehvorgang im Auge eine essentielle Rolle. Ein weiteres zu den Diterpenen gehörendes Carotinoid ist das Crocetin und das Crocetindial, welche unter anderem im Safrankrokus (*Crocus sativus*) zu finden sind. Außerdem wird Geranylgeranylpy-

rophosphat, das eine wichtige Stufe in der Isoprenoidbiosynthese darstellt, zu den Diterpenen gezählt.

3.3.5 Sesterterpene

Die Sesterterpene (C_{25}) spielen eine untergeordnete Rolle. Die etwa 150 verschiedenen acyclische und einige cyclische Vertreter kommen vor allem in niederen Tieren und Pflanzen vor.[25] Sie wurden beispielsweise aus den Blättern der Kartoffelpflanze oder aus dem Schwamm (*Ircinia campana*) isoliert. Das aus diesem Schwamm stammende (-)-Ircinin I (Abbildung 3.4) wirkt antibakteriell.[25]

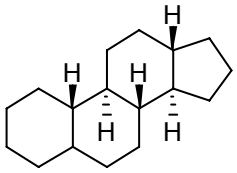


(-)-Ircinin I

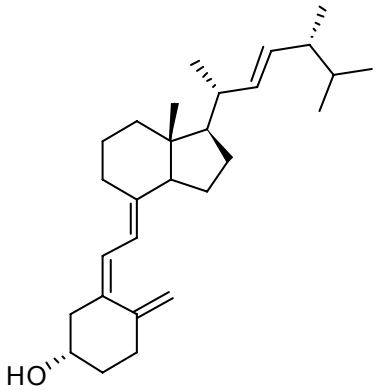
Abbildung 3.4 (-)-Ircinin I als Beispiel für ein Sesterterpen
Die abgebildete Substanz stammt aus dem Schwamm *Ircinia campana* und wirkt unter anderem antibakteriell.[25]

3.3.6 Triterpene

Die Triterpene (Abbildung 3.5), aufgebaut aus sechs Isopreneinheiten, sind mit 4000 acyclischen und vielen cyclischen Vertretern wieder deutlich weiter verbreitet.[25] Für die Synthese von Vitamin D spielt das Calciferol, ein tricyclisches Triterpen eine Rolle. Ferner ist das Grundgerüst der Steroide, das Gonan, ein tetracyclisches Triterpen.



Gonan



Calciferol

Abbildung 3.5 Beispiele für Triterpene
Dargestellt sind das Gonan, welches die Stammverbindung der Steroide darstellt und das Calciferol als Vitamin D-Vorstufe.

3.3.7 Tetraterpene

Die Gruppe der Tetraterpene besteht ausschließlich aus den ungefähr 150 Carotinoiden (siehe Kapitel 3.3.9).[25] Auch bei ihnen findet man acyclische, mono- und bicyclische Formen. Im

weiteren Sinne werden auch die Derivate der Carotinoide wie die Apocarotinoide, die Diapocarotinoide und die Megastigmane (C_{13}-Gerüst) zu den Tetraterpenen gezählt. Die Derivate enthalten meist weniger, selten mehr Kohlenstoffatome.

3.3.8 Polyterpene

Als Polyterpene (Polyprene) werden Terpene mit mehr als acht Isopreneinheiten bezeichnet. *cis*-Polyisopren findet man im Kautschuk, *trans*-Polyisopren im Guttapercha. Ein Gemisch der beiden Polyisoprene kommt in Chicle aus dem Breiapfelbaum vor. Auch die Prenylchinone wie die Ubichinone und das Vitamin E sind Polyterpene.

3.3.9 Tetraterpene oder Carotinoide

Carotinoide sind, wie bereits oben gesagt, Tetraterpene und bestehen somit aus acht Isopreneinheiten, wobei auch Carotinoide mit zusätzlichen Isopreneinheiten bekannt sind. Diese werden als Homocarotinoide bezeichnet.[28] Als Beispiel sei hier Decaprenoxanthin genannt.
Der Name „Carotinoid“ leitet sich vom lateinischen Namen der Karotte, *Daucus carota*, ab.[29] Als Carotinoide werden im Überbegriff die Carotine und die Xanthophylle verstanden. Carotine sind nur aus Kohlenstoff und Wasserstoff aufgebaut während die Xanthophylle Sauerstoffsubstituenten enthalten. Als Sauerstoffsubstituenten können Hydroxylgruppen (zum Beispiel Zeaxanthin), Epoxygruppen (zum Beispiel im Violaxanthin) und Oxogruppen (zum Beispiel im Canthaxanthin) fungieren. Weitere Modifikationen in den Carotinoiden können olefinische oder aromatische Gruppen darstellen.
Zu den Carotinen (Abbildung 3.6) zählen α-, β, γ-, δ und ε-Carotin sowie Lycopin und die noch nicht vollständig durchkonjugierten Vorstufen wie zum Beispiel Neurosporin und ζ-Carotin. Die Carotinoide unterschieden sich, da es keine weiteren Substituenten gibt, alleine in ihren Endgruppen. Im Abschnitt 3.3.9.1 zur Nomenklatur werden die Unterschiede in den einzelnen Ringen näher beschrieben. Im häufigsten Carotin, dem β-Carotin, findet man zwei β-Ringe. Das α-Carotin ist hierzu in einem Ring ein Regioisomer und besitzt einen β- und einen ε-Ring. Im ε-Carotin dagegen, welches ein weiteres Regioisomer des β-Carotins darstellt, gibt es zwei solche ε-Ringe. Ferner gibt es das γ-Carotin, bei welchem an einem Ende ein β-Ring und am anderen Ende eine offenkettige Struktur zu finden ist. δ-Carotin besteht ebenfalls aus einem offenkettetigen Ende und einem ε-Ring. An beiden Enden offenkettig ist das Lycopin und wird daher auch als ψ,ψ-Carotin bezeichnet.

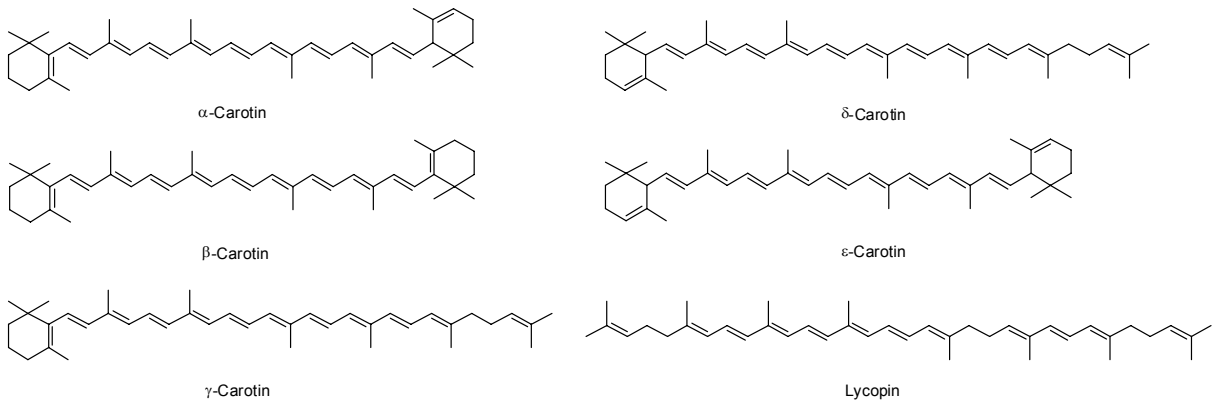


Abbildung 3.6 Verschiedene Carotinoide

Abgebildet sind α-Carotin (β,ε-Carotin), β-Carotin (β,β-Carotin), γ-Carotin (β,ψ-Carotin), δ-Carotin (ε,ψ-Carotin), ε-Carotin (ε,ε-Carotin) und Lycopin (ψ,ψ-Carotin).

Die Xanthophylle (Abbildung 3.7) sind eine wesentlich heterogenere Gruppe. Das Grundgerüst ist mit Hydroxylgruppen an verschiedenen Positionen, Epoxide und Oxogruppen substituiert; seltener sind Carboxylgruppen. Diese findet man zum Beispiel im Crocetin, von diesem ist der Safranfarbstoff Crocin abgeleitet. In ihm sind die Carboxylgruppen mit Gentiobiose verknüpft, was zur Wasserlöslichkeit führt.[30]

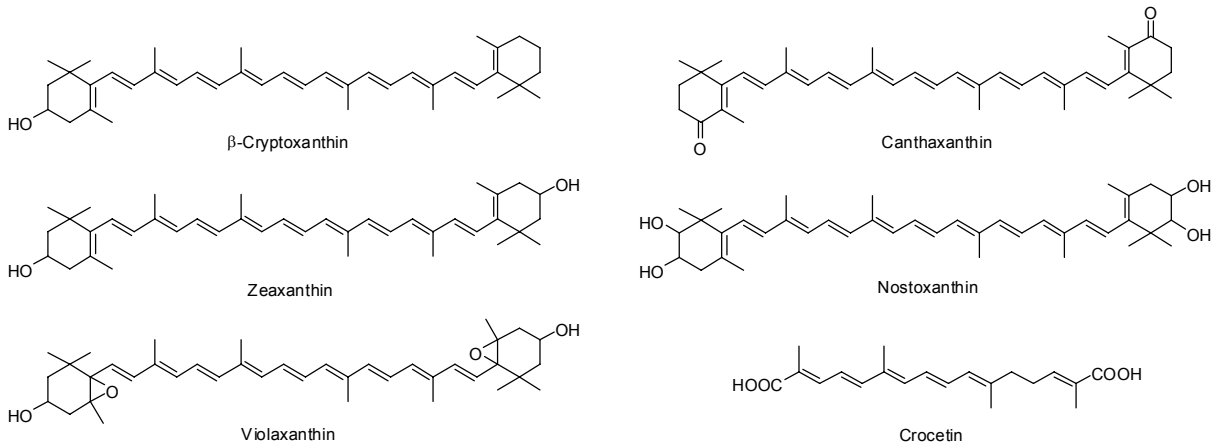


Abbildung 3.7 Beispiele für Xanthophylle

Abgebildet sind β-Cryptoxanthin, Zeaxanthin und Nostoxanthin als Beispiele für Xanthophylle mit Hydroxygruppen, Canthaxanthin als Beispiel für ein mit Oxogruppen substituiertes Xanthophyll, Violaxanthin als Xanthophyll mit Epoxygruppen und Crocetin als Beispiel für ein Xanthophyll mit Carboxylgruppen.

Aufgrund ihrer Struktur mit einer großen Zahl konjugierter Doppelbindungen absorbieren die Carotinoide intensiv Licht. Die Elektronenanregungsspektren sind für die Strukturaufklärung und für die Identifizierung von Interesse, da sie sehr spezifisch für die Substanzen sind. In der Regel erfolgt die Absorption im sichtbaren Bereich in seltenen Fällen, wie beim Phytoen, auch im UV-Bereich.

In der Regel findet man eine Feinstruktur mit drei Maxima; ein Haupt- und zwei Nebenmaxima. Die Wellenlänge der Maxima hängt sowohl von der Anzahl der konjugierten Doppelbindungen als auch von der Struktur ab. So zeigt zum Beispiel das β-Carotin eine weniger

ausgeprägt Feinstruktur als Lycopin, da bei β-Carotin die planare Struktur nicht mehr vollständig vorhanden ist. Die Methylgruppen in der Polyenkette und in den Ringen hindern sich sterisch. Dadurch wird die vollständige Überlappung der π-Orbitale verhindert. Dieser Effekt führt dann zu einer hypsochromen Verschiebung der Wellenlänge,[30] weshalb das Hauptmaximum von Lycopin bei 474 nm und das von β-Carotin bei 452 nm (jeweils in Aceton)[31] liegt. Oxogruppen heben die Feinstruktur auf, sofern sie mit der Kette konjugieren. Daneben findet man eine bathochrome Verschiebung. So hat Canthaxanthin in Benzol ein Maximum bei 484 nm im Vergleich zu β-Carotin bei 462 nm.[31] Als Konstante der Feinstruktur wird das Verhältnis in Prozent der Absorptionsdifferenz des dritten Maximums zum Minimum zwischen zweitem und dritten Maximum und der Absorptionsdifferenz des zweiten Maximums zum Minimum angegeben (% III/II, Abbildung 3.8).

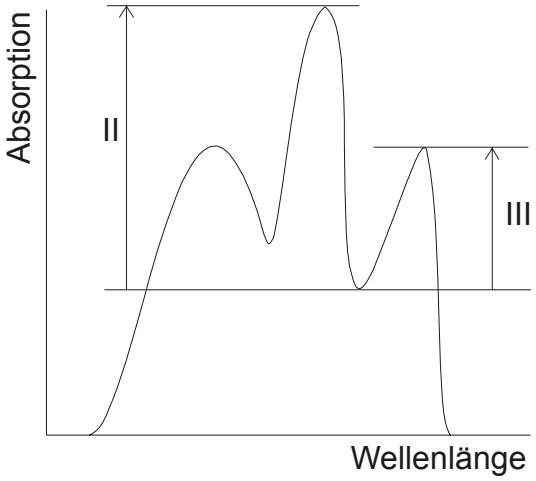


Abbildung 3.8 Feinstruktur eines Absorptionsspektrums und Bestimmung der Konstante % III/II

Ferner ändert sich mit der Molekülsymmetrie das spektroskopische Verhalten. Dies kann zur Identifizierung von *cis*- oder (*Z*)-Isomeren verwendet werden. Da in (all-*E*)- oder *trans*-Isomeren ein Symmetriezentrum vorliegt, sind bestimmte Übergänge verboten. Bei einer (*Z*)-Bindung im Molekül sind diese Übergänge erlaubt und machen sich zum einen durch das Auftreten eines zusätzlichen Signals, dem (*Z*)- oder *cis*-Peak, bei einer Wellenlänge die in Hexan etwa 142 nm niedriger liegt als das Hauptmaximum, bemerkbar. Ferner kann eine hypsochrome Verschiebung von 2 bis 6 nm, ein starker hypochromer Effekt und eine Reduzierung der Feinstruktur beobachtet werden. Außerdem kann als Faustregel angenommen werden, dass eine (*Z*)-Doppelbindung die näher am Symmetriezentrum liegt, einen stärkeren (*Z*)-Peak hervorruft als eine, die weiter entfernt ist.[31]

3.3.9.1 Nomenklatur

Die Nomenklatur der Carotinoide ist geprägt von Trivialnamen, da die systematischen Namen sehr lang und unübersichtlich sind. In Tabelle 3.2 sind einige Trivial- und systematische Namen angegeben.

Tabelle 3.2 Übersicht über einige der Trivial- und systematischen Namen der Carotinoide

Trivialname	Systematischer Name
α-Carotin (α,ε-Carotin)	1,3,3-Trimethyl-2-((1*E*,3*E*,5*E*,7*E*,9*E*,11*E*,13*E*,15*E*,17*E*)-3,7,12,16-tetramethyl-18-(2,6,6-trimethylcyclohex-2-enyl)octadeca-1,3,5,7,9,11,13,15,17-nonaenyl)cyclohex-1-en
β-Carotin (β,β-Carotin)	2,2'-((1*E*,3*E*,5*E*,7*E*,9*E*,11*E*,13*E*,15*E*,17*E*)-3,7,12,16-Tetramethyloctadeca-1,3,5,7,9,11,13,15,17-nonaen-1,18-diyl)bis(1,3,3-trimethylcyclohex-1-en)
β-Cryptoxanthin	(*R*)-3,5,5-trimethyl-4-((1*E*,3*E*,5*E*,7*E*,9*E*,11*E*,13*E*,15*E*,17*E*)-3,7,12,16-Tetramethyl-18-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)octadeca-1,3,5,7,9,11,13,15,17-nonaenyl)cyclohex-3-enol
Lycopin	(6*E*,8*E*,10*E*,12*E*,14*E*,16*E*,18*E*,20*E*,22*E*,24*E*,26*E*)-2,6,10,14,19,23,27,31-Octamethyldotriaconta-2,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24,26,30-tridecaen
Zeaxanthin	(1*R*,1'*R*)-4,4'-((1*E*,3*E*,5*E*,7*E*,9*E*,11*E*,13*E*,15*E*,17*E*)-3,7,12,16-Tetramethyloctadeca-1,3,5,7,9,11,13,15,17-nonaen-1,18-diyl)bis(3,5,5-trimethylcyclohex-3-enol)

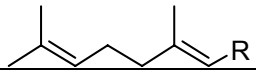
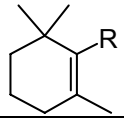
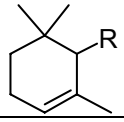
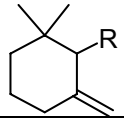
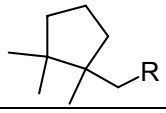
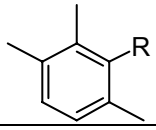
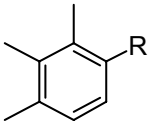
Jedoch werden auch die Trivialnamen nach Nomenklaturregeln gebildet. Auf für diese Arbeit wichtige Regeln wird im Folgenden kurz eingegangen.

Bei den Carotinoiden werden die Gerüstatome nicht durchgehend nummeriert wie dies für gewöhnlich der Fall ist. Vielmehr werden von der ersten Verzeigungsstelle bis zur Mitte des Moleküls die Atome mit 1 bis 15 bezeichnet und anschließend die Methylgruppen von 16 bis 20 nummeriert. In der anderen Hälfte des Moleküls werden die Atome dann entsprechend von 1’ bis 20’ bezeichnet. Bei Cyclisierungen an den Enden wird diese Nummerierung beibehalten.

Stammname aller Verbindung ist „Carotin“. Die acyclischen und cyclischen Enden werden je nach Struktur mit griechischen Kleinbuchstaben benannt (Tabelle 3.3). Eine offenkettige Struktur wie im Lycopin wie mit ψ bezeichnet. Bei den vom Cyclohexan und Methylencyclohexan abgeleiteten Ringen werden je nach Lage der Doppelbindung β, ε und γ für die Regioisomere verwendet. Dabei ist zu beachten, dass α- und γ-Carotin nicht von einer entsprechenden Struktur abgeleitet sind, sondern Trivialnamen des β,ε- bzw. β,ψ-Carotins sind und ein ε-Carotin nicht existiert. Ein vom Cyclopentan abgeleiteter Ring wird als κ bezeichnet. Die beiden aromatischen Regioisomere werden je nach Position der Kette als φ oder χ bezeichnet.

Die Buchstaben werden nach ihrer Folge im griechischen Alphabet vor den Stammnamen gesetzt.

Tabelle 3.3 Struktur- und Summenformel, Art der Grundstruktur und Präfix von Carotinoidendgruppen

Struktur	Beschreibung	Formel	Präfix
	Offenkettig	C_9H_{15}	ψ
	Cyclohexan	C_9H_{15}	β
	Cyclohexan	C_9H_{15}	ε
	Methylencyclohexan	C_9H_{15}	γ
	Cyclopentan	C_9H_{17}	κ
	arylisch	C_9H_{11}	φ
	arylisch	C_9H_{11}	χ

Substituenten werden unter Angabe des Ortes und der Art (zum Beispiel β,β-Carotin-3,3'-diol für Zeaxanthin) angegeben.

Ist die Kette verkürzt, wird dies unter der Angabe der Position und des Präfixes „Apo-„ kenntlich gemacht (zum Beispiel Apo-8'-carotinal).

3.3.9.2 Natürliches Auftreten und Funktion der Carotinoide

Sichtbar wird das Vorkommen von Carotinoiden an der meist gelb-orangefarbenen bis rot-orangefarbenen Farbe von Blättern oder Früchten, wobei die Menge und Art der Carotinoide dabei sehr unterschiedlich ist. Die Hauptfunktion finden die Carotinoide in ihrer Wirkung als Lichtsammelpigmente für Photosynthese. Ferner schützen sie vor Strahlung und haben antioxidative Wirkung.

Von den Carotinoiden werden jährlich schätzungsweise 100 Millionen Tonnen in der Natur gebildet,[32] wobei Fucoxanthin und Peridinin die mengenmäßig am häufigsten in der Natur vorkommenden Carotinoide sind. Fucoxanthin ist als das Hauptcarotinoid des braunen Tanges und einiger Mikroalgen an der Jahresproduktion mit etwa 10 Millionen Tonnen beteiligt. Pe-

ridinin, wird hauptsächlich in Dinoflagellaten als Hauptcarotinoid gefunden (Abbildung 3.9).[32]

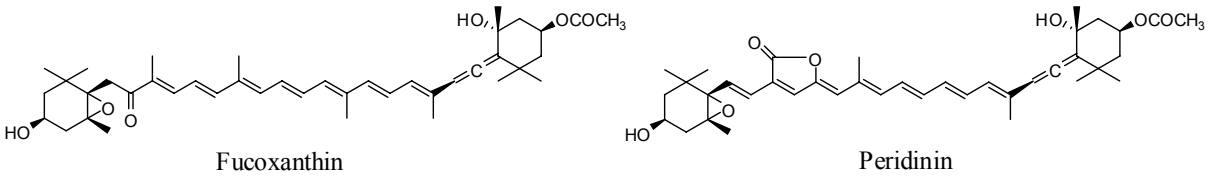


Abbildung 3.9 Fucoxanthin und Peridinin sind wahrscheinlich die in größter Menge natürlich produzierten Carotinoide

Auch in vielen Landpflanzen, insbesondere in den Plastiden der photosynthetisch aktiven Zellen, können Carotinoide gefunden werden. Tiere nehmen sie über die Nahrung auf und können sie nicht selbst synthetisieren. Jedoch kommen sie auch hier vielfältig vor, sei es als Schmuck oder aus funktionellen Gründen, wie zum Beispiel im gelben Fleck des Auges.

In den photosynthetisch aktiven Zellen sammeln die Carotinoide durch Absorption Lichtenergie und dienen auch dem Schutz vor überschüssiger Energie. Hierzu dient der Xanthophyllzyklus, bei welchem überschüssige Energie durch die Bildung von Zeaxanthin aus Violaxanthin über die Zwischenstufe Antheraxanthin abgebaut wird und keine reaktive Sauerstoffspecies entstehen können.

Für die Sehfunktion im Auge essentiell sind die aus C_{20}-Körpern aufgebauten Vitamin A-Derivate Retinol (Vitamin A), Retinal und Retinsäure. Sie werden aus Carotinoiden mit mindestens einem β-Ring im Körper hergestellt, wobei der Tagesbedarf eines Erwachsenen bei etwa 0,8 bis 1 mg liegt. 75 % werden dabei durch Retinol, meist als Fettsäureester, zum Beispiel Retinylpalmitat, und zu 25 % aus β-Carotin und anderen Provitamin A-wirksamen Carotinoiden gedeckt. Wegen der unvollständigen Spaltung entspricht 1 mg Retinol 6 mg (all-*E)*-β-Carotin und 12 mg anderen Provitamin A-Carotinoiden.[30]

Die Sehfunktion erfolgt durch die Proteingruppe der Opsine. Die Photopsine (Zapfen-Topsine) in den Zapfen sind für das Farbsehen und das Skotopsin (Stäbchen-Topsin) in den Stäbchen ist für das Sehen in Dämmerung und Dunkelheit verantwortlich.

Beim Menschen wird in den Stäbchen (11-*Z*)-Retinal an das Protein Skotopsin als Imin gebunden. Das entstandene Rhodopsin absorbiert bei 500 nm. Lichteinfall führt zur Konformationsänderung zum (all-*E*)-Retinal, was wiederum zu einer Konformationsänderung des Rhodopsins und damit zu einer Aktivierung des Transducins führt. Dieses löst dann die Signalkaskade aus.

In den Zäpfchen ist dieser Mechanismus gleich aufgebaut, jedoch werden hier Porphyropsin (Absorptionsmaximum bei 535 nm), Iodopsin (Absorptionsmaximum bei 565 nm) und Cyanopsin (Absorptionsmaximum bei 420 nm) gebildet.[31]

Carotinoide sind in der Lage in einer sehr schnellen Reaktion ($k = 5 \cdot 10^9$ l /mol · s) Singulett-Sauerstoff durch Aufnahme von Energie in den energieärmeren Triplett-Sauerstoff umzuwandeln. Ferner fangen sie auch Peroxide ab.[30]

Einige Forschungen deuten auch darauf hin, dass Carotinoide der altersbedingten Makulardegenerierung, die letztendlich zur Erblindung führt, vorbeugen kann.[33] Außerdem kann durch Carotinoide die Entstehung oder Verbreitung von Krebszellen behindert werden.[34-36]

3.3.9.3 Verwendung der Carotinoide im technischen Bereich

Carotinoide werden in erster Linie als Farbstoffe für Lebens-, Futter- und Arzneimittel verwendet. Die Anwendung ist in Deutschland bundes- und europarechtlichen Vorschriften unterworfen.

Tabelle 3.4 gibt eine Übersicht über die für Lebens- und Futtermittel zugelassenen Farbstoffe. Neben reinen Farbstoffen sind unter den E-Nummern 161y und 161z auch zwei Stämme der astaxanthinreichen Hefe *Phaffia rhodozyma* zugelassen, die Fischfutter bis zu einer Menge von 100 mg/kg Futtermittel zugesetzt werden dürfen.[37]

Tabelle 3.4 Übersicht über in Deutschland und der EU zugelassene Carotinoide zum Färben von Lebens- und Futtermitteln

A und B in der Spalte Lebensmittel stehen für Teil A (Farbstoffe, die für Lebensmittel allgemein, ausgenommen bestimmte Lebensmittel, zugelassen sind) bzw. Teil B (Farbstoffe, die für bestimmte Lebensmittel zugelassen sind) der Anlage 1 der Zusatzstoff-Zulassungsverordnung. Zusammengestellt aus der Zusatzstoff-Zulassungsverordnung[38], der Handreichung des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit[37] und der Mitteilung 2004/C 50/01 der Europäischen Kommission[39].

E-Nummer	Bezeichnung	Lebensmittel	Futtermittel
E 160a	Carotine (gemischte Carotine, β-Carotin)	A	+
E 160b	Annatto, Bixin, Norbixin	B	
E 160c	Paprikaextrakt, Capsanthin, Capsorubin	A	+ (Capsanthin)
E 160e	β-Apo-8'-carotinal	B	+
E 160f	β-Apo-8'-carotinsäureethylester	B	+
E 161b	Lutein	B	+
E 161c	Cryptoxanthin	-	+
E 161g	Canthaxanthin	B	+
E 161h	Zeaxanthin	-	+
E 161i	Citranaxanthin	-	+
E 161j	Astaxanthin	-	+
E 161y	astaxanthinreiche *Phaffia rhodozyma* (ATCC SD 5340)	-	+
E 161z	astaxanthinreiche *Phaffia rhodozyma* (ATCC 74219)	-	+

Der Anwendungsbereich der einzelnen Farbstoffe ist sehr unterschiedlich. Während einige, wie die Carotine allgemein und ohne Mengenbeschränkung verwendet werden dürfen, sind

andere auf bestimmte Lebens- oder Futtermittel beschränkt. So sind Astaxanthin und die astaxanthinreichen Hefen ausschließlich für Fischfutter zugelassen, wo sie der Pigmentierung des Fleisches bei Lachsen oder Regenbogenforellen („Lachsforellen“) dienen. Die Hauptanwendung im Futtermittelbereich ist der Zusatz zu Legehennenfutter um eine stärkere Pigmentierung des Eigelbs zu erreichen. Im Lebensmittelbereich werden mit Carotinoiden beispielsweise Käserinden, Wursthüllen, Lachsersatz, Senf, Likören, Speiseeis und Schmelzkäse gefärbt; fast immer ist eine Mengenbegrenzung festgelegt. Auch Carotinoide ohne Mengenbeschränkung, zum Beispiel β-Carotin, dürfen nur in der erforderlichen Menge (*quantum sartis*) verwendet werden. Die lebensmittelrechtlich zugelassenen Carotinoide dürfen auch zur Färbung von Arzneimitteln verwendet werden.[40]

In Nahrungsergänzungsmitteln und funktionellen Lebensmitteln dürfen auch nicht lebensmittelrechtlich zugelassene Carotinoide verwendet werden, wenn sie einen physiologischen Zweck, wie die Vorbeugung der altersbedingten Makulardegeneration, haben. Hier darf beispielsweise auch Zeaxanthin verwendet werden.

3.4 Biosynthese von Carotinoiden

Bei der Biosynthese von Carotinoiden findet man ihn das Isopren in Form des „aktivierten Isoprens“ als Isopentenylpyrophosphats (IPP) und des Dimethylallylpyrophosphats (DMAPP).[41] Daraus werden in mehreren Schritten verschieden lange Terpene aufgebaut, wobei in nicht-carotinoid produzierenden Organismen Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) die Endstufe darstellt. Aus zwei Molekülen GGPP wird dann Phytoen aufgebaut, welches in mehreren Schritten vollständig durchkonjugiert wird. Das gebildete Lycopin ist der Grundbaustein für alle folgenden Carotinoide. An ihm werden je nach Syntheseziel verschiedene Modifikationen, wie Cyclisierungen oder Hydroxylierungen vorgenommen.

3.4.1 Generierung der Vorstufen bis Isopentenylpyrophosphat

Für die Biosynthese des IPP und DMAPP gibt es den Acetat-Mevalonat- und den Desoxyxylulosephosphat-Weg. Der Acetat-Mevalonatweg (3.4.1.1) wurde 1959 von Bloch, Lynen und Cornfort als Syntheseweg bei Tieren und Hefen beschrieben.[42-44] Lange Zeit galt er als einzige Möglichkeit Isoprenoide aufzubauen[45] und wurde auch in weiteren Eukaryonten und einigen Archea gefunden.[46] 1993 wurde ein neuer Stoffwechselweg gefunden[46], der als Desoxyxylulosephosphat-Weg, Triose-Pyruvat-Weg[47] oder nach einem seiner Erstbeschreiber als Rohmer-Weg bezeichnet wird.[47]

3.4.1.1 Acetat-Mevalonat-Weg

Beim Acetat-Mevalonat-Weg (MVA-Weg, Abbildung 3.10) wird im ersten Schritt in einer Claisen-ähnlichen Kondensationsreaktion mit der Acetyl-CoA-Thiolase (EC: 2.3.1.9) aus zwei Molekülen Acetyl-CoA, unter Abspaltung von CoA-SH, Acetoactyl-CoA gebildet. In einer Aldol-ähnlichen Reaktion wird diese Molekül dann mit einem weiteren Acetyl-CoA zu (3*S*)-Hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) umgesetzt. Die Reaktion wird von der HMG-glutaryl-CoA-Synthase (EC: 2.3.3.10) katalysiert. Anschließend wird aus HMG-CoA durch zwei Reduktionen mittels der HMG-CoA-Reduktase (EC: 1.1.1.34) unter NADPH-Verbrauch (3*R*)-Mevalonsäure gebildet. Diese Substanz wird unter ATP-Verbrauch durch das Enzym Mevalonatkinase (EC: 2.7.1.36) zunächst zu Mevalonat-5-phosphat und anschließend durch die Phosphomevalonatkinase (EC: 2.7.4.2) zu Mevalonat-5-pyrophosphat umgesetzt. Das gewünschte Isopentenylpyrophosphat wird daraus schließlich durch eine Decarboxylase (EC: 4.1.1.33) gebildet.

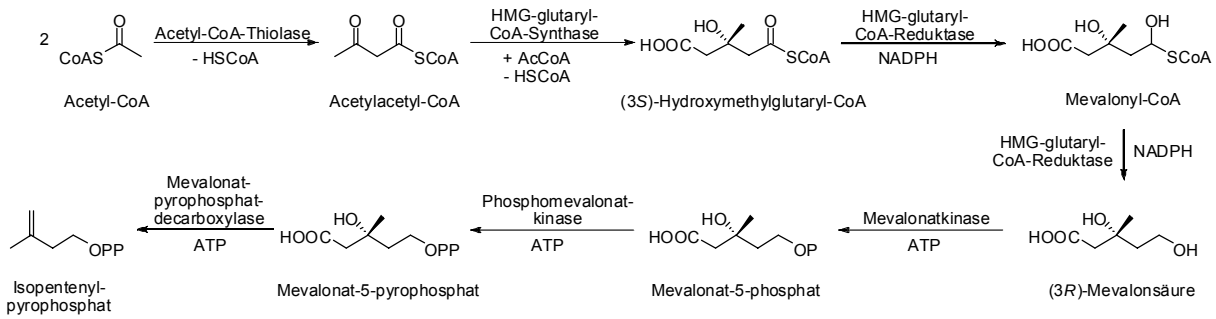


Abbildung 3.10 Bildung von Isopentenylpyrophosphat im Mevalonatweg

Aus zwei Molekülen Acetyl-CoA wird in mehreren Schritten zunächst Mevalonsäure gebildet. Diese wird dann zweifach phosphoryliert und schließlich decarboxyliert. Man erhält Isopentenylpyrophosphat als „aktiviertes Isopren“.

3.4.1.2 Desoxyxylulosephosphat-Weg

Der Desoxyxylulosephosphat-Weg (DXP-Weg, Triose-Pyruvat-Weg, *Rohmer-Pathway*[47], Abbildung 3.11) ist eine Alternative zum Acetat-Mevalonat-Weg. Er wurde 1993 von Rohmer und Kollegen erstmalig beschrieben[46] und wird in erster Linie in Bakterien gefunden. Der Name leitet sich vom ersten Produkt im Stoffwechselweg, der 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXS) ab.

Ausgangssubstanzen für den DXP-Weg sind die Glucosemetabolite Pyruvat und Glycerinaldehyd. Sie werden von der 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase (Dxs, EC: 2.2.1.7) zunächst zu 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXS) umgesetzt. Anschließend erfolgt die Reduktion und Umlagerung einer Hydroxylgruppe durch die 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate-Reduktoisomerase (Dxr, IspC, EC: 1.1.1.267) zu 2C-Methyl-D-erythritol, welches

dann mittels einer 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythriol-Synthase (IspD, EC: 2.7.7.60) und einem Aminopyrimidin zu 4-(Cytidine-5'-diphospho)-2C-methyl-D-erythritol umgesetzt wird. Nach einer weiteren Phosphorylierung, katalysiert durch die 4-Diphosphocytidyl-2C-methylerythritol-Kinase (IspE, EC: 2.7.1.148) erfolgt ein Ringschluss in welchem der Aminopyrimidin wieder abgespalten wird. Letztere Reaktion wird durch die 2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat-Synthase (IspF, EC: 4.6.1.12) katalysiert. Nach einer Ringöffnung wird die Hydroxylgruppe mittels einer (*E*)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphat-Synthase (IspG, EC: 1.17.7.1) abgespalten. In einem letzten Schritt erfolgt aus dem 1-Hydroxy-2-methyl-2-butenyl-4-diphosphat die Synthese von IPP und DMAPP. Die Reaktion wird durch die 4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphat-Reduktase (IspH, EC: 1.17.1.2) katalysiert. Die beiden gebildeten Isoprenoidvorläufer können durch eine Isomerase ineinander umgewandelt werden. Das Enzym, die Isopentenyldiphosphat-Isomerase (Idi), gehört in die Enzymklasse 5.3.3.2 und konnte in verschiedenen Bakterien gefunden werden. In *P. putida* KT2440 ist jedoch bislang keine Sequenz annotiert (Stand: Februar 2010).

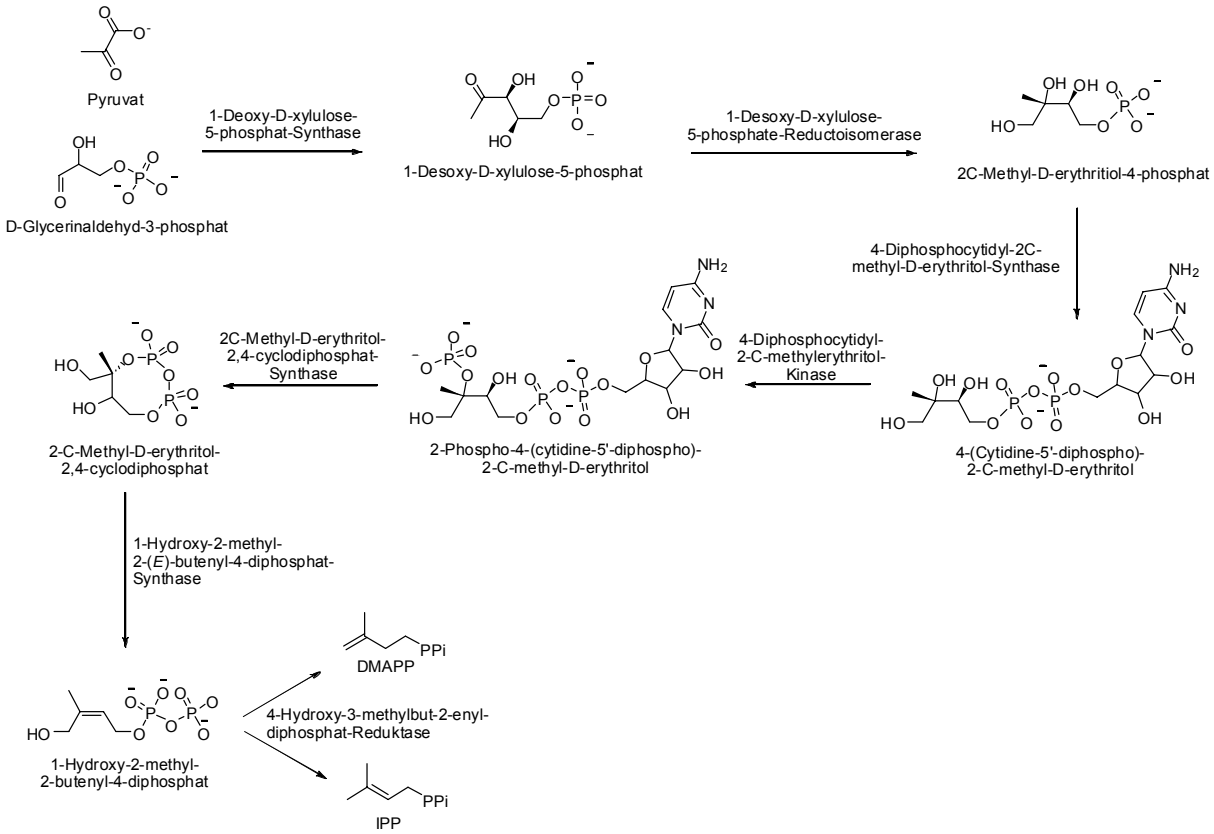


Abbildung 3.11 DXP-Weg zur Synthese von IPP und DMAPP

Zur Steigerung der Carotinoidproduktion wurden verschiedene Untersuchungen des DXP-Weges in *E. coli* vorgenommen. Die Steigerung der Lycopinausbeute durch die zusätzliche Expression der Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase Dxs wurde in mehreren Studien ge-

zeigt. [48] Kim und Keasling steigerten die Lycopinausbeute durch die zusätzliche Expression der Gene *dxr* und *dxs*; gleichzeitig zeigten sie auch, dass eine mittlere Kopienzahl des Plasmids positiv war.[49] Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Kang und Kollegen 2005, welche, neben *dxs*, die Transkriptionsregulatoren *appY* und *crl* und den RNS-Polymerasesigmafaktor S *rpoS* als limitierend für die Lycopinproduktion identifiziert. Wurde das nicht direkt am Lycopinsyntheseweg beteiligte *appY* und *dxs* jeweils einzeln koexprimiert, stiegen die Ausbeuten auf etwa 2,8 mg/g Biotrockenmasse, bei einer gemeinsamen Koexpression wurden 4,7 mg/g erreicht, während ohne Koexpression nur 0,6 mg/g erzielt werden konnte.[50]
Auch mit der Überexpression von *idi* konnte in anderen Untersuchungen die Ausbeute an Lycopin um das 3,6 bis 4,5fache, an β-Carotin um das 2,7fache und für Astaxanthin um das 6fache gesteigert werden. Wurden *crtE*, *idi*, die Geranyltransferase *ispA* und eine Geranylgeranylpyrophosphatsynthase (*gps*) zusätzlich exprimiert, konnte die Astaxanthinausbeute, je nach Kombination, bis um das zwölffache gesteigert werden. [48]

3.4.2 Aufbau der Carotinoide bis zum β-Carotin

Nach der Bildung von Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) wird aus einer je einem dieser Moleküle zunächst Geranylpyrophosphat (GPP) gebildet. Anschließend wird mit einem weiteren Molekül IPP in einer Kondensationsreaktion zunächst Farnesylpyrophosphat (FPP) und schließlich Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) synthetisiert (Abbildung 3.12). Diese Reaktion wird durch eine Geranyltransferase *IspA* (EC 2.5.1.10) katalysiert.[45]

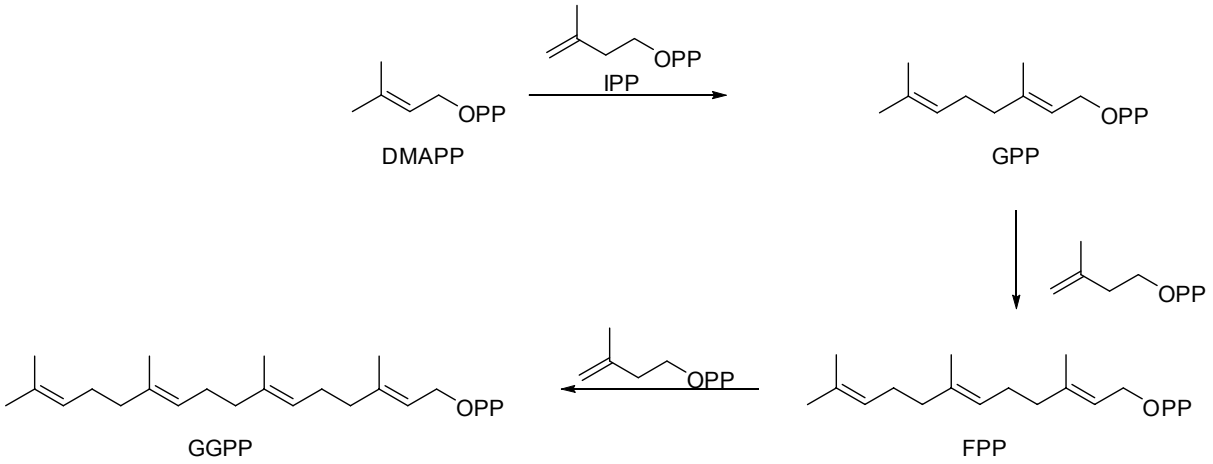


Abbildung 3.12 Geranyltransferase-katalysierte Synthese von Geranylgeranylpyrophospht aus Dimethylallylpyrophosphat und Isopentenylpyrophosphat[45]

Durch mehrfache Kondensation von Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) und Isopentenylpyrophosphat (IPP) entstehen Geranylpyrophospht (GPP), Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP).

Mechanistisch wird zunächst wird Pyrophosphat am DMAPP frei, am IPP wird ein Proton am C2-Atom eliminiert und es bildet sich eine neue Doppelbindung in Richtung C3 des IPP aus. Die bisherige Doppelbindung zwischen C3 und C4 bildet eine neue Bindung zum C1 des DMAPP aus (Abbildung 3.13).

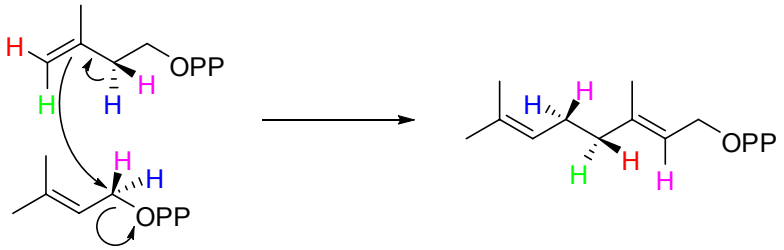


Abbildung 3.13 Mechanismus der Kondensationsreaktion von Isopentenylpyrophosphat und Dimethylallylpyrophosphat

Unter Ausbildung einer Bindung vom C4-Atom des DMAPP (oben) zum C2-Atom des IPP (unten) wird das Proton am C2-Atom des DMAPP eliminiert. Am IPP wird ein Pyrophosphat abgespalten. (Abbildung modifiziert nach [45])

Zwei Moleküle GGPP kondensieren schließlich und es bildet sich das erste Tetraterpen Phytoen, welches aber noch nicht farbig ist, sondern sein Absorptionsmaximum im UV-Bereich (Hauptmaximum 286 nm in Hexan[31]) hat. In der Regel wird (15*Z*)-Phytoen gebildet. Nur in einigen Bakterien wie etwa *Mycobacterium* sp. und *Cellulomonas dehydrogenans* wird die (all-*E*)-Form beobachtet.

Die Bildung von Lycopin aus Phytoen verläuft in mehreren Stufen (Abbildung 3.14) und wird durch die Phytoendesaturase CrtI katalysiert. Zunächst wird nur auf einer Seite eine neue Doppelbindung ausgebildet; es entsteht das hellgelbe Phytofluen mit einem Hauptmaximum von 348 nm in Hexan.[31] Anschließend erfolgt die Ausbildung einer weiteren Doppelbindung. Dies erfolgt entweder unter Bildung von unsymmetrischem ζ-Carotin (7,8,11,12-Tetrahydrolycopin), auf der gleichen Seite wie im letzten Schritt oder symmetrisch zur Mitte unter Bildung von symmetrischem ζ-Carotin (7,8,7',8'-Tetrahydrolycopin). ζ-Carotin ist ebenfalls hellgelb mit einem Hauptmaximum von 400 nm in Hexan im Fall des symmetrischen ζ-Carotin und 395 nm im Falle des unsymmetrischen ζ-Carotin.[31]

In den nächsten beiden Schritten werden dann noch zwei weitere Doppelbindungen ausgebildet, wobei zunächst Neuorsporin und dann Lycopin entsteht. Dabei verschiebt sich das Hauptmaximum weiter zu längeren Wellenlängen (440 nm für Neuorsporin und 470 nm für Lycopin).[31]

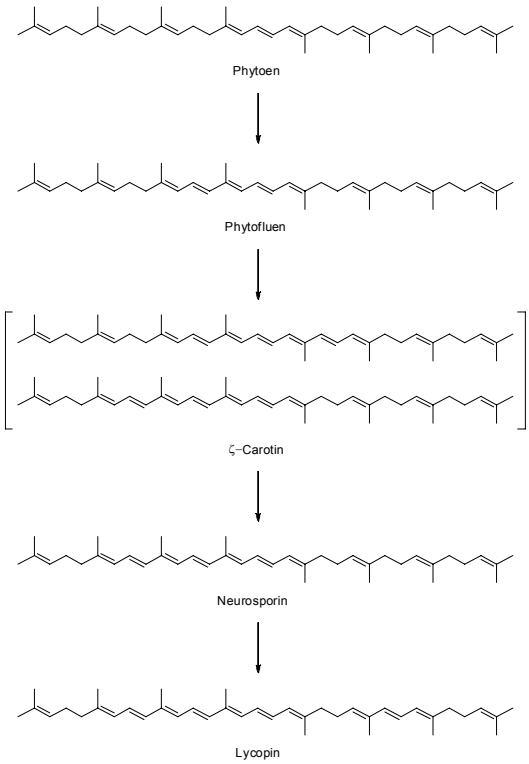


Abbildung 3.14 Biosynthese von Lycopin aus Phytoen[45]

Die von der Phytoendesaturase CrtI katalysierte Reaktion verläuft in mehreren Stufen über das Phytofluen, das ζ-Carotin, das Neuosporin und das Lycopin, welches als das erste farbige Carotinoid angesehen wird.

In diesem Schritt bildet sich auch die (all-*E*)-Form der Carotinoide aus. Die kann an unterschiedlichen Stellen stattfinden. Jedoch ist der Schritt von Organismus zu Organismus unterschiedlich. Bei einigen findet dieser Schritt auf dem Weg vom Phytoen zum Phytofluen (zum Beispiel *Flavobcterium* R1560 oder *Rhodospirillum rubrum*) oder vom Phytofluen zum ζ-Carotin (zum Beispiel in der Grünalge *Chlorella pyrenoidosa*) statt.[45]

Anschließend kann die Zyklisierung oder andere Modifikationen der Enden erfolgen. Bei der Zyklisierung können, je nach eliminiertem H-Atom drei nichtaromatische Ringformen gebildet werden (Abbildung 3.15); welches eliminiert wird, ist enzymabhängig.

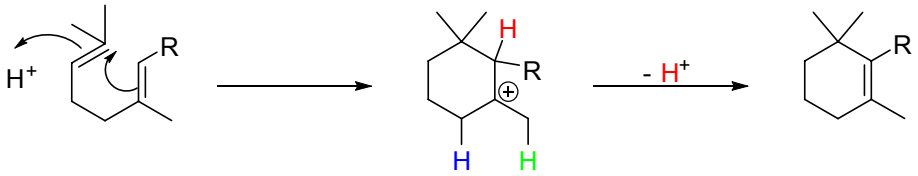


Abbildung 3.15 Mechanismus der Zyklisierung, hier unter Bildung eines β-Ringes[45]

Bei Eliminierung des rot markierten H-Atoms entsteht der β-Ring. Wird das grün gefärbte H-Atoms eliminiert bildet sich der γ-Ring und bei Eliminierung des blau gefärbten H-Atoms der ε-Ring.

3.4.3 Hydroxylierung von β-Carotin

Für die Hydroxylierung von β-Carotin stehen verschiedene Enzyme zur Verfügung, wobei es hämenthaltende und hämfreie Hydroxylasen gibt. Zur ersteren Gruppe gehört die Cytochrom-P450-Monooxygenase CYP175A1 aus *Thermo thermophilus* HB27. Nachdem sie 2003 kloniert, funktionell exprimiert und charakterisiert wurde[51], konnte ein Jahr später *in vivo* die Hydroxylierung von β-Carotin zu Zeaxanthin gezeigt werden.[52] Nebenprodukt war das einfach hydroxylierte β-Cryptoxanthin.[53]

Die weitaus größere Gruppe bilden die β-Carotinhydroxylasen (CrtZ) ohne Hämgruppe. Man findet sie unter anderem in *Pantoea ananatis*[54]. Ferner findet man solche Hydroxylasen in *Brevundimonas* sp. SD212, *Paracoccus* sp. PC1 und *Paracoccus* sp. N81106. Die genannten wurden von Choi *et al.* 2006 hinsichtlich ihrer Fähigkeit β-Carotin zu hydroxylieren geprüft, wobei aber keine Mengenangaben gemacht wurden.[55] Zu den CrtZ ist nur wenig bekannt, da bislang keine Kristallstrukturen vorliegen und Versuche in der Regel *in vivo* ohne Mengenangaben durchgeführt werden.

3.4.4 Synthese von Carotinoiden in rekombinanten bakteriellen Systemen

Die Synthese von Carotinoiden in Mikroorganismen bietet eine Alternative zu den chemisch relativ aufwendigen Synthesen.[56] Neben Extraktionen aus carotinoidproduzierenden Bakterien wie zum Beispiel *Dunaliella salina* oder *Haematococcus pluvialis* wurden Gene vornehmlich aus *Pantoea anantis* (vormals: *Ewinia uredovora*) in anderen Mikroorganismen, vor allem *Escherichia coli,* exprimiert. Bei diesem Bakterium werden ausreichende Mengen der Carotinoidvorstufen exprimiert und es hat ausreichend hohe Lagerkapazitäten für Carotinoide.[57]

In diesem Organismus wurden verschiedene Ansätze zum *Metabolic Engineering* unternommen. Tabelle 3.5 gibt eine Übersicht über Ausbeuten die in *E. coli* erreicht werden konnten. Dabei wurden Untersuchungen im MVA-, im DXP-Weg und teilweise an anderen Stellen durchgeführt. Je nach Versuchsbedingungen schwankt die Produktmenge stark und die angegebenen Werte sind nur eingeschränkt vergleichbar, da sich die Mengenangaben teilweise auf das Volumen und teilweise auf die Biotrockenmasse beziehen.

Tabelle 3.5 Übersicht über die Ausbeute von verschiedenen Carotinoiden in *E. coli*[56]
Angegeben wurden jeweils die besten Ausbeuten.

Produkt	Ausbeute	Referenz
Lycopin	4,28 mg/l	Vadali *et al.*, 2005[58]
Lycopin	6,6 mg/g	Alper *et al.*, 2005[59]
Lycopin	59 mg/l	Yoon *et al.*, 2007[60]
Zeaxanthin	0,82 mg/g	Nishizaki *et al.*, 2007[61]
β-Carotin	6 mg/g	Yuan *et al.*, 2006[62]
β-Carotin	49,3 mg/g	Yoon *et al.*, 2007[63]

Die meisten Untersuchungen wurden zum Lycopin als Produkt vorgenommen. Dabei wurden volumetrische Ausbeuten zwischen 4,28 mg/l und 59 mg/l und Ausbeuten bezogen auf die Biotrockenmasse zwischen 4,7 mg/g und 22 mg/g gefunden.

Vadali und Kollegen untersuchten die Produktion von Lycopin in *E. coli* und konstruierten einen neuen Mevalonat-Weg. Je nach Stamm und Bedingungen erhielten sie Werte zwischen 0,52 mg/l und 4,28 mg/l.[58] Alper und seine Kollegen verwendeten verschiedene *knock-out*-Mutanten von *E. coli* zur Steigerung der Lycopinausbeute. Sie erhielten im Wildtyp 4,7 mg/g und in der besten Dreifachmutante (*gdhA*, *aceE*, *fdhF*) 6,6 mg/g.[59] Auch Yoon *et al.* untersuchten die Lycopinproduktion in *E. coli* unter Verwendung von Genen aus *Pantoea ananatis* und *Pantoea agglomerans*. Sie fanden nach 48 h mit den lycopinproduzierenden Genen aus *P. agglomerans* ohne Induktion 27 mg/l. Dieser Wert war deutlich höher als nach Induktion mit 0,1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG), wo nur etwa 1 mg/l gefunden wurde. Wurden die Gene aus *P. ananatis* verwendet, konnten nach Induktion 12 mg/l und ohne Induktion 4 mg/l Lycopin in den Zellen gefunden werden. Die Zufütterung von Mevalonat erhöhte die Ausbeute bei Genen aus *P. agglomerans* weiter auf 59 mg/l ohne Induktion und 4 mg/l nach Induktion. Bei *P. ananatis* wurde < 1 mg/l ohne Induktion und 30 mg/l nach Induktion mit IPTG gefunden.[60]

Die Herstellung von β-Carotin wurde beispielsweise von Yoon *et al.*[63] und Yuan *et al.*[62] untersucht. Yuan *et al.* ersetzen den natürlichen Promotor für die chromosomalen isoprenoid-produzierenden Gene in *E. coli* durch einen starken Promotor aus dem Phagen T5 und erhielten so 6 mg/g Biotrockenmasse β-Carotin.[62] Yoon *et al.* verglichen ebenfalls Gene aus *P. ananatis* und *P. agglomerans* und erhielten mit den Genen aus *P. ananatis* 36 mg/l und mit Genen aus *P. agglomerans* 35 mg/l Kultur. Dabei wurde ausschließlich β-Carotin und kein Lycopin produziert. Durch zusätzliche Expression der Gene *idi* und *dxs* konnte die Ausbeute auf 51 mg/l gesteigert werden, bei Koexpression von *dxs* und den carotinogenen Genen auf einem Plasmid wurden sogar 141 mg/l erhalten. Bei Expression von *idi* auf einem zweiten

Plasmid koexprimiert und zusätzlicher Mevalonat-Fütterung konnten 135 mg/l β-Carotin gefunden werden. Ferner wurde ein *E. coli*-Stamm hergestellt, in dem die carotinogenen Gene aus *P. ananatis* und *dxs* auf einem und *idi* auf einem zweiten Plasmid exprimiert wurden. Es wurde nach Zufütterung von Mevalonat und Glycerin nach 144 Stunden 503 mg/l oder 49,3 mg/g β-Carotin gefunden[63]

Zeaxanthin als Produkt wurde lediglich in einem Fall untersucht. Die dazu nötigen Gene wurden in verschiedenen Reihenfolgen angeordnet. Die Reihenfolge *crtE, crtB, crtI, crtY, crtZ* führte in *E. coli* zur höchsten Ausbeute von 0,82 mg/g.[61]

3.5 Chemische Synthese von Carotinoiden

Die industrielle Produktion beträgt ca. 400 t/a (berechnet auf Reinstoffe) und wird von der BASF und Hoffmann-LaRoche getragen.[64] Die chemische Synthese ist teilweise aufwendig und beschränkt sich im industriellen Bereich daher auf β-Carotin, Canthaxanthin, Astaxanthin, Lycopin, (3*R*,3'*R*)-Zeaxanthin, β-Apo-8'-carotinal, β-Apo-8'-carotinsäureethylester, Citranaxanthin und Retinol. Da die Synthesewege relativ lang sind, können die Investitionskosten nicht von einem Produkt getragen werden. Die Synthesen werden daher so geplant, dass die Bausteine der mengenmäßig großen Produkte β-Carotin und Retinol auch für die mengenmäßig kleineren Produkte verwendet werden können.[65]

Gleichwohl ist für eine Vielzahl von Carotinoiden eine chemische Synthese entwickelt worden. Insbesondere Paul Karrer und seine Kollegen haben sich hier seit den 50er Jahren große Verdienste erworben. Von ihnen stammt auch die erste Totalsynthese eines Carotinoids, des β-Carotins.[66]

Zeaxanthin wurde 1956 erstmals synthetisch hergestellt.[67] Ausgangspunkt waren hier zwei C_{19}-Bausteine und ein C_2-Baustein. Der C_{19}-Baustein wurde ausgehend von Isophoron synthestisiert. Weitere Stufen waren β-Isophoron, Hydroxyisophoron, Ketoisophoron und 2,6,6-Trimethyl-cyclohexandion-(l,4). Aus letzterem wurde durch Umsetzung mit Ethylenglycol das sogenannte C_9-Monoketal.

In der Technik wird ein ähnlicher Weg verwendet wie bei der ersten Totalsynthese. Sie erfolgt aus zwei C_{15}- und einem C_{10}-Baustein. Für die C_{15}-Körper ist Ketoisophoron der Grundbaustein. Dieses wird zu Laevodion und in weiteren Schritten zu Aktinol, Isopropylmethylaktinolether (IPM-Aktinol) und schließlich zum entsprechenden C_{15}-Phosphonioumsalz umgesetzt. Zwei dieser Bausteine und ein C_{10}-Dialedhyd werden dann in einer Wittig-Reaktion zum Zeaxanthin umgesetzt (Abbildung 3.16).

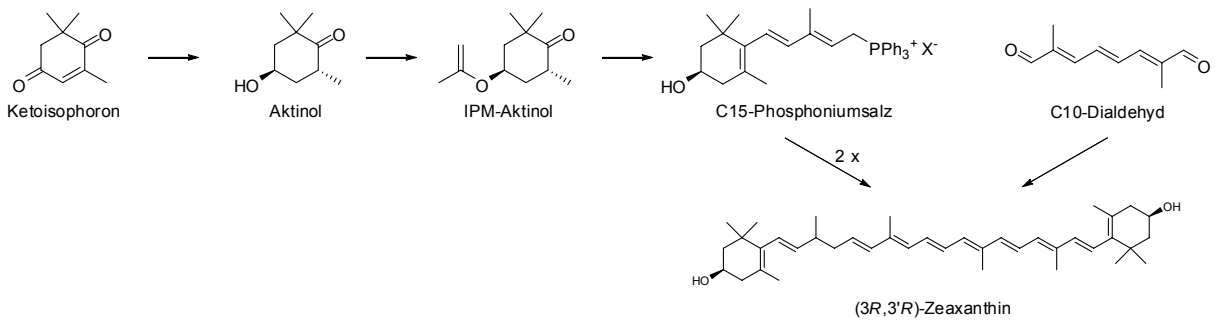


Abbildung 3.16 Beispiel einer industriellen Synthese von Zeaxanthin (Schema nach Meyer[65])

3.6 Chromatographische Methoden zur Untersuchung sekundärer Metabolite

Die Chromatographie bietet vielfältige Methoden zur Trennung von Substanzgemischen an. In der Chromatographie werden immer zwei miteinander nicht mischbare Phasen wendet, von denen eine ruht (stationäre Phase) und eine sich bewegt (mobile Phase).[68, 69]

Chromatographische Methoden werden seit langer Zeit verwendet. 1903 wurde durch den russischen Botaniker Michail Tswett erstmals eine chromatographische Trennung eines Pflanzenextrakts vorgenommen. Er verwendete hierzu eine mit Calciumcarbonat gepackte Glassäule. Diese Anordnung erlaubte ihm die Trennung der im Extrakt erhaltenen Chlorophylle und Carotinoide.[70] Die Substanzen waren auf der Säule als farbige Banden sichtbar. Daraus ging der von Tswett geprägte Name für dieses Trennverfahren hervor: Er nannte es Chromatographie nach den griechischen Wörtern *chroma* für „Farbe“ und *graphein* für „schreiben“.[71]

Von Erika Cremer wurden 1944 die Grundlagen für Adsorptionsgaschromatographie geschaffen, die sie in den Nachkriegsjahren mit Fritz Prior weiter entwickelte. Eine weitere wichtige Technik, die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), entwickelte sich ab etwa 1965.[68] Inzwischen hat sie die Gaschromatographie in ihrer Bedeutung auf den zweiten Platz verdrängt. Zu ihrem Siegeszug verhalfen der HPLC insbesondere die Entwicklung von modifizierten, unpolaren Kieselgelphasen.[71]

Von einiger Bedeutung sind ferner noch die Ionenaustauschchromatographie (IEC), die Kapillarelektrophorese (CE), von der aber nur Unterarten eine chromatographische Methode darstellen, die Größenausschlusschromatographie (SEC), die überkritische Fluidchromatographie (SFC) und weitere Spezialtechniken.[71]

Die Chromatographie beruht im Wesentlichen auf den beiden physikalisch-chemischen Mechanismen Adsorption und die Verteilung; bei Spezialformen kommt der Ionenaustausch oder die Siebwirkung bei der Größenausschlusschromatographie zum Tragen Bei der Adsorption

handelt es sich um die Verteilung an der Feststoffoberfläche der stationären Phase, bei der Verteilung um den Lösungsvorgang in den beiden unmischbaren Phasen.[69]

Diese beiden Mechanismen reichen wegen der großen Vielfalt der Methoden aber alleine nicht aus um die Verfahren zu gliedern. Tabelle 3.6 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Methoden. Eine erste Einteilung kann nach dem Aggregatszustand der beiden Phasen in flüssig/fest, flüssig/flüssig, gasförmig/fest beziehungsweise gasförmig/flüssig vorgenommen werden. Als weiteres Unterscheidungsmerkmal dienen dann die oben genannten Trennprinzipien Adsorption, Verteilung, Siebwirkung und Ionenaustausch. Schließlich kann dann weiter nach der Konfiguration aufgeteilt werden, die im Wesentlichen von der säulenförmigen Bauform beherrscht wird. Die planare Anordnung kommt nur bei der Dünnschichtchromatographie und der Papierchromatographie vor, wobei letztere bis auf Spezialanwendungen, zum Beispiel im pharmazeutischen Bereich für die Identitätsprüfung radioaktiver Arzneimittel[72], bedeutlungslos geworden ist.

Unter den Begriff der Säulenchromatographie fallen alle Methoden die mit einer Säule arbeiten, wie die klassische Säulechromatographie mit Glassäulen, die HPLC oder Flashchromatographie. In einer anderen Systematik fallen unter die Säulenchromatographie alle Techniken bei welchen eine Säule verwendet wird, unabhängig von der Separationstechnik.

Tabelle 3.6 Phasen und Trennprinzipien bei verschiedenen Chromatographiemethoden

Die Tabelle wurde modifiziert nach[68] und erweitert durch Angaben aus[71]. Nicht berücksichtigt wurde beim Phasenaufbau die Verwendung überkritischer Fluide und weitere Spezialformen.

Phasenaufbau	Separationstechnik	Konfiguration	Methode
Flüssig/fest (LSC)	Adsorption	Säule	Säulenchromatographie (SC)
		Planar	Papierchromatographie (PC) Dünnschichtchromatographie (DC)
	Ionenaustausch	Säule	Ionenaustauschchromatographie (IEC)
	Affinität	Säule	Affinitätschromatographie
	Siebwirkung, Ausschluss	Säule	Größenausschlusschromatographie (SEC)
Flüssig/flüssig (LLC)	Verteilung	Säule	Säulenchromatographie (SC)
		Planar	Papierchromatographie (PC) Dünnschichtchromatographie (DC)
gasförmig/fest (GSC)	Adsorption	Säule	Gasadsorptionschromatographie (*gas-solid chromatography*, GSC)
gasförmig/flüssig (GLC)	Verteilung	Säule	Gasverteilungschromatographie (*gas-liquid chromatography*, GLC)

Prinzipiell kann bei der Flüssigkeitschromatographie in Normalphasen und Umkehrphasenchromatographie (*reversed phase*) unterschieden werden.

Die Normalphasenchromatographie ist die ältere der beiden Methoden. Bei ihr werden eine polare stationäre Phase und eine unpolare mobile Phase verwendet. Bei der Umkehrphasenchromatographie sind die Verhältnisse umgekehrt. Als stationäre Phasen werden in erster Linie anorganische Adsorbentien wie Kieselgel, Kieselgur oder Aluminiumoxid, seltener Cellulosepartikel oder chirale Materialien verwendet. Kieselgel wird wegen der chemischen Inertheit und Kostengünstigkeit gegenüber anderen Materialien bevorzugt.[71]
Für die Umkehrphasenchromatographie wird bevorzugt Kieselgel als Grundlage verwendet und dieses dann mit verschieden langen Alkylketten die an die Hydroxylgruppen des Kieselgels gebunden werden, modifiziert.
Die in dieser Arbeit zu untersuchenden Stoffe sind aufgrund ihrer Thermolabilität nicht der Gaschromatographie zugänglich. Die Flüssigkeitschromatographie in Form der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und die Dünnschichtchromatographie (DC) bieten sich aufgrund der Farbigkeit der meisten der untersuchten Substanzen an. Die Gaschromatographie kann jedoch bei Vorstufen zum Einsatz kommen, die weit weniger hitzelabil sind und ein geringeres Molekulargewicht besitzen. Im Folgenden soll daher noch kurz auf die drei Methoden eingegangen werden.

3.6.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ist neben der Gaschromatographie die wichtigste chromatographische Methode. HPLC-Geräte bestehen aus Pumpe, Injektor zur Probenaufgabe, der Trennsäule und den Detektoren. Zur Verminderung von Diffusionseffekten werden in den Detektoren kleine Durchflusszellen und Kapillaren mit geringem Durchmesser verwendet.
Bei der Probenaufgabe am Detektor lassen sich prinzipiell zwei Techniken einsetzen. Zum einen kann eine Probenschleife verwendet werden oder die Probe kann direkt in den Strom des Laufmittels injiziert werden, wobei letztere wegen einiger Nachteile selten ist. Bei der Probenschleife wird die Probe zunächst in die Probenschleife injiziert, die entweder ein definiertes Volumen hat oder das Volumen mit einer Spritze abgemessen wird. Die Schleife ist nicht in den Laufmittelstrom eingebunden und daher drucklos. Durch ein Ventil wird die Schleife anschließend in den Laufmittelstrom eingebunden.
Die Säule wird in der Regel in einem Säulenofen temperiert. Diese Methode hat den Vorteil, dass zum einen, aufgrund gleichbleibender Temperaturbedingungen, eine höhere Reproduzierbarkeit erreicht werden kann, zum anderen kann hier auch durch das wärmere Laufmittel ein höherer Fluss verwendet werden.

Auch hier kommen Normalphasen- (NP) und der Umkehrphasen (RP, *reversed phase*) zum Einsatz, wobei der Hauptanteil der RP-Chromatographie zugeschrieben werden kann, die Normalphasenchromatographie jedoch wieder zunimmt. Als Säulenbett dienen heute hauptsächlich Edelstahlröhren. Für die RP-HPLC stehen Säulenmaterialien mit Phenyl-, Cyano-, C_1-, C_2, C_4, C_8 und die am weitesten verbreiteten C_{18}-Beschichtungen zur Verfügung.[28] In der Carotinoidanaltik kommt vor allem die C_{30}-Phase zum Einsatz, da sie sich für die Auftrennung von (*E*)- und (Z)-Isomeren und für die Trennung von Carotinoiden mit nur kleinen strukturellen Unterschieden besonders eignen. Zum Beispiel konnten Lutein und Zeaxanthin auf einer C18-Phase nicht getrennt werden, während eine Trennung auf der C30-Phase möglich war.[73]

In der HPLC verwendete Säulenmaterialien müssen druckfest sein. Daher kommen poröse Partikel verschiedener Geometrien und Dünnschichteilchen mit festem Kern, die aber an Bedeutung verloren haben, da auch poröse Teilchen kleiner Durchmesser reproduzierbar gepackt werden können,[69] zum Einsatz. Seit einigen Jahren sind auch monolithische Säulenfüllungen im Einsatz. Diese haben nach Herstellerangaben eine besonders gute Trennleistung bei gleichzeitig niedrigem Gegendruck. Partikel kommen mit Durchmessern von 3, 5 und 10 µm zum Einsatz.[71] Im Gegensatz dazu wird bei der klassischen Säulenchromatographie mit Partikeldurchmessern zwischen 100 und 200 µm gearbeitet.[69] Für spezielle Hochdruckgeräte (sogenannte „Ultra-HPLC“) können auch noch kleinere Partikelgrößen verwendet werden. Mit sinkender Partikelgröße steigt das Auflösungsvermögen der Säule aber auch gleichzeitig der Rückdruck an.

Die Streuung des Teilchendurchmessers muss so eng wie möglich gehalten werden, um ein Verstopfen des Geräts durch kleine Teilchen und eine Verminderung der Trennleistung durch große Teilchen zu verhindern.[69]

Als Detektoren kommen neben Massenspektrometern hauptsächlich Lichtstreudedektoren (evaporative light-scattering detector, ELSD), Brechungsindexdetektoren (refractive index detector, RID), UV/Vis-Detektoren und Fluoreszenzdetektoren zum Einsatz.

Im ELSD wird das Eluat mittels Stickstoff in einem beheizten Verdampfer zunächst vernebelt. Dort verdampft das Lösungsmittel und die zurückgebliebenen Partikel bewegen sich im Gasstrom weiter. Zur Detektion dient ein Laser, dessen Licht durch die Partikel gestreut wird. Das Streulicht kann dann von einem Photodetektor registriert werden. Der Detektor kann zur Detektion aller Substanzen verwendet werden, die einen höheren Siedepunkt als das Laufmittel haben; eine Detektion in Puffern ist nicht möglich. Der Detektor ist bei Gradientenelution

und bei Substanzen, die keine oder nur eine geringe Absoprtion im UV/Vis-Bereich zeigen, einsetzbar.

Der Brechungsindexdetektor arbeitet mit einem Refraktometer in welchem der Brechungsindex des Eluats im Vergleich zum reinen Laufmittel in einer Referenzzelle bestimmt wird; die Detektion nahezu aller gelösten Stoffe ist daher möglich. Nachteilig am Detektor ist die Nichtverwendbarkeit bei der Gradientenelution und die niedrige Empfindlichkeit, die bis zu drei Zehnerpotenzen über der eines UV/Vis-Detektors liegt..[71]

Der UV/Vis-Detekor ist wie ein Photometer aufgebaut. In der Durchflussküvette wird die Absorption des Eluats bei einer oder mehreren vorgegebenen Wellenlängen bestimmt. Als Lichtquellen dienen Wolfram-Halogenlampen (370-800 nm) und Deuteriumlampen (190-370 nm), mittels Monochromator wird die gewünschte Wellenlänge eingestellt. Es gibt Detektoren für eine ohne mehrere Wellenlängen und Diodenarray-Detektoren. Bei diesen wird nach dem Durchtritt es Lichtbündels durch die Küvette der Strahl mittels eines Polychromators räumlich aufgetrennt. Das Licht fällt dann auf ein Diodenfeld mitüblicherweise 512 Dioden auf dem die Intensität in Abhängigkeit von der Zeit und der Wellenlänge erfasst werden kann. Das erhaltene Spektrum kann zur Identifizierung eingesetzt werden. Der Detektor ist bei der Gradientenelution und für Reinheitsüberprüfungen einsetzbar, da ein breiter Absorptionsbereich abgedeckt wird.

Ebenfalls zur Substanzidentifizierung eignet sich die Kopplung der Flüssigkeitschromatorgaphie mit der Massenspektrometrie. Erste Methoden wie das *Moving-Belt*-Verfahren waren aufwendig und kontaminationsanfällig. Lange wurde daher die Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie zunächst als für die Routine ungeeignet angesehen.[71] Mit Einführung des *Particle-Beam-Interface*in den 90er Jahren, welches noch relativ unempfindlich und mit hohen Kosten verbunden war, wurde ein kommerziell erfolgreiches MS-Verfahren vorgestellt. Dabei wurde das Laufmittel im Vakuum entfernt und die Partikel mit Elektronenstoßionisation ionisiert.

Heute werden zur Ionisierung hauptsächlich die Elektrosprayionisierung (ESI) und die chemische Ionisierung unter Atmosphärendruck (APCI, *atmospheric pressure chemical ionization*) im Bereich der Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie-Kopplung (LC/MS) eingesetzt. Beide Methoden sind relativ sanfte Ionisierungsmethoden, auch große empfindliche Moleküle werden praktisch nicht fragmentiert. Die Ionisierung findet unter Atmosphärendruck statt.

Bei der Elektrosprayionisierung (ESI) kann bei großen Molekülen eine Mehrfachionisierung gefunden werden, die etwa eine Ladung pro Kilodalton Masse beträgt. Das Elutat wird durch

eine Kapillare, an die eine Hochspannung angelegt ist, mittels Stickstoff vernebelt. Am Ende der Kapillare bilden sich kleine, geladene Tröpfchen, die im Gasstrom durch Verdunstung immer kleiner werden bis durch die Konzentration der Ladung auf kleinem Raum sogenannte Coulomb-Explosionen stattfinden. Diese verringern den Durchmesser weiter. Die Methode eignet sich für ionische oder zumindest leicht ionisierbare Substanzen. Diese werden dann, abhängig von der angelegten Spannung, entweder protoniert (positive Spannung) oder deprotoniert (negative Spannung). Für unpolare Substanzen ist die Methode weniger gut geeignet, da fast keine Ionisierung stattfindet.

Unpolare Substanzen dagegen können mittels der chemischen Ionisierung unter Atmosphärendruck ionisiert werden. Dabei wird das Eluat durch eine heiße Kapillare geleitet und mit Hilfe von Stickstoff verdampft. An einer Nadel finden Coronar-Entladungen statt, die entweder Bestandteile des Lösungsmittels oder das Trägergas ionisieren. Mit den gebildeten Ionen erfolgt dann die Ionisierung der Analytmoleküle. Ein wichtiger Vorteil dieser Methode ist die Tatsache, dass sie auch für Flüsse bis zu 1 ml/min geeignet ist. Dies vereinfacht die Übertragung von Methoden. Außerdem hat die APCI gegenüber der ESI den Vorteil, dass die Linearität des Detektors um mindestens drei Zehnerpotenzen größer ist.[74] In einem Übersichtsartikel von Rezanka und Kollegen wurde 2009 über literaturbekannte LC/MS-Methoden berichtet. Dabei wurde in 60 von 71 Methoden APCI, in zwei negative Elektroneneinfangdetektion (ECNI), in fünf ESI und in zwei *Fast Atom Bombardment* (FAB) verwendet. In zwei weiteren Methoden wurde entweder keine Angabe zur Ionisierungsmethode gemacht oder es wurde nur optische Absorption verwendet.

In der Literatur sind zu dem Gebiet der Trennung von Carotinoiden mittels HPLC sehr viele Methoden bekannt. Im Folgenden kann daher nur eine sehr kleine und nicht repräsentative Auswahl gegeben werden.

Breithaupt stellte 2004 eine Methode vor, die eine YMC30-Säule als stationäre Phase verwendete, als Laufmittel diente ein Gemisch aus Methanol und Wasser beziehungsweise *tert*-Butylmethylether (MTBE) und Methanol. Beiden Laufmitteln wurde bei UV/Vis-Detektion noch Triethylamin zugesetzt, bei MS-Detektion wurde dieses weggelassen. Mit dieser Methode konnte eine große Zahl von Carotinoiden aufgetrennt werden.[75] Zudem diente sie als Ausgangspunkt für weitere von ihm veröffentlichte Methode.[76-78]

Eine sehr ähnliche Methode wird vom Säulenhersteller empfohlen. Hierbei wird ein Gradient aus Methanol, MTBE und Wasser verwendet. Nachteilig an den Methoden ist die lange Dauer von 90 Minuten alleine für den Gradient.[79]

Steel und Keller verwendeten eine C18-Säule mit einem Gradienten aus Wasser und Aceton. Damit trennten sie Lutein und β-Carotin.[80]
Zur Trennung von geometrischen Isomeren von Lutein und Zeaxanthin setzten Khachik und Kollegen eine Nitril-Säule ein.[81]

3.6.2 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie (DC) wurde in den 50er Jahren eingeführt und ersetzte nach und nach die Papierchromatographie. Die Dünnschichtchromatographie unterscheidet sich ebenfalls in die Normalphasen- und die Umkehrphasenchromatographie.
Bei der Dünnschichtchromatographie wird die stationäre Phase direkt in einer gleichmäßigen und dünnen Schicht (200-250 µm) auf ein Trägermaterial (chromatographisches Bett) aufgebracht. Das Trägermaterial besteht aus Kunststoff, einer dünnen Aluminiumfolie oder Glasplatten. Die stationäre Phase besteht aus kleinen Partikeln (20 µm Durchmesser). Bei der Normalphasenchromatographie werden meist anorganische Adsorbentien wie Kieselgel oder Aluminiumoxid verwendet; selten werden andere Materialien, wie Cellulose eingesetzt. Bei der Umkehrphasenchromatographie wird als stationäre Phase modifiziertes Kieselgel eingesetzt. Bei manchen Platten kommen zusätzliche Bindemittel, wie Stärke oder verschiedene Polymere, zum Einsatz, welche die Haftung an das chromatographische Bett erhöhen sollen. Außerdem werden teilweise auch UV-Indikatoren (zum Beispiel manganaktiviertes Zinksilikat) in einer Konzentration von ca. 2 % beigefügt, welche unter Einstrahlung von UV-Licht fluoreszieren. Sie sollen die Detektion von Substanzen erleichtern, die in dem entsprechenden Wellenlängenbereich absorbieren. Die Substanz schwächt die Fluoreszenz an der entsprechenden Stelle und die Substanz tritt als dunkler Punkt hervor.
Der Retentionsfaktor R_f welcher sich als Koeffizient aus Laufstrecke der mobilen Phase durch Laufstrecke der Substanz ergibt, ist daher, bei gleichen Versuchsbedingungen, charakteristisch für eine Substanz.
Ein großer Vorteil der DC ist, neben der Kostengünstigkeit, die Zeitersparnis, weil viele Proben gleichzeitig aufgetrennt werden können. Da immer eine neue Platte verwendet wird, besteht außerdem keine Gefahr der Kreuzkontamination oder Probenverschleppung.
Die Platten können einerseits rein optisch, entweder mit Weiß- oder UV-Licht, oder mittels spezieller Detektoren ausgewertet werden. Zum einen wird die Densitometrie verwendet. Dabei wird mit Photozellen entweder die Transmission oder die Remission von Licht gemessen. Inzwischen ist auch die Kopplung mit der Massenspektrometrie weiter entwickelt worden. Bei der 1997 erstmals vorgestellten Methode[82], kam noch eine dem MALDI-Verfahren ähnliche Technik zum Einsatz. Bei der Methode wird der Analyt in einer Silberschicht angerei-

chert und dort mittels eines Ionenstrahls ionisiert (Sekundärionen). 2007 wurde ein Verfahren vorgestellt[83], bei dem direkt von der Platte eluiert und das Eluat in ein Massenspektrometer eingebracht wird. Die weitere Technik ist dann der LC/MS vergleichbar.

Die in der Literatur bekannten DC-Methoden für Carotinoide wurden in der Regel auf spezielle Trennprobleme hin entwickelt. Es gibt nur wenige, für die eine größere Anzahl von Substanzen getestet wurde. In Tabelle 3.7 sind einige Methoden mit für diese Arbeiten interessanten Trennproblemen der letzten Jahre dargestellt. In allen vorgestellten Methoden wurde Kieselgel als stationäre Phase verwendet. In zwei Fällen wurde ein Gemisch aus Hexan und Aceton als mobile Phase verwendet.

Tabelle 3.7 Methoden zur dünnschichtchromatographischen Trennung von Carotinoiden

Substanzen	stationäre Phase	mobile Phase	Referenz
Zeaxanthin, α-, β-Carotin, Violaxanthin	Kieselgel 60 F_{254}	Hexan/Aceton (75:25)	El-Baky *et al.*, 2008[84]
Zeaxanthin, β-Cryptoxanthin, β-Carotin, Lutein	Kieselgel 60 F_{254} (HPTLC)	Tetrahydrofuran, Methylenchlorid, Hexan	Schulte *et al.*, 2009[85]
Annato-Extrakt (Bixin)	Kiegelgel 60 F_{254}	Chloroform, Methanol (95:5)	Lotfi *et al.*, 2008[86]
Astaxanthin, β-Carotin, Zeaxanthin	Kieselgel G	Hexan/Aceton (75:25)	Sachindra *et al.*, 2005[87]

In einer Arbeit wurden eine große Zahl verschiedener Carotinoide getrennt und dabei drei verschiedene mobile Phasen auf Kieselgel als stationärer Phase verglichen. Bei den verglichenen Systemen (Petrolether, Aceton; Petrolether, *tert*-Butanol und Methanol, Benzol und Essigsäureethylester) wurden sehr ähnliche Ergebnisse erzielt. Jedoch wurde das dritte Laufmittelsystem als am besten geeignet für sauerstoffhaltige Carotinoide angesehen.[88]

Für eine schnelle Übersicht wird ein Laufmittel aus Hexan, Essigsäureethylester oder Hexan und Aceton (4:1) angegeben. Als stationäre Phase dient Kieselgel.[28]

3.6.3 Gaschromatographie

Bei der Gaschromatographie besteht die mobile Phase aus einem inerten Trägergas mit guten Strömungseigenschaften, in der Regel Helium oder Wasserstoff, bei gepackten Säulen auch Stickstoff. Mit Wasserstoff lässt sich eine etwa doppelt so große Trennleistung wie mit Helium erreichen. Ist die Säule mit einem festen Trägermaterial befüllt, spricht man von der *Gas-Solid-Chromatography*, ist das Trägermaterial mit einer Flüssigkeit überzogen, welche dann die stationäre Phase darstellt, spricht man von der *Gas-Liquid-Chromatography*.

Die stationäre Phase besteht entweder aus einer gepackten Säule oder einer Kapillarsäule, wobei erstere kaum noch verwendet werden. Bei Kapillarsäulen besteht die Säule aus einer

Kapillare die an der Innenseite mit einer hochviskosen und hochsiedenden Flüssigkeit in Form eines dünnen Films beschichtet ist. Die Kapillare selbst besteht aus Quarzglas und einer flexiblen Polyimid-Umhüllung und ist je nach Anwendungsgebiet 10-60 m, für Spezialanwendungen bis zu 100 m, lang, hat einen Außendurchmesser von etwa 500 µm und einen Innendurchmesser von etwa 250 µm. Die Beschichtung unterscheidet sich ebenfalls ja nach Anwendungsgebiet und besteht in der Regel aus Polysiloxanen.

Der Gaschromatograph besteht im Wesentlichen aus Injektor, Ofen mit Säule und Detektor. In den beheizbaren Injektor wird die Probe durch ein Septum mit einer Spritze eingespritzt. Die Heizung gewährleistet eine rasche Verdampfung der Probe. Die verdampfte Substanz wird vom Trägergas mitgerissen und in die Säule transportiert. Diese befindet sich in einem Ofen, in dem eine konstante Temperatur (isokratisch) oder ein Temperaturgradient erzeugt wird. Die Trennung erfolgt auf Grund unterschiedlicher Siedepunkte bzw. verschieden guter Wechselwirkungen des Analyten mit dem Säulenmaterial.

Am weitesten verbreitet ist der Flammenionisationsdetektor, seltener sind zum Beispiel Wärmeleitfähigkeits- und Photoionisationsdetektoren; auch die Kopplung mit der Massenspektrometrie ist möglich. Bei Massenspektrometrie ist die Elektronenstoßionisation (EI, *electron impact*) weit verbreitet. Dabei wird von einer Ionenquelle ein Elektronenstrahl mit der Energie von 5-200 eV emittiert, der den Analyten ionisiert; eine gebräuchliche Energie sind 70 eV. Häufige weitere Ionisationsmethoden sind die chemische Ionisation (CI), bei der ein durch EI angeregtes Gas seinerseits Analyt-Moleküle ionisiert und den schnellen Atombeschuss (FAB, *fast atom bombardment*), bei dem der Analyt mit schnellen Atomen (zum Beispiel Xenon) oder Molekülen beschossen woraufhin sich Ionen lösen. Anstelle von Atomen können auch Ionen verwendet werden. Man spricht dann von Sekundärionen-Massenspektrometrie (SIMS, *secondary ion mass spectrometry*).

Bei den Carotinoiden kann die GC nicht eingesetzt werden, da sie unter Wärmeeinwirkung isomerisieren. Jedoch ist ein Einsatz für die Carotinoidvorstufen möglich und wurde auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Außerdem kann Retinol und seine Abkömmlinge und Apocarotinoide als Trimethylsilylether gaschromatographisch untersucht werden.[28]

3.6.4 Quantifizierung in der Chromatographie

Mit Hilfe der verschiedenen chromatographischen Methoden kann man neben qualitativen Aussagen auch relativ einfach Angaben über Quantitäten machen.

Das Signal des Detektors ist, in gewissen Grenzen, proportional zur enthaltenen Menge. In der Regel wird die Fläche unter der Kurve eines Chromatogramms, seltener auch die Höhe als Signal verwendet. Bei der DC wird zu diesem Zweck zunächst eine Aufnahme der Platte an-

gefertigt und dann mit Hilfe eines Computerprogramms das Volumen der einzelnen Flecken bestimmt.

Zur eigentlichen Quantifizierung der erhaltenen Fläche oder Höhe gibt es ebenfalls mehrere Methoden: Die Einpunktkalibrierung, die Zweipunktkalibrierung, die Mehrpunktkalibrierung oder das Standardadditionsverfahren.

Bei der Einpunktkalibrierung wird ein einzelner Standard mit bekannter Konzentration gemessen und aus dem erhaltenen Signal und der Konzentration ein Faktor gebildet. Diese Methode wird immer dann verwendet, wenn die zu erwartenden Werte um einen bestimmten Wert schwanken, wie dies beispielsweise bei Wirkstoffen in Arzneimitteln der Fall ist.

Die Zweipunktkalibrierung basiert auf zwei Messpunkten durch die eine Gerade gelegt wird. Sie wird wie die Einpunktkalibrierung verwendet, die Genauigkeit ist jedoch höher.

Die Mehrpunktkalibrierung bietet den größten Messbereich, da mehrere Standardlösungen unterschiedlicher Konzentration gemessen und die erhaltenen Werte anschließend gegen die Konzentration aufgetragen. Normalerweise werden mindestens fünf verschiedene Konzentrationen verwendet, eine höhere Zahl von Standards erhöht im erwarteten Messbereich erhöht jedoch die Genauigkeit.

Bei der Methode des externen Standards wird das erhaltene Signal direkt mit der Kalibrierfunktion verglichen. Vorteilhaft ist hier die einfache Bestimmung. Nachteilig ist aber, dass Fehler bei der Probenaufgabe oder bei der Extraktion sich ebenfalls auf das Ergebnis auswirken. Das Resultat kann besonders bei komplexen Matrices oder bei aufwendigen Probenvorbereitungen stark verfälscht werden.

Abhilfe schafft in diesem Fall die Verwendung eines internen Standards. Dabei wird der Probe zu einem geeigneten Zeitpunkt, zum Beispiel vor der Extraktion, eine Substanz als interner Standard beigegeben. Die beigegebene Substanz sollte den zu analysierenden Stoffen so ähnlich wie möglich sein, darf aber nicht mit einer anderen Substanz koeluieren. Die Kalibrierfunktion wird hier mit Hilfe von Proben unterschiedlicher Konzentration aufgestellt, die aber alle die gleiche Konzentration des internen Standards enthalten. Aufgetragen wird dann der Quotient aus der Intensität der Probe geteilt durch die Intensität des internen Standards. Bei der Messung einer Probe mit unbekannter Konzentration wird dann genauso verfahren.

Eine dritte Methode zur Quantifizierung ist das Standardadditionsverfahren. Bei den beiden obengenannten Verfahren sollten die Verdünnungsreihen möglichst matrixbasiert erstellt werden, was bedeutet, dass für die Verdünnungen Lösungen verwendet werden, die dem realen Extrakt möglichst nahe kommen und lediglich analytfrei. Beispielsweise kann zur Bestimmung von Pestiziden in Wasser pestizidfreies Wasser verwendet werden. Durch die Ver-

wendung solcher matrixbasierten Standards können Probleme, die zum Beispiel auf der Adsoprtion des Analyten an der Matrix beruhen, vermieden werden.
In einigen Fällen kann es jedoch unmöglich sein, eine analytfreie Matrix zu beschaffen; zum Beispiel bei der Bestimmung von Insulin in Blut. Bei ausreichender Probenmenge kann dann das Standardadditionsverfahren verwendet werden. Dabei wird zunächst die Probe gemessen und aufgeteilt. Anschließend diese Teilmengen mit unterschiedlichen Mengen des Analyten aufgestockt, die Proben erneut gemessen und die erhaltenen Werte gegen die zugegebene Menge aufgetragen. Der Betrag des Schnittpunkts mit der x-Achse einer durch die Punkte gelegten Gerade ist die in der Probe enthaltene Analytmenge.

3.7 Die Transkriptionsanalyse

Zur Untersuchung der Transkription, also der zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Zelle enthaltenen RNS, können prinzipiell zwei Methoden verwendet werden. Zum einen ist die Verwendung von Microarrays, zum anderen die quantitative Real-Time-PCR zu nennen.
Beiden Schritten gemeinsam ist zunähst die Isolierung der RNS aus den zu untersuchenden Zellen und die anschließende reverse Transkription in cDNS. Je nach Methode kann hier ein Fluoreszenzfarbstoff (zum Beispiel Cyanine3-dCTP) eingebaut werden.
Bei erster Technik werden sogenannte Sonden, also kurze Oligonukleotide, auf eine Glasoberfläche aufgebracht. Zur Bindung der Sonden an die Oberfläche muss diese zuvor chemisch behandelt werden. Anschließend wird die zuvor hergestellte cDNS in Lösung auf die Oberfläche aufgebracht und bei definierten Bedingungen inkubiert. Anschließend wird der Array mit Puffern mit sinkender Salzkonzentration gewaschen. Damit wird falschbindende cDNS entfernt.
Die Arrays werden danach eingescannt. Je nach Farbstoff wird Laserlicht einer Wellenlänge zur Erregung der Fluoreszenz verwendet. Die bei der Emission erhaltenen Intensitäten müssen anschließend normalisiert und sind ein Maß für die Menge der vorhandenen RNS, die an bestimmte Sonde hybridisiert.
Bei der quantitativen Real-Time-PCR (qRT-PCR) wird zunächst wie oben vorgegangen und die RNS aus den Zellen isoliert. Anschließend erfolgt eine reverse Transkription. Dabei werden aber keine fluoreszierenden Nukleotide eingebaut.
Mit der erhaltenen cDNS wird dann eine weitere PCR mit spezifischen Primern durchgeführt. Hierbei erfolgt die Echtzeitmessung der Produktion mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes. Dabei gibt es zwei prinzipielle Verfahren: Die Einlagerung von SYBR Green I (Abbildung 3.17) in doppelsträngige DNS und die Verwendung von TaqMan- oder anderen Sonden, die auf dem Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)[89] beruhen.

Bei der Verwendung von SYBR Green I wird eine Fluoreszenz erst dann angeregt, wenn die Interkalation mit Dopplestrang-DNS erfolgt. Freies SYBR Green I dagegen zeigt keine nur eine schwache Fluoreszenz.

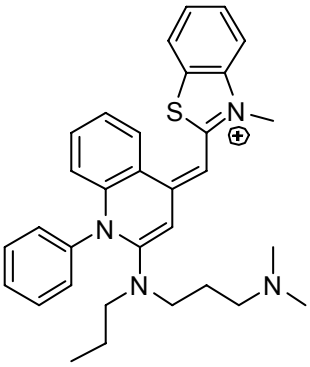


Abbildung 3.17 Fluoresenzfarbstoff SYBR Green I

Die andere Möglichkeit ist die Verwendung von FRET-Sonden. Das am weitesten verbreitete Verfahren ist das TaqMan-Verfahren, bei welchem Hydrolysesonden zum Einsatz kommen. Bei diesen werden auf einem kurzen, zur Sequenz des Zielgens komplementären, DNS-Strang zwei Fluorchrome eingebaut. Einer davon ist ein Fluoreszenz-Donor, der andere ein Akzeptor (Quencher). Der Donor wird angeregt und gibt einen Teil der emittierten Energie an den Akzeptor ab. Dadurch wird die Fluoreszenz abgeschwächt. Erhöht sich der Abstand der beiden Fluorchrome, zum Beispiel durch den Abbau der Sonde, schwächt sich die Wirkung des Quenchers ab und die Fluoreszenz wird stärker. Dieser Effekt tritt während der PCR ein, da durch die Reaktion die Sonde abgebaut wird. Die verwendete Polymerase besitzt eine Exonukleaseaktivität. Daneben gibt es noch weitere Verfahren, die auf dem FRET-Prinzip beruhen. Auf diese wird hier nicht eingegangen.

Vorteil des ersten Verfahrens ist die kostengünstigkeit, nachteilig ist die geringere Selektivität, da unter Umständen mehrere Produkte entstehen und alle eine entsprechende Fluoreszenz hervorrufen.

Das TaqMan-Verfahren umgeht dieses Problem, da hier die Sonden spezifisch für die jeweilige DNS-Sequenz ausgewählt werden. Aufgrund der individuellen Herstellung ist das Verfahren jedoch deutlich teurer.

3.8 Aufgabenstellung

Wie in den vorherigen Abschnitten dargelegt wurde, ist *P. putida* KT2440 ein für die Biosynthese interessantes Bakterium, das aber bislang auf diesem Gebiet kaum zum Einsatz kommt. Ferner wurde aufgezeigt, dass die große Stoffklasse der Terpene, die aufgrund ihrer strukturellen Vielfalt ein vielfältiges Anwendungsspektrum haben und daher interessante Produkte

darstellen. Die als Farbstoffe vielfältig zum Einsatz kommenden Carotinoide sind für die Etablierung von *P. putida* als Produktionsstamm vorteilhaft, da sie relativ leicht zu analysieren sind.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Verwendung von rekombinanten *P. putida* als Produktionsstamm für verschiedene Carotinoide untersucht werden. Hierzu sollten Methoden zur Bestimmung des Carotinoidgehalts etabliert und die Synthese von Carotinoiden in verschiedenen Stämmen von *P. putida* untersucht werden. Dabei wurden auch Vergleiche mit als Carotinoidproduzenten etablierten Bakterium *E. coli* gemacht. Zur Erhöhung der Ausbeute sollten die Kultivierungsbedingungen optimiert und verschiedene Additive zur Erhöhung der Ausbeute auf ihre Eignung hin untersucht werden.

Die Synthese von Zeaxanthin, das der chemischen Synthese aufgrund der Hydroxylgruppen schwerer zugänglich ist als andere Carotinoide, wurde als Modellprodukt gewählt. Neben der Zeaxanthinsynthese sollte aber auch die Möglichkeit der Synthese anderer Carotinoide sowohl in *P. putida* als auch in *E. coli* gezeigt werden. Daneben wurde *Pantoea ananatis* auf seine Eignung als Produktionsstamm geprüft, da bei dem natürlichen Produzenten eine sehr große Ausbeute zu erwarten.

Die Bereitstellung von Carotinoidvorstufen im DXP-Weg ist wichtig für eine hohe Ausbeute. Durch die Analyse der diese Stoffwechselweg kodierenden Gene mittels der Transkriptionsanalyse sollten Probleme im DXP-Weg bei *P. putida* erkannt werden.

4 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit entstand aus einer Zusammenarbeit mit dem Institut für Industrielle Genetik im Rahmen des Zentrums für Systembiologie an der Universität Stuttgart. Dabei wurde die Synthese von Carotinoiden in *Pseudomonas putida* KT2440 und verschiedenen Mutanten untersucht. Die molekularbiologischen Arbeiten innerhalb dieses Projekts wurden am Institut für Industrielle Genetik unternommen, während das Institut für Technische Biochemie die Aufgabe hatte, die Bildung der Carotinoide zu untersuchen und zu optimieren.
Zur Analyse standen die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und zum schnellen Überblick die Dünnschichtchromatographie zur Verfügung. Entsprechende Methoden wurden im Rahmen dieser Arbeit entwickelt oder etabliert. Des Weiteren wurden Untersuchungen der Transkription im Hinblick auf eine mögliche Erkennung von differentiell exprimierten Genen während der Bildung der Carotinoide untersucht.
In einem weiteren Schritt wurde die Skalierung der Produktion vom Schüttelkolben in den 5 l-Fermenter entwickelt. Ein kleiner Teil der Arbeit machte ferner die Untersuchung des entstandenen Endprodukts Zeaxanthin und die Untersuchung weiterer Produktionsstämme aus.

4.1 Isolierung von Referenzsubstanzen

Nicht alle der Carotinoide und ihre Vorstufen, die als Referenzsubstanzen benötigt wurden, waren im Handel erhältlich oder sind sehr teuer. Zeaxanthin und Physalien ließen sich aus dem Gemeinen Bocksdorn, Lycopin, Phytofluen, Phytoen, Neurosporin und ζ-Carotin aus Tomatenmark isolieren.

4.1.1 Isolierung von Zeaxanthin und Physalien aus *Lycium barbarum*

Die Früchte von *Lycium barbarum* (Gemeiner Bocksdorn, Chinesische Wolfsbeere), sind reich an Zeaxanthin beziehungsweise dem als Physalien bezeichneten Dipalmitat des Zeaxanthins. Sie erhalten hiervon bis zu 1 g/kg frische Frucht[90] und eignen sich daher gut für die Extraktion.
Es wurden etwa 1,5 g getrocknete Beeren in der Reibschale mit flüssigem Stickstoff gefroren und zerrieben. Anschließend wurden sie mit einem Gemisch aus gleichen Teilen Methanol, Essigsäureethylester und Hexan extrahiert und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand enthielt hauptsächlich Physalien. Unter der Annahme, dass Physalien nahezu den gleichen Extinktionskoeffizienten wie Zeaxanthin haben sollte, wurden 1,69 mg Physalien erhalten, was einer Ausbeute von 1,13 mg/g getrockneter Frucht entspricht. Der Rückstand wurde in 10 ml Diethylether aufgenommen und mit dem gleichen Volumen etha-

nolischer Kalilauge (β = 30 %) versetzt. Das Gemisch wurde über Nacht bei Zimmertemperatur gerührt. Am nächsten Tag wurde solange mit dem gleichen Volumen Wasser gewaschen, bis das Waschwasser neutral reagierte. Die organische Phase wurde anschließend über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Eine Analyse des erhaltenen Rückstandes mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ergab im Vergleich zu einem Standard der bereits in geringer Menge am Institut vorhanden war, dass nahezu reines Zeaxanthin vorlag.

4.1.2 Isolierung von Lycopin, Phytofluen, Phytoen und ζ-Carotin aus Tomatenmark

Etwa 50 g Tomatenmark wurden mit 50 ml Methanol gewaschen und dieses verworfen. Anschließend wurde mehrfach mit insgesamt 300 ml Aceton extrahiert. Das Aceton wurde mit dem Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 10 ml einer 10 %igen Lösung von Dichlormethan in Hexan gelöst.

Die Lösung wurde der Säulenchromatographie unterworfen. Als stationäre Phase wurde Aluminiumoxid verwendet. Die mobile Phase war zunächst Hexan, Toluol und Diethylether (88:10:2). Mit diesem Laufmittel wurden zwei Fraktionen eluiert. Am Beginn der Säule war noch eine rote Bande erkennbar. Es wurde daher auf ein polareres Laufmittel aus gleichen Teilen Hexan und Diethylether gewechselt mit dem eine weitere Fraktion erhalten wurde. Anschließend wurde mit einer 2 %igen Lösung von Ethanol in Diethylether eluiert und eine weitere Fraktion erhalten. Nach dem Aufkonzentrieren waren die Fraktionen 1 und 3 gelb, die Fraktion 2 war orange und die Fraktion 4 leuchtend gelb gefärbt. Fraktion 2 machte gefolgt von Fraktion 3 den Hauptteil aus (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1 Fraktionen der Carotinoidaufreinigung aus Tomaten

Laufmittel	Fraktion	Farbe
Hexan, Toluol, Diethylether (88:10:2)	1	gelb
	2	orange
Hexan, Diethylether (1:1)	3	gelb
Diethylether, Ethanol (98:2)	4	leuchtend gelb

Die erhaltenen Fraktionen wurden mit Hilfe der HPLC untersucht. In Fraktion 1 wurde Phytoen, Phytofluen, ζ- und β-Carotin identifiziert. Fraktion 2 enthielt in der Hauptsache Lycopin (89 %) und zwei (*Z*)-Isomere des Lycopins. Fraktion 3 bestand aus sehr vielen verschiedenen Substanzen, die nicht zugeordnet werden konnten. In Fraktion 4 wurde hauptsächlich Lutein und eine nicht-identifizierbaren Substanz gefunden (Tabelle 4.2). Die Identifizierung der Substanzen erfolgte durch Vergleich ihrer Absorptionsspektren mit der Literatur.

Tabelle 4.2 Übersicht über die Carotinoide in den Fraktionen 1, 2 und 4

Fraktion 3 enthielt viele verschiedene Carotinoide die nicht zugeordnet werden konnten. Fraktion 4 enthielt weitere nicht zuordenbare Substanzen in kleinen Mengen.

Fraktion	Substanz	Maxima	Maxima Literatur
1	Phytoen	286	276, 286, 297
	Phytofluen	332, 348, 367	331, 348, 367
	ζ-Carotin	380, 400, 426	378, 400, 425
	β-Carotin	452, 479	452, 450, 476
2	Lycopin	446, 472, 503	446, 471, 504
4	Lutein	446, 474	
	Nicht zuordenbar	431, 457, 489	

Es wurde eine Methode für die präparative HPLC entwickelt, mit der Fraktion 1 weiter getrennt werden kann.

4.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Für die Identifizierung und Quantifizierung von Carotinoiden bieten sich die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und die Dünnschichtchromatographie (DC) an. Mit der optischen Absorptionsspektroskopie, die naturgemäß bei Gemischen aber nur ungefähre Aussagen über die Menge geben kann, steht eine weitere Methode zur Verfügung. Bei der HPLC kann die Kopplung mit der Massenspektrometrie (MS, LC/MS) weitere Informationen liefern.

Für das Gebiet der Carotinoide sind sowohl Methoden zur Aufbereitung von Proben aus verschiedensten Matrizes als auch flüssigkeitschromatographischen Methoden in einer großen Anzahl literaturbekannt.[32] Die Literatur ist unübersichtlich. Es finden sich Methoden für spezielle Trennprobleme, bei welchen nur zwei oder drei Substanzen erfasst werden und Methoden für eine größere Zahl von Substanzen. Es kommt eine Fülle von Säulenmaterialien und Laufmitteln zum Einsatz.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben einer Standardmethode der HPLC, die Methoden von Breithaupt[75] und Steel und Keller[80] untersucht.

4.2.1 Methodenvergleich

Die Methode von Breithaupt zeichnet sich durch die Trennung einer großen Anzahl von zu trennenden Verbindungen aus (unter anderem Canthaxanthin, α- und β-Carotin, Lutein, Lycopin und Zeaxanthin) aus. Nachteilig an dieser Methode sind die Verwendung des ungewöhnlichen Laufmittelbestandteils *tert*-Butylmethylether (MTBE) und einer speziellen Säule mit einer Beschichtung von C_{30}-Ketten. In der Carotinoidanalytik wird jedoch häufiger auf diese Kombination zurückgegriffen, da sie eine besonders gute Trennleistung bietet.[73] Steel und Keller dagegen verwendeten für ihre Untersuchungen eine RP-18-Säule und einen Gradienten

von Wasser und Aceton. Sie trennten hierbei β-Carotin und Lutein auf. Eine weit verbreitete Methode in der HPLC ist die Verwendung eines Gradienten von Acetonitril und Wasser auf einer RP-18-Säule. Auch diese Methode wurde auf ihre Eignung geprüft.
Zur Eignungsprüfung wurde jeweils ein Gemisch aus α- und β-Carotin, β-Cryptoxanthin, Lycopin und Zeaxanthin verwendet.

4.2.1.1 Standardmethode

Zur chromatographischen Trennung von Carotinoiden wurde ein Gradient aus Acetonitril und Wasser verwendet. Als Säule diente eine Outstanding C18 (250 x 4,6 mm) von Trentec und eine Chromolith Performance RP-18e (100 x 3 mm) von Merck verwendet. Die Elution erfolgte mit 10 % Wasser und wurde auf 90 % Wasser gesteigert. Zur Detektion wurde die Absorption bei 450 nm gemessen. Die Trennung des Standardgemisches gelang nur unvollständig. Ferner zeigten die erhaltenen Signale eine starke Abweichung von der idealen Form mit starkem *Fronting* und *Tailing*. Die Methode wurde daher nicht weiter verwendet.

4.2.1.2 Methode nach Steel und Keller

Bei dieser Methode wurde die gleiche Säulen wie unter 4.2.1.1 verwendet. Die Gradientenelution erfolgte bei 70 % Aceton für die ersten 20 Minuten und dann bei 100 % für weitere 15 Minuten. Auch hier wurden die Signale bei 450 nm detektiert.
Problematisch bei dieser Methode war, dass die Trennung teilweise unzureichend war und die Substanzen erst nach Ende der eigentlichen Laufzeit mit sehr langen Retentionszeiten eluiert wurden. Auch diese Methode wurde daher verworfen.

4.2.1.3 Methode nach Breithaupt

Breithaupt verwendete einen Gradient aus Laufmittel A (Methanol, Wasser, Triethylamin, 90:10:0,1) und Laufmittel B (MTBE, Methanol, Wasser, Triethylamin, 90:6:4:0,1) auf einer RP-30-Säule von 25 cm. Es wurde mit einem Gradienten von 6,5 % B auf 100 % in 34 min eluiert. Die Detektion erfolgte auch hier bei 450 nm.
Abweichend von der veröffentlichten Vorschrift wurde in den durchgeführten Arbeiten kein Triethylamin verwendet. Bei der Herstellung von Laufmittel B zeigte sich zudem, dass sich zwei Phasen bildeten. Daher wurde das Laufmittel B in ein Gemisch aus 90 % MTBE und 10 % Methanol geändert.
Die Methode zeigte von allen getesteten das beste Ergebnis. Die Referenzsubstanzen wurden hervorragend getrennt. Bei Messungen realer Proben zeigte sich jedoch oft eine schwache Schulter am Signal des internen Standards.

Um dieses Problem zu lösen wurde die Zeitdauer des Gradientenanstiegs daher von 34 min auf 38 min verlängert. Danach konnten beide Signale grundliniengetrennt erhalten werden.

4.2.2 Qualitative Untersuchungen

In Tabelle 4.3 sind die Retentionszeiten und Maxima der gemessenen Referenzsubstanzen angegeben.

Tabelle 4.3 Retentionszeiten und Absorptionsmaxima der gemessenen Referenzsubstanzen
Die jeweiligen Hauptmaxima sind unterstrichen. Angaben in Klammern sind Schultern oder schwache Signale.

Substanz	Retentionszeit [min]	Maxima [nm]
Adonixanthin	17,9	465
Astaxanthin	16,3	478
Canthaxanthin	19,4	476
Capsanthin	18,2	473
Lutein	20,5	445, 473
Lycopin	36,1	446, 473, 504
Physalien	32,4	451, 479
Phytoen	23,1	274, 286, 294
Phytofluen	25,4	332, 348, 367
trans-β-Apo-8'-carotinal	21,0	462
Zeaxanthin	17,9	452, 479
α-Carotin	25,4	(424), 447, 475
β-Carotin	26,4	452, 479
β-Cryptoxanthin	22,7	452, 479
β-Zeacarotin	26,6	401, 424, 474
ζ-Carotin	28,8	380, 401, 426

Wie zu erwarten haben polare Substanzen eine kürzere Retentionszeit als unpolare Substanzen. Alle Substanzen zeigen ein ausgeprägtes Absorptionsspektrum. Abbildung 4.1 zeigt ein Chromatogramm der Referenzsubstanzen. Abgebildet sind Canthaxanthin, Zeaxanthin, β-Cryptoxanthin, α- und β-Carotin und Lycopin.

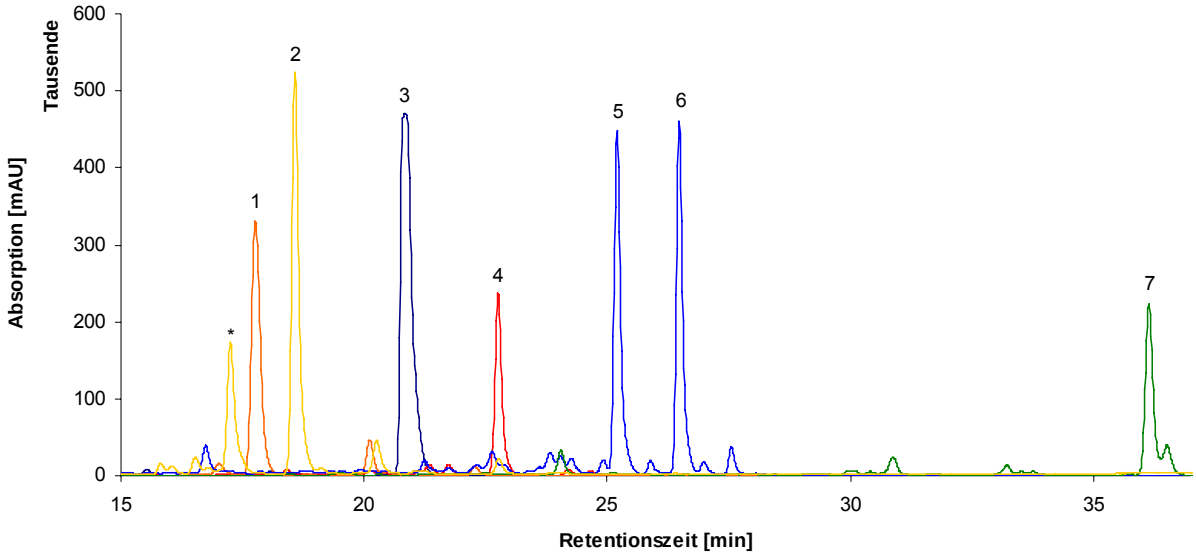


Abbildung 4.1 Ausschnitt aus einem Chromatogramm verschiedener Referenzsubstanzen

Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus einem HPLC-Chromatogramm verschiedener Carotinoide gemessen bei 450 nm. Es wurden Zeaxanthin (1), Canthaxanthin (2) und ein (*Z*)-Isomer (*), Apocarotinal (3), β-Cryptoxanthin (4), α-Carotin (5), β-Carotin (6) und Lycopin (7) getrennt.

Ein Chromatogramm mit einer Auswahl von Substanzen, welche kaum bei 450 nm absorbieren ist in Abbildung 4.2 dargestellt. Bei den gemessenen Substanzen handelt es sich um Phytoen (1) mit einem Maximum von 286 nm, Phytofluen (2) mit einem Maximum von 348 nm und ζ-Carotin (4) mit einem Maximum von 401 nm. Die Substanz 4 ist β-Carotin.

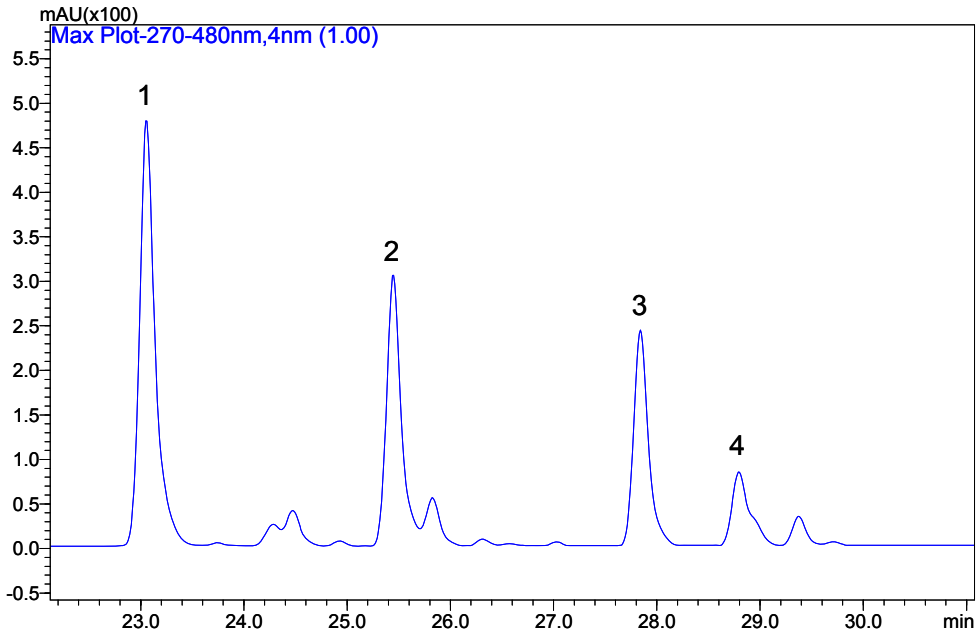


Abbildung 4.2 Chromatogramm von β-Carotin, Phytoen, Phytofluen und ζ-Carotin

In diesem Lauf wurden Phytoen (1), Phytofluen (2), β-Carotin (3) und ζ-Carotin (4) getrennt. Das Chromatogramm wurde in einem Max-Plot hergestellt. Dabei wird jeweils die maximale Wellenlänge in einem vorgebenenen Intervall zur Berechnung des Chromatogramms herangezogen.

4.2.3 Eignung der Methode für Farnesol und Geraniol

Nachdem Carotinoide und langkettige C_{40}-Vorstufen erfolgreich mit der etablierten Methode gemessen werden konnten, wurde versucht auch die kurzkettigeren Vorstufen Farnesol und Geraniol zu detektieren. Es war anzunehmen, dass die Detektion im ultravioletten Bereich stattfinden muss. Daher wurden Lösungen mit 500 mg/l verwendet und dabei ein Bereich von 200 bis 450 nm gemessen. Es wurden starke Absorptionen bei 239 nm bei Geraniol mit einer Retentionszeit von 3,7 min und Farnesol bei 1,9 min und einem Absorptionsmaximum von 269 min gefunden. Die Detektion für diese Substanzen wurde daher auch bei dieser Wellenlänge durchgeführt. Abbildung 4.3 zeigt das erhaltene Chromatogramm. Diese Untersuchungsmethode wurde im Weiteren aber nicht mehr eingesetzt.

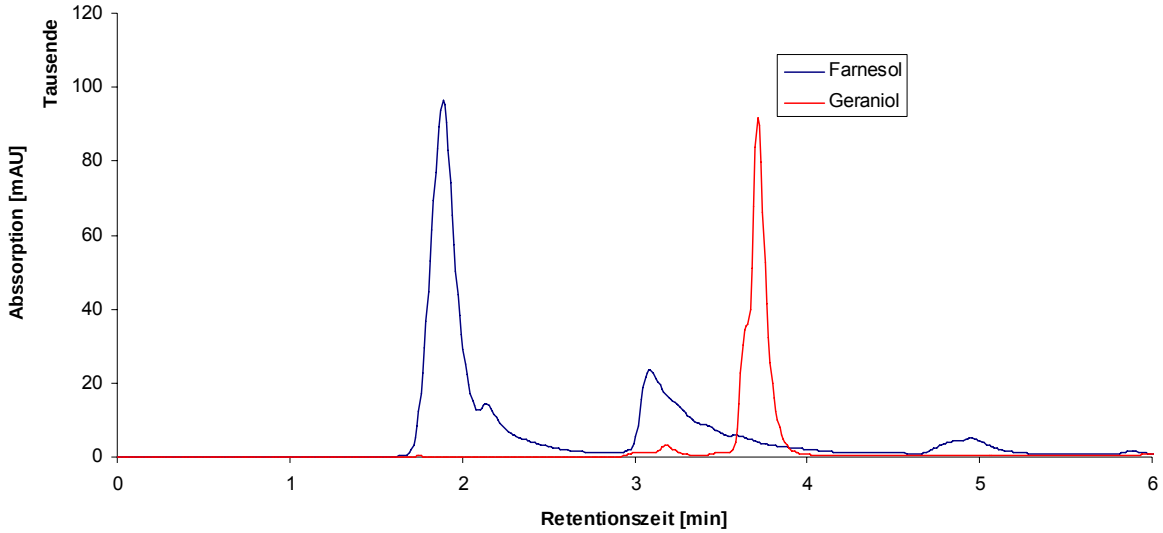


Abbildung 4.3 Chromatogramm von Geraniol und Farnesol

4.2.4 Identifizierung von (*Z*)-Isomeren

In einigen Proben wurden weitere Signale gefunden, die mit den verwendeten Referenzsubstanzen nicht zugeordnet werden konnten. Einige Signale zeigten einen zusätzlichen (*Z*)-Peak, so dass hier von Strukturisomeren ausgegangen werden konnte. Zur sicheren Identifizierung wurden aus den (all-*E*)-Isomeren die (*Z*)-Isomere herzustellen.

Von Zechmeister wurde die Isomerisierung von Carotinoiden mit Iod[91] und konzentrierter Salzsäure[92] beschrieben.

Zur Isomerisierung mit Iod wurden etwa 10 mg β-Carotin in 80 ml Hexan gelöst und mit etwa 0,2 mg Iod versetzt. Die Lösung wurde etwa 1,5 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt und anschließend mit 1 Volumen Natriumthiosulfatlösung (c = 1 M) versetzt. Dieser Vorgang wurde wiederholt bis kein Niederschlag mehr zu beobachten war. Die Lösung wurde drei Mal

mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt.

Zur Isomerisierung mit Salzsäure wurde wie oben vorgegangen, anstelle von Iod wurden 40 ml konzentrierte Salzsäure zugegeben. Nach der Reaktion bei Zimmertemperatur wurde die Salzsäure abgetrennt und die organische Phase mit Wasser gewaschen bis das Waschwasser nicht mehr sauer reagierte. Anschließend wurde die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt.

Die Rückstände wurden in etwa 10 ml Hexan gelöst und mittels LC/MS untersucht, da aus der Literatur bekannt ist, dass sich neben den Isomeren noch Oxidationsprodukte bilden.[93]

Bei der Isomerisierung mit Iod wurden sehr viele Signale mit Retentionszeiten zwischen 5 und 30 Minuten erhalten. Die Isomerisierung mit Salzsäure war dagegen viel einfacher auszuwerten. Es wurden mehrere Signale gefunden, die mit Signalen in den Proben übereinstimmen. Die Hauptpeaks sind in Tabelle 4.4 angegeben. Da keine Referenzsubstanzen zur Verfügung standen und nur durch aufwendige weitere Untersuchungen die tatsächliche Identität abgeleitet werden kann, wurden die Zuordnungen anhand der Absorptionsspektren vorgenommen.[94] Nach der Auswertung der Spektren wurden (9*Z*)-, (13*Z*)- und (15*Z*)-Isomere gefunden. Signale mit diesen Retentionszeiten konnten auch in realen Proben gefunden werden. Bei stark aufkonzentrierten Proben konnten hier auch die (*Z*)-Peaks erkannt werden.

Tabelle 4.4 Hauptpeaks der Salzsäureisomerisierung von β-Carotin

Die Zuordnungen wurden, außer für (all-*E*)-β-Carotin, anhand der Absorptionsspektren in der Literatur vorgenommen und sind, bis zu einer Bestätigung durch weitere Strukturaufklärungstechniken, nur vorläufig.

Retentionszeit	Maxima [nm]	Masse [Da]	Zuordnung
26,5 min	343, 445, 469	536,3	(15*Z*)-β-Carotin
26,6 min	339, 440, 465	536,3	(9*Z*)-β-Carotin
27,5 min	452, 478	536,2	(all-*E*)-β-Carotin
28,8 min	348, 448, 474	536,3	(13*Z*)-β-Carotin

Bei der Umsetzung von Lycopin durchgeführt mit Iod entfärbte sich die Lösung vollständig. Bei der Umsetzung mit konzentrierter Salzsäure wurden jedoch Signale bei 33,0 und 35,5 min erhalten. Diese zeigten beiden einen deutlichen (*Z*)-Peak. Sie konnten jedoch anhand der Literatur nicht zugeordnet werden, da sich die Maxima signifikant von den publizierten unterschieden. Bei den Retentionszeiten der beiden Substanzen wurden auch Substanzen bei der Messung realer Proben gefunden.

Für Zeaxanthin wurde die Umsetzung nur mit konzentrierter Salzsäure vorgenommen. Aman und Kollegen[95] veröffentlichten zu den Isomeren des Zeaxanthins eine Untersuchung, bei der ein sehr ähnliches Laufmittelgemisch zum Einsatz kam und die Lage der Absorptionsmaxima also sehr ähnlich sein muss.

Tabelle 4.5 Hauptpeaks der Salzsäureisomerisierung von Zeaxanthin

Die Zuordnungen wurden anhand der Absorptionsspektren in der Literatur vorgenommen und sind, bis zu einer Bestätigung durch weitere Strukturaufklärungstechniken, nur vorläufig.

Retentionszeit	Maxima [nm]	Masse [Da]	Zuordnung
17,1 min	336, 444, 468	568,8	(13*Z*)-Zeaxanthin
20,6 min	340, 446, 473	568,6	(9*Z*)-Zeaxanthin

4.2.5 Quantifizierung

Zur Quantifizierung stehen mehrere Methoden zur Verfügung die sich je nach Einsatzgebiet unterschiedlich eignen.[96-98] Für diese Arbeit wurde eine Mehrpunktkalibrierung vorgenommen. Vorteilhaft ist hier besonders, dass zwischen Konzentration und Signalintensität kein linearer Zusammenhang bestehen muss. Für die Kalibrierung wurden Verdünnungsreihen β-Cryptoxanthin, β-Carotin, Lycopin und Zeaxanthin erstellt. Die einzelnen Verdünnungen enthielten 5 µg/ml Apocarotinal als interner Standard. Aus den erhaltenen Flächen wurde der Quotient der Fläche des Analyten zur Flächte des internen Standards gebildet. Dieser Quotient wurde dann gegen die Konzentration des Analyten aufgetragen. Dies ist beispielhaft für β-Cryptoxanthin in Tabelle 4.6 und Abbildung 4.4 wiedergegeben.

Tabelle 4.6 Beispielhafte Daten für Kalibriergerade für β-Cryptoxanthin

Angegeben sind die Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen.

Konzentration [µg/ml]	β-Cryptoxanthin [FE]	interner Standard [FE]	Quotient
43,0	13558167	1315659	10,31
28,7	6564779	1137444	5,77
14,3	4897232	1420669	3,45
7,8	2573800	1810344	1,42
4,1	1054344	1302736	0,81
2,1	285392	1122201	0,25
1,4	204996	1167098	0,18
0,7	114722	1295081	0,09
0,4	74211	1421756	0,05
0,2	37035	1412893	0,03

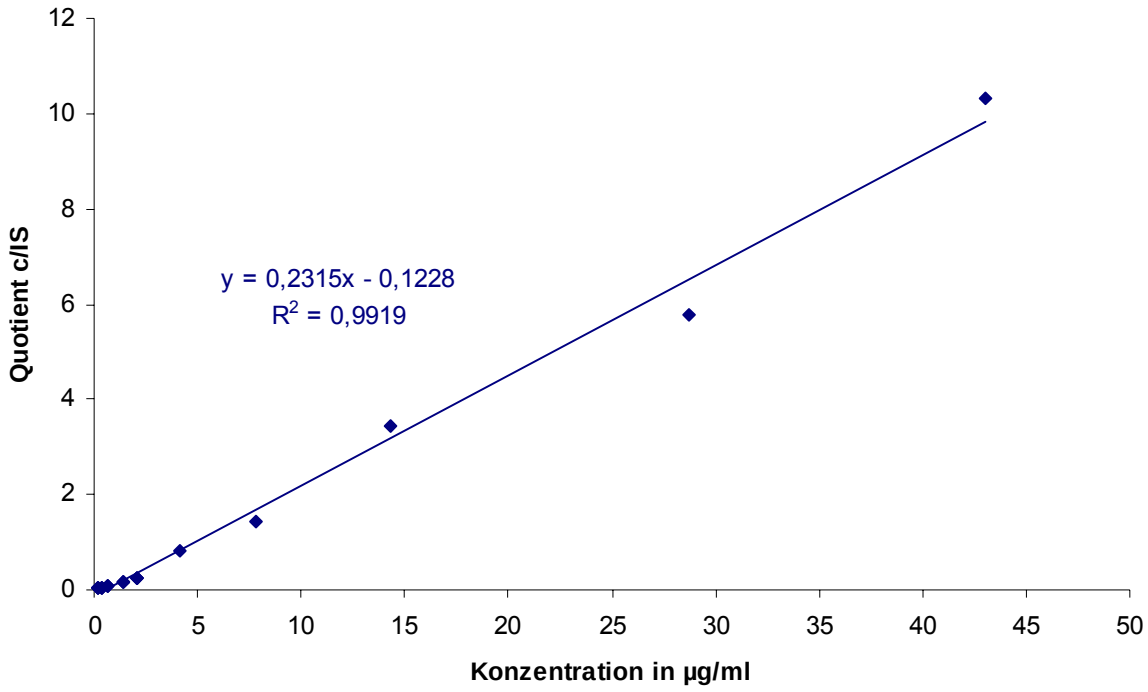


Abbildung 4.4 Kalibriergerade für β-Cryptoxanthin

Die Kalibriergerade für β-Cryptoxanthin wurde aus den Werten in Tabelle 4.6 erstellt. Auf der Ordinate ist der Quotient aus den Flächen von Analyt und internem Standard und auf der Abszisse die Werte der Analytkonzentration in µg/ml angegeben.

Es wurde als Geradengleichung für β-Carotin $y = 0{,}167\,x - 0{,}0434$, für β-Cryptoxanthin $y = 0{,}2315\,x - 0{,}1228$, für Lycopin $y = 0{,}0588\,x - 0{,}0073$ und für Zeaxanthin $y = 0{,}0934\,x - 0{,}014$ erhalten. Für Apocarotinal wurde direkt die Fläche gegen die Konzentration aufgetragen, die Funktion war $y = 239031\,x - 14935$.

4.2.6 Bestimmung der Nachweis- und der Bestimmungsgrenze

Die Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze wurde mit Hilfe des im Internet als Java-Skript frei verfügbaren Programms DINtest online des Instituts für Rechts- und Verkehrsmedizin der Universität Heidelberg[99] bestimmt. Die Bestimmung erfolgte aus den Daten für die Kalibriergeraden. Das Programm gab hierzu die Nachweis- und die Bestimmungsgrenze (Tabelle 4.7) aus, wobei für die Bestimmungsgrenze das Dreifache der Nachweisgrenze verwendet wurde.

Tabelle 4.7 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Referenzsubstanzen
Die Menge in Nanogramm wurde aus der Konzentration und dem eingespritzten Volumen von 20 µl berechnet.

Substanz	Nachweisgrenze		Erfassungsgrenze		Bestimmungsgrenze	
	in µg/ml	in ng	in µg/ml	in ng	in µg/ml	in ng
trans-β-Apo-8'-carotinal	0,18	3,6	0,37	7,4	0,79	15,8
Lycopin	0,46	9,2	0,91	18,2	1,89	37,8
β-Carotin	0,43	8,6	0,86	17,2	1,66	33,2
β-Cryptoxanthin	0,28	5,6	0,57	11,4	1,13	22,6
Zeaxanthin	1,87	37,4	3,74	74,8	7,37	147,4

Für trans-β-Apo-8'-carotinal (Apocarotinal) wurde für die Nachweisgrenze mit 0,18 µg/ml beziehungsweise 3,6 ng der niedrigste Wert gefunden. Der Wert für β-Cryptoxanthin war mit 0,28 µg/ml (5,6 ng) etwas höher. Ungefähr im selben Bereich lagen β-Carotin mit 0,43 µg/ml (8,6 ng) und Lycopin mit 0,46 µg/ml (9,2 ng). Für Astaxanthin wurde 0,89 µg/ml gefunden was 17,8 ng entspricht. Den mit Abstand höchsten Wert erzielte Zeaxanthin. Hier lag die Erfassungsgrenze bei 1,87 µg/ml oder 37,4 ng.

4.2.7 Massenspektrometrie

Um eine genauere Identifizierung unbekannter Substanzen zu ermöglichen, wurde auch eine massenspektrometrische Methode etabliert. Die von Breithaupt ebenfalls veröffentlichte Methode konnte nicht auf das vorhandene Gerät übertragen werden. Daher wurde eine Methode, die von Shimadzu zu Verfügung gestellt wurde[100] mit der von Breithaupt entwickelten Methode kombiniert. Bei einer Flussrate von 0,5 ml/min, den von Shimadzu angegebenen Geräteeinstellungen und einem Gradienten der beiden Laufmittel über einen Zeitraum von 70 min konnten Massenspektren erhalten werden. Es wurde der Molekülionenpeak (M^+-Peak) als Basispeak beobachtet. Fragmentierungen gab es nicht. Abbildung 4.5 zeigt beispielhaft das Massenspektrum von β-Carotin mit dem M^+-Signal bei $m/z = 536{,}4$ (Literatur: $M_r = 536{,}85$) und das Signal von Carotin mit angelagertem Methanolat ($[M + MeO]^+$) bei $m/z = 567{,}60$.

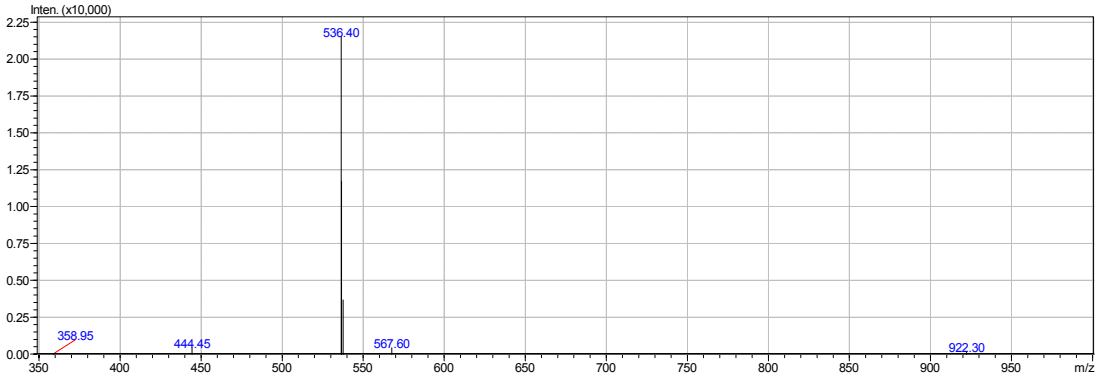


Abbildung 4.5 Massenspektrum von β-Carotin

Die Ionisierung erfolgte in einem Massenspektrometer LCMS2010 mit ESI/APCI-Doppelionenquelle. Der Molekülionenpeak bei *m/z* = 536,40 ist der Basispeak. Es gibt daneben noch ein Signal mit der Masse des β-Carotins und eines angelagerten Methylrests.

4.3 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie ist eine Methode mit welcher eine große Anzahl von Proben schnell und reproduzierbar analysiert werden kann. Für Carotinoide sind in der Literatur viele Methoden bekannt, die aber in der Regel für spezielle Trennprobleme entwickelt wurden; sie sind meist nur bedingt allgemein anwendbar.

In dieser Arbeit sollte in erster Linie die Carotinoide Lycopin, β-Carotin, β-Cryptoxanthin, Zeaxanthin und der interne Standard Apocarotinal getrennt werden.

4.3.1 Methodenentwicklung

Bei der Methodenentwicklung wurde nach einer von der Firma Camag entwickelten Technik vorgegangen.[101] Hierzu wurden in einem ersten Schritt verschiedene Lösungsmittel unterschiedlicher Polarität auf ihre Eignung geprüft. Die Tests wurden mit Aceton, Acetonitril, Diethylether, Ethanol, Essigsäureethylester, *iso*-Propanol, Methanol, Dichlormethan, *tert*-Butylmethylether, Tehtrahydrofuran und Toluol verglichen. Als stationäre Phase diente Kieselgel 60.

Tabelle 4.8 zeigt das Ergebnis dieser ersten Prüfung. In Diethylether (R_f = 0,98), *iso*-Propanol (R_f = 0,82), Dichlormethan (R_f = 0,62) und Tetrahydrofuran (R_f = 1,00) fand keine Auftrennung statt. In den anderen Laufmitteln wurden zumindest einzelne Subtanzen getrennt. Für Toluol wurde eine besonders gute Auftrennung gefunden. Apocarotinal hatte einen R_f-Wert von 0,31, β-Carotin von 1,00, β-Cryptoxanthin von 0,10, Lycopin von 0,96 und Zeaxanthin von 0,05. Auch mit Methanol und mit Ethanol zeigte sich eine teilweise Auftrennung. Die Trennung konnte hier aber auch durch Mischungen mit anderen Laufmitteln nicht verbessert werden.

Tabelle 4.8 Retentionsfaktoren der geprüften Substanzen in verschiedenen Laufmitteln

Laufmittel	Apo-carotinal	β-Carotin	β-Crypto-xanthin	Lycopin	Zeaxanthin
Aceton	1,00	1,00	1,00	1,00	0,95
Acetonitril	1,00	1,00	1,00	1,00	0,96
Diethylether	0,98	0,98	0,98	0,98	0,98
Ethanol	0,92	0,87	0,92	0,83	0,95
Es-sigsäureethyles-ter	0,96	1,00	0,92	1,00	0,84
iso-Propanol	0,82	0,82	0,82	0,82	0,82
Methanol	0,78	0,64	0,74	0,59	0,85
Dichlormethan	0,62	0,62	0,62	0,62	0,62
tert-Butylmethylether	0,98	0,98	0,95	0,96	0,83
Tetrahydrofuran	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Toluol	0,31	1,00	0,10	0,96	0,05

Mit einem Gemisch aus gleichen teilen Toluol und *tert*-Butylmethylether wurde konnte eine verbesserte Trennung der Carotinoide erreicht werden. Es zeigte sich jedoch, dass Apocarotinal (R_f = 0,93), β-Carotin (R_f = 0,97) und Lycopin (R_f = 0,99) schlecht getrennt wurden. Die Abtrennung der beiden Xanthophylle β-Cryptoxanthin und Zeaxanthin war mit R_f-Werten von 0,68 beziehungsweise 0,41 dagegen gut. Eine Verdoppelung des Toluol-Anteils brachte keine Verbesserung.

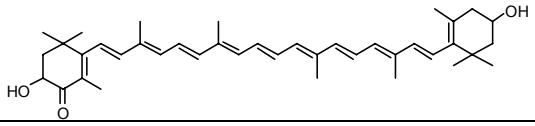
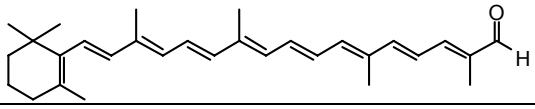
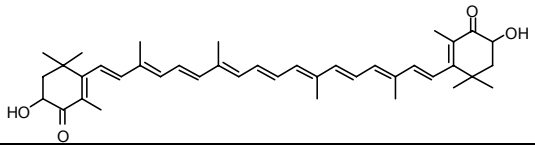
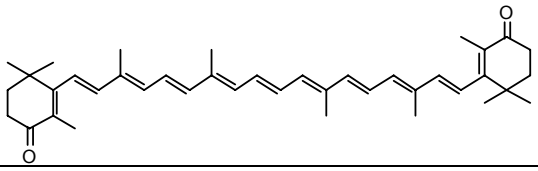
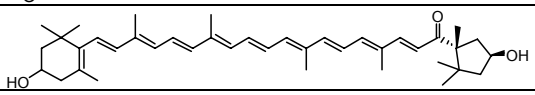
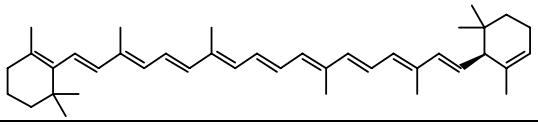
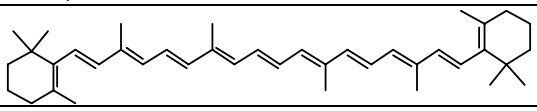
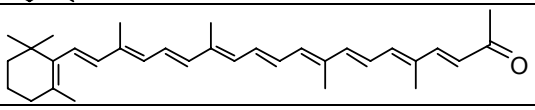
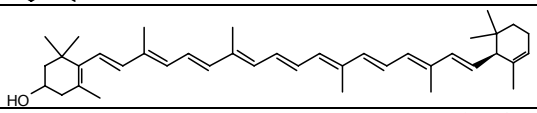
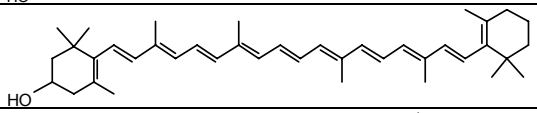
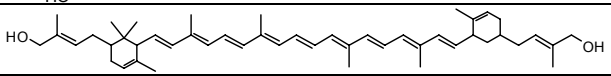
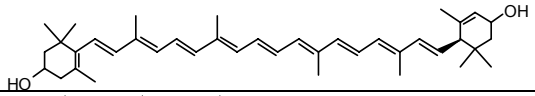
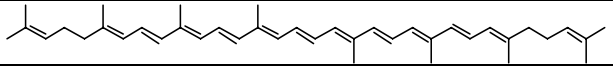
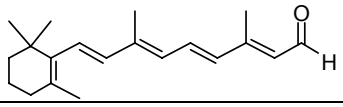
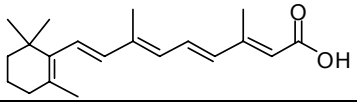
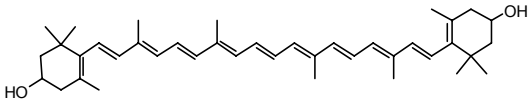
Dagegen konnte mit einem Gemisch aus gleichen Teilen MTBE, Toluol und Hexan eine weitere Verbesserung erreicht werden. Apocarotinal trennte sich jetzt mit einem R_f-Wert von 0,86 deutlich von Lycopin und β-Carotin. Die Auftrennung der beiden Xanthophylle blieb gleich. Problematisch war jetzt aber die Tatsache, dass Lycopin und β-Carotin den gleichen R_f -Wert (0,98) hatten. Dies konnte auch nicht mit höheren Anteilen von MTBE und Toluol ausgeglichen werden.

Jedoch konnte die Trennung durch Anwendung eines 2D-Verfahrens erreicht werden. Als Laufmittel in die zweite Richtung diente Aceton und Hexan in einem Mischungsverhältnis von 1:10. Die R_f-Werte unterschieden sich jetzt deutlich mit 0,92 für β-Carotin und 0,87 für Lycopin.

Nachdem die Methode für die in der Biotransformation erwarteten Substanzen etabliert war, wurde die Methode auf weitere Carotinoide ausgeweitet. Tabelle 4.9 zeigt die Strukturformeln, die R_f-Werte und die Varianzen der R_f-Werte der Substanzen.

Tabelle 4.9 Retentionsfaktoren, ihre Varianz und Strukturformeln der bei der Dünnschichtchromatographie verwendeten Substanzen

Angegeben sind die Substanzen in alphabethischer Reihenfolge mit ihren Strukturformeln, die berechneten R_f-Werte aus drei unabhängigen Bestimmungen und die Varianz der R_f-Werte als relative Standardabweichung.

Substanz		R_f-Wert	Varianz
Adonixanthin		0,18	0,0 %
Apocarotinal		0,89	2,3 %
Astaxanthin		0,25	6,2 %
Canthaxanthin		0,59	1,0 %
Capsanthin		0,07	9,1 %
α-Carotin		0,98	0,5 %
β-Carotin		0,98	0,5 %
Citranaxanthin		0,77	0,9 %
α-Cryptoxanthin		0,51	1,9 %
β-Cryptoxanthin		0,44	1,2 %
Decaprenoxanthin		0,26	5,0 %
Lutein		0,14	7,7 %
Lycopin		0,97	0,8 %
Retinal		0,78	0,8 %
Retinsäure		0,61	0,0 %
Zeaxanthin		0,15	8,0 %

In Abbildung 4.6 ist ein Chromatogramm der verschiedenen Carotinoide zu sehen. Die Flecken sind scharf abgegrenzt; lediglich bei Retinal zeigt sich deutlich ein schmierender Fleck. Wurde eine geringere Menge aufgetragen, zeigen sich zwei Flecken. Möglicherweise handelt es sich hierbei um ein (*Z*)-Isomer.

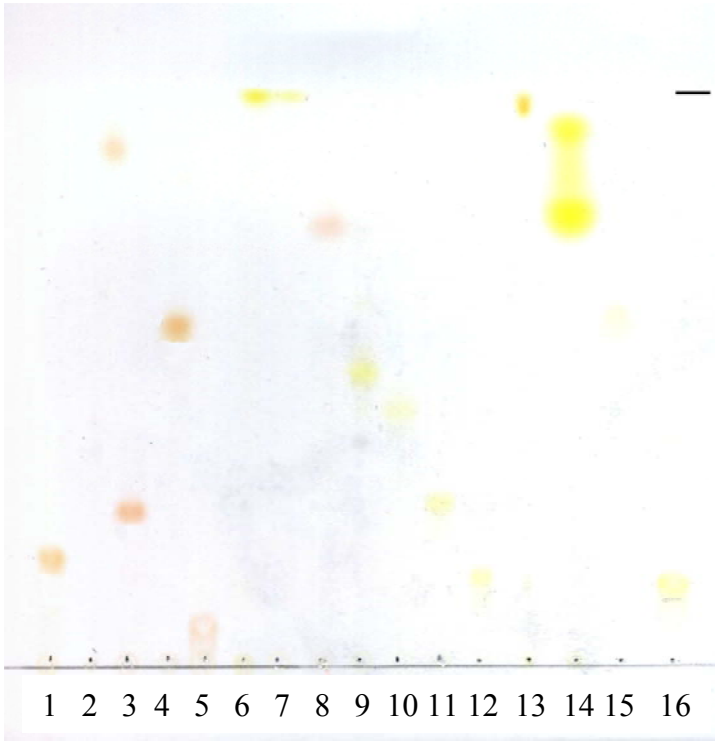


Abbildung 4.6 Dünnschichtchromatogramm verschiedener Carotinoide

Aufgetragen wurden 1: Adonixanthin; 2: Apocarotinal; 3: Astaxanthin; 4: Canthaxanthin; 5: Capsanthin; 6: α-Carotin; 7: β-Carotin; 8: Citranaxanthin; 9: α-Cryptoxanthin; 10: β-Cryptoxanthin; 11: Decaprenoxanthin; 12: Lutein; 13: Lycopin; 14: Retinal; 15: Retinsäure; 16: Zeaxanthin. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus gleichen Teilen MTBE, Toluol und Hexan.

Es wurde die Zahl der Trennstufen und die Auflösung der für die späteren Umsetzungen interessanten Substanzen Apocarotinal, Astaxanthin, Canthaxanthin, β-Carotin, β-Cryptoxanthin, Lycopin und Zeaxanthin bestimmt. Die Auflösung ist abhängig von der Laufstrecke zwischen den beiden Flecken und dem Fleckdurchmesser. Tabelle 4.10 zeigt das Ergebnis. Die Auflösungen schwanken zwischen 0,0 für die Auflösung zwischen β-Carotin und Lycopin und 9,0 für die Auflösung zwischen Canthaxanthin und Apocarotinal.

Tabelle 4.10 Auflösung und Zahl der Trennstufen der Carotinoide

Angegeben sind die für die späteren Umsetzungen interessanten Stoffe. Die Substanzen sind nach ihrem R_f-Wert geordnet. Die Auflösung ist jeweils zum nachfolgenden Fleck angegeben. Die Auflösung bei β-Carotin und Lycopin in Klammern bezieht sich auf die Auflösung zu Lycopin beziehungsweise β-Carotin. Die Auflösung zu Apocarotinal ist 7,0.

Substanz	R_f-Wert	Auflösung	Zahl der Trennstufen
Zeaxanthin	0,15	2,9	100
Astaxanthin	0,25	4,7	711
β-Cryptoxanthin	0,44	3,3	2055
Canthaxanthin	0,59	9,0	2070
Apocarotinal	0,89	7,0	73984
Lycopin	0,97	(0,0)	90000
β-Carotin	0,98	(0,0)	90000

4.3.2 Quantifizierung

Die Dünnschichtchromatographie eignet sich zur Quantifizierung von Substanzen. Dabei wird mit Hilfe einer Software die Fläche und die Farbtiefe der Flecken berechnet. Es ergibt sich das Volumen. Dieses kann wie bei der HPLC das Integral gegen die Konzentration aufgetragen werden.

Zur Bestimmung des Volumens wurden Verdünnungsreihen von β-Cryptoxanthin, β-Carotin, Lycopin und Zeaxanthin hergestellt. Den Verdünnungen wurden wie bei der HPLC 5 µg/ml Apocarotinal beigegeben. Es wurden jeweils 20 µl der Lösung aufgetragen. Anschließend wurden die DC-Platten entwickelt und eingescannt. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit dem Programm ImageJ.

Die Quantifizierung erwies sich schwierig, da nur ein gewöhnlicher Flachbettscanner zur Verfügung stand und bei diesem eine automatische Bildkorrektur stattfand, die nicht abgeschaltet werden konnte. Es konnte zwar ein linearer Zusammenhang gefunden werden, eine Anwendung der erhaltenen Kalibriergerade auf eine andere DC-Platte erwies sich jedoch als nicht möglich.

Es wurde daher bei jeder Messung 20 µl einer Cartoinoidlösung mit bekannter Konzentration, zusätzlich zu den Proben aufgetragen und mit diesen entwickelt. Anschließend wurde daraus jedes Carotinoid ein Faktor bestimmt, mit dem quantifiziert wurde.

4.4 Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden für Carotinoide aus bakterieller Matrix

In der Arbeit wurde die Extraktion Aceton, mit einem Gemisch aus Methanol, Essigsäureethylester und Hexan (Gemisch A), mit einem Gemisch aus Aceton, Methanol, Essigsäureethylester und Hexan (Gemisch B), mit methanolische Kalilauge und mit Hexan verglichen. Bei der Verseifung mit methanolischer Kalilauge wurde anschließend mit Gemisch A aus der wässrigen Phase extrahiert. Zur weiteren Verbesserung des Zellaufschlusses wurden Glasper-

len zugesetzt oder die Gemische mit Ultraschall beschallt. Alle Extraktionen wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt.

Die Extraktion mit Hexan war nicht erfolgreich. Es konnten keinerlei Carotinoide extrahiert werden. Auch bei der Verseifung wurde nur sehr wenig Zeaxanthin erhalten.

Bei Verwendung von Gemisch A konnten dagegen eine 6,4fach höhere Menge Zeaxanthin erhalten werden. Der Zusatz von Glasperlen erhöhte die Ausbeute nochmals leicht auf das 6,7fache, während der Einsatz von Ultraschall ohne Auswirkungen blieb. Bei Gemisch B wurden, wie bei Gemisch A, zwei Phasen erhalten, wobei auch die wässrige Phase gelblich gefärbt war. Im Gegensatz zu Gemisch A war hier aber auch nach Zugabe von gesättigter Kochsalzlösung und Zentrifugation keine vollständige Entfärbung der wässrigen Phase beobachtet werden. Die Extraktion mit diesem Gemisch war daher mit einem großen Substanzverlust verbunden. Im besten Fall wurden nur etwas mehr als 80 % der Ausbeute von Gemisch A erhalten.

Bei der Verwendung von Gemisch A und der Verwendung von Aceton zeigte sich, dass nahezu das gleiche Ergebnis erhalten wurde. Aceton bietet gegenüber Gemisch A jedoch den Vorteil, dass es weniger umwelt- und gesundheitsgefährdend ist und sich keine zwei Phasen ausbilden. Daher wurde für künftige Extraktionen Aceton verwendet. Nachteilig an Aceton war, dass wegen der guten Mischbarkeit mit Wasser viel Wasser aus den Zellen und aus Resten des Mediums das an den Zellen haftete in den Extrakt überging. Die Trocknung des Extrakts mit wasserfreiem Magnesiumsulfat oder Natriumsulfat war nur schwer möglich, da etwa ein Fünftel bis ein Viertel des Volumens aus Wasser bestand. Das Wasser musste somit relativ zeitaufwendig verdampft werden.

Der Zusatz von Glasperlen hat keinen Einfluss auf die Extraktion. Der geringe Anstieg der Ausbeute ist innerhalb der Fehlergrenzen der Extraktion ohne weiteren Zusatz. Bei der Verwendung von Ultraschall sinkt die Ausbeute sogar, was vermutlich auf die schlechtere Durchmischung der Zellpellets mit dem Extraktionsmittel zurückzuführen ist (Abbildung 4.7).

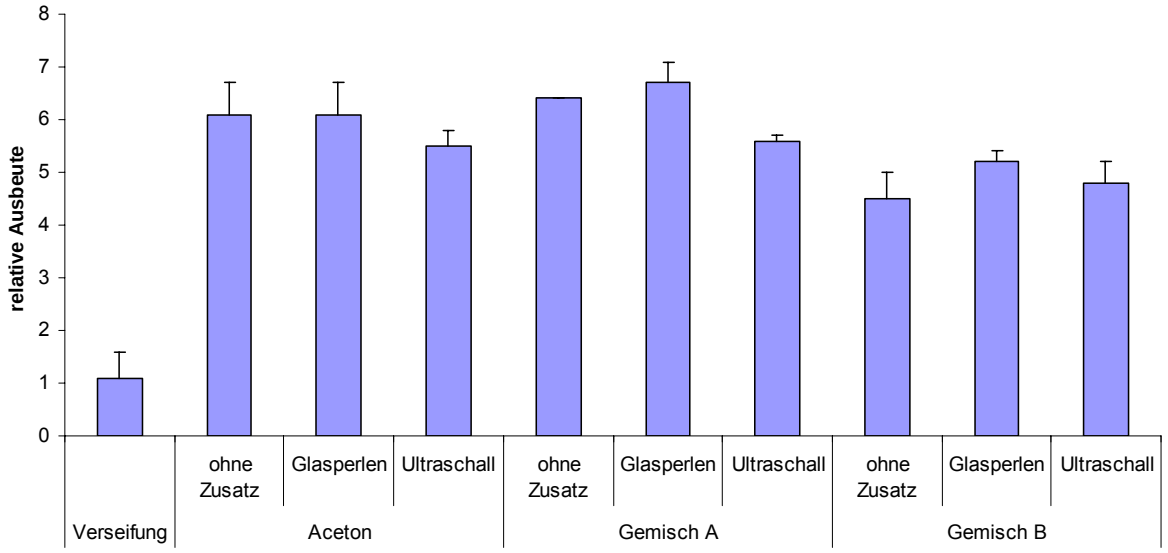


Abbildung 4.7 Relative Ausbeuten an Zeaxanthin bei Verwendung verschiedener Extraktionsmethoden
Die relativen Ausbeuten sind bezogen auf den Mittelwert der Verseifung. Gemisch A ist ein Gemisch aus gleichen teilen Methanol, Essigsäureethylether und Hexan. Gemisch B wurde aus gleichen Teilen Aceton, Methanol, Essigsäureethylether und Hexan hergestellt.

4.4.1 Bestimmung der Wiederfindungsrate

Nachdem in einem Vergleich verschiedener Extraktionsverfahren Aceton als Extraktionsmittel ausgewählt wurde (Kapitel 4.3.2), wurde die Wiederfindungsrate (WFR) der Carotinoide bestimmt. Aufgrund dessen, dass nicht alle Carotinoide in Reinform oder in ausreichender Menge zur Verfügung standen, wurde die Wiederfindungsrate nur von Zeaxanthin als polarem Xanthophyll und von Lycopin als unpolarem Carotin bestimmt. Ferner wurde sie für das als internen Standard verwendete Apocarotinal bestimmt.

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden 100 mg feuchte Zellen extrahiert, der Gehalt bestimmt und anschließend mit verschiedenen Mengen der genannten Carotinoide aufgestockt. Die Proben wurden erneut gemessen und die erhaltenen Signale gegen die Menge an aufgestockter Substanz aufgetragen. Die Steigung entspricht dann der Wiederfindungsrate. Eine Wiederfindungsrate von 100 % würde somit der ersten Winkelhalbierenden entsprechen.[102]

Für Lycopin wurden 3,5, 7,0 und 10,5 µg, an Zeaxanthin 3,3, 6,6 und 10 µg und für Apocarotinal 5, 10 und 15 µg zugesetzt.

Beispielhaft für die erhaltenen Diagramme ist das von Lycopin in Abbildung 4.8 wiedergegeben. Für Lycopin wurde eine Wiederfindungsrate 98,1 %, für Zeaxanthin von 97,3 % und für Apocarotinal 98,0 % erhalten

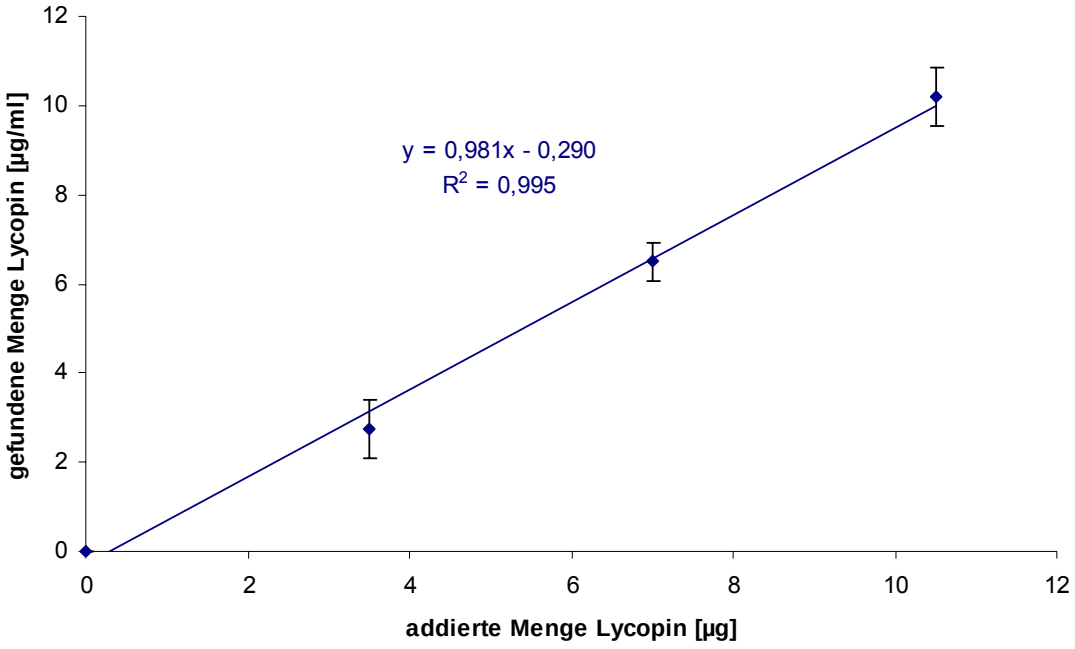


Abbildung 4.8 Graphische Bestimmung der Wiederfindungsrate

Beispielhaft ist die Auswertung für Lycopin dargestellt. Auf der x-Achse ist die Menge an Lycopin, welche den Proben zugegeben wurde, aufgetragen. Auf der y-Achse findet man die gemessenen Werte für Lycopin in der Probe.

4.5 Entwicklung einer Methode zur Dephosphorylierung von Geranylgeranylpyrophosphat

Mittel der Wahl für die Identifizierung und Quantifizierung der Carotinoidvorstufen bis einschließlich Geranylgeraniol ist die Gaschromatographie gekoppelt mit der Massenspektrometrie (GC/MS); aber auch die HPLC ist bei Wahl der entsprechenden Bedingungen zur Analyse geeignet. Ab Phytoen muss wegen der Isomerisierungsgefahr und wegen der relativ hohen Masse (544,94 Da) die HPLC zum Einsatz kommen.

Geranylgeraniol ist zum einen ein interessanter Synthesebaustein und zum anderen auch eine wichtige Vorstufe der Carotinoidsynthese. Ferner hat das Produkt eine hohe Wertschöpfungsrate. Gegenwärtig (2010) sind 100 mg für etwa 50 € im Handel erhältlich (Sigma-Aldrich). Sowohl zur Quantifizierung mit Hilfe der Gaschromatographie als auch zur Herstellung des eigentlichen Produkts ist eine Dephosphorylierung notwendig.

In literaturbekannten Methoden wird zuerst eine chemische Lyse der Zellen[103], ein mechanischer Aufschluss[104] oder eine Kombination beider Verfahren durchgeführt. Anschließend wird in der Regel mit Hilfe von alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP) dephosphoryliert.[104, 105]

In dem entwickelten Verfahren wird methanolische Kalilauge sowohl zum Zellaufschluss als auch zur Dephosphorylierung verwendet. Bei Vorversuchen mit reinem Geranylgeranylpy-

rophosphat und Geranylgeraniol zeigte sich, dass in Eppendorfgefäßen ein Substanzverlust eintritt. Die Reaktionen wurden daher in Glasvial durchgeführt, die mit Metallkappen mit Septum verschlossen wurden.

Etwa 50 mg feuchte Zellen wurden in ein Vial überführt und mit 100 µl methanolischer Kalilauge (c = 1,5 M) versetzt. Das Gemisch wurde 2 h im Trockenschrank auf 70 °C erhitzt. Es wurde eine sehr dickflüssige Lösung erhalten, die mit 200 µl Salzsäure (c = 6 M) versetzt und in ein Eppendorfgefäß überführt wurde. Anschließend wurde der Überstand von den Zelltrümmern durch Abzentrifugieren für 5 min bei Höchstgeschwindigkeit getrennt. Der erhaltene gelbliche Überstand wurde anschließend noch zwei Mal mit jeweils 300 µl Hexan extrahiert. Die Lösung wurde auf ein Volumen von etwa 20 µl eingeengt und gaschromatographisch untersucht. Es wurde ein Signal bei einer Retentionszeit von 19,3 min erhalten. Der Flächenanteil dieses Signals zu den anderen betrug 37,1 %. Das Signal stimmte sowohl hinsichtlich der Retentionszeit (Abbildung 4.9) als auch der Fragmentierung im Massenspektrometer mit reinem Geranylgeraniol (Tabelle 4.11) überein.

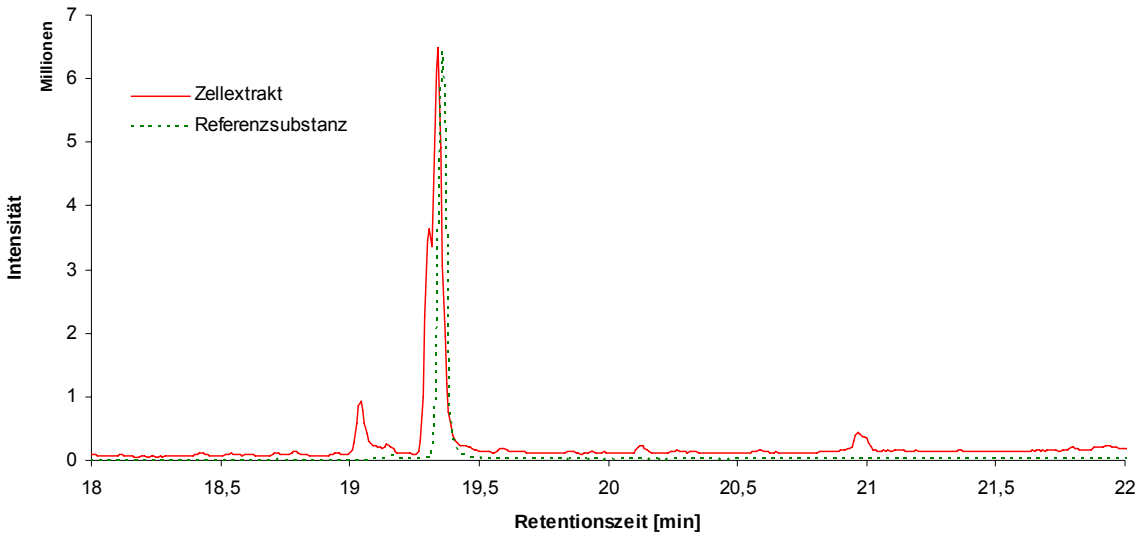


Abbildung 4.9 Auszug aus einem Chromatogramm des Rohextrakts und der Referenz

Aufgetragen sind ein Auszug des Chromatogramms des Rohextrakts in Hexan (rot) und die Referenzsubstanz gelöst in Hexan (grün).

Ein Massenspektrum der erhaltenen Substanz ist in Abbildung 4.10 zu sehen.

Tabelle 4.11 Charakteristische *m/z*-Werte für Geranylgeraniol und das durch Verseifung erhaltene Produkt

Angegeben sind herausragende m/z-Werte mit den dazugehörigen Intensitäten in Prozent (in Klammern)

Geranylgeraniol	69 (100), 81 (40), 93 (19), 107 (9), 121 (5), 136 (3), 189 (0,4)
Substanz	69 (100), 81 (43) , 93 (20), 107 (13), 121 (11), 136 (9), 147 (3), 189 (2), 290 (0,1) [M^+]

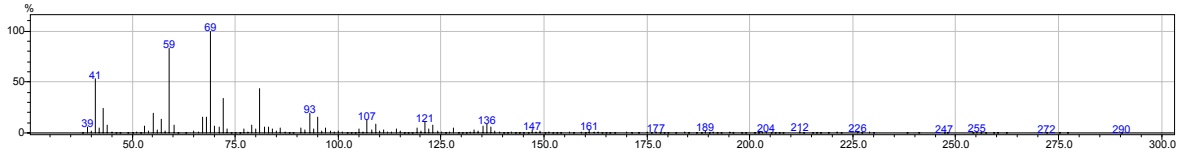


Abbildung 4.10 Massenspektrum des dephosphorylierten Geranylgeraniols

Die besonders charakteristischen Massen-/Ladungsverhältnisse bei 69, 81, 93, 107 und 121 wurden in beiden Messungen gefunden. Bei der Messung des dephosphorylierten Ansatzes wurde ferner auch der Molekülionenpeak bei *m/z* = 290 gefunden. Das für die Substanz erhaltenen Massenspektrum stimmt auch mit dem in der *Spectral Database for Organic Compounds* des *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology*, Japan, mit der SDBS-Nummer 10624 hinterlegten Massenspektrum sehr gut überein.[106]

4.6 Vergleich der nicht-hämhaltigen β-Carotinhydroxylasen aus *Pantoea ananatis* und *Brevundimonas* sp. SD212 in *Escherichia coli*

Es sind mehrere β-Carotinhydroxylasen bekannt. Neben den hämhaltigen Cytochrom-P450-Monooxygenasen gibt es mehrere nicht-hämhaltige. Für diese Arbeit wurden zwei am Institut für Industrielle Genetik kloniert und für diese Arbeit exprimiert. Zum einen war dies die β-Carotinhydroxylase aus *Brevundimonas* sp. SD212 ($CrtZ_{Brev}$) und zum anderen aus *Pantoea ananatis* (CrtZ). Sie wurden in Plasmide eingefügt, welche alle nötigen Gene zur Carotinsynthese enthielten. Für einen ersten Versuch wurden diese Plasmide in *E. coli* JM-109 transformiert und die erhaltenen Klone in LB-Medium kultiviert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen pelletiert und extrahiert.

Abbildung 4.11 zeigt die verschiedenen Ausbeuten im Überblick. Bei der Verwendung des Plasmids pJH14 mit CrtZ wurde eine höhere volumetrische Zeaxanthinausbeute von 2 mg/l erhalten. Die Zeaxanthinmenge, die mit $CrtZ_{Brev}$ erhalten wurde, beträgt nur ein Fünftel dieses Wertes. Ferner wurden bei $CrtZ_{Brev}$ prozentual höhere Mengen β-Carotin gefunden. Während die Menge bei CrtZ 12 µg/l, was einem Anteil von 0,6 % entspricht, liegt, beträgt er bei $CrtZ_{Brev}$ 8,7 % (38 µg/l). Bei β-Cryptoxanthin zeigt sich ein sehr ähnliches Bild. Die Menge beträgt bei CrtZ 10 µg/l und bei $CrtZ_{Brev}$ 19 µg/l. Der relative Anteil ist bei CrtZ mit 0,5 % aber wesentlich niedriger als bei $CrtZ_{Brev}$ mit 4,2 %.

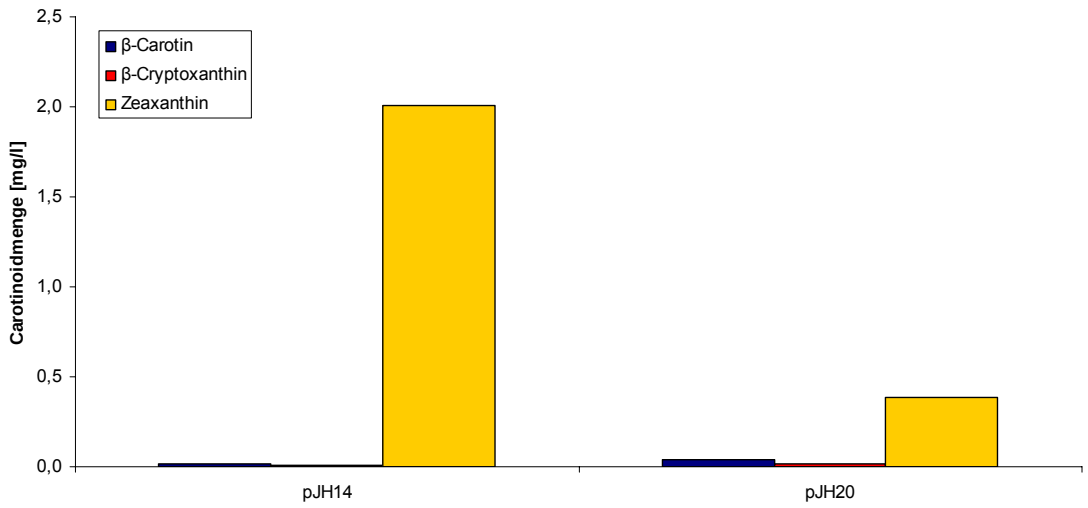


Abbildung 4.11 Produktverteilung bei den β-Carotinhydroxylasen aus *Brevundimonas* sp. SD212 und *Pantoea ananatis*

Das Plasmid pJH14 enthielt die β-Carotinhydroxylase aus *Pantoea ananatis* und das Plasmid pJH20 die Hydroxylase aus *Brevundimonas* sp. SD212.

Die Reinheit des erhaltenen Zeaxanthins beträgt bei CrtZ 98,9 % und bei $CrtZ_{Brev}$ 87,1 %. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde mit der β-Carotinhydroxylase aus Pantoea ananatis weitergearbeitet. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde dann noch die Monooxygenase CYP175A1 verwendet. Ein Vergleich von CrtZ und diesem Enzym ist in Kapitel 4.6 beschrieben.

4.7 Transformation in *Pseudomonas putida* mittels Elektroporation

Da Anfangs die Transkonjugation in *P. putida* KT2440 nicht gelang[107], wurde eine Methode zur Transformation mit Elektroporation etabliert. Diese Methode verspricht bis zu $1{,}1 \cdot 10^5$ Transformanden je Mikrogramm DNS.[108] Hierzu wurde eine Kultur von *P. putida* KT2440 bis zu einer optischen Dichte von ca. 0,3 kultiviert und mehrfach mit Saccharose-Lösung (c = 300 mM) salzfrei gewaschen. Anschließend wurde mit einer Spannung von 2,5 kV, einem Widerstand von 200 Ω und einer Kapazität von 25 µF elektroporiert. Die Menge der transformierten DNS betrug durchschnittlich 325 ng. Nach der Elektroporation wurden die Zellen zunächst 2 h in 900 µl LB-Medium kultiviert und dann auf Agar-Platten mit LB-Medium ausplattiert. Nach 48 h wurden die Kolonien ausgezählt und die Anzahl der gefärbten Kolonien bestimmt (Tabelle 4.12). Für das Plasmid pJOE5573.2 welches die Gene bis zum Lycopin trägt, wurden neun Kolonien gefunden, die alle orange gefärbt waren. Für das Plasmid pJOE5607.5, welches die Gene bis zum β-Carotin trägt, wurden mehr als 20 Kolonien gefunden, davon waren mehr als die Hälfte gelb. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich für das Plasmid pJH14 mit welchem Zeaxanthin mit der β-Carotinhydroxylase aus *Pantoea ananatis* hergestellt werden kann. Es wurden mehr als 20 Kolonien gezählt und 15 Kolonien waren

gelb gefärbt. Das schlechteste Ergebnis wurde für das Plasmid pJOE5653.5 erhalten, mit welchem ebenfalls Zeaxanthin mit der P450-Monooxygenase CYP175A1 aus *Thermus thermophilus* HB27 hergestellt werden kann. Von 18 gefundenen Kolonien waren lediglich vier gelb. Beim wiederholten Ausstreichen der farbigen Kolonien auf Agar-Platten behielten die Kolonien ihre Farbe bei.

Tabelle 4.12 Ergebnis der Transformation verschiedener Plasmide in *P. putida* KT2440

Vektor	Produkt	Kolonien	farbig
pJOE5573.2	Lycopin	9	9 orange
pJOE5607.5	β-Carotin	>20	>10 gelb
pJOE5653.5	Zeaxanthin	18	4 gelb
pJH14	Zeaxanthin	>20	15 gelb

4.7.1 Untersuchung der isolierten Plasmide

Zunächst stand nur das Plasmid pJOE5653.5 mit der P450-Monooxygenase CYP175A1 zur Verfügung. Daher wurde anfangs die Untersuchung darauf konzentriert. Mit verschiedenen farbigen und farblosen Kolonien aus der Transformation von pJOE5653.5 wurden Übernachtkulturen inokuliert und die Plasmide isoliert. Anschließend wurde eine Agarosegelelektrophorese vorgenommen. Zur Kontrolle wurde das transformierte Plasmid auch aufgetragen. Abbildung 4.12 zeigt ein Agarosegel der Plasmide aus farblosen Kolonien.

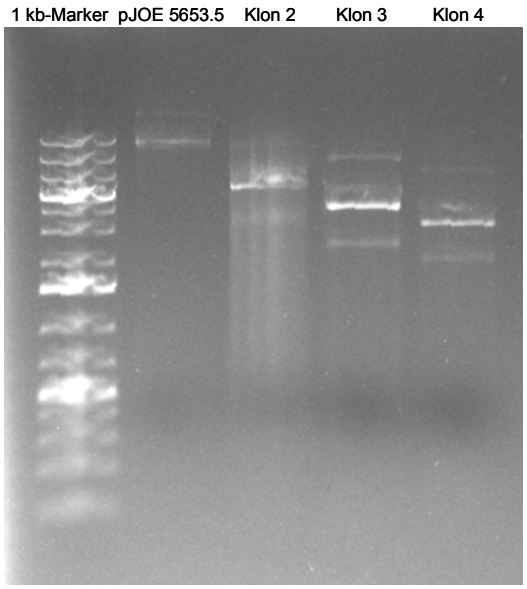


Abbildung 4.12 Agarosegel der Plasmidisolierung aus *P. putida* KT2440 mit pJOE5653.5

Es zeigte sich, dass in keinem Klon ein Plasmid der richtigen Größe enthalten war. In einer weitergehenden Untersuchung am Institut für Industrielle Genetik zeigte sich, dass wesentliche Teile des Plasmids fehlten.

4.7.2 Untersuchung der Produktion der erhaltenen Klone

In den farbigen Kolonien konnten aus der Transformation mit pJOE5653.5 jedoch Plasmide richtiger Größe gefunden werden. Diese Klone wurden kultiviert und die Zellen extrahiert. Zur Zeit der Untersuchung war die HPLC-Methode noch nicht etabliert, daher wurden nur Verhältnisse bestimmt. Die Verhältnisse der einzelnen Substanzen sind mit 86 % bzw. 82 % für β-Carotin, 7 % und 11 % für β-Cryptoxanthin und jeweils 7 % für Zeaxanthin in beiden Klonen sehr ähnlich. Sehr deutlich sichtbar ist auch, dass die Hydroxylierung offenbar nur sehr schlecht funktioniert hat und daher das nicht-hydroxylierte β-Carotin das Hauptprodukt darstellt während sowohl das einfach als auch das doppelt hydroxylierte Produkt nur eine untergeordnete Rolle spielt (Abbildung 4.13)

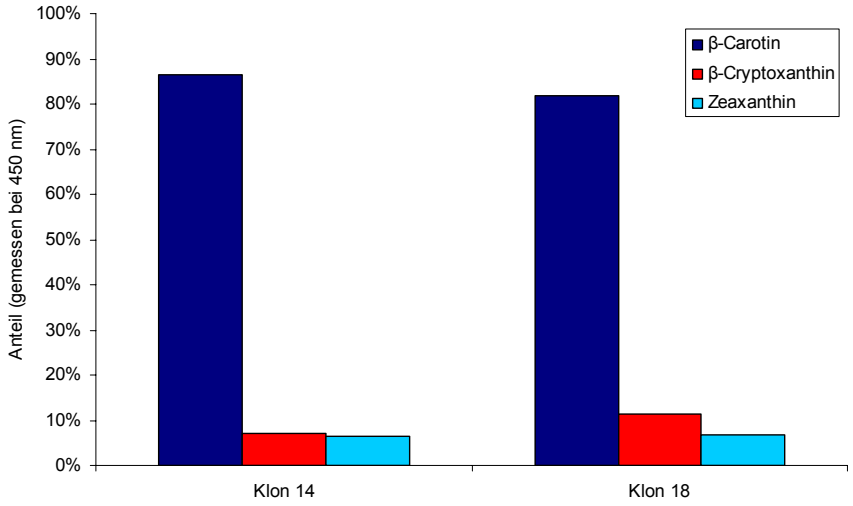


Abbildung 4.13 Produkte aus zwei Klonen von *P. putida* KT2440 mit pJOE5653.5

Nachdem das Plasmid pJH14 vom Institut für Industrielle Genetik hergestellt wurde, kam auch dieses zur Transformation. Es wurden vier gelbe Kolonien zur weiteren Untersuchung ausgewählt. Mit diesen wurden zunächst Übernachtkulturen angeimpft und anschließend in 100 ml LB-Medium kultiviert. Nach 24 h wurden die Produkte extrahiert und am HPLC analysiert.

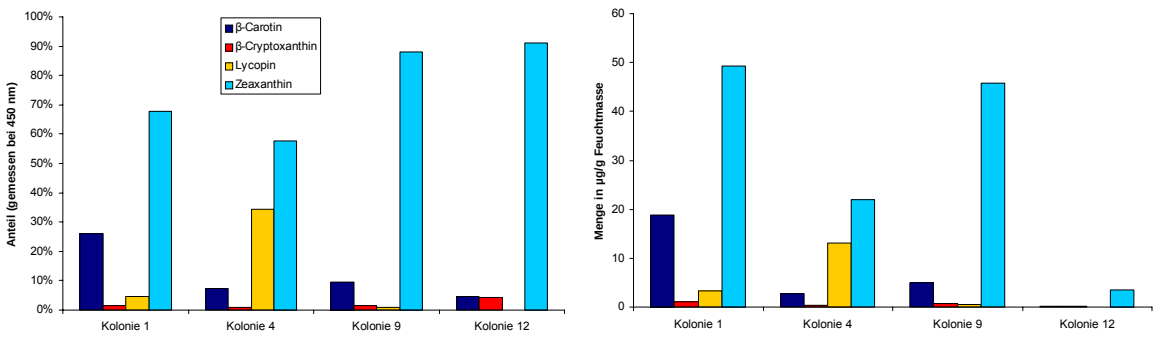


Abbildung 4.14 Produkte aus verschiedenen Klonen von *Pseudomonas putida* KT2440 mit pJH14
Links Anteile der einzelnen Substanzen bezogen auf die Gesamtabsorption bei 450 nm, rechts die Menge in Gramm pro Gramm Feuchtmasse. Die Anteile beziehen sich auf die Fläche des entsprechenden Carotinoids gemessen bei 450 nm anteilig zur Summe der Flächen.

Aus der Transformation von pJH14 wurden vier der erhaltenen Klone gewählt, kultiviert und nach 24 h das Produktgemisch extrahiert. Der Extrakt wurde mittels HPLC analysiert. Es zeigte sich, dass die Werte der einzelnen Klone sowohl hinsichtlich der Reinheit des erhaltenen Zeaxanthins als auch der absolut produzierten Menge stark untereinander schwankten.
Für Kolonie 1 wurden 49,3 µg/g erhalten, was einem Anteil von 68 % entspricht. Kolonie 4 zeigte eine ähnliche Reinheit von 58 % aber mit 21,9 µg/g eine wesentlich geringere Ausbeute. Die relativen Mengen bei Kolonie 9 und 12 waren mit 88 % bzw. 91 % sehr ähnlich. Bei den absoluten Mengen zeigte jedoch Kolonie 12 mit einer Ausbeute von nur 3,5 µg/g das schlechteste Ergebnis aller getesteten Kolonien. Bei Kolonie 9 war die Ausbeute mit 45,8 µg/g dagegen hoch.
Auch bei den Vorstufen wurden sehr unterschiedliche Mengen erhalten. Bei Klon 4 wurde viel Lycopin (13 µg/g oder 34 %) produziert, bei den anderen war β-Carotin das wichtigste Nebenprodukt. Lycopin dagegen wurde mit einem Anteil von maximal 4,5 % gefunden. β-Carotin hatte einen Anteil von 26 % bei Klon 1, 9,6 % bei Klon 9 und 4,5 % bei Klon 12 an den gefundenen Carotinoiden (Abbildung 4.14).
Für die weiteren Untersuchungen wurde Klon 9 verwendet, der hinsichtlich Reinheit (88 %) und Ausbeute (45,8 µg/g Feuchtmasse) einen guten Kompromiss darstellte.

4.8 Vergleich verschiedener Mutanten von *Pseudomonas putida*

Nachdem im Wildtyp nur eine relativ geringe Menge Zeaxanthin produziert wurde, stellte das Institut für Industrielle Genetik vier Mutanten zur Verfügung, die mittels Transposonmutagenese erzeugt und nach Tranformierbarkeit carotinogener Plasmide selektiert wurden. Sie wurden in 50 ml LB-Medium kultiviert, die Zellen nach 24 h geerntet und der Extrakt chromatographisch untersucht.

Wie aus Abbildung 4.15 ersichtlich, ist der Gehalt der Carotinoide in den einzelnen Mutanten sehr verschieden. Wie auch im Wildtyp wurde neben Zeaxanthin, Lycopin, β-Carotin und β-Cryptoxanthin nachgewiesen. Ferner wurden viele Signale gefunden die von (*Z*)-Isomeren herrühren.

Bei der Mutante C7L zeigte sich, dass nahezu gleich viel β-Carotin (2,0 mg/l) wie Zeaxanthin (2,2 mg/l) gebildet wurde. Ferner wurden hier 0,1 mg/l β-Cryptoxanthin und 0,5 mg/l Lycopin gefunden.

In der Mutante E3L2 wurde dagegen ein sehr hoher Gehalt an Lycopin gefunden. Mit 1,6 mg/l war er nahezu gleich hoch wie der Zeaxanthingehalt mit 1,9 mg/l. Dagegen waren der β-Carotingehalt und der β-Cryptoxanthingeahlt mit 0,4 mg/l beziehungsweise 10,6 µg/l niedriger als in allen anderen Mutanten.

Die Mutanten D7L3 und D8L1 zeigten ein sehr ähnliches Produktspektrum. In der Mutante D7L3 wurden 0,2 mg/l Lycopin, 1,2 mg/l β-Carotin, 0,2 mg/l β-Cryptoxanthin und 3,1 mg/l Zeaxanthin gefunden. Bei der Mutante D8L1 konnten dagegen 0,4 mg/l Lycopin, 1,3 mg/l β-Carotin, 0,1 mg/l β-Cryptoxanthin und 3,7 mg/l Zeaxanthin nachgewiesen werden.

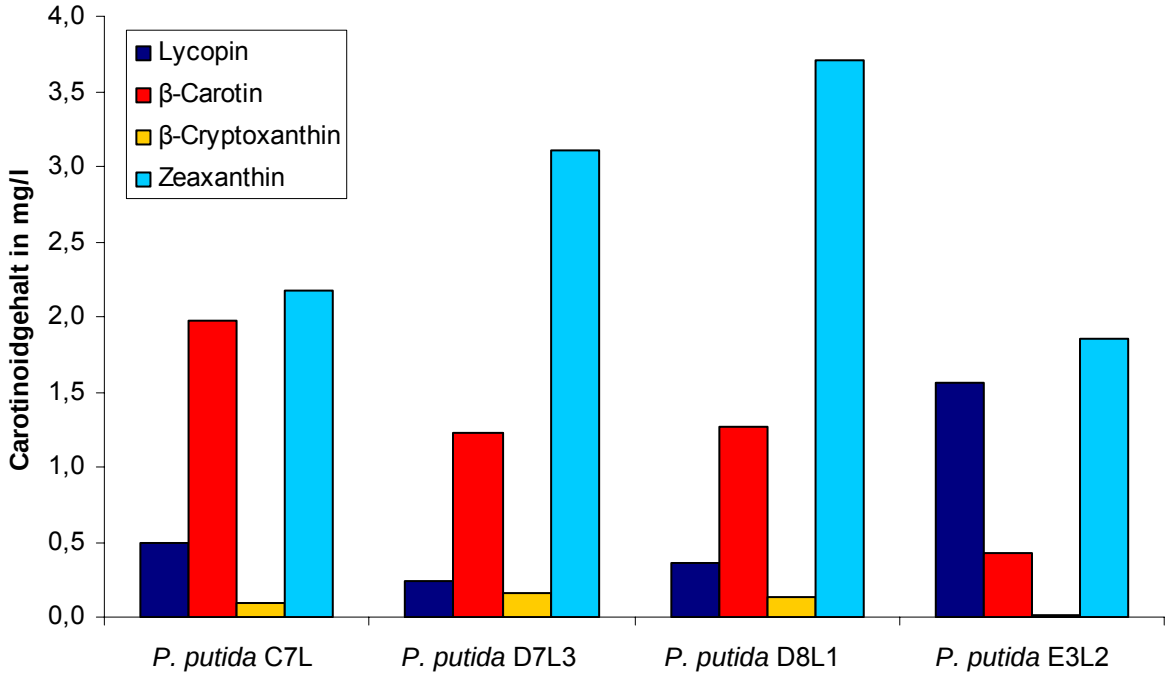


Abbildung 4.15 Gehalt an Zeaxanthin und seinen Vorstufen in Mutanten von *P. putida* KT2440
In allen vier geeigneten Mutanten konnte Zeaxanthin gefunden werden. Der Gehalt der Zeaxanthinvorstufen unterschied sich jedoch erheblich.

Bezog man die Ausbeute auf die Trockenmasse ergab sich ein sehr ähnliches Bild wie bei der volumetrischen Ausbeute. Die Mutante E3L2 wies auch hier den geringsten Wert mit 0,77 mg/g Biotrockenmasse auf, gefolgt von C7L mit 0,97 mg/g. Die beiden höchsten Gehalte an

Zeaxanthin erreichten die Mutanten D8L1 mit 1,51 mg/g gefolgt von D7L3 mit 1,20 mg/g. Auch die Gehalte der Nebenprodukte waren ähnlich wie bei den volumetrischen Ausbeuten verteilt. Die Mutante E3L2 wies mit 0,65 mg/g den höchsten Gehalt an Lycopin auf, auch bei den Mutanten C7L und D8L1 war der Gehalt mit 0,22 mg/g beziehungsweise 0,15 mg/g deutlich höher als bei der Mutante D7L3 mit 0,09 mg/g. β-Cryptoxanthin konnte dagegen nur bei den Mutanten C7L, D7L3 und D8L1 gefunden werden. Die gefundenen Mengen bewegten sich zwischen 0,04 mg/g und 0,06 mg/g. Bei β-Carotin wies dagegen die Mutante C7L mit 0,88 mg/g den höchsten Gehalt, die Mutante E3L2 den geringsten Gehalt (0,18 mg/g) auf. Die β-Carotingehalte in den Mutanten D7L3 und D8L1 waren mit 0,47 mg/g und 0,51 mg/g sehr ähnlich.

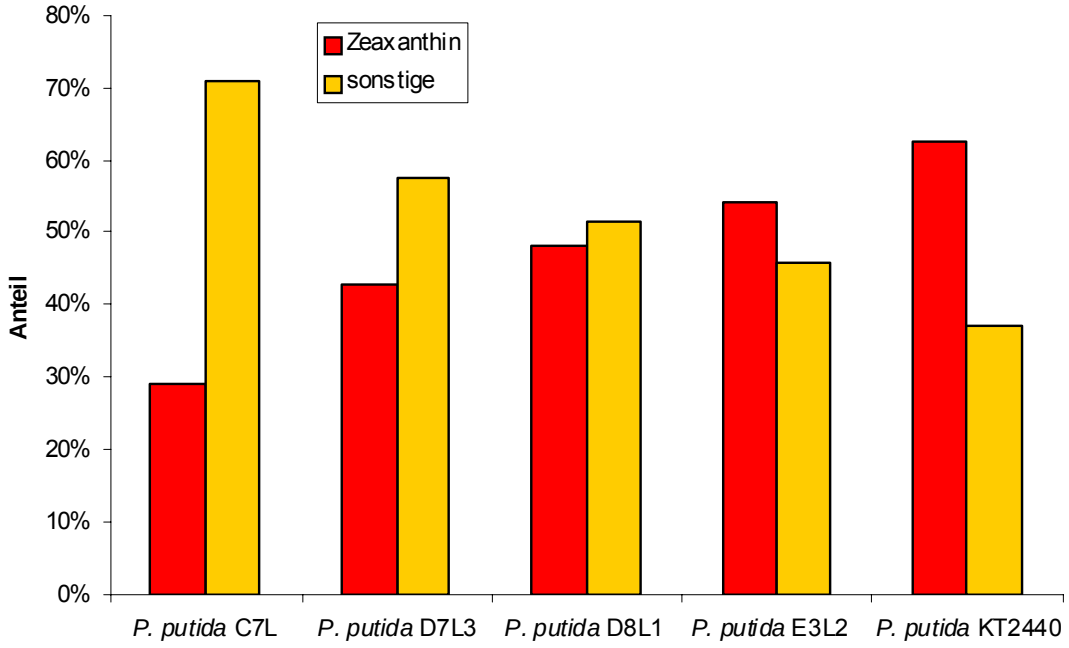


Abbildung 4.16 Verhältnis von Zeaxanthin zu anderen bei 450 nm detektierbaren Substanzen
Als Zeaxanthin wurde nur das (all-*E*)-Zeaxanthin gewertet. Alle Stereoisomere sowie die weiteren Carotinoide wurden als Verunreinigungen betrachtet.

Betrachtete man die Verhältnisse des Zeaxanthins zu den sonstigen Carotinoiden (Abbildung 4.16), wobei (Z)-Isomere als Verunreinigung gewertet wurden, erhielt man folgendes Bild.
Bei der Mutante C7L, die auch bei der Zeaxanthinausbeute zurücklag, waren nur 29 % der produzierten Carotinoide Zeaxanthin. Bei der Mutante E3L2 welche absolut ebenfalls eine relativ geringe Zeaxanthinmenge aufwies, waren dagegen 54 % der Carotinoide Zeaxanthin.
Die Mutanten D7L3 und D8L1, welche sich auch bei der Produktivität ähnlich verhielten, zeigten auch hier ein ähnliches Bild. Bei D7L1 waren 43 % und bei D8L1 48 % der produzierten Carotinoide Zeaxanthin.

Der Anteil des Zeaxanthins war in allen Mutanten jedoch niedriger als im Wildtyp, wo er 63 % betrug. Dagegen war die produzierte Menge Zeaxanthin in allen Mutanten höher als beim Wildtyp (Abbildung 4.17).

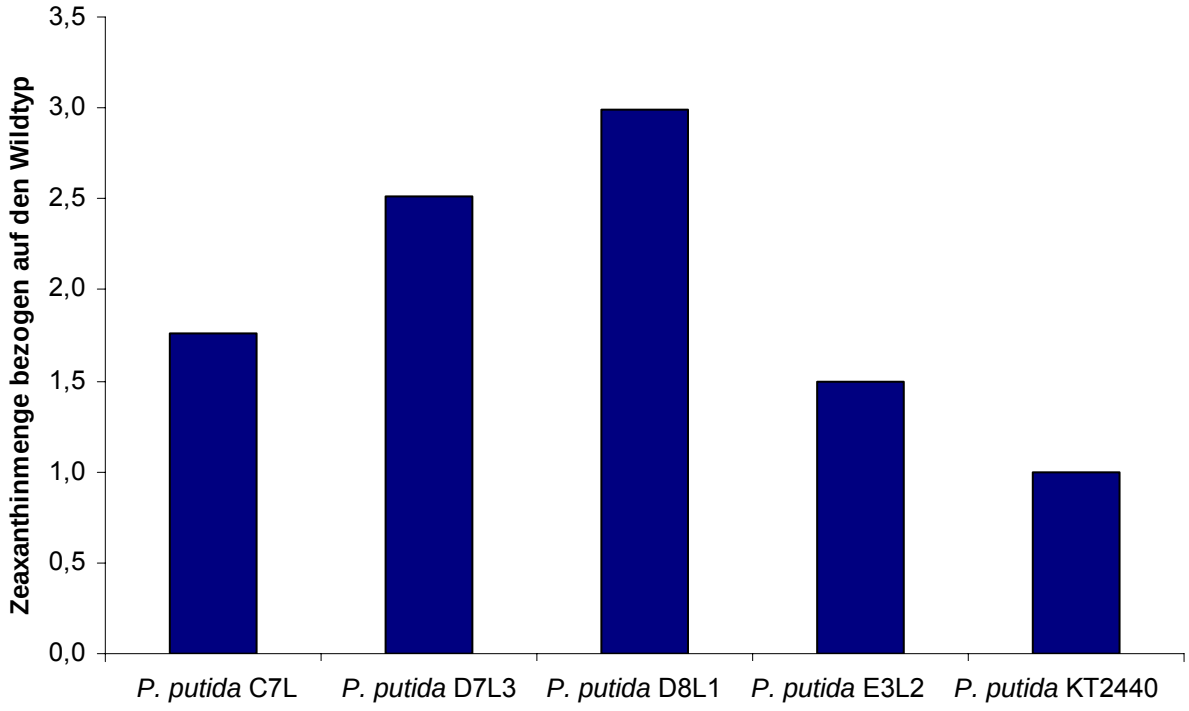


Abbildung 4.17 Steigerung der Zeaxanthinproduktion in den Mutanten gegenüber dem Wildtyp
Für die Berechnung wurden die volumetrischen Ausbeuten verwendet und alle Ausbeuten des Zeaxanthins auf den Wildtyp bezogen.

Bei der Mutante E3L2 betrug sie das 1,5fache, bei C7L das 1,8fache, bei D7L3 das 2,5fache und bei D8L1 das 3,0fache der Zeaxanthinmenge, die in der besten Transformante des Wildtyps gefunden wurde.

Anhand dieser Ergebnisse wurde die Mutante D7L3 für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Sie wies zwar eine etwas geringere Ausbeute an Zeaxanthin als die Mutante D8L1 auf, jedoch wurden bei letzterer, bei ansonsten nahezu gleichen Werten für β-Carotin und β-Cryptoxanthin, eine um das etwa 1,5fache höhere Menge an Lycopin gefunden.

4.8.1 Auswahl eines geeigneten Mineralmedium

Die Zusammensetzung eines Vollmediums wie LB- oder TB-Medium variiert je nach Charge der Bestandteile teilweise erheblich. Im Hinblick auf die geplanten Transkriptionsanalysen wurde daher ein geeignetes Mineralmedium für die Kultivierung von *Pseudomonas putida* benötigt.

Zunächst wurde M9-Medium verwendet. Das Medium zeigte bei einigen Versuchen eine starke gelb-grüne Fluoreszenz. Hierbei handelt es sich um Siderophore (Pyoverdine), die von

verschiedenen Vertretern von *Pseudomonas* sp. bei Eisenmangel ausgeschieden werden.[109, 110]

Ein nächster Versuch wurde mit MEK-Medium[107] unternommen. Dieses Medium besteht aus einem Phosphatpuffer, welches mit Spurenelementen, Mineralsalzen und einer Kohlenstoffquelle supplementiert wird. Die Mineralsalzlösung enthält als Eisenquelle 1 g/l Ammoniumeisen(III)-citrat. Dies entspricht einem Eisengehalt von 10 mg/l im Medium.

Auch hier wurde wieder eine von Siderophoren herrührende Verfärbung des Mediums gefunden. Daher wurde der Eisengehalt verzehnfacht. Ein Vergleich der beiden Medien bei der Kultivierung von *P. putida* führte bei beiden Medien zu einer ähnlichen End-OD, so dass durch den höheren Eisengehalt das Wachstum nicht gehemmt wurde.

Von der Mutante D7L3 wurde in diesem Medium das Wachstum verfolgt. Abbildung 4.18 zeigt die Wachstumskurve mit Glucose als Kohlenstoffquelle. Nach ungefähr 5 h waren die Zellen in der stationären Phase.

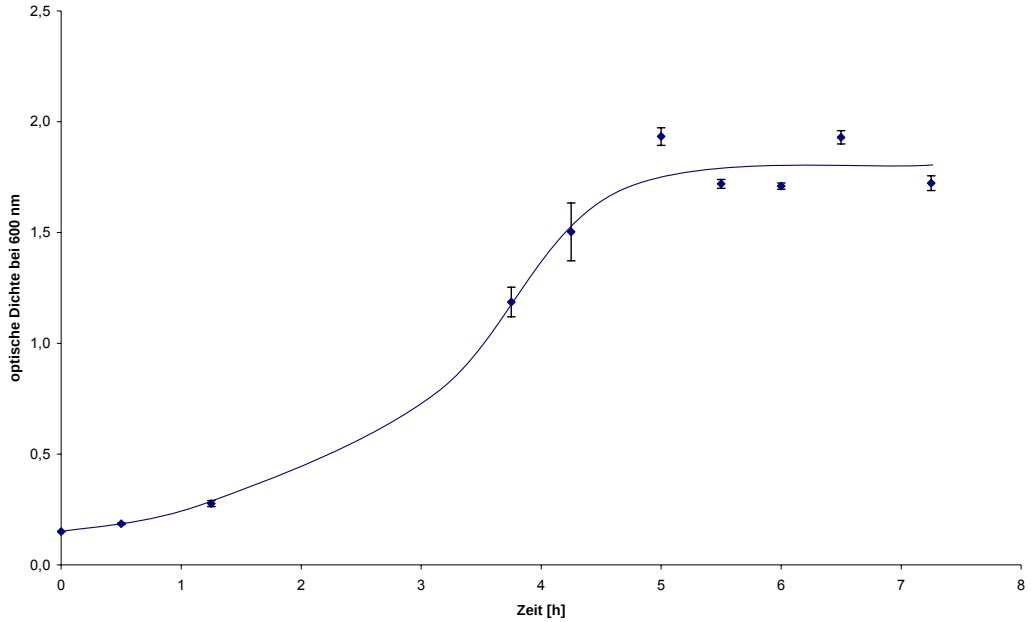


Abbildung 4.18 Wachstumskurve von *Pseudomonas putida* D7L3 bei 30 °C in MEK-Medium mit Glucose als Kohlenstoffquelle

4.9 Ausschluss einer β-Carotinhydroxylase in *Pseudomonas putida*

Für *P. putida* KT2440 wurde eine β-Carotinhydroxylase anotiert (GeneID 1046895), aber es wurden keine Gene für Präkusoren des Zeaxanthins angegeben. Daher kann davon ausgegangen werden, daß die Induktion dieser Hydroxylase durch β-Carotin erfolgt. In diesem Fall sollte dann β-Cryptoxanthin oder Zeaxanthin neben β-Carotin in der Zelle nachweisbar sein. Zur Überprüfung wurde eine Kultur *P. putida* KT2440 mit dem Plasmid pJOE5607.5, welches die Gene bis zu β-Carotin trägt, in TB-Medium bei 25 °C und 160 1/min für 24 Stunden

kultiviert. Die Zellen wurden extrahiert und der Extrakt analysiert. Es konnte mittels HPLC nur β-Carotin und keine hydroxylierten Produkte nachgewiesen werden (Abbildung 4.19).

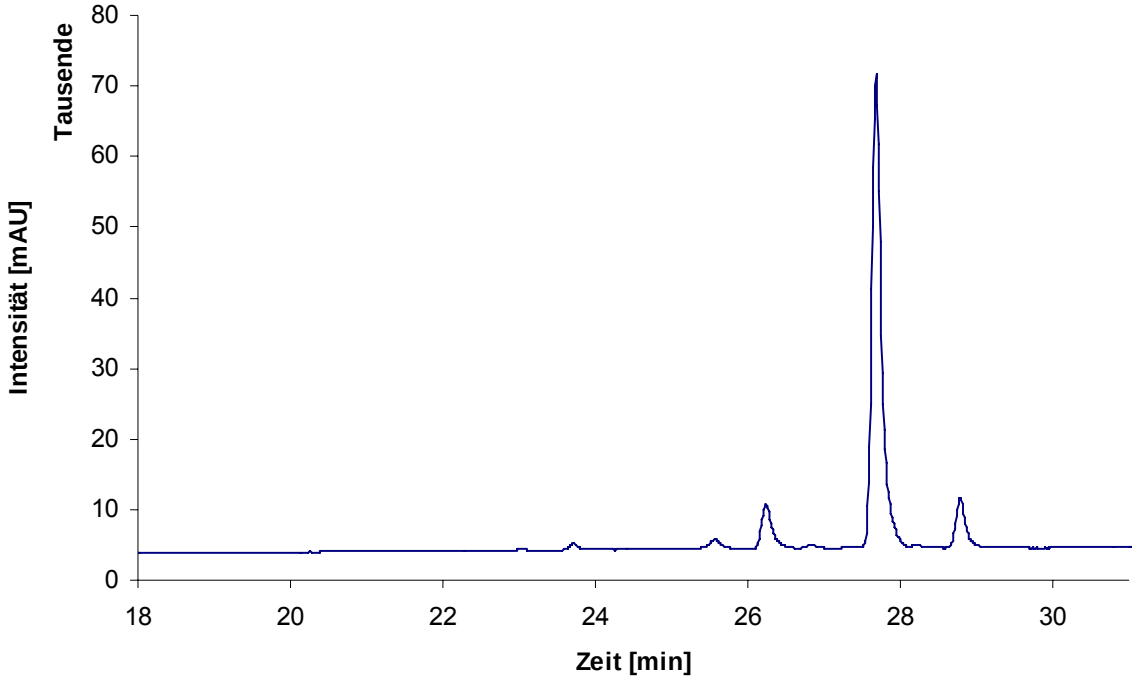


Abbildung 4.19 Chromatogramm des Zellextrakts eine β-carotinproduzierenden Klons von *P. putida* KT2440

Zu sehen ist das Signal von β-Carotin. Zeaxanthin und β-Cryptoxanthin haben kürzere Retentionszeiten.

4.10 Verlauf der Produktion im Schüttelkolben

Im Schüttelkolben wurde zwei Voll- (LB- und TB-Medium) und ein Mineralmedium (MEK-Medium) Zeaxanthin hergestellt und der Verlauf der Produktion verfolgt.

100 ml des entsprechenden Mediums wurden aus seiner Übernachtkultur angeimpft und bei 30 °C und 160 1/min inkubiert. Nach der Induktion mit 100 µl L-Rhamnose-Lösung (β = 20 %) wurden die Kulturen bei 25 °C und gleicher Drehzahl weiter kultiviert und in regelmäßigen Abständen Proben entnommen und die optische Dichte bei 600 nm bestimmt. Bei den Proben wurden Doppelbestimmungen, bei der optischen Dichte Dreifachbestimmungen gemacht. In Abbildung 4.20 ist der Verlauf des Wachstums gegen die Zeit aufgetragen, ferner wurde der Induktionszeitpunkt als grüne und die Fütterungen als blauen Linien markiert. Es ist zu erkennen, dass die optische Dichte bei LB- und TB-Medium zunächst innerhalb von 24 h kontinuierlich bis 5,8 in LB-Medium beziehungsweise 11,3 in TB-Medium ansteigt. Bei der nächsten Messung wurde dann ein Abfall der optischen Dichte auf 5,4 beziehungsweise 10,6 beobachtet. Demgegenüber war bei MEK-Medium ein Anstieg in den ersten sieben Stunden zu beobachten. Es wurde eine optische Dichte von 1,6 erreicht. Bei der nächsten

Messung nach 24 h war dann schon ein Sinken des Wertes auf 1,2 zu beobachten und nach 27,5 h war die optische Dichte bereits auf 1,1 weiter gefallen. Da nach 27,5 h bei allen Medien ein Sinken der optischen Dichte und somit die beginnende Lysierung zu beobachten war, wurden jeweils 20 ml eines fünffach konzentrierten Mediums zugegeben.

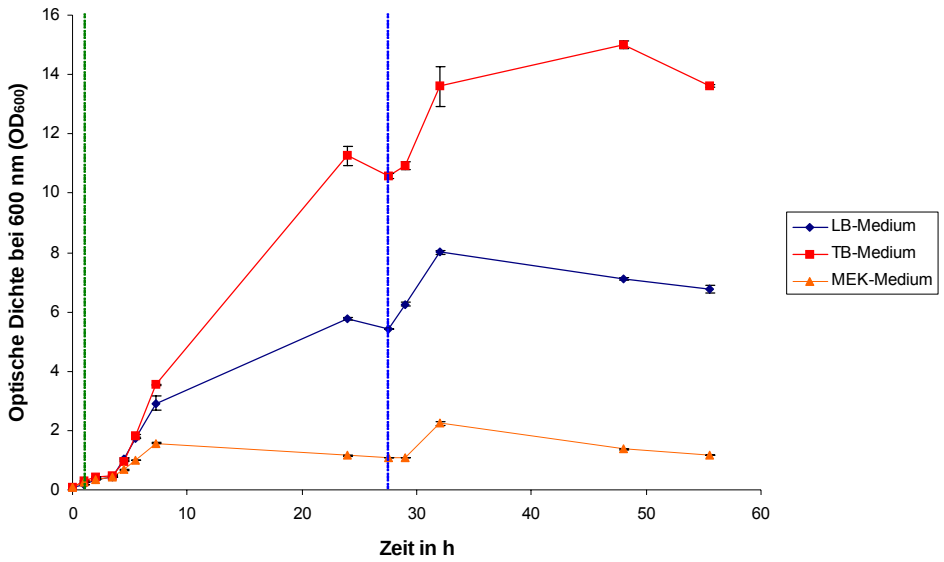


Abbildung 4.20 Verlauf der optischen Dichte bei 600 nm bei der Kultivierung von *P. putida* D7L3 mit pJH14

Neben dem Wachstumsverlauf in den drei Medien sind der Zeitpunkt der Diskussion (grüne senkrechte Linie) und der Zugabe des konzentrierten Mediums (blaue senkrechte Linie) eingetragen.

Nach der Zugabe von frischem Medium stieg die optische Dichte erneut an und erreichte dann das Maximum von etwa 15 in TB-, etwa 8 in LB- und 2,2 in MEK-Medium. Während in LB- und MEK-Medium nach 32 Stunden das Maximum erreicht war und danach wieder ein Rückgang der optischen Dichte zu beobachten war, wurde das Maximum in TB-Medium nach 48 Stunden erreicht.

Die Induktion wurde eine Stunde nach der Inokulation bei einer optischen Dichte von 0,2 bis 0,3 mit 100 µl einer L-Rhamnose-Lösung (β = 20 %) durchgeführt (grüne Linie in Abbildung 4.20). Nach 3,5 h (2,5 h nach der Induktion) wurde die erste Probe entnommen. Die Trockenmasse wurde über die optische Dichte berechnet. In allen Medien wurde eine ständige Zunahme der Zeaxanthinmenge während der Kultivierung beobachtet (Abbildung 4.21).

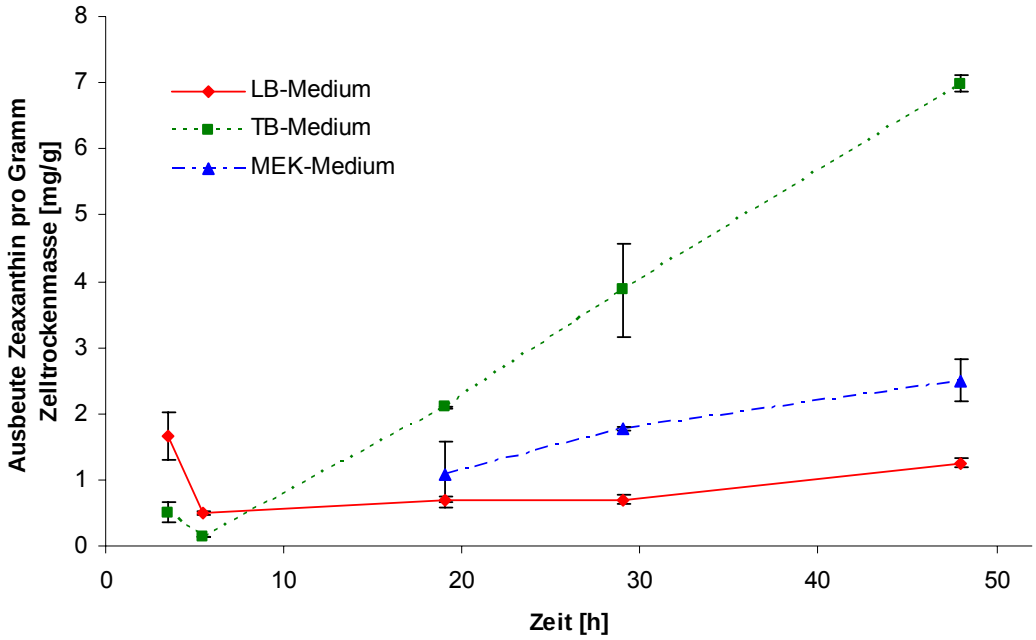


Abbildung 4.21 Verlauf der Zeaxanthinmenge bezogen auf die Biotrockenmasse in den verschiedenen Medien über die Zeit

Bei allen Medien ist eine kontinuierliche Zunahme zu beobachten, die unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Die Werte für MEK-Medium waren bei den Messpunkten bei 3,5 und 5,5 h nahe der Erfassungsgrenze und sind daher nicht angegeben.

Die größte Menge Zeaxanthin wurde in TB-Medium mit 7,0 mg/g Biotrockenmasse (BTM) gefolgt vom Mineralmedium MEK mit Glucose als Kohlenstoffquelle mit einer Ausbeute von 2,5 mg/g erreicht. In LB-Medium lag die Produktivität mit 1,3 mg/g deutlich niedriger. Die Volumenausbeute betrug in TB-Medium 51,3 mg/l; es folgten LB-Medium mit 2,2 mg/l und MEK-Medium mit 1,7 mg/l. Der große Unterschied in der Ausbeute bezogen auf die Biotrockenmasse und das Volumen kann durch den sehr großen Unterschied in der Zellmasse erklärt werden. Dieser ist beim Maximum der optischen Dichten 17,5fach. Der große Unterschied zwischen LB- und TB-Medium kann dadurch erklärt werden, dass TB-Medium wesentlich reicher als die anderen Medien sind.

Auch das Verhältnis von Zeaxanthin zu den anderen Carotinoiden änderte sich im Verlauf der Kultivierung (Abbildung 4.22). Bei der Berechnung der Verhältnisse wurden die bei 450 nm messbaren Carotinoide berücksichtigt. Sowohl (*Z*)-Isomere des Zeaxanthins als auch andere Carotinoide wurden als Verunreinigungen angesehen.

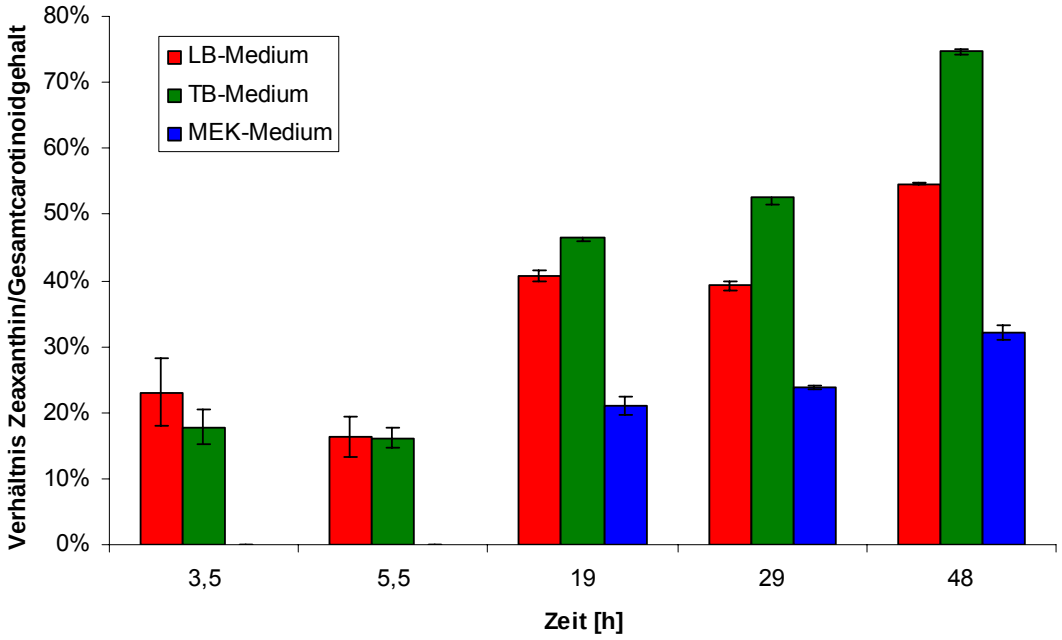


Abbildung 4.22 Verhältnis von Zeaxanthin zu den anderen produzierten Carotinoiden
Erfasst wurden in dieser Berechnung nur die bei 450 nm messbaren Carotinoide. Als Zeaxanthin wurde nur das (all-*E*)-Isomer von Zeaxanthin gezählt. (*Z*)-Isomere des Zeaxanthins wurden als Verunreinigung gewertet. In MEK-Medium konnte Zeaxanthin erst nach 19 h erstmalig detektiert werden.

Die Reinheit des isolierten Zeaxanthins erhöhte sich in allen Fällen. In TB-Medium wurde eine Reinheit von fast 80 % nach 48 h erreichet. In den beiden anderen Medien war das Verhältnis schlechter. In LB-Medium wurde ein Verhältnis von Zeaxanthin zu den anderen Substanzen von etwa 55 % und in MEK-Medium von 32 % erreicht. Diese Tatsache lässt sich auf die deutlich geringere Zeaxanthinmenge in diesen Medien zurückführen; kleine Mengen an Verunreinigungen haben daher einen verhältnismäßig starken Effekt.

Der Zeaxanthinsyntheseweg ist auf dem Plasmid pJH14 codiert. Er beginnt mit dem farblosen Phytoen, geht über mehrere Schritte über das Lycopin zum β-Carotin und dieses wird schließlich zum Zeaxanthin hydroxyliert. Bei den Untersuchungen der Produktion im zeitlichen Verlauf wurden, außer β-Carotin, β-Cryptoxanthin und Zeaxanthin, keine anderen Carotinoide wie Phytoen chromatographisch nachgewiesen.

Der Gehalt an β-Carotin und β-Cryptoxanthin war mit weniger als 0,1 mg/g BTM für β-Carotin und 0,6 mg/g BTM für β-Cryptoxanthin jedoch sehr niedrig. In LB- und MEK-Medium waren nur Spuren der Substanzen vorhanden. Die Menge an Zeaxanthin stieg während der Kultivierung dagegen kontinuierlich an. In Abbildung 4.23 ist beispielhaft der zeitliche Verlauf für TB-Medium abgebildet.

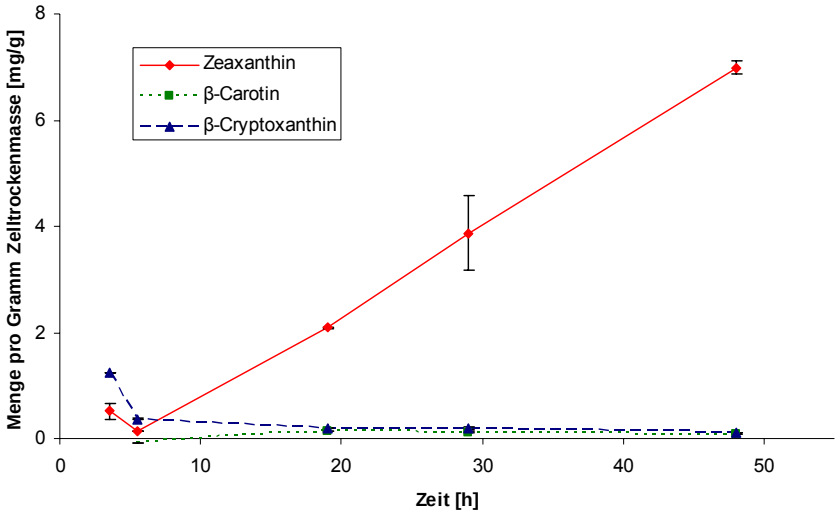


Abbildung 4.23 Zeitlicher Verlauf der Produktion von Zeaxanthin in TB-Medium unter Angabe der beiden Vorstufen β-Carotin und β-Cryptoxanthin
Abgebildet ist der Verlauf für TB-Medium über 48 h. Der Verlauf für die beiden anderen untersuchten Medien ist ähnlich.

In den ersten 15 h stieg die Zeaxanthinmenge um den Faktor 15 von 0,1 auf 2,1 mg/g BTM. Danach wurde eine Verdoppelung der Menge in 10 h auf 3,9 mg/g BTM und eine weitere Verdoppelung in 29 h auf 7,0 mg/g BTM gemessen.

In den beiden anderen Medien war der kontinuierliche Anstieg der Zeaxanthinmenge ebenfalls zu beobachten wenn auch gleich nicht so stark. In LB-Medium wurden nach 19 h und 29 h 0,7 mg/g BTM gemessen. Nach 48 h wurden schließlich 1,3 mg/g BTM Zeaxanthin erhalten. In MEK-Medium wurden nach 19 h 1,1 mg/g und nach 29 h 1,8 mg/g Zeaxanthin gefunden. Nach 48 h lag der Wert bei 2,5 mg/g.

4.10.1 Einfluss des Sauerstoffgehalts im Kolben auf die Zeaxanthinproduktion

Bei Wiederholungen der obigen Versuche stellte sich heraus, dass in einigen Fällen bevorzugt β-Carotin gebildet wurde und die Hydroxylierung nur in sehr geringem Maße stattfand. Auffällig war, dass dieses Phänomen nur dann auftrat, wenn Kolben ohne Schikanen verwendet wurden. In einem Vorversuch wurde daher der Sauerstoffgehalt in 500 ml-Schüttelkolben mit und ohne Schikane mit 100 ml Wasser bestimmt. Die Messungen fanden bei 25 °C statt. Abbildung 4.24 zeigt den Sauerstoffgehalt in mg/l bei verschiedenen Drehzahlen des Schüttelinkubators. Ab 120 1/min wird die Sättigung des Wassers sowohl im Schüttelkolben mit als auch ohne Schikanen erreicht.

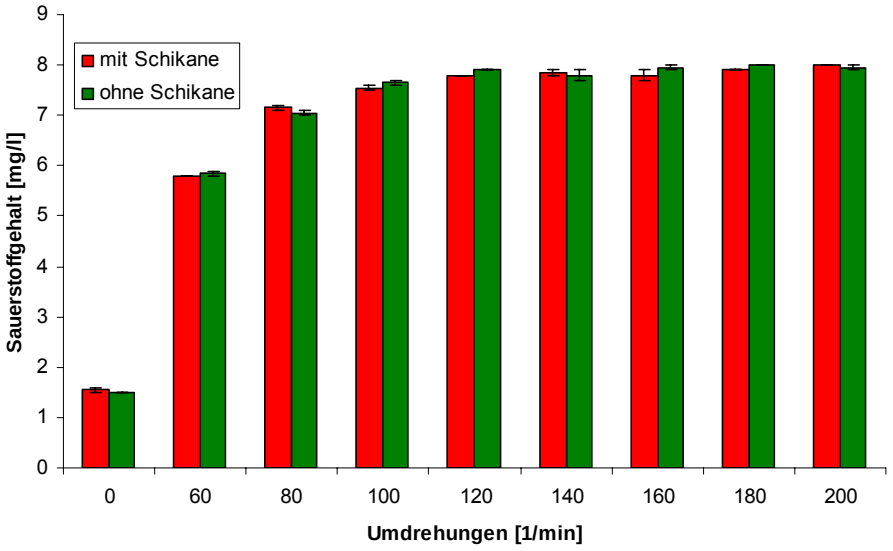


Abbildung 4.24 Sauerstoffgehalt in Schüttelkolben mit und ohne Schikane
Zur Prüfung wurde 100 ml zunächst bei 25 °C temperiert. Das Kolbenvolumen betrug 500 ml.

P. putida D7L3 mit pJH14 wurde in TB-Medium in Kolben mit und ohne Schikane kultiviert. Die optische Dichte ist in Abbildung 4.25 dargstellt. Erwartungsgemäß wachsen die Zellen in Kolben mit Schikanen bereits nach kurzer Zeit deutlich besser als in Kolben ohne Schikanen. Nach 4,5 h war bereits das 3,3fache der optischen Dichte erreicht. Nach 23 h wurde in den Kolben mit Schikanen das Maximum der optischen Dichte mit 18,2 erreicht, während in den Kolben ohne Schikanen im gleichen Zeitraum nur eine OD von 6,5 erreicht wurde, aber hier weiter stieg. Nach 48 h haben sich die optischen Dichten mit 12,4 (mit Schikanen) bzw. 10,0 (ohne Schikanen) wieder angenähert. Insgesamt ist das Wachstum im Kolben mit Schikane also deutlich schneller, die Zellen sterben daher aber auch schneller ab, da die Nährstoffe des Mediums schneller verbraucht sind.

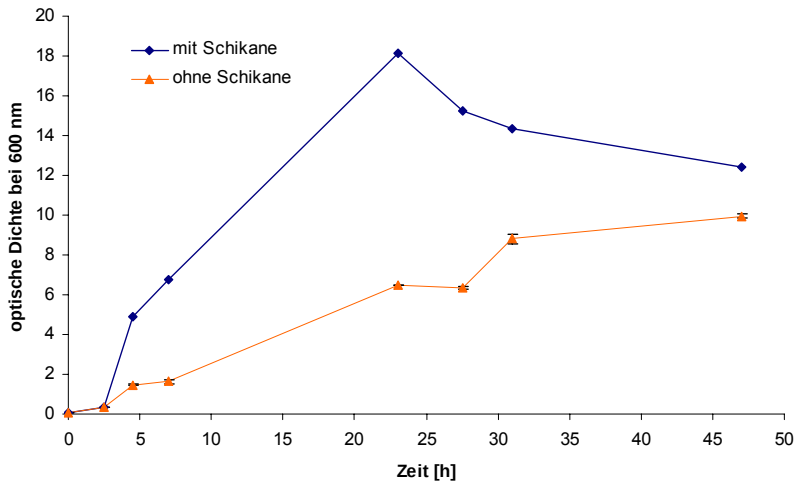


Abbildung 4.25 Zeitlicher Verlauf der optischen Dichte bei Kultivierung von *P. putida* D7L3 mit pJH14 in TB-Medium in verschiedenen Kolbentypen

Betrachtet man den Produktgehalt in den Zellen (Abbildung 4.26) im Verlauf der Zeit, so sieht man, dass im Kolben mit Schikanen der Zeaxanthingehalt ständig bis auf einen Wert von etwa 1,1 mg/g Trockenmasse nach 35 Stunden steigt. Bei diesem Experiment enthielt das Endprodukt noch relativ viel β-Carotin (0,4 mg/g) aber nahezu kein β-Cryptoxanthin.
In den Kolben ohne Schikanen, sieht man, dass hier der β-Carotingehalt wesentlich höher war. Er lag nach 30 Stunden bei 0,7 mg/g, der Zeaxanthingehalt dagegen bei nur 0,3 mg/g. β-Cryptoxanthin konnte in beiden Versuchen nur in sehr geringen Mengen gefunden werden.

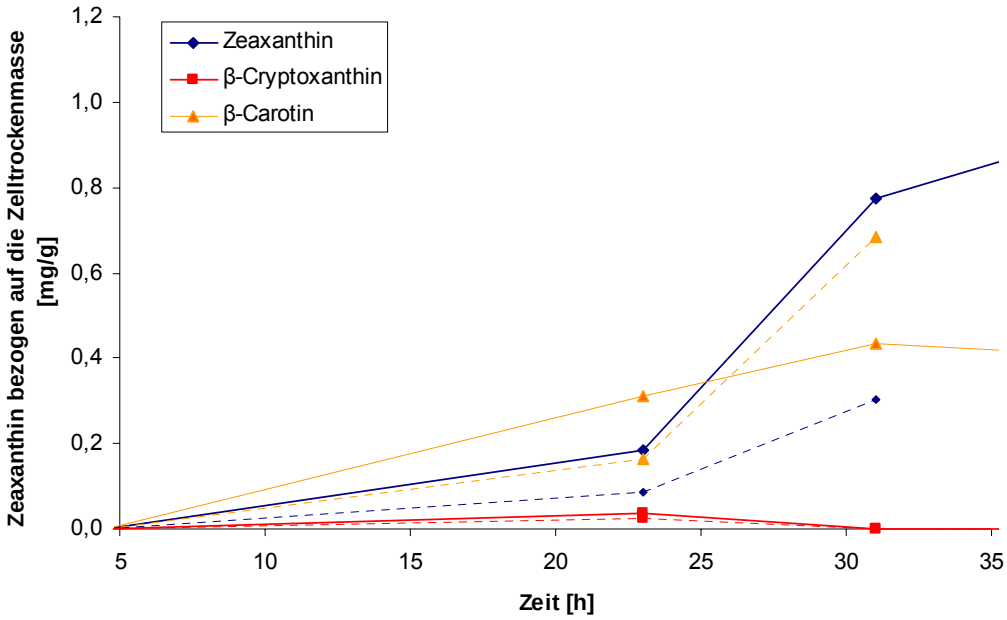


Abbildung 4.26 Gefundene Produkte in den Zellen bei Verwendung unterschiedlicher Kolben
Abgebildet ist die Produktmenge bezogen auf die Biotrockenmasse im verlauf der Zeit. Die Ergebnisse aus den Schikanekolben sind mit durchgezogenen Linien, die der Kolben ohne Schikanen mit gestrichelten Linien dargestellt.

Der Sauerstoffgehalt lag während der Kultivierung in den Kolben mit Schikanen höher als in den Kolben ohne Schikanen. In den Kolben ohne Schikanen wurde im Minimum ein Wert von 0,1 mg/l gemessen und in den Kolben mit Schikanen ein Minimum von 1,8 mg/l erreicht.

4.11 Erhöhung der Zeaxanthinproduktion in *Pseudomonas putida* mit Additiven

Die in den bisherigen Experimenten erreichten Werte für Zeaxanthin sind bereits höher als der in der Literatur genannte für *E. coli* mit 0,82 mg/g Biotrockenmasse. Um auf eine höhere Ausbeute zu kommen, ohne im Wege des *Metabolic Engineering* einzugreifen, wurde versucht eine kontinuierliche Extraktionsmethode zu etablieren. Hierzu sollte eine zweite nichtpolare Phase verwendet werden.
Die Verwendung eines organischen Lösungsmittels als Phase schied nach Vorversuchen aus, da sogar Substanzen mit einem relative hohen log *p*-Wert für die Zellen schädlich waren (zum

Beispiel *n*-Octanol, log *p* = 2,9) oder es mit ihnen nicht möglich war, die Carotinoide aus den Zellen zu extrahieren (zum Beispiel Heptan, log *p* = 4,4).[111] Daher wurde von einer weiteren Untersuchung dieser Möglichkeit abgesehen. Stattdessen wurden die micellenbildende Substanzen Cholin, Lecithin und Ölsäure sowie das Adsorberharz Amberlite® XAD-7 untersucht.
In einem ersten Versuch wurde der Kultur 1 Gew.-% (bezogen auf das Medium) des jeweiligen Additivs zugesetzt. Nach 24 h wurde die optische Dichte bestimmt. Bei den Kulturen die Ölsäure, Lecithin und Cholin enthielten, waren die optischen Dichten relativ ähnlich und lagen für Lecithin bei etwa 17, für Cholin um 12 und für Ölsäure zwischen 24 und 27. Letzteres ließ den Schluss zu, dass Teile der Ölsäure als zusätzliche Kohlenstoffquelle verstoffwechselt wurden. Bei der Kontrolle ohne Additiv wurden Werte zwischen 10 und 16 erreicht. Ein großer Unterschied zwischen den einzelnen Kolben ergab sich für XAD-7. Die optischen Dichten schwankten hier zwischen 8,4 und 17,4. Bei den Kulturen mit Ölsäurezusatz wurde eine schmierige Ablagerung am Glas gefunden. Von dieser wurde ebenfalls eine Probe entnommen. Das vorher weiße XAD-7 hatte sich gelblich verfärbt.
Es wurden jeweils Proben von 1 ml entnommen. XAD-7 setzt sich wegen seiner hohen Dichte schnell ab. Die Kulturen wurden daher vor der Probennahme kräftig geschüttelt. Da sich, vor allem bei Lecithin und Ölsäure, eine sehr stabile Emulsion bildete, war das Abzentrifugieren der Zellen und des Additivs nicht möglich. Es wurde daher 2 ml eines Gemisches aus Methanol, Hexan und Essigsäureethylester vorgelegt und die Probe direkt in dieses Gemisch gegeben. Dem Lösungsmittel wurden zuvor 5 µg des internen Standards zugefügt. Durch kräftiges Mischen wurde extrahiert, 1 ml gesättigte Kochsalzlösung zugegeben und zur weiteren Phasentrennung bei 3200 *g* zentrifugiert. Es wurde nochmals Extraktionsmittel zugegeben aber in keinem Fall eine weitere Färbung des Extraktionsmittels beobachtet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand wieder aufgenommen und analysiert.
Das übrige XAD-7 wurde durch Dekantieren von der Kultur getrennt und mit obigem Lösungsmittel extrahiert. Nach dem Eindampfen wurde ein gelbgrünes Öl erhalten, das ebenfalls analysiert wurde.
Proben aus den Kolben wurden auf Agar-Platten ausgestrichen. Nach 24 h wurden Kolonien beobachtet.

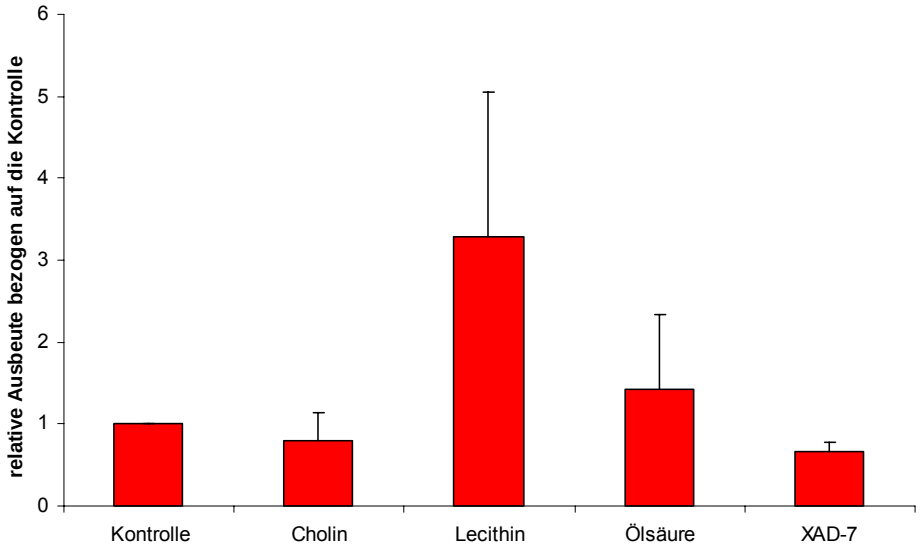


Abbildung 4.27 Relative Ausbeuten von Zeaxanthin bei Verwendung verschiedener Additive in TB-Medium

Durch die Zugabe von Lecithin wurden 3,3fach höhere Ausbeuten bezogen auf die Kontrolle erreicht. Mit Ölsäure wurde ein etwa 1,4fach höherer Wert erreicht, während die Werte für die beiden anderen Additive im Bereich der Kontrolle lagen. Der ölige Rückstand im Versuch mit der Ölsäure konnten teilweise extrahiert werden und ergab einen gelben Extrakt. Aus Amberlite XAD-7 konnte keine weiteren Carotinoide extrahiert werden (Abbildung 4.27).

In einem weiteren Experiment wurden 1, 5 und 10 % der vielversprechenden Additive Ölsäure und Lecithin zugesetzt. Nach einem und zwei Tagen wurden Proben entnommen, wie oben beschrieben extrahiert und analysiert.

Mit steigender Lecithin-Menge stieg auch die volumetrische Ausbeute an Zeaxanthin in der Probe. Bei Zusatz von 1 % konnte eine Steigerung um das 3,3fache beobachtet werden, bei einem Zusatz von 5 % und 10 % stieg die Ausbeute nach einem Tag um den Faktor 4,2 beziehungsweise 10,4 gesteigert werden. Nach 48 h war dieser Effekt bei den beiden niedrigeren Konzentrationen weniger ausgeprägt aber bei einem Zusatz von 10 % Lecithin immer noch deutlich ausgeprägt. Es wurde hier eine Steigerung um das 4,2fache gemessen.

Mit Ölsäure wurden die besten Ergebnisse mit 1 % erzielt. Mit 5 % und 10 % Zusatz dagegen war der Einfluss nur sehr schwach, da eine unlösliche ölige Schicht gebildet wurde aus der nahezu keine weiteren Carotinoide mehr extrahiert werden konnten. Nach Zusatz von 1 % Ölsäure wurde nach einem Tag eine Steigerung um das 2,3fache und nach zwei Tagen um das 1,2fache beobachtet (Abbildung 4.28).

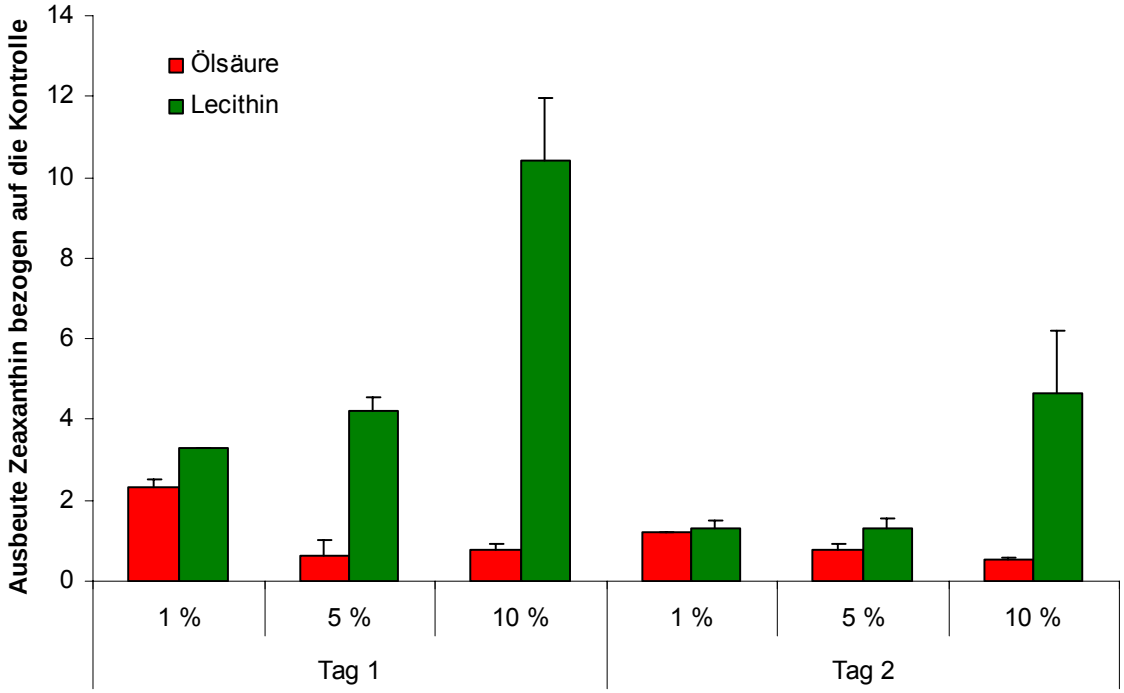


Abbildung 4.28 Zusatz verschiedener Konzentrationen von Lecithin und Ölsäure zu Kulturen

4.12 *Escherichia coli* als Vergleichsorganismus

Um die erhaltenen Ergebnisse mit *P. putida* einordnen zu können, wurde eine Untersuchung mit drei verschiedenen Medien auch für *E. coli* JM-109 durchgeführt. Tabelle 4.13 zeigt das Resultat.

Tabelle 4.13 Zeaxanthingehalt in *P. putida* D7L3 und *E. coli* JM-109

Angegeben ist die Zeaxanthinmenge in mg/g bezogen auf die Biotrockenmasse.

Zeit	*P. putida*			*E. coli*		
	TB	LB	MEK	TB	LB	MEK
6 h	0.1 ± 0.01	0.5 ± 0.02	n.n.	1.8 ± 0.14	0.7 ± 0.10	0.6 ± 0.01
19 h	2.1 ± 0.01	0.7 ± 0.05	1.1 ± 0.51	2.4 ± 0.78	0.6 ± 0.03	0.8 ± 0.05
29 h	3.9 ± 0.70	0.7 ± 0.07	1.8 ± 0.03	1.5 ± 0.40	0.8 ± 0.14	0.8 ± 0.03
48 h	7.0 ± 0.12	1.3 ± 0.06	2.5 ± 0.32	1.6 ± 0.08	1.0 ± 0.03	0.4 ± 0.05

Wie bei *P. putida* auch, war die Ausbeute in TB-Medium am höchsten. Das Maximum von 2,4 mg/g wurde hier aber schon nach 19 Stunden erreicht. Sie ist aber deutlich niedriger als in *P. putida* und beträgt etwas mehr als ein Drittel des in diesem Organismus erreichten Wertes. Die Ausbeute in MEK- und LB-Medium ist in *E. coli* vergleichbar. Die Werte in *E. coli* und *P. putida* waren vergleichbar. Für MEK-Medium dagegen war sie deutlich niedriger; es wurde nur knapp ein Viertel der Menge produziert, die in *P. putida* erhalten wurde.

Insgesamt ist die Ausbeute in *E. coli* niedriger, die maximale Menge wird aber, bis auf LB-Medium, früher erreicht.

4.13 Herstellung anderer Carotinoide in *Pseudomonas putida* und *Escherichia coli*

Die Hauptaufgabe dieser Arbeit war die Darstellung von Zeaxanthin mit Hilfe von *Pseudomonas putida*. Da auch für andere Carotinoide Plasmide zur Verfügung standen, wurde ebenfalls versucht, auch diese Substanzen darzustellen.

4.13.1 Herstellung von Canthaxanthin und Astaxanthin in *Escherichia coli*

Canthaxanthin wurde in *E. coli* mit zwei Plasmiden hergestellt. Eines (pJOE5607.5) trug die Gene für die Synthese von β-Carotin und das zweite Plasmid (pJH22-pJH25) jeweils eine Ketolase. pJH22 enthielt die Ketolase CrtW aus *Pantoea ananatis*, pJH24 die Ketolase mit einem N-terminalen His-Tag und pJH25 CrtW mit MalE-Fusion zur Verbesserung der Expression und zur Aufreinigung Nach der Extraktion zeigte sich bei der Untersuchung mit HPLC ein sehr unterschiedliches Bild (Abbildung 4.29). Während mit dem Plasmid pJH22 nur Canthaxanthin produziert wurde, zeigte sich bei den anderen Plasmiden eine deutliche Bildung von Nebenprodukten. β-Carotin wurde bei pJH24 und pJH 25 gefunden. Ein weiteres Nebenprodukt mit einer Retentionszeit von 28,5 min war vermutlich das nur mit einer Ketogruppe substituierte Echinenon.

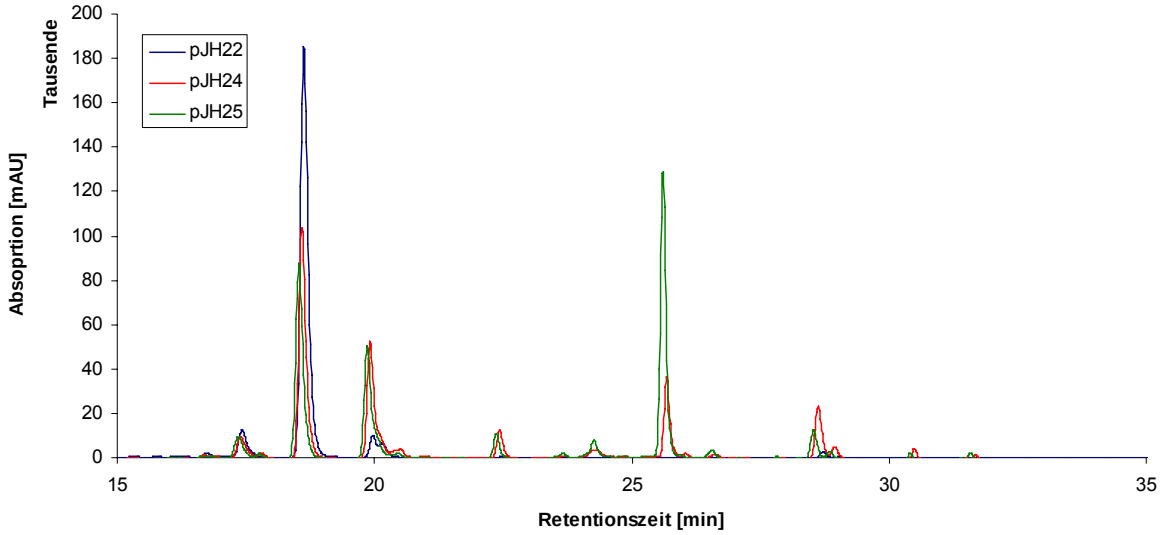


Abbildung 4.29 Ausschnitt aus den Chromtogrammen der Extrakte aus canthaxanthinproduzierenden *E. coli*

Ferner wurde versucht Astaxanthin herzustellen. Hierzu wurde in *E. coli* das Plasmid pJH14 für die Synthese von Zeaxanthin und pJH22 mit einer Ketolase transformiert.

Damit konnte Astaxanthin produziert werden. Es war jedoch mit einem hohen Anteil Canthaxanthin verunreinigt. Der Astaxanthinanteil betrug etwa 30 %, der Anteil des Canthaxanthins etwa 40 %.

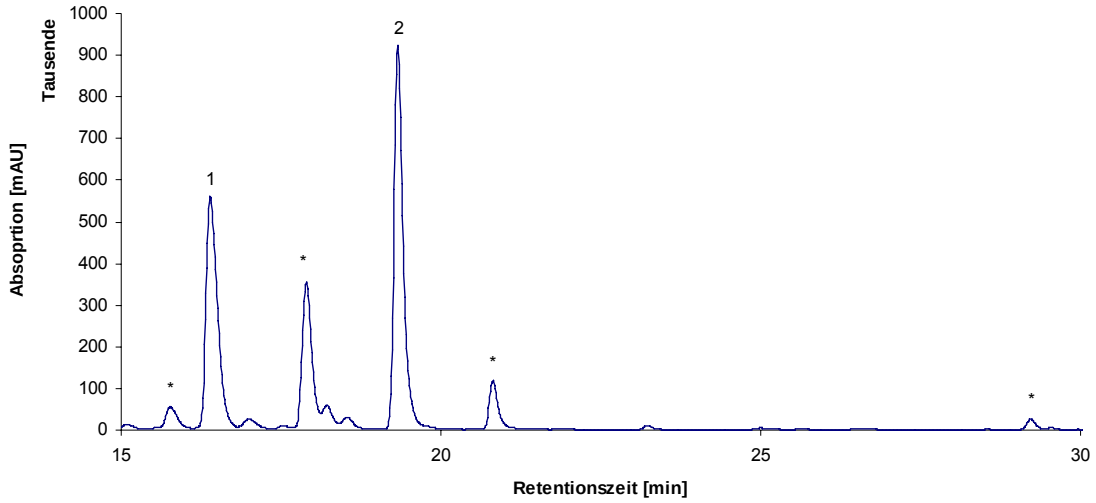


Abbildung 4.30 Ausschnitt des Chromtogramms der Extrakte aus astaxanthinproduzierenden *E. coli*
Das Signal 1 ist Astaxanthin, das Signal 2 Canthaxanthin. Die Signal mit Sternchen konnten nicht zugeordnet waren und sind vermutlich (*Z*)-Isomere und teilweise carbonylierte oder hydroxylierte Substanzen.

4.13.2 β-Carotin und Lycopin in *Pseudomonas putida* D7L3

Sowohl Lycopin als auch β-Carotin konnten in *P. putida* D7L3 hergestellt werden. Bei beiden Substanzen konnten keine weiteren Verunreinigungen wie Phytoen nachgewiesen werden. Es wurden aber (*E*)/(*Z*)-Isomere gefunden (Abbildung 4.31).

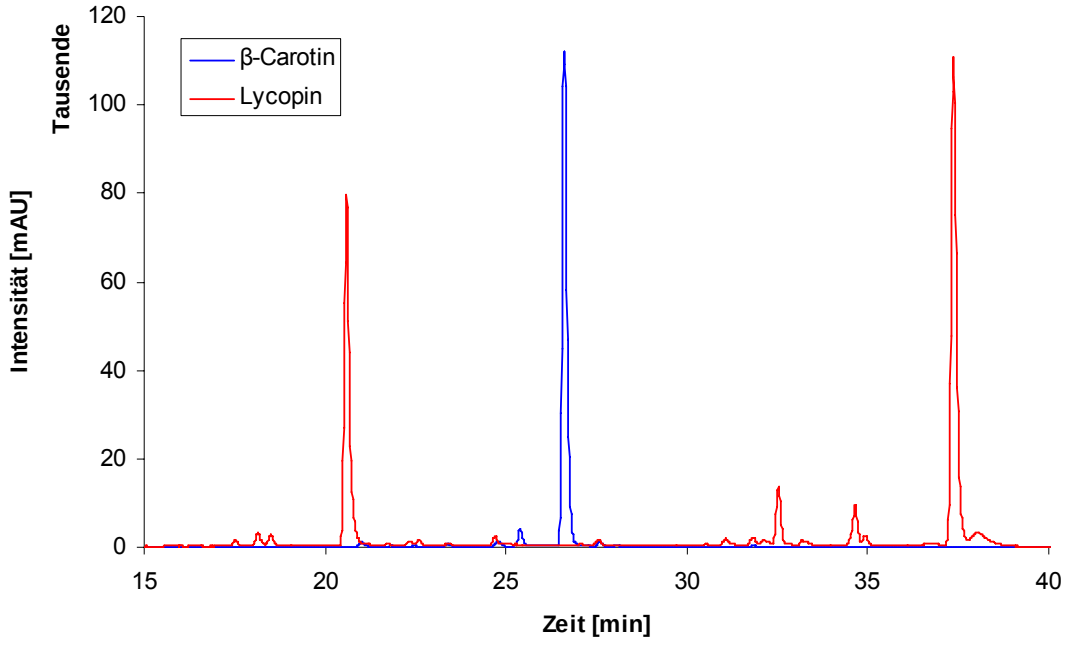


Abbildung 4.31 Ausschnitt der Chromatogramme der Extrakte aus *P. putida* D7L3 zur Produktion von Lycopin und β-Carotin

Das Signal bei 21 min ist der interne Standard. Die beiden Signale zwischen 30 und 35 min sind (*Z*)-Isomere des Lycopins, ebenso das Signal kurz vor β-Carotin.

Für β-Carotin wurden 0,89 mg/g Biotrockenmasse und für Lycopin etwa 9,3 mg/g Biotrockenmasse gefunden. Hier wurden keine weiteren Optimierungen mehr unternommen.

4.14 Kultivierung von *Pseudomonas putida* im Bioreaktor

Nachdem im Schüttelkolben gute Ausbeuten erhalten wurde, sollte die Kultivierung von *P. putida* im Bioreaktor untersucht werden.

Die Versuche wurden alle in einem Maßstab von 4 l Medium unter Kontrolle von gelöstem Sauerstoff, Sauerstoff- und Kohlendioxidgehalt im Abgas und pH-Wert durchgeführt. Es wurde TB- und MEK-Medium unter Zusatz verschiedener Kohlenstoffquellen verwendet. Als Fütterungsstrategie wurde das sogenannte *Fed-Batch*-Verfahren verwendet, bei dem unter Kontrolle des Sauerstoffgehalts im Medium eine Lösung der jeweiligen Kohlenstoffquelle zugefügt wurde. Das Volumen steigt dabei an.

4.14.1 Vollmedium

Es wurden zunächst Vorkulturen in TB-Medium angesetzt mit welchen dann der Reaktor auf eine optische Dichte von etwa 0,1 inokuliert wurde. Die Induktion erfolgte durch Zugabe einer L-Rhamnose-Lösung (β = 20 %) auf eine Endkonzentration von 0,2 %.

4.14.1.1 Glucose als Kohlenstoffquelle

4 l TB-Medium wurden mit 53 ml Inokulum auf eine optische Dichte von 0,1 angeimpft und bei 30 °C kultiviert. Die Zellen erreichten während der Fermentation eine maximale optische Dichte von 95.

Die Ausbeute hier war wesentlich niedriger als im Schüttelkolben. Der Maximalwert der Ausbeute lag bei 430 µg/g. In weiten Bereichen des Prozesses wurde nur Biomasse und kein Produkt mehr gebildet. Es wurde hier nur Biomasse gebildet. Auch die volumetrische Ausbeute blieb mit 1,9 mg/l deutlich hinter dem Ergebnis der Versuche in den Schüttelkolben zurück.

Bei der Ernte zeigte sich, dass kein festes Pellet gebildet wurde und daher sehr viele Zellen verloren gingen. Etwa zwei Drittel des Pellets konnten aber erhalten werden.

In einem weiteren Versuch wurde die Fütterung mit Glucose wiederholt. Es wurden wiederum optische Dichten bis zu 117 nach 47 h erreicht. Auch dabei wurden im besten Fall Ausbeuten von 200 µg/mg Biotrockenmasse aber immerhin maximal 7 mg/l erreicht. Abbildung 4.32 zeigt den Verlauf. Dabei ist zu sehen, dass Zeaxanthin kontinuierlich ansteigt. Auch bei β-Carotin und β-Cryptoxanthin kann ein Anstieg beobachtet werden. Er fällt für β-Carotin stärker aus. Die Menge an β-Carotin verbleibt auch auf einem höheren Niveau als β-Cryptoxanthin. Es werden maximal 2,2 mg/l, verglichen mit 1,1 mg/l für β-Cryptoxanthin gebildet.

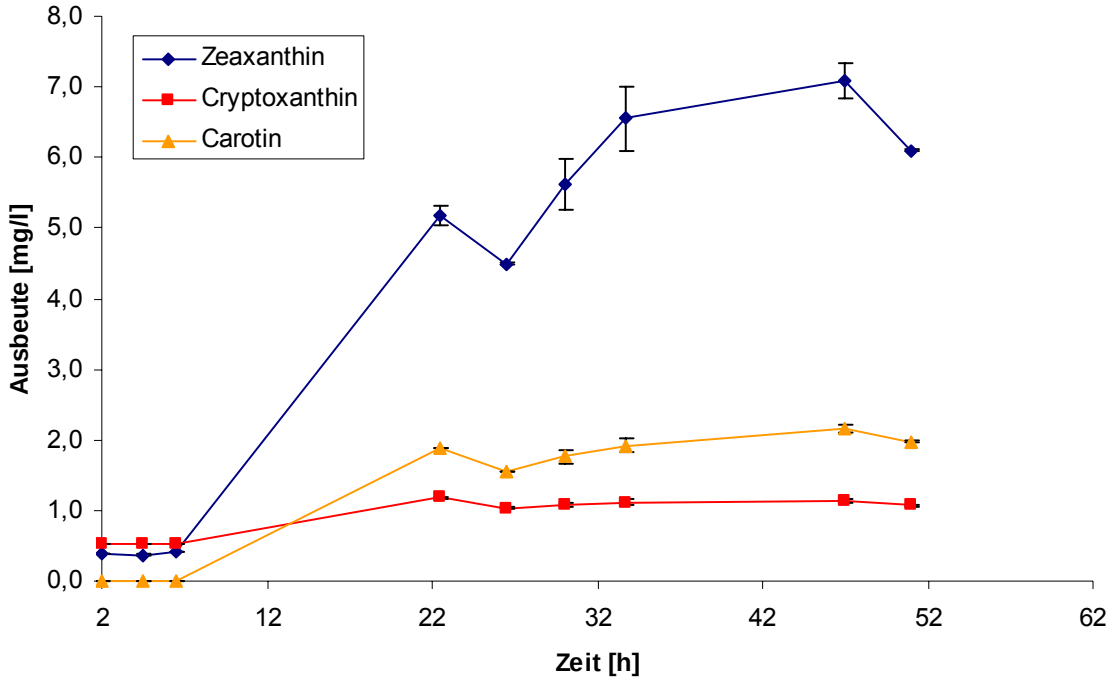


Abbildung 4.32 Verlauf der Carotinoidproduktion in *P. putida* in TB-Medium mit Glucosefütterung

4.14.1.2 Glycerin als Kohlenstoffquelle

Da die Fütterung mit Glucose nur mäßig erfolgreich war, wurde auf eine Fütterung mit Glycerin umgestellt. In einem ersten Versuch wurde TB-Medium verwendet. Die Fütterung erfolgte sobald der Partialdruck des gelösten Sauerstoffs einen Wert von 70 % unterschritt. Es wurden jeweils 20 g zugefüttert.

Nach ca. 30 h wurde bei der optischen Dichte ein Maximum von etwa 95 erreicht, danach sank die optische Dichte kontinuierlich ab (Abbildung 4.33).

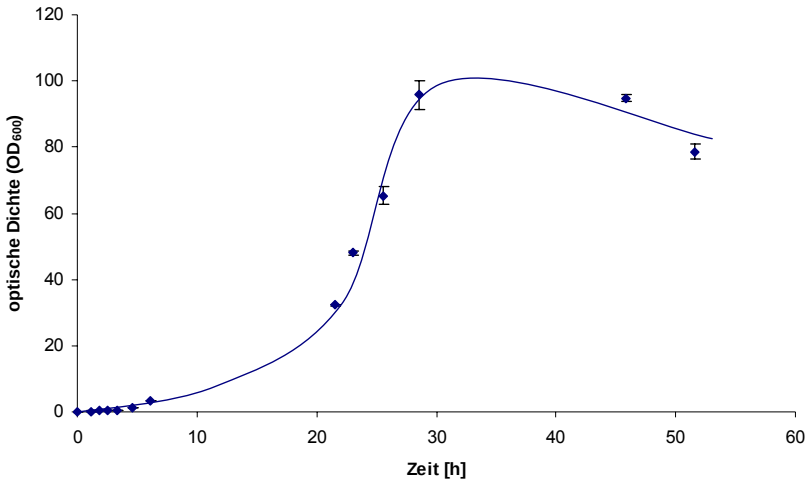


Abbildung 4.33 Wachstumskurve der Kultivierung mit Glycerin als Kohlenstoffquelle

Nach 3 h 30 min wurde bei einer optischen Dichte von 0,380 die Proteinexpression induziert und regelmäßig Proben entnommen. Die volumetrische Ausbeute (Abbildung 4.34) stieg dabei kontinuierlich an und erreichte Maximalwerte von 20 mg/l. Die Ausbeute bezogen auf die Trockenmasse dagegen war wesentlich geringer als im Schüttelkolben. Nach 20 h wurde etwa 1 mg/g gefunden. Danach ging die Menge kontinuierlich zurück. Es wurde nur noch Zellmasse aber kein weiteres Produkt gebildet

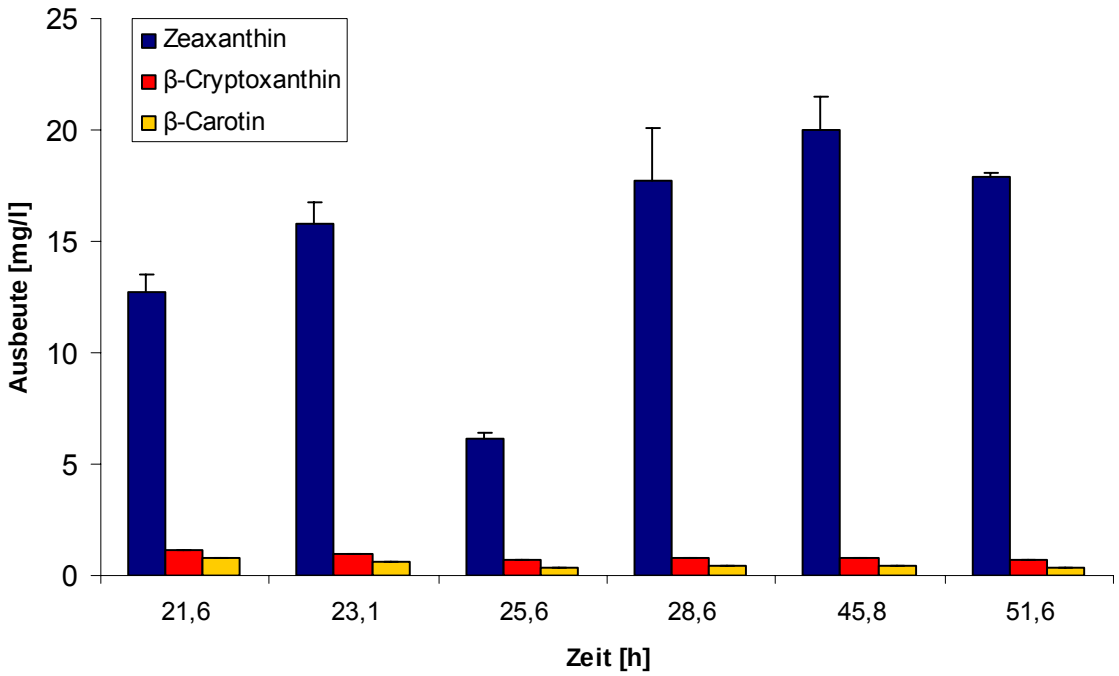


Abbildung 4.34 Verlauf der volumetrischen Ausbeute an Zeaxanthin bei der Fermentation mit Glycerin als Kohlenstoffquelle

Wie im Schüttelkolben konnten die Vorstufen des Zeaxanthins, das β-Carotin und das β-Cryptoxanthin, nachgewiesen werden. Andere Vorstufen wurden nicht gefunden. Die Menge der Vorstufen war wesentlich geringer als die des Zeaxanthins. Es wurden an β-Carotin im Maximalfall 0,8 mg/l und von β-Cryptoxanthin 1,1 mg/l gefunden. Andere Vorstufen konnten nicht nachgewiesen werden.

Problematisch bei der Fermentation war die Tatsache, dass der Gelöstsauerstoffgehalt zeitweise nicht mehr den Schwellwert erreichte. Es erfolgte daher keine Fütterung mehr. Der Kohlenstoffmangel ging mit der Bildung von säuerlich riechenden Stoffen, vermutlich kurzkettigen Fettsäuren, einher. Der Schwellwert für die Fütterung wurde daher auf einen neuen Grenzwert von 50 % eingestellt. Bereits 15 min nach dieser Änderung wurde wieder sehr viel Sauerstoff verbraucht.

Problematisch bei allen Kultivierungen war die Bildung eines stark schleimenden Stoffes. Die eingeblasene Luft war nicht mehr fein verteilt. Es bildete sich vielmehr eine große Blase, die nahezu mittig den Fermenter durchströmte. In der Abluft wurde nahezu kein Kohlendioxid mehr gemessen. Wurde eine Probe des Medium jedoch auf einer Agar-Platte ausgestrichen, konnte ein Wachstum beobachtet werden. Die Pellets waren nach der Ernte sehr weich und mit Medium durchsetzt. Es ging nahezu ein Drittel des Pellets verloren.

4.14.2 Kultivierung in Mineralmedium

Da die Versuche in Vollmedium nur teilweise erfolgreich waren, wurde ein Kultivierung in einem Mineralmedium vorgenommen. Hier können gezielter einzelne Komponenten wie Spurensalze und Kohlenstoffquelle hinzugefügt werden. Somit kann auf den Mangel einzelner Komponenten gezielt reagiert werden.

In einem ersten Versuch wurde eine Kultivierung in MEK-Medium durchgeführt und wie oben Glucose zugefüttert. Das Medium schäumte sehr stark. Dabei ging ein Teil der Zellen verloren. Außerdem trat auch hier nach einiger Zeit das Problem auf, dass, wie beim TB-Medium, eine Schleimbildung einsetzte, die eine gute Sauerstoffverteilung im Fermenter unmöglich machte. In der Literatur ist bekannt, dass manche *Pseudomonas* sp. unter bestimmten Bedingungen Alginat bilden. Eine Probe des Überstandes wurde daher mit Calciumchloridlösung (β = 30 %) versetzt. Die Lösung verdickte dabei sofort. Eine Natriumalginatlösung (β = 10 g/l) reagierte gleich.

Unter anderem wird die Limitierung von Stickstoff als Auslöser für die Alginatproduktion genannt. Des weiteres sind die Scherkräfte unter Umständen für die Alginatbildung verantwortlich. Es wurde daher statt mit einem Blatt- mit einem Propellerrührer gearbeitet.

In einem weiteren Versuch wurde daher als Fütterungslösung ein Gemisch aus Glucose (1000 g/l) und Ammoniumsulfat (9,5 g/l) verwendet. Ferner wurde nach 25 Stunden eine zweite Induktion vorgenommen.

Die optische Dichte blieb in Mineralmedium hinter den Werten in TB-Medium zurück. Sie erreichte nach etwa 20 Stunden einen Maximalwert von 25. Nach 48 Stunden fiel der Wert aber auf 10. Betrachtet man dies aber im Kontext mit dem Partialdruck des im Medium gelösten Sauerstoffs (Abbildung 4.35), so sieht man bei etwa 43 Stunden ein breites Signal. Danach wird auch das Rauschen in der Kurve stärker. Bei den vorherigen Fermentationen war dies immer ein Zeichen dafür, dass Alginat gebildet wurde. Diese Alginatbildung erschwerte auch die Messung der optischen Dichte, so dass diese hier nicht mehr als sicherer Wert angesehen werden kann. Im Fementer selbst wurde dann auch eine Schleimbildung beobachtet, die aber nicht so stark ausgeprägt war wie bei TB-Medium

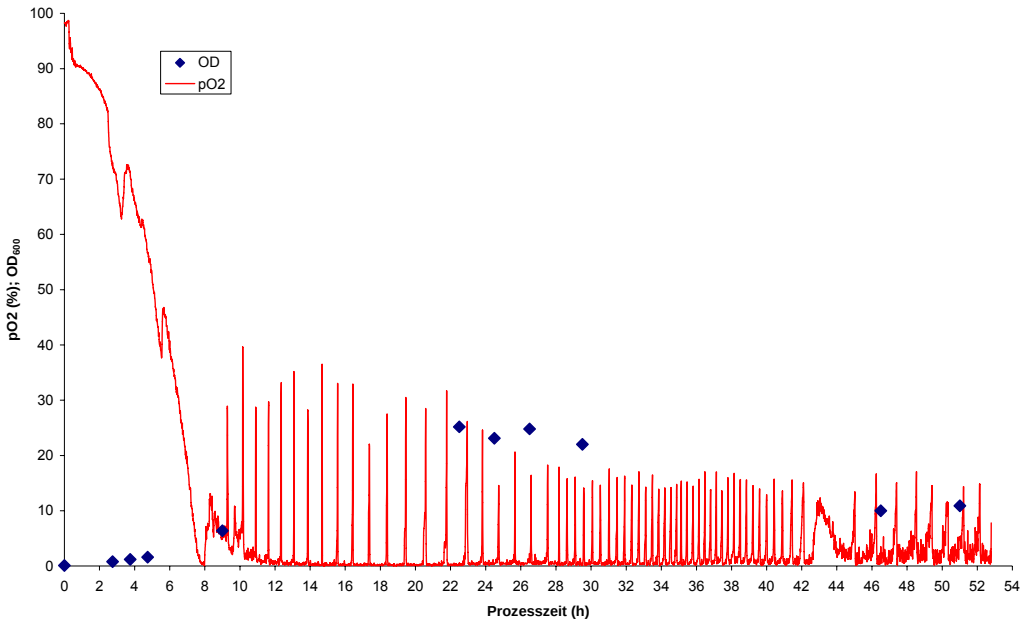


Abbildung 4.35 Verlauf des Sauerstoffpartialdrucks in Lösung und der optische Dichte bei 600 nm bei Kultivierung in MEK-Medium

Betrachtet man die Produktion der Carotinoide, sieht man, dass diese beständig ansteigt. Gut zu sehen ist hier, dass die β-Cryptoxanthin- und die β-Carotinmenge in den ersten 10 Stunden größer ist als die Zeaxanthinmenge (Abbildung 4.36). Zeaxanthin erreicht einen Maximalwert von 3,5 mg/l nach 48 Stunden. Die nach 25 Stunden erfolgte zweite Induktion hat einen relativ geringen Einfluss auf Zeaxanthin. β-Carotin steigt jedoch nach dieser Induktion erneut an. Es bleibt aber, wie auch β-Cryptoxanthin, auf einem relativ niedrigen Niveau um 0,5 mg/l

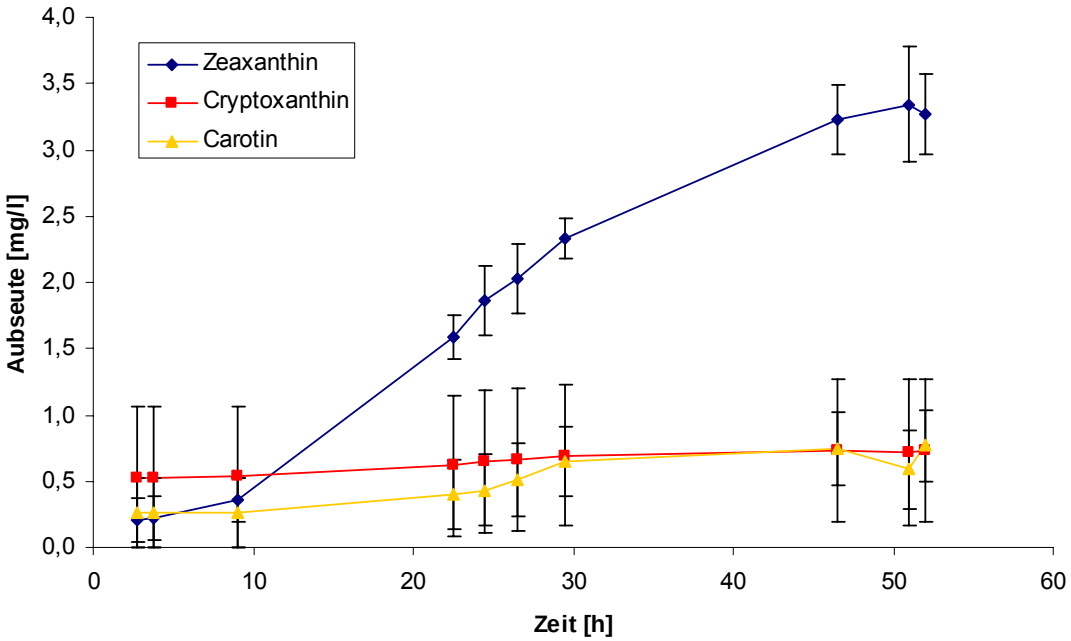


Abbildung 4.36 Verlauf der Carotinoidproduktion bei Kultivierung in MEK-Medium im Fermenter

Bezieht man die Zeaxanthinmenge aber auf die Biotrockenmasse, so sieht man, dass der Einfluss der zweiten Induktion hier stärker ausgeprägt ist (Abbildung 4.37). Die Kurve macht noch mal einen kleinen Sprung.
Insgesamt ist aber auch hier die Produktmenge deutlich geringer als im Schüttelkolben und überschreitet 1,2 mg/g nicht.

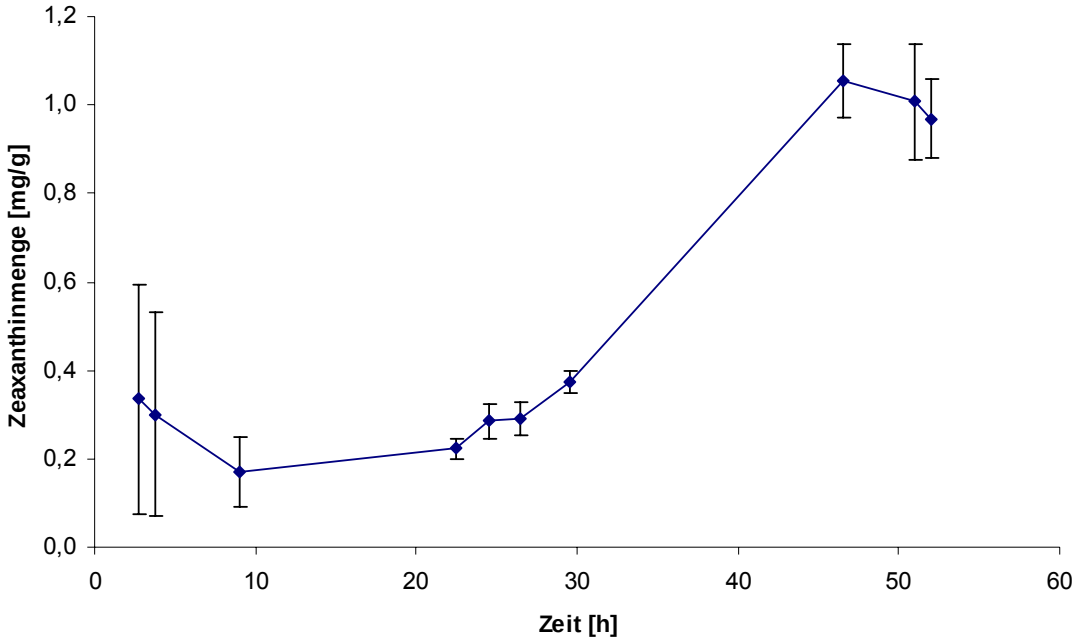


Abbildung 4.37 Zeaxanthinmenge bei Kultivierung im Fermenter

In einem weiteren Versuch wurde wiederum wie oben Glucose mit Ammoniumsulfat zugefüttert. Zusätzlich wurde einmal täglich eine Teilernte gemacht, bei der das halbe Fermentervolumen durch frisches Medium ausgetauscht und erneut induziert wurde. Die Produktmenge stieg nach jeder Teilernte etwas an und erreicht im Maximum 5,1 mg/l Zeaxanthin. Sie war damit deutlich höher als bei den vorherigen Versuchen. Problematisch war jedoch, dass hier auch Lycopin zu beobachten war.

4.14.3 Alginatbestimmung im Medium

Da der Verdacht bestand, dass während der Fermentation Alginat gebildet wurde, wurde versucht eine Quantifizierungsmethode zu etablieren.
Ein erster Ansatz war, das Alginat mit Calciumchloridlösung als Calciumalginat zu fällen, welches in Wasser schwerlöslich ist. In Wasser gelöstes Alginat konnte mit dieser Methode quantifiziert werden. Bei höheren Konzentrationen wurde jedoch eine Abweichung der Auswage von der Einwage gefunden, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die Fällung

nicht quantitativ war. Eine Nachfällung war nicht erfolgreich Die Wiederfindungsrate betrug nur 59,7 %.

Bei Alginat gelöst in Medium war aufgrund des Sulfatgehalts der Lösung eine Mitfällung von Calciumsulfat zu beobachtet. Eine Quantifizierung ist mit der Calciumsulfatfällung daher nicht möglich.

Das Schweizerische Lebensmittelbuch beschreibt eine einfache Methode zur Quantifizierung.[112] Zunächst wird Alginat mit Borax und Schwefelsäure in der Hitze hydrolysiert und mit *m*-Phenylphenol versetzt. Dies bildet einen rot gefärbten Komplex mit Uronsäuren, der photometrisch bestimmt werden kann. Die Angabe des Gehalts erfolgt als Anhydrogalacturonsäure. Für eine Kalibriergerade wurde von Galacturonsäure (β = 219 mg/l) eine Verdünnungsreihe hergestellt. Es entsprachen 0,219 mg Galacturonsäure 200 mg Anhydrogalacturonsäure.

Während die Erstellung der Kalibriergerade möglich war (Abbildung 4.38), konnte aus realen Proben des Überstandes keine Quantifizierung vorgenommen werden. Während der Hydrolyse verfärbten sich die Lösungen schwarz oder dunkelgelb. Die Absorption dieser Färbung war stärker als die Absorption des Komplexes bei 520 nm. Daher konnte keine Quantifizierung vorgenommen werden.

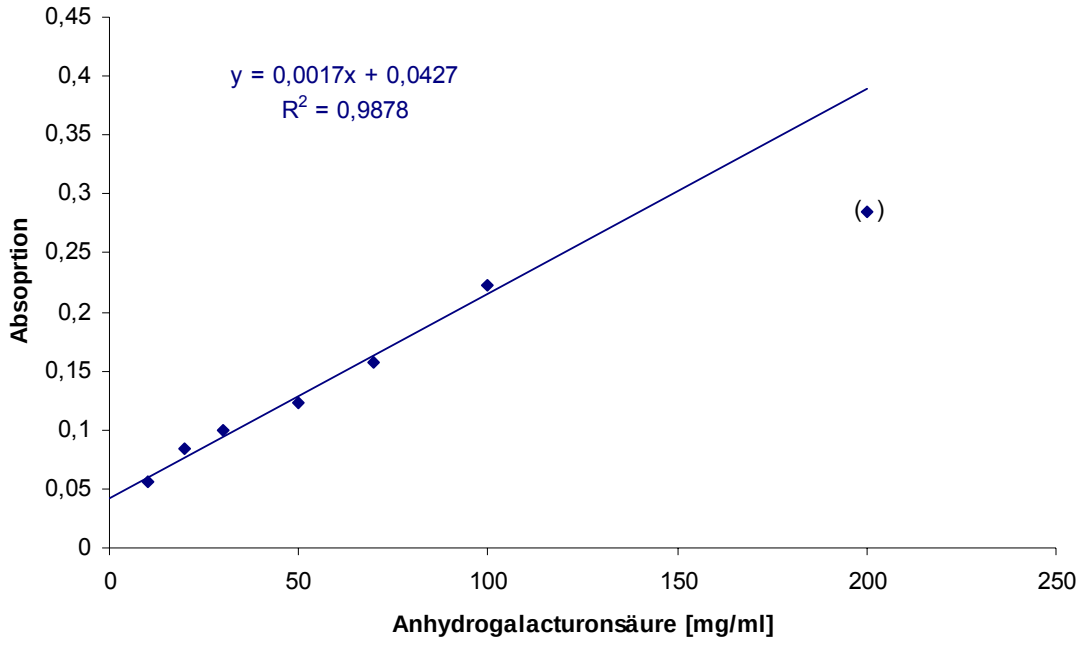


Abbildung 4.38 Kalibriergerade für die Bestimmung der Uronsäuren

4.15 Stereochemie des in *Pseudomonas putida* produzierten Zeaxanthins

Zur Charakterisierung von Zeaxanthin war es zunächst nötig eine größere Menge aufzureinigen. Hierzu wurden etwa 60 g feuchte Zellen aus einer Fermentation wiederholt mit insge-

samt 500 ml Aceton extrahiert bis die Zellen farblos waren. Der erhaltene Extrakt wurde zur Trockne eingeengt und in 50 ml Dichlormethan wieder aufgenommen. Anschließend wurde das halbe Volumen Kalilauge (β = 30 %) zugegeben. Dabei fiel wenig Seife aus. Die Prozedur wurde wiederholt. Nachdem keine weitere Seife ausgefallen war, wurde wiederholt mit 25 ml Wasser gewaschen, bis das Waschwasser nicht mehr alkalisch reagierte. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und auf etwa 5 ml aufkonzentriert. Die Lösung wurde einer Säulenchromatographie auf Kieselgel unterworfen. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus Hexan und Aceton im Verhältnis 8:2. Dabei wurden vier Fraktionen erhalten, wobei Fraktion 1 aus β-Carotin, Fraktion 2 aus einer unbekannten gelben Substanz, die nach dem Ergebnis der Absorption kein Carotinoid war, Fraktion 3 aus β-Cryptoxanthin und Fraktion 4 aus Zeaxanthin bestand. Es wurden 81 mg Zeaxanthin erhalten.

Zur Bestimmung der absoluten Konfiguration der Hydroxylgruppen wurde eine Probe des Extrakts zunächst mit Hilfe einer chiralen Dünnschichtchromatographie untersucht und mit (3*R*,3'*R*)-Zeaxanthin verglichen. Wie aus Abbildung 4.39 ersichtlich, ist in der Referenz ein Punkt bei einem R_f-Wert von 0,23 zu sehen. Die Probe zeigt einen Punkt ebenfalls bei 0,23 und einen weiteren deutlich schwächer ausgeprägten bei 0,11. Daher konnte nicht ausgeschlossen werden, dass mindestens ein weiteres Stereoisomer gebildet wird.

Abbildung 4.39 Dünnschichtchromatogramm von Zeaxanthin und (3*R*,3R')-Zeaxanthin auf chialer DC-Platte
Links (1) die Referenz, rechts (2) die extrahierte Probe.

Da das erhaltene Zeaxanthin der Fraktion 4 nach dem Ergebnis der HPLC außer (all-*E*)-Zeaxanthin noch zwei Isomere enthielt, wurde ein Teil der Fraktion noch weiter mit dem HPLC aufgereinigt. Auf einer C_{30}-Säule konnte das (all-*E*)-Isomer rein erhalten werden. Das Laufmittel wurde entfernt und der Rückstand erneut in 500 µl Dichlormethan aufgenommen. Die Derivatisierung wurde mit 200 µl (+)-(*S*)-1-(1-Naphthyl)ethylisocyanat unter Zusatz von

200 µl Triethylamin und einer Spatelspitze 4-(Dimethylamino)pyridin über Nacht bei Zimmertemperatur durchgeführt.[113] Die Lösung wurde am nächsten Tag mit weiteren 500 µl Dichlormethan verdünnt, da große Mengen weißer Kristalle ausgefallen waren und die Lösung dadurch sehr dickflüssig war. Die Kristalle wurden abgetrennt und die erhaltene dunkelgelbe Lösung mehrfach mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt. Die Analyse des erhaltenen Produkts mit Hilfe der HPLC (Abbildung 4.40) ergab drei Signale mit einem Verhältnis von 33:4:1.

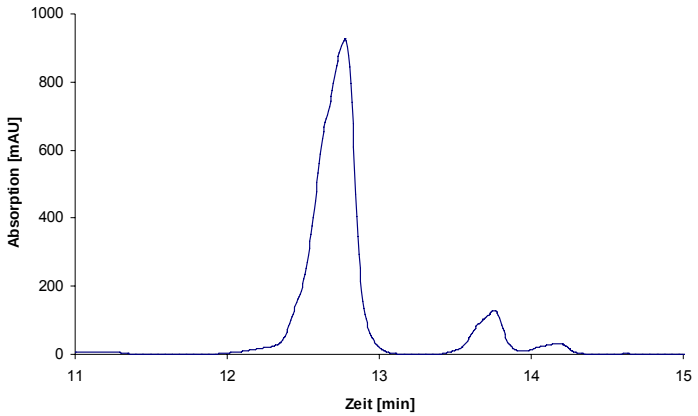


Abbildung 4.40 Chromatogramm des Carbamat-Esters von Zeaxanthin
Gefunden wurden drei Fraktionen I, II und III.

Die drei Substanzen wurden mit Hilfe der HPLC aufgereinigt. Die erhaltenen Fraktionen wurden in Ethanol, Diethylether und iso-Pentan (1:1:1) gelöst und mittels CD-Spektroskopie untersucht.

Es zeigte sich, dass das gefundenen Spektrum der Fraktion I und das Spektrum von (3*R*,3'*R*)-Zeaxanthin übereinstimmten. Bei den Fraktionen II und III war die Konzentration des Zeaxanthins zu niedrig und daher konnten keine Spektren aufgenommen werden, die eine eindeutige Zuordnung zulassen. Andeutungsweise konnte jedoch beobachtet werden, dass die Kurvenform der vom (*R*,*R*)-Isomer gleicht. Die β-Carotinhydroxylase aus *Pantoea ananatis* ist in *P. putida* somit für das (3*R*,3'*R*)-Isomer spezifisch.

4.16 Transkriptionsanalyse mit DNS-Microarrays

Es wurde während Konjugationsexperimenten beobachtet, dass die Transformationsrate des Plasmids pJH13 für die Synthese von Phytoen in *P. putida* KT2440 um den Faktor 300 höher war als die Transformationsrate für das Plasmid pJOE5573.2, welches die Synthese von Lycopin codiert. Ferner wurde beobachtet, dass die Transformationseffizienz für die Mutante D7L3 für das Plasmid pJH13 30fach höher war.[107]

Eine erste Vermutung war, dass Lycopin für den Stamm KT2440 giftig sei und der Stamm D7L3 eine höhere Toleranz gegen die Substanz aufweist. Wurde jedoch Lycopin dem Medium zugegeben, konnte nur ein sehr geringer Einfluss auf das Wachstum der Zellen festgestellt werden. Vielmehr wurde teilweise sogar beobachtet, dass die Zellen eine höhere optische Dichte erreichten als ohne Lycopin. Schwachpunkt dieses Versuches war jedoch, nicht direkt auf die Zelle oder die Membran von innen einwirken konnte, sondern nur außerhalb der Zelle wirken konnte.

Daher sollte mit Hilfe einer Transkriptionsuntersuchung festgestellt werden, ob während der Produktion eine Veränderung auf RNS-Ebene beobachtet werden kann. Insbesondere könnte hier eine Regulation von Genen für die Stressantwort beobachtet werden. Ein anderer Aspekt, der mit Hilfe dieser Untersuchungen geklärt werden sollte, waren weitere Mutationen, die möglicherweise in D7L3 aufgetreten sein könnten, da die bekannte Mutation im *Major Facility Transporter*-Gen die bessere Transformationseffizienz nicht erklärt. Außerdem sollten in einem weiteren Schritt die Gene für die Isoprenoidsynthese auf differentielle Expression hin untersucht werden, um hier eventuell Engpässe zu identifizieren.

4.16.1 Versuchskonzeption

Im Experiment sollte der Wildtyp mit der Mutante mit gleichem Plasmid und die Mutante gegen die Mutante beziehungsweise der Wildtyp mit dem Wildtyp mit jeweils unterschiedlichem Plasmid verglichen werden (Tabelle 4.14).

Tabelle 4.14 Schema für die Microarrayexperimente

Experiment	Probe A	Probe B
1	KT2440, pJH13	D7L3, pJH13
2	KT2440, pJOE5573.2	D7L3, pJOE5573.2
3	KT2440, pJH13	KT2440, pJOE5573.2
4	D7L3, pJH13	D7L3, pJOE5573.2

4.16.2 Kultivierung von *Pseudomonas putida* D7L3 und KT2440 für die Probennahme

Die Kultivierung erfolgte in MEK-Medium bei 25 °C und 160 1/min. Als Kohlenstoffquelle wurde Natriumsuccinat verwendet, da dadurch jegliche Induktion des Rhamnose-Promotors ausgeschlossen werden kann[114] und Succinat und Glucose von *P. putida* ähnlich gut akzeptiert werden.[115] Es kam eine zu einer Glucosekonzentration von 0,2 % äquivalente Stoffmenge Natriumsuccinat von 3,0 g/l (0,3 %) zum Einsatz.

Zur Kultivierung wurden 100 ml des Mediums mit einer entsprechenden Menge einer Übernachtkultur auf eine optische Dichte von 0,1 angeimpft. Die Kultivierung wurde jeweils nur für die Probennahme kurz unterbrochen. Der Hauptkultur wurde kein Antibiotikum zugesetzt. Es wurden jeweils gleichzeitig zwei Kolben des Wildtyps und der Mutante mit dem jeweili-

gen Plasmid kultiviert (Abbildung 4.41). Beim Wachstum war nahezu kein Unterschied sichtbar. Lediglich die Kultur in der Lycopin in der Mutante produziert wurde, trat bereits nach 5 Stunden in die stationäre Phase während dies bei den anderen Kulturen erst nach 6 Stunden der Fall war. Die Kulturen erreichten alle eine optische Dichte zwischen 1,5 und 2,0 während der stationären Phase. Die höheren Standardabweichungen im späteren Bereich der Kultivierung lassen sich durch die notwendige höhere Verdünnung erklären.

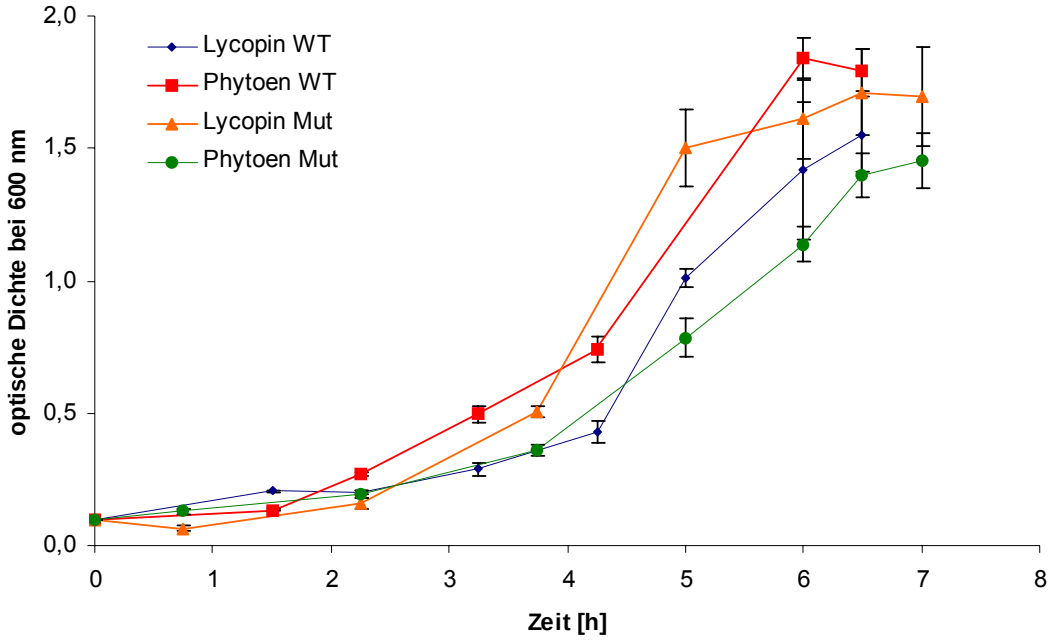


Abbildung 4.41 Wachstum der Stämme KT2440 und D7L3
Angegeben sind die Mittelwerte der optischen Dichten aus den beiden Kolben. Die optischen Dichten wurden jeweils in Dreifachbestimmungen ermittelt.

Kurz vor Beginn der stationären Phase (also bei einer optischen Dichte kleiner als 2,0) wurden jeweils 50 ml zu Portionen von 10 ml als Probe entnommen, mit „RNeasy Protect Bacteria“ von Qiagen nach Vorgabe des Herstellers behandelt und die Proben bei -80 °C zur weiteren Verwendung eingefroren. Tabelle 4.15 gibt eine Übersicht über die optische Dichte bei Probennahme.

Tabelle 4.15 Optische Dichte der Proben bei Probenentnahme

Probe	optische Dichte (600 nm) bei Probennahme
Lycopin I, Wildtyp	1,618
Lycopin II, Wildtyp	1,215
Phytoen I, Wildtyp	1,852
Phytoen II, Wildtyp	1,823
Lycopin I, Mutante	1,363
Lycopin II, Mutante	1,638
Phytoen I, Mutante	1,119
Phytoen II, Mutante	1,156

4.16.3 Isolierung von Gesamt-RNS

Aus den erhaltenen Zellen wurden die RNS mit Hilfe des „RNeasy Mini Kits“ von Qiagen isoliert. Hierbei wurde zunächst ein Aufschluss mit Lysozym vorgenommen. Die Zellen wurden dabei mindestens 15 min mit dem Aufschlusspuffer inkubiert. Ferner erfolgte ein DNase-Verdau direkt auf der Membran der Aufreinigungssäule. Es erfolgte eine Elution mit zunächst 40 µl und dann nochmals mit 30 µl RNase-freiem Wasser.

Man erhielt bei *P. putida* KT2440 mit pJOE5573.2 im Durchschnitt um 2,0 µg/µl RNS und für *P. putida* mit pJH13 um 2,5 µg/µl RNS. Es wurden Maximalwerte bis zu 3,9 µg/µl erreicht. Die Werte für die Mutante waren sehr ähnlich.

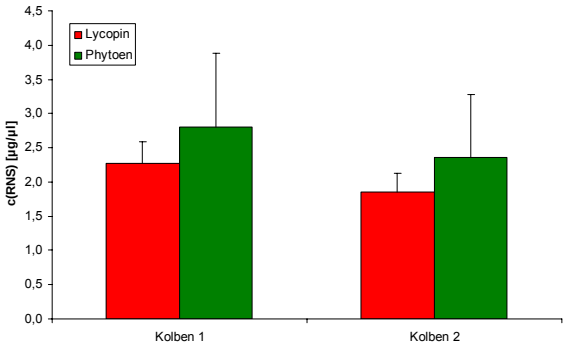


Abbildung 4.42 Ausbeute an Gesamt-RNS aus der Kultivierung des Wildtyps
Dargestellt ist die Menge an Gesamt-RNS in µg/µl.

Die Verhältnisse der Absorption bei 260 und 280 nm bzw. 260 und 230 nm wurden ebenfalls bestimmt. Sie lagen mit Werten über 1,9 bzw. 2,0 eindeutig im notwendigen Bereich.

4.16.4 Synthese von fluoreszenzmarkierter cDNS und Hybridisierung auf die Arrays

Für die reverse Transkription (RT-OCR) und Markierung mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden (Cyanin-3 und Cyanin-5) wurden zunächst mindestens 20 µg und in weiteren Versuchen mindestens etwa 60 µg RNS eingesetzt.

Nach der RT-PCR wurde die erhaltene cDNS wurde mit Hilfe des „PCR Purification Kits“ von Qiagen aufgereinigt. Zur Hydrolyse der RNS im PCR-Ansatz wurde zunächst 5 µl Natronlauge (c = 1 M) zugegeben und der Ansatz anschließend für 10 min auf 65 °C erhitzt. Danach wurde mit 5 µl Salzsäure (c = 1 M) neutralisiert und die Lösung mit 200 µl TE-Puffer (pH = 7,5) gepuffert. Die weitere Aufreinigung erfolgte nach Vorschrift des Herstellers.

Anschließend wurde die Konzentration der cDNS und der Fluoreszenzmarker bestimmt und daraus die Einbaurate berechnet. Durchschnittlich wurden etwa 70 ng/µg cDNS erhalten. Die Einbaurate betrug durchschnittlich 70.

Die Hybridisierung erfolge zunächst mit System „GeneFrame“. Dazu wurden gleiche Mengen cDNS, in der Regel etwa ein Drittel der erhaltenen Menge, von jeder Fraktion verwendet und

anschließend bis nahezu zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde dann in 300 µl Hybridisierungspuffer wieder gelöst und in den GeneFrame eingebracht, der auf einen vorher nach Angabe des Herstellers geblockten Array, geklebt wurde. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht in der Kammer auf einem Thermomixer. Anschließend wurde der Array nach Herstellervorschrift gewaschen. Das Einscannen des Arrays erfolgte bei den entsprechenden Anregungswellenlängen für Cy-3 und Cy-5 und bei verschiedenen Einstellungen für den Photomultiplier (PMT). Bei Verwendung von GeneFrames wurde keine Hybridisierung erreicht. Stattdessen wurden schwarze Punkte auf grünem Untergrund erhalten (Abbildung 4.43, links).

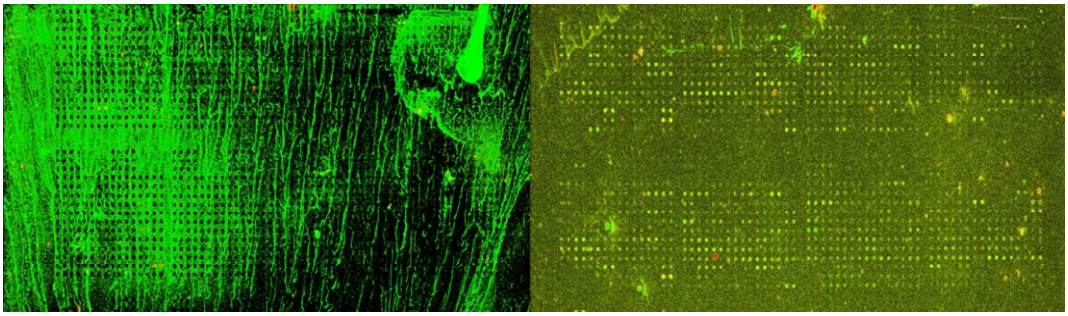


Abbildung 4.43 Falschfarbendarstellung der Microarrays (Ausschnitt)
Links ist die Hybridisierung mit cDNS hergestellt aus 20 µg RNS, rechts ausgehend von 60 µg RNS.

Die RNS-Menge wurde daraufhin verdreifacht. Auch hier konnte keine Ausreichende Hybridisierung erreicht werden. Einzelne Signale waren erkennbar, jedoch aufgrund des hohen Hintergrunds nicht auswertbar.

Daher wurde auf das vom Hersteller des Arrays empfohlene System mit Cover Slips gewechselt. Auch hier konnte bei dreifacher RNS-Menge und, aufgrund des anderen Systems, einer verringerten Menge an Hybridisierungspuffer keine für die Auswertung ausreichende Hybridisierung erreicht werden. Es konnte zwar eine Hybridisierung nach dem Scannen erkannt werden; eine Bestimmung der Signalintensitäten war dennoch nicht möglich, da sich die Signalintensität des Hintergrundes etwa im gleichen bereich bewegte in dem auch die Intensität der Sonden lag (Abbildung 4.43, rechts). Auch die Anwendung der in der Scannersoftware vorhandenen mathematischen Methoden zur Bildverbesserung konnte dieses Problem nicht lösen. Die Arbeit mit den Arrays wurde daher eingestellt, da auch der Hersteller der Arrays nicht weiter zur Problemlösung beitragen konnte.

4.17 Transkriptionsanalyse mit Hilfe der quantitativen Real-Time-Polymerasekettenraktion

Nachdem die Untersuchungen mit Hilfe von Microarrays nicht erfolgreich waren, sollte die Synthese der Vorstufen im DXP-Stoffwechselweg untersucht werden. Da hierbei nur eine geringe Zahl an Genen zu untersuchen war, bot sich die quantitative Real-Time-

Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) an. Mit dieser Methode kann während der PCR-Reaktion durch Messung der Fluoreszenz eines Markers eine Bestimmung der Kopienzahl in Echtzeit vorgenommen werden.

Zur Fluoreszenz können entweder Stoffe verwendet werden, die bei der Interkalation in den synthetisierten Doppelstrang eine Fluoreszenz zeigen, zum Beispiel der Farbstoff SYBR Green, oder es können spezifische Sonden mit einem Fluoreszenzfarbstoff und einem Quencher verwendet werden. Solange beide Moleküle beieinander sind, gibt es kein Fluoreszenzsignal. Wird die Sonde dagegen vom PCR-Produkt verdängt, kann eine Fluoreszenz gemessen werden.

Da letztere Methode relativ teuer und nur Verhältnisse und keine absoluten Mengen bestimmt werden sollten, wurde die Methode mit dem Interkalationsfarbstoff SYBR Green I verwendet. Es wurde der Stamm D7L3 mit dem Plasmid pJH26, welches nur die Gene für die Lycopinsynthese und keine Gene des DXP-Weges trug, kultiviert (Experiment). Als Kontrolle diente eine Kultur des Stammes D7L3 mit einem leeren Vektor pJH40 (Kontrolle). Die Kultivierung erfolgte bei 25 °C und 160 1/min in MEK-Medium mit Glucose.

Abbildung 4.44 zeigt die Wachstumskurven für die Experimente. Problematisch für die Bestimmung der optischen Dichte war die Tatsache, dass sich im Kolben mit der Lycopinproduktion die Zellen zusammenballten. Daher war eine genaue Bestimmung nicht möglich, die Zellpellets waren jedoch sehr ähnlich und auch die Menge an RNS war sehr ähnlich. Die tatsächliche optische Dichte dürfte daher im Bereich der Kontrolle liegen und nicht in einem so niedrigen Bereich wie die Messungen glauben lassen.

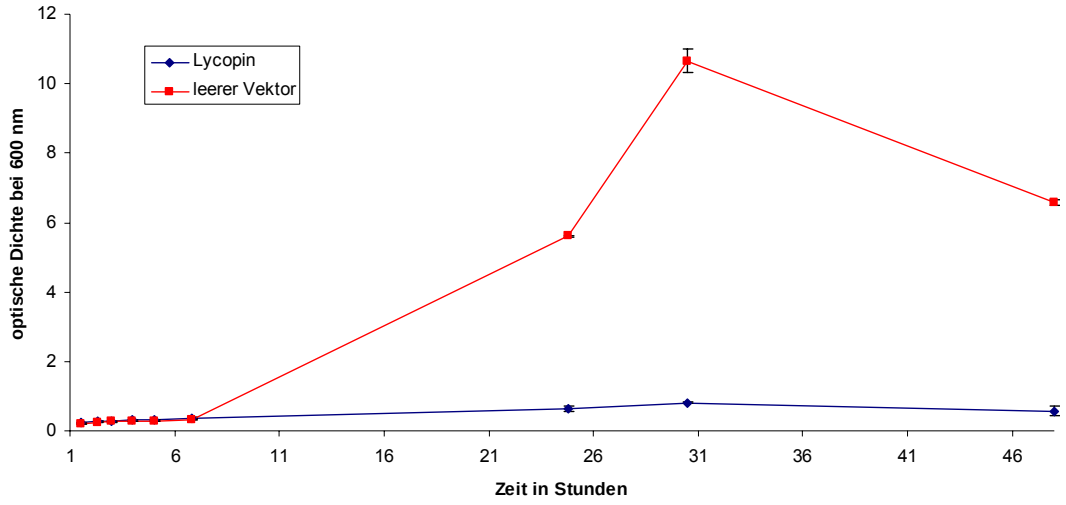


Abbildung 4.44 Wachstumskurve der Kulturen für die qRT-PCR-Experimente

Bei der Ernte und Isolierung der RNS wurde wie bei den Arrayexperimenten vorgegangen. Proben wurden nach 4, 5, 6,8 und 24,8 Stunden entnommen.

Die isolierte Menge an RNS war bei diesen Experimenten wesentlich geringer. Sie lag im besten Fall bei etwa 0,7 µg/µl. Anschließen wurde mit Hilfe der reversen Transkription die RNS in cDNS transkribiert und aufgereinigt.

Die qRT-PCR-Messungen wurden mit Hilfe des „SYBR Green Kits“ von Fermentas vorgenommen. Bei der Auswertung wurden die erhaltenen Intensitäten dann durch die cDNS-Menge dividiert, um die Intensitäten zu normalisieren.

Für eine erste Kontrolle wurden die Verhältnisse der Intensitäten bezogen auf die jeweilige Probe vor der Induktion bestimmt. Aus diesem Verhältnis wurde dann der Logarithmus zur Basis 2 gebildet. Dabei zeigte sich, dass die Werte für die Proben nach 6,8 und 24 Stunden alle negativ waren, was bedeutet, dass hier die Intensitäten niedriger als sie bei der Probe vor der Induktion waren. Bei allen Proben des Stammes mit dem Plasmid pJH40 waren die Werte niedriger als vor der Induktion. Am stärksten ausgeprägt waren die negativen Werte bei den Proben von pJH26 nach 24 Stunden und pJH40 nach 6,8 und 24 Stunden.

Bei allen Proben nach 5 Stunden mit Plasmid pJH26 waren die Werte positiv, die Expression der Gene also stärker als vor der Induktion. Daher wurde für die weitere Untersuchung nur dieser Messpunkt betrachtet.

Augenfällig bei der Betrachtung der Werte im Diagramm (Abbildung 4.45) ist, dass die Werte für *ispG* und *ispA* wesentlich niedriger sind als der Durchschnitt. Für *ispG* liegt der Wert bei 0,07, für *ispA* bei 0,23. Der Mittelwert der der Messwerte liegt bei 0,29 ± 0,10.

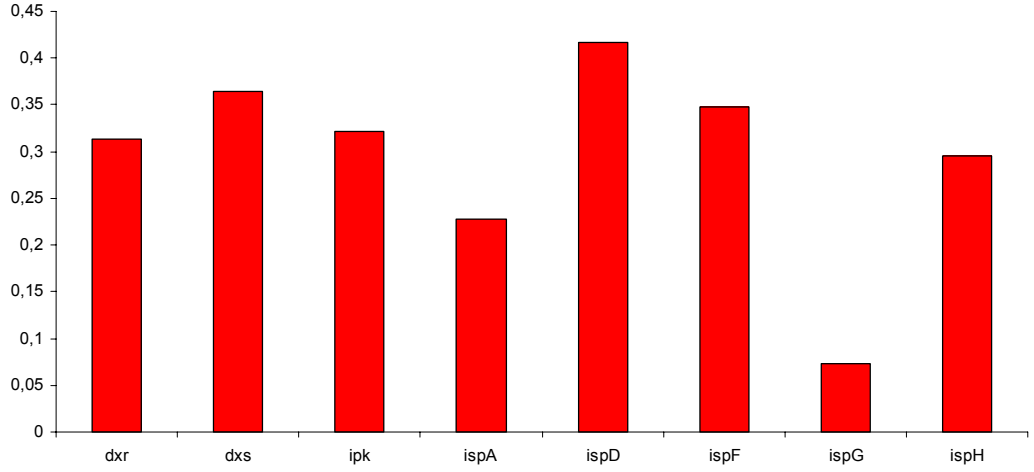


Abbildung 4.45 Gene der Isoprenoidsynthese

Aus diesen Daten kann also abgeleitet werden, dass die beiden Gene weniger stark exprimiert werden als die übrigen Gene des Stoffwechselweges. Das in der Literatur für *E. coli* auch als Engpass genannte Gen *idi* wurde in dieser Untersuchung nicht berücksichtigt, da keine Gensequenz in *P. putida* KT2440 dafür bekannt ist.

4.18 *Pantoea ananatis* als alternativer Produktionsstamm

Pantoea ananatis ist ein natürlicher Produzent von verschiedenen Carotinoiden. Daher sollte geprüft werden, ob mit diesem Organismus nach Transformation der entsprechende Gene eine Erhöhung der Produktion beobachtet werden kann.

In *Pantoea ananatis* wurde am Institut für Industrielle Genetik das Plasmid pJH14 transformiert und eine Kultivierung mit und ohne Induktion durchgeführt. Als Referenz diente der Stamm ohne Plasmid. Die Kultivierung erfolgte bei 30 °C in LB-Medium, das mit Glycerin oder Glucose (jeweils 0,5 %) supplemetiert wurde.

Die Auswertung der Chromatogramme gestaltete sich schwierig, da sehr viele Signale gefunden wurden. Anhand der Absorptionsspektren war keine Zuordnung möglich. Bei einigen wenigen konnte aber zumindest eine Vermutung über deren Identität angestellt werden.

Abbildung 4.46 zeigt das Chromatogramm des *P. ananatis* Wildtyps nach Kultivierung in LB-Medium mit 0,5 % Glucosezusatz. Sicher zugeordnet werden konnte anhand der Retentionszeiten und des Absorptionspektrums lediglich Zeaxanthin und Lutein. Zwei Signale sind bei den Retentionszeiten von α- beziehungsweise β-Carotin zu finden. Die Absorptionsspektren stimmen jedoch nicht überein. Dagegen zeigen die Signale I bis III die Absorptionsspektren des Zeaxanthins. Von *Pantoea ananatis* ist bekannt, dass eine Glycosyltransferase (CrtX, GeneID: 8898072) besitzt. Das glycosylierte Zeaxanthin muss polarer sein als das nicht-glycosylierte. Daher wurde vermutet, dass es sich bei I um das Diglycosid und bei III um das weniger polare Diglycosid handelt. II zeigt im Absorptionsspektrum eine hypsochrome Verschiebung der Maxima von 452 nm beziehungsweise 478 nm zu 445 nm beziehungsweise 471 nm und zusätzlich ein Signal bei 340 nm. Diese Tatsachen sind typisch für (*Z*)-Isomere bei Carotinoiden. Vermutlich handelt es sich bei dieser Substanz um ein (*Z*)-Isomer eines Glycosids. IV und V wurden anhand des Absorptionsspektrums und der Retentionszeit als Lutein beziehungsweise Zeaxanthin sicher identifiziert. VI ist der zugesetzte interne Standard Apocarotinal.

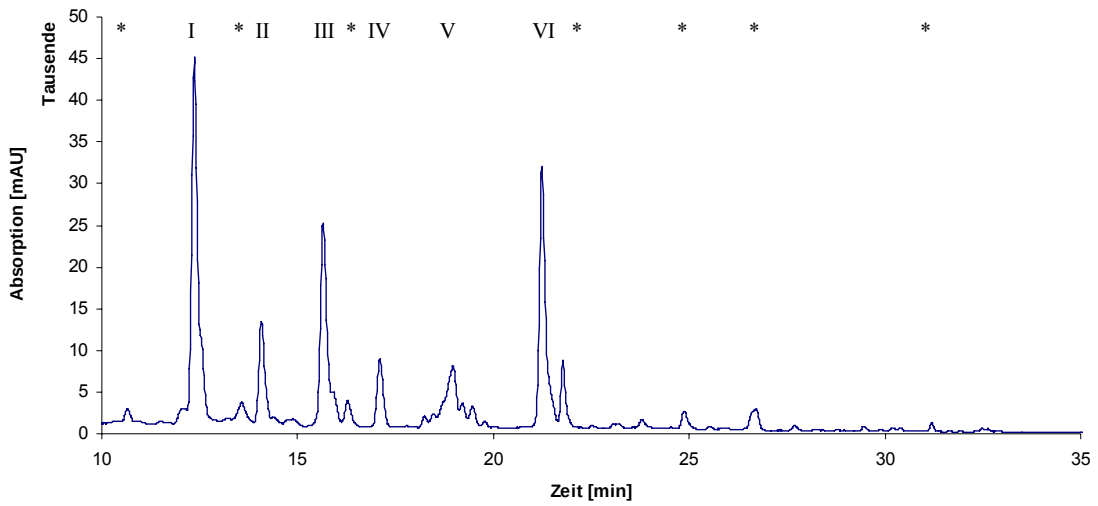


Abbildung 4.46 Chromatogramm von *Pantoea ananatis* Wildtyp

Die Kultivierung erfolgte bei 30 °C in LB-Medium unter Zusatz von 0,5 % Glucose. Für die Signale I bis VI konnte eine Zuordnung vorgenommen werden oder es wurde eine Vermutung (?) angestellt. Signale mit einem Stern (*) konnten nicht zugeordnet werden. I: Zeaxanthindiglycosid (?); II: (*Z*)-Isomer eines Gylcosids (?); III: Zeaxanthinmonoglycosid (?); IV: Lutein; V: Zeaxanthin; VI: interner Standard.

In den Proben aus den Stämmen mit Plasmid wurde sowohl in den induzierten als auch in den nicht-induzierten Proben die Signale I bis V gefunden. Ferner konnte immer β-Carotin nachgewiesen werden. In geringen Mengen traten andere Carotinoide wie zum Beispiel Lycopin auf.

Abbildung 4.47 kann die volumetrische Ausbeute der einzelnen Carotinoide in *P. ananatis* entnommen werden. Sowohl bei den nicht-induzierten als auch bei den induzierten Zellen ist eine Steigerung der Produktion gegenüber dem Wildtyp zu sehen.

Die Induktion mit Rhamnose bewirkte eine Steigerung der Ausbeute. β-Cryptoxanthin konnte auch in einigen der Proben, wenn auch nur in geringsten Mengen, gefunden werden.

Deutlich ist jedoch der starke Anstieg der Zeaxanthinproduktion und der glycosylierten Produkte zu erkennen.

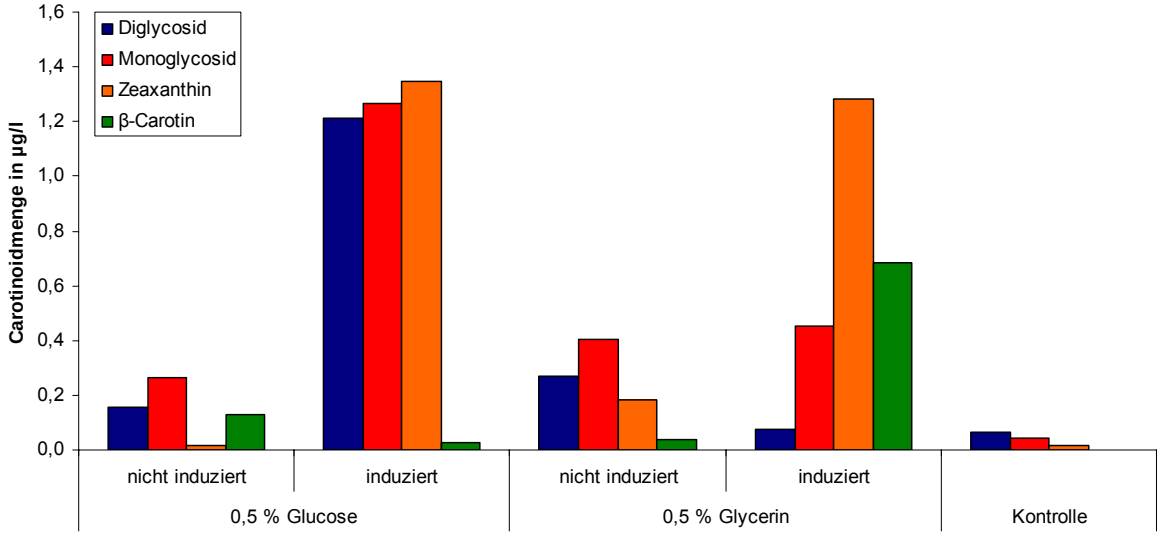


Abbildung 4.47 Übersicht über produzierte Produkte in *Pantoea ananatis*
Abgebildet sind die Produkte aus LB-Medium mit Zusatz von 0,5 % Glucose beziehungsweise Glycerin und die Produktverteilung in der Kontrolle.

Wurde Glucose als Supplement des LB-Mediums eingesetzt, konnte in den nicht-induzierten Zellen 132 µg/l β-Carotin und 19 µg/l Zeaxanthin und 266 µg/l beziehungsweise 1555 µg/l des Mono- beziehungsweise des Digylcosids gefunden werden. Nach Induktion erhöht sich die Menge des Zeaxanthins erheblich auf 1,35 mg/l. Mono- und Diglycosid sind mit 1,26 mg/l und 1,27 mg/l im selben Bereich anzutreffen. Die produzierte Menge des β-Carotins geht dagegen auf 28 µg/l deutlich zurück.

Mit Glycerin als Supplement wurden in den nicht induzierten Zellen 36 µg/l β-Carotin, 184 µg/l Zeaxanthin, 406 µg/l des Mono- und 271 µg/l des Digylcosids gefunden. Nach Induktion konnte auch hier eine deutliche Steigerung der Ausbeute gefunden werden. Allerdings wurde hier auch eine Verneunzehnfachung des β-Carotingehalts auf 682 µg/l gefunden werden. Die Menge an Zeaxanthin stieg dagegen nur um das siebenfache auf 1,28 mg/l an. Der Wert bewegte sich im Rahmen wie beim anderen Experiment. Auch das Monoglycosid wurde mit 452 µg/l im gleichen Rahmen wie bei der Glucosesupplementierung gefunden. Digylcosid wurde dagegen nur in geringen Mengen von 77 µg/l gefunden. Er war somit deutlich niedriger als in der nicht-induzierten Probe.

In der Kontrolle ohne Plasmid wurden wesentlich niedrigere Mengen an Carotinoiden und Glycosiden gefunden. Das Diglycosid war dagegen deutlich am stärksten vertreten. Es wurden 63 µg/l gefunden. Vom Monoglycosid waren 45 µg/l in der Probe enthalten und Zeaxanthin war mit 15 µg/l vertreten. β-Carotin und β-Cryptoxanthin konnte dagegen gar nicht gefunden werden.

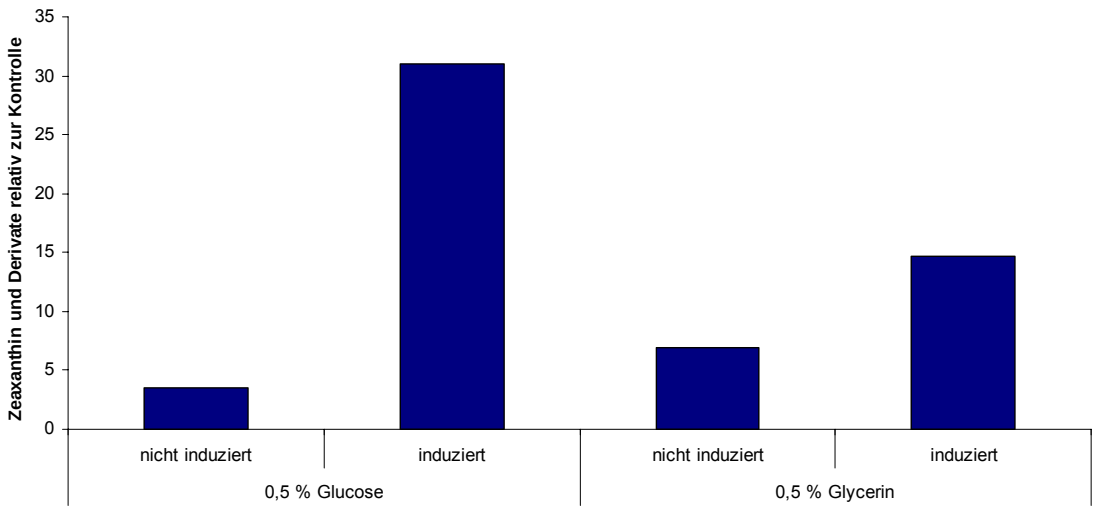


Abbildung 4.48 Relative Mengen des Zeaxanthins und seiner glycosylierten Derivate im Vergleich zum Wildtyp in *Pantoea ananatis*

In Summe aller mutmaßlichen Zeaxanthinderivate in den Proben konnte eine Steigerung gegen sowohl ohne als auch mit Induktion und bei beiden zusätzlichen Kohlenstoffquellen gegenüber dem Wildtyp gefunden werden. Ferner waren die Werte für Zeaxanthin, wenn auch nur geringfügig, höher als die zum Zeitpunkt des Experiments erreichten Mengen für Zeaxanthin in *P. putida* und in *E. coli*.

Nachteilig an diesem Produktionsstamm waren jedoch die sehr geringe Reinheit des Zeaxanthins und der damit verbundene Aufwand beim Aufreinigen. Im Wildtyp betrug der Anteil des Zeaxanthins nur 0,6 %, bei Glucose als Supplement 17 % und bei supplementiertem Glycerin 31 %. Dieser Ansatz wurde daher nicht mehr weiter verfolgt.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von *Pseudomonas putida* zur rekombinanten Produktion von Carotinoiden am Modellprodukt Zeaxanthin. Bei der Produktion von Carotinoiden in *P. putida* KT2440 und seinen Mutanten wurde Neuland betreten. Bislang wurde die Carotinoidproduktion nur in *E. coli* und einigen wenigen anderen Organismen gezeigt, jedoch nie in *Pseudomonas* sp. Von einigen Stämmen von *P. putida* ist eine Toleranz gegen organische Lösungsmittel bekannt.[116] Daher wurde eine höhere Toleranz gegen Substanzen angenommen, die wie die produzierten Carotinoide, in die Membran eingelagert werden.

Um Limitierungen für eine hohe Produktionsleistung zu erkennen wurden Untersuchungen der Metabolite, die beim Aufbau des Zeaxanthins durchlaufen werden, vorgenommen. Des Weiteren wurde die Analyse der Transkription vorgenommen um die Beteiligung verschiedener Gene zu untersuchen. Um Biosynthese von Zeaxanthin zu optimieren wurde die Kultivierung von rekombinanten *P. putida* in verschiedenen Medien und mit verschiedenen Medienadditiven verglichen. Darüber hinaus wurde das verwendete Expressionssystem auch in *E.coli* transformiert und die Ergebnisse mit denen in *P. putida* verglichen. Außerdem wurden Plasmide, die die Gene für die Synthese von Astaxanthin, Canthaxanthin, β-Carotin und Lycopin tragen teilweise ausschließlich in *E. coli* und teilweise in beiden Organismen exprimiert und die Produktbildung gezeigt.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit bildete die Hochskalierung der Produktion vom Schüttelkolben in den 5 l-Fermenter.

Schließlich wurde noch die Eignung eines natürlichen Produzenten von Carotinoiden, das Bakterium *Pantoea ananatis*, zur Produktion von Carotinoiden geprüft.

Zur Untersuchung des Produktionsverlaufs und zu Identifizierung limitierender Reaktionen während der Biosynthese, war es nötig eine genaue Analysemethode für Carotinoide und für die Vorstufen zu etablieren, wofür die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie das Mittel der Wahl darstellte. Ferner wurde eine Methode zur Untersuchung einer großen Probenzahl mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie entwickelt. Im weiteren Verlauf der Arbeit zeigte sich während der Fermentation die Bildung schleimender Substanzen. Hierfür wurde eine Methode etabliert, bei der Uronsäuren nach schwefelsaurer Hydrolyse mittels einer Farbreaktion quantifiziert werden konnten.

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse diskutiert und mit bisher bekannten Daten verglichen.

5.1 Analytik

5.1.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

5.1.1.1 Vergleich verschiedener Methoden

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ist für Carotinoide die wichtigste Untersuchungsmethode. Gekoppelt mit der Absorptionsspektroskopie und der Massenspektrometrie liefert sie wertvolle Hinweise zur Identität der Substanzen.

In dieser Arbeit wurden drei chromatographische Methoden miteinander verglichen. Eine weit verbreitete Technik ist die Verwendung einer RP-18-Säule mit einem Laufmittelgradienten aus Acetonitril und Wasser als Laufmittel. Mit Hilfe dieser Technik konnten β-Carotin, β-Cryptoxanthin, Lycopin, Zeaxanthin und Apocarotinal nur teilweise getrennt werden und außerdem zeigten die Signale starke Abweichungen von der optimalen Form. Ein ähnliches Ergebnis wurde mit der Methode von Steel und Keller[80] erzielt. Bei dieser Methode wurde auf einer RP-18-Säule mit einem Gradienten aus Aceton und Wasser gearbeitet. Die Autoren trennten mit dieser Methode Lutein und β-Carotin. Auch diese Methode konnte, trotz der Ähnlichkeit zwischen Zeaxanthin und Lutein, nicht erfolgreich übertragen werden.

Die Anwendung eines Acetonitril/Wasser-Gemisches in einem isokratischen Verfahren mit einer RP-8-Säule (DXSIL C8, 3 µm, 2,1 x 100 mm) ist literaturbekannt. Mit dieser Methode wurden β-Carotin, β-Cryptoxanthin und Zeaxanthin getrennt. Als Retentionszeiten wurde für Zeaxanthin 2,4 min, für β-Cryptoxanthin 5,7 min und für β-Carotin 15,1 min erhalten. Bis auf das von β-Carotin zeigten alle Signalen ein relativ starkes *Tailing*.[117]

Auch die Verwendung einer RP-18-Säule für Carotinoide ist literaturbekannt.[118] Als Laufmittel kommt hier ein Gradient aus Wasser, Methanol, Acetonitril und Tetrahydrofuran zum Einsatz. Nachteilig an dieser Methode sind das *Fronting* der Signale und die langen Retentionszeiten von bis zu 80 min. Die Leistung der RP-8- und RP-18-Säulen ist für die Carotinoide offensichtlich nicht ausreichend.

Dagegen konnte mit der Methode von Breithaupt[75] ein sehr gutes Ergebnis erzielt werden. Es wurde hier eine RP-30-Säule und ein Gradient aus MTBE, Methanol und Wasser verwendet. Nachteilig an der Methode ist die Verwendung einer RP-30-Säule und der etwas ungewöhnliche Laufmittelbestandteil *tert*-Butylmethylether (MTBE) verwendet werden. Als Laufmittel dient ein Gradient aus MTBE, Methanol und Wasser. Die Methode wurde zur Umgehung der RP-30-Säule auch auf einer RP-18-Säule getestet; auf dieser war aber die Trennung von Lycopin und β-Carotin nicht möglich. Auch die Verwendung eines flacheren Gradienten führte nicht zum Erfolg.

Die Trennung der fünf Carotinoide Apocarotinal, β-Carotin, β-Cryptoxanthin, Lycopin und Zeaxanthin auf einer RP-30-Säule war sehr gut. Wie in der Literatur beschrieben, konnten auch weitere Carotinoide wie Astaxanthin und Canthaxanthin und die (*E*)/(*Z*)-Isomere auf dieser Säule gut getrennt werden. Die Fähigkeit zur Trennung von (*E*)/(*Z*)-Isomeren wurde für Zeaxanthin und Leutein bereits in der Literatur gezeigt.[95] Der in der Arbeit vorgenommene Vergleich zeigt erneut die in der Literatur[73] genannte hohe Leistung der RP-30-Säulen für die Carotinoidanalytik.

In dieser Arbeit wurde die von Breithaupt entwickelte Methode für die RP-30-Säule leicht angepasst. Das Laufmittel wurde wegen Mischbarkeitsproblemen verändert und der Gradient leicht abgeflacht. Dies führte zu einer vollständigen Trennung eines (*Z*)-Isomer des Zeaxanthins und des als internem Standard verwendete Apocarotinals, welche zuvor teilweise koeluierten.

Ferner konnte gezeigt werden, dass mit der angewandten Methode neben den bereits in der Literatur beschriebenen Carotinoiden auch Phytoen, Phytofluen und ζ-Carotin sowie die kurzkettigen Verbindungen Geraniol und Farnesol getrennt werden können. Da diese nicht bei der üblichen Wellenlänge von 450 nm absorbieren, können auch Bestimmungen bei leichter Koelution vorgenommen werden.

5.1.1.2 Kopplung mit der Massenspektrometrie

Die Übertragung der von Breithaupt ebenfalls veröffentlichen Methode zur Ionisierung der Carotinoide auf das vorhandene Massenspektrometer war nicht möglich, da die Einstellungen des von Breithaupt verwendeten Agilent-Geräts nicht auf das vorhandene Shimadzu-Gerät angewendet werden konnten.

Von Shimadzu wurden Geräteeinstellungen zur Ionisierung von Carotinoiden bereitgestellt[100], allerdings wurde in dieser Methode eine andere Säule und ein anderes Laufmittel verwendet. Es wurde versucht die etablierte HPLC-Methode mit den von Shimadzu angegebenen Ionisierungsbedingungen zu verwenden. Bei einem Fluss von 1 ml/min waren jedoch keine Signale zu beobachten. Wurde der Fluss halbiert und die Laufzeit dafür verlängert, konnten relativ schwache Peaks erhalten werden. Es konnten dann auch Massen-/Ladungsverhältnisse gemessen werden, die mit denen der jeweils gemessenen Carotinoide übereinstimmen. Erwartungsgemäß wurden keine Fragmente erhalten. Der erhaltene Basispeak entsprach dem Molekülionenpeak. Es wurde immer das M^+-Ion erhalten. Bei β-Carotin konnte auch ein Ion mit der Masse $[M + CH_3O]^+$ gemessen werden. Es kam nicht zur Bildung von $[M + H]^+$-Ionen. Die ausschließliche Bildung von M^+-Ionen konnte bereits von Mijts *et al.* beobachtet werden[119, 120], während Breithaupt $[M + H]^+$-Ionen fand.

5.1.1.3 Quantifizierung

Die zur Quantifizierung der Carotinoide verwendeten Kalibrierfunktionen waren über den gesamten Bereich linear und erfassten Konzentrationen bis zu 53 mg/l. In der Arbeit wurden Nachweisgrenzen zwischen 0,18 mg/l und 1,87 mg/l gefunden, wobei Zeaxanthin die höchste Nachweisgrenze hatte.

Die Werte für die Nachweisgrenzen entsprachen denen von Breithaupt, der 0,36 bis 0,53 mg/l angab. Auch der lineare Bereich war vergleichbar, wobei Breithaupt nur den Bereich bis 25 mg/l untersuchte.[75].

5.1.2 Dünnschichtchromatographie

In dieser Arbeit wurde eine Methode zur Dünnschichtchromatographie der Carotinoide entwickelt. Die Chromatographie wurde auf Kieselgel-Platten mit einem Gemisch aus gleichen Teilen Hexan, Toluol und *tert*-Butylmethylether durchgeführt. Mit der Methode können neben den für die Arbeit wichtigen Carotinoiden β-Carotin, Lycopin, β-Cryptoxanthin und Zeaxanthin, auch noch eine Vielzahl weiterer Carotinoide getrennt werden. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass die Regioisomere Lutein und Zeaxanthin und α- und β-Cryptoxanthin getrennt werden können; die Trennung von α- und β-Carotin dagegen war nicht möglich. Die R_f-Werte der von Lutein und Zeaxanthin liegen aber sehr nahe; mit einer ausreichend langen Laufstrecke ist die Trennung aber möglich. Nachteilig war ferner, dass α- und β-Carotin und Lycopin nicht getrennt werden konnte. Zur Trennung musste die Chromatographie in der zweiten Dimension mit einem Laufmittelgemisch aus Hexan und Aceton wiederholt werden.

Letztendlich war die Methode aber für die Anwendung auf die Extrakte dieser Arbeit gut geeignet, da Lycopin nur in Einzelfällen als Intermediat auftrat und die Auftrennung von β-Carotin, β-Cryptoxanthin und Zeaxanthin sehr gut war.

In der Literatur ist mehrfach beschrieben, dass die Quantifizierung von Aufnahmen, die mit einem handelsüblichen Flachbettscanner gemacht wurden, möglich ist.[121, 122] Es konnte in einer Untersuchung von Morlock *et al.* gezeigt werden, dass das Signal/Rausch-Verhältnis der Fläche bei Verwendung eines Hewlett-Packard-Scanner um das bis zu 22fache höher war als bei Verwendung von DC-Dokumentationssystemen von CAMAG.[123] Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigte sich jedoch, dass aufgrund der automatischen, nicht abstellbaren Bildkorrektur, starke Abweichungen vorkamen. Diese Abweichungen machte die Anwendung einer Kalibriergerade unmöglich, da mit jedem Scan teils sehr unterschiedliche Werte für das Volumen erhalten wurde. Daher wurde auf die Platte jeweils eine Standardlösung aufgetragen und für jede Platte ein Kalibrierungsfaktor bestimmt. Diese Methode wurde dann aber nur zu Abschätzungen verwendet und die genaue Menge mit Hilfe der

HPLC bestimmt. Abhilfe könnte die die Verwendung eines Scanners ohne Bildkorrektur oder die Verwendung einer Kamera bringen.

5.2 Extraktion von Carotinoiden aus bakterieller Matrix

In der Literatur findet man eine große Bandbreite an Extraktionsmethoden für Carotinoide. So ist zum Beispiel die Extraktion von Carotinoiden aus Algen mit 80 %igem Aceton unter Zusatz von Glasperlen[124], die Reextraktion mit Hexan aus einem Aceton/Wasser-Gemisch, das zuvor zur Extraktion von Carotinoiden aus bakteriellen Zellen eingesetzt wurde,[117], die Verwendung eines Gemisches aus Methanol, Hexan und Essigester aus Paprika, Rotem Pfeffer und wässrigen Lösungen[76-78] und die Verwendung von Aceton für Bakterienzellen[125] beschrieben.

Zur Extraktion aus bakterieller Matrix wurden verschiedene Methoden verglichen. Es kam zum einen reines Hexan und reines Aceton zur Anwendung, zum anderen wurden Gemische aus Methanol, Essigsäureethylester und Hexan (Gemisch A) und aus Methanol, Essigsäureethylester, Hexan und Aceton (Gemisch B) verwendet. Ferner wurde versucht, die Zellen mit methanolischer Kalilauge zu lysieren und die Carotinoide aus dem Lysat mit Gemisch A zu extrahieren.

Die Extraktion mit Hexan war nicht möglich. Da bei der bakteriellen Zellmembran die polaren Enden nach außen zeigen, konnte das unpolare Hexan selbst im großen Überschuss die Zellen nicht lysieren.

Auch mit methanolischer Kalilauge war die Lyse unzureichend. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, war bei der Dephosphorylierung von Geranylgeranylpyrophosphat die Lyse mit methanolischer Kalilauge erfolgreich. Dort wurde aber mit erhöhter Temperatur gearbeitet, was hier nicht der Fall war. Die Lyse bei erhöhter Temperatur war hier aber nicht erwünscht, da die Gefahr der (*E*)/(*Z*)-Isomerisierung bestand.

Die Extraktionversuche mit Aceton, Gemisch A und Gemisch B war dagegen erfolgreich. Nachteilig an Gemisch A und B war die Ausbildung zweier Phasen. Bei Gemisch A konnte durch Zugabe von gesättigter Natriumchlorid-Lösung und anschließender Zentrifugation eine vollständige Auftrennung der Phasen beobachtet werden; die wässrige Phase war farblos. Bei Gemisch B dagegen blieb die wässrige Phase gelb gefärbt und es konnte auch keine vollständige Extraktion vorgenommen werden. Vermutlich beruht dies auf dem höheren Anteil wassermischbarer Lösungsmittel in diesem Gemisch. Zeaxanthin und die anderen Carotinoide sind in Aceton und Methanol gut löslich. Die beiden Substanzen wirken daher als Lösungsvermittler mit der wässrigen Phase. Aceton hat ferner den Vorteil, dass auch auf die stärker umwelt- (Hexan, Essigsäureethylester) und gesundheitsgefährdenden Lösungsmittel (Metha-

nol) verzichtet werden kann. Die Zugabe von Glasperlen oder die Anwendung von Ultraschall während der Extraktion brachten keinen wesentlichen Vorteil. Lediglich bei Gemisch A und B war eine leichte Erhöhung der Ausbeute zu beobachten. Bei der Anwendung von Ultraschall ist die Durchmischung der Zellen mit dem Lösungsmittel schlechter und daher sank die Ausbeute.

Die Extraktion mit Aceton ist auch eine in der Literatur oft beschriebene Technik.[118, 126] Eine andere Technik ist die Extraktion mit Methanol[52, 127, 128] oder die Extraktion mit einem Gemisch aus Aceton und Methanol[129]; gelegentlich wird danach eine Reextraktion durchgeführt.[52] Die Reextraktion birgt aber wieder die Gefahr des Substanzverlustes.

Die Wiederfindungsrate der drei untersuchten Carotinoide lag mit Werten um 98 % im Bereich wie sie auch in anderen Arbeiten angegeben ist, wobei in dieser Arbeit allerdings nur die (all-*E*)-Isomere in die Berechnung einbezogen wurden. In der Literatur angegebene Werte wurden mit anderen Lösungsmitteln oder aus anderen Matrices erzielt. So fanden Thürmann *et al.* für Zeaxanthin aus Plasma eine Wiederfindungsrate von 99 %[130], Breithaupt für Apocarotinal aus verschiedenen Obst- und Gemüsesorten > 96 %[131], 83 % für β-Cryptoxanthin aus Kartoffeln[132] und zwischen 97,1 % und 101,5 % für Lycopin und β-Carotin unter anderem aus verschiedenen Getränken, Puddingmischungen, Würsten, Getreideflocken und Kleingebäck.[75] In allen Veröffentlichungen wurde nicht angegeben, ob die Wiederfindungsrate nur das (all-*E*)-Isomer berücksichtigte oder alle Isomere gezählt wurden. Bei Analysen von Carotinoiden aus bakterieller Matrix wurde in der Literatur in nahezu allen Fällen auf die Angabe einer Wiederfindungsrate verzichtet. Lediglich in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wurden Wiederfindungsraten angegeben; sie lagen zwischen 96,8 und 99,8 %.[133]

Die gefundenen Wiederfindungsraten können somit als gut und als im üblichen Rahmen liegend bezeichnet werden. Der Ausbeuteverlust bei der Extraktion kann auf Adsorptionseffekte an die verwendeten Kunststoffgefäße oder durch Verluste bei der Entfernung des Lösungsmittels zurückgeführt werden.

5.3 Synthese von Carotinoiden in *Pseudomonas putida* und *Escherichia coli*

Zur Synthese von Carotinoiden wurden am Institut für Industrielle Genetik mehrere Plasmide hergestellt. Diese enthielten neben den Genen für die Carotinoidsynthese noch die bereits in der Literatur als limitierend beschriebenen Gene *idi*, *dxs* und *ispA*.[134] Die Gene für die Synthese der Carotinoide bis zum β-Carotin stammten aus *Pantoea ananatis*. Als β-Carotinhydroxylasen wurden die Cytochrom-P450-Monooxygenase CYP175A1 aus *Thermus thermophilus* HB27 und die beiden β-Carotinhydroxylasen aus *Pantoea ananatis* (CrtZ) und

aus *Brevundimonas* sp. SD212 ($CrtZ_{Brev}$) verwendet. $CrtZ_{Brev}$ wurde in *P. putida* nicht weiter geprüft, da in *E. coli* mit diesem Enzym eine sehr geringe Ausbeute erhalten wurde (siehe 5.3.8).

5.3.1 Elektroporation

Die Transformationsrate des Plasmids welches zum Lycopin führte war sehr niedrig gegenüber der des Plasmids welches zum Phytoen führte. Wahrscheinlich liegt hier eine Intoleranz von *P. putida* KT2440 gegenüber Lycopin vor.[107, 114] Daher wurde eine Methode zur Elektroporation etabliert, mit welcher für verschiedene Plasmide deutlich höhere Transformationsraten gegenüber der Transkonjugation erreicht.[108] Bei Transformation von Plasmiden, die zum Lycopin, zum β-Carotin und zum Zeaxanthin führten, konnten Klone erhalten werden; jedoch waren diese sehr heterolog. Es gab neben farbigen auch farblose Klone. In den farblosen Klonen waren die Plasmide verändert. Auch dies spricht für die Intoleranz gegenüber einem der entstehenden Carotinoiden. Es wurden die Plasmide mit CYP175A1 und CrtZ mittels dieser Methode transformiert. Insgesamt war die Transformationseffizienz auch hier sehr niedrig, da selten mehr als 20 Klone gefunden wurden. Durchschnittlich wurden 325 ng DNS transformiert, was etwa 62 Klonen pro Mikrogramm entspricht. Die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse zeigen aber bis zu $1{,}1 \cdot 10^5$ Transformanden je Mikrogramm.[108] Außerdem schwankte die Ausbeute und die Reinheit des Produkts sehr stark von Klon zu Klon.

5.3.2 Zeaxanthinproduktion im *P. putida*-Wildtyp

Mit der Monooxygenase CAP175A1 wurde in erster Linie β-Carotin erhalten. Die hydroxylierten Produkte β-Cryptoxanthin und Zeaxanthin waren nur mit einem Anteil um 10 % im Produktgemisch enthalten. CYP175A1 ist also in der Lage β-Carotin zu hydroxylieren, die Aktivität gegen das Substrat ist jedoch relativ niedrig. In *E. coli* konnten Blasco *et al.*, Zeaxanthin als Hauptprodukt erhalten.[52] Auch Choi *et al.*, konnten eine Ganzzellsynthese von Zeaxanthin mit CYP175A1 in *E. coli* zeigen.[55] In beiden Veröffentlichungen wurden aber weder Angaben zu Verhältnissen noch zu absoluten Mengen gemacht. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Aktivität von CYP175A1 in *P. putida* KT2440 niedriger ist als in *E. coli*.

Mit CrtZ dagegen konnte in *P. putida* KT2440 Zeaxanthin synthetisiert werden. Die hergestellten Mengen waren jedoch von Klon zu Klon sehr unterschiedlich. Vermutlich waren während der Elektroporation Mutationen im Genom von *P. putida* aufgetreten, so dass einzelne Klone eine gesteigerte Toleranz gegenüber Zeaxanthin oder anderen Carotinoiden hatten. Die synthetisierte Menge Zeaxanthin im Wildtyp des Stammes *P. putida* KT2440 war sehr gering

und lag im besten Fall bei 46 µg/g Biofeuchtmasse. Verglichen mit dem in der Literatur für *E. coli* angegebenen Höchstwert von 820 µg/g Biotrockenmasse war die in *P. putida* erhaltenen Ausbeute sehr gering.[61]

5.3.3 Zeaxanthinproduktion in Mutanten von *P. putida*

Aufgrund der niedrigen Ausbeute im Wildtyp und der sehr niedrigen Transformationsraten wurden am Institut für Industrielle Genetik mehrere Mutanten von *P. putida* KT2440 mittels der Transposonmutagenese hergestellt und auf die Transformierbarkeit von carotinogenen Plasmiden selektioniert. In den Mutanten war die Ausbeute mit CrtZ deutlich höher; jedoch schwankte sie innerhalb der Mutanten. Die schlechteste Mutante lieferte 0,77 mg/g Biotrockenmasse (BTM), die beste einen fast doppelt so hohen Wert von 1,51 mg/g (BTM). Bei dieser trat allerdings auch noch Lycopin mit dem höchsten Wert aller Mutanten auf. Letztendlich wurde die Mutante D7L3 gewählt, die hinsichtlich der Zeaxanthinproduktion mit 1,2 mg/g BTM und niedrigem Anteil der Vorstufen einen guten Mittelweg darstellte. Der Wert der drei besten Mutanten für Zeaxanthin war höher als der bisher beste in *E. coli* erhaltene Wert von 0,82 mg/g BTM.[61] Eine Optimierung der Bedingungen konnte die Ausbeute noch weiter steigern. In allen untersuchten Medien (LB-, TB- und MEK-Medium) wurden Werte erhalten, die höher sind als die bislang in *E. coli* für Zeaxanthin erreicht wurden. Sie lagen für TB-Medium bei 7,0 mg/g oder 51,3 mg/l, für LB-Medium bei 1,3 mg/g oder 2,2 mg/l und für MEK-Medium bei 2,5 mg/g oder 1,7 mg/l. Die höhere Ausbeute in TB-Medium lässt sich dadurch erklären, dass TB-Medium wesentlich reicher als die beiden anderen Medien ist. In TB-Medium wurde auch eine wesentlich höhere optische Dichte als in den anderen beiden Medien erhalten.

Bis auf β-Carotin und β-Cryptoxanthin konnten keine weiteren Vorstufen gefunden werden. Die Akkumulierung des nicht-hydroxylierten β-Carotins und des einfach hydroxylierten β-Cryptoxanthins lassen darauf schließen, dass die Hydroxylierung einen Engpass in der Synthese darstellt. Die Werte für diese beiden Substanzen lagen jedoch auf einem durchgehend niedrigen Niveau von höchstens 0,6 mg/g. Von Choi *et al.* wurde ebenfalls festgestellt, dass es keine Bevorzugung von β-Carotin oder β-Cryptoxanthin bei der Hydroxylierung gibt. Sie gaben jedoch nicht an, ob und wie viel β-Cryptoxanthin oder β-Carotin in ihren Untersuchungen synthetesiert wurde.[55]

Die mit *P. putida* D7L3 erhaltenen Werte lagen in dem Mengenbereich der für β-Carotin und für Lycopin in optimierten *E. coli*-Stämmen gemessen wurde; für *E. coli* als Produktionsstamm für Zeaxanthin wurde nur der bereits oben genannte Wert von 0,82 mg/g in der Literatur beschrieben. Auch der bei der Produktion von Lycopin erhaltene Wert lag höher als die in

der Literatur beschriebenen Werte, während der für β-Carotin deutlich niedriger war. Lycopin konnte von Alper *et al.* in einer Menge von 6,6 mg/g Trockenmasse in *E. coli* synthetisiert werden. Yuan *et al.* konnten 6 mg/g β-Carotin aus *E. coli* isolieren.[62] Auch hinsichtlich der volumetrischen Ausbeute kann die gefundene Zeaxanthinausbeute für *P. putida* in die für *E. coli* gefundene Werte eingereiht werden. Der Wert für Lycopin, der von Yoon *et al.* mit 59 mg/l[60] beschrieben wurde, lag dem Bereich in welchem in P. putida Zeaxanthin und Lycopin hergestellt wurde, während der von Vadali *et al.* mit 4,28 mg/l[58] angegebene Wert für Lycopin niedriger war. Von den in Hochzelldichtefermentationen erreichten Werten, die von Alper *et al.* mit 220 mg/l für Lycopin[135] und von Lee *et al.* mit 390 mg/l für β-Carotin[136] angegeben wurden, waren die erhaltenen Werte aber noch weit entfernt.
Beim Vergleich von Schüttelkolben mit und ohne Schikanen zeigte sich, dass in Kolben ohne Schikanen die hydroxylierten Produkte in deutlich niedrigerer Menge gefunden werden konnten. Dies zeigt, dass für die Hydroxylierung von β-Carotin eine ausreichend hohe Sauerstoffkonzentration nötig ist. Sauerstoffmessungen bestätigten, dass in Schüttelkolben ohne Schikanen nur eine sehr geringe Menge Sauerstoff gelöst ist. Hier wurden maximal Werte zwischen 0,1 mg/l und 6 mg/l gefunden, während die Menge des Gelöstsauerstoffs in Kolben mit Schikanen mit Werten 1,8 mg/l und 8 mg/l nahezu an der Sättigungsgrenze von 8,11 mg/l bei der Kultivierungstemperatur von 25 °C lag.

5.3.4 Stereochemie des erhaltenen Zeaxanthins

Zeaxanthin kommt in drei Isomeren vor, das (3*S*,3'*S*)-, das (3*R*,3'*R*) und das (3*S*,3'*R*)- oder *meso*-Zeaxanthin. In chemisch hergestelltem Zeaxanthin findet man oft das Isomerengemisch; die Herstellung der reinen Isomere ist dagegen kostenintensiver. Das in *P. putida* D7L3 erhaltene Produkt ist das (3*R*,3'*R*)-Zeaxanthin. Dies stimmt mit dem für *E. coli* erhaltenen Ergebnis überein.[54] Dieses Isomer wurde in einer Untersuchung auch in 30 von 36 untersuchten Tier- und Pflanzenarten mit einem Anteil von mehr als 50 % gefunden.[137]

5.3.5 Additive zur Erhöhung der Ausbeute

In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass durch Zusatz von Lecithin und Ölsäure die Ausbeute an Carotinoide gesteigert werden kann. Diese Additive eigenen sich aufgrund ihrer Fähigkeit zur Micellenbildung zur Produktionssteigerung und so einen zusätzlichen Speicher für die unpolaren Carotinoide bereitstellen. Eine ebenfalls angewandte Methode zur Produktionssteigerung, die Zufütterung von Vorstufen zum Medium hat den Nachteil, dass dabei teilweise kostenintensive Substanzen verwendet werden müssen, während Lecithin und Ölsäure relativ kostengünstig sind.

Besonders Lecithin (Abbildung 5.1) führte zu einer sehr starken Ausbeutesteigerung. Bei Ölsäure war eine Steigerung zwar ebenfalls messbar, sie war jedoch deutlich weniger ausgeprägt.

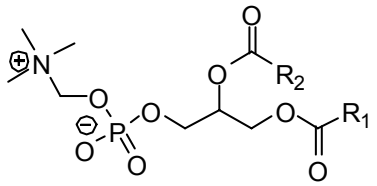


Abbildung 5.1 Allgemeine Strukturformel für Lecithin
R1 und R2 sind unverzweigte aliphatische Gruppen mit bis zu vier (*Z*)-Doppelbindungen.

Der lipophile Charakter der Carotinoide führt dazu, dass sie in die Zellmembran eingelagert werden. Dabei ordnen sie sich, je nach Struktur, entweder parallel zur Membranoberfläche an, zeigen keine bevorzugte Anordnung oder liegen, wie zum Beispiel Zeaxanthin, nahezu senkrecht in der Membran.[138-140] Lecithin ist in der Lage selbst Micellen auszubilden, möglicherweise könnte es auch von den Zellen genutzt werden um ihre Membran zu erweitern. Gleiches trifft auch auf Ölsäure zu. Hier ist jedoch eine (*Z*)-Bindung zu finden, die die eine Ausbildung von Micellen erschwert. Ob die Carotinoide in das Additiv übergehen, konnte nicht geklärt werden, da die Extraktion des Additivs getrennt von den Zellen wegen der Emulsionsbildung unmöglich war.
Die beiden anderen getesteten Substanzen, Cholin und Amberlite® XAD-7 führten nicht zu einer Steigerung der Ausbeute. Bei Cholin war aufgrund seines basischen Charakters eine Lyse der Zellen zu beobachten. Während reines Zeaxanthin sehr gut an die Oberfläche von XAD-7 adsorbierte, war die Adsorptionswirkung von XAD-7 als Additiv nicht stark genug, um Carotinoide aus der Membran zu lösen. Die Verwendung anderer Amberlite, die in großer Zahl verfügbar sind, könnte hier Abhilfe schaffen.

5.3.6 Synthese von β-Carotin und Lycopin in *P. putida*

In dieser Arbeit konnte ferner erstmals gezeigt werden, dass die Produktion von Lycopin und β-Carotin mit *P. putida* D7L3 möglich ist. Während die Ausbeute für Lycopin mit nahezu 10 mg/g mit den in der Literatur veröffentlichten Werten für *E. coli* korreliert[58, 59], waren die Werte für β-Carotin in *E. coli* deutlich höher.[62] Zur Herstellung der beiden Substanzen wurden aber keine weiteren Optimierungen mehr vorgenommen.

5.3.7 Ausschluss einer β-Carotinhydroxylase

In P. putida KT2440 ist das Gen 1046895 als β-Carotinhydroxylase annotiert. Da sich in *P. putida* keine weiteren Gene finden lassen, welche Enzyme für die Herstellung β-

Carotinvorstufen kodieren, kann darauf geschlossen werden, dass die Anwesenheit von β-Carotin in der Zelle die Expression der Hydroxylase induziert. Wäre eine Hydroxlyase vorhanden, so müssten dann zumindest kleine Anteile von β-Cryptoxanthin oder Zeaxanthin im Extrakt vorhanden sein.

Da β-Carotin ohne weitere Nebenprodukte in *P. putida* KT2440 hergestellt wurde, konnte auch gezeigt werden, dass die Annotation des Gens 1046895 in *P. putida* nicht korrekt ist; es handelt sich dabei nicht um eine β-Carotinhydroxylase.

5.3.8 Synthesen von Carotinoiden in *E. coli*

In *E. coli* JM-109 wurden zu Vergleichszwecken ebenfalls Synthesen angestellt. Zum einen wurde die β-Carotinhydroxylase aus *Brevundimonas* sp. SD212 und aus *P. ananatis* verglichen. Dabei wurde gefunden, dass CrtZ eine fünfmal höhere Ausbeute liefert als $CrtZ_{Brev}$. Choi *et al.* führten einen solchen Vergleich auch durch, gaben jedoch keine Werte für die Produktmengen an.[55] Auch bei $CrtZ_{Brev}$ wurden, außer β-Carotin und β-Cryptoxanthin, ebenfalls keine weiteren Vorstufen beobachtet. Betrachtete man die Verhältnisse war der Anteil von β-Carotin mit 8,7 % bei $CrtZ_{Brev}$ deutlich höher als mit 0,6 % bei CrtZ. Auch der Anteil des β-Cryptoxanthins ist mit 4,2 % deutlich höher als bei CrtZ (0,5 %). Dies deutet darauf hin, dass die Hydroxylierung mit $CrtZ_{Brev}$ langsamer verläuft als mit CrtZ.

Ferner wurde die Hydroxylierung mit CrtZ in den drei Medien die auch bei *P. putida* zum Einsatz kamen Kultivierungen vorgenommen. Die Ausbeuten betrugen im besten Fall etwa ein Drittel der Ausbeute in *P. putida*. Sie waren aber dennoch höher als die von Nishizaki *et al.* veröffentlichten Werte für *E. coli*.[61] Die schlechteren Ausbeuten in *E. coli* lassen sich damit erklären, dass ein Expressionssystem verwendet wurde, welches für die Verwendung in *P. putida* optimiert wurde.[141] Wie von Jeske und Altenbuchner gezeigt wurde, war bei *P. putida* keine Katabolitrepression mit diesem System zu beobachten, während in *E. coli* deutlich ein Hemmung in Gegenwart von Glucose zu beobachten war. Sie konnten ferner zeigen, dass die Expression von grün-fluoreszierendem Protein (GFP) mit diesem System in *P. putida* zwar etwas langsamer war als in *E. coli* die Ausbeute, gemessen als Fluoreszenz des GFP, war aber ein Drittel höher als in *E. coli*.[141]

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit in *E. coli* die β-Carotinketolase aus *Brevundimonas* sp., teilweise mit Modifikationen, verglichen und es konnte in diesem Organismus erstmals mit dem verwendeten Expressionssystem die Herstellung von Canthaxanthin und von Astaxanthin gezeigt werden. Dabei zeigte sich, dass die Ketolase ohne weitere Modifikationen die höchste Ausbeute zeigte. Weitere Untersuchungen in *P. putida* wurden nicht vorgenommen.

5.4 Synthese von Geranylgeraniol und Dephosphorylierung des Produkts

In der Arbeit wurde eine einfache Methode entwickelt, mit der rekombinant produziertes Geranylgeranylpyrophosphat aus den Zellen extrahiert und dephosphoryliert werden konnte. Die Lyse erfolgt mit methanolischer Kalilauge bei erhöhter Temperatur. Im Gegensatz zu den bisher in der Literatur beschriebenen Methoden hat diese den Vorteil, dass nur ein Schritt benötigt wird.

Bei den literaturbekannten Methoden wird hier zunächst eine chemische Lyse der Zellen[103], ein mechanischen Zellaufschluss[104] oder eine Kombination beider Verfahren angewandt. Anschließend erfolgt eine Dephosphorylierung mit Hilfe von alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP).[104, 105] Von dieser sind jedoch immer relativ große Mengen nötig.

Die entwickelte Methode eignet sich somit auch zur direkten Extraktion für Metabolomuntersuchungen und kann auch auf andere Vorstufen des Phytoens angewandt werden. Zur Quantifizierung für die Metabolituntersuchung wurde auch die Kopplung von Farnesol mit einem Fluorophor und die Quantifizierung mittels HPLC beschrieben, was ebenfalls einen weiteren Arbeitsschritt benötigt.[103]

Der bei der entwickelten Methode auftretende Substanzverlust kann durch Verdampfungsverluste nur in untergeordnetem Maß erklärt werden, da der Siedepunkt des Geranygeraniols bei 229-230 °C liegt. Eher kann er durch eine Adsoprtion der Substanzen an den Kunststoff des Eppendorfgefäßes erklärt werden, wie er auch bei Carotinoiden auch optisch sichtbar wird. Daher wurde in Glasvials gearbeitet, in diesen war der Verlust geringer.

5.5 Fermentation

Die Fermentation von *P. putida* stellte ein Problem dar. Zum einen kam es zur Bildung einer schleimigen Substanz, die auch als Biofilm an der Glaswand des Fermenters sichtbar war und die mit großer Wahrscheinlichkeit hauptsächlich aus Alginat besteht. Zum anderen waren die Ausbeuten noch nicht befriedigend.

Die Bildung von Alginat in *P. putida* ist literaturbekannt.[142] Diese dient unter anderem dem Schutz vor Austrocknung und dem Schutz vor schädlichen Umwelteinflüssen, wie zum Beispiel Antibiotika[143]. Bei *P. putida* wurde beschrieben, dass dieses Bakterium Alginat in den Exopolysacchariden (EPS) bildet, um Osmolatität und Wassermangel vorzubeugen.[142] Sun *et al.* verglichen mehrere Fütterungsmethoden für die Fed-Batch-Kultivierung von *P. putida*. Dabei wurden die Fermentationen bereits nach 12 bis 22 Stunden abgebrochen, da der Sauerstoffgehalt nicht mehr hoch genug war.[144] Diese Beobachtung stimmt der in dieser Arbeit gemachten überein; der Sauerstoffpartialdruck in der Fermentationsbrühe war bei höheren

optischen Dichten oder längerer Prozesszeit niedrig. Gleichzeitig wurde in der Ablauft auch kein Kohlendioxid mehr gemessen. Es waren aber noch lebende Zellen vorhanden, wie die Ausplattierungsversuche zeigten.

All dies lässt darauf schließen, dass die Zellen in einer Art Ruhephase waren. Wurde das Medium teilweise ausgetauscht, begann auch das Wachstum relativ schnell wieder von Neuem.

Es ist anzunehmen, dass die Zellen eine hohe optische Dichte, also ein geringer Abstand zu den nächsten Zellen, als Wassermangel interpretieren und dann mit der Bildung eines Biofilms beginnen.

Auch die während der Fermentation durch das Rühren auftretenden Scherkräfte, sind ein möglicher Induktor für die Bildung des Alginats. Vandevivere und Kirchmann konnten in einer Kultur aus Bodenisolat eine verstärkte Bildung von EPS beobachten nachdem sie Sand zu den Kulturen gaben, was die Scherkräfte erhöhte. Ohne Sand wurden in nur einem Isolat ebenfalls EPS gebildet. [145]

Bonilla *et al.* untersuchten in *P. putida* ML2 die Biofilmbildung und fanden sowohl einen Einfluss der Stickstoffquelle als auch der Kohlenstoffquelle. Mit Glucose war die Bildung des EPS niedriger als mit Glycerin. Bei der Stickstoffquelle war Nitrat günstiger als Harnstoff oder Pepton.[146]

Aus all diesen einzelnen Tatsachen, kann gefolgert werden, dass die höheren Scherkräfte im Fermenter im Vergleich zum Kolben und die wesentlich höhere Zelldichte, die den Zellen einen Wassermangel suggerieren zur Bildung von Alginat führen. Unter Umständen kann auch bereits eine andere Stickstoffquelle Abhilfe schaffen.

All diese Maßnahmen können bereits zu einer Erhöhung der Ausbeute führen.

5.6 Transkriptionsanalyse

Da die Untersuchungen des Transkriptoms mit Hilfe des Microarrays fehlschlugen, wird im Weiteren nur sehr kurz darauf eingegangen. Die Ursache für das starke Rauschen des Hintergrunds ist in der Oberfläche des Chips zu suchen. Möglicherweise war die Arbeitsvorschrift für die Hybridisierung oder das Waschen des Chips nicht korrekt oder es kam bereits bei der Herstellung des Arrays zu Fehlern.

Die Untersuchung der Transkription der Gene des DXP-Weges dagegen war möglich. Letztendlich konnte aber kein eindeutiges Ergebnis erhalten werden. Das in der Literatur als limitierend beschriebene Gen für die 1-Desoxyxylulose-5-phosphatsynthase (*dxs*) war auf einem ähnlichen Niveau hochreguliert wie die anderen Gene. Allerdings wurde bei dem ebenfalls als limitierend identifizierten Gen für die Geranyltranstransferase (*ispA*) auch eine schwächere

Hochregulation beobachtet. Daneben wurde das Gen der 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl 4-diphosphatsynthase (*ispG*) ebenfalls nur schwach hochreguliert.
Da solche Untersuchungen bislang nur in *E. coli* und nicht in *P. putida* vorgenommen wurden, müssen weitere Untersuchungen zur endgültigen Klärung der Frage folgen, ob *ispA* und *ispG* limitierend sind. Ein endgültiges Ergebnis kann nur die Koexpression dieser Gene mit den carotinogenen Genen erhalten werden. Ist eines dieser Gene limitierend muss im Vergleich einer Produktion ohne diese Gene eine Steigerung der Ausbeute zu beobachten sein.

5.7 Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Synthese von Zeaxanthin, Lycopin und β-Carotin in *P. putida* D7L3 gezeigt. Weiter konnte die Synthese von Astaxanthin und Canthaxanthin in *E. coli* gezeigt werden. Auch hierzu wurde das Expressionssystem für *P. putida* verwendet. Eine Synthese der beiden Carotinoide kann daher auch relativ einfach in der vorhandenen Mutante D7L3 gezeigt werden. Ferner ist die Ausbeuteoptimierung bei Lycopin und β-Carotin erforderlich. Nach der Optimierung im Schüttelkolben und der Fermentation kann eine Synthese im größeren Maßstab im Bioreaktor erfolgen.
Ein weiteres wichtiges Arbeitsfeld ist die Optimierung der Fermentation. Zum einen kann die Produktion weiter gesteigert werden, zum anderen ist es nötig, die Alginatbildung zu umgehen. Dies könnte durch Ausschalten der zur Alginat führenden Gene geschehen. Eine weitere einfache Möglichkeit ist das regelmäßige Teilernten. Dies hält die Konzentration des Alginats im Medium niedrig. Jedoch muss der Zeitpunkt der Teilernten optimiert werden, da ansonsten Lycopin und möglicherweise auch weitere Zeaxanthinvorstufen im Produkt gefunden werden können.
Ferner kann eine Optimierung der Fütterung stattfinden. Zur Fütterung kann anstelle der bisherigen Kombination von Glucose mit einem Ammoniumsalz eine Kombination aus Glucose und einem Nitrat verwendet werden. Ferner ist die Verwendung von Glycerin und einem Nitrat zu prüfen, da mit Glycerin höhere Ausbeuten erzielt werden konnten.
Ferner ist die Möglichkeit einer Optimierung der Isoprenbausteinsynthese durch das zusätzliche Klonieren des Gens *ispG* zu prüfen.

6 Material und Methoden

6.1 Materialien

6.1.1 Geräte

Tabelle 6.1 Übersicht über die verwendeten Geräte

Gerät	Typbezeichnung	Hersteller
Brutschrank	UM500	Memmert, Schwabach
	WTE	Binder, Tuttlingen
DC-Alufolie	Kieselgel 60 F254	Merck KGaA, Darmstadt
	Kieselgel RP-18	Merck KGaA, Darmstadt
	Aluminiumoxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DC-Platten	Kieselgel 60 F254	Merck KGaA, Darmstadt
Eppendorf-Röhrchen	Safe lock (0,5 ml, 1,5 ml und 2,0 ml)	Eppendorf GmbH, Hamburg
Feinwaage	Sartorius Basic	Sartorius AG, Göttingen
Fotometer	BioPhotometer	Eppendorf GmbH, Hamburg
GC/MS-Apparatur	QP2010-GC/MS-System	Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg
GC-Rollrandflaschen	Injektionsflaschen nach DAB	WICOM GmbH, Heppenheim
GC-Säule	Supreme 5	Chromatographie Service GmbH, Langerwehe
Glaswaren	Erlenmeyerkolben, Glasflaschen, Bechergläser, Reagenzgläser	Schott AG, Mainz
Heizrührer	RCT Basic	IKA Labortechnik, Stauffen
HPLC-Apparatur	Agilent 1200 mit Probengeber, Diodenarraydetektor, quaternärer Pumpe und Fraktionensammler	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen
Inkubator	Schüttelinkubator Multitron	Infors, Botmingen, Schweiz
Kammern für Agrose-Gelelektrophorese	DNA Sub Cell, Mini Sub DNA Cell, Mini Sub Cell GT	BioRad, Hercules, USA
Kammern für die SDS-Gelelektrophorese	Minigel-Twin G42	Whatman Biometra, Göttingen
Kapillargelektrophorese	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen
Küvetten	ratiolab® Halbmikro-Küvetten	Ratiolab GmbH, Dreieich-Buchschlag
LC/MS-Apparatur	Controller SLC-10Avp, Pumpen LC-20, Diodenarraydetektor SPD-M10Avp, Massenspektrometer LCMS-2010	Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg
Mikroarrayscanner	ScanArray Express	PerkinElmer, Waltham, USA
Mikrowelle	Micro-Chef FM A935	Moulinex, Ecully Cedec, Frankreich
Netzgerät für die Agarose- und SDS-Gelelektrophorese	PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Gerät	Typbezeichnung	Hersteller
Netzgerät für die Agarose- und SDS-Gelelektrophorese	PowerPac 3000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
PCR-Gerät	Mastercycler Gradient	Eppendorf GmbH, Hamburg
Petrischale	Durchmesser 9,4 cm	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Österreich
pH-Meter	GPRT 1400 AN	Greisinger electronic GmbH, Regenstauf
	ino lab, level 2	WTW GmbH, Weilheim
Photometer	Ultrospec 3000	Biochrom Ltd., Cambridge, Großbritannien
	Nanodrop ND-1000	Nanodrop Technologies, Wilmington, USA
Pipetten	research, reference	Eppendorf GmbH, Hamburg
Pipettenspitzen	kristallklar, gelb, blau	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Polypropylen-Röhrchen	Falcon-Tubes (15 ml und 50 ml)	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
PTFE-Septen		WICOM GmbH, Heppenheim
real-time PCR-Gerät	Mastercycler realplex ep²	Eppendorf GmbH, Hamburg
Rotor	A-4-62	Eppendorf GmbH, Hamburg
Rotor	SS-34, SLA-3000	Sorvall, Langenselbold
Sauerstoffmessgerät	GOX 20	Greisinger electronic GmbH, Regenstauf
Schwingmühle	MM 200	Retsch GmbH, Haan
SDS-Geltrockner	Modell583 Gel Dryer	BioRad, Hercules, USA
Spritzenfilter	Sterilfilter 0,2 µm	Millipore, Molsheim, Frankreich
Thermomixer	Thermomixer 5436	Eppendorf GmbH, Hamburg
	Thermomixer 5436	Eppendorf GmbH, Hamburg
	Thermomixer comfort	Eppendorf GmbH, Hamburg
Tischzentrifugen	centrifuge 5417 R, 5417 C	Eppendorf GmbH, Hamburg
Ultraschalldeintegrator	Branson Sonifier 250	Branson, Danbury, USA
UV/Vis-Spektrometer	Ultraspec 3000	Amersham Pharmacia Biotech, Wien, Österreich
Vakuumkonzentrator	Concentrator 5301 Speedvac	Eppendorf GmbH, Hamburg
	EZ-2 Plus, Personal evaporator	Genevac Ltd, Ipswich, Großbritanien
Vortexer	Janke & Kunkel	IKA Labortechnik, Stauffen
	Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage	Precision advanced	Ohaus Deutschland GmbH, Giessen
Zentrifuge	Zentrifuge 5417 C	Eppendorf GmbH, Hamburg
	Zentrifuge 5415 R	Eppendorf GmbH, Hamburg
	Sorvall RC-5B	Du Pont Instruments
µ-Einsätze		WICOM GmbH, Heppenheim

6.1.2 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in den Reinheitsgraden „rein“, „reinst“ oder „zur Analyse“ erworben. Sie stammten von den Firmen Merck KGaA, Darmstadt, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, VWR International GmbH, Darmstadt. Basenpaarmarker für die Gelelektrophorese wurden von Invitrogen GmbH, Karlsruhe erworben. 7, 12-Diketolithocholsäure war ein Geschenk der Pharmazell GmbH, Raubling. Die Fluoreszenzmarker für Microarrays wurden bei GE Healthcare Europe GmbH, München, gekauft.

Für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurden Laufmittel in den Reinheitsgraden „für die HPLC“, „für die Flüssigkeitschromatographie“ oder „für LC/MS“ verwendet oder vor Gebrauch über eine Füllkörperkolonne destilliert.

Tabelle 6.2 Übersicht über die verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
1 kb-DNA-Ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
100 bp-DNA-Ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Aceton	Merck KGaA, Darmstadt
Agar-Agar	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Amberlite MB-1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Amberlite XAD-7	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ampicillin-Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Chlortrimethylsilan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
dCTP-Cyanine 3	GE Healthcare Europe GmbH, München
dCTP-Cyanine 5	GE Healthcare Europe GmbH, München
Dehydrocholsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Denharts Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Desoxynukleotidtriphosphate (10 mM)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dextransulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dikaliumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid (1 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethylendiamintetraacetat-Natriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Formamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycerin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hexan	VWR International GmbH, Darmstadt
iso-Propanol	VWR International GmbH, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumhydroxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Magnesiumsulfat (wasserfrei)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methanol (LC/MS)	VWR International GmbH, Darmstadt Merck KGaA, Darmstadt

Methyl-*tert*-butylbutylether	VWR International GmbH, Darmstadt Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
N, O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
ortho-Phosphorsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Salzsäure 35 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Toluol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Tabelle 6.3 Übersicht über die verwendeten Referenzsubstanzen

ILC: Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hohenheim; ITB: Laborbestand Institut für Technische Biochemie

Referenzsubstanzen	Herkunft
Adonixanthin	ITB
trans-Apo-8'-carotinal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Astaxanthin	ILC und BASF SE, Ludwigshafen
Canthaxanthin	ILC
Capsanthin	ILC
α-Carotin	ILC
β-Carotin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
ζ-Carotin	Extraktion aus Tomate
Citranaxanthin	ILC
α-Cryptoxanthin	ILC
β-Cryptoxanthin	ILC
Decaprenoxanthin	Isolat aus rekombinaten *E. coli* (IIG)
Lutein	ILC
Lycopin	Extraktion aus Tomate
Physalien	Extraktion aus Chinesischer Wolfsbeere
Phytoen	Extraktion aus Tomate und aus *E. coli* (IMB)
Phytofluen	Extraktion aus Tomate
Retinal	ITB
Retinsäure	ITB
Zeaxanthin	Extraktion aus Chinesischer Wolfsbeere

6.1.3 Kits

Tabelle 6.4 Übersicht über die verwendeten Kits

Bezeichnung	Hersteller
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Fast Start Taq DNA Polymerase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
GeneElute™ Plasmid MiniPrep-Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2X), ROX Solution provided	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
PCR Nucleotide Mix	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
QIAquick PCR purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
RNAprotect Bacteria Reagent	Qiagen GmbH, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Superscript III Reverse Transcriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

6.1.4 Plasmide und Gene

Alle Plasmide wurden am Institut für Industrielle Genetik hergestellt und dort bereits in *Escherichia coli* JM-109 oder *Pseudomonas putida* transformiert.

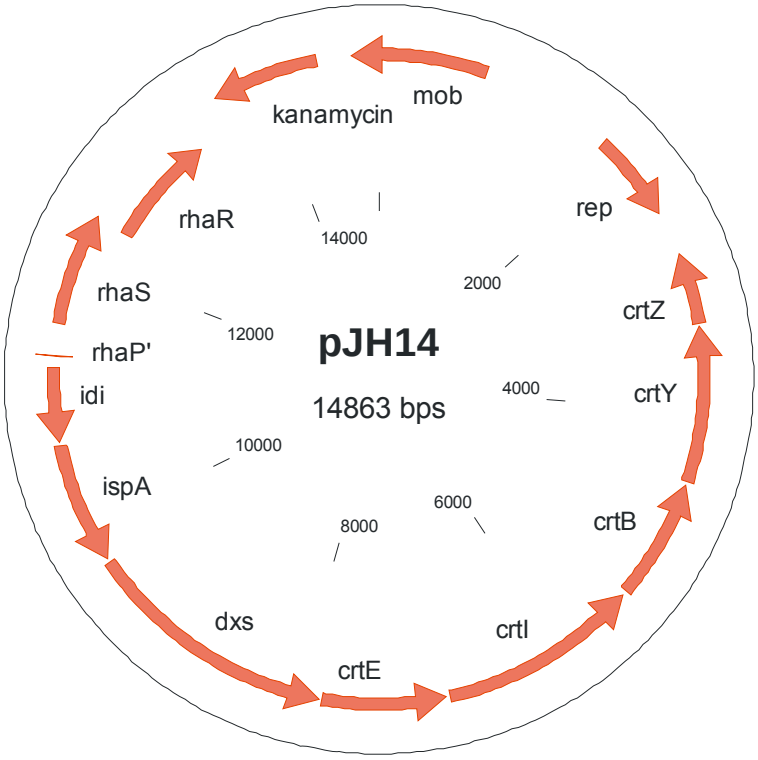


Abbildung 6.1 Plasmidkarte des Plasmids pJH 14

Das Plasmid enthält neben dem Replikationsursprung (*rep*) Gene für die Kanamycinresistenz (*kanamycin*), das Induktionssystem bestehend aus Promotor (*rhaP*), Supressor (*rhaS*) und Repressor (*rhaR*), Gene für die Carotinoidsynthese (*crtE*, *crtI*, *crtB*, *crtY*, *crtZ*) und zum Ausgleich von limitierenden Genen im DXP-Weg (*idi*, *ispA* und *dxs*).

Die in der Arbeit verwendeten Plasmide sind mit Bezeichnung, enthaltenen Genen und erwartetem Produkt in Tabelle 6.5 angegeben. Die Abkürzungen der Gene sind

Tabelle 6.6 zu entnehmen. Alle Plasmide enthielten den Replikationsursprung, das Resistenzgen und das rhamnoseinduzierbare Expressionssystem.[147] Beispielhaft für die verwendeten Plasmide ist die Plasmidkarte von pJH 14 in Abbildung 6.1 wiedergegeben.

Tabelle 6.5 Übersicht über die verwendeten Plasmide

Plasmidname	enthaltene Gene	erwartetes Produkt
pJH14	*idi*, *ispA*, *dxs*, *crtE*, *crtI*, *crtB*, *crtY*, *crtZ*	Zeaxanthin
pJH20	*idi*, *ispA*, *dxs*, *crtE*, *crtI*, *crtB*, *crtY*, *crtZ*(*Brevundimonas* sp. SD212)	Zeaxanthin
pJH22	*crtW*(*Brevundimonas* sp. SD212)	β-Carotinketolase
pJH24	*crtW* (*Brevundimonas* sp. SD212 mit N-terminalem His-Tag)	β-Carotinketolase
pJH25	*crtW* (*Brevundimonas* sp. SD212 mit N-terminaler MalE-Fusion)	β-Carotinketolase
pJH26	*crtE*, *crtI*, *crtB*	Lycopin
pJH40	keine	kein Produkt
pJH7	*crtE*, *crtX*, *crtI*, *crtB*, *crtY*, *crtZ*	Zeaxanthin
pJOE5573.2	*idi*, *ispA*, *dxs*, *crtE*, *crtI*, *crtB*	Lycopin
pJOE5607.5	*idi*, *ispA*, *dxs*, *crtE*, *crtI*, *crtB*, *crtY*	β-Carotin
pJOE5653.5	*idi*, *ispA*, *dxs*, *crtE*, *crtI*, *crtB*, *crtY*, *cyp175A1*	Zeaxanthin

Tabelle 6.6 Übersicht über häufig verwendete Abkürzungen für Gene

Abkürzung	Protein
crtB	Phytoensynthase
crtE	Geranylgeranylpyrophosphatsynthase
crtI	Phytoendehydrogenase
crtW	β-Carotinketolase
crtY	Lycopincyclase
crtZ	β-Carotinhydroxylase
dxs	1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphatsynthase
idi	Isopentenylpyrophosphatisomerase
ispA	Geranyltranstransferase (Farnesyldiphosphatsynthase)

6.1.5 Primer

6.1.5.1 Primer für die Polymerase-Kettenraktion

Tabelle 6.7 Primer für die Polymerase-Kettenreaktion

Gen	Name	Sequenz (5' → 3')	Schmelzpunkt
dxr	hbe_dxr_for	GTGGGCTGCCGAATGGGGTG	64,0 °C
	hbe_dxr_rev	TCAGCGGCCGTGACGCCT	65,5 °C
dxs	hbe_dxs_for	ATG CCC ACG ACG TTT CAA GAG A	58,9 °C
	hbe_dxs_rev	CTAGAGCCCGAGCCTGGC	60,7 °C
ipk	hbe_ipk_for	ATGCAAAAGCTCACCCTGCC	58,8 °C
	hbe_ipk_rev	TCATGCGCTCGACTTCTTGA	56,6 °C
ispA	hbe_ispA_for	ATGATTGGCACCTACCAGGC	57,6 °C
	hbe_ ispA_rev	TTAGTTACGGCGTTCGACAATATAACGCGC	56,9 °C
ispD	hbe_ispD_for	ATGATCGATATCTTGCCGGC	55,0 °C
	hbe_ispD_rev	TCAGCGTTTACCCGCCCA	59,8 °C
ispF	hbe_ispF_for	ATGCGTATTGGCCACGGCTA	59,5 °C
	hbe_ispF_rev	TCATGCTGGCAGCAGCAG	58,8 °C
ispG	hbe_ispG_for	ATGCACGGCGAATCTCCGAT	59,4 °C
	hbe_ispG_rev	TCAGCCACGAGCGATCAACG	60,1 °C
ispH	hbe_ispH_for	ATGCAAATCAAACTCGCCAA CCC	58,8 °C
	hbe_ispH_rev	TCAGATCAGCGAGCGAACCC	59,6 °C

6.1.5.2 Primer für die quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenraktion

Die Primer wurden automatisiert mit dem Programm Primer-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome) welches auf dem Programm Primer3[148] basiert erstellt. Hierzu wurde die Gensequenz im FASTA-Format eingegeben. Das Programm errechnete nach Eingabe der gewünschten optimalen Schmelztemperatur (60 °C) Primersequenzen. Die gefundenen Sequenzen wurden automatisiert gegen Sequenzen aus der *Pseudomonas putida*-Gruppe (Einstellung: *Pseudomonas putida group*, taxid:136845) mit Hilfe einer BLAST-Suche auf Eindeutigkeit geprüft. Die gefundenen Sequenzen der Primer können Tabelle 6.8 entnommen werden.

Tabelle 6.8 Primer für quantitative Real-Time-PCR

Gen	Name	Sequenz (5' → 3')
dxr	hbe_qPCR_dxr_for	CGGTGAGGTTGCGTGCGAGT
	hbe_qPCR_dxr_rev	AAGCAGGATCCGGCGCACAC
dxs	hbe_qPCR_dxs_for	CGGACGACCGGTTGGTGTGG
	hbe_qPCR_dxs_rev	GGCCATGTCGCACAGCCACT
ipk	hbe_qPCR_ipk_for	CGTCCCCCACGACAGCAACC
	hbe_qPCR_ipk_rev	TTGCGGCACCAGCACGACAT
ispA	hbe_qPCR_ispA_for	AACCGGTGCAGCTGGATGCC
	hbe_qPCR_ispA_rev	CGGCCTTTTCGCCGAACCCT
ispD	hbe_qPCR_ispD_for	AGCTGGCTGGGCAGACCCTT
	hbe_qPCR_ispD_rev	TGGCTGTCGGCACGCTTGAG
ispF	hbe_qPCR_for	GGGCGACATCGGCAAGCACT
	hbe_qPCR_rev	AGCAGGGCGACCGAATGCAC

Gen	Name	Sequenz (5' → 3')
ispG	hbe_qPCR_ispG_for	GCGGATCAACCCGGGCAACA
	hbe_qPCR_ispG_rev	GATGCCCAGGTGCAGCGGTT
ispH	hbe_qPCR_ispH_for	GGCACCCGGAAGTCGAAGGC
	hbe_qPCR_ispH_rev	CCGACCACCAGCACCACGTC

6.1.6 Stämme

Tabelle 6.9 Verwendete Stämme

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig; IIG: Institut für Industrielle Genetik, Universität Stuttgart, Stuttgart

Stamm	Genotyp	Herkunft
Pseudomonas putida KT2440	Wildtyp	DSMZ (DSM 6125)
Pseudomonas putida D7L3	Mutation im *Major Facility Transporter*	IIG
Pseudomonas oleovorans	Wildtyp	DSMZ (DSM 1045)
Pseudomonas putida F1	Wildtyp	DSMZ (DSM 6899)
Pseudomonas putida C7L	Mutation in der cytosolischen Aminopeptidase *pepA*	IIG
Pseudomonas putida D8L1	Mutation im Thiol-Disulfid-Austausch-Protein	IIG
Pseudomonas putida E2L3	Mutation im *Sensory Box Protein*	IIG
Escherichia coli JM-109	*recA*1 *supE*44 *endA*1 *hsd*R17 *gyrA*96 *relA*1 *thi* Δ(*lac-pro*AB) F'[*traD*36 *proAB*$^+$ *lacI*^{q} *lacZ*ΔM15]	IIG

6.2 Mikrobiologische Methoden

6.2.1 Stammhaltung von Bakterien

Zur Stammhaltung wurde 828 µl einer Übernachtkultur mit 172 µl sterilem Glycerin (β = 87 %) versetzt und bei -80 °C gelagert.

Kurzzeitig wurden Bakterien auf Agar-Platten bei 4 °C gelagert. Die Stämme wurden hierbei nach spätestens vier Wochen auf eine neue Platte übertragen.

6.2.2 Kultivierung von *Escherichia coli* und *Pseudomonas* sp. und Biotransformation

Übernachtkulturen wurden in Reagenzgläsern mit 5 ml Medium oder 100 ml-Erlenmeyerkolben mit 20 ml Medium angesetzt. Mit einer Übernachtkultur wurde das gewünschte Volumen Flüssigmedium auf eine optische Dichte von 0,1 inokuliert. Der Übernachtkultur und dem Medium wurde ein Tausendstel Volumen einer Lösung des entsprechenden Antibiotikums zugesetzt.

Die Kultivierung erfolgte bei *E. coli* bei 37 °C und 160 1/min, bei *Pseudomonas* sp. bei 30 °C und 160 1/min. Bei einer optischen Dichte zwischen 0,3 und 0,5 wurde mit einem Tausendstel des Medienvolumens einer Lösung von L-Rhamnose (β = 20 %) die Proteinexpression induziert. Nach der Rhamnosezugabe wurde die Kultur bei 25 °C und 160 1/min inkubiert.

6.2.3 Bestimmung der Zelldichte (optische Dichte bei 600 nm)

Das Wachstum von bakteriellen Zellen wurde über die Absorption des Lichts verfolgt (optische Dichte). Hierzu wurde die Absorption der Kultur bei 600 nm gegen Wasser als Kompensationsflüssigkeit gemessen. Die Probe wurde so verdünnt, dass eine optische Dichte von maximal 0,6 erreicht wurde.

6.2.4 Bestimmung von Feucht- und Trockenmasse

In konstant gewogenen Eppendorfgefäßen wurde die Zellmasse aus 2 ml Kultur durch Zentrifugieren bei 20000 *g* pelletiert und durch Differenzwägung die Feuchtmasse bestimmt. Die Trockenmasse wurde nach Trocknung des Pellets bei 60 °C bis zur Massekonstanz bestimmt.

6.2.5 Berechnung von Trockenmassen aus optischen Dichten

Für *E. coli* und *P. putida* standen für die LB-Medium aus Schüttelkolben Umrechnungsfaktoren für die Trockenmasse aus optischer Dichte aus früheren Versuchen zur Verfügung. Die Trockenmasse wurde nach Formel 1 berechnet.

$$m_{tr} = A \cdot f \cdot V \qquad \text{Formel 1}$$

mit:

m_{tr}: Trockenmasse, m_{tr} in g

A: Absorption bei 600 nm

f: Umrechnungsfaktor, für *P. putida*: 0,49 g/l, für *E. coli* 0,401 g/l

V: Volumen, V in l

6.3 Molekularbiologische Methoden

6.3.1 Isolierung genomischer DNS aus *Pseudomonas putida*

Genomische DNS wurde mit Hilfe des „DNeasy Blood & Tissue Kit“ von Qiagen nach Anweisung des Herstellers aus 4 ml einer Übernachkultur in LB-Medium isoliert.

6.3.2 Isolierung von plasmidischer DNS aus *Escherichia coli* und *Pseudomonas putida*

Plasmidische DNS wurde mit Hilfe des „GeneElute™ Plasmid MiniPrep-Kit“ nach Anweisung des Herstellers aus 4 ml einer Übernachkultur in LB-Medium isoliert.

6.3.3 Transformation in *Pseudomonas* sp. mittels Elektroporation

Pseudomonas sp. wurde im Schüttelkolben bei 30 °C und 160 1/min bis auf eine optische Dichte bei 600 nm von 0,26 bis 0,38 kultiviert. Die Zellen wurden bei 1800 *g* für 5 min pelletiert und der Überstand entfernt. Die Zellen wurden in einem Volumen einer sterilen Saccharose-Lösung (c = 300 mM) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen nochmals in einem

halben Volumen Saccharose-Lösung gewaschen. Die Zellen wurden dann in einem Hundertstel Volumen der Saccharose-Lösung resuspendiert.
In einer vorgekühlten Elektorporationsküvette wurden 100 µl der Zellsuspension mit 1-5 µl der DNS-Lösung vermischt. Anschließend wurde die Elektroporation (Spannung: 2,5 kV entsprechend 12,5 kV/cm, Kapazität: 25 µF und Widerstand: 200 Ω) durchgeführt. Unmittelbar danach wurden 900 µl LB-Medium zugegeben und die Suspension in ein steriles Reagenzglas überführt.[108] Die Zellen wurden 2 h bei 30 °C und 160 1/min inkubiert und anschließend auf Agarplatten ausplattiert.

6.3.4 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese kann die Größe von DNS- bzw. RNS-Fragmenten bestimmt werden. Agarose bildet ein gelartiges Polymer. In einem äußeren elektrischen Feld wandern kleine Fragmente schneller und damit weiter als große. Mit Hilfe eines Größenstandards kann die Größe des Fragments bestimmt werden. Zur Sichtbarmachung der Nukleinsäuren dient zum Beispiel eine 1 %igen Lösung von Ethidiumbromid. Dieses interkaliert mit der DNS beziehungsweise RNS. Mit UV-Licht kann die Fluoreszenz angeregt werden.

Zur Herstellung eines Gels wurden 40 ml einer Lösung von Agarose (β = 1 %) in TAE-Puffer (1x) mit 5 µl Ethidiumbromidlösung (β = 1 %) versetzt. Diese Lösung wurde blasenfrei in eine Gießform gefüllt und zur Ausbildung von Kammern ein Kamm in die Agarose eingehängt.
Die Probelösung wurde mit Ladepuffer vermischt und Volumina zwischen 5 und 10 µl in die Kammer pipettiert. Vom Größenstandard wurden 5 µl eingesetzt. Das Gel wurde in eine Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer (1x) gelegt und einer Elektrophorese (30 min, 120 V) unterworfen. Die nach der Größe getrennten DNS-Banden wurden nach der Elektrophorese durch Bestrahlung mit UV-Licht (λ = 254 nm) sichtbar gemacht. Zur Dokumentation wurden Fotos angefertigt.

6.3.5 Arbeiten mit RNS

Da RNS relativ leicht durch allgegenwärtige RNasen abgebaut wird, mussten Maßnahmen zur Verhinderung oder Verminderung der Kontaminationsgefahr mit RNasen getroffen werden. Wasser und andere wässrige Lösungen wurden, soweit nicht vom Hersteller als RNase-frei ausgewiesen, mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt (siehe 6.3.6). Oberflächen wurden mit RNase Zap®, einem kommerziell erhältlichen Inaktivator, gereinigt. Es wurden Pipetten-

spitzen verwendet, die laut Hersteller RNase-frei waren. Kunststoffgefäße wurden unmittelbar der Umverpackung entnommen.
Proben wurden zur Stabilisierung der RNS mit „RNAprotect Bacteria Reagent“ von Qiagen nach Herstellervorschrift behandelt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren. Isolierte RNS wurde ebenfalls bei -80 °C gelagert. Während der Experimente wurde sie auf Eis aufbewahrt.

6.3.6 Herstellung von RNase-freien Lösungen

Lösungen, die RNase-frei gemacht werden sollten, wurden mit 1-2 ml/l Diethylpyrocarbonat versetzt und kräftig geschüttelt. Anschließend wurde sie über Nacht im Abzug gelagert und am nächsten Tag autoklaviert.

6.3.7 Isolierung der Gesamt-RNS aus *Pseudomonas putida* KT2440 und D7L3

Die Isolierung der Gesamt-RNS (tRNS) erfolgte mit dem Kit „RNeasy Mini Kit“ von Qiagen nach Vorschrift des Herstellers. Die Zellen wurden nach Vorschrift mit Lysozym aufgeschlossen. Ein Verdau eventuell vorhandener DNS wurde mit RNase-freier DNase I von Qiagen unmittelbar auf der Säulenmembran nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Die Elution erfolgte zur Erhöhung der Ausbeute mit zunächst 40 µl und dann mit 30 µl Wasser in zwei Schritten.

6.3.8 Bestimmung der RNS-Konzentration

Zur Bestimmung der RNS-Konzentration wurde die Absorption bei 260 nm photometrisch am Nanodrop® bestimmt. Mit dem Programm des Photometers wurden die Quotienten der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm (Verunreinigung der RNA durch Proteine und durch DNS) und 260 nm und 230 nm (Verunreinigung durch aromatische Verbindungen und Ethanol) berechnet. Es wurde nur RNS verwendet bei welcher das Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm zu 280 nm größer als 1,8 war. Ferner wurde das Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm und 230 nm zur Qualitätskontrolle herangezogen. Hier war ein Ausschlusskriterium, dass der Wert größer als 1,8 und größer als das Verhältnis von 260 nm zu 280 nm sein musste.

6.3.9 Kapillargelelektrophorese von RNS

Die RNS-Qualität wurde durch Kapillargelelektrophorese mit Hilfe des Agilent Bioanalyzer bestimmt. Die Vorbereitung des Chips, des Geräts und der Proben erfolgte nach Angaben des Herstellers. Zur Elektrophorese wurde das Programm „Prokaryote Total RNA Nano“ verwendet. Die RNS wird dabei elektrophoretisch aufgetrennt. Zusätzlich wurde über die Absorption

eine Konzentrationsbestimmung vorgenommen und das Integral der Signale für die 16S- und die 23S-RNS bestimmt. Waren die beiden Signale unscharf, wurde die RNS nicht verwendet. Aus den Integralen ließ sich ein Koeffizient bestimmen. Für nicht-degradierte RNS liegt er über 2,0. Es wurde nur RNS verwendet, in welchen die beiden Signale scharf begrenzt waren und der Koeffizient größer als 2,0 war.

Als maximal quantitativ bestimmbare Konzentration wurden 500 ng/µl vom Chip-Hersteller angegeben. Lag die photometrisch bestimmte Konzentration (6.3.8) über diesem Wert, wurde die Probe vor der Messung mit RNase-freiem Wasser entsprechend verdünnt.

6.3.10 Polymerasekettenreaktion

Mit der Polymerasekettenreaktion (PCR, *polymerase chain raction*) können DNS-Abschnitte vervielfältigt werden. Im Idealfall erhält man nach n Zyklen 2^n Moleküle der gewünschten Sequenz.

In einem ersten Schritt wird der doppelsträngige DNS-Strang zunächst bei 95 °C geschmolzen. Im nächsten Schritt wird die Temperatur auf die Schmelztemperatur der Primer (50-60 °C) abgesenkt, um spezifischen oder unspezifischen Primern die Bindung an die Einzelstränge zu ermöglichen. Bei den Primern handelt es sich um meist 20 bis 30 Nukleotide lange Oligonucleotide, die zu DNS-Bereichen komplementär sind.

Nach der Bindung der Primer wird die Temperatur wieder auf die Reaktionstemperatur der Polymerase (zum Beispiel 72 °C für *Taq*-Polymerase) erhöht. Die Polymerase synthetisiert die DNS-Sequenzen, indem sie die Primer vom 5'- zum 3'-Ende durch in der Reaktionsmischung vorhandene Desoxyribonucleotidtriphophatenphosphate (dNTP) verlängert. Da die Synthese immer nur in dieser Richtung abläuft, werden für beide Enden der Sequenz Primer benötigt („*Forward*-“ und „*reverse Backward*-Primer“).

Als Polymerase werden Polymerasen aus thermophilen Bakterien wie zum Beispiel aus *Thermus aquaticus* (*Taq*-Polymerase), *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*-Polymerase) und *Pyrococcus woesi* (*Pwo*-Polymerase) verwendet.

6.3.10.1 Polymerasekettenreaktion mit genomischer DNS als Templat

Die Primer wurden nach Angaben des Herstellers in sterilem, doppelt-deionisiertem Wasser gelöst. Der Ansatz wurde aus folgenden Lösungen hergestellt:

10x PCR-Puffer	5 µl
PCR Nucleotide Mix (10 mM)	je 1 µl
Forward-Primer (5' → 3', 100 pmol/µl)	5 µl
reversed Backward Primer (3'→ 5', 100 pmol/µl)	5 µl
Taq-Polymerase (2 U/µl)	0,4 µl
Templat-DNS (20-200 ng/µl)	Volumen entsprechend 500 ng DNS
doppelt-deionisiertes Wasser (steril)	ad 50 µl

Die Ansätze wurden folgendem Programm im Thermocycler unterworfen:

Initialisierung 95 °C 3 min

Zyklus (30 Widerholungen):

Denaturierung	95 °C	1 min
Anlagerung	50 °C	30 s
Synthese	72 °C	2 min

Synthese 72 °C 5 min

Aufbewahrung 4 °C

6.3.10.2 Polymerasekettenreaktion zur reversen Transkription

Es wurde folgende Mischung hergestellt:

Exo-Resistant Random Hexamer Primer (500 µM)	1 µl
tRNS-Lösung	Volumen entsprechend 3 µg RNS
dNTP-Mischung (10 mM)	1 µl
RNase-freies Wasser	ad 13 µl

Die Mischung wurde für 5 min auf 65 °C erhitzt und danach mindestens 1 min auf Eis abgekühlt.

Anschließend wurde folgende Mischung zugefügt:

First Strand Buffer (5x)	4 µl
DTT-Lösung (0,1 M)	1 µl
RNaseOUT™	1 µl
SuperScript III	1 µl

Die Mischung wurde durch pipettieren gemischt und folgendem PCR-Programm unterworfen:

Start	25 °C	5 min
Synthese	50 °C	60 min
Denaturierung	70 °C	15 min

Die erhaltene cDNS wurde wie unter 6.4.1 beschrieben durch Zugabe von Natronlauge von RNS befreit. Die Lösung wurde mit Salzsäure neutralisiert. Mit dem „PCR Purification Kit“ von Qiagen wurde die erhaltene cDNS nach Vorschrift des Herstellers aufgereinigt.

6.4 Methoden der Transkriptionsanalyse

6.4.1 Synthese und Aufreinigung von fluoreszenzmarkierter cDNS

Ein Volumen das 50 µg der tRNS enthielt, wurde am Vakuumkonzentrator zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 6 µl Wasser wieder aufgenommen. Die Lösung wurde mit 3 µl Random-Hexamerprimer (c = 500 µM) versetzt und 10 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde sie 10 min bei Zimmertemperatur und 2 min auf Eis inkubiert.

Zur Lösung wurde dann die PCR-Mischung (siehe 6.14.2) zugefügt und die cDNS-Synthese bei 42 °C über 2 h durchgeführt. Anschließend wurde die RNS durch Zugabe von 100 µl TE-Puffer (pH = 7,5) und 5 µl Natronlauge (c = 1 M) hydrolysiert. Das Gemisch wurde 10 min bei 65 °C inkubiert. Danach wurden weitere 100 µl des Puffers und 5 µl Salzsäure (c = 1 M) zur Neutralisierung der Natronlauge zugegeben. Aus der erhaltenen Lösung wurde die cDNS mit dem Kit „PCR Purification Kit“ von Qiagen nach Vorschrift des Herstellers isoliert. Zur Elution der cDNS wurden 30 µl Wasser verwendet. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde das Wasser direkt auf die Membran der Aufreinigungssäule pipettiert, dort 1 min einwirken lassen und anschließend 1 min bei höchstmöglicher Umdrehung abzentrifugiert.

6.4.2 Bestimmung der Konzentration von cDNS und Einbaurate

Die Konzentration der DNS und der Fluoreszenzmarkierung wurden photometrisch am Nanodrop® bestimmt. Daraus ließ sich die Einbaurate berechnen. Die Konzentration der cDNS wurde über die Absorption bei 260 nm bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten dCTP, entweder Cyanin-3-dCTP (Cy3-dCTP) oder Cyanin-5-dCTP (Cy5-dCTP), erfolgte fluorometrisch. Die Anregung erfolgte für Cy3-dCTP bei 550 nm und die Emission bei 570 nm und für Cy5-dCTP bei 649 nm beziehungsweise 670 nm.

Die Konzentration der Nukleotide wurde aus dem Molekulargewicht eines Nukleotids (330 g/mol) und der photometrisch bestimmten Konzentration der cDNS bestimmt (Formel 2).

$$c_{\text{Nukleotide}} = \frac{w_{\text{cDNS}}}{M_{\text{Nukleotid}}}$$ Formel 2

mit

$c_{\text{Nukleotide}}$: Konzentration der Nukleotide in 1 mol/l

w_{cDNS}: Konzentration der cDNS in ng/µl

$M_{\text{Nukleotid}}$: molare Masse eines Nukleotids (M = 330 g/mol)

Anschließend konnte die Einbaurate bestimmt werden (Formel 3).

$$E = \frac{c_{\text{Nukleotide}}}{c_{\text{Marker}}}$$ Formel 3

mit

E: Einbaurate (markiertes Cystein pro Nukleotide)

$c_{\text{Nukleotide}}$: Konzentration der Nukleotide in mol/l

c_{Marker}: Konzentration der Fluoreszenzmarker in mol/l

6.4.3 Arbeiten mit DNS-Microarrays

6.4.3.1 Blocken des Arrays

Vor der Verwendung muss der Array zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen der cDNS an die Oberfläche geblockt werden. Durch das Blocken werden die reaktiven Gruppen auf der γ-Aminosilan-Oberfläche abgesättigt.

Als Blocklösung wurde ein Gemisch aus 50 ml 20x SSC-Puffer, 2 ml Natriumdodecylsulfat-Lösung (β = 10 %), 40 ml Rinderserumalbumin (β = 5 % in Wasser) und 108 ml Wasser verwendet. Die Blocklösung wurde auf 42 °C vorgewärmt und die Arrays 45 min bei 42 °C unter leichtem Rühren darin inkubuiert. Danach wurden sie durch fünfmaliges Tauchen in zimmerwarmes Wasser gewaschen und anschließend durch einmaliges Tauchen in zimmerwarmes *iso*-Propanol vorgetrocknet. Die Arrays wurden dann durch Abblasen mit Stickstoff getrocknet.

6.4.3.2 Hydridisierung unter Verwendung von Geneframes

Gleiche Mengen cDNS aus Kontrolle und Experiment wurden vereinigt und am Vakuumkonzentrator zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 305 µl Hydrisierungspuffer gelöst. Der Hybridisierungspuffer wurde vor der Verwendung auf 42 °C erwärmt. Die cDNS-lösung wurde 5 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurde auf den Array ein Geneframe aufgebracht, die Hybridisierungslösung eingefüllt und der Geneframe verschlossen. Der Array

wurde 18 h bei 42 °C im humidisierten Schüttler inkubiert. Danach wurde der Geneframe entfernt und der Array gewaschen.

6.4.3.3 Hydridisierung unter Verwendung von Coverslips

Gleiche Mengen cDNS aus Kontrolle und Experiment wurden im Vakuumkonzentrator zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 36 µl Hybridisierungspuffer, der auf 42 °C temperiert war, gelöst. Die Probe wurde 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Lösung wurde anschließend mittig auf einen Coverslip aufgetragen. Der Coverslip wurde vor Verwendung mit Luft abgeblasen. Anschließend wurde die bedruckte Seite des Arrays auf den Slip gelegt und der Array in eine Hybridisierungskammer eingebracht. Zur Kontrolle der Luftfeuchtigkeit in der Kammer wurde in die beiden Humidisierungskavitäten der Kammer jeweils 10 µl SSC-Puffer (3x) eingefüllt. Der Array wurde 18 h bei 42 °C inkubiert. Danach wurde der Array gewaschen. Beim ersten Waschschritt fiel der Coverslip unter dem eigenen Gewicht normalerweise von selbst ab; falls nicht, wurde er entfernt.

6.4.3.4 Waschen des Arrays

Einzelne Arrays wurden in Falcon-Röhrchen gewaschen und dabei im Hybridisierungsofen langsam rotiert. Mehrere Arrays wurden in Färbegestellen für Objektträger in Färbetröge eingesetzt und der Waschpuffer wurde leicht gerührt. Hier wurde die Waschlösung, falls nötig, auf die entsprechende Temperatur im Hybridisierungsofen aufgewärmt.

Zunächst wurde je zweimal für 5 min im 37 °C warmen Puffer 1 und 2 und anschließend einmal für 5 min im Puffer 3 bei Zimmertemperatur gewaschen. Danach wurde der Array durch Abblasen mit Stickstoff getrocknet.

6.4.3.5 Datenerfassung

Der Array wurde an einem Perkin-Elmer Scanner eingescannt. Dabei wurden beide Laser gleichzeitig verwendet. Als Rasterweite wurde 5 µm gewählt. Die Daten wurden bei 50 %, 70 % und 100 % Photomultiplier-*Tube* (PMT) erfasst und als tiff- und jpg-Datei gespeichert. Mit Hilfe der Scannersoftware wurden die Intensitäten bestimmt und dabei gleichzeitig nach der Methode LOWESS normalisiert. Die Topographie des Arrays wurde mit Hilfe einer vom Arrayhersteller mitgelieferten Datei festgestellt.

6.4.4 Quantitative Real-Time-Polymerasekettenraktion

Zur quantitativen Real-Time-PCR (qRT-PCR) wurde zunächst folgender Ansatz hergestellt:

Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x)	12,5 µl
Forward Primer	Volumen entsprechend 0,3 µM
Reverse Prime	Volumen entsprechend 0,3 µM
cDNS	Volumen entsprechend < 500 ng
Wasser	ad 25 µl

Die Proben wurden lichtgeschützt gelagert, in qRT-PCR-geeignete Mikrotiterplatten überführt und diese mit qRT-PCR-geeigneten Klebefolien verschlossen.
Die qRT-PCR-Maschine wurde zuvor auf die Eigenfluoroeszenz von Platten und Klebefolien kalibriert.

Es wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

Initialisierung 95 °C 10 min

Zyklus (60 Widerholungen):

Denaturierung	95 °C	15 s
Anlagerung	60 °C	30 s
Synthese	72 °C	30 s

Aufbewahrung 4 °C

Die Auswertung erfolgte mit der Software der PCR-Maschine.

6.5 Fermentation

Die Fermentation erfolgte in einem Volumen von maximal 4 l. Während der Fermentation wurden der Partialdruck des Sauerstoffs im Medium, die Rührerdrehzahl und der pH-Wert aufgezeichnet. Ferner wurde teilweise der Partialdruck von Sauerstoff und Kohlendioxid in der Abluft gemessen.
Das Medium wurde während der Fermentation mit Luft belüftet und zur Durchmischung und zur Verbesserung des Lufteintrages gerührt. In einigen Fällen wurde die Drehzahl des Rührers auf einen unteren und einen oberen Grenzwert eingestellt. Die Drehzahl wurde bei höherem Sauerstoffverbrauch erhöht.
Zur Fütterung wurde entweder eine Glucoselösung (β = 100 %) oder Glycerin (β = 87 %) verwendet. Die Fütterung erfolgte automatisiert bei Überschreiten eines vorher bestimmten

Sauerstoffpartialdrucks in der Lösung. Es wurde solange Fütterungslösung zugegeben bis der Wert wieder unter den Schwellwert gesunken war.

Der pH-Wert wurde auf 7,2 eingestellt. Bei Abweichung von diesem Wert wurde entweder Phosphorsäure (β = 10 %) oder Ammoniakwasser (β = 28 %) zugegeben.

6.6 Methoden der Analytischen Chemie

6.6.1 Extraktion von Referenzsubstanzen für Carotinoide

Da Referenzsubstanzen der Carotinoide vergleichsweise teuer oder nicht erhältlich sind (Phytoen), wurden einige der Substanzen extrahiert oder mikrobiell hergestellt und dann extrahiert. Tabelle 6.10 gibt Auskunft über die verwendeten Ausgangsmaterialien.

Tabelle 6.10 Übersicht über die Quelle und Herkunft der zur Extraktion von Referenzubstanzen verwendeten Materialien

Substanz	Quelle	Herkunft
Lycopin, Phytofluen, Phytoen, Neurosporin, ζ-Carotin	Tomatenmark (*Solanum lycopersicum*)	Rich. Hengstenberg GmbH & Co. KG, Esslingen (Tomatenmark, dreifach konzentriert)
Physalien, Zeaxanthin	*Lycium barbarum* L. (Gemeiner Bocksdorn, Chinesische Wolfsbeere)	Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hohenheim (getrocknet) Institut für Industrielle Genetik, Universität Stuttgart (frisch)
Phytoen	*Escherichia coli* DH5α, pCAS59	Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart

Phytoen aus *E. coli* wurde wie unter 6.6.3 beschrieben extrahiert.

6.6.1.1 Extraktion von Lycopin, seinen Vorstufen und Derivaten aus Tomatenmark

Zur Isolierung von Carotinoiden aus der Tomate wurde eine abgewandelte Literaturvorschrift[149] verwendet. Dazu wurden ca. 40 g Tomatenmark mehrfach mit 50 ml Aceton extrahiert, bis das Lösungsmittel nahezu farblos blieb. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 50 ml Hexan aufgenommen. Unlösliche Bestandteile aus dem Rohextrakt wurden durch 5 minütiges Zentrifugieren bei 3200 *g* entfernt. Die Lösung zunächst drei Mal im Scheidetrichter mit Kalilauge (c = 1 M) geschüttelt und anschließend so lange mit deionisiertem Wasser gewaschen, bis das Waschwasser nicht mehr alkalisch war. Die organische Phase wurde anschließend über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Der Extrakt wurde anschließend säulenchromatographisch auf Aluminiumoxid getrennt. Der Rückstand wurde in einem Gemisch aus Hexan und Toluol (1:1) aufgenommen, auf die Säule aufgebracht und zunächst mit einem Gemisch aus 98 % Hexan und Toluol (9:1) und 2 % Diethylether chromatographiert. Nachdem mehrere Fraktionen erhalten wurden, wurden pola-

re Substanzen mit einem Gemisch von Hexan und Diethylether (1:1) eluiert. Die auf der Säule zurückgebliebenen Substanzen wurden mit einer Lösung von 2 % Ethanol in Diethylether eluiert.

Gleichartige Fraktionen konnten leicht an der stark unterschiedlichen Retentionszeit und teilweise auch an der Farbe erkannt werden. Diese wurden vereinigt und das Lösungsmittel entfernt. Die Rückstände wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

6.6.1.2 Extraktion von Zeaxanthin und Physalien aus **Lycium barbarum** *(Gemeiner Bocksdorn)*

Etwa 1,5 g getrocknete Beeren wurden in einer Reibschale in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit dem Pistill fein verrieben. Das Pulver wurde mehrfach mit insgesamt 30 ml eines Gemisches aus Methanol, Essigsäureethylester und Hexan (1:1:1) extrahiert. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und zur Abtrennung von Beerenrückständen 5 min bei 3200 *g* zentrifugiert. Die Lösung wurde zur Trockne eingedampft. Der Rückstand besteht hauptsächlich aus Physalien. Der Palmitinsäureester kann mit Kalilauge zu Zeaxanthin umgesetzt werden (6.6.1.3).

6.6.1.3 Verseifung von Physalien

Der bei der Extraktion (6.6.1.2) erhaltene Extrakt wurde in 5 ml Dietylether gelöst und mit 15 ml ethanolischer Kalilauge (β = 30 %) versetzt und über Nacht bei Zimmertemperatur gerührt. Am nächsten Tag wurde die Lösung mit 10 ml Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde abdestilliert.

6.6.2 Extraktion von Carotinoiden aus bakteriellen Zellen für analytische Zwecke

Aus bakteriellen Zellen wurden Carotinoide mit Aceton extrahiert. Für den Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden kamen auch andere Lösungsmittel zum Einsatz.

Hierzu wurden je nach optischer Dichte 1 bis 2 ml der Kultur bei 20000 *g* pelletiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Pellet mit 20 µl einer Lösung von trans-Apo-8'-β-carotinal (w = 0,25 g/l, entspricht 5 µg Apo-8'-carotinal) als internem Standard vermischt.

Danach wurde dreimal mit dem Volumen des Pellets mindestens aber 500 µl mit Aceton durch kräftiges Mischen auf dem Vortex-Mixer extrahiert. Der erhaltene Extrakt wurde im Vakuumkonzentrator (Einstellung: 40 °C, „Low Boiling Point") zur Trockne eingedampft und danach in einer Mischung von Methanol und *tert*-Butylmethylether (1:1) unter Zusatz von 0,1 % Butylhydroxytoluol (BHT), welches der Stabilisierung dient, wieder aufgenommen. Zur besseren Lösung des Rückstandes wurden die Gefäße in ein Ultraschallbad bis zur voll-

ständigen Lösung eingestellt. Die Lösung wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

6.6.3 Extraktion von Carotinoiden aus bakteriellen Zellen zur präparativen Zwecken

Zur Extraktion einer größeren Menge Zellen wurden diese in einen entsprechend dimensionierten Erlenmeyerkolben überführt und dort mit mindestens dem doppelten Volumen Aceton versetzt. Die Suspension wurde mit einem Magnetrührer 10 min kräftig gerührt. Anschließend wurde der Überstand abdekantiert und die Zellen erneut mit Aceton versetzt. Dies wurde bis zur vollständigen Farblosigkeit des Pellets, bei Phytoen Substanzen fünfmal, wiederholt.

Da bei der Extraktion, neben anderen Zellbestandteilen, auch eine große Menge Fettsäuren extrahiert werden, wurden diese durch Verseifen mit Natronlauge entfernt. Hierzu wurde der erhaltene Rohextrakt am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft und der Rückstand in etwa 25 ml eines geeigneten nicht-wassermischbaren Lösungsmittels aufgenommen. Für polare Substanzen wie Zeaxanthin wurde Dichlormethan, Diethylether oder *tert*-Butylmethylether verwendet. Für unpolare Substanzen wie Phytoen, Lycopin oder β-Carotin wurde *n*-Hexan verwendet.

Der organische Phase wurden sooft mit dem gleichen Volumen Natronlauge (β = 30 %) versetzt, bis kein Seife mehr ausfiel. Die entstandene Seife wurde durch einminütige Zentrifugation bei 3800 *g* pelletiert und verworfen. Die organische Phase wurde mit Wasser gewaschen bis das Waschwasser nicht mehr alkalisch reagierte, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingedampft. Bei Xanthophyllen wurde der Rückstand in einem Gemisch aus Methanol und MTBE (1:1) aufgenommen, bei Carotinen in *n*-Hexan. Die Lösung wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

6.6.4 Extraktion und Verseifung von Geranylgeraniolpyrophosphat

Zur Extraktion und Verseifung von Geranylgeraniolpyrophosphat wurde ein Zellpellet mit dem dreifachen Volumen methanolischer Kalilauge (c = 1,5 M) vermischt und das Gemisch 2 h bei 70 °C im verschlossenen Vial temperiert. Anschließend wurde mit dem gleichen Volumen Hexan drei Mal extrahiert, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel entfernt.

6.7 Bestimmung der Carotinoidkonzentration über die Extinktion

Die Konzentration der Carotinoide wurde über die Extinktion bei ihrem jeweiligen Hauptmaximum bestimmt. Hierzu wurde eine Lösung bzw. Verdünnung im jeweiligen Lösungsmittel hergestellt (Tabelle 6.11). Die Messungen wurden in Quarzglasküvetten mit einer Länge von 1 cm vorgenommen. Als Kompensationsflüssigkeit wurde das entsprechende Lösungsmittel

verwendet. Die Extinktionskoeffizienten wurden der Literatur[150] entnommen. ε für Lycopin wurde nach Formel 4[72] berechnet

Tabelle 6.11 Lösungsmittel, Wellenlänge des Hauptmaximums und Werte der Extinktionskoeffizienten der Carotinoide

Substanz	Lösungsmittel	Wellenlänge [nm]	$E_{1\,cm}^{1\%}$	ε
Astaxanthin	Ethanol	472	2135	124000
Canthaxanthin	*n*-Hexan	466	220	124000
β-Apo-8'-carotinal	*n*-Hexan	457	2640	109800
β-Carotin	*n*-Hexan	453	2592	139000
β-Cryptoxanthin	*n*-Hexan	452	2386	132000
Lutein	Ethanol	445	2550	145000
Lycopin	*n*-Hexan	472	3450	185213
Phytoen	*n*-Hexan	285	1250	68100
Zeaxanthin	*n*-Hexan	452	2348	133400
Carotinoidgemische	*n*-Hexan	450	2500	

$$E_{1\,cm}^{1\%} = \frac{10 \cdot \varepsilon}{M}$$ Formel 4

6.8 Dünnschichtchromatographie

6.8.1 Methodenentwicklung

Zur Entwicklung einer dünnschichtchromatographischen Methode wurde in einem mehrstufigen Verfahren vorgegangen.[101] In Stufe I wurden zunächst die Referenzsubstanzen mit reinen Laufmitteln auf Aluminiumfolien welche mit Aluminiumoxid, Kieselgel bzw. modifiziertem Kieselgel (RP-18) beschichtet waren, chromatographiert. Als Laufmittel wurden Toluol, Methyl-*tert*-butylester, Methylenchlorid, *iso*-Propanol, Essigsäureethylester, Diethylether, Aceton, Ethanol und Methanol verwendet. Anschließend wurden die R_f-Werte der Substanzen bestimmt. Nach der überwiegenden Anzahl der R_f-Werte wurden die Laufmittel in drei Gruppen eingeteilt: Gruppe A ($R_f < 0{,}3$), Gruppe B ($0{,}3 < R_f < 0{,}8$) und Gruppe C ($R_f > 0{,}8$). Laufmittel der Gruppe B wurden direkt in Stufe III übernommen, Laufmittel der Gruppen A und C in Stufe II.

In Stufe II gibt es mehrere Möglichkeiten zur Optimierung: Entweder konnten Gemische aus Laufmitteln der Gruppe A und C hergestellt oder die Elutionskraft von Laufmitteln der Gruppen A und C verändert werden. Zur Erhöhung der Elutionskraft von Laufmitteln der Gruppe A können Essig- oder Ameisensäure oder Ammoniakwasser oder Diethylamin und zur Erniedrigung der Elutionskraft von Laufmitteln der Gruppe C kann Hexan zugesetzt werden. Hierbei wurden verschiedene Verhältnisse geprüft.

In Stufe III werden ebenfalls Mischungen auf den Stufen I und II verwendet Auch hier wurden verschiedene Verhältnisse geprüft werden.
In Stufe IV kann abschließend durch Zusatz von bis zu 1 % Wasser oder Säuren oder Basen in kleinen Mengen das Schmieren von Substanzen auf der Platte verhindert werden.

6.8.2 Qualitative Dünnschichtchromatographie

Zur Trennung von Carotinoiden wurden Kieselgel 60-Platten verwendet. Als mobile Phase diente ein Gemisch aus gleichen Teilen *tert*-Butylmethylether, Toluol und Hexan. Das Gemisch wurde nach obigem Verfahren erhalten. Die Kammer wurde 20 min mit Lösungsmitteldampf gesättigt.

6.8.3 Quantitative Dünnschichtchromatographie

Zur Quantifizierung mittels DC wurden 20 µl Probelösung mit einer kalibrierten Kapillare aufgetragen und chromatographiert. Der Probe wurden 20 µg Apocarotinal als internem Standard zugefügt. Nach dem Lauf wurde die Platte fotografiert und das Volumen der Punkte mit dem Programm ImageJ bestimmt. Aus dem Volumen des Substanzflecks und des internen Standards wurde ein Koeffizient für die jeweilige Substanz gebildet und dieser für die Quantifizierung verwendet.

6.8.4 Reproduzierbarkeit

Zur Prüfung der Reproduzierbarkeit wurden drei DC-Läufe durchgeführt und die R_f-Werte bestimmt. Daraus wurden der mittlere R_f-Wert und die relative Standardabweichung berechnet.

6.8.5 Berechnung der Auflösung

Die Auflösung zweier Flecke bei der Dünnschichtchromatographie wurde nach Formel 5 berechnet.

$$R_S = \frac{d}{0{,}5w_1 + 0{,}5w_2} \qquad \text{Formel 5}$$

mit

R_S: Auflösung

d: Abstand der Mittelpunkte der beiden Flecken

w_1, w_2: Durchmesser der einzelnen Flecken

6.9 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

6.9.1 Vergleich verschiedener hochleistungsflüssigkeitschromatographischer Trennmethoden für Carotinoide

Da in der Literatur eine sehr große Anzahl von Methoden zur Trennung von Carotinoiden mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie beschrieben wird, wurden für diese Arbeit zunächst drei bekannte Methoden auf ihre Eignung geprüft.

6.9.1.1 Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie nach Breithaupt

Breithaupt entwickelte eine Methode für eine große Zahl von Carotinoiden.[75] Er verwendete eine RP-30 Säule von YMC (4,6 x 250 mm). Als mobile Phasen diente eine Mischung aus Methanol, Wasser und Triethylamin (90:10:0,1; Laufmittel A) und Methyl-tert-butylether, Methanol, Wasser und Triethylamin (90:6:4:0,1; Laufmittel B). Für Messungen mit Massenspektrometriekopplung wurde kein Triethylamin verwendet. Die Detektion erfolgte bei 450 nm Tabelle 6.12 gibt den veröffentlichten Gradienten an.

Tabelle 6.12 Gradient von Breithaupt[75]

Zeit in min	Anteil A in %
0	93,5
34	0
38	93,5
43	93,5

6.9.1.2 Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie nach Steel und Keller

Die Methode wurde Steel und Keller zur Trennung von Lutein, β-Carotin und β-Apo-8'-carotinal entwickelt.[80] Die Trennung erfolgte mit einer Nucleosil RP-18 (4 x 250 mm). Als Laufmittel diente ein Gradient von Aceton (Laufmittel A) und Wasser (Laufmittel B). Der Gradient war 0 min: 70 % A, 20 min: 70 % A, 21 min: 100 % A, 30 min: 100 % A, 31 min: 70 % A, 35 min 70 % A. Die Detektion erfolgte bei 450 nm.

6.9.1.3 Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit einer Standardmethode

Die Trennung erfolgte mit einer Nucleosil RP-18 (4 x 250 mm) und alternativ mit einer Chromolith RP-18 (3 x 100 mm). Als Laufmittel diente ein Gradient von Acetonitril (Laufmittel A) und Wasser (Laufmittel B). Der Gradient war für die längere Säule 0 min: 90 % A, 30 min: 10 % A, 33 min: 90 % A, 37 min: 90 % A, für die kürzere Säule wurden identische Verhältnisse gewählt, jedoch fanden die Wechsel nach 20, 22 und 25 min statt. Die Detektion erfolgte bei 450 nm.

6.9.2 Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie von Carotinoiden

Während der Untersuchungen von 6.9.1.1 zeigte sich, dass Laufmittel B nicht im angebenen Verhältnis herstellbar war, da sich eine zweite wässrige Phase ausbildete. Das Wasser wurde daher nicht eingesetzt und der Anteil des Methanols auf 10 % erhöht.

Ferner wurde der Gradient verändert um eine verbesserte Trennung von Apo-8'-carotinal und einer unbekannten Substanz zu erreichen.

Für die Arbeiten wurden daher folgende Bedingungen gewählt: Als Laufmittel A diente eine Gemisch von Methanol und Wasser im Verhältnis 90:10 und als Laufmittel B ein Gemisch aus MTBE und Methanol im Verhältnis 90:10. Die Detektion erfolgte bei 450 nm mit Referenzwellenlänge von 600 nm. Der Gradient ist in

Tabelle 6.13 angegeben. Bei der Kopplung mit der Massenspektrometrie (MS) wurde ein Fluss von 0,5 ml/min statt 1 ml/min verwendet.

Tabelle 6.13 In der Arbeit verwendeter Gradient

Zeit in min (MS-Kopplung)	Zeit in min (UV/Vis-Detektion)	Anteil A in %
0	0	93,5
60	38	0
65	42	93,5
70	47	93,5

Am Massenspektrometer wurde im Modus „*Scan*" bei einer *Event Time* von 0,15 s betrieben. Die Detektorspannung betrug 1,5 kV, die Interfacespannung 3,5 kV und die CDL-Spannung - 43 V. Die CDL-Temperatur wurde auf 230 °C und die Temperatur des Heizblocks auf 200 °C eingestellt. Es wurde ein *m/z*-Bereich von 350 bis 1000 erfasst.

6.9.3 Präparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie zur Aufreinigung von Carotinoiden

Um Zeaxanthin und andere Carotinoide präparativ an der HPLC aufzureinigen wurden Bedingungen wie unter 6.9.2 verwendet. Die Säule wurde auf 35 °C temperiert. Es wurden pro Lauf 100 µl Lösung injiziert.

Die Fraktionen wurden mit Hilfe eines Fraktionensammlers gesammelt. Hierzu wurde ein Peak-basierter Sammelmodus gewählt. Die Sammlung von Carotinoiden begann 2 min vor der Retentionszeit des gewünschten Carotinoids und endete 2 min später. Es wurden nur Peaks gesammelt, deren Höhe mindestens 50 mAU betrug. Die maximale Peakdauer wurde auf 1,5 min eingestellt.

Als Gradient für die Aufreinigung von Zeaxanthin wurde je nach Art weiterer Carotinoide eines der in Tabelle 6.14 angegebenen Programme gewählt.

Tabelle 6.14 Programme zur Aufreinigung von Carotinoiden (links) und Zeaxanthin (rechts)

Zeit	Anteil B
0 min	20 %
25 min	45 %
30 min	100 %
32 min	20 %
37 min	20 %

Zeit	Anteil B
0 min	30 %
15 min	80 %
17 min	100 %
19 min	30 %
23 min	30 %

Die erhaltenen Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

6.9.4 Präparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie zur Aufreinigung von Phytoen

Zur präparativen Chromatographie von Phytoen wurde wie in 6.9.2 vorgegangen. Es wurde jedoch der in Tabelle 6.15 angegebene Gradient verwendet. Die Detektion des Chromatogramms wurde bei 285 nm vorgenommen. Gleiche Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Tabelle 6.15 Gradient für die Elution von Phytoen

Zeit [min]	Anteil A [%]	Anteil B [%]
0	93,5	6,5
20	38,5	61,5
24	38,0	62,0
25	0,0	100,0
29	93,5	6,5
33	93,5	6,5

6.9.5 Bestimmung der Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze

Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen wurden teilweise mit Hilfe der Software DINtest Online (http://www.analytiksoft.de/download/dintestonline.htm) vom Institut für Rechts- und Verkehrsmedizin am Universitätsklinikum Heidelberg bestimmt.[99] Für die Nachweisgrenze, die Bestimmungsgrenze, die Verfahrensstandardabweichung und die Summe der Abweichungsquadrate wurden die Formel 6 bis Formel 9 verwendet.[102]

Die Nachweisgrenze berechnete sich nach Formel 6.

$$x_{NG} = s_{x0} \cdot t_{f;\alpha} \cdot \sqrt{\frac{1}{n_x} + \frac{1}{m} + \frac{\bar{x}^2}{Q_x}} \qquad \text{Formel 6}$$

mit

x_{NG}: Nachweisgrenze

s_{x0}: Verfahrensstandardabweichung bei Homogenität der Varianzen

$t_{f;\alpha}$: Quantil der t-Verteilung bei einseitiger Fragestellung für den Fehler 1. Art

n_x: Anzahl der Kalibrierproben

m: Anzahl der Kalibriermessungen

$\bar{x}$: Mittelwert der Gehalte aller Kalibrierproben

Q_x: Summe der Abweichungsquadrate von x bei der Kalibrierung

Die Bestimmungsgrenze berechnet sich nach Formel 7.

$$x_{BG} = k \cdot s_{x0} \cdot t_{f;\alpha} \cdot \sqrt{\frac{1}{n_x} + \frac{1}{m} + \frac{(k \cdot x_{NG} - \bar{x})^2}{Q_x}} \qquad \text{Formel 7}$$

mit

x_{BG}: Bestimmungsgrenze

k: Ergebnisunsicherheit

Die Verfahrensstandardabweichung kann ebenfalls berechnet werden (Formel 8).

$$s_{x0} \approx \frac{s_y}{b} \qquad \text{Formel 8}$$

mit:

s_y: Streuung

b: Steigung der Kalibriergerade

Ebenfalls berechnet wurde sie Summe der Abweichungsquadrate von x (Formel 9).

$$Q_x = \sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2 \qquad \text{Formel 9}$$

Steigung, Achsenabschnitt und Bestimmtheitsmaß der Kalibriergerade wurden vom Tabellenkalkulationsprogramm berechnet.

6.9.6 Bestimmung der Wiederfindungsrate

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde die Extraktion wie in Abschnitt 6.6.2 beschrieben durchgeführt und der Gehalt chromatographisch über die Fläche bestimmt. Anschließend wurden die Proben aufgeteilt, mit drei verschiedenen Mengen des entsprechenden Carotinoids aufgestockt und erneut analysiert. Die Bestimmungen wurden in Dreifachbestimmungen durchgeführt. Anschließend wurde die gefundene Menge gegen die aufgestockte Menge aufgetragen. Die Steigung der Geraden durch die Punkte ergab die Wiederfindungsrate. Die Bestimmungen wurden für Apocarotinal, Lycopin und Zeaxanthin vorgenommen.

6.10 Präparative Säulenchromatographie

Der verseifte Zellextrakt wurde am Rotationsverdampfer aufkonzentriert und das Konzentrat auf eine Säule angemessener Dimension aufgetragen. Als Säulenmaterial wurde Kieselgel verwendet.

Zur Auftrennung der Carotinoide wurde ein Laufmittelgemisch aus Hexan und Aceton im Verhältnis 60:40 auf einer Kieselgelsäule verwendet. Die Chromatographie erfolgte in Reagenzgläser. Es wurden Fraktionen von jeweils ca. 3 ml gesammelt.

Die erhaltenen Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch analysiert und Fraktionen mit gleicher Zusammensetzung vereinigt. Das Lösungsmittel vereinigter Fraktionen wurde am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde bei -20 °C bis zur weiteren Untersuchung gelagert.

6.11 Gaschromatographie

Zur Messung von Geranylgeraniol wurde 1 µl Reinsubstanz in 100 µl *n*-Hexan gelöst und die Lösung in ein Gaschromatographieröhrchen überführt. Die Lösung wurde direkt zur Messung verwendet. Verseifungsrückstande wurden in *n*-Hexan gelöst und auch direkt zur Messung verwendet.

- Injektor-Temperatur 250 °C,
- Startemperatur: 80 °C (2 min isotherm),
- Aufheizen: 10 °C/min auf 280 °C, 20 °C/min auf 320 °C
- bei 320 °C: 1 min isotherm.

Als Säule wurde eine Polydimethylsiloxan-Säule mit 5 % Phenylanteil (30m, ID 0,25 mm, AD 0,35 mm, Filmdicke 0,25 µm) verwendet (Supreme 5).

Das Massenspektrometer arbeitete mit Elektronenstoß-Ionisation (EI), die Ionenquelle war auf 200 °C beheizt.

6.12 Bestimmung der absoluten Konfiguration von Zeaxanthin unter Ausnutzung des Circulardichronismus'

Zur Bestimmung der absoluten Konfiguration wurde eine Lösung des jeweiligen verseiften Derivats mit Hilfe der Circulardichronismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) untersucht. Die Messung erfolgte in einem Gemisch aus gleichen Teilen Diethylether, Isopentan und Ethanol in Quarzglasküvetten mit einer Schichtdicke von 1 mm. Die Messungen wurden an einem Spektropolarimeter Jasco J-715 am Institut für Mikrobiologie, Universität Hohenheim, durchgeführt. Spektren wurden in einem Bereich von 200 bis 400 nm bei einer Meßgeschwindigkeit von 20 nm/min, einer Bandbreite von 2,0 nm, einer *Response* von 4 s und einem *Data Pitch* von 1 nm aufgenommen. Als Kompensationsflüssigkeit diente das Lösungsmittel.

Als Rohdaten erhielt man die Elliptizität Θ. Diese kann nach Formel 10 in die Absorptionsdifferenz ΔA umgerechnet werden.

$$\Delta A = \frac{\Theta}{32980} \qquad \text{Formel 10}$$

mit

ΔA: Absorptionsdifferenz

Θ: Elliptizität in Milligrad

Die Angaben erfolgt als Differenz der molaren dekadischen Absorptionskoeffizienten $\Delta\varepsilon$ (Formel 11).

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R = \frac{\Delta A}{c \cdot l} \qquad \text{Formel 11}$$

mit

$\Delta\varepsilon$: Differenz der molaren dekadischen Absorptionskoeffizienten

ε_L: molarer dekadischer Absorptionskoeffizient links

ε_R: molarer dekadischer Absorptionskoeffizient rechts

c: Konzentration in mol/l

l: Länge der Küvette in cm (hier 0,1 cm)

6.13 Chemische Methoden

6.13.1 *E/Z*-Isomerisierung von Carotinoiden mit elementarem Iod

10 mg des Carotenoids wurden in 80 ml eines geeigneten Lösungsmittels (Hexan für Lycopin und β-Carotin, Diethylether für Zeaxanthin) gelöst und mit 0,2 mg (2 %) Iod versetzt und mindestens eine Stunde bei Zimmertemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung in

einen Scheidetrichter überführt und zwei Mal mit jeweils einem Volumenteil Natriumthiosulfatlösung (c = 1 mol/l) versetzt und bis zum Verschwinden der violetten Farbe geschüttelt. Anschließend wurde drei Mal mit je einem Volumenteil deionisiertem Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde danach über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

6.13.2 *E/Z*-Isomerisierung von Carotinoiden mit konzentrierter Salzsäure

Wie unter 6.13.1 beschrieben, wurde eine Carotenoidlösung hergestellt. Die Lösung wurde mit 40 ml konzentrierter Salzsäure versetzt und mindestens eine Stunde kräftig gerührt. Danach wurde die organische Phase abgetrennt und im Scheidetrichter mehrfach mit Wasser bis zur neutralen Reaktion der Waschflüssigkeit gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

6.13.3 Bestimmung der Alginatkonzentration in der Fermentationsbrühe

Zur Bestimmung der Alginatkonzentration in Medium wurde eine angepasste Vorschrift des Schweizerischen Lebensmittelbuches verwendet.[112] Hierzu wurde 1 ml Medium entnommen und die Zellen durch Zentrifugieren (20000 *g*, 2 min) abgetrennt. 200 µl des Überstands wurden in ein Reagenzglas überführt und dort unter Eiskühlung zunächst mit 500 µl deionisiertem Wasser versetzt. Zur kalten Lösung wurden 3,6 ml einer Lösung von 4,76 g Borax in 1 l konzentrierter Schwefelsäure zugefügt und auf dem Vortex-Mixer gründlich gemischt. Das Reagenzglas wurde mit einer Glaskugel abgedeckt. Durch fünfminütiges Erhitzen des Reagenzglases im siedenden Wasserbad wurde hydrolysiert. Anschließend wurde das Reagenzglas 15 min im Eisbad gekühlt und 100 µl einer Lösung von 150 mg *m*-Phenylphenol in 1 l Natronlauge (β = 0,5 %) zugegeben. Die Lösung wurde erneut auf dem Vortex-Mixer gemischt und 20 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 520 nm gemessen. Für die Kompensationsflüssigkeit des Photometers und den Blindwert wurden anstelle von Überstand 200 µl Wasser verwendet und für die Kompensationsflüssigkeit Natronlauge gleicher Konzentration ohne *m*-Phenylphenol zugesetzt; beim Blindwert dagegen wurde das obige Reagenz verwendet. Die Extinktion wurde bestimmt und die Extinktion der Blindwertprobe abgezogen. Die erhaltene effektive Extinktion mit einer Kalibriergerade verglichen.

Zur Erstellung der Kalibriergerade wurde eine Lösung von 219 mg Galacturonsäure Monohydrat in 1 l Wasser hergestellt. 1 ml dieser entsprechen 200 mg Anhydrogalacturonsäure. Es wurden Verdünnungen hergestellt, die 10, 20, 30, 50, 70, 100 und 200 mg/ml Anhydrogalac-

turonsäure entsprachen und wie oben behandelt. Die erhaltene effektive Extinktion wurde gegen die enthaltene Menge Anhydrogalacturonsäure aufgetragen.

6.14 Lösungen und Medien

Soweit nicht anders angegeben gilt Folgendes: Medien wurden durch autoklavieren sterilisiert. Alle Lösungen wurden bei Zimmertemperatur gelagert. Alle Lösungen wurden mit doppelt-deionisiertem Wasser angesetzt.

6.14.1 Agar-Platten mit Kanamycin

Bacto-Trypton	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
Natriumchlorid	5 g
Agar-Agar	15 g
Wasser	ad 1000 ml

Vor dem Gießen der Platten wurde dem 55 °C warmen Medium 1 ml Kanamycin-Lösung (Endkonzentration im Medium 30 µg/ml) zugefügt.

6.14.2 Ansatz für die reverse Transkription mit Fluoreszenzmarkierung

PCR-Mischung

5x RT Reaktionspuffer (Superscript III Kit, Invitrogen)	4 µl
dNTP-Mischung	2 µl
Cy3-dCTP or Cy5-dCTP (1 mM)	2 µl
0.1 M DTT (Superscript III Kit, Invitrogen)	2 µl
RNase-Inhibitor (ca. 60 U/µl)	1 µl
Superscript III (200 U, Invitrogen)	1 µl

dNTP-Mischung

dATP (100 mM)	5 µl
dGTP (100 mM)	5 µl
dTTP (100 mM)	5 µl
dCTP (100 mM)	2 µl
RNase-freies Wasser	83 µl

6.14.3 Hybridisierungspuffer

Dextransulfat	500 mg
SSC-Puffer (20 x)	1,5 ml
Natriumdodecylsulfat-Lösung (10 %)	1 ml
Denharts Lösung	1 ml
Formamid	5 ml
doppelt-deionisiertes Wasser	ad 10 ml

6.14.4 Kanamycin-Lösung (30 mg/ml)

Kanamycin Monosulfat	30 mg
Wasser	1 ml

Die Lösung wurde sterilfiltiert (0,2 µm) und bei -20 °C gelagert.

6.14.5 Ladepuffer für die Agarosegelelektrophorese

Harnstoff	12,01 g
Ethylendiamintetraacetat Dinatriumsalz	0,21 g
Glycerin	25 ml
Bromphenolblau	50 mg
deionisiertes Wasser	ad 50 ml

6.14.6 LB-Medium

Bacto-Trypton	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
Natriumchlorid	5 g
Wasser	ad 1000 ml

6.14.7 MEK-Medium

Phosphatpuffer

Kaliumdihydrogenphosphat	20 g
Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	70 g
doppelt-deionisiertes Wasser	ad 1000 ml

Der pH-Wert wurde auf 7,1 eingestellt.

Mineralsalzlösung

Ammoniumsulfat	100 g
Magnesiumsulfat Heptahydrat	20 g
Ammoniumeisen(III)-citrat	1 g
Spurenelementlösung	100 ml
doppelt-deionisiertes Wasser	ad 1000 ml

Spurenelementlösung

Zink(II)-sulfat Heptahydrat	100 mg
Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat	30 mg
Borsäure	300 mg
Cobalt(II)-chlorid Hexahydrat	200 mg
Kupfer(II)-chlorid Dihydrat	10 mg
Nickel(II)-chlorid Hexahydrat	20 mg
Natriummolybdat Dihydrat	30 mg
doppelt-deionisiertes Wasser	1000 ml

Calciumnitratlösung

Calciumnitrat Heptahydrat	50 g
doppelt-deionisiertes Wasser	1000 ml

Die Lösungen wurden getrennt autoklaviert. Für das Medium wurden 50 ml des Phosphatpuffers, 10 ml der Mineralsalzlösung, 1 ml der Calciumnitratlösung und 10 ml Glucoselösung (β = 20 %) auf 1 l mit doppelt-deionisiertem Wasser aufgefüllt. Wurde eine andere Kohlenstoffquelle verwendet, wurde dieses in einer äquivalenten Stoffmenge eingesetzt.

6.14.8 Rhamnose-Lösung

L-Rhamnose	20 g
Wasser	ad 100 ml

Die Lösung wurde sterilfiltriert (0,2 µm).

6.14.9 SSC-Puffer (20 x)

Natriumchlorid	175,3 g
Natriumcitrat Dihydrat	88,2 g

Die Substanzen wurden in 800 ml Wasser gelöst und der pH-Wert mit Natronlauge (c = 10 M) auf 7,0 eingestellt. Anschließend wurde auf 1 l mit Wasser aufgefüllt und die Lösung autoklaviert.

6.14.10SSPE-Puffer (20 x)

Natriumchlorid	175,3 g
Natriumhydrogenphosphat Monohydrat	27,6 g
Ethylendiamintetraacetat Dinatriumsalz	7,4 g

Die Substanzen wurden in 800 ml Wasser gelöst und der pH-Wert mit Natronlauge (c = 10 M) auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurde auf 1 l mit Wasser aufgefüllt und die Lösung autoklaviert.

6.14.11TAE-Puffer (50 x)

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	242 g
Essigsäure, konzentriert	57,1 ml
Ethylendiamintetracetat-Lösung (0,5 M, pH 8,0)	100 ml
destilliertes Wasser	ad 1000 ml

6.14.12TB-Medium

<u>Lösung I</u>

Bacto-Trypton	12 g
Hefe-Extrakt	24 g
Glycerin, wasserfrei	4 ml
Wasser	ad 900 ml

<u>Lösung II</u>

Kaliumdihydrogenphosphat	2,31 g
Kaliumhydrogenphosphat	12,54 g
doppelt-deionisiertes Wasser	ad 100 ml

Beide Lösungen wurden nach dem Autoklavieren vereinigt.

6.14.13TE-Puffer

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	1,21 g
Ethylendiamintetraacetat Dinatriumsalz	0,34 g
doppelt-deionisiertes Wasser	ad 1000 ml

6.14.14Waschpuffer für DNS-Microarrays

Waschpuffer 1 (0,5 x SSPE, 0,1 % Tween 20)

20x SSPE	7,5 ml
Tween 20 (10 % in Wasser)	3 ml
doppelt-demineralisiertes Wasser	ad 300 ml

Waschpuffer 2 (0,5 x SSPE)

20 x SSPE 7,5 ml	7,5 ml
doppelt-demineralisiertes Wasser	ad 300 ml

Waschpuffer 3 (0,1 x SSPE)

20 x SSPE	1,5 ml
doppelt-demineralisiertes Wasser	ad 300 ml

7 Literaturverzeichnis

[1] K. E. Nelson, C. Weinel, I. T. Paulsen, R. J. Dodson, H. Hilbert, V. A. Martins dos Santos, D. E. Fouts, S. R. Gill, M. Pop, M. Holmes, L. Brinkac, M. Beanan, R. T. DeBoy, S. Daugherty, J. Kolonay, R. Madupu, W. Nelson, O. White, J. Peterson, H. Khouri, I. Hance, P. Chris Lee, E. Holtzapple, D. Scanlan, K. Tran, A. Moazzez, T. Utterback, M. Rizzo, K. Lee, D. Kosack, D. Moestl, H. Wedler, J. Lauber, D. Stjepandic, J. Hoheisel, M. Straetz, S. Heim, C. Kiewitz, J. A. Eisen, K. N. Timmis, A. Dusterhoft, B. Tummler, C. M. Fraser, *Environ Microbiol* **2002**, *4*, 799.

[2] N. Entner, M. Doudoroff, *Journal of Biological Chemistry* **1952**, *196*, 853.

[3] M. Vicente, J. L. Canovas, *Journal of Bacteriology* **1973**, *116*, 908.

[4] K. N. Timmis, *Environmental Microbiology* **2002**, *4*, 779.

[5] H. Zhang, Y. Wang, B. A. Pfeifer, *Molecular Pharmaceutics* **2008**, *5*, 212.

[6] P. A. Williams, K. Murray, *Journal of Bacteriology* **1974**, *120*, 416.

[7] N. W. Dunn, I. C. Gunsalus, *Journal of Bacteriology* **1973**, *114*, 974.

[8] J. G. Rheinwald, A. M. Chakrabarty, I. C. Gunsalus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1973**, *70*, 885.

[9] M. Bagdasarian, R. Lurz, B. Rückert, F. C. Franklin, M. M. Bagdasarian, J. Frey, K. N. Timmis, *Gene* **1981**, *16*, 237.

[10] A. Copeland, S. Lucas, A. Lapidus, K. Barry, J. C. Detter, T. Glavina del Rio, N. Hammon, S. Israni, E. Dalin, H. Tice, S. Pitluck, P. Chain, S. Malfatti, M. Shin, L. Vergez, J. Schmutz, F. Larimer, M. Land, L. Hauser, N. Kyrpides, A. Lykidis, R. Parales, P. Richardson, United States Department of Energy Joint Genome Institute, **2007**.

[11] A. Copeland, S. Lucas, A. Lapidus, K. Barry, J. C. Detter, T. Glavina del Rio, E. Dalin, H. Tice, S. Pitluck, P. Chain, S. Malfatti, M. Shin, L. Vergez, J. Schmutz, F. Larimer, M. Land, L. Hauser, N. Kyrpides, E. Kim, S. Taghavi, D. Vangronsveld, D. van der Lelie, P. Richardson, United States Department of Energy Joint Genome Institute, **2008**.

[12] A. Copeland, S. Lucas, A. Lapidus, K. Barry, T. Glavina del Rio, E. Dalin, H. Tice, S. Pitluck, D. Bruce, L. Goodwin, O. Chertkov, T. Brettin, J. C. Detter, C. Han, C. R. Kuske, J. Schmutz, F. Larimer, M. Land, L. Hauser, N. Kyrpides, E. Kim, J. K. McCarthy, P. Richardson, United States Department of Energy Joint Genome Institute, **2008**.

[13] S. Marques, J. L. Ramos, *Molecular Microbiology* **1993**, *9*, 923.

[14] Y. Li, J. Li, C. Wang, P. Wang, *Bioresource Technology* **2010**.

[15] D. Janke, W. Fritsche, *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie* **1979**, *19*, 139.

[16] H. von Canstein, Y. Li, K. N. Timmis, W. D. Deckwer, I. Wagner-Dobler, *Appl Environ Microbiol* **1999**, *65*, 5279.

[17] L. E. Hüsken, M. C. F. Dalm, J. Tramper, J. Wery, J. A. M. de Bont, R. Beeftink, *Journal of Biotechnology* **2001**, *88*, 11.

[18] G. P. Prpich, A. J. Daugulis, *Biotechnology and Bioengineering* **2007**, *98*, 1008.

[19] G. P. Prpich, A. J. Daugulis, *Biotechnology and Bioengineering* **2007**, *97*, 536.

[20] S. C. Wenzel, F. Gross, Y. M. Zhang, J. Fu, A. F. Stewart, R. Muller, *Chemistry & Biology* **2005**, *12*, 349.

[21] F. Gross, M. W. Ring, O. Perlova, J. Fu, S. Schneider, K. Gerth, S. Kuhlmann, A. F. Stewart, Y. M. Zhang, R. Muller, *Chemistry & Biology* **2006**, *13*, 1253.

[22] N. J. P. Wierckx, H. Ballerstedt, J. A. M. de Bont, J. Wery, *Applied and Environmental Microbiology* **2005**, *71*, 8221.

[23] S. Verhoef, H. J. Ruijssenaars, J. A. M. de Bont, J. Wery, *Journal of Biotechnology* **2007**, *132*, 49.
[24] S. Verhoef, N. Wierckx, R. G. M. Westerhof, J. H. de Winde, H. J. Ruijssenaars, *Applied and Environmental Microbiology* **2009**, *75*, 931.
[25] E. Breitmaier, *Terpene*, 2. ed., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2005**.
[26] L. Ruzicka, *Experientia* **1953**, *9*, 357.
[27] L. Ruzicka, *Pure and Applied Chemistry* **1963**, *6*, 493.
[28] A. B. Barua, J. A. Olson, H. C. Furr, R. B. Van Breemen, in *Modern Chromatographic Analysis of Vitamins* (Eds.: A. P. De Leenheer, W. E. Lambert, J. F. Van Bocxlaer), Marcel Dekker, New York, **2000**.
[29] G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, in *Carotenoids 1A: Isolation and Analysis, Vol. 1A*, 1st ed. (Eds.: G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander), Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, **1995**, pp. 13.
[30] H.-D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle, *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 6. ed., Springer-Verlag, Berlin, **2008**.
[31] G. Britton, in *Carotenoids 1B: Spectroscopy, Vol. 1B* (Eds.: G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander), Birkhäuser Verlag, Basel, **1995**, pp. 13.
[32] G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, in *Carotenoids: Isolation and Analysis, Vol. 1A*, 1st ed. (Eds.: G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander), Birkhäuser Verlag, Basel, **1995**, pp. 13.
[33] B. S. Winkler, M. E. Boulton, J. D. Gottsch, P. Sternberg, *Molecular Vision* **1999**, *5*.
[34] H. Nishino, M. Murakoshi, T. Ii, M. Takemura, M. Kuchide, M. Kanazawa, X. Y. Mou, S. Wada, M. Masuda, Y. Ohsaka, S. Yogosawa, Y. Satomi, K. Jinno, *Cancer Metastasis Rev* **2002**, *21*, 257.
[35] Z. Sun, H. Y. Yao, *Asia Pac J Clin Nutr* **2007**, *16*, 447.
[36] M. Tsushima, T. Maoka, M. Katsuyama, M. Kozuka, T. Matsuno, H. Tokuda, H. Nishino, A. Iwashima, *Biol Pharm Bull* **1995**, *18*, 227.
[37] *Zusatzstoffe zugelassen nach Richtline 70/524/EWG und Übergangsregelung Verordnung EG 1831/2003*, Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, **2007**.
[38] *Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln zu technologischen Zwecken (Zusatzstoff-Zulassungsverordnung)*, BGBl. I vom 29. Januar 1998, S. 230, **2005**.
[39] *Verzeichnis der zugelassenen Futtermittel-Zusatzstoffe, veröffentlicht gemäß Artikel 9t Buchstabe b) der Richtlinie 70/524/EWG des Rates über Zusatzstoffe in der Tierernährung*, ABl. C50/1, **2004**.
[40] *Arzneimittelfarbstoffverordnung*, BGBl. I vom 17. Oktober 2005, S. 3031, **2005**.
[41] G. Britton, in *Carotenoids 3: Biosynthesis and Metabolism, Vol. 3*, 1st ed. (Eds.: G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander), Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, **1998**, pp. 13.
[42] K. Bloch, S. Chaykin, A. H. Phillips, A. De Waard, *Journal of Biological Chemistry* **1959**, *234*, 2595.
[43] A. De Waard, A. H. Phillips, K. Bloch, *Journal of the American Chemical Society* **1959**, *81*, 2913.
[44] U. Henning, E. M. Möslein, F. Lynen, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1959**, *83*, 259.
[45] G. Britton, in *Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism, Vol. 3*, 1 ed. (Eds.: G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander), Birkhäuser Verlag, Basel, **1998**, pp. 14.
[46] M. Rohmer, M. Knani, P. Simonin, B. Sutter, H. Sahm, *Biochemical Journal* **1993**, *295*, 517.

[47] W. Knöss, *Pharmazie in unserer Zeit* **1999**, *28*, 247.
[48] P. C. Lee, C. Schmidt-Dannert, *Appl Microbiol Biotechnol* **2002**, *60*, 1.
[49] S. W. Kim, J. D. Keasling, *Biotechnol Bioeng* **2001**, *72*, 408.
[50] M. J. Kang, Y. M. Lee, S. H. Yoon, J. H. Kim, S. W. Ock, K. H. Jung, Y. C. Shin, J. D. Keasling, S. W. Kim, *Biotechnol Bioeng* **2005**, *91*, 636.
[51] J. K. Yano, F. Blasco, H. Y. Li, R. D. Schmid, A. Henne, T. L. Poulos, *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 608.
[52] F. Blasco, I. Kauffmann, R. D. Schmid, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2004**, *64*, 671.
[53] K. Momoi, U. Hofmann, R. D. Schmid, V. B. Urlacher, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2006**, *339*, 331.
[54] N. Misawa, M. Nakagawa, K. Kobayashi, S. Yamano, Y. Izawa, K. Nakamura, K. Harashima, *Journal of Bacteriology* **1990**, *172*, 6704.
[55] S. K. Choi, S. Matsuda, T. Hoshino, X. Peng, N. Misawa, *Appl Microbiol Biotechnol* **2006**, *72*, 1238.
[56] A. Das, S. H. Yoon, S. H. Lee, J. Y. Kim, D. K. Oh, S. W. Kim, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2007**, *77*, 505.
[57] G. Sandmann, M. Albrecht, G. Schnurr, O. Knorzer, P. Boger, *Trends in Biotechnology* **1999**, *17*, 233.
[58] R. V. Vadali, Y. C. Fu, G. N. Bennett, K. Y. San, *Biotechnology Progress* **2005**, *21*, 1558.
[59] H. Alper, Y. S. Jin, J. F. Moxley, G. Stephanopoulos, *Metabolic Engineering* **2005**, *7*, 155.
[60] S. H. Yoon, J. E. Kim, S. H. Lee, H. M. Park, M. S. Choi, J. Y. Kim, S. H. Lee, Y. C. Shin, J. D. Keasling, S. W. Kim, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2007**, *74*, 131.
[61] T. Nishizaki, K. Tsuge, M. Itaya, N. Doi, H. Yanagawa, *Appl Environ Microbiol* **2007**, *73*, 1355.
[62] L. Z. Yuan, P. E. Rouviere, R. A. LaRossa, W. Suh, *Metabolic Engineering* **2006**, *8*, 79.
[63] S. H. Yoon, H. M. Park, J. E. Kim, S. H. Lee, M. S. Choi, J. Y. Kim, D. K. Oh, J. D. Keasling, S. W. Kim, *Biotechnology Progress* **2007**, *23*, 599.
[64] M. Eggersdorfer, G. Adam, M. John, W. Hähnlein, L. Labler, K.-U. Baldenius, L. v. d. Bussche-Hünnefeld, E. Hilgemann, P. Hoppe, R. Stürmer, F. Weber, A. Rüttimann, G. Moine, H.-P. Hohmann, R. Kurth, J. Paust, W. Hähnlein, H. Pauling, B. J. Weimann, B. Kaesler, B. Oster, U. Fechtel, K. Kaiser, B. d. Potzolli, M. Casutt, T. Koppe, M. Schwarz, B.-J. Weimann, U. Hengartner, A. d. Saizieu, C. Wehrli, R. Blum, in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2005**.
[65] K. Meyer, *Chemie in Unserer Zeit* **2002**, *36*, 178.
[66] P. Karrer, C. H. Eugster, *Helvetica Chimica Acta* **1950**, *33*, 1172.
[67] O. Isler, H. Lindlar, M. Montavon, R. Ruegg, G. Saucy, P. Zeller, *Helvetica Chimica Acta* **1956**, *39*, 2041.
[68] Autorenkollektiv, *Analytikum: Methoden der analytischen Chemie und ihre theoretischen Grundlagen*, 8 ed., VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, **1990**.
[69] G. Schwedt, *Chromatographische Trennmethoden*, 3 ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1994**.
[70] M. S. Tswett, *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* **1906**, *24*, 316.
[71] K. Cammann, *Instrumentelle Analytische Chemie*, 1 ed., Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, **2001**.

[72] K. Hartke, E. Mutschler, *DAB 9-Kommentar: Allgemeiner Teil (Methoden und Reagenzien)*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **1987**.
[73] L. C. Sander, K. E. Sharpless, N. E. Craft, S. A. Wise, *Analytical Chemistry* **1994**, *66*, 1667.
[74] T. Rezanka, J. Olsovská, M. Sobotka, K. Sigler, *Current Analytical Chemistry* **2009**, *2009*, 1.
[75] D. E. Breithaupt, *Food Chemistry* **2004**, *86*, 449.
[76] D. E. Breithaupt, *Z Naturforsch [C]* **2000**, *55*, 971.
[77] D. E. Breithaupt, J. Schlatterer, *European Food Research and Technology* **2005**, *220*, 648.
[78] D. E. Breithaupt, W. Schwack, *European Food Research and Technology* **2000**, *211*, 52.
[79] YMC, in *YMC Katalog*.
[80] C. C. Steel, M. Keller, *Biochemical Society Transactions* **2000**, *28*, 883.
[81] F. Khachik, G. Englert, C. E. Daitch, G. R. Beecher, L. H. Tonucci, W. R. Lusby, *Journal of Chromatography-Biomedical Applications* **1992**, *582*, 153.
[82] L. Merschel, Dissertation thesis, Universität Münster (Münster), **1997**.
[83] H. Luftmann, M. Aranda, G. E. Morlock, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2007**, *21*, 3772.
[84] H. H. A. El-Baky, F. K. El Baz, G. S. El-Baroty, *Journal of Medicinal Plants Research* **2008**, *2*, 292.
[85] F. Schulte, J. Mäder, L. W. Kroh, U. Panne, J. Kneipp, *Analytical Chemistry* **2009**, *81*, 8426.
[86] W. M. Lotfi, R. A. Hassan, W. A. Tawfik, A. A. Habib, *Journal of Applied Sciences Research* **2008**, *4*, 2013.
[87] N. M. Sachindra, N. Bhaskar, N. S. Mahendrakar, *LWT - Food Science and Technology* **2005**, 221.
[88] J. Deli, *Journal of Planar Chromatography* **1998**, *11*, 311.
[89] T. Förster, *Annalen der Physik* **1947**, *437*, 55.
[90] M. G. Sajilata, R. S. Singhal, M. Y. Kamat, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2008**, *7*, 29.
[91] L. Zechmeister, P. Tuzson, *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1939**, *72*, 1340.
[92] L. Zechmeister, A. Polgar, *Journal of the American Chemical Society* **1944**, *66*, 137.
[93] K. Fröhlich, Dissertation thesis, Friedrich-Schiller-Universität Jena (Jena), **2007**.
[94] C. H. Lin, B. H. Chen, *Journal of Chromatography A* **2003**, *1012*, 103.
[95] R. Aman, J. Biehl, R. Carle, J. Conrad, U. Beifuss, A. Schieber, *Food Chemistry* **2005**, *92*, 753.
[96] S. Lindsay, *Einführung in die HPLC*, 1 ed., Friedr. Vieweg & Sohn, Braunschweig, Wiesbaden, **1996**.
[97] J. W. Dolan, *Lc Gc North America* **2009**, *27*, 472.
[98] J. W. Dolan, *Lc Gc North America* **2009**, *27*, 224.
[99] G. Schmitt, Analytiksoft (Universitätsklinikum Heidelberg, Institut für Rechts- und Verkehrsmedizin), Heidelberg, **2005**.
[100] Shimadzu, *LC-MS Application Data Sheet Nr. 4 ´*.
[101] CAMAG, **2009**.
[102] F. W. Küster, A. Thiel, *Rechentafeln für die Chemische Analytik*, 105. ed., de Gruyter, Berlin, **2002**.
[103] H. X. Tong, S. A. Holstein, R. J. Hohl, *Analytical Biochemistry* **2005**, *336*, 51.
[104] L. S. Song, *Analytical Biochemistry* **2003**, *317*, 180.

[105] T. Vallon, S. Ghanegaonkar, O. Vielhauer, A. Muller, C. Albermann, G. Sprenger, M. Reuss, K. Lemuth, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2008**, *81*, 175.
[106] SDBSWeb, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology.
[107] J. Hoffmann, **2007**.
[108] K. Iwasaki, H. Uchiyama, O. Yagi, T. Kurabayashi, K. Ishizuka, Y. Takamura, *Biosci Biotechnol Biochem* **1994**, *58*, 851.
[109] S. Matthijs, G. Laus, J. M. Meyer, K. Abbaspour-Tehrani, M. Schafer, H. Budzikiewicz, P. Cornelis, *Biometals* **2009**, *22*, 951.
[110] J. M. Meyer, M. A. Abdallah, *Journal of General Microbiology* **1978**, *107*, 319.
[111] K. Moimoi, **2007**.
[112] M. 1105.1, in *Schweizerisches Lebensmittelbuch*, Bundesamt für Gesundheit, **1993**.
[113] C. H. Eugster, in *Carotenoids: Isolation and Analysis, Vol. 1A* (Eds.: G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander), Birkhäuser Verlag AG, Basel, **1995**, pp. 71.
[114] J. Altenbuchner, Institut für Industrielle Genetik, **2007**.
[115] L. Kurbatov, D. Albrecht, H. Herrmann, L. Petruschka, *Environ Microbiol* **2006**, *8*, 466.
[116] Y. Sardessai, S. Bhosle, *Research in Microbiology* **2002**, *153*, 263.
[117] F. Blasco, Universität Stuttgart (Stuttgart), **2002**.
[118] P. C. Lee, A. Z. R. Momen, B. N. Mijts, C. Schmidt-Dannert, *Chemistry & Biology* **2003**, *10*, 453.
[119] B. N. Mijts, P. C. Lee, C. Schmidt-Dannert, *Protein Engineering* **2004**, *388*, 315.
[120] B. N. Mijts, P. C. Lee, C. Schmidt-Dannert, *Chemistry & Biology* **2005**, *12*, 453.
[121] M. E. Johnson, *Journal of Chemical Education* **2000**, *77*, 368.
[122] J. Valverde, H. This, *Journal of Chemical Education* **2007**, *84*, 1505.
[123] G. E. Morlock, C. Oellig, L. W. Bezuidenhout, M. J. Brett, W. Schwackt, *Analytical Chemistry* **2010**, *82*, 2940.
[124] K. Behnke, Universität Leipzig (Leipzig), **2005**.
[125] G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, in *Carotenoids, Vol. 1A*, 1 ed. (Eds.: G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander), Birkhäuser Verlag, Basel, **1995**.
[126] G. Giuliano, D. Pollock, P. A. Scolnik, *Journal of Biological Chemistry* **1986**, *261*, 2925.
[127] J. Breitenbach, N. Misawa, S. Kajiwara, G. Sandmann, *Fems Microbiology Letters* **1996**, *140*, 241.
[128] P. Krubasik, M. Kobayashi, G. Sandmann, *European Journal of Biochemistry* **2001**, *268*, 3702.
[129] S. Takaichi, D. O. Jung, M. T. Madigan, *Photosynthesis Research* **2001**, *67*, 207.
[130] P. A. Thurmann, W. Schalch, J. C. Aebischer, U. Tenter, W. Cohn, *American Journal of Clinical Nutrition* **2005**, *82*, 88.
[131] D. E. Breithaupt, A. Bamedi, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, *49*, 2064.
[132] D. E. Breithaupt, A. Bamedi, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*, 7175.
[133] P. Kaiser, Freie Universität Berlin (Berlin), **2009**.
[134] P. C. Lee, C. Schmidt-Dannert, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2002**, *60*, 1.
[135] H. Alper, K. Miyaoku, G. Stephanopoulos, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2006**, *72*, 968.
[136] S. W. Kim, J. B. Kim, W. H. Jung, J. H. Kim, J. K. Jung, *Biotechnology Letters* **2006**, *28*, 897.
[137] T. Maoka, A. Arai, M. Shimizu, T. Matsuno, *Comp Biochem Physiol B* **1986**, *83*, 121.
[138] L. B. A. Johansson, G. Lindblom, A. Wieslander, G. Arvidson, *Febs Letters* **1981**, *128*, 97.

[139] B. Norden, G. Lindblom, I. Jonas, *Journal of Physical Chemistry* **1977**, *81*, 2086.
[140] M. Vandeven, M. Kattenberg, G. Vanginkel, W. Verwer, Y. K. Levine, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1984**, *120*, 1060.
[141] M. Jeske, J. Altenbuchner, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2010**, *85*, 1923.
[142] W. S. Chang, M. van de Mortel, L. Nielsen, G. Nino de Guzman, X. Li, L. J. Halverson, *J Bacteriol* **2007**, *189*, 8290.
[143] T. F. Mah, G. A. O'Toole, *Trends Microbiol* **2001**, *9*, 34.
[144] Z. Sun, J. A. Ramsay, M. Guay, B. A. Ramsay, *Appl Microbiol Biotechnol* **2006**, *71*, 423.
[145] P. Vandevivere, D. L. Kirchman, *Appl Environ Microbiol* **1993**, *59*, 3280.
[146] M. Bonilla, C. Olivaro, M. Corona, A. Vazquez, M. Soubes, *J Appl Microbiol* **2005**, *98*, 456.
[147] T. Stumpp, B. Wilms, J. Altenbuchner, *Biospektrum* **2000**, *1*, 33.
[148] S. Rozen, H. Skaletsky, *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* **2000**, *132*, 365.
[149] G. Britton, in *Carotenoids, Volume 1A: Isolation and Analysis*, 1 ed. (Eds.: G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander), Birkhäuser Verlag AG, Basel, Boston, Berlin, **1995**.
[150] A. B. Barua, J. A. Olson, H. C. Furr, R. B. van Breemen, in *Modern Chromatographic Analysis of Vitamins, Vol. 84*, 3 ed. (Eds.: A. P. de Leenheer, W. E. Lambert, J. F. van Bocxlaer), Marcel Dekker New York, **2000**, pp. 1.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Holger Heinz Beuttler
Geburtsdatum	29. Juli 1981
Geburtsort	Böblingen

Schulausbildung

1988 – 1992	Johannes-Widmann-Grund- und Hauptschule mit Werkrealschule Maichingen, Sindelfingen
1992 – 2001	Gymnasium Unterrieden, Sindelfingen

Hochschulausbildung

2001 – 2006	Studium Diplom-Chemie, Universität Stuttgart Wahlpflichtfach: Biochemie Vertiefungsfach Technische Biochemie, Diplomarbeit am Institut für Technische Biochemie: „Klonierung, Expression und Charakterisierung von Hydroxysteroid-Dehydrogenasen und ihre Anwendung in der stereospezifischen Synthese“
2007 – 2010	Promotionsstudium Chemie, Universität Stuttgart

Berufliche Tätigkeit

seit März 2007	Wissenschaftlicher Angestellter, Universität Stuttgart, Institut für Technische Biochemie