

Lehrstuhl für Angewandte Mikrobiologie
Rheinisch-Westfälische Technische Universität Aachen

Abschlussbericht zum Projekt

Nachhaltige Herstellung von Triterpenen mit spezialisierten Bäckerhefen – TRITERP

gefördert durch die Deutsche Bundestiftung Umwelt



unter dem Aktenzeichen

AZ 13272

Aachen, 07.01.2016

RWTH - Prof. Dr. Lars M. Blank, Birgitta E. Ebert, Eik Czarnotta, Kerstin Walter

Lehrstuhl für Angewandte Mikrobiologie, Institut für Angewandte Mikrobiologie – iAMB,
Aachener Biologie und Biotechnologie - ABBt, Rheinisch Westfälische Technische Hochschule
Aachen (RWTH)

DTU – Prof. Dr. Jochen Förster, Christoph Knuf, Simo A. Jacobsen, Scott Harrison, Basti Bergdahl,
Jérôme Maury

Novo Nordisk Foundation Center for Biosustainability, Danmarks Tekniske Universitet (DTU),
Kogle Alle 6, 2970 Hørsholm, Dänemark

OB – Prof. Dr. Christine Lang, Thomas Polakowski, Anna Lewandowski

Organobalance GmbH, Gustav-Meyer-Allee 25, 13355 Berlin

Projektkennblatt
der
Deutschen Bundesstiftung Umwelt



Az	13272	Referat	Biotechnol	Fördersumme	556.265,00 €
Antragstitel		Nachhaltige Herstellung von Triterpenen mit spezialisierten Bäckerhefen – TRITERP			
Stichworte		<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Mevalonat Stoffwechselweg, Triterpen, Stammoptimierung, Prozessoptimierung			
Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)		
36 Monate	01.09.2012	31.08.2015	1		
Zwischenberichte	17.02.2014				
Bewilligungsempfänger	Prof. Dr. Lars M. Blank			Tel	0241 8026600
	Institut für Angewandte Mikrobiologie			Fax	0241 80622180
	RWTH Aachen			Projektleitung	
				Lars M. Blank	
				Bearbeiter	
				Birgitta Ebert	
Kooperationspartner	Prof. Dr. Jochen Förster, Novo Nordisk Foundation center for Biosustainability, DTU Dänemark, Prof. Dr. Christine Lang, Organobalance GmbH				
Zielsetzung und Anlass des Vorhabens					
<p>Bei der Produktion pharmazeutischer Wirkstoffe wird selten Nachhaltigkeit berücksichtigt. Die etablierten Produktionsprozesse sind häufig charakterisiert durch geringe Ausbeuten und dem Einsatz großer Mengen Chemikalien inkl. Lösungsmittel pro Gram produziertem Wirkstoff. Das vorliegende Projekt erarbeitet ein neuartiges Verfahren unter Verwendung von Ganzzellbiokatalysatoren zur Herstellung des vielversprechenden Wirkstoffes Betulinsäure, einem pentazyklischen Triterpen, und weiterer werthaltiger Derivate. Ganzzellbiokatalysatoren sind Mikroorganismen, die idealerweise nachwachsende Rohstoffe (z.B. Glukose oder Glyzerin) mit hoher Rate, Ausbeute und Titer in das gewünschte Produkt umsetzen. Die Nachhaltigkeit des neuartigen Verfahrens wird während des Projektes unabhängig durch die IFU GmbH, Hamburg, in einem Unterauftrag bewertet.</p> <p>Das TRITERP Konsortium setzt sich aus drei Partnern zusammen: Organobalance GmbH, eine erfolgreiche Berliner KMU, die nachgewiesene Erfahrung im Bereich der Kommerzialisierung von Ganzzellbiokatalysatoren hat sowie zwei Universitätsgruppen, das Institut für Angewandte Mikrobiologie (iAMB) der RWTH Aachen und das Novo Nordisk Foundation Center for Biosustainability der Technischen Universität von Dänemark, die beide viele Jahre Erfahrungen im Bereich der effektiven Ganzzellkatalyseprozessentwicklung haben. Beide Universitätsgruppen, insbesondere das Team der TU Dänemark, haben als übergeordnetes Ziel, die Reduktion des CO₂ Ausstoßes voranzutreiben und in Zukunft Chemikalien aus nachwachsenden Rohstoffen anstatt aus Petroleum herzustellen.</p>					
<small>Deutsche Bundesstiftung Umwelt ☐ An der Bornau 2 ☐ 49090 Osnabrück ☐ Tel 0541/9633-0 ☐ Fax 0541/9633-190 ☐ http://www.dbu.de</small>					

Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

Im Rahmen dieses Projektes soll ein innovativer, umweltschonender Produktionsprozess zur mikrobiellen Produktion von zyklischen Triterpenen am Beispiel der Betulinsäure, unter Anwendung maßgeschneiderter Hefe-Stämme, erarbeitet werden. Dabei soll geklärt werden, unter welchen Bedingungen ein solches Verfahren aus ökologischer und ökonomischer Sicht umsetzbar ist. Begleitend zur Stammkonstruktion beinhaltet das Projekt die Erarbeitung eines Fermentations- und Aufreinigungsprozesses, so dass am Ende des Projektes ein ökologisch und ökonomisch sinnvoller Produktionsprozess zur Synthese von Betulinsäure bzw. entsprechenden werthaltigen Derivaten steht.

Die Implementierung des Betulinsäuresyntheseweges in *S. cerevisiae* erfordert die Expression der Gene für eine Oxidosqualenesynthase, einer Cytochrom P450 Monooxygenase und einer kompatiblen NADPH-Cytochrom P450 Reduktase. Um hohe Umsatzraten der heterologen Gene bzw. der gebildeten Enzyme und somit auch hohe Titer an Betulinsäure zu gewährleisten, ist innerhalb des Projektes die Evaluierung mehrerer Gene für jede heterologe Enzymreaktion in verschiedenen Kombinationen zur Ermittlung der optimalen Gene und Kombination derselben mit hoher Produktivität vorgesehen. Potentielle Limitierungen des Metabolismus werden durch physiologische Analysen identifiziert und durch geeignete Metabolic Engineering Maßnahmen behoben.

Für den Produktionsprozess ist es vorteilhaft, wenn die Ziel-Metabolite aus der Zelle ausgeschieden werden, da dies die Aufreinigungskosten nach der Fermentation stark reduziert und gleichzeitig den Einsatz von Lösungsmittel signifikant mindert. Im Laufe des Projektes sollen homologe oder heterologe Produkttransporter identifiziert werden, die einen Transport der Metabolite aus der Zelle zulassen oder verbessern.

Einige essentielle Enzyme des Betulinsäuresyntheseweges sind in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert. Hier soll durch genetische Manipulation die Oberfläche des Endoplasmatischen Reticulums vergrößert werden, damit mehr Enzyme des Mevalonat-Squalenstoffwechselwegs Platz finden und damit eine erhöhte enzymatische Aktivität und erhöhte Produktionsrate durch den Stoffwechselweg ermöglicht wird. Hierfür werden geeignete genetische Perturbationen implementiert und mit Hilfe von moderner Fluoreszenzmikroskopie die Größe der Organelloberfläche vermessen.

Die Entwicklung von Hochleistungstämmen wird im Kontext der industriell relevanten Fermentation und Produktaufreinigung erfolgen. Speziell bei Bäckerhefe unterscheidet sich die Physiologie auf Glukose unter Satz- und Zulaufbedingungen erheblich. Deshalb werden etablierte Fermentationsprotokolle für die Produktion von zyklischen Triterpenen adaptiert. Dabei steht die Verfügbarkeit der Kohlenstoffquelle und Sauerstoff, sowie die Medienkomposition (auch hinsichtlich Preis, Umweltaspekte) im Vordergrund. Moderne Laborfermenter werden für diese Optimierungsschritte eingesetzt.

Für die ökonomisch und ökologisch sinnvolle Produktion ist die Produktisolierung von großer Bedeutung. Deshalb werden unterschiedliche organische Lösungsmittel(-kombinationen) auf ihre Extraktionseffizienz und Umwelteinfluss inklusive ihrer Rezyklierbarkeit bewertet. Sollte die gezielte Sekretion gelingen, wären deutlich einfachere Aufarbeitungsprotokolle wie zum Beispiel die Kombination von hydrophober Adsorption mit anschließender Extraktion und Destillation denkbar, die anhand von Modellmischungen parallel getestet werden sollen.

Projektbegleitend werden Ökoeffizienzanalysen zur Evaluierung der Wirtschaftlichkeit und Umweltfreundlichkeit des geplanten biotechnologischen Prozesses durchgeführt und mit einem existierenden Referenzprozess verglichen.

Ergebnisse und Diskussion

Die Betulinsäuresynthese in *S. cerevisiae* erforderte das Implementieren einer Oxidosqualenzyklase (OSC), einer P450 Monooxygenase (CYP) plus geeigneter Cytochrome P450 Reduktase (CPR), die das native Metabolit 2,3-Oxidosqualen in Lupeol und über die Zwischenstufen Betulin und Betulinaldehyd in Betulinsäure transformieren.

Von diversen OSC-CYP/CPR Kombinationen erwies sich die Verwendung der Oxidosqualenzyklase

OEW aus *Olea europaea* und der P450 Monooxygenase *CYP716A15* aus *Vitis vinifera* in Kombination mit der Reduktase *LjCPR* (*Lotus japonicus*) oder *MTR* (*Medicago truncatula*) als sehr vielversprechend hinsichtlich Produktausbeute und Produktivität. Das Einbringen der Codon-optimierten Pflanzengene führte zunächst nur zu sehr geringer Akkumulation der pentacyklischen Triterpene Lupeol, Betulin, Betulinaldehyd und Betulinsäure.

Zur Verbesserung der Produktsynthese wurden diverse Metabolic Engineering Strategien getestet. Um die Verfügbarkeit des Präkursors 2,3-Oxidosqualen zu erhöhen, wurde dessen Synthese durch Deregulation der Expression des *HMG1* und *ERG1* Gens erhöht sowie durch gezielte Degradation der Lanosterolsynthase Erg7p der Abfluss in den konkurrierenden Ergosterolsyntheseweg reduziert. Diese Maßnahmen führten zu höherer Produktbildung. Da in Stämmen mit einfacher genomischer Integration der heterologen Gene des Betulinsäuresyntheseweges vor allem Squalen und Lupeol akkumulierten, wurde die Kopienzahl der Gene *OEW* und *CYP716A15* erhöht und damit die Umsetzung dieser Metabolite zu den pentacyklischen Triterpenen stark verbessert.

Manipulation der Biogenese des Endoplasmatischen Reticulums durch Deletion des Gens *PAH1* hatte zum Ziel, die verfügbare Membranfläche für den Einbau der heterologen Enzyme und damit deren Abundanz und Aktivität zu erhöhen, und verbesserte die Umsetzung des im Referenzstamm akkumulierenden Squalens und verdoppelte die Akkumulation der Produkte Lupeol und Betulinsäure.

Parallel zu diesen Maßnahmen wurde der Fermentationsprozess durch Optimierung der Medienzusammensetzung, Wahl der Kohlenstoffquelle und Fermentationsfahrweise entwickelt. In dem optimierten Fermentationsprozess wurde nach einem Batch auf Glukose der Fermenter mit Ethanol Pulsen gefüttert und 5,4 g/L Triterpene (ca. 30 % g/g_{CDW}, Zusammensetzung: 22% Lupeol, 44% Betulin, 8% Betulinaldehyd, 24% Betulinsäure, 2% Squalene) mit einer Produktivität von 8,30 mg/L/h erzielt.

Die ökologische und ökonomische Bewertung zeigte, dass die Produktionskosten des entwickelten Verfahrens in etwa denen des Vergleichsprozesses, der Extraktion aus Platanenrinde, entsprechen, die mikrobielle Produktion jedoch mit deutlich reduzierten Umwelteinwirkungen möglich ist. Dies ist vor allen Dingen auf den hohen Produkttiter und des im Rahmen des Projektes entwickelten, umweltschonenden Aufreinigungsverfahrens zurückzuführen.

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

Das Projekt und die erzielten Ergebnisse wurden bisher in zwei Publikationen veröffentlicht (Ebert, B.E., Blank, L.M., Nachhaltige Herstellung von Triterpenen mit spezialisierten Bäckerhefen – TRITERP, ChemBioTec Review, 2012; Rugbjerg, P.; Knuf, C.; Forster, J.; Sommer, M.O., Recombination-stable multimeric green fluorescent protein for characterization of weak promoter outputs in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Research 2015, 15) sowie in fünf Konferenzbeiträgen (TERPNET 2013, 1.-5. Juni 2013, Kolyvari, Kreta, Griechenland; ProcessNet-Jahrestagung 2014 und 31. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, 2010, Aachen, Deutschland; Metabolic Engineering X, 2014, Vancouver, Kanada, 12th Yeast Lipid Conference, 2015, Ghent, Belgien; Biochemical and Molecular Engineering XIX, 2015, Puerto Vallarta, Mexiko) vorgestellt. Mindestens fünf weitere Publikationen sind in Vorbereitung. Die generierten Stämme und gemachten Erfindungen sind durch ein Patent (WO 2015/121168 A1) geschützt, ein weiteres ist eingereicht (ORG/EP/1502, angemeldet am 4.11.2015 (Kanzlei Jungblut und Seuss)).

Fazit

Das Projekt TRITERP konnte mit Erfolg abgeschlossen werden. In dem dreijährigen Projekt wurden Hefestämme konstruiert mit denen unter optimierten Fermentationsbedingungen 5,4 g/L Triterpene, davon 1,3 g/L Betulinsäure, synthetisiert wurden. Die selektive Extraktion der Wertprodukte durch Aceton erlaubte eine erste Anreicherung der Hauptprodukte, ohne vorheriges Aufschließen der Zellen. Eine anschließende komplette Aufreinigung der Produkte ist durch Chromatographie oder Destillation möglich. Die Ökoeffizienzanalyse ergab, dass der hohe Titer gemeinsam mit dem ressourcenschonenden und umweltfreundlichen Aufbereitungsverfahren die mikrobielle Synthese nicht nur in wirtschaftlicher sondern auch aus ökologischer Sicht zu einer attraktiven Alternative zu der bisherigen Extraktion aus Pflanzenmaterial macht. Das Projektziel, die Entwicklung eines Hefestammes und eines nachhaltigen Fermentationsverfahrens zur Synthese von Betulinsäure und weiteren werthaltigen Derivaten, wurde somit erreicht.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis.....	9
Verzeichnis von Begriffen, Abkürzungen und Definitionen	10
1 Zusammenfassung	15
2 Einleitung.....	16
3 Zielsetzung und Aufgabenstellung.....	16
4 Ergebnisse.....	19
4.1 Etablierung der Biosynthese zyklischer Triterpene in Hefe	19
4.1.1 Auswahl eines geeigneten Basisstammes	19
4.1.2 Konstruktion eines Betulinsäureproduzenten	20
4.1.3 Entwicklung eines Stammes mit erhöhter 2,3-Oxidosqualen Verfügbarkeit	21
4.1.3.1 Charakterisierung von geeigneten Promotoren.....	22
4.1.3.2 Blockstrategie	24
4.1.3.3 Push Strategie.....	25
4.2 Variation der heterologen Gene.....	26
4.2.1 Optimierung der Betulinsäuresynthese durch Kombination geeigneter Oxidosqualenzyklase und P450 Monooxygenase Gene	26
4.2.2 Optimierung der Betulinsäuresynthese durch Wahl der NADPH-Cytochrom P450 Reduktase (CPR) in Kombination mit ausgewählten CYP-Genen.....	28
4.3 Evolutionsgeführte Zellfabrikentwicklung.....	30
4.4 Identifikation von Lupeol- und beta-Amyrintransportern	30
4.5 Fermentationsoptimierung der Triterpenproduktion.....	32
4.6 Metabolische Charakterisierung der Squalen und zyklischen Triterpen produzierenden <i>S. cerevisiae</i> Stämme	37
4.7 Vergleichende Genomik verschiedener Triterpenproduzenten und Entwicklung von Stämmen mit erhöhter Lupeol-, β -Amyrin und Betulinsäureproduktion	38
4.7.1 Transkriptomanalyse	38
4.7.2 Genomanalyse des stark 2,3-Oxidosqualene akkumulierenden Stammes	39
4.8 Zellfabrikentwicklung mit Hilfe genomskaliger Modelle.....	40
4.9 Erhöhung der Triterpenproduktion durch Vergrößerung der Oberfläche des Endoplasmatischen Reticulums.....	41
4.9.1 Erhöhung der Squalenproduktion durch Vergrößerung der Oberfläche des Endoplasmatischen Retikulums durch <i>OPI1</i> oder <i>PAH1</i> Deletion.....	43

4.9.2	Charakterisierung von Triterpenoid-produzierenden <i>S. cerevisiae</i> Stämmen mit veränderter ER Proliferation durch <i>PAH1</i> Deletion.....	44
4.10	Konstruktion und Charakterisierung der finalen Betulinsäureproduzenten.....	45
4.11	Entwicklung eines Produktaufreinigungsverfahrens.....	50
4.12	Upscaling und Optimierung der Fermentationsbedingungen.....	53
4.13	Etablierung eines Zellaufschlussverfahrens zur Freisetzung der Triterpene (Autolyse).....	54
4.14	Ökoeffizienzanalyse.....	54
4.15	Dissemination der Projektergebnisse.....	58
5	Diskussion	58
6	Fazit	59
	Literaturverzeichnis	60
	Anhang	64
	Tabelle A1: Übersicht der entwickelten Stämme.....	64

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Hauptarbeitspakete des Projektes TRITERP zur Realisierung eines ökologisch und ökonomisch sinnvollen Produktionsprozesses zur Synthese von Betulinsäure bzw. entsprechenden werthaltigen Derivaten mit maßgeschneiderten Hefestämmen.....	17
Abbildung 2. Prä- und Postsqualenbiosyntheseweg in der Hefe <i>S. cerevisiae</i> und Erweiterung des Stoffwechselweges für die Synthese des zyklischen Triterpenoids Betulinsäure über die Plattformsubstanz Lupeol. Die Gene für die Synthese der Betulinsäure sind in der Abbildung rot dargestellt und kodieren für Oxidosqualenzyklase (<i>OSC</i>), NADPH-Cytochrom P450 Reduktase (<i>CPR</i>) und Cytochrom P450 Monooxygenase (<i>CYP</i>).....	18
Abbildung 3: Vergleich der Fluoreszenz von 3vGFP und sfGFP mit der Autofluoreszenz eines Wildtypstammes (<i>S. cerevisiae</i> CEN.PK).....	22
Abbildung 4: Fluoreszenz des Wildtypstammes, des PCUP1-3vGFP (CK24) und des PCUP1-SPO13-3vGFP Stammes (CK28), gemessen nach Kultivierung in Medium mit (rot) und ohne (blau) Kupfer.	22
Abbildung 5: Verlauf des GFP Signals (520nm, leere Symbole) und der Biomasse (backscatter, gefüllte Symbole) der Stämme CK25 (PADH2-3vGFP, Quadrate), CK26 (PHXT7-3vGFP, Dreiecke) und CK27 (PERG7-3vGFP, Kreise) während Kultivierung in Delft Medium mit 2% Glukose im Biolektor bei 30°C und 1000 U/min.....	23
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Degronkassette (A) und der Funktion der Degronstrategie (B) (nach [16]).....	24
Abbildung 7: 2,3-Oxidosqualen Konzentration in Kulturen von CK11 (<i>P_{CUP1}</i>) mit unterschiedlichen Kupferkonzentrationen.	25
Abbildung 8: 2,3-Oxidosqualen Konzentrationen von CK11, Simo1575 und Simo1578 im Vergleich zum Wildtypstamm <i>S. cerevisiae</i> CEN.PK113-7D	25
Abbildung 9: Ergebnisse der GC-MS Analytik. Gehalte der Triterpenoide/Kulturvolumen [mg/L] der Hefestämme CEN.PK2U pTT1-OEW mit dem <i>CPR</i> -Gen <i>LjCPR1</i> und den verschiedenen <i>CYP</i> -Genen nach Kultivierung in WM8-Medium für sechs Tage. Die <i>CYP</i> -Gene sind als Abkürzung angegeben (z.B. A12 entspricht <i>CYP716A12</i>). Die Daten beruhen auf Doppelbestimmungen. Ko* - ohne <i>LjCPR1</i> und <i>CYP</i> -Gen.....	27
Abbildung 10: Triterpenoidproduktion der Hefestämme CEN.PK2U pTT1-OEW kombiniert mit einem der <i>CPR</i> -Gene <i>ATR</i> , <i>NCP1</i> , <i>CrCPR</i> oder <i>MTR</i> und mit einem der <i>CYP</i> -Gene <i>A15</i> , <i>A17</i> oder <i>A9</i> . Die Stämme wurden 72 h in WM8-Medium mit 5% Glukose kultiviert und mittels GC-MS analysiert. Die Daten beruhen auf dem Mittelwert von 2 untersuchten Klonen.	28
Abbildung 11: Ausschnitt eines Total Ion Chromatogramms (TIC) einer Terpenoid-Analytik. Extrakt aus Kulturbrühe CEN.PK2U pTT1-OEW pTT2-MTR-A15 (blau). Standardsubstanzen in Chloroform gelöst (schwarz). TMS: Trimethylsilyl-Derivate.	29
Abbildung 12: Intrazelluläre Glukosinulat Peak Flächen der über LC-MS analysierten unterschiedlich behandelten Eizellen (blau) und Proben der Nährlösung (rot).	31
Abbildung 13: Verlauf von Glukose, Ethanol, Biotrockenmasse (CDW) und spezifische Triterpenkonzentration während einer Schüttelkolbenkultivierung des Squalenüberproduzenten <i>S. cerevisiae</i> CEN.PK thmg1 (A) und des Betulinsäureproduzenten <i>S. cerevisiae</i> BA4 (B). SQ=Squalen, B=Betulin, BS=Betulinsäure.....	33
Abbildung 14: (A) Ablagerungen im Bioreaktor während einer Fermentation mit <i>S. cerevisiae</i> BA4. (B) Mikroskopische Aufnahme von Agglomeraten nach einer Fermentation mit <i>S. cerevisiae</i> BA4	34

Abbildung 15: Verlauf der volumetrischen (A) und der spezifischen (B) Triterpenkonzentration während eines gepulsten Ethanol-Fed-Batches im Bioreaktor mit dem Betulinsäureproduzenten <i>S. cerevisiae</i> BA4. SQ=Squalen, B=Betulin, BS=Betulinsäure. (C) Verlauf der Glukose-, Ethanol- und Acetatkonzentration. Vertikale, gestrichelte Linien stellen die gepulste Zugabe von 25 g/L Ethanol dar.....	35
Abbildung 16: (A) Abhängigkeit des spezifischen Squalengehaltes von der Verdünnungsrate und Squalenakkumulationsrate in einer kontinuierlichen Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> CEN.PK tHMG1 im Verduyn-Medium und einem Ethanol/Glukose Cofeed. Ratio gibt das Ethanol zu Glukose Verhältnis in $C_{mol_{EtOH}}/C_{mol_{Glc}}$ an. (B) Mini-Chemostat im Wasserbad	37
Abbildung 17: Überlagerung der Sequenzen von Simo1575 und der NCBI CEN.PK Sequenz. In rot ist die Deletion im ERG7 Gen von Simo1575 dargestellt.	40
Abbildung 18: Stoffwechselfdesign zur Kopplung von Betulinsäureproduktion and das Wachstum. Deletionstargets sind in rot dargestellt, orangene Pfeile symbolisieren heterologe Reaktionen.	41
Abbildung 19: Enzymatische Katalyse von Phosphatidat (PA) zum Diacylglycerol (DAG) durch Pah1p. Diacylglycerol (DAG) ist ein Vorprodukt des Triacylglycerol (TAG), was neben Sterylester (SE) Hauptbestandteil der Lipidpatikel ist; Quelle: [42].	42
Abbildung 20: Spezifische Squalenkonzentration in <i>S. cerevisiae</i> CEN.PK 111-61A, CEN.PK 111-61A <i>opi1Δ</i> , CEN.PK 111-61A <i>pah1Δ</i>	43
Abbildung 21: Fluoreszenz- und DIC-Bild von A) <i>S. cerevisiae</i> CEN.PK2U <i>OEW.LjA15</i> (BA5) und B) <i>S. cerevisiae</i> BA5 <i>pah1Δ</i> nach Färbung mit Nilrot.....	44
Abbildung 22: Gemessene Konzentrationen von (1) Squalen, (2) Lupeol, (3) Betulin und (4) Betulinsäure jeweils für den <i>S. cerevisiae</i> CEN.PK2U <i>OEW.LjA15</i> (BA5) und einer BA5 <i>pah1Δ</i> Deletionsmutante.....	44
Abbildung 23: Plasmidkarte von pTY-OB-BA (10652 bp) für die multiple Integration der Lupeolsynthese (<i>OEW</i>) aus <i>Olea europaea</i> und der Cytochrom P450 Monooxygenase (<i>CYP716A15</i>) aus <i>Vitis vinifera</i> . Genomintegration erfolgt über TY-sites der Zelle.	45
Abbildung 24: Volumetrische (links) und spezifische Konzentrationen (rechts) von Squalen (blau) , Lupeol (rot), Betulin (grün), Betulinaldehyd (violett) und Betulinsäure (hellblau) in <i>S. cerevisiae</i> CEN.PK 2U <i>OEW.Lj.A15</i> (BA5), <i>S. cerevisiae</i> CEN.PK 2U <i>OEW.Lj.A15 ERG1</i> (BA5 Erg1) und unterschiedliche Kolonien nach der Transformation mit dem Plasmid pTY-OB-BA (BA5 Erg1 pTY #10 – #12).....	46
Abbildung 25: Volumetrische (links) und spezifische Konzentrationen (rechts) von Squalen (blau) , Lupeol (rot), Betulin (grün), Betulinaldehyd (violett) und Betulinsäure (hellblau) in <i>S. cerevisiae</i> CEN.PK Simo1575 pTY-OB-BA #3 - #6.....	47
Abbildung 26: Lichtmikroskopiebild von <i>S. cerevisiae</i> Simo1575 pTY#4, kultiviert in Glukose Minimalmedium WM8. Links: Zellen mit stark vergrößerten Lipidpartikeln, rechts: Lysierte Zelle mit freigesetzten Lipidpartikeln.	48
Abbildung 27: Volumetrische (links) und spezifische Konzentrationen (rechts) von Squalen (blau) , Lupeol (rot), Betulin (grün), Betulinaldehyd (violett) und Betulinsäure (hellblau) in <i>S. cerevisiae</i> CEN.PK Simo1575 pTY-OB-BA #4 - #5 nach Kultivierung in optimiertem WM8+ Medium.....	49
Abbildung 28: Volumetrische (links) und spezifische Konzentrationen (rechts) von Squalen (blau),Lupeol (rot), Betulin (grün), Betulinaldehyd (violett) und Betulinsäure (hellblau) in <i>S. cerevisiae</i> CEN.PK CK12_10 (P_{CUP1_TEVp}), <i>S. cerevisiae</i> CEN.PK CK18.2_7 (P_{HXT7_TEVp}), <i>S. cerevisiae</i> CEN.PK CK18.3_5 (P_{HXT7_TEVp}).....	50

Abbildung 29: a) Die einzelnen Phasen der Fermentationsbrühe nach Trennung mittels Zentrifugation, b) Verteilung der Betulinsäure in den Phasen, c) Mikroskopaufnahmen der einzelnen festen Phasen (# reine Biomasse, * Biomasse und Kristalle), d) Chromatogramme der einzelnen Phasen.....	51
Abbildung 30: Prozess zur Isolierung von Betulinsäure und Betulin aus Fermentationsbrühen der untersuchten Hefe <i>S. cerevisiae</i> CEN.PK BA4.....	53
Abbildung 31: Verlauf der volumetrischen (A) und der spezifischen (B) Triterpenkonzentration während eines gepulsten Ethanol-Fed-Batches im Bioreaktor mit dem finalen Betulinsäureproduzenten <i>S. cerevisiae</i> BA6. SQ=Squalen, L=Lupeol, B=Betulin, BA=Betulinaldehyd, BS=Betulinsäure. Vertikale, gestrichelte Linien stellen die gepulste Zugabe von 25 g/L Ethanol dar. Die totalen Terpenkonzentrationen sind die Summe der Konzentrationen von L, B, BA, und BS.	53
Abbildung 32: (A) Extrahiertes, eingedampftes und getrocknetes Produktgemisch aus verschiedenen Fed-Batch Fermentationen mit <i>S. cerevisiae</i> BA6. (B) HPLC-CAD Chromatogramm des Acetonrohextraktes einer Fed-Batch Fermentation von <i>S. cerevisiae</i> BA6.....	54
Abbildung 33: Netzdiagramm zum Vergleich der normalisierten Bewertungsergebnisse der verschiedenen Fermentatiooszenarien und dem Vergleichsprozess ‚Extraktion aus Rinde‘. Der jeweils größere Wert einer Bewertungskategorie ist auf 1 gesetzt, die verbleibenden Szenarien werden entsprechend niedriger skaliert.	56
Abbildung 34: Bewertung der Fermentationsszenarien und der Extraktion aus Rinde mit dem Ecoindicator99.....	56
Abbildung 35: Ergebnisse in Form einer Ökoeffizienzmatrix	57
Abbildung 36: HPLC Chromatogramm des Extraktes von Platanenrinde. Die gemessene Menge Betulinsäure entspricht etwa 1.34 % g/gRinde.....	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Spezifischer Squalengehalt der Hefestämmen, welche eine deregulierte HMG-CoA-Reduktase besitzen. Die Stammkonstruktion basiert auf dem Ausgangsstamm CEN.PK111-61A (Genotyp: <i>MATα</i> ; <i>ura3-52</i> ; <i>leu2-3_112</i> ; <i>TRP1</i> ; <i>his3-Δ1</i> ; <i>MAL2-8C</i> ; <i>SUC2</i>). Die angegebenen Stämme wurden einer 72 h Kultivierung in WM8-Medium mit 50 g/L Glukose unterzogen und der Squalengehalt auf die Biotrockensubstanz bezogen. Die Daten stellen den Mittelwert aus sechs unabhängigen Messungen mit der Standardabweichung dar.	20
Tabelle 2: Übersicht der konstruierten Betulinsäureproduzenten sowie das Wachstum und die Triterpenoidproduktion. Die Ausgangsstämme CEN.PK111-61A und CEN.PK2U wurden mit den Plasmiden pTT1-OEW sowie pTT2-LjCPR1-A9 transformiert. Die angegebenen Stämme wurden sechs Tage in WM8-Medium mit 50 g/L Glukose kultiviert und mittels GC-MS analysiert. Die Daten sind mit Standardabweichung angegeben, CDW und Triterpenoidgehalte wurden im Duplikat bestimmt.	21
Tabelle 3: Übersicht der getesteten Gene für die Synthese von Betulinsäure. Die Gene kodieren für Oxidosqualenzylase (<i>OSC</i>), NADPH-Cytochrom P450 Reduktase (<i>CPR</i>) und Cytochrom P450 Monooxygenase (<i>CYP</i>).....	26
Tabelle 4: Wachstum und Lupeolgehalte der Stämme CEN.PK111-61A und CEN.PK2U transformiert mit pTT1-GuLUP1 bzw. pTT1-OEW nach 48 h, 72 h und 93 h-stündigen Kultivierung in WM8-Medium mit 50 g/L Glucose. Die Daten beruhen bei der Biotrockensubstanz (CDW) auf einer	

Dreifachbestimmung und die Lupeolgehalte auf einer Doppelbestimmung mit einer Standardabweichung von unter 10%.	27
Tabelle 5: Einfluss der verwendeten Medien WM8 und Verduyn auf den spezifischen Triterpengehalt des Squalenüberproduzierers <i>S. cerevisiae</i> CEN.PK tHMG1 und des Betulinsäureproduzenten <i>S. cerevisiae</i> CEN.PK BA4. Daten aus Batchkultivierungen bei 30°C und 50 g/L Glukose. Mit + gekennzeichnete Medien enthielten erhöhte Vitamin- und Spurenelementkonzentrationen.	32
Tabelle 6: Spezifische Konzentration (% g/g _{CDW}), volumetrische Konzentration (mg/L) und volumetrische Produktivität (mg/L/h) für Betulin und Betulinsäure des Betulinsäureproduzenten <i>S. cerevisiae</i> BA4 nach Batch und Fed-Batch Fermentationen. Die angegebene Zeit bezieht sich auf die totale Fermentationsdauer und wurde zur Berechnung der Produktivität benutzt.	36
Tabelle 7: Gene Ontology Enrichment der biologischen Prozesse, welche mit den sich signifikant hoch-/herunter-regulierten Gene des tHMG1 Stammes zwischen der niedrigen hin zur hohen Verdünnungsrate in Verbindung gebracht werden.	39
Tabelle 8: GC-MS Analytik. Produktion von Squalen (mg/L) und pentacyklischen Triterpenen (mg/L) der Hefestämme BA5 (CEN.PK2U <i>OEW.LjCPR1.A15</i>) und BA5.2 (CEN.PK2U <i>OEW.LjCPR1.A15.ERG1 move4-OEW-A15</i>) nach Kultivierung in WM8-Medium für 72 h. Die Daten beruhen bei BA5 auf einer Doppelbestimmung und bei BA5.2 auf einer Sechsfachbestimmung mit einer Standardabweichung von unter 20%.	47
Tabelle 9: Extraktionsversuche mit Ethylacetat und Aceton unter Verwendung eines Phasenverhältnis $\theta = 10$ [g _{LSM} /g _{CDW}], T = 25 °C und 15 h.	52
Tabelle 10: Betrachtete Szenarien. Aus der Spalte Daten ist ersichtlich, dass die Daten für das Vordergrundsystem für alle Szenarien, die die Gewinnung von Betulinsäure mittels Fermentation abbilden von der RWTH zur Verfügung gestellt wurden.	55

Verzeichnis von Begriffen, Abkürzungen und Definitionen

B	Betulin
BA	Betulinaldehyd
BS	Betulinsäure
BTS	Biotrockensubstanz
C	Kohlenstoff
CAD	Charged Aerosol Detektor
CDW	Zelltrockengewicht
CoA	Coenzym A
CPR	Cytochrome P450 Reduktase
CYP	Cytochrome P450 Monooxygenase
D	Verdünnungsrate
DAG	Diacylglycerol
DO	Dissolved Oxygen
DSP	Downstream processing
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol

FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMN	Flavin-Mono-Nukleotid
GC	Gaschromatographie
GFP	Green Fluorescent Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
L	Lupeol
LC	Flüssigchromatographie
LP	Lipid Partikel
LSM	Lösungsmittel
mRFP	rot-fluoreszierendes Protein (Monomer)
MS	Massenspektrometrie
MSTFA	N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid
MTB	4-Methylthiobutyrylglukosinulat
N	Stickstoff
ÖEA	Ökoeffizienzanalyse
OSC	Oxidosqualenzyklase
PA	Phosphatidat
PCA	Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis)
SE	Sterolester
SQ	Squalen
TAG	Triacylglycerol
TEV	Tobacco Etch Virus
TIC	Total Ion Chromatogramm
TMS	Trimethylsilan
USD	US Dollar
vvm	Volumen pro Volumen und Minute
WT	Wildtyp

1 Zusammenfassung

In dem von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt geförderten Projekt TRITERP (AZ13272) wurde unter Koordination der RWTH Aachen, in Kooperation mit der DTU Dänemark und der Organobalance GmbH ein Verfahren zur Produktion von Betulinsäure und Derivaten in *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK entwickelt. Die Betulinsäuresynthese in *S. cerevisiae* erforderte das Implementieren dreier heterologer Enzyme, einer Oxidosqualenzyklase (*OSC*), einer P450 Monooxygenase (*CYP*) plus geeigneter Cytochrome P450 Reduktase (*CPR*), die das native Metabolit 2,3-Oxidosqualen in Lupeol und über die Zwischenstufen Betulin und Betulinaldehyd in Betulinsäure transformieren. Von verschiedenen *OSC-CYP/CPR* Kombinationen erwies sich die Verwendung der Oxidosqualenzyklase *OEW* aus *Olea europaea* und der P450 Monooxygenase *CYP716A15* aus *Vitis vinifera* in Kombination mit der Reduktase *LjCPR* (*Lotus japonicus*) oder *MTR* (*Medicago truncatula*) als sehr vielversprechend hinsichtlich Produktausbeute und Produktivität. Das Einbringen der Codon-optimierten Pflanzengene führte nur zu sehr geringer Akkumulation der pentazyklischen Triterpene Lupeol, Betulin, Betulinaldehyd und Betulinsäure. Zur Erhöhung der Produktsynthese wurden diverse Metabolic Engineering Strategien getestet. Zur Erhöhung der Verfügbarkeit des Präkursors 2,3-Oxidosqualen wurde dessen Synthese durch Deregulation der Expression des *HMG1* und *ERG1* Gens erhöht sowie durch gezielte Degradation der Lanosterolsynthese Erg7p der Abfluss in den konkurrierenden Ergosterolsyntheseweg reduziert. Diese Maßnahmen führten zu höherer Produktbildung. In Stämmen mit einfacher genomischer Integration der heterologen Gene des Betulinsäuresyntheseweges wurde vor allem Squalen und Lupeol akkumuliert. Durch Erhöhung der Kopienzahl der Gene *OEW* und *CYP716A15* wurde die Umsetzung dieser Metabolite zu den pentazyklischen Triterpenen stark verbessert. Manipulation der Biogenese des Endoplasmatischen Reticulums durch Deletion des Gens *PAH1* hatte zum Ziel, die verfügbare Membranfläche für den Einbau der heterologen Enzyme und damit deren Abundanz und Aktivität zu erhöhen, und verbesserte die Umsetzung des im Referenzstamm akkumulierenden Squalens und verdoppelte die Akkumulation der Produkte Lupeol und Betulinsäure.

Parallel zu diesen Maßnahmen wurde der Fermentationsprozess durch Optimierung der Medienzusammensetzung, Wahl der C-Quelle und Fermentationsfahrweise entwickelt. In dem optimierten Fermentationsprozess wurde nach einem Batch auf Glukose der Fermenter mit Ethanol Pulsen gefüttert und 5,5 g/L Triterpene (Zusammensetzung: 8% Lupeol, 44% Betulin, 22% Betulinaldehyd, 24% Betulinsäure, 3% Squalene) mit einer Produktivität von 8,30 mg/L/h erzielt. Die ökologische und ökonomische Bewertung zeigte, dass die Produktionskosten des entwickelten Verfahrens in etwa denen des Vergleichsprozesses, der Extraktion aus Platanenrinde, entsprechen, die mikrobielle Produktion jedoch mit deutlich reduzierten Umwelteinwirkungen möglich ist. Dies ist vor allen Dingen auf den hohen Produkttiter und des im Rahmen des Projektes entwickelten, umweltschonenden Aufreinigungsverfahrens zurückzuführen. Das Projektziel, die Entwicklung eines Hefestammes und eines geeigneten Fermentationsverfahrens zur Synthese von Betulinsäure und weiteren werthaltigen Derivaten, wurde erreicht. Da nicht alle positiv evaluierten Metabolic Engineering Maßnahmen im finalen Produzenten implementiert wurden, ist das Optimierungspotential des Hefestammes ist noch nicht vollständig ausgereizt. Daher ist eine weitere Steigerung der Produktivität der Hefestämme ist wahrscheinlich und somit auch die Realisierung eines umweltfreundlicheren und ökonomisch sinnvollen Prozesses.

2 Einleitung

Phytochemikalien wie Terpene und Sterole machen derzeit einen hohen Anteil an pflanzlich gewonnenen Wirkstoffen aus. Der jährliche Umsatz beläuft sich auf ca. 12,4 Mrd. USD [1]. Pentazyklische Triterpene sind aufgrund ihres breiten Wirkungsspektrums von besonderem Interesse in der Lebensmittel-, Kosmetik- aber vor allem der Pharmaindustrie [2]. Dies gilt insbesondere für die Betulinsäure, welche sich als Inhibitor von Melanom- und anderer Krebszellen erwiesen hat [3,4]. Eine ebenso große Rolle spielen einige Derivate der Betulinsäure, welche zurzeit im Mittelpunkt verschiedener klinischer Studien zur Behandlung des HI-Virus stehen. Das große Interesse an der Betulinsäure wird u.a. dadurch verdeutlicht, dass der Pharmakonzern Boehringer Ingelheim im Jahre 2006 ein Patent zur Isolation der Säure von der Firma Biosolutions Halle GmbH erworben hat. Daneben lassen sich zahlreiche weitere Patente identifizieren, welche vor allem die therapeutische Anwendung von Betulinsäure und Betulinsäure-Derivaten gegen Krebs oder HIV beanspruchen (DE69908397T2, DE19713768B4, DE19713768A1, DE69634951T2, DE69633398T2).

Neben der veralteten und ineffizienten synthetischen Produktion [5], erfolgt die Gewinnung der Betulinsäure heutzutage durch Extraktion aus höheren Pflanzen, z.B. aus der Baumrinde von *Picramnia pentandra* [5], *Arbutus menziesii* [6] oder *Ziziphus mauritiana* [3] und insbesondere *Platanus occidentalis*. Dabei werden trotz kontinuierlicher Verbesserung der Extraktionsverfahren große Mengen an organischen Lösungsmitteln verbraucht. In der Patentanmeldung US2007/0149490A1 ist dazu eines der neuesten Verfahren der Firma Boehringer Ingelheim beschrieben, bei dem die Betulinsäure aus der Rinde der Platane mittels chemischer Extraktion gewonnen wird. Der Anmeldung ist zu entnehmen, dass für die Gewinnung von 1 kg Betulinsäure ca. 70 kg Baumrinde (entspricht einer Produktkonzentration von nur 1,41 Prozent), 230 L Toluol, 20 L 2-Pentanol, 30 L Methanol, 50 L 2-Propanol und 32 L Dichlormethan benötigt werden. Zusätzlich zur Verwendung dieser hohen Mengen an Lösungsmitteln verbraucht der Prozess aufgrund der mehrfachen Destillationsschritte große Mengen an Energie. Neben diesen ökologisch relevanten Fakten ist die Gewinnung aus Baumrinden nicht wirtschaftlich und nachhaltig, da der Betulinsäuregehalt gering ist und diese Bäume nicht für die Kultivierung in Plantagen geeignet sind. Die mikrobielle Produktion von Betulinsäure oder ihrer Derivate durch Einbringen der entsprechenden Synthesegene kann eine wirtschaftlich und ökologisch sinnvolle und attraktive Alternative zur Extraktion aus Pflanzenmaterial sein. Entsprechende Verfahren wurden bereits für die Produktion von Mono-, Di- und Sesquiterpenen entwickelt, die mikrobielle Produktion von Triterpenen ist derzeit jedoch noch nicht am Markt etabliert.

3 Zielsetzung und Aufgabenstellung

Ziel des Projektes TRITERP ist die Entwicklung eines innovativen, umweltschonenden Produktionsprozesses zur mikrobiellen Produktion pentazyklischer Triterpene unter Anwendung maßgeschneiderter Hefestämme. Dabei soll geklärt werden, unter welchen Bedingungen ein solches Verfahren aus ökologischer und ökonomischer Sicht umsetzbar ist. Als Plattformchemikalien bzw. -stämme sollen dabei zunächst Lupeol überproduzierende Stämme entwickelt werden. Dieses Zwischenprodukt oder auch das Nebenprodukt β -Amyrin sind selber Moleküle, die, wenn einfach zu-

gänglich, kommerziell hoch interessant sind. Aus Lupeol lassen sich dann eine Vielzahl pharmazeutisch relevanter Triterpene herstellen. In diesem Projekt soll ausgehend vom Lupeol das Triterpenoid Betulinsäure hergestellt werden.

Begleitend zur Stammkonstruktion beinhaltet das Projekt die Erarbeitung eines Fermentations- und Aufreinigungsprozesses, mit dem Ziel am Ende des Projektes einen ökologisch und ökonomisch sinnvollen Produktionsprozess zur Synthese von Betulinsäure bzw. entsprechender werthaltiger Derivate etabliert zu haben.

Die einzelnen Arbeitsschritte des Projektes sind in Abbildung 1 skizziert. Sie lassen sich in fünf Hauptarbeitspakete (APs) einteilen, die parallel bearbeitet wurden.

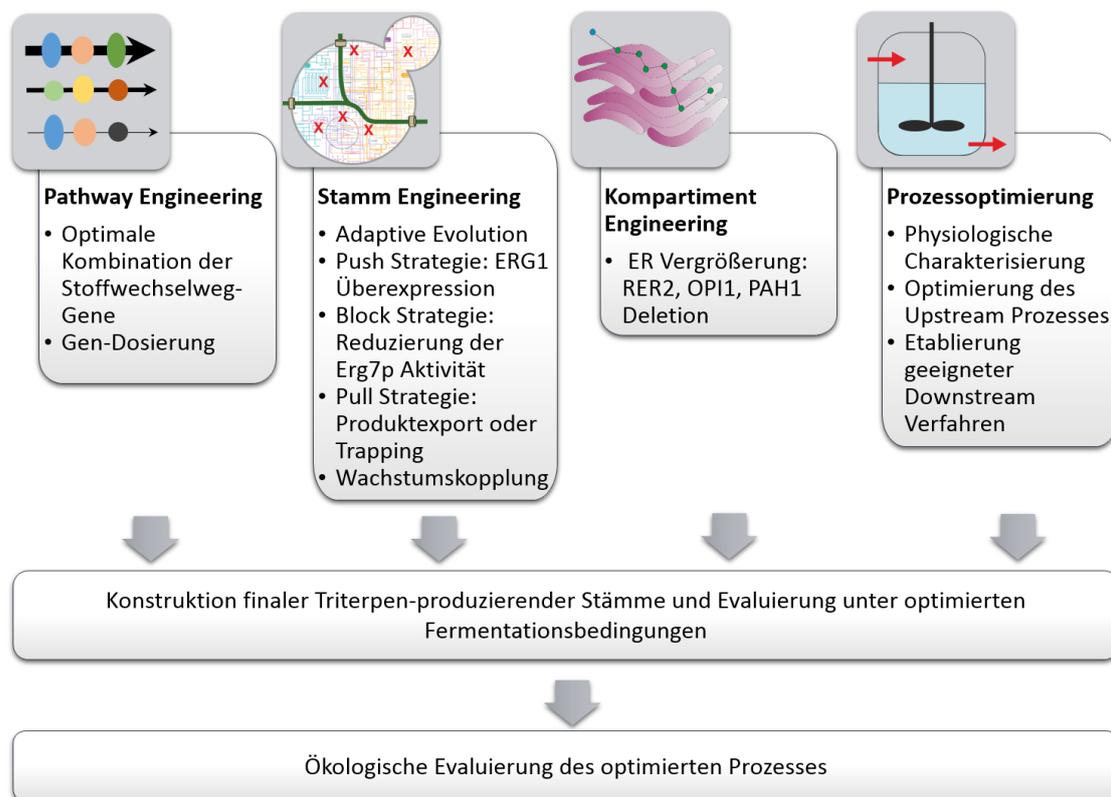


Abbildung 1 Hauptarbeitspakete des Projektes TRITERP zur Realisierung eines ökologisch und ökonomisch sinnvollen Produktionsprozesses zur Synthese von Betulinsäure bzw. entsprechenden werthaltigen Derivaten mit maßgeschneiderten Hefestämmen.

Das AP „Pathway Engineering“ hat die Entwicklung eines optimalen Syntheseweges (Pathway Engineering) zum Ziel, in dem die optimale Genkombination und -dosis bestimmt werden sollen. Die Implementierung des Betulinsäuresyntheseweges in *S. cerevisiae* erfordert die Expression der Gene für eine Oxidosqualenzylase (OSC) sowie einer Cytochrom P450 Monooxygenase (CYP) und einer kompatiblen NADPH-Cytochrom P450 Reduktase (CPR) (Abb. 2). Dass die Synthese von Betulinsäure in *S. cerevisiae* nach heterologer Expression entsprechender Gene prinzipiell möglich ist, wurde bereits gezeigt [7]. Um hohe Umsatzraten der heterologen Gene bzw. der gebildeten Enzyme und somit auch hohe Titer an Betulinsäure zu gewährleisten, sollen innerhalb des Projektes mehrere Gene für jede heterologe Enzymreaktion in verschiedenen Kombinationen getestet werden und die optimale Genkombination und Dosis, die maximale Produktivität ermöglicht, identifiziert werden.

Durch Anwendung geeigneter Metabolic Engineering Maßnahmen (*push* oder *block* Strategien) im AP „Stamm Engineering“ soll die Verfügbarkeit der Vorstufen des Syntheseweges optimiert werden. Angestrebt wird eine Verbesserung der Bereitstellung der Vorstufen durch Erhöhung der Aktivität der Upstream-Enzyme (*push*) und das Ausschalten oder Regulieren von konkurrierenden Stoffwechselwegen, d.h. Synthesewegen, die die direkte Vorstufe 2,3-Oxidosqualen verbrauchen (*block*). Zudem sollen weitere Metabolic Engineering Strategien mit Hilfe von computergestützten Simulation abgeleitet werden.

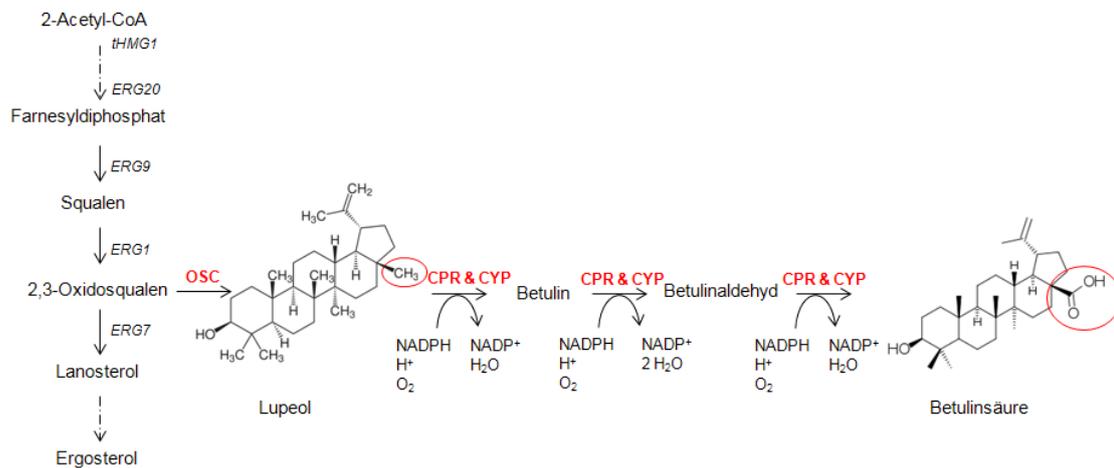


Abbildung 2. Prä- und Postsqualenbiosyntheseweg in der Hefe *S. cerevisiae* und Erweiterung des Stoffwechselweges für die Synthese des zyklischen Triterpenoids Betulinsäure über die Plattformsubstanz Lupeol. Die Gene für die Synthese der Betulinsäure sind in der Abbildung rot dargestellt und kodieren für Oxidosqualenzyklase (OSC), NADPH-Cytochrom P450 Reduktase (CPR) und Cytochrom P450 Monooxygenase (CYP).

Es ist unklar, ob Betulinsäure und die Vorstufe Lupeol von der Hefe hauptsächlich ausgeschieden oder in der Zelle angereichert und gespeichert werden. Ersteres ist vorteilhaft, da dieses die Aufreinigungskosten nach der Fermentation stark reduziert und gleichzeitig der Einsatz von Lösungsmittel nochmals signifikant vermindert. Im Laufe des Projektes sollen homologe oder heterologe Produkttransporter identifiziert werden, die einen Transport der Metabolite aus der Zelle zulassen oder verbessern. Zudem waren Alternativen hierzu, z. B: Erhöhung der Löslichkeit durch die Glycosylierung oder die Einlagerung in Oleosome angedacht (*pulling* Strategien).

Einige essentielle Enzyme des Betulinsäuresyntheseweges sind in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert. Im AP „Kompartiment Engineering“ sollte durch genetische Manipulation die Oberfläche des ERs vergrößert werden, damit mehr Enzyme des Mevalonat-Squalenstoffwechselwegs eingebaut werden können und eine erhöhte enzymatische Aktivität und erhöhte Produktionsrate durch den Stoffwechselweg ermöglicht wird. Hierfür sollen geeignete genetische Perturbationen implementiert und mit Hilfe von moderner Fluoreszenzmikroskopie die Größe der ER Oberfläche vermessen werden, sowie die vielversprechendste Strategie auf die Betulinsäure produzierenden Stämme angewendet werden.

Die Entwicklung von Hochleistungsstämmen soll im Kontext der industriell relevanten Fermentation und Produktaufreinigung erfolgen [8]. Speziell bei Bäckerhefe unterscheidet sich die Physiologie auf Glukose unter Satz- und Zulaufbedingungen erheblich. Deshalb werden Versuche zur quantitativen Beschreibung der Physiologie entwickelter Produktionsstämmen durchgeführt und darauf aufbauend etablierte Fermentationsprotokolle für die Produktion von zyklischen Triterpe-

nen adaptiert. Dabei steht zunächst die Verfügbarkeit der C-Quelle und Sauerstoff, sowie die Medienkomposition (auch hinsichtlich Preis, Umweltaspekte) im Vordergrund. Unter Anwendung dieser optimierten Parameter werden dann verschiedene Fermentationsfahrweisen getestet und optimiert, wobei moderne Laborfermenter (inkl. modernster Abgasanalytik) eingesetzt werden.

Für die ökonomisch und ökologisch sinnvolle Produktion ist die Produktisolation von großer Bedeutung. Deshalb werden unterschiedliche organische Lösungsmittel(-kombinationen) auf ihre Extraktionseffizienz und Umwelteinfluss inklusive ihrer Rezyklierbarkeit bewertet. Diese Arbeiten werden im Unterauftrag (15.000 € Fördermittel, Partner RWTH) vergeben. Ebenfalls ist die Möglichkeit der Schaumfraktionierung zu testen.

Den etablierten Produktionsprozess gilt es abschließend hinsichtlich Wirtschaftlichkeit und Umweltfreundlichkeit zu evaluieren und mit einem existierenden Referenzprozess zu vergleichen.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung der Biosynthese zyklischer Triterpene in Hefe

Im Rahmen des Projektes wurden Stämme konstruiert, welche das zyklische Triterpen Betulin-säure über das Zwischenprodukt Lupeol produzieren (Abb. 2). Hierfür wurden ein gängiger Labor-sowie ein Squalen-überproduzierender Stamm der Spezies *Saccharomyces cerevisiae* als Wirtsorganismus verwendet. Die zu exprimierenden Gene kodieren für eine Oxidosqualenzyklase (*OSC*), eine NADPH-Cytochrom P450 Reduktase (*CPR*) und eine Cytochrom P450 Monooxygenase (*CYP*).

Im Zuge der Literaturrecherche zu den erforderlichen Genen wurde deutlich, dass insbesondere die *CPR* eine zentrale Rolle für die Funktionalität der Monooxygenase spielt. *CPRs* bilden einen Komplex mit *CYPs* und transferieren zwei Elektronen über FAD und FMN an die *CYPs*. Die Interaktionen von *CYP* und *CPR* sind sehr von den individuellen Eigenschaften der jeweiligen Proteine abhängig und daher ihre Effizienz nur schwer vorhersehbar. Ein effizienter Elektronentransport ist jedoch entscheidend für die Reaktion der Cytochrome [9,10]. Abweichend vom ursprünglichen Plan wurden daher zusätzliche *CPRs* getestet, um ein optimales Zusammenspiel von *CYP* und *CPR* zu ermöglichen.

4.1.1 Auswahl eines geeigneten Basisstammes

Als Basisstamm wurde ein Stamm gewählt, der hohe Mengen der Vorstufe Squalen bildet. Basierend auf dem Ausgangsstamm CEN.PK111-61A wurden zwei Hefestämme CEN.PK2A und CEN.PK2U erstellt (Tab.1, eine Übersicht zu allen konstruierten Hefestämmen findet sich im Anhang A1), die eine deregulierte HMG-CoA-Reduktase besitzen [11]. Beim Stamm CEN.PK2A liegt das Gen für die deregulierte HMG-CoA-Reduktase im *ARE2*-Lokus und bei CEN.PK2U im *URA3*-Lokus chromosomal integriert vor. Dabei wurde die chromosomale gegenüber der episomalen Modifikation bevorzugt, um das wichtige Kriterium der Stammstabilität eines Produktionsstammes zu erfüllen. Beide Stämme wurden auf die Parameter Wachstum und Squalenproduktion untersucht und miteinander verglichen. Die Hefestämme CEN.PK2A und CEN.PK2U wurden hierfür einer 72 h Kultivierung in Schüttelkolben in WM8-Medium mit 50 g/L Glukose unterzogen. Anschließend wurde ein definiertes Volumen der Kulturbrühe mit Glasperlen aufgeschlossen und mit Chloroform/Methanol (4+1) extrahiert. Mittels der entwickelten GC-MS Analyse konnte Squalen identifiziert und quantifiziert werden, dabei wurde die Menge an Squalen über eine Kalibriergerade bestimmt und auf die eingesetzte Biotrockensubstanz bezogen. Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse

dieser Analyse.

Tabelle 1: Spezifischer Squalengehalt der Hefestämme, welche eine deregulierte HMG-CoA-Reduktase besitzen. Die Stammkonstruktion basiert auf dem Ausgangsstamm CEN.PK111-61A (Genotyp: *MAT α* ; *ura3-52*; *leu2-3_112*; *TRP1*; *his3- Δ 1*; *MAL2-8C*; *SUC2*). Die angegebenen Stämme wurden einer 72 h Kultivierung in WM8-Medium mit 50 g/L Glukose unterzogen und der Squalengehalt auf die Biotrockensubstanz bezogen. Die Daten stellen den Mittelwert aus sechs unabhängigen Messungen mit der Standardabweichung dar.

	Name	Integrationslokokus	Squalen [% (g/g _{CDW})]
Ausgangsstamm	CEN.PK111-61A	--	0,04 ± 0,01
squalenanreichernde Hefen	CEN.PK2A	<i>are2::tHMG1</i>	3,8 ± 1,1
	CEN.PK2U	<i>ura3::tHMG1</i>	8,1 ± 1,2

Der Stamm CEN.PK2U erreichte nach 72 h Kultivierung eine Ausbeute von etwa 8% Squalen/CDW, wohingegen der Stamm CEN.PK2A nur etwa 4% Squalen/CDW enthielt. Aus der Bestimmung der Biotrockensubstanz und der optischen Dichte ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Wachstum (nicht dargestellt). Der Stamm CEN.PK2U wurde aufgrund dieser höheren Vorstufen- ausbeute als Basisstamm für die Evaluierung verschiedener heterologer Gene der Betulinsäure- Synthese ausgewählt (Abschnitt 4.2).

Parallel hierzu wurde ein zweiter Stamm auf Basis der Hefe *S. cerevisiae* CEN.PK 102-5B (*URA*⁻; *HIS*⁻; *LEU*⁻, Genotyp: *MAT α* , *ura3-52*, *his3 Δ 1*, *leu2-3/112* *MAL2-8c* *SUC2*) vorgenommen. Auch in die- sem Stamm wurde das trunkierte *tHMG1* Gen überexprimiert. Zusätzlich wurde das Gen *ARE2* (Acyl-CoA:sterol Acyltransferase) deletiert, um eine Esterifizierung der Sterole zu verhindern. Die- ser Stamm CFB1010, diente als Ausgangsstamm für die Evaluation neuer Metabolic Engineering Strategien (4.1.3).

4.1.2 Konstruktion eines Betulinsäureproduzenten

Lupeol ist eine wichtige Vorstufe von Betulinsäure, die nicht in Hefen gebildet wird. Zur Konstruktion Lupeol-produzierender Hefestämme auf Basis von CEN.PK111-61A sowie CEN.PK2U wurde dementsprechend zunächst das Gen der heterologe, monofunktionale Oxidosqualenzylklase (*OEW*) aus *Olea europaea* eingebracht, die 2,3-Oxidosqualen zu Lupeol umsetzt. Dieses Gen wurde ausgewählt, um Lupeol möglichst ohne Nebenprodukte zu erhalten [12]. Des Weiteren wurden die Hefestämme mit den Genen für die NADPH-Cytochrom P450 Reduktase *LjCPR1* (Ursprung: *Lotus japonicus*) und die Cytochrom P450 Monooxygenase *CYP716A9* aus *Vitis vinifera* transformiert (Tab. 2).

Nach der Transformation wurden die Hefestämme im Schüttelkolbenmaßstab einer Wachstums- und Produktanalyse unterzogen, wobei die Hauptkultur sechs Tage geführt wurde. Ergänzend zur Squalen-Analyse wurde bei der Analyse der pentazyklischen Triterpene die Kulturbrühe mit 1 M HCL und einem internen Standard (Stigmasterol) aufgeschlossen. Nach Derivatisierung mit N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (MSTFA) sind die pentazyklischen Triterpene als TMS-Derivate über GC-MS analysierbar. Die Mengen an Squalen und pentazyklischen Triterpenen wurden über entsprechende Kalibriergeraden bestimmt und auf das eingesetzte Kulturvolumen bezogen. In Tabelle 2 sind für den Vergleich der Stämme die Ergebnisse der GC-MS Analytik zusammengefasst.

Die neu konstruierten Hefestämme, sowohl auf Basis von CEN.PK2U mit einer deregulierten HMG-CoA-Reduktase als auch auf Basis von CEN.PK111-61A waren in der Lage, pentazyklische Triterpene zu produzieren. Durch die Aktivität des *CPR*- und *CYP*-Komplexes wurde Lupeol weiter zu dem Triterpenoid-Alkohol Betulin als Vorstufe von Betulinsäure umgesetzt. Betulin wurde in beiden Stämmen detektiert, Betulinsäure aber nur im transformierten Basisstamm CEN.PK2U.

Alle Produkte wurden anhand der Retentionszeit und über das Massenspektrum der Referenzsubstanzen identifiziert. Die Entstehung von Lupeol, Betulin und Betulinsäure spiegeln die Funktionalität der ausgewählten heterologen Gene wider.

Der Stamm CEN.PK2U pTT1-*OEW* pTT2-*LjCPR1-A9*, der eine größere Menge der Vorstufe Squalen bildete, produzierte im Vergleich zum CEN.PK111-61A pTT1-*OEW* pTT2-*LjCPR1-A9* sowohl Betulinsäure als auch größere Mengen an Lupeol (+30%) und Betulin (+ 51%). Dies zeigt, dass die Deregulation der HMG-CoA Reduktase einen positiven Einfluss auf die Produktion von Triterpenoiden hat. Das Ziel, einen Betulinsäureproduzenten zu konstruieren, wurde somit erreicht. Jedoch waren die erreichten Gehalte gering. Zudem weist die Akkumulation der Vorstufen Lupeol und Betulin und vor allen Dingen Squalen weisen auf Limitierungen im heterologen Betulinsäuresyntheseweg hin.

Tabelle 2: Übersicht der konstruierten Betulinsäureproduzenten sowie das Wachstum und die Triterpenoidproduktion. Die Ausgangsstämme CEN.PK111-61A und CEN.PK2U wurden mit den Plasmiden pTT1-*OEW* sowie pTT2-*LjCPR1-A9* transformiert. Die angegebenen Stämme wurden sechs Tage in WM8-Medium mit 50 g/L Glukose kultiviert und mittels GC-MS analysiert. Die Daten sind mit Standardabweichung angegeben, CDW und Triterpenoidgehalte wurden im Duplikat bestimmt.

Stamm	Hintergrund	Plasmide	CDW [g/L]	Squalen [mg/L]	Lupeol [mg/L]	Betulin [mg/L]	Betulinsäure [mg/L]
CEN.PK111-61A (Ausgangsstamm)	-	pTT1- <i>OEW</i> , pTT2- <i>LjCPR1-A9</i>	10,7 ± 0,7	91,4 ± 11	63,1 ± 9,5	4,6 ± 0,7	-
CEN.PK2U (Basisstamm)	tHMG1	pTT1- <i>OEW</i> , pTT2- <i>LjCPR1-A9</i>	12,9 ± 0,02	704,3 ± 98	82,6 ± 3,5	6,9 ± 0,3	3,8 ± 0,01

4.1.3 Entwicklung eines Stammes mit erhöhter 2,3-Oxidosqualen Verfügbarkeit

Um Stämme mit erhöhten intrazellulären 2,3-Oxidosqualenwerten zu konstruieren, wurden eine *block*-, und eine *push*-Strategie entwickelt. Die *block*-Strategie zielte auf die Unterbrechung des nativen Ergosterolsyntheseweges nach dem Intermediat 2,3-Oxidosqualen, um dessen Akkumulation zu erwirken und somit einen erhöhten Fluss in den heterologen Betulinsäuresyntheseweg zu ermöglichen. Hierzu wurden zwei Strategien getestet, die die Lanosterolsynthaseaktivität durch gezielte Proteindegradation oder durch Kontrolle der Expression steuern. Für diese Strategien ist die Wahl geeigneter Promotoren sehr wichtig, weshalb zuerst mögliche induzierbare oder wachstumsphasenabhängige Promotoren evaluiert wurden. Abschließend wurde ein aus der Literatur bekannter Betulinsäuresyntheseweg zur Evaluation der Strategien in die Zellen eingebracht.

4.1.3.1 Charakterisierung von geeigneten Promotoren

Zur Charakterisierung geeigneter Promotoren wurden diese zur Expression einer speziellen Form des GFPs (Green Fluorescent Protein), das 3vGFP, genutzt, welches ein Fusionsprotein aus drei unterschiedlichen GFPs, GFP(+); yeGFP und superfolder GFP (sfGFP), ist [13] und sich durch eine verstärkte Fluoreszenz auszeichnet (Abb. 3).

In einem ersten Schritt zur kontrollierten Expression der Tobacco Etch Virus (TEV) Protease (siehe 4.1.3.2.1) wurde der durch Kupfer induzierbare *CUP1* Promoter (P_{CUP1}) genutzt. Die Stämme mit dem getaggten Erg7p Protein und der TEV Protease unter P_{CUP1} Kontrolle waren in der Lage 2,3-Oxidosqualen zu akkumulieren. Dies geschah jedoch auch ohne die Zugabe von Kupfer zum Medium, was darauf schließen lässt, dass die Kontrolle durch P_{CUP1} nicht streng genug ist. Wie in Abbildung 4 zu sehen ist, zeigt das P_{CUP1} -3vGFP Konstrukt ohne die Zugabe von Kupfer eine signifikant erhöhte Fluoreszenz im Vergleich zur Wildtypkontrolle. In einer früheren Veröffentlichung über TIPI (TEV protease induced protein instability) wurde zur Expressionskontrolle der sehr streng regulierte Promotor der Serin/Threonin Proteinkinase (*IME2*) verwendet, welche in der Aktivierung der Meiose involviert ist [14]. Zur Verwendung der TEV Protease in diesem Projekt musste also ein Promotor gewählt werden, der die Genexpression sehr strikt kontrolliert und gut auf einen externen Faktor zur Induktion anspricht, um einen effektiven Proteinabbau zu gewährleisten. Mögliche Promotoren sind Glukose regulierte Promotoren, wie P_{HXT7} (*HXT7* kodiert für einen hoch affinen Glukosetransporter) oder P_{ADH2} (*ADH2* kodiert die Glukose reprimierte Alkoholdehydrogenase II), welche beide während des Wachstums in glukosereichem Medium, wie es in der ersten exponentiellen Wachstumsphase der Fall ist, reprimiert sind. Außerdem wurde ein Fusionspromotor, der aus dem *CUP1* Promotor und einem Teil des *SPO13* (Meiotischer Regulator) Promotors besteht, in Erwägung gezogen. *SPO13* ist durch zwei UME6 (Unscheduled Meiotic gene Expression) Bindestellen sehr stark reguliert [13]. Durch die Kombination des induzierbaren Kupferpromotors und des stark kontrollierten *SPO13* wird erreicht, dass die basale Expression stark vermindert wird, eine Induktion durch die Zugabe von Kupfer jedoch immer noch gewährleistet ist (Abb. 4).

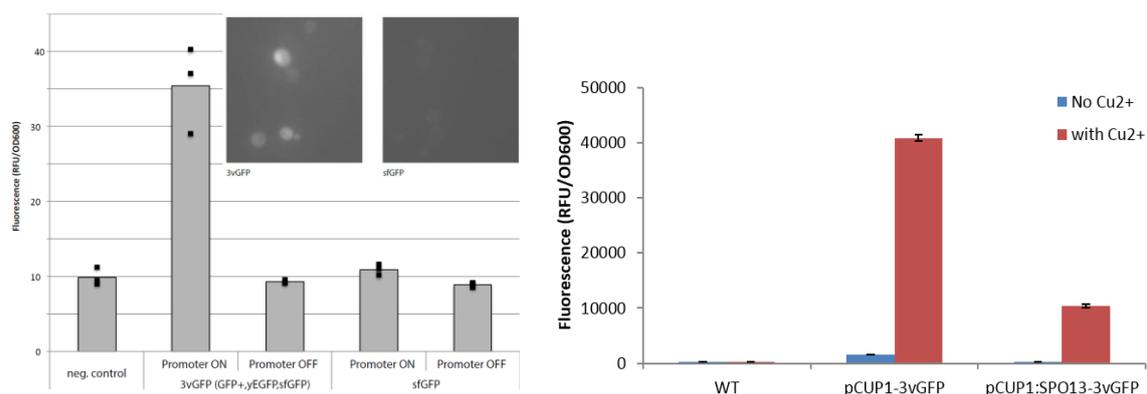


Abbildung 3: Vergleich der Fluoreszenz von 3vGFP und sfgFP mit der Autofluoreszenz eines Wildtypstammes (*S. cerevisiae* CEN.PK)

Abbildung 4: Fluoreszenz des Wildtypstammes, des PCUP1-3vGFP (CK24) und des PCUP1-SPO13-3vGFP Stammes (CK28), gemessen nach Kultivierung in Medium mit (rot) und ohne (blau) Kupfer.

Die oben genannten Promotoren und der native *ERG7* Promotor wurden durch USER-Klonierung [15] vor das 3vGFP in den integrativen EASY-Clone Vektor pCFB258 [15] geklont und danach stabil

in das Genom des Ausgangsstammes CFB1010 an die Easyclone Integrationsstelle 3 auf Chromosom 10 (X-3) integriert. Die entstandenen Stämme (CK24, P_{CUP1} ; CK25, P_{ADH2} ; CK26, P_{HXT7} ; CK28, $P_{CUP1-SPO13}$) wurden im Mikrotitermaßstab im Biolector (m2p labs, Baesweiler, Deutschland) kultiviert und Daten zur Biomassekonzentration und des GFP-Signals in Abständen von 15 min aufgenommen (Abb. 5).

Die Stämme zeigten keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Wachstums, der Verlauf des GFP Signals war jedoch, wie erwartet, unterschiedlich. Für den Stamm CK25 (P_{ADH2}) war das Signal zuerst sehr schwach, stieg dann leicht nach Ende der Glukosephase an und zeigte einen steilen Anstieg zu Beginn der Ethanolphase. Das GFP Signal des Stammes CK26 (P_{HXT7}) startete zu Anfang auf einem leicht erhöhten Wert und blieb relativ konstant bis kurz vor Ende der Glukosephase, in der es steil anstieg. Während der zweiten Wachstumsphase schwächte sich der Anstieg wiederum ab. Die Stämme CK24 und CK28 wurden unter vergleichbaren Bedingungen wie oben beschrieben getestet, jedoch wurden hier Kultivierungen mit und ohne Kupfer verglichen. Dieser Vergleich zeigte eine deutliche Erhöhung des GFP Signals in den Kultivierungen von CK24 in Kupfer enthaltendem Medium (Abb. 4). Für den Stamm CK28 konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Kupferkonzentrationen festgestellt werden. Dies könnte damit erklärt werden, dass das Signal zu schwach ist, um über das Hintergrundsignal des Mediums zu kommen. Um feinere Unterschiede zu detektieren, wurden Proben einer ähnlichen Kultivierung gewaschen und das GFP Signal in einem Mikrotiterplattenlesegerät quantifiziert (Abb. 4). Hier zeigte sich, dass das nicht induzierte Signal (kein Kupfer im Medium) sehr nah an der Autofluoreszenz des Wildtypstammes liegt, das durch Kupfer induzierte Signal jedoch deutlich erhöht ist.

Die Ergebnisse der Promotorcharakterisierung zeigen, dass beide glukoseabhängigen Systeme (P_{ADH2} , P_{HXT7}) ein sehr gutes Ansprechverhalten haben, der $HXT7$ Promotor jedoch eine erhöhte basale Aktivität hat, welche bereits zu vermehrter TEV Proteaseexpression führen könnte. Die Ergebnisse zur Charakterisierung des $CUP1$ Promotors zeigen, dass dieser eine zu starke Basalaktivität zeigt und deshalb für die Degronstrategie nicht zu empfehlen ist (siehe 4.1.3.2.1). Der Fusionspromotor $CUP1-SPO13$ zeigte ein vielversprechendes Aktivitätsverhalten, mit sehr schwacher Basalaktivität und guter Induzierbarkeit.

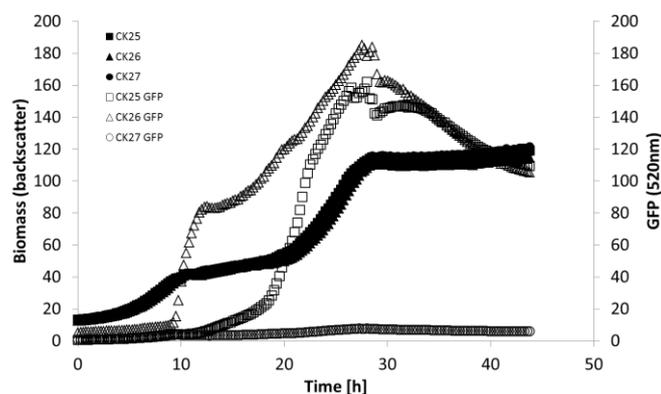


Abbildung 5: Verlauf des GFP Signals (520nm, leere Symbole) und der Biomasse (backscatter, gefüllte Symbole) der Stämme CK25 (P_{ADH2} -3vGFP, Quadrate), CK26 (P_{HXT7} -3vGFP, Dreiecke) und CK27 (P_{PERG7} -3vGFP, Kreise) während Kultivierung in Delft Medium mit 2% Glukose im Biolector bei 30°C und 1000 U/min

4.1.3.2 Blockstrategie

Zur Reduktion der Lanosterolaktivität und somit dem Abfließen der Betulinsäure-Vorstufe 2,3-Oxidosqualen in den Ergosterolsyntheseweg wurden zwei Strategien getestet die die Lanosterolaktivität durch gezielte Proteindegradation (4.1.3.2.1) oder durch Kontrolle der Expression (4.1.3.2.2) steuern.

4.1.3.2.1 Degronstrategie

Die Degronstrategie wirkt direkt auf der Proteinebene. Dies wird dadurch erzielt, dass das Zielprotein mit einer Degronkassette (Abb. 4) getagged wird. Zusätzlich wird die Tabacco Etch Virus (TEV) Protease unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors exprimiert.

Die Degronkassette enthält eine interne TEV Proteaseschnittstelle und dormante unstrukturierte Degronelemente. Im nicht induzierten Zustand ist das Zielenzym funktionell und in den natürlichen Konzentrationen innerhalb der Zelle vorhanden. Eine Induktion der TEV Proteaseexpression führt zur gezielten Proteolyse und damit zur Enthüllung der Degronelemente, was einen raschen Abbau des Proteins bewirkt. Mit dieser Strategie soll ein schneller Wechsel von der Phase zur Biomasseproduktion zur Produktionsphase der Triterpene (während der Ethanolphase oder in einem Ethanol Zulaufverfahren) gewährleistet werden.

Die Degronkassette wurde hinter dem *ERG7* Gen in den Stamm CFB1010 kloniert, was zum Stamm CFB2105 führte. Des Weiteren wurden die oben getesteten Promotoren vor das Gen der TEV Protease in den integrativen USER Vektor pCFB258 kloniert. Diese Konstrukte wurden in CFB2105 kloniert. Die entstanden Stämme CK11 (P_{CUP1}), CK41 (P_{ADH2}), CK42 (P_{HXT7}) und CK43 ($P_{CUP1-SPO13}$) wurden anschließend in Minimalmedium kultiviert. Zuerst wurde die Induktion der TEV Protease Expression durch den nativen CUP1 Promoters getestet, indem der Stamm CK11 in Minimalmedium mit Kupferkonzentrationen von 0; 0,3; 0,6 und 1,2 mM kultiviert wurde. Wie schon von den Ergebnissen der 3vGFP Versuche zu vermuten war, scheint die TEV Protease auch in nicht induziertem Zustand (0 mM) sehr aktiv zu sein, so dass 2,3-Oxidosqualen in allen getesteten Konzentrationen akkumuliert (Abb. 7).

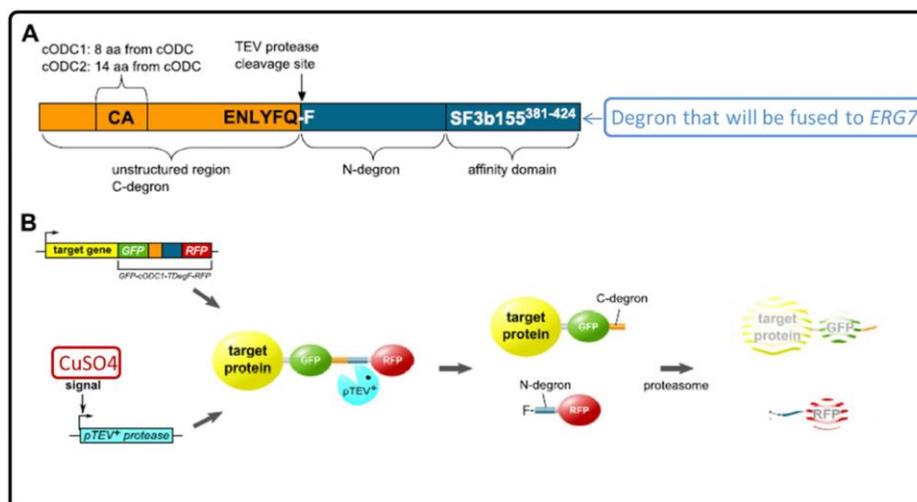


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Degronkassette (A) und der Funktion der Degronstrategie (B) (nach [16])

Zudem gab es unter den getesteten Transformanten eine breite Streuung. CK11 und Simo1578 (gleiche Modifikationen wie CK11) sind durchschnittlich gut bezüglich 2,3-Oxidosqualenakkumulation (Abb. 8) während in Kultivierungen des Stammes Simo1575 eine mehr als die doppelte 2,3-

Oxidosqualen Akkumulation zu verzeichnen war. Die 2,3-Oxidosqualenkonzentration in den beiden Stämmen CK41 und CK42 wurde jeweils gegen Ende der Glukosephase und am Ende der Ethanolphase bestimmt. Hier zeigte sich, dass 2,3-Oxidosqualen in beiden Stämmen auch schon am Ende der Glukosephase akkumuliert. Das lässt darauf schließen, dass auch diese Promotoren die Expression der TEV Protease nicht strikt genug kontrollieren. Der Stamm CK43 wurde auch in Minimalmedium evaluiert; jedoch wurden hier Kupferkonzentrationen von 0; 15 und 150 μM getestet. Die Messung des 2,3-Oxidosqualens ergab jedoch, dass der Stamm in keiner der untersuchten Konzentrationen 2,3-Oxidosqualen akkumuliert. Zusammengefasst ist zu sagen, dass der Gebrauch der Degronstrategie für Metabolic Engineering Ansätze sehr von der Wahl der Promotoren abhängig ist. Es ist äußerst schwierig hier den richtigen Promotor zu finden, der den Anforderungen bezüglich Stringenz und Induzierbarkeit genügt.

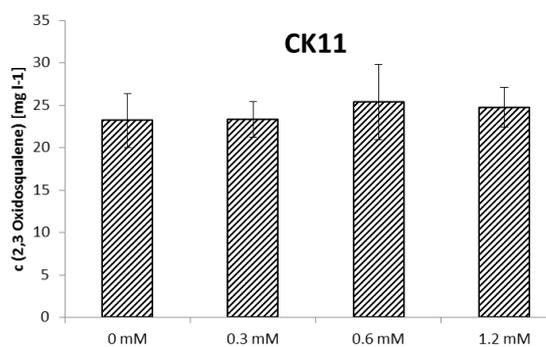


Abbildung 7: 2,3-Oxidosqualen Konzentration in Kulturen von CK11 (P_{CUP1}) mit unterschiedlichen Kupferkonzentrationen.

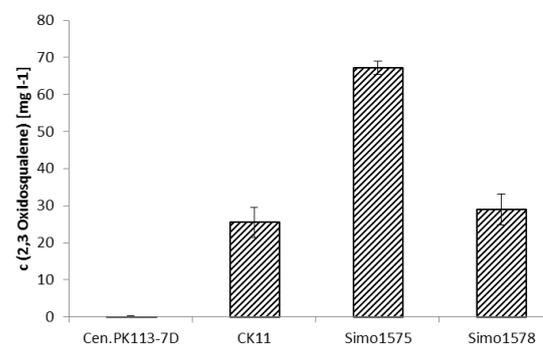


Abbildung 8: 2,3-Oxidosqualen Konzentrationen von CK11, Simo1575 und Simo1578 im Vergleich zum Wildtypstamm *S. cerevisiae* CEN.PK113-7D

4.1.3.2.2 Direkte Transkriptionskontrolle

Neben dem gezielten Proteinabbau wurde auch die Möglichkeit der Transkriptionskontrolle von *ERG7* getestet. Hierzu wurde mit Hilfe des CrispR/Cas9 Systems der native *ERG7* Promotor gegen den *HXT1* Promotor ausgetauscht, der eine geringe Affinität zu Glukose hat. Dieser Promoter wurde schon in vorherigen Studien zur Umlenkung des Metabolismus in einen heterologen Stoffwechselweg genutzt [17]. In einer ersten Evaluierung des entstandenen Stammes CK51 zeigte dieser jedoch nur Wachstum während der Glukosephase, in welcher der *HXT1* Promotor eine ausreichende Expression der Lanosterolsynthase gewährleistet. Wenn dann aber die Glukosekonzentration gegen Ende der Glukosephase zu gering wird, scheint P_{HXT1} die Expression so stark zu regulieren, dass die Zellen nicht mehr wachsen können.

4.1.3.3 Push Strategie

Die genetischen Modifikationen im Ausgangsstamm CFB1010 resultierten in Akkumulation von Squalen. Um dieses Intermediat verstärkt zu 2,3-Oxidosqualen umzusetzen, wurde das Gen der Squalenepoxidase (*ERG1*) überexprimiert (*push* Strategie). Hierzu wurde der konstitutive *TDH3* Promotor vor das native *ERG1* Gen in den EasyClone Vector pCFB258 kloniert und in den Stamm CFB1010 transformiert. Zusätzlich wurde der Betulinsäuresyntheseweg durch Expression der heterologen Gene *AtLUP1* (Oxidosqualenzylase) und *CYP716AL1* (P450 Monooxygenase, s. auch Abschnitt 4.2) mit Hilfe eines einfach integrativen Vektors (pCFB255, Chromosom 10, USER site 2) und mit Hilfe des multicopy integrativen Vektors pCFB322 (TY Integration) in den Stamm einge-

bracht. Nach erstem Screening der Transformanten zeigte sich, dass das Spektrum an Betulinsäurekonzentrationen sehr stark streut, was auf eine unterschiedliche Anzahl an Integrationsevents und damit variierender Gendosis zurückzuführen ist. Der beste Transformant erreichte eine Betulinsäurekonzentration von 30 mg/L.

4.2 Variation der heterologen Gene

Die Ergebnisse der vorangegangenen Abschnitt zeigen, dass *S. cerevisiae* nach Transformation mit den notwendigen Genen in der Lage ist, Betulinsäure zu produzieren. Mit einer umfangreichen Untersuchung verschiedener Kombinationen von Genen für Oxidosqualenzylase, NADPH-Cytochrom P450 Reduktase und Cytochrom P450 Monooxygenase wurde eine verbesserte Enzymkombination zur Steigerung der Ausbeuten der Triterpenoide Lupeol, Betulin und Betulinsäure identifiziert. Dafür wurden die in Tabelle 3 aufgeführten Gene in die Plasmide pTT1 und pTT2 kloniert und damit die Stämme CEN.PK111-61A und CEN.PK2U transformiert.

Tabelle 3: Übersicht der getesteten Gene für die Synthese von Betulinsäure. Die Gene kodieren für Oxidosqualenzylase (OSC), NADPH-Cytochrom P450 Reduktase (CPR) und Cytochrom P450 Monooxygenase (CYP).

	Genname	Ursprungsorganismus	Referenz
OSC	<i>OEW</i>	<i>Olea europaea</i> (Olivenbaum)	[12]
	<i>GuLUP1</i>	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> (Süßholz)	[7]
CPR	<i>LjCPR1</i>	<i>Lotus japonicus</i> (Hornklee)	[18]
	<i>ATR1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Acker-Schmalwand)	[19]
	<i>CrCPR</i>	<i>Catharanthus roseus</i> (Hundsgiftgewächse)	[20]
	<i>MTR_3g100160</i>	<i>Medicago truncatula</i> (Schneckenklee)	[21]
	<i>NCP1 (CPR1)</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Hefe)	[22]
CYP	<i>CYP716A15</i>	<i>Vitis vinifera</i> (Weinrebe)	[7]
	<i>CYP716A17</i>	<i>Vitis vinifera</i> (Weinrebe)	[7]
	<i>CYP716A12</i>	<i>Medicago truncatula</i> (Schneckenklee)	[7]
	<i>CYP716AL1</i>	<i>Catharanthus roseus</i> (Hundsgiftgewächse)	[23]
	<i>CYP716A9</i>	<i>Populus trichocarpa</i> (Pappel)	[24]
	<i>CYP716B2</i>	<i>Glycine max</i> (Sojabohne)	BioProject: PRJNA48389
	<i>CYP716A41</i>	<i>Bupleurum chinense</i> (Chin. Hasenohr)	[25]
	<i>CYP716B1</i>	<i>Cucumis sativus</i> (Gurke)	BioProject: PRJNA182750

4.2.1 Optimierung der Betulinsäuresynthese durch Kombination geeigneter Oxidosqualenzylase und P450 Monooxygenase Gene

In einem ersten Schritt wurden die Oxidosqualenzylase-Gene *OEW* und *GuLUP1* in dem Ausgangsstamm CEN.PK111-61A sowie im squalenanreichernden Stamm CEN.PK2U hinsichtlich Wachstum und Lupeol-Produktivität untersucht und miteinander verglichen. Nach Kultivierung im Schüttelkolbenmaßstab für 48 h, 72 h und 93 h in WM8-Medium mit 5% Glukose, wurde die Ausbeute an Lupeol mittels der etablierten GC-MS Analytik quantifiziert.

Zusammengefasst lässt sich aus den Ergebnissen (Tab 4) erkennen, dass CEN.PK2U transformiert mit *OEW* ein deutlich besseres Wachstum und eine höhere Lupeol-Produktivität als CEN.PK2U transformiert mit *GuLUP1* aufweist. Ersterer produziert im Vergleich zum Ausgangsstamm CEN.PK111-61A transformiert mit *OEW* deutlich mehr Lupeol und zwar sind die Lupeolausbeuten nach 72 h um 42% und nach 93 h um 56% höher. Daher wurde die Oxidosqualenzylase *OEW* auf dem Plasmid pTT1-*OEW* und der Stamm CEN.PK2U für die Untersuchung weiterer Kombinationen von *CRP/CYP* Genen ausgewählt.

Tabelle 4: Wachstum und Lupeolgehalte der Stämme CEN.PK111-61A und CEN.PK2U transformiert mit pTT1-*GuLUP1* bzw. pTT1-*OEW* nach 48 h, 72 h und 93 h-stündigen Kultivierung in WM8-Medium mit 50 g/L Glucose. Die Daten beruhen bei der Biotrockensubstanz (CDW) auf einer Dreifachbestimmung und die Lupeolgehalte auf einer Doppelbestimmung mit einer Standardabweichung von unter 10%.

Stamm	Plasmid	CDW [g/L]			Lupeol [mg/L]		
		48 h	72 h	93 h	48 h	72 h	93 h
CEN.PK111-61A	pTT1- <i>GuLUP1</i>	5,9	9,6	10,9	44,3	79,5	90,3
CEN.PK111-61A	pTT1- <i>OEW</i>	5,5	9,5	10,6	38,6	83,2	88,4
CEN.PK2U	pTT1- <i>GuLUP1</i>	3,7	5,3	7,5	54,4	67,5	81,9
CEN.PK2U	pTT1- <i>OEW</i>	10,6	11,8	11,9	92,0	129,9	125,8

Der Stamm CEN.PK2U pTT1-*OEW* wurde im Weiteren mit den Genen für die *CPR* und *CYP*-Enzyme auf einem pTT2-Plasmid transformiert und einer Wachstums- und Produktanalyse für pentazyklische Triterpenoide im Schüttelkolbenmaßstab unterzogen. Es wurden dabei die verschiedenen *CYP*-Gene (Tab. 3) mit dem *CPR*-Gen *LjCPR1* kombiniert und die Triterpenoidbildung der Hefestämme miteinander verglichen (Abb. 9).

Die Ergebnisse machen deutlich, dass die Produktion der Betulinsäure deutlich von der Wahl des Gens für das *CYP*-Enzym abhängig ist. Dies gilt sowohl hinsichtlich der volumetrischen Ausbeute als auch im Verhältnis der pentazyklischen Triterpene untereinander. Für die weiteren Optimierungen wurden die Gene *OEW* und *CYP-A15*, *A17* und *A9* verwendet und mit unterschiedlichen *CPR*-Genen (Tab. 3) kombiniert.

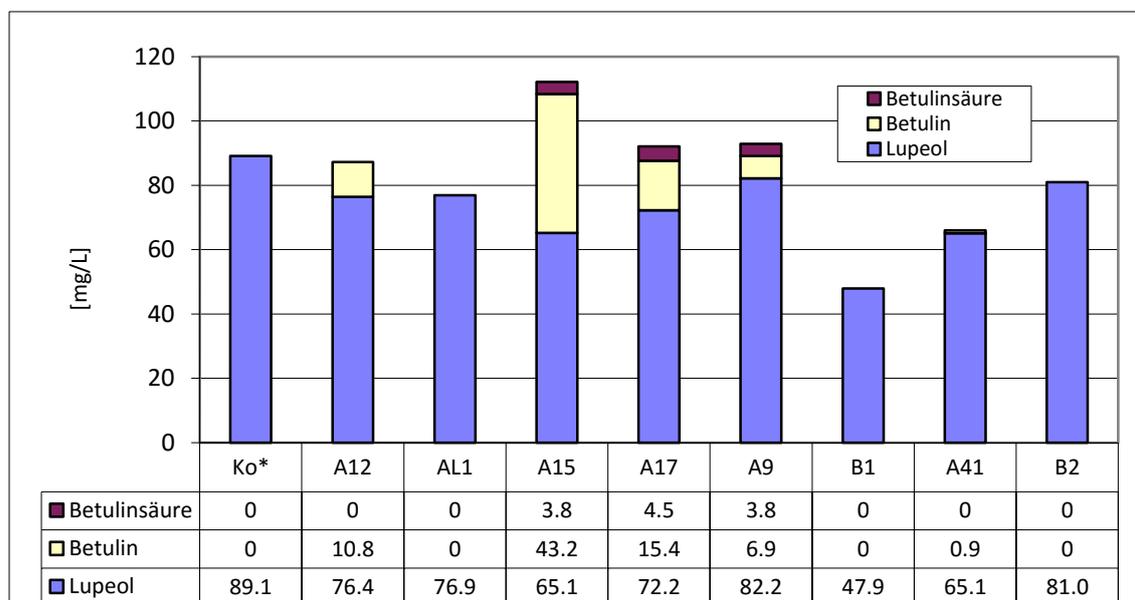


Abbildung 9: Ergebnisse der GC-MS Analytik. Gehalte der Triterpenoide/Kulturvolumen [mg/L] der Hefestämme CEN.PK2U pTT1-*OEW* mit dem *CPR*-Gen *LjCPR1* und den verschiedenen *CYP*-Genen nach Kultivierung in WM8-Medium für sechs Tage. Die *CYP*-Gene sind als Abkürzung angegeben (z.B. A12 entspricht *CYP716A12*). Die Daten beruhen auf Doppelbestimmungen. Ko* - ohne *LjCPR1* und *CYP*-Gen.

4.2.2 Optimierung der Betulinsäuresynthese durch Wahl der NADPH-Cytochrom P450 Reduktase (CPR) in Kombination mit ausgewählten CYP-Genen

Nachdem das Oxidosqualenzylase-Gen *OEW* und die *CYP*-Gene *A15*, *A17* und *A9* als vielversprechende Gene für die Produktion von Betulinsäure identifiziert wurden, galt es nun, eine passende NADPH-Cytochrom P450 Reduktase (*CPR*) auszuwählen, um eine bestmögliche Interaktion zwischen *CYP* und *CPR* gewährleisten zu können. Die *CYP*-Aktivität ist u.a. an die Interaktion mit der dazugehörigen *CPR* gekoppelt und spielt daher für die funktionelle heterologe Expression in Hefe eine essentielle Rolle.

Für die Stammkonstruktion wurde die Lupeol-produzierende Hefe CEN.PK2U pTT1-*OEW* mit einem der *CYP*-Gene *A15*, *A17* bzw. *A9* und mit einem der *CPR*-Gene *ATR1*, *NCP1*, *CrCPR* bzw. *MTR* transformiert. Nach Kultivierung im Schüttelkolbenmaßstab für 72 h in WM8-Medium, wurden die Stämme auf die Parameter Wachstum und Triterpenoidproduktion untersucht (Abb. 10). Die Triterpenoide wurden mittels der etablierten GC-MS Analytik (s. Abschnitt 4.1.2) identifiziert und quantifiziert.

Die erzeugten Stämme unterschieden sich im Gesamttiter der pentazyklischen Triterpene von 90 mg/L und 230 mg/L deutlich. Durch unterschiedliches Wachstum ist dieser Unterschied nicht zu erklären (CDW von 13-15 g/L). Alle Stämme wiesen Lupeol Anreicherung auf. In zwei Stämmen, welche das *CYP*-Gen *A15* in Kombination mit einer der *CPR*-Gene *CrCPR* bzw. *MTR* exprimierten, war zusätzlich eine deutliche Betulinanreicherung von bis zu 100 mg/L zu beobachten. Zudem wurden die direkte Betulinsäure-Vorstufe Betulinaldehyd als auch Betulinsäure selbst in höheren Mengen von bis zu 30 mg/L gemessen. Des Weiteren zeigten die Kombinationen aus dem *CYP*-Gen *A17* und einem der *CPR*-Gene *CrCPR* bzw. *MTR* ebenfalls erhöhte Mengen von je bis zu 25 mg/L für die Triterpenoide Betulinaldehyd und Betulinsäure.

Nur in einem der sechs untersuchten Stämme, welche das *CPR*-Gen *ATR* bzw. *NCP1* exprimierten, wurde sowohl die direkte Vorstufe Betulinaldehyd als auch Betulinsäure detektiert (Expression von *OEW*, *ATR* und *A17*). In vier dieser Stämme, welche die *CYP*-Gene *A15* bzw. *A17* in Kombination mit einer der *CPR*-Gene exprimierten, konnte die Vorstufe Betulin nachgewiesen werden.

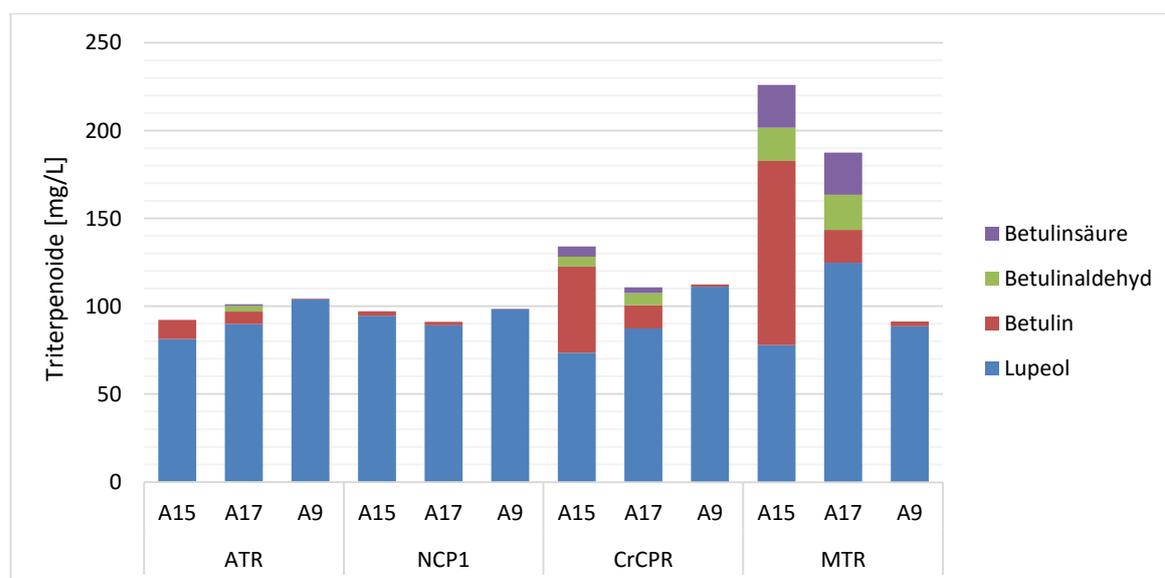


Abbildung 10: Triterpenoidproduktion der Hefestämme CEN.PK2U pTT1-*OEW* kombiniert mit einem der *CPR*-Gene *ATR*, *NCP1*, *CrCPR* oder *MTR* und mit einem der *CYP*-Gene *A15*, *A17* oder *A9*. Die Stämme wurden 72 h in WM8-Medium mit 5% Glukose kultiviert und mittels GC-MS analysiert. Die Daten beruhen auf dem Mittelwert von 2 untersuchten Klonen.

Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass bei fünf von zwölf *CPR-CYP*-Kombinationen Betulinsäure detektiert werden konnte. Die drei untersuchten *CYP*-Enzyme (*A15*, *A17* und *A9*) jedoch in der Lage sind, das Substrat Lupeol am C-28 zu oxidieren. In deutlichen Mengen von sogar bis zu 30 mg/L wird sie in zwei Stämmen produziert (Expression von *MTR-A15* und *MTR-A17*). Die Ergebnisse zeigen, wie komplex das *CPR/CYP*-System ist, da nur die optimale Interaktion zwischen beiden Enzymen zur gewünschten Produktbildung in relevanten Mengen führt.

Verglichen mit den Ergebnissen aus dem vorangegangenen Abschnitt (Abb. 9), führen die neu untersuchten *CPR-CYP*-Genkombinationen zu einer deutlich effizienteren Oxidation von Lupeol zur Betulinsäure, wobei dies insbesondere auf das verwendete *CPR*-Gen *MTR* in Kombination mit den zuvor untersuchten *CYP*-Genen *A15* und *A17* zurückzuführen ist.

In Abbildung 11 ist der relevante Ausschnitt eines Total Ion Chromatogramms (TIC) einer Terpenoid-Analyse am Beispiel des Stammes CEN.PK2U pTT1-*OEW* pTT2-*MTR-A15* dargestellt. Die extrahierten Triterpenoide wurden mit MSTFA derivatisiert und konnten als Trimethylsilan (TMS)-Derivate über GC-MS analysiert werden (blau). Die derivatisierten Standardsubstanzen (Ergosterol-TMS, Stigmasterol-TMS, Lupeol-TMS, Betulin-TMS, Betulinaldehyd und Betulinsäure-TMS) sind im Chromatogramm schwarz dargestellt. Als interner Standard diente das Pflanzensterol Stigmasterol-TMS.

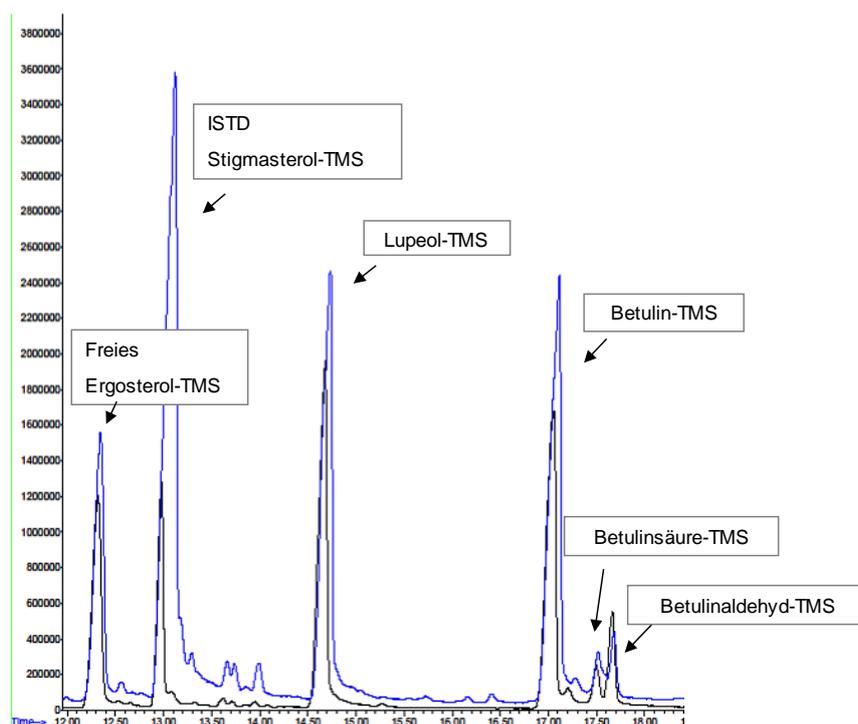


Abbildung 11: Ausschnitt eines Total Ion Chromatogramms (TIC) einer Terpenoid-Analytik. Extrakt aus Kulturbrühe CEN.PK2U pTT1-*OEW* pTT2-*MTR-A15* (blau). Standardsubstanzen in Chloroform gelöst (schwarz). TMS: Trimethylsilyl-Derivate.

Der Stamm CEN.PK2U pTT1-*OEW* pTT2-*MTR-A15* scheint Potential für einen biotechnologischen Prozess zur Produktion von Betulinsäure zu haben. Die in diesem Stamm vorgenommenen Modifikationen führen zu besserem Wachstum gegenüber dem Ausgangsstamm CEN.PK111-61A sowie dem Basisstamm CEN.PK2U. Aufgrund der ausgewählten Gene *OEW*, *MTR* und *CYP-A15* zeigte er eine volumetrische Ausbeute an pentazyklischen Triterpenen im Schüttelkolben von 230 mg/L

(Betulinsäure bis zu 30 mg/L) bei einer spezifischen Ausbeute von etwa 16 mg/g (Betulinsäure 2 mg/g).

4.3 Evolutionsgeführte Zellfabrikentwicklung

Um eine mögliche negative Auswirkung der Intermediate und finalen Produkte des Betulinsäurestoffwechselweges auf das Zellwachstum zu untersuchen, wurde der Wildtypstamm CEN.PK 113-7D in Minimalmedium, welches mit unterschiedlichen Konzentrationen (von 0,0313 g/L bis 0,5 g/L) an Betulinsäure, Ursolsäure, Oleanolsäure, β -Amyrin oder Lupeol angereichert wurde, kultiviert. Da die Löslichkeit der oben genannten Stoffe in wässriger Lösung sehr niedrig ist, wurden Stammlösungen in 96% Ethanol angesetzt. In einer Negativkontrolle wurden die Zellen in Gegenwart einer entsprechenden Menge Ethanol kultiviert. Es konnte in keiner der Kultivierungen ein signifikant negativer Effekt gefunden werden, was zur Schlussfolgerung führte, dass die Intermediate des Betulinsäurestoffwechselweges entgegen unserer ersten Annahme das Wachstum nicht beeinflussen und somit eine Evolution der Stämme nicht nötig war.

4.4 Identifikation von Lupeol- und beta-Amyrintransportern

Anfänglich wurden drei unterschiedliche Strategien für den Export oder das Trapping der finalen Produkte entwickelt. Diese Strategien wurden unter dem Begriff *Pulling* Strategien zusammengefasst, da sie alle direkt auf das Entfernen der Produkte abzielen und dadurch mögliche Produktinhibition verhindern. Zudem könnten durch einen direkten Export der Produkte aus der Zelle die Kosten für die Produktaufreinigung gesenkt werden.

Die drei *Pulling* Strategien umfassten:

1. Identifizierung und Expression von Triterpenttransportern
2. Expression von Glykosyltransferasen
3. Binden der Triterpene in Lipidtröpfchen

Der Fokus wurde auf die Identifizierung von möglichen Triterpenttransportern gelegt. Hierzu wurde eine Kollaboration mit Dr. Hussam Nour Eldin (Kopenhagener Universität, Dänemark) gestartet. Seine Gruppe hat eine Methode etabliert, in welcher Froscheizellen die mRNA potentieller Transporter injiziert wird. Die Eizellen translatieren die injizierte Information in funktionale Transporter und lokalisieren diese in die Plasmamembran. Die Oozyten werden dann auf die Transportfähigkeit hin untersucht, indem sie in Nährlösung kultiviert werden, die unter anderem auch das zu untersuchende Molekül enthält. Im Anschluss an diese Inkubation wird die intrazelluläre Konzentration des zu untersuchenden Moleküls bestimmt. Diese Methode wurde erfolgreich zur Identifizierung von Transportern für den Import von hydrophilen Molekülen (4-Methylthiobutyrylglukosinulat (4 MTB)) eingesetzt. Um in der Lage zu sein Triterpenexporter zu identifizieren, musste der Assay zunächst für hydrophobe Moleküle adaptiert werden. Da Triterpene recht gut in Ethanol löslich sind, wurden die Oozyten zunächst auf die Auswirkung der direkten Injektion verschiedener Ethanolverdünnungen auf Vitalität und Fähigkeit zur Expression von Transporter getestet. Hier diente die Injektion von mRNA eines bekannten Glukosinulattransporters als Kontrolle. Die Injektion von 96%iger und 50%iger Ethanollösungen führte zum Absterben der Zellen, was durch die Detektion von Glukosinulat in Zellen ohne injizierter Transporter mRNA zu erkennen war. Nach der Injektion von 25%iger Ethanollösung zeigte sich kein negativer Effekt auf die Vitalität. Des Weiteren waren die intrazellulären 4 MTB-Konzentrationen der Ethanoltests mit der Wasserkontrolle vergleichbar. Diese Ergebnisse wurden in einem zweiten Test verifiziert, in dem gezeigt

wurde, dass die Injektion von 25%iger Ethanollösung ohne mRNA die Membranstabilität nicht kompromittiert (kein 4 MTB intrazellulär detektierbar) (Abb. 12). Die intrazellulären 4 MTB Konzentrationen der Proben mit 25%iger Ethanol und 1,33-fach verdünnter mRNA, Wasser mit 1,33-fach verdünnter mRNA und unverdünnter mRNA waren vergleichbar, was nochmals bestätigt, dass die Injektion einer 25%igen Ethanollösung den Assay nicht negativ beeinflusst. Zuletzt wurde zudem getestet, ob Oleanolsäure der Expression des Glukosinulatransporters schadet. Hier war zu erkennen, dass die Intrazelluläre 4 MTB Konzentration ungefähr der Hälfte des Wertes der Proben ohne Oleanolsäure entsprach. Dies zeigt, dass Oleanolsäure einen negativen Effekt auf die Expression hat, die Transporteraktivität für eine qualitative Evaluation jedoch ausreichend ist. Ausstehend zur finalen Nutzung des angepassten Assays ist die Entwicklung eines geeigneten Analyseprotokolls zur Detektion der äußerst geringen Mengen der intrazellulären Triterpene.

Der Kopenhagener Universität steht eine Genbank mit ca. 800 potentiellen *Arabidopsis thaliana* Transportern mit 2 oder mehr Transmembrandomänen zur Verfügung. Von diesen 800 Sequenzen besitzen ca. 300 10-14 Transmembrandomänen. Da die Hefe mit den nativen ABC Transportern schon einen Reihe an entgiftenden Transportern besitzt, sollte die Aktivität dieser auch mit Hilfe des Eizellenassays evaluiert werden. Hierzu wurden die Sequenzen von *Aus1* (vermutete Steroltransport Funktion), *Pdr5* (Multidrug Efflux pump) und *Pdr15* (cell detoxification during general stress) erfolgreich in das Plasmid pNB1u [26] mittels USER Cloning kloniert. Diese Plasmide werden als Template genutzt, um mRNA des zu untersuchenden Transporters herzustellen.

Die Ergebnisse zeigen, dass es prinzipiell möglich ist den *Xenopus* Assay auch für die Charakterisierung von Transportern für die Sekretion hydrophober Moleküle einzusetzen. Innerhalb des Projektzeitraumes war jedoch eine Charakterisierung von Triterpen-Transportern nicht mehr möglich.

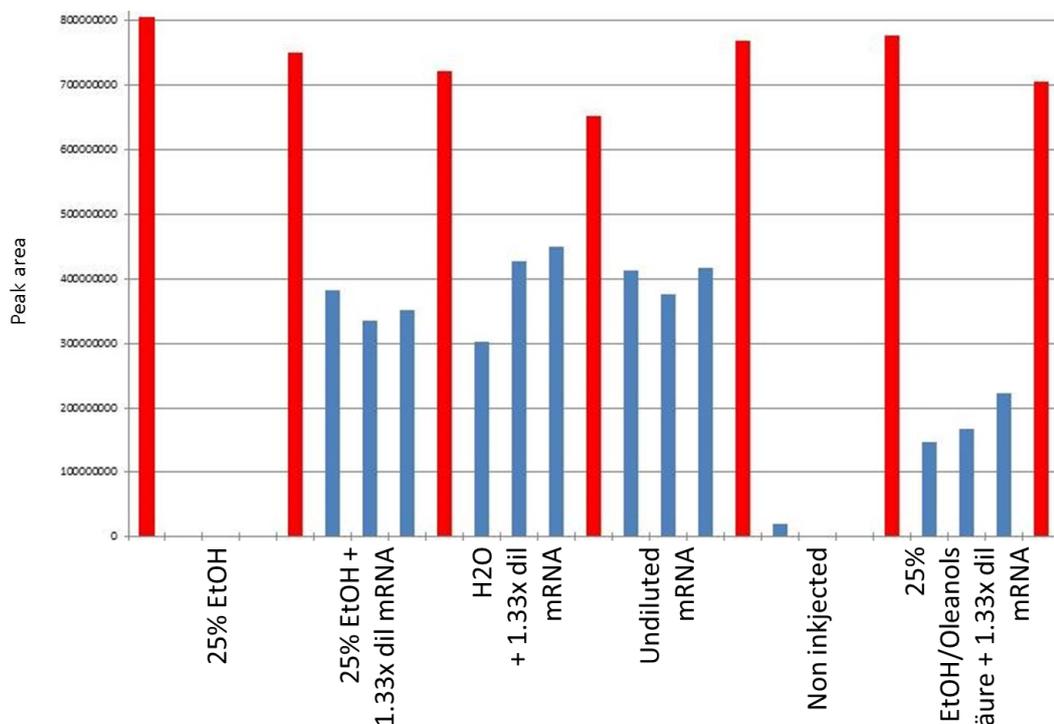


Abbildung 12: Intrazelluläre Glukosinulat Peak Flächen der über LC-MS analysierten unterschiedlich behandelten Eizellen (blau) und Proben der Nährlösung (rot).

4.5 Fermentationsoptimierung der Triterpenproduktion

Für die Fermentation von *S. cerevisiae* existieren etablierte Protokolle, die allerdings zum großen Teil darauf abzielen, Ethanol herzustellen. Für die Produktion von zyklischen Triterpenen sind andere Kultivierungsbedingungen und –strategien entscheidend. In diesem Projekt wurden existierende Protokolle adaptiert und für die Terpenproduktivität optimiert. Neben den Fermentationsparametern wie Temperatur, pH-Wert und Sauerstoffeintrag wurden hauptsächlich Medienbestandteile, C-Quellen und Feed-Strategien für eine Zulauffermentation (Fed-Batch) betrachtet. Einfache Batch-Kultivierungen, wurden größtenteils in Schüttelkolben oder im Multititer-Plattenformat mit dem Growth Profiler (Enzygscreen, Harlem Niederlande) durchgeführt. Für kontrollierte Batch-Fermentationen mit Volumina bis 150 mL wurden Bioreaktoren vom Typ DASbox (DasGIP Eppendorf, Jülich Deutschland) verwendet. Größere Volumina (0,5-2 L), die wurden in Bioreaktoren vom Typ Bioflow 115 (New Brunswick, Eppendorf, Deutschland) durchgeführt. Alle Batch und Fed-Batch Kulturen wurden mit einer vorangegangenen Vorkultur angeimpft. Über die Fermentationszeit wurden regelmäßig Proben gezogen, die bezüglich des Terpengehalts, der Biotrockenmasse (CDW) und der verbrauchten Substrate untersucht wurden. Die Quantifizierung der Triterpene erfolgte mittels Reversed-Phase-HPLC und einem Acetonitril-Wasser-Gradienten in Verbindung mit einem Charged Aerosol Detektor (CAD). Die Optimierung der Fermentationsparameter wurde kontinuierlich für die Stämme, die im Laufe des Projektes konstruiert wurden durchgeführt.

Tabelle 5: Einfluss der verwendeten Medien WM8 und Verduyn auf den spezifischen Triterpengehalt des Squalenüberproduzierers *S. cerevisiae* CEN.PK tHMG1 und des Betulinsäureproduzenten *S. cerevisiae* CEN.PK BA4. Daten aus Batchkultivierungen bei 30°C und 50 g/L Glukose. Mit + gekennzeichnete Medien enthielten erhöhte Vitamin- und Spurenelementkonzentrationen.

Stamm	Medium	SQ-Gehalt% [g _{SQ} /g _{CDW}]	Betulin- Gehalt% (g/g _{CDW})	Betulinsäure- Gehalt% (g/g _{CDW})
tHMG1	Verduyn	0,10	-	-
tHMG1	WM8	5,95	-	-
tHMG1	Verduyn+	2,10	-	-
BA4	WM8	0,56	0,24	0,04
BA4	Verduyn+	0,25	0,29	0,05
BA4	WM8+	0,50	0,33	0,08

Durch Variation der Medienbestandteile konnte gezeigt werden, dass sich die Medienkomposition wesentlich auf die finalen Produktkonzentrationen auswirkt. Als Minimalmedien kamen das Standard-Bäckerhefe-Medium von Verduyn *et al.* [27] und das WM8-Medium zum Einsatz [28]. Der Unterschied findet sich in den Vitaminkonzentrationen, die im Verduyn-Medium etwa 10-fach geringer konzentriert vorliegen als im WM8-Medium, sowie die erhöhte Konzentration der Spurenelemente im Verduyn-Medium (ca. 3-5-fach höher). Für den Squalenüberproduzierer *S. cerevisiae* CEN.PK 113-1A *tHMG1 are2Δ* (CEN.PK tHMG1) konnte so ein 20-fach höherer spezifischer Squalengehalt mit dem modifiziertem Verduyn-Medium (Verduyn+) erzielt werden (Tab. 5). Selbiges war bei allen Betulinsäure-Produzenten zu beobachten. Hier konnte durch den kombinierten Einsatz der erhöhten Vitamin und Spurenelementkonzentration im WM8-Medium (WM8+) der spezifische Produktgehalt weiter gesteigert werden. In einer detaillierteren Untersuchung zeigt sich,

dass vor allem das in der Vitaminlösung enthaltene Pantothenat (Vitamin B₅) einen positiven Effekt auf die Produktakkumulation hat. Pantothenat dient als Vorstufe für das Coenzym A [29], Teil des Acetyl-CoA, und hat somit Einfluss auf die Bereitstellung der Metabolite des Mevalonatwegs. Neben dem Einfluss des eingesetzten Mediums konnte gezeigt werden, dass die C-Quelle von entscheidender Bedeutung ist. Der verwendete CEN.PK Stamm zeigt das Wachstumsverhalten einer typischen Crabtree-positiven Hefe. Auffallend war, dass der spezifische Terpenegehalt während des Wachstums auf Glukose leicht abnahm und erst nach vollständigem Verbrauch der Glukose und anschließendem Wachstum auf Ethanol anstieg. Der Verlauf des spezifischen Terpenegehalts deutet daraufhin, dass die gebildeten Triterpene in der Zelle erst akkumulieren, wenn Ethanol verstoffwechselt wird (Abb. 13A). Dies zeigt sich besonders deutlich am spezifischen Squalengehalt des Squalenproduzenten CEN.PK tHMG1 (Abb. 13A) über die Zeit. Beim Betulinsäure-Produzenten *S. cerevisiae* CEN.PK 102-5B *tHMG1 are2Δ AtATR2 ERG1 AtLUP1 - CYP716A11* (BA4) (Abb. 13B) ist der spezifische Betulinsäure Gehalt über die gesamte Kultivierzeit konstant bei 0,12 % g/g_{CDW}, während der spezifische Betulingehalt während der Ethanolphase auf 0,67 % g/g_{CDW} ansteigt. Für die Produktion von Triterpenen über den Mevalonatweg ist die Anwesenheit von Ethanol ausschlaggebend. Diese Annahme konnte in glukose-limitierten Fed-Batch (Daten nicht gezeigt) und kontinuierlichen (Chemostat) Fermentationen (siehe Abschnitt 4.6) bestätigt werden. Sobald die Glukose limitiert vorlag, sank der spezifische Squalengehalt. Erst bei Verwendung eines Cofeeds von Glukose und Ethanol akkumulierten die Zellen Squalen (siehe Abb. 16). Aufgrund des positiven Einflusses des Ethanols, wurde es als C-Quelle für den Feed in den Fed-Batch Fermentationen verwendet.

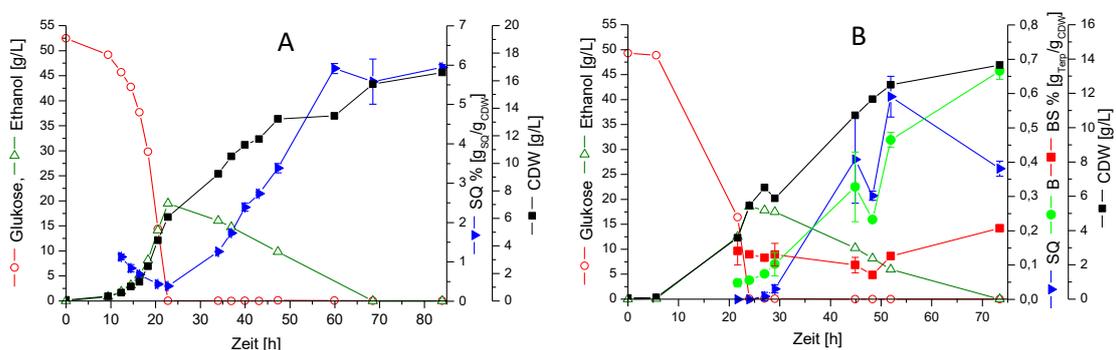


Abbildung 13: Verlauf von Glukose, Ethanol, Biotrockenmasse (CDW) und spezifische Triterpenkonzentration während einer Schüttelkolbenkultivierung des Squalenüberproduzenten *S. cerevisiae* CEN.PK thmg1 (A) und des Betulinsäureproduzenten *S. cerevisiae* BA4 (B). SQ=Squalen, B=Betulin, BS=Betulinsäure

Durch eine kontrollierte Fermentation im Bioreaktor wurden die Prozessparameter pH, Temperatur, gelöst Sauerstoff (DO) und Sauerstoff-Eintrag auf eine maximale Triterpenproduktivität ausgelegt. Hauptsächlich wurde das modifizierte WM8-Medium (WM8+) verwendet, durch welches sich eine im Vergleich zum Verduyn-Medium hohe Produktivität erzielen lässt. Als optimaler pH Wert wurde pH 6 bestimmt, bei welchem nicht nur die maximalen spezifischen und volumetrischen Triterpenkonzentrationen erreicht wurden, sondern auch die Batch-Fermentationszeit im Vergleich zum unregulierten Batch deutlich verkürzt werden konnte. Die optimale Temperatur für alle untersuchten CEN.PK-Stämme liegt bei 30°C. Unterschiedliche Gelöstsauerstoffwerte (DO, dissolved oxygen) während der Fermentation mit dem Betulinsäureproduzenten CEN.PK BA4 (eingestellt über eine DO-Kaskade) haben gezeigt, dass bei Werten $\geq 80\%$ die spezifischen Triterpengehalte sinken, vermutlich durch Scherkräfte durch das starke Rühren.

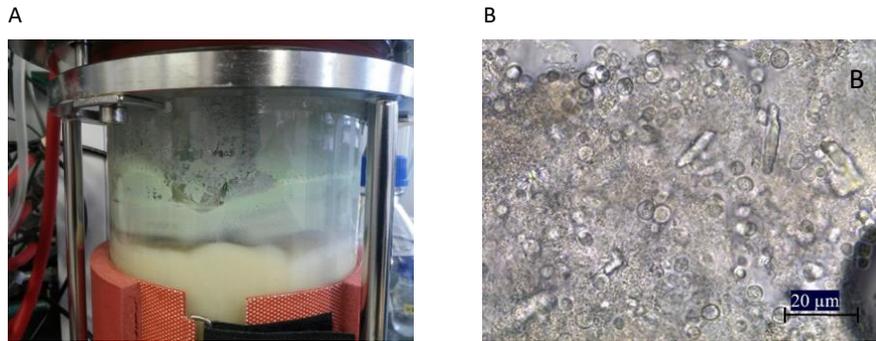


Abbildung 14: (A) Ablagerungen im Bioreaktor während einer Fermentation mit *S. cerevisiae* BA4. (B) Mikroskopische Aufnahme von Agglomeraten nach einer Fermentation mit *S. cerevisiae* BA4

Es wurde beobachtet, dass sich vor allem während der Fermentation mit CEN.PK BA4 durch eine im Laufe der Fermentation einsetzende Schaumbildung an den inneren Fermentereinbauten und des Fermenterrandes zunehmend eine Schicht aus gelblich-grünen, viskosen Agglomeraten und Partikeln ausbildete (Abb. 14). Die genaue Zusammensetzung konnte nicht geklärt werden, aber es wurden Betulin, Betulinsäure und Lupeol darin nachgewiesen. Durch Zugabe von Antischaum konnte das Ausschäumen weitestgehend vermieden werden.

Im Zusammenhang mit der Fed-Batch Bioreaktorkultivierung des CEN.PK BA4 konnte weiterhin eine Verblockung des Begasungsrohres (Sparger) festgestellt werden. Diese wurde durch einen Kristallwuchs in den Bohrungen des Begasungsrohres verursacht. Es war im Rahmen dieses Projektes nicht mehr möglich eine Identifizierung des unbekanntes Kristalls durchzuführen. Um die Verblockung zu vermeiden, wurde ein Begasungsrohr mit großem Innendurchmesser (\varnothing 2 mm) eingesetzt.

Durch die Optimierung der Fermentationsparameter und der Medienkomposition konnte eine stetige Erhöhung des Produkttiters sowie der Produktivität im Batch-Modus erreicht werden. Um eine weitere Steigerung der spezifischen und volumetrischen Konzentrationen zu erzielen, wurden verschiedene Fed-Batch Strategien untersucht und auf maximale Triterpenproduktivität optimiert. Die Optimierung wurde mit dem Betulinproduzenten CEN.PK BA4 durchgeführt. Da die Zielprodukte intrazellulär vorliegen war das Hauptziel die Maximierung der Beladung der Zellen mit Triterpenen bei möglichst hoher Zellkonzentration. Üblicherweise wird für die Hochzelldichte-Fermentation der Zulauf (Feed) so eingestellt, dass die C-Quelle limitiert zugefüttert wird, um möglichst hohe Produktausbeuten zu erzielen. Für die Produktion der Triterpenoide wurde gezeigt, dass eine C-Limitierung nur zu sehr geringen spezifischen Konzentration führt (vgl. Abschnitt 4.6), weshalb eine Feed-Methode gewählt wurde, in der die C-Quelle im Überschuss vorliegt. Als C-Quelle wurde Ethanol verwendet, welches gepulst zugefüttert wurde, wodurch eine deutliche Steigerung der spezifischen und volumetrischen Triterpenkonzentrationen erreicht werden konnte. Der Einsatz von Ethanol als C-Quelle führt vor allem zu einer erhöhten Bildungsrate des cytosolischen Acetyl-CoAs und generiert durch die Oxidation des Acetaldehyds zum Acetat durch ALD6 den Redoxcofaktor NADPH. Beide Metabolite werden für die Produktsynthese über den Mevalonatweg benötigt. Weiterhin wird die Synthese von Ergosterol durch die Erhöhung der Ethanolkonzentration verstärkt. Der Einbau des Ergosterols in die Zellmembran dient der Erhöhung der Ethanoltoleranz, wodurch gleichzeitig der Fluss in den Mevalonatweg erhöht wird. [30,31].

Für die Fed-Batch Fermentationen mit gepulstem Ethanolfeed wurden die zuvor optimierten Prozessparameter verwendet. Die Feedphase, die sich nach einer normalen Batchkultivierung im

WM8+-Medium mit 50 g/L Glukose anschließt, wurde durch die Zugabe von 25 g/L Ethanol über eine externe Peristaltikpumpe gestartet. Als Indikator diente das DO-Signal, welches nach Verbrauch aller C-Quellen im Batchmedium abrupt ansteigt. Um eine automatisierte DO-getriggerte Zufütterung zu gewährleisten, wurde das DO-Signal über die Fermentersoftware (BioCommand C.1, New Brunswick, Eppendorf) mit der Ethanolpumpe gekoppelt. Sobald der DO-Wert über einen Wert von 60% stieg, wurden 25 g/L Ethanol in den Fermenter gepumpt. Durch die Softwareimplementierung konnten so mehrere Feedzyklen hintereinander gefahren werden. Um den Einfluss des zugegebenen Ethanols auf die spezifischen und volumetrischen Triterpenkonzentrationen zu untersuchen, wurden verschiedene Puls-Konzentrationen getestet. Hier zeigte sich, dass bei Pulsen mit Ethanolkonzentration kleiner als 20 g/L der spezifische Triterpengehalt sinkt. Wahrscheinlich wird durch den schnelleren Wechsel zwischen Ethanolüberschuss und C-Mangel der Metabolismus stärker beeinträchtigt als bei Konzentrationen >20 g/L Ethanol. Bei Ethanolpulskonzentrationen größer als 25 g/L konnte keine Steigerung der Produktivität erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

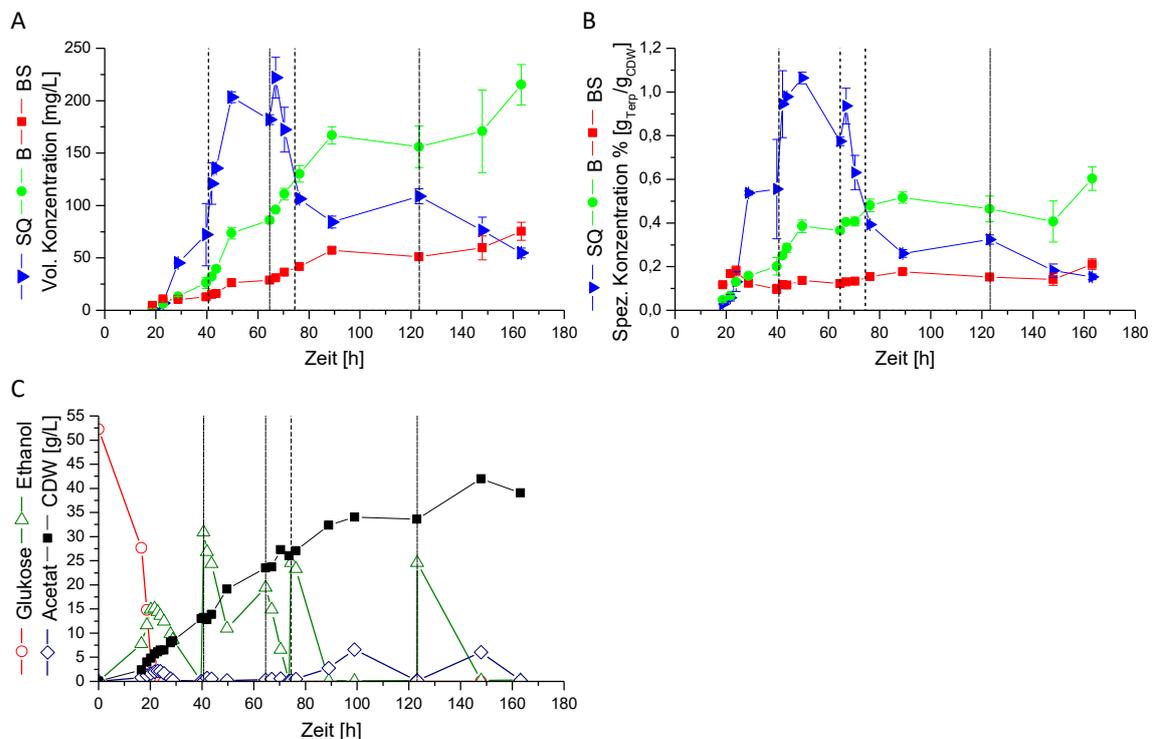


Abbildung 15: Verlauf der volumetrischen (A) und der spezifischen (B) Triterpenkonzentration während eines gepulsten Ethanol-Fed-Batches im Bioreaktor mit dem Betulinsäureproduzenten *S. cerevisiae* BA4. SQ=Squalen, B=Betulin, BS=Betulinsäure. (C) Verlauf der Glukose-, Ethanol- und Acetatkonzentration. Vertikale, gestrichelte Linien stellen die gepulste Zugabe von 25 g/L Ethanol dar.

Die Batchfermentationszeit des Betulinsäureproduzenten *S. cerevisiae* BA4 betrug bei vorgegebenen Bedingungen (WM8+-Medium, 50 g/L Glukose) 36 h. Nach Zugabe des ersten 25 g/L Ethanolpulses wurde eine erhöhte Zunahme des spezifischen Betulingehaltes beobachtet, welche nach dem zweiten Puls nur noch leicht zunahm (Abb. 15B). Nach etwa 90 h, nach dem dritten Ethanolpuls, erreichte die Produktivität ein Maximum von 1,88 mg_B/L/h bei 160 mg_B/L (Abb. 15A). Eine weitere Steigerung des spezifischen Gehaltes konnte nach dem dritten Puls nicht erreicht werden. Es wurde eine maximale Produktivität für Betulinsäure von 0,64 mg_{BS}/L/h bestimmt bei 60 mg_{BS}/L.

Ein möglicher Grund für den Rückgang der Produktivität und das Abflachen der Konzentrationsverläufe könnte an der zunehmenden Bildung von Acetat liegen. Nach dem dritten und vierten Puls hatte sich zwischenzeitlich bis zu 6 g/L Acetat gebildet was einen erheblichen Einfluss auf das Zellvitalität hat [32].

Bei der entwickelten Feed-Strategie liegt als Haupttriterpen Betulin vor und die Konzentration an Betulinsäure ist vergleichsweise gering. Das weitere Ziel, war es daher die Beladung der Hefezellen mit Betulinsäure zu maximieren. Hierzu wurde der Einsatz einer Stickstofflimitation untersucht. Dazu wurden zwei Strategien verfolgt. Zum einen wurde die Stickkonzentration im Medium so eingestellt, dass die Zellen in eine N-Limitierung wuchsen („Limitierung durch Verbrauch“) und zum anderen wurden die Zellen bei einer hohen Zellkonzentration in ein stickstofffreies Medium überführt („Resting cell Fermentation“). Anschließend wurde für beide Strategien der automatisierte gepulste Ethanolfeed angelegt. Für die Fermentation unter vollständigem Stickstoffverbrauch wurde eine Konzentration ausreichend für die Bildung von 6 g_{CDW}/L zugegeben. Interessanterweise konnte durch die Verringerung und anschließende N-Limitation das Verhältnis der Triterpene zugunsten der Betulinsäure verschoben werden (Tab. 6). Allerdings ist die volumetrische Konzentration aufgrund der geringen Biomasse vergleichsweise niedrig.

Tabelle 6: Spezifische Konzentration (% g/g_{CDW}), volumetrische Konzentration (mg/L) und volumetrische Produktivität (mg/L/h) für Betulin und Betulinsäure des Betulinsäureproduzenten *S. cerevisiae* BA4 nach Batch und Fed-Batch Fermentationen. Die angegebene Zeit bezieht sich auf die totale Fermentationsdauer und wurde zur Berechnung der Produktivität benutzt.

Stamm	Modus	Zeit h	End CDW g/L	Betulin			Betulinsäure		
				% g/g _{CDW}	mg/L	mg _B /L/h	% g/g _{CDW}	mg/L	mg _{BS} /L/h
BA4	Kolben	62	14,3	0,67	91	1,24	0,21	28	0,38
BA4	Batch	36	14,1	0,19	26	0,71	0,08	12	0,33
BA4	EtOH Fed Batch	89	32,3	0,52	167	1,88	0,18	57	0,64
BA4	N-Limit Fed Batch	123	5,7	0,35	20	0,15	0,50	28	0,20
BA4	Resting Cell Fed Batch	100	70,4	0,66	464	5,22	0,26	182	2,05

Bei der „Resting Cell“ Fermentation wurde ein glukoselimitierter Fed-Batch vorgeschaltet um eine möglichst hohe Biomasse zu generieren. Die Zellen wurden anschließend geerntet und in ein stickstofffreies Medium überführt. Nach Zugabe des ersten Ethanol Pulses kam es zu einem steilen Anstieg der volumetrischen als auch spezifischen Triterpenkonzentrationen. Die weitere Zunahme der Biomasse deutet daraufhin, dass die Zellen durch den plötzlichen Stickstoffmangel intrazelluläre Stickstoffquellen, z.B. freie Aminosäuren oder durch Autophagie bereit gestellte Aminosäuren, genutzt haben. Mit dieser Fermentationsstrategie wurde maximale Produktivität und volumetrische Konzentration für den *S. cerevisiae* BA4 erreicht (Tab. 6).

4.6 Metabolische Charakterisierung der Squalen und zyklischen Triterpen produzierenden *S. cerevisiae* Stämme

Für die Charakterisierung der terpenüberproduzierenden Stämme in kontinuierlichen Kultivierungen wurden parallelisierte Mini-Chemostaten erfolgreich etabliert (Abb. 16B). Kontinuierliche Fermentationen im Kleinstmaßstab wurden für die vergleichenden ^{13}C -basierte Flussanalyse und Transkriptomstudien des Squalenüberproduziers *S. cerevisiae* CEN.PK tHMG1 eingesetzt. Für die Kultivierung im Chemostat wurde das Verduyn-Medium ausgewählt. Zum Einstellen der optimalen Feedparameter wurden anfangs glukoselimitierte Chemostaten gefahren. Die Glukosekonzentration im Feed wurde auf 1 g/L gesetzt und es wurden Verdünnungsraten zwischen 0,05 1/h und 0,3 1/h getestet. Unter diesen glukoselimitierten Wachstumsbedingungen konnte mit dem Squalenüberproduzierer *S. cerevisiae* CEN.PK tHMG1 eine spezifische Squalenausbeute von max. 0,5% ($\text{g}_{\text{SQ}}/\text{g}_{\text{CDW}}$) erzielt werden. Als weitere C-Quelle für einen kohlenstofflimitierten Chemostat wurde Ethanol eingesetzt, wodurch sich der Squalengehalt verdreifachte (1,6% $\text{g}_{\text{SQ}}/\text{g}_{\text{CDW}}$), aber die maximale Verdünnungsrate auf 0,05 1/h sank.

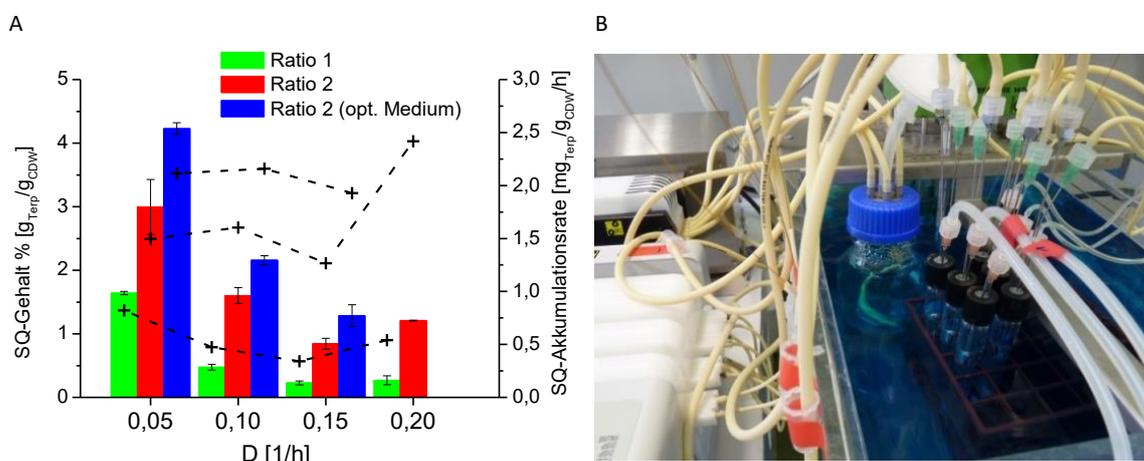


Abbildung 16: (A) Abhängigkeit des spezifischen Squalengehaltes von der Verdünnungsrate und Squalenakkumulationsrate in einer kontinuierlichen Kultivierung von *S. cerevisiae* CEN.PK tHMG1 im Verduyn-Medium und einem Ethanol/Glukose Cofeed. Ratio gibt das Ethanol zu Glukose Verhältnis in $\text{Cmol}_{\text{EtOH}}/\text{Cmol}_{\text{Glc}}$ an. (B) Mini-Chemostat im Wasserbad

Eine weitere Möglichkeit die Squalenausbeute zu steigern lieferte die Anwendung eines Cofeeds von Glukose und Ethanol. Es wurde davon ausgegangen, dass die eingesetzte Glukose vorrangig zur Biomassesynthese verwendet wird und Ethanol den Acetyl-CoA-Pool erhöht, wodurch mehr Substrat in den Mevalonat-Weg fließen kann. Mit Erhöhung des Ethanol-Glukose-Verhältnisses stieg der spezifische Squalengehalt an und konnte durch die in Abschnitt 3.5 beschriebene Optimierung des Verduyn-Mediums bei einem Cofeed-Verhältnis von 2 $\text{Cmol}_{\text{EtOH}}/\text{Cmol}_{\text{Glc}}$ auf 4,2% ($\text{g}_{\text{SQ}}/\text{g}_{\text{CDW}}$) gesteigert werden (Abb. 16A). Da die spezifische Akkumulationsrate annähernd konstant ist, hängt der spezifische Squalengehalt für die jeweils eingestellte Wachstumsbedingung von der Reaktorverweilzeit ab. Bei kleinen Verdünnungsraten ist die Verweilzeit groß, weshalb hier die höchsten Squalengehalte gemessen wurden.

Für die metabolische ^{13}C -basierte Flussanalyse wurden die Bedingungen mit der höchsten Squalenausbeute bei Verdünnungsraten von $D = 0,05$ 1/h und $D = 0,15$ 1/h gewählt. Bei der ^{13}C -basierten Flussanalyse wird der Zellkultur als C-Quelle ein ^{13}C -markiertes Substrat zugeführt. Aufgrund eines Stoffwechsel-spezifischen Einbaus der ^{13}C -Isotope in die Biomassebestandteile, ist es möglich durch Analyse des Markierungsmuster der Biomassebestandteile, beispielsweise der protein-

ogenen Aminosäuren, Rückschlüsse auf die intrazelluläre Flussverteilung zu ziehen [33]. Im metabolischen und isotopomeren Gleichgewichtszustand (5 Verweilzeiten nach Wechsel auf das ^{13}C -markierte Medium) wurden die proteinogenen Aminosäuren der Biomasse wie in [34,35] beschrieben mittels GC-MS analysiert und mit der Software iMS2FLUX [36] prozessiert. Die Bestimmung der intrazellulären Flussraten aus den Isotopomerenmustern der Aminosäuren und den extrazellulären Raten erfolgte mit der Software OpenFLUX [37]. Das verwendete metabolische Modell umfasste den Zentralkohlenstoffstoffwechsel von *S. cerevisiae* und die Reaktionen der Squalenbiosynthese und bestand aus 64 Reaktionen und 44 intrazellulären Metaboliten. Die 95% Konfidenzintervalle der berechneten Flüsse wurden durch eine nichtlineare basierte Sensitivitätsanalyse bestimmt [38]. Die Flussanalyse zeigte, dass die Wachstumsrate die intrazelluläre Flussverteilung beeinflusst, während die erhöhte Squalenproduktion im Stamm CEN.PK tHMG1 keinen signifikanten Einfluss auf die Flüsse des Zentralkohlenstoffstoffwechsels hat. Die maximal beobachtete Squalenproduktion betrug $0,01 \text{ mmol/g}_{\text{CDW}}/\text{h}$, äquivalent zu einem Verbrauch von $0,18 \text{ mmol/g}_{\text{CDW}}/\text{h}$ Acetyl-CoA und ATP, sowie $0,13 \text{ mmol/g}_{\text{CDW}}/\text{h}$ NADPH. Dass die Reaktionsraten in den beiden Stämmen CEN.PK und CEN.PK tHMG1 daher sehr ähnlich sind, war zu erwarten. Zu klären bleibt, ob regulatorische Mechanismen einen erhöhten Fluss in die Squalenbiosynthese verhindern oder ob die enzymatische Kapazität des Biosyntheseweges die Squalenproduktion limitiert. Die GC-MS Messung des akkumulierten Squalens zeigten, dass keine ^{13}C -Isotope eingebaut wurden. Das deutet daraufhin, dass hauptsächlich das cytosolische Acetyl-CoA, welches vom Ethanol im Feed stammt, in den Mevalonat-Weg geflossen ist.

4.7 Vergleichende Genomik verschiedener Triterpenproduzenten und Entwicklung von Stämmen mit erhöhter Lupeol-, β -Amyrin und Betulinsäureproduktion

Ziel war es mit Hilfe von Transkriptionsanalysen und vergleichender Genomik die Antwort der Zellen auf die genetischen Eingriffe zu untersuchen bzw. Variationen in den Gensequenzen unterschiedlicher 2,3-Oxidosqualen Produzenten zu identifizieren.

4.7.1 Transkriptomanalyse

Mittels Transkriptomanalyse sollte der Effekt der Überexpression einer verkürzten Version der HMG-CoA Reduktase auf den Stoffwechsel der Hefe offengelegt werden. Hierzu wurden der Wildtypstamm CEN.PK und ein Stamm mit einer zusätzlichen Kopie des tHMG1p Genes unter der transkriptionellen Kontrolle des *TEF1* Promoters in kontinuierlichen Kultivierungen bei Verdünnungsraten von $0,05 \text{ 1/h}$ und $0,15 \text{ 1/h}$ in Triplikaten angezogen. Die Hauptkomponentenanalyse (PCA, Principal Component Analysis) dieser Proben zeigt einen eindeutigen Unterschied zwischen den beiden Verdünnungsraten. Das Gene Ontology Enrichment zeigte einige signifikant veränderte biologische Prozesse (Tab. 7), sowie Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der Mutante unter der erhöhten Verdünnungsrate. Unter der niedrigen Verdünnungsrate war die Auftrennung der beiden Stämme nicht sehr stark und nur 7 Gene zeigten signifikante Veränderungen, was darauf schließen lässt, dass der Metabolismus durch die Überexpression der verkürzten HMG-CoA Reduktase nicht stark beeinträchtigt wurde.

Tabelle 7: Gene Ontology Enrichment der biologischen Prozesse, welche mit den sich signifikant hoch-/herunter-regulierten Gene des tHMG1 Stammes zwischen der niedrigen hin zur hohen Verdünnungsrate in Verbindung gebracht werden.

Biological process	p-value
Up-regulated	
mitochondrion organization	4,14e-16
mitochondrial translation	1,16e-15
single-organism biosynthetic process	9,64e-07
single-organism organelle organization	2,17e-05
translation	2,58e-05
Down-regulated	
single-organism catabolic process	2,49e-07
oxidation-reduction process	6,93e-06
fatty acid oxidation	8,83e-06
lipid oxidation	8,83e-06
fatty acid catabolic process	1,04e-05

4.7.2 Genomanalyse des stark 2,3-Oxidosqualene akkumulierenden Stammes

Wie unter 4.1.3.2.1 beschrieben ist der Stamm Simo1575 in der Lage doppelt so viel 2,3-Oxidosqualen zu akkumulieren wie der Stamm Simo1578, obwohl es sich hier um verschiedene Klone derselben Transformation handelt. Um herauszufinden, welche Veränderungen den Stamm 1575 hierzu befähigen, wurde die genomische DNA beider Stämme extrahiert und mittels Sequenzierung der nächsten Generation sequenziert. Die einzelnen kurzen DNA Abschnitte wurden mit Bezug auf die Genomsequenz von CEN.PK (NCBI Sequenz) in der CLC Genomics Workbench zusammengesetzt. Danach wurden die Mutationen beider Stämme einzeln gegenüber CEN.PK bestimmt. Die Mutationen, die sowohl in Simo 1575 als auch in 1578 auftraten wurden ausgeblendet und übrig blieben die Mutationen, die Simo 1575 und 1578 unterscheiden. Dies waren 9 Insertionen, ein Basenaustausch und eine Deletion (Abb. 17). Die einzige Mutation in einer kodierenden Sequenz wurde im *ERG7* Gen gefunden. Hier führte eine Deletion zu einem Rasterschub, der das Stopcodon außer Kraft setzt. Dies führt dazu, dass das translatierte Protein viel größer wird, als die ursprüngliche Lanosterolsynthase. Diese Mutation war die einzige, die mit einer 100%igen Frequenz in allen kurzen DNA Abschnitten über diese Sequenz ermittelt wurde, alle anderen Mutationen hatten eine maximale Frequenz von 55%.

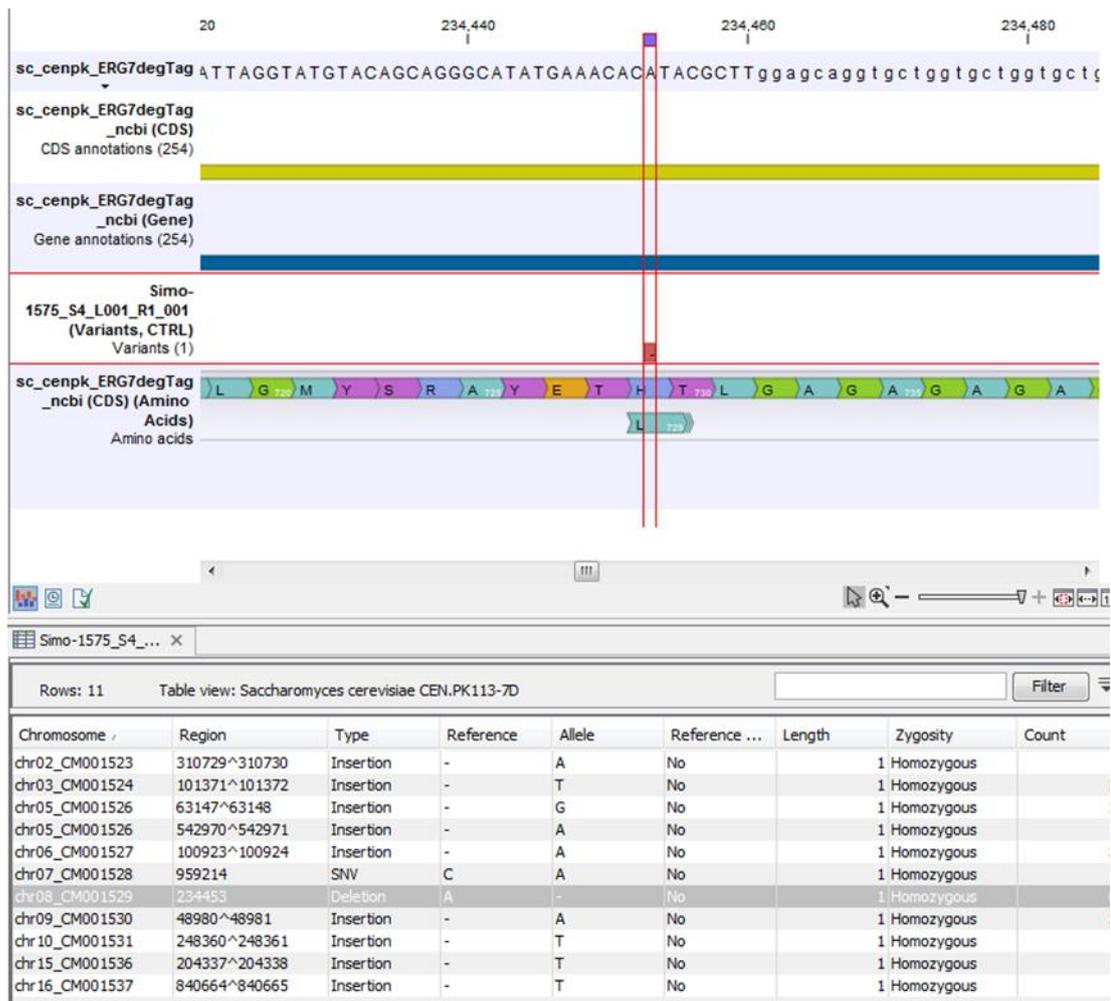


Abbildung 17: Überlagerung der Sequenzen von Simo1575 und der NCBI CEN.PK Sequenz. In rot ist die Deletion im ERG7 Gen von Simo1575 dargestellt.

4.8 Zellfabrikentwicklung mit Hilfe genomskaliger Modelle

Um die Auswirkung unterschiedlicher metabolischer Modifikationen vorab *in silico* testen zu können wurden Simulationen mit dem genomskalige *S. cerevisiae* Modell IMM904 [39] durchgeführt, dass bezüglich der Biosynthesewege für Aminosäuren, Austauschreaktionen zwischen Zytosol und Mitochondrium und des Fumarat/FAD Metabolismus aktualisiert wurde. Das resultierende Modell iBB918 umfasste 918 Gene, 1243 Metabolite und 1602 Reaktionen, konnte experimentell bestimmte externe Flüsse sehr gut abbilden und wurde zur Identifikation metabolischer Modifikationen zur Kopplung der Squalen/Betulinsäure-Produktion an das Wachstum genutzt. Das bedeutet, dass nach Modifikationen gesucht wurde, die einen erhöhten Fluss durch den Ergosterolstoffwechselweg essentiell macht, was höchst erstrebenswert ist, da dies eine weitere Evolution der Stämme, in der auf schnelleres Wachstum selektiert wird, ermöglicht. Durch *in silico* Simulationen wurde die in Abbildung 18 dargestellte Strategie entwickelt.

Diese Strategie ist unterteilt in vier Schritte:

1. Erhöhter α -Ketoglutaratfluss in das Mitochondrium
2. Relokalisierung von zwei Reaktionen des Mevalonatstoffwechselweges vom Zytosol in das Mitochondrium

valent zu den unter 4.1.3 beschriebenen Strategien zur Stammentwicklung kann die ER Membranfläche durch *push* oder *block* Strategien manipuliert werden. Einer der Hauptbestandteile der ER Membran sind Phosphoglyceride mit einem hohen Anteil von Phosphatidylinositol (PI) [40], dessen Überproduktion durch konstitutive Expression des Inositolbiosyntheseweges und damit erhöhter Inositolverfügbarkeit erzielt werden kann (*push* Strategie). Dies ist möglich durch Deletion des Genes *OPI1*, das einen Transkriptionsfaktor kodiert, der die Expression der Inositolsynthesegene reprimiert. Schuck et al [41] berichteten, dass das Ausschalten dieses Regulators in *S. cerevisiae* zur konstitutiven Expression der Gene dieses Stoffwechselweges, einer erhöhten Inositolproduktion und einem stark vergrößertem ER führt.

Lipidpartikel sind eukaryotische Kompartimente, die als Reservoir neutraler Lipide und Sterolester dienen und durch Abschnürungen der ER Membran entstehen. Die Lipidpartikelbildung stellt damit einen Verlust an ER Membranfläche dar und die Unterbindung ihrer Bildung eine mögliche Strategie zur Vergrößerung der ER-Membranfläche (*block* Strategie). In der Tat konnte gezeigt werden, dass Deletion des Phosphatidatphosphatase kodierenden Gens *PAH1* zu einem vergrößertem ER und einer Verringerung der Lipidpartikelzahl in *S. cerevisiae* [42] und nahezu völligem Lipidpartikelverlust in *Yarrowia lipolytica* [43] führt. Die Phosphatidatphosphatase katalysiert die Umsetzung von Phosphatidat zu Diacylglycerol, das weiter zu Triacylglycerol umgesetzt wird (Abb. 19). Neben Sterolestern macht dieses neutrale Lipid den Hauptbestandteil der Lipidpartikel aus [41]. Der in *pah1Δ* Stämmen reduzierte Gehalt an Triacylglycerol wird durch erhöhte Akkumulation von Sterolestern ausgeglichen, die sich verstärkt in der ER Membran anreichern, wodurch es vermutlich zu der beobachteten Vergrößerung dieses Kompartiments kommt [42]. Es wurde außerdem berichtet, dass eine *pah1Δ* bedingte Vergrößerung zu einer Steigerung des Expressionslevel membranassoziierter Enzyme führen kann [43]. Eine biotechnologische Anwendung dieser *block* Strategie zur Erhöhung ER-membranständiger Enzymaktivitäten wurde bisher noch nicht beschrieben.

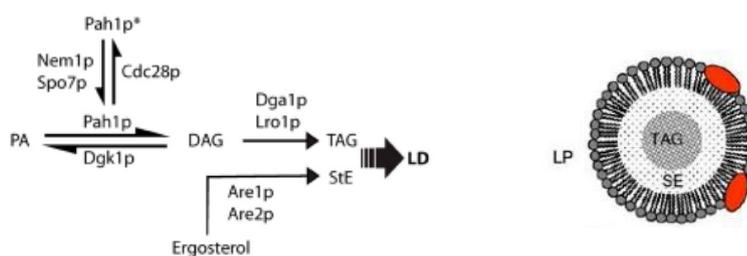


Abbildung 19: Enzymatische Katalyse von Phosphatidat (PA) zum Diacylglycerol (DAG) durch Pah1p. Diacylglycerol (DAG) ist ein Vorprodukt des Triacylglycerol (TAG), was neben Sterylester (SE) Hauptbestandteil der Lipidpartikel ist; Quelle: [42].

Die im Projektantrag postulierte Deletion des Genes *RER2* ist eine alternative *block* Strategie. *RER2* kodiert für die Dehydrodichyldiphosphatesynthase und ist involviert in die Polyprenyl Synthese. Deletion dieses Gens führt zur Mislokalisierung des Sec12p Proteins, das verantwortlich für die Bildung von COPII Vesikeln aus der ER-Membran ist [44].

Zur Visualisierung der ERs wurden die Hefen mit dem Plasmid pSM1959-sec63-mRFP1 (pSM1959) transformiert, welches das Gen für das integrale Membranprotein Sec63p trägt, das mit einem mRFP1 fusioniert ist [45]. Das mRFP1 getaggte Sec63p wird die ER-Membran integriert und dient somit als ER-Marker. In diesen Zellen konnte das ER über Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden. Hierfür wurde das Mikroskop DM6000B der Firma Leica (Wetzlar, Deutschland)

verwendet, dass mit einer Leica DFC 365 FX Kamera und einem HC PL APO 63x Objektiv ausgestattet war und Extinktionen (Em) im Bereich von 550–569 nm und Emissionsmessungen (Em) im Bereich von 512-542 nm erlaubte.

Durch flusszytometrische Messungen (BD Biosciences, San Jose, USA, 10.000 Counts s⁻¹, Ex: 561 nm, Em: 670 ± 30 nm) war eine relative Quantifizierung und ein Vergleich der ER-Membranflächen in den konstruierten Stämmen möglich. Da wie oben beschrieben die Lipidpartikelbildung durch die genetischen Eingriffe reduziert wird, wurden diese mit Nilrot, einem Farbstoff der sich in neutrale Lipide einlagert [46] angefärbt. Die Visualisierung und Quantifizierung erfolgte ebenfalls durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und Flusszytometrische Messungen (Ex: 561 nm, Em: 670 nm). Die Quantifizierung der Triterpene erfolgte mittels GC-MS wie unter 4.1 beschrieben.

4.9.1 Erhöhung der Squalenproduktion durch Vergrößerung der Oberfläche des Endoplasmatischen Retikulums durch *OPI1* oder *PAH1* Deletion

Die Strategie zur ER Vergrößerung durch Deletion der oben genannten Targets, *RER2*, *OPI1* und *PAH1*, wurde zunächst dem Referenzstamm *S. cerevisiae* CEN.PK 111-61A getestet. Die Deletion des *RER2* Gens in diesem Stamm, führte zwar zu einem klar vergrößertem ER (Daten nicht gezeigt), die Mutanten waren aber nicht mehr in der Lage Ethanol zu verstoffwechseln. Da, wie unter 4.5 beschrieben, Ethanol die bevorzugte Kohlenstoffquelle für die Triterpenoidsynthese ist, wurde eine Konstruktion von Betulinsäureproduzenten auf Basis dieses Knockout-Stamms nicht weiter verfolgt.

Mutanten mit Deletion des *OPI1* oder *PAH1* Gens zeigten kein oder nur geringfügig vergrößertes ER, interessanterweise akkumulierten diese nicht für die Produktion von Triterpenen optimierten Stämme aber eine deutlich erhöhte Menge Squalen (Abb. 20). Dieser Effekt war in der *PAH1* Deletionsmutante stärker ausgeprägt, so dass in den weiteren Arbeiten die *PAH1*-Deletion ausgewählt, um Auswirkungen auf die Lupeol- und Betulinsäureproduktion zu untersuchen.

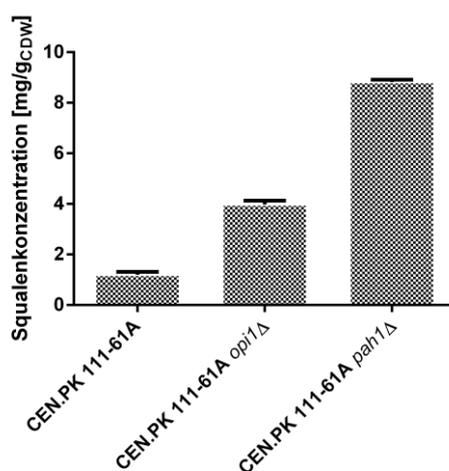


Abbildung 20: Spezifische Squalenkonzentration in *S. cerevisiae* CEN.PK 111-61A, CEN.PK 111-61A *opi1*Δ, CEN.PK 111-61A *pah1*Δ

4.9.2 Charakterisierung von Triterpenoid-produzierenden *S. cerevisiae* Stämmen mit veränderter ER Proliferation durch *PAH1* Deletion

Die Deletion von *PAH1* wurde in einem Referenzstamm *S. cerevisiae* CEN.PK 111-61A, dem Lupeolproduzenten *S. cerevisiae* CEN.PK *OEW* und den zu diesem Zeitpunkt besten Betulinsäureproduzenten *S. cerevisiae* CEN.PK2U *OEW.LjA15* (BA5) (s. Abschnitt 4.1.2) durchgeführt.

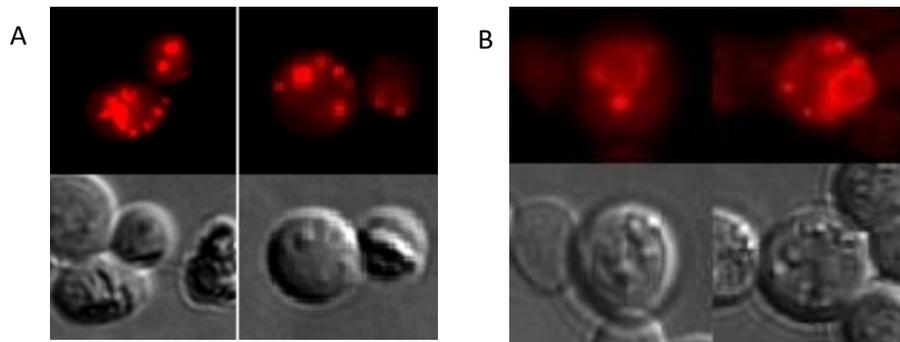


Abbildung 21: Fluoreszenz- und DIC-Bild von A) *S. cerevisiae* CEN.PK2U *OEW.LjA15* (BA5) und B) *S. cerevisiae* BA5 *pah1Δ* nach Färbung mit Nilrot.

Obwohl keine Vergrößerung der ER-Membran beobachtet werden konnte, wies die *PAH1* Deletionsmutante eine deutliche Reduzierung der Lipidpartikel auf. In einigen Zellen waren sogar keine

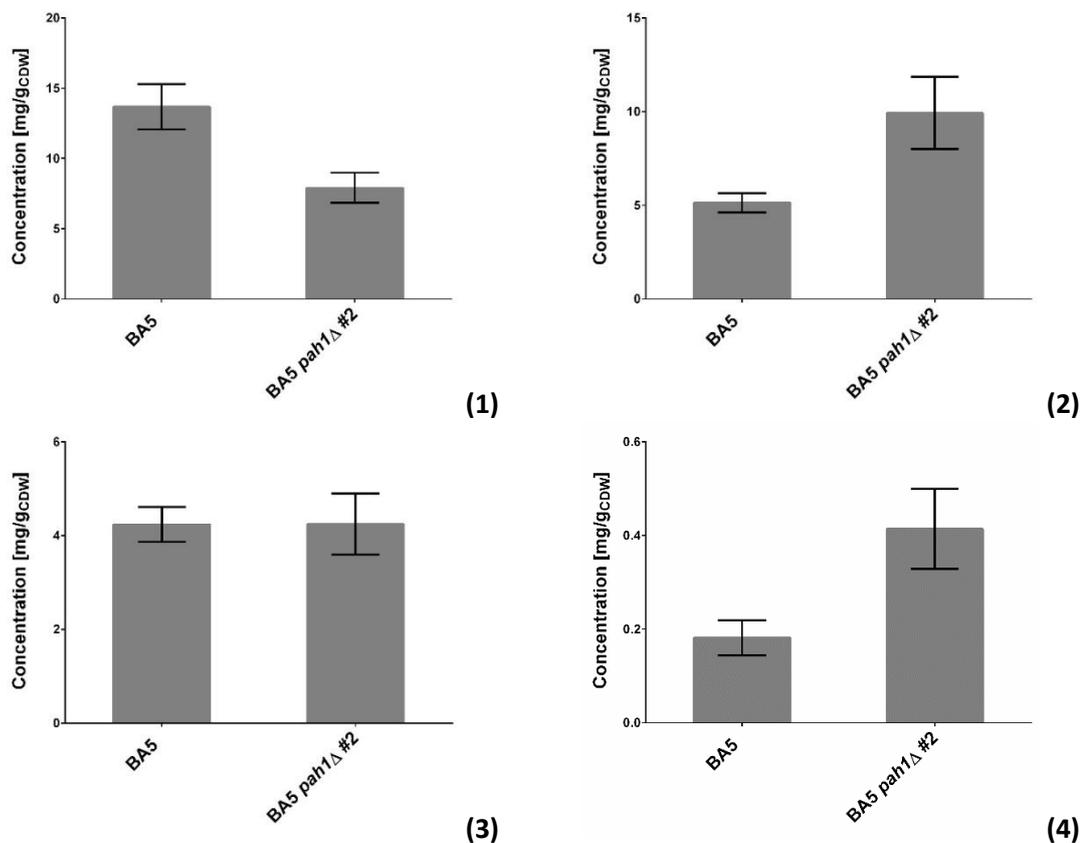


Abbildung 22: Gemessene Konzentrationen von (1) Squalen, (2) Lupeol, (3) Betulin und (4) Betulinsäure jeweils für den *S. cerevisiae* CEN.PK2U *OEW.LjA15* (BA5) und einer BA5 *pah1Δ* Deletionsmutante

Lipidpartikel mehr vorhanden (Abb. 21). Interessanterweise wurden in den Mutanten neben den Lipidpartikeln auch die ER-Membran und andere biologische membranähnliche Strukturen gefärbt.

Die *PAH1* Deletion führte im Stamm BA5 zu einer Abnahme der Squalenkonzentration und zur Steigerung der Lupeolkonzentration. Die gleiche Beobachtung wurde für den Lupeolproduzenten *S. cerevisiae* CEN.PK *OEW* gemacht (Daten nicht gezeigt). Während die Akkumulation von Betulin unverändert blieb, konnte der Betulinsäuregehalt verdoppelt werden. Die Manipulation der ER Proliferation stellt somit in der Tat eine Metabolic Engineering Maßnahme dar, mit der die Aktivität ER membrangebundener Stoffwechselwege verbessert werden kann. Die genauen Ursachen der hier beobachteten Akkumulation der Stoffwechselwegsintermediate und Produkte bedarf jedoch weitere Untersuchung.

4.10 Konstruktion und Charakterisierung der finalen Betulinsäureproduzenten

In den Abschnitten 4.1, 4.2 und 4.9 wurden Strategien zur Verbesserung der pentazyklischen Triterpenakkumulation beschrieben. Diese Arbeiten wurden parallel in verschiedenen Ausgangsstämmen durchgeführt. Zur Konstruktion finaler Produktionsstämme sollten die erfolgreichen Strategien in wenigen ausgewählten Ausgangsstämmen vereint werden. Ausgewählt wurden der Stamm BA5, der hohe Mengen der Vorstufe Squalen akkumuliert und in welchem die optimalen Gene des Betulinsäuresyntheseweges integriert waren, sowie die Stämme Simo1575, CK12, CK18.2 und CK18.3. In den vier letztgenannten Stämmen ist die *Erg7p* Aktivität verringert, was zu Akkumulation von 2,3-Oxidosqualen führt (s. auch Anhang A1).

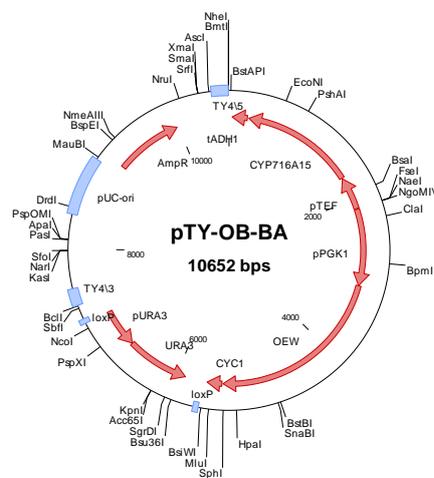


Abbildung 23: Plasmidkarte von pTY-OB-BA (10652 bp) für die multiple Integration der Lupeolsynthese (*OEW*) aus *Olea europaea* und der Cytochrom P450 Monooxygenase (*CYP716A15*) aus *Vitis vinifera*. Genomintegration erfolgt über TY-sites der Zelle.

Diese Stämme wurden wie folgt genetisch verändert. Für einen erhöhten Fluss zum 2,3-Oxidosqualen und einer höheren Aktivität des Betulinsäuresyntheseweges in BA5 wurde das Gen *ERG1* überexprimiert (genomische Integration des hefeeigenen *OG1* Gens unter Kontrolle des starken konstitutiven Promoters *TDH3*) und multiple Kopien des *OEW* und *CYP716A15* Gens in die TY Sites eingebaut (analog zu dem Vorgehen, das unter 4.1.3.3 beschrieben ist, Plasmidkarte s. Abb 23). Parallel hierzu wurde auch die episodale Expression der Gene *OEW* und *CYP716A15* von einem

Multicopy Plasmid (move4) getestet. Die multiple Integration der Gene *OEW* und *CYP716A15* wurde ebenfalls in dem Stamm Simo1575 durchgeführt.

Die CK Stämme enthielten die gleichen genetischen Modifikationen wie der hier konstruierte Simo1575 mit dem Unterschied, dass in diesen Stämmen anstatt der *OEW* aus *Olea europaea* und der Cytochrome P450 Monooxygenase *CYP716A15* aus *Vitis vinifera* die multifunktionelle *AtLUP1* und die Cytochrome P450 Monooxygenase *CYP716AL1* aus *Catharanthus roseus* mehrfach in das Genom integriert wurden sowie unterschiedliche Promotoren zur Steuerung der Expression der TEV Protease verwendet wurden (s. Abschnitt 4.1.3.2).

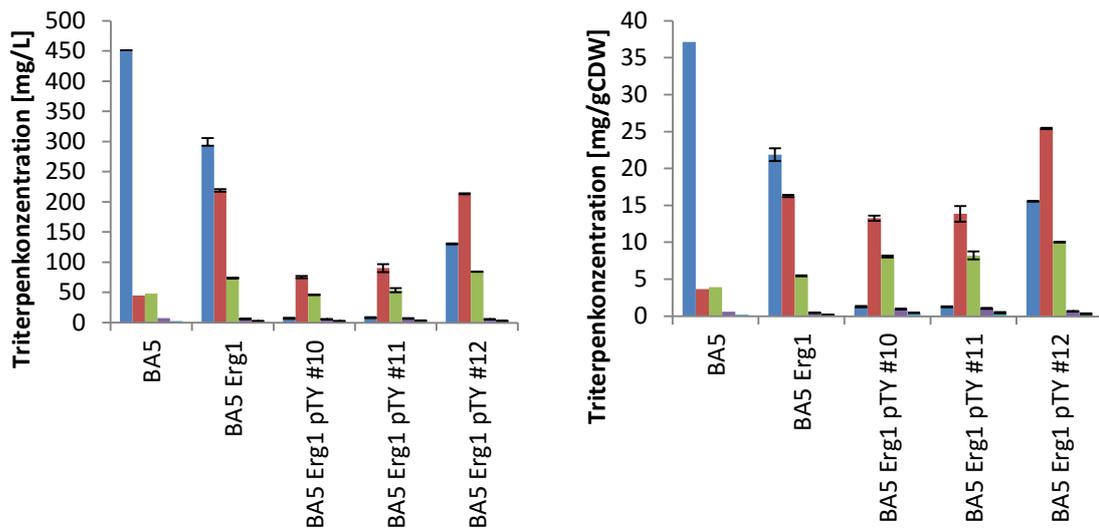


Abbildung 24: Volumetrische (links) und spezifische Konzentrationen (rechts) von Squalen (blau), Lupeol (rot), Betulin (grün), Betulinaldehyd (violett) und Betulinsäure (hellblau) in *S. cerevisiae* CEN.PK 2U *OEW.Lj.A15* (BA5), *S. cerevisiae* CEN.PK 2U *OEW.Lj.A15 ERG1* (BA5 Erg1) und unterschiedliche Kolonien nach der Transformation mit dem Plasmid pTY-OB-BA (BA5 Erg1 pTY #10 – #12)

Die Zellen wurden in WM8 Minimalmedium mit 50 g/L Glukose bis zur stationären Phase (mind. 72 h) kultiviert und anschließend aufgeschlossen. Die Quantifizierung erfolgte wie in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben über GC-MS nach Derivatisierung mit MSTFA oder direkt über RP-HPLC und einem Charged Aerosol Detektor.

Die zusätzliche *ERG1* Überexpression im BA5 Hintergrund erniedrigte die Squalenkonzentration um ein Drittel während sich die Lupeolkonzentration vervierfachte. Der Betulintiter erhöhte sich nur leicht, während die Konzentrationen der Folgeprodukte Betulinaldehyd und die Betulinsäure unverändert blieben. Multiple Integration des TY-Plasmids in diesem Stamm führte zu einer weiteren Verringerung der Squalenkonzentration, beeinflusste aber die Produktion der zyklischen Triterpene Betulin, Betulinaldehyd und Betulinsäure nur geringfügig. Aufgrund der geringeren Biomasseausbeute der Stämme, ergibt sich für die spezifischen Konzentrationen der Triterpene das in Abbildung 24 (rechts) dargestellte Bild. Die Transformante *S. cerevisiae* CEN.PK BA5 Erg1 pTY #12 zeigt hier im Vergleich zum Stamm BA5 Erg1 erhöhte Lupeol- und Betulinausbeute pro Gramm Biomasse. Der Flaschenhals in diesem Stoffwechselweg scheint die weitere Oxidation von Betulin zu sein.

Der BA5 Referenzstamm und der Stamm BA5.2 mit deregulierter *ERG1* Expression und episomaler Expression der Gene *OEW* und *CYP716A15* über das Multicopy Plasmid move wurden im Schüttelkolbenmaßstab für 72 h in WM8-Medium kultiviert und auf Wachstum und Triterpenoidproduktion mittels GC-MS Analytik untersucht und die Werte miteinander verglichen (Tab. 8).

Tabelle 8: GC-MS Analytik. Produktion von Squalen (mg/L) und pentazyklischen Triterpenen (mg/L) der Hefestämme BA5 (CEN.PK2U *OEW.LjCPR1.A15*) und BA5.2 (CEN.PK2U *OEW.LjCPR1.A15.ERG1* move4-*OEW-A15*) nach Kultivierung in WM8-Medium für 72 h. Die Daten beruhen bei BA5 auf einer Doppelbestimmung und bei BA5.2 auf einer Sechsfachbestimmung mit einer Standardabweichung von unter 20%.

Stamm	Squalen (mg/L)	Lupeol (mg/L)	Betulin (mg/L)	Betulinaldehyd (mg/L)	Betulinsäure (mg/L)
BA5	540,2	38,6	49,1	4,0	1,5
BA5.2	224,5	106,8	43,9	1,9	0,5

Die *ERG1* Überexpression und zusätzliche Dosis der Gene *OEW* und *CYP716A15* führte wie in den oben beschriebenen Stämmen zu einer Verschiebung des Squalens zum Lupeol, eine Steigerung des Betulinsäuregehalts blieb jedoch aus. Die Titer an Betulin, Betulinaldehyd und Betulinsäure waren sogar geringer als die in Kulturen des BA5. Dies ist nicht durch geringere Biomassekonzentrationen begründet, da die die Biotrockenmassekonzentration in den Kulturen beider Stämme etwa 13-14 g/L betrug. Weitere Untersuchungen ergaben hingegen, dass das Sterol Lanosterol, welches wie Lupeol von 2,3-Oxidosqualen abgeleitet ist, im BA5.2 erhöht ist (nicht dargestellt).

Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass die Überexpression von *ERG1* zur Anreicherung der Vorstufe Lupeol führt, die weiteren Oxidationsschritte, bedingt durch das *CPR/CYP*-System, jedoch nicht optimal ablaufen. Eine Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung des Endoxidationsproduktes Betulinsäure durch Einbau der in Abschnitt 4.2.2 identifizierten optimalen Kombination von *CPR* und *CYP* Genen wäre erstrebenswert, konnte im Projektzeitraum jedoch nicht mehr realisiert werden.

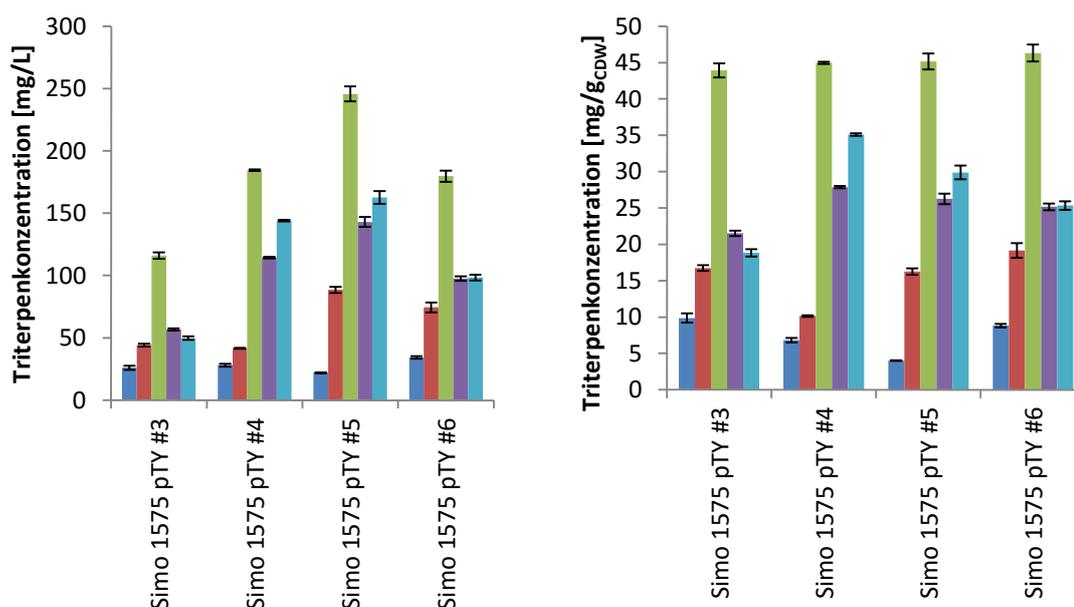


Abbildung 25: Volumetrische (links) und spezifische Konzentrationen (rechts) von Squalen (blau), Lupeol (rot), Betulin (grün), Betulinaldehyd (violett) und Betulinsäure (hellblau) in *S. cerevisiae* CEN.PK Simo1575 pTY-OB-BA #3 - #6

Parallel zu diesen Arbeiten wurde der Betulinsäuresyntheseweg durch multiple Integration der Gene *OEW* und *CYP716A15* in den 2,3-Oxidosqualen produzierenden Stamm Simo1575 eingebracht. Vier Transformanten wurden bezüglich ihrer Triterpenproduktivität charakterisiert. Die die Syntheseleistung variierte zwischen den Klonen, was auf eine unterschiedliche Anzahl an Integrationsevents und damit variierende Gendosis hinweist (Abb. 25). Insgesamt zeigten alle vier Transformanten im Vergleich zu den Stämmen auf BA5 Basis eine deutlich höhere Bildung des Endproduktes Betulinsäure, mit einem maximalen Titer von ca. 144,1 mg/L und einem Gehalt von ca. 35,1 mg/g_{CDW}. Das im Simo1575 akkumulierende 2,3-Oxidosqualen konnte durch Einbringen der heterologen Gene effizient in den Betulinsäuresyntheseweg geschleust werden. Wie in den BA5 Stämmen akkumulierten auch in diesen Stämmen die Vorstufen der Betulinsäure, die Durchoxidation zur Betulinsäure durch die P450 Monooxygenase war also auch in diesen Stämmen weiterhin limitierend. Der bestproduzierende Stamm akkumulierte in Schüttelkolbenexperimente in WM8 Medium mit 50 g/L Glukose 6,8 mg/g_{CDW} Squalen, 10,1 mg/g_{CDW} Lupeol, 45,0 mg/g_{CDW} Betulin, 27,9 mg/g_{CDW} Betulinaldehyd und 35,1 mg/g_{CDW} Betulinsäure. Insgesamt entspricht das einem Triterpengehalt von 12,5%.

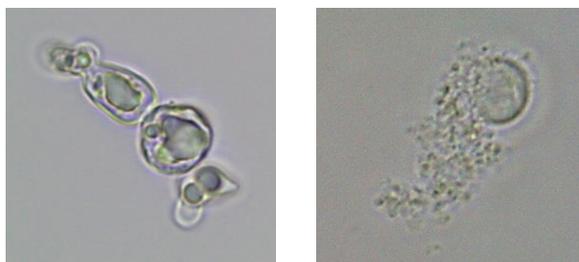


Abbildung 26: Lichtmikroskopiebild von *S. cerevisiae* Simo1575 pTY#4, kultiviert in Glukose Minimalmedium WM8. Links: Zellen mit stark vergrößerten Lipidpartikeln, rechts: Lysierte Zelle mit freigesetzten Lipidpartikeln.

Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften der Triterpenoide wird angenommen, dass diese in die Lipidpartikel eingelagert werden, wie es für Squalen bereits gezeigt wurde [47]. Die signifikant, erhöhte Triterpenproduktion war daher ebenfalls unter dem Lichtmikroskop in Form von vergrößerten bzw. verschmolzenen Lipidpartikel, die in einigen Fällen die Zelle und auch den Bud komplett ausfüllten, sichtbar (Abb. 26). Außerdem wurde eine Häufung zerplatzter Zellen und freigesetzter Lipidpartikel beobachtet. Des Weiteren wurde für diesen Stamm eine Agglomeration der Zellen beobachtet, eventuell hervorgerufen durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Zellen und ausgeschiedenen oder freigesetzten Lipidpartikel.

Hier ist zu erwähnen, dass das gebildete Ethanol nach 240 h noch nicht vollständig aufgebraucht war und zu diesem Zeitpunkt kein Wachstum der Zellen mehr festzustellen war, was auf eine Limitierung anderer Medienkomponenten hindeutet oder auf hohen Zellstress zurückzuführen ist.

Um ersteres zu prüfen, wurden die Transformanten Simo1575 pTY#4 und Simo1575 pTY#5 in dem in Abschnitt 4.5. beschriebenen in Schüttelkolben in optimiertem WM8+ Medium kultiviert. Unter diesen Bedingungen verbrauchten diese Stämme das gebildete Ethanol vollständig und setzten Squalen nahezu vollständig zu den Folgeprodukten um (keine oder geringfügige Akkumulation von Squalen). Insgesamt konnte die Triterpenausbeute beachtlich gesteigert werden. Die maximalen Titer (Simo1575 pTY#5) betragen 125,4 mg/L Lupeol, 708,6 mg/L Betulin, 218,3 mg/L Betulinaldehyd und 239,1 mg/L Betulinsäure, was einer prozentualen Gesamttriterpengehalt von 22,8%

(g/g_{CDW}) entspricht (Abb. 27). Offensichtlich unterstützt die erhöhte Vitamin- und/oder der Spurenelementkonzentration die Synthese und Funktionalität der Ethanol Degradation und / oder der heterologen Enzyme.

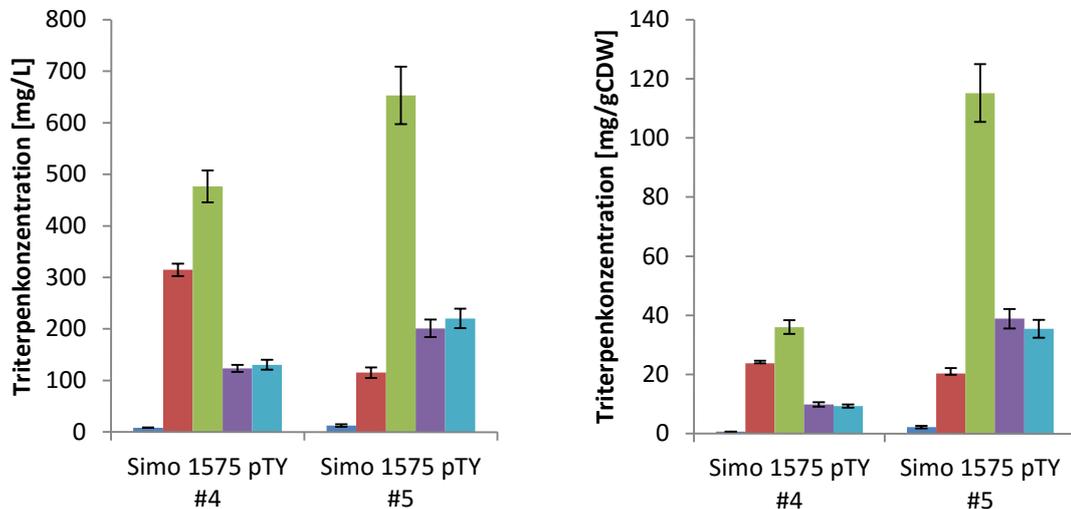


Abbildung 27: Volumetrische (links) und spezifische Konzentrationen (rechts) von Squalen (blau) , Lupeol (rot), Betulin (grün), Betulin aldehyd (violett) und Betulin säure (hellblau) in *S. cerevisiae* CEN.PK Simo1575 pTY-OB-BA #4 - #5 nach Kultivierung in optimiertem WM8+ Medium.

Als dritte zu untersuchende Stammgruppe dienten die CK-Stämme, in denen die Gene *AtLUP1* und *CYP716A1* integriert wurden. Da *AtLUP1p*, im Gegensatz zu *OEW*, eine multifunktionale, unspezifische Oxidosqualenzylase kodiert, können neben Lupeol noch β -Amyrin und 4 weitere Produkte entstehen können [23]. In der Tat zeigten sich in den HPLC und GC Chromatogrammen von Zellextrakten dieser Stämme neben den Metaboliten des Betulinsyntheseweges unbekannte Peaks, die leider nicht eindeutig zuzuordnen waren.

Die hohe Basalexpression der TEV Protease in Stamm CK12_10_1 (s. Abschnitt 4.1.3.1) wirkte sich auf Grund der reduzierten Ergosterolsynthese negativ auf das Wachstum aus. Die Produkttiter dieser Kulturen waren daher relativ gering, die Akkumulation pro g Biomasse jedoch mit einem Gesamtgehalt der zyklischen Triterpene von 75,1 mg/g_{CDW} hoch, dieser blieb aber dennoch hinter den Gehalten der Simo1575 pTY Stämme zurück. Auch die volumetrischen und spezifischen Konzentrationen der pentazyklischen Triterpene der CK18 Stämme bleiben weit hinter denen der Simo Stämme zurück (Abb. 28).

In allen Stämmen führten die eingeführten Modifikationen zu einer Erhöhung der Synthese der pentazyklischen Triterpene. Der Stamm Simo1575 pTY#5 (im Weiteren BA6 genannt) erzielte die höchste Syntheseleistung und wurde in Bioreaktorexperimenten unter optimalen Produktionsbedingungen (s. Abschnitt 4.12) weiter charakterisiert.

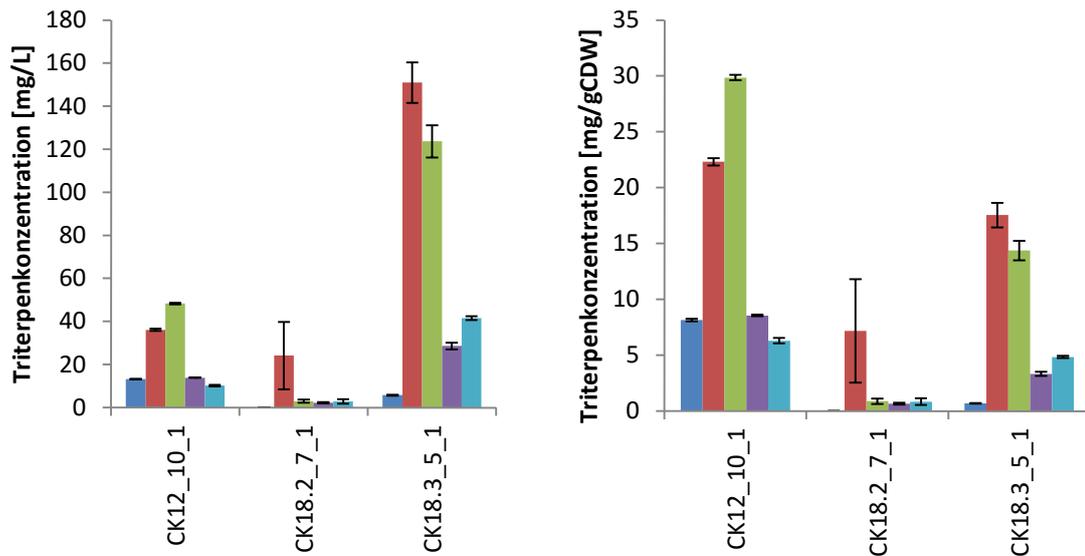


Abbildung 28: Volumetrische (links) und spezifische Konzentrationen (rechts) von Squalen (blau), Lupeol (rot), Betulin (grün), Betulinaldehyd (violett) und Betulinsäure (hellblau) in *S. cerevisiae* CEN.PK CK12_10 (P_{CUP1}_TEVp), *S. cerevisiae* CEN.PK CK18.2_7 (P_{HXT7}_TEVp), *S. cerevisiae* CEN.PK CK18.3_5 (P_{HXT7}_TEVp)

4.11 Entwicklung eines Produktaufreinigungsverfahrens

Im Rahmen des Unterauftrages im Projekt TRITERP „Nachhaltige Herstellung von Triterpenen mit spezialisierten Bäckerhefen“ beschäftigte sich der Lehrstuhl Anlagen- und Prozesstechnik der TU Dortmund (TU Do) mit der Isolierung der gewünschten Triterpene aus den Fermentationsbrühen des Hefestammes *S. cerevisiae* CEN.PK BA4. Besonderes Augenmerk lag auf der Wahl umweltfreundlicher Additive, z. B. Lösungsmittel (LSM), zur Isolierung des Wertstoffes Betulinsäure. Um ein geeignetes Aufreinigungsverfahren, das sogenannte Downstream processing (DSP), für das genannte Wertprodukt zu entwickeln, müssen Stoffdaten gesammelt, verschiedene Verfahrensalternativen generiert und experimentell evaluiert werden, welches im Folgenden geschildert wird. Das Wertprodukt Betulinsäure mit einem Molekulargewicht von 457 g/mol und einem Log $K_{O/W}$ -Wert von 6,85 [48] verteilt sich bevorzugt in unpolaren Lösungsmitteln. Außerdem ist die Löslichkeit in Wasser mit 0,021 mg/L sehr gering [49], was ebenfalls den hydrophoben, unpolaren Charakter des Moleküls bestätigt.

Die erste Aufgabe, die sich nach Erhalt einer Fermentationsbrühe zur Produktisolierung stellte, ist die Charakterisierung der einzelnen Phasen hinsichtlich der Produktverteilung und Konzentration. Im Falle der von der RWTH Aachen bereitgestellten Fermentationsbrühen wurde, wie in Abbildung 29 dargestellt, Betulinsäure sowie Betulin (B), welches ebenfalls als Wertprodukt prozessiert werden kann, in den zwei Feststoffphasen lokalisiert. Dabei war die untere Feststoffphase direkt nach Fermentation kaum sichtbar, erst nach Einfrieren und Auftauen der Brühe konnte diese nachweislich bei der Phasentrennung detektiert werden.

Betulinsäure war je nach Fermentationsbatch bis zu 30-fach konzentrierter in der unteren festen Phase vorhanden, wobei das Nebenproduktspektrum im Vergleich zur oberen festen Phase deutlich geringer war. Da aber der Aufwand die zwei festen Phasen voneinander zu trennen zu groß war und das Produkt in beiden festen Phasen verteilt vorlag, wurde für weitere Untersuchungen die gesamte Feststoffphase betrachtet.

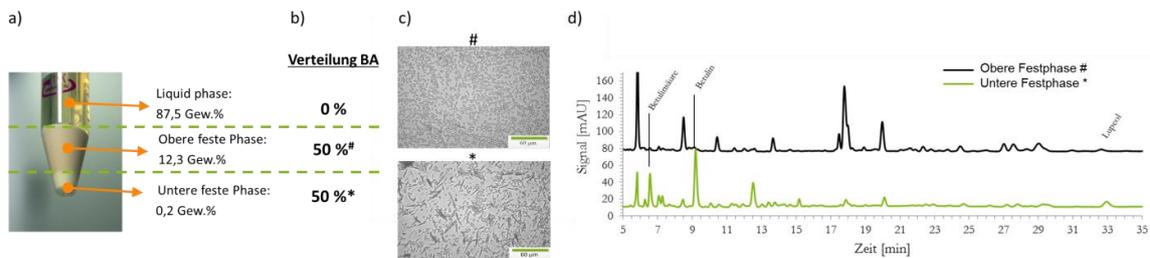


Abbildung 29: a) Die einzelnen Phasen der Fermentationsbrühe nach Trennung mittels Zentrifugation, b) Verteilung der Betulinsäure in den Phasen, c) Mikroskopaufnahmen der einzelnen festen Phasen (# reine Biomasse, * Biomasse und Kristalle), d) Chromatogramme der einzelnen Phasen

Aufgrund der Tatsache, dass die untere Feststoffphase erst nach Einfrieren und Auftauen sichtbar war, stellte sich die Frage, ob die Produkte intrazellulär vorliegen und ein Zellaufschluss zur Produktisolierung notwendig ist. Dazu wurden verschiedene Aufschlussmethoden (z. B. mechanisch mit Glaskugeln oder chemisch mit Toluol) getestet. Es zeigte sich, dass durch den Zellaufschluss nicht mehr Produkt gewonnen, sondern lediglich mehr Verunreinigungen detektiert werden konnten. Daher ist von einem Zellaufschluss abzusehen.

Für eine erste Produktisolierung von den Zellen bietet sich zum einem die Zerschäumung der gesamten Fermentationsbrühe oder nach einer Fest-Flüssig Trennung die Extraktion der erhaltenen Feststoffphase an.

Das Trennprinzip der Zerschäumung beruht darauf, dass oberflächenaktive bzw. amphiphile Substanzen an Gasblasen adsorbieren und mit dem generierten Schaum ausgetragen und isoliert werden. Da Betulinsäure einen amphiphilen Charakter aufweist schien dieses Verfahren als erster Prozessschritt denkbar. Zur Auslegung der Zerschäumung ist das Screening der Zerschäumbarkeit bei unterschiedlichen pH-Werten essentiell. Dazu wurde die gesamte Fermentationsbrühe bei pH-Werten von pH=3 - pH=9 in einer Zerschäumungskolonnen untersucht. Da während der Versuche auf unterschiedliche Fermentationsbatches zurückgegriffen werden musste, die unterschiedlich viel Antischaum während der Fermentation zugesetzt bekommen hatten, konnte keine eindeutige Aussage über die Zerschäumbarkeit von Betulinsäure getroffen werden. Das pH-Optimum konnte bei pH = 4 der Fermentationsbrühe identifiziert werden, an dem eine 2 fache Konzentrierung der Betulinsäure im Schaum erzielt werden konnte. Grundsätzlich kann die Zerschäumung als Verfahrensschritt nicht ausgeschlossen werden, doch sollte der Antischaumgehalt in der Fermentationsbrühe einheitlicher geregelt werden.

Eine andere Alternative als erster Prozessschritt ist die Extraktion der abgetrennten Feststoffphase. Da immer ein gewisser Rest Fermentationsmedium bzw. Wasser in der festen Phase (Zellpellet) verbleibt, wurden Lösungsmittel, die mit Wasser eine Mischungslücke und welche, die vollständig mit Wasser mischbar sind, verglichen. Verschiedene grüne Lösungsmittel wurden anhand von Literatur und einem am Lehrstuhl entwickelten Tool zur Lösungsmittelauswahl [50] in Standardversuchen (Phasenverhältnis $\theta = 10 \text{ [g}_{\text{LSM}}/\text{g}_{\text{CDW}}]$, $T = 25 \text{ °C}$, 15 h) gescreent. Die höchsten Ausbeuten wurden für Ethylacetat als Wasser unmischbares und für Aceton als Wasser mischbares Lösungsmittel gefunden (Tab. 9).

Für diese Lösungsmittel wurde dann im nächsten Schritt das optimale Phasenverhältnis von g_{LSM} zu 1 g_{CDW} bestimmt und die Kinetik der Extraktion aufgenommen. Für Ethylacetat können Phasenverhältnisse bis zu $\theta_{\text{minimal}} = 3 \text{ [g}_{\text{LS}}/\text{g}_{\text{CDW}}]$, für Aceton bis zu $\theta_{\text{minimal}} = 6 \text{ [g}_{\text{LSM}}/\text{g}_{\text{CDW}}]$ gewählt werden.

Die Kinetik der Extraktion mit Ethylacetat war mit 8 h bis zum Erreichen des Gleichgewichtes deutlich langsamer als für Aceton mit 1 h. Zusätzlich war das Verunreinigungsprofil mit Ethylacetat größer im Vergleich zu Extrakten mit Aceton. Beide Lösungsmittel sind ähnlich teuer und gut zu recyceln. Die Entscheidung des geeignetsten Extraktionsmittels sollte erst mit den nachfolgenden Schritten festgelegt werden.

Tabelle 9: Extraktionsversuche mit Ethylacetat und Aceton unter Verwendung eines Phasenverhältnis $\theta = 10$ [$\text{g}_{\text{LSM}}/\text{g}_{\text{CDW}}$], $T = 25$ °C und 15 h.

Lösungsmittel		Ausbeute Betulinsäure (%)	Ausbeute Betulin (%)
Ethylacetat	1. Extraktionsstufe	95,2 ± 0,7	86,5 ± 1,1
Aceton	2. Extraktionsstufe	91,5 ± 1,0	81,6 ± 2,9
	3. Extraktionsstufe	8,5 ± 1,0	18,4 ± 2,9

Die mit Aceton oder Ethylacetat gewonnenen Extrakte hatten im Durchschnitt eine Reinheit, bezogen auf die Flächen aller Peaks im Chromatogramm, von ungefähr 0,7%, wobei Betulin ebenfalls als Verunreinigung angesehen wurde. Daher waren weitere Reinigungsschritte nach der Extraktion notwendig. Zur Auswahl standen Adsorption und Präzipitation. Eine direkte weitere Extraktion ist nicht durchführbar, da kein unpolares Lösungsmittel eine Mischungslücke mit Ethylacetat oder Aceton bildet.

Für die Untersuchungen der Adsorption wurden Adsorbentien verschiedener Polarität und unterschiedlichen Oberflächen zu Extrakt-Verhältnissen (Ω [m^2/mL]) nach dem Leitfaden von Winkelkemper [51] hinsichtlich Ausbeute und Selektivität evaluiert. Grundsätzlich konnte gezeigt werden, dass es Adsorbentmaterialien gibt die Betulinsäure und/oder Betulin adsorbieren, jedoch konnte eine Ausbeute >50% aus dem Acetonextrakt und >37% aus dem Ethylacetatextrakt nicht überstiegen werden. Die Adsorption führte bei beiden Extrakten zu keiner Reinheitssteigerung. Zudem gelang es nicht die gesamte adsorbierte Masse an Betulinsäure und Betulin von den Partikeln zu desorbieren, was die Ausbeute weiter verringern würde. Daher wurde die Adsorption nicht weiter betrachtet.

Um die Präzipitation als möglichen Aufreinigungsschritt zu bewerten, musste erst die Art der Präzipitation ausgewählt werden. Auf Basis der Stoffeigenschaften, nämlich der schlechten Wasserlöslichkeit, die mit sinkendem pH-Wert zunimmt [49] wurde sich für eine Antisolvent-Präzipitation entschieden. Dazu muss das sogenannte Antisolvent eine sehr geringe Löslichkeit zum Produkt aufweisen und mit der Feedphase, hier den Extrakten, vollständig mischbar sein. Dies kann bei der Konstellation von Wasser als Antisolvent und dem Acetonextrakt gewährleistet werden. In einem ersten Screening wurde das Phasenverhältnis von Antisolvent zu Extrakt untersucht. Dabei wurde Wasser und Wasser mit verschiedenen 1-, 2- und 3-protonigen Säuren, vor allem Carbon-säuren wegen der biologischen Abbaubarkeit, untersucht. Bei einem Verhältnis von $1,27 \text{ g}_{\text{Wasser}}/\text{g}_{\text{Acetonextrakt}}$ konnte eine Ausbeute von 82% Betulinsäure mit einer 11-fachen Steigerung der Reinheit (Betulin als Verunreinigung) und eine Ausbeute von Betulin zu 88% mit einer Reinheit von 65% (Betulinsäure als Verunreinigung in Rechnung einbezogen) erzielt werden. Die Präzipitation mit angesäuertem Wasser erhöhte nur die Ausbeute an Betulin aber nicht von Betulinsäure. Aufgrund der geringeren Umweltbelastung wurde die Präzipitation mit reinem Wasser bevorzugt.

Um die Reinheit weiter zu steigern wurde ein anschließender Waschschrift mit reinem Wasser und mit Hexan [52] durchgeführt. Dabei konnte trocken keine weitere Reinheitssteigerung erzielt werden. Das rückgelöste Präzipitat besteht zu ca. 73% aus den Produkten Betulinsäure und Betulin. Eine Massenbilanz des derzeitigen Verfahrens ist in Abbildung 30 zu sehen. Für eine weitere Isolierung der Betulinsäure sollten chromatographische Verfahren oder eine Kristallisation durch Kühlung untersucht werden.

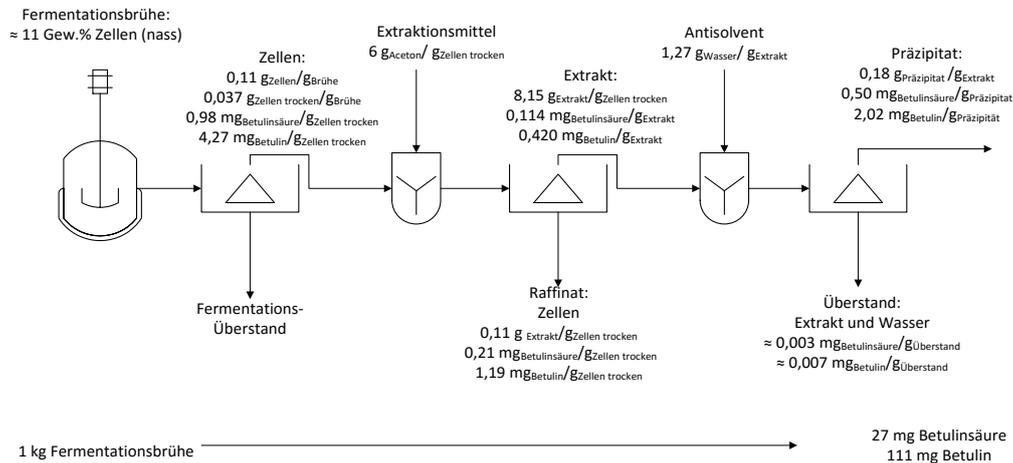


Abbildung 30: Prozess zur Isolierung von Betulinsäure und Betulin aus Fermentationsbrühen der untersuchten Hefe *S. cerevisiae* CEN.PK BA4.

4.12 Upscaling und Optimierung der Fermentationsbedingungen

In einer abschließenden Fermentation, wurden die optimierten Prozessparameter zusammen mit der entwickelten Fed-Batch Strategie für die Triterpenproduktion im Gramm-Maßstab mit dem finalen Betulinsäureproduzenten *S. cerevisiae* BA6 angewendet. Bereits in einfachen Schüttelkolbenexperimenten zeigte der Stamm eine Steigerung der Triterpenkonzentration um ein Vielfaches (Abschnitt 4.10) In einer kontrollierter Fed-Batch-Fermentation mit gepulstem Ethanolfeed konnte die Produktivität und die volumetrische Konzentration von Betulin und Betulinsäure noch weiter gesteigert werden (Abb. 31).

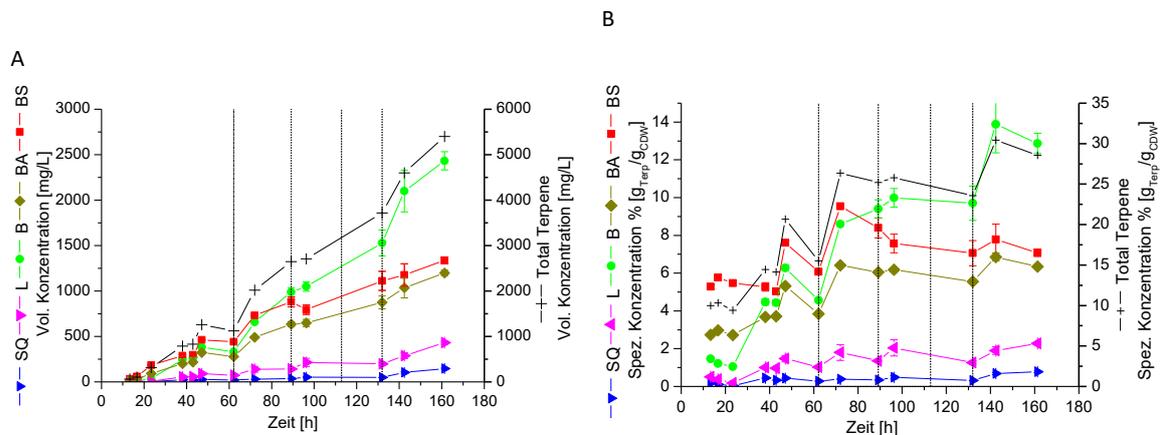


Abbildung 31: Verlauf der volumetrischen (A) und der spezifischen (B) Triterpenkonzentration während eines gepulsten Ethanol-Fed-Batches im Bioreaktor mit dem finalen Betulinsäureproduzenten *S. cerevisiae* BA6. SQ=Squalen, L=Lupeol, B=Betulin, BA=Betulinaldehyd, BS=Betulinsäure. Vertikale, gestrichelte Linien stellen die gepulste Zugabe von 25 g/L Ethanol dar. Die totalen Terpenkonzentrationen sind die Summe der Konzentrationen von L, B, BA, und BS.

Die Produktivität für Betulinsäure hat sich mit 8,30 mg/L/h im Vergleich zum *S. cerevisiae* BA4 mehr als verzehnfacht. Mit dem Betulinsäureüberproduzenten *S. cerevisiae* BA6 und dem entwickelten und optimierten Fermentationsprozess war es nun möglich, im Labormaßstab ausreichend Fermenterbrühe herzustellen, die in einer hohen Konzentration die Zielprodukte enthielt. In einem abschließenden Versuch wurden aus der generierten Fermenterbrühe die zyklischen Triterpene mittels des von der AG Schembecker (APT, TU Dortmund) im Unterauftrag entwickelten Extraktionsverfahrens extrahiert (s. Abschnitt 4.11).

Dazu wurden ca. 7 L Fermenterbrühe aus Experimenten, in denen verschiedene Fed-Batchstrategien getestet wurden, aufgearbeitet. Nach Eindampfen und Trocknen des Rohextraktes wurde ein Pulver erhalten, welches als Hauptkomponenten Betulin, Betulinsäure und Betulinaldehyd enthält. Weiterhin sind geringe Mengen Lupeol, Squalen sowie weitere Verunreinigungen enthalten (siehe HPLC-Chromatogramm in Abbildung 32 B). Die gewonnene Gesamtmenge betrug 32 g. Eine Chromatographie zum Aufreinigen der Betulinsäure wurde nicht durchgeführt.

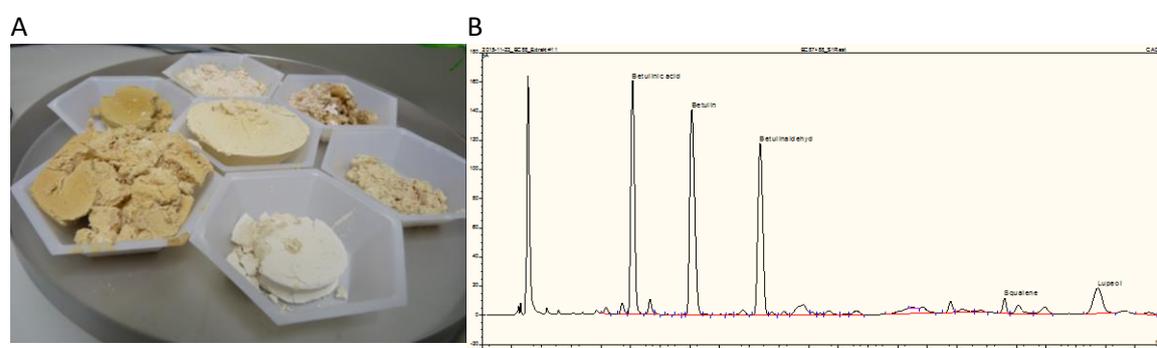


Abbildung 32: (A) Extrahiertes, eingedampftes und getrocknetes Produktgemisch aus verschiedenen Fed-Batch Fermentationen mit *S. cerevisiae* BA6. (B) HPLC-CAD Chromatogramm des Acetonrohextraktes einer Fed-Batch Fermentation von *S. cerevisiae* BA6.

4.13 Etablierung eines Zellaufschlussverfahrens zur Freisetzung der Triterpene (Autolyse)

Wie unter Abschnitt 4.11 beschrieben, führt ein Zellaufschluss zu einer stärkeren Verunreinigung des Zellextrakts. Aus diesem Grund wurde von der Entwicklung und Anwendung eines Autolyseverfahrens abgesehen und das im Abschnitt 4.11 vorgestellte Aceton-Extraktionverfahren weiterverfolgt. Dieses erlaubte es ohne einen mechanischen Zellaufschluss die Zielprodukte effizient und selektiv aus den pelletierten Zellen zu extrahieren.

4.14 Ökoeffizienzanalyse

In der Ökoeffizienzanalyse (ÖEA) werden ökonomische und ökologische Kriterien kombiniert, um eine Aussage über die Wettbewerbsfähigkeit eines Produktionsverfahrens im Vergleich zu Alternativen treffen zu können. Eine ÖEA besteht aus zwei zusammengeführten Bewertungsverfahren: Ökologische und ökonomische Bewertung. Beide Bewertungen werden im Rahmen dieser Analyse mit Hilfe von Stoffstrommodellen durchgeführt.

Die Bewertung der Umweltauswirkungen orientiert sich an den Standards für die Erstellung von Ökobilanzen [53,54]. Als Systemgrenze wird der Bilanzraum cradle-to-gate gewählt. Für die Vorketten, das sogenannte Hintergrundsystem, werden Datensätze aus der Datenbank ecoinvent v3 [55] mit dem System Model 'Allocation, default' verwendet. Mit Hilfe des Stoffstrommodells wird

eine Sachbilanz errechnet, die anschließend mit Bewertungssystemen der ecoinvent v3 Datenbank bewertet wird. Das Ergebnis ist eine ökologische Wirkungsabschätzung. Für ÖEAs wird ein Single-Score-Indikator (etwa Ecoindicator99 [56]) benötigt. Da diese eine gewisse Subjektivität für das Ergebnis bedeuten, werden die Sachbilanzen zusätzlich mit dem Midpoint-Indikatoren-Bewertungssystem CML 2001 (Hintergründe zur Methode in [57]) bewertet. Die ökonomische Bewertung wird ebenfalls auf Basis des Stoffstrommodells erstellt. Hierzu werden Kosteninformation wie Material-, Energie-, Hilfsstoff- und Gehaltskosten in das Modell integriert.

Zusammen mit der ökologischen Bewertung (Single-Score-Indikator) kann das Gesamtergebnis in einer sogenannten Ökoeffizienz-Matrix (beschrieben beispielsweise durch Saling [58]) abgebildet werden. Diese Matrix besitzt eine ökologische und eine ökonomische Dimension. Sie erlaubt eine eindeutige Darstellung und Abgrenzung der verschiedenen Alternativen, womit eine Aussage zur ökonomisch-ökologischen Wettbewerbsfähigkeit getroffen werden kann.

Im Rahmen dieses Projektes wurde früh im Projekt mit der Erstellung der ÖEA begonnen. Bereits zu Projektbeginn wurden erste Daten erfasst. Zum Statusseminar lagen erste vergleichende Modelle vor. Alle Modelle beziehen sich auf die Produktion von Betulinsäure (BA). Die Daten zur Modellierung der Materialeinsätze des Vordergrundsystems wurden projektintern zur Verfügung gestellt. Daten zum Energiebedarf, sowohl für das Modell 'Fermentation', als auch für das Modell 'Extraktion aus Rinde', wurden mittels physikochemischer Konstanten, Datenblättern von Laborgeräten und Literaturwerten (etwa [59]) abgeschätzt. Als Vergleichsprozess wurde die Extraktion von BA aus Rinde modelliert. Hierzu wurden Daten aus Patentschriften [60,61] genutzt.

Tabelle 10: Betrachtete Szenarien. Aus der Spalte Daten ist ersichtlich, dass die Daten für das Vordergrundsystem für alle Szenarien, die die Gewinnung von Betulinsäure mittels Fermentation abbilden von der RWTH zur Verfügung gestellt wurden.

Szenario	Kurzbeschreibung	Daten (Vordergrund)
A	Scenario A WM8	RWTH
B	Scenario B WM8+	RWTH
C	Scenario C Ethanol gepulster Fedbatch	RWTH
D	Scenario D Ehanol gepulster Fedbatch-N limitierung	RWTH
E	Scenario E Ethanol gepulster Fedbatch-N limitierung Verduyn	RWTH
F1	Scenario F Ethanol gepulster Fedbatch BA6	RWTH
F2	Scenario F Glukose gepulster Fedbatch BA6	RWTH
Rinde	Extraktion von Betulinsäure aus Rinde, mit Lösemittel-Recycling	[8,9]

Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Daten und Zwischenstände der ÖEA ausgetauscht und diskutiert. So wurde beispielsweise zum Projektende Primärdaten für die Aufreinigung sowie Daten zu den Szenarien F1 und F2 zur Verfügung gestellt. Auch das Vergleichsszenario wurde in der zweiten Projekthälfte ergänzt um Prozesse zum Lösemittel-Recycling. Im Projektverlauf wurden die in Tabelle 10 dargestellten Szenarien berechnet.

Die hier gezeigten Ergebnisse der Fermentations-Szenarien beruhen alle auf einem Produktaufreinigungsprozess bestehend aus Pelletierung, Ausschütteln mit Aceton und Ausfällung durch Ansäuern mit Salzsäure. Die Fermentationsszenarien unterscheiden sich in der eingesetzten Hefe, der Zusammensetzung des Mediums und der darauf angepassten Fermentationsbedingungen.

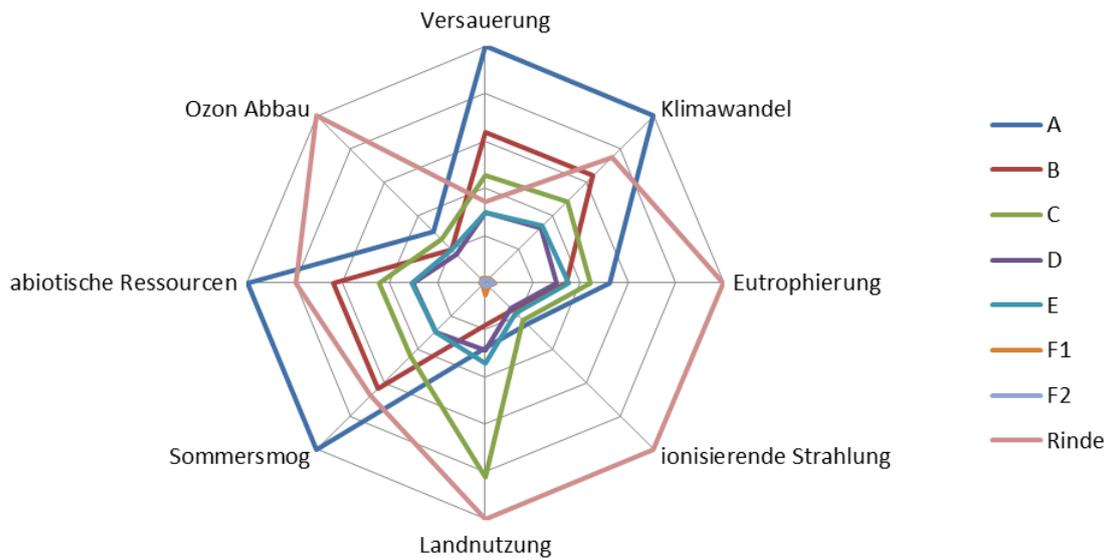


Abbildung 33: Netzdiagramm zum Vergleich der normalisierten Bewertungsergebnisse der verschiedenen Fermentationszenarien und dem Vergleichsprozess ‚Extraktion aus Rinde‘. Der jeweils größere Wert einer Bewertungskategorie ist auf 1 gesetzt, die verbleibenden Szenarien werden entsprechend niedriger skaliert.

Abbildung 33 zeigt die Bewertungsergebnisse der Fermentationsszenarien im Vergleich. Verschiedene Wirkungskategorien des Bewertungssystems CML sind dargestellt. Die Werte wurden normalisiert, sodass der Prozess mit der größeren Auswirkung jeweils den Wert 1 erhält. Deutlich ist ein großer Abstand der Szenarien F1 und F2 (beide mit BA6) zu den anderen Szenarien zu erkennen.

Für die Darstellung in einer Ökoeffizienzmatrix wurde für diese Studie der Single-Score-Indicator Ecoindicator99 genutzt. Dieser unterscheidet die Kategorien Ökosystem-Qualität, Humantoxizität und Ressourcenverbrauch. Die Bewertung der Fermentationsszenarien mit dem Ecoindicator99 findet sich in Abbildung 34.

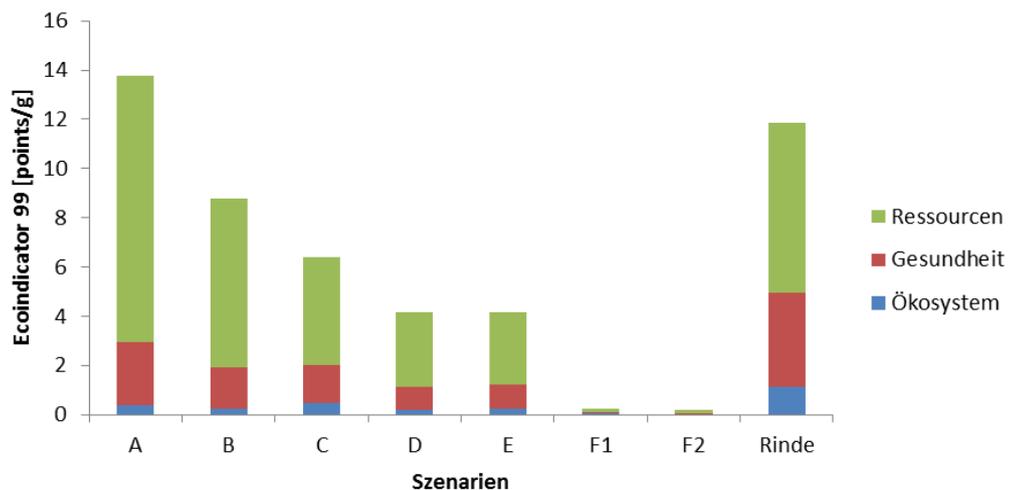


Abbildung 34: Bewertung der Fermentationsszenarien und der Extraktion aus Rinde mit dem Ecoindicator99

Für die Fermentationsszenarien liegen die Hotspots der Umweltauswirkungen beim Energieeinsatz (Kühlung für Fermentation) und Ammoniumchlorid (falls verwendet) auf der Input-Seite sowie dem Aceton für die Aufreinigung. Bei den Kosten wird der größte Anteil durch einzelne Bestandteile der Fermentationsbrühe beigetragen, beispielsweise Thiamin-HCl und Glukose für das Szenario F2. Auch der Energieeinsatz ist deutlich sichtbar. Bei der Aufreinigung wird der Großteil der Kosten durch Aceton verursacht. Prozesse, die für das Szenario ‚Extraktion aus Rinde‘ besonders großen Anteil an den verursachten Umweltwirkungen haben, sind der Lösemittel-Verbrauch (vor allem Toluol und Isopropanol) sowie der Energieverbrauch.

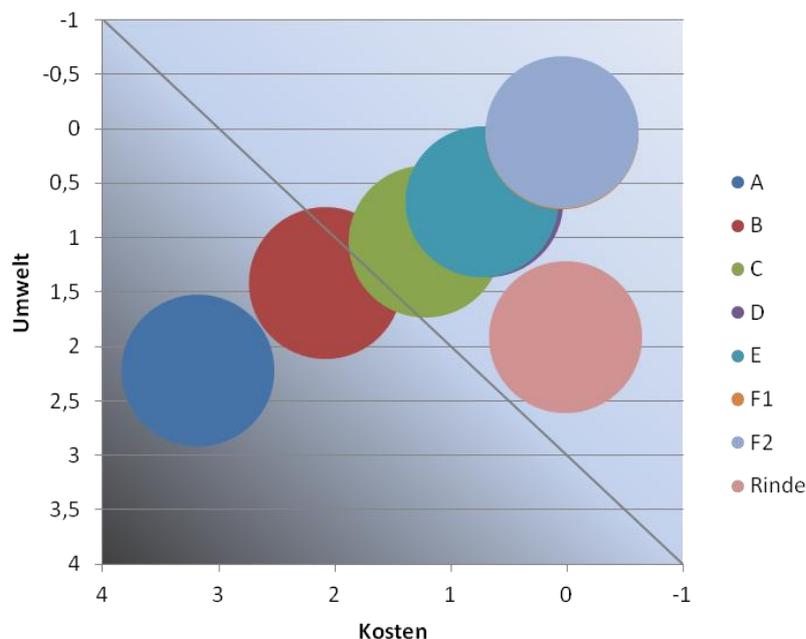


Abbildung 35: Ergebnisse in Form einer Ökoeffizienzmatrix

Abbildung 35 zeigt die Ergebnisse der verschiedenen Fermentationsszenarien und des Szenarios der Extraktion aus Rinde in einer so genannten Ökoeffizienzmatrix. Die Ergebnisse werden sowohl bezüglich der Umweltauswirkungen (berechnet mit Ecoindicator99) als auch bezüglich der Kosten normalisiert. Je weiter oben rechts ein Szenario zu finden ist, desto ökoeffizienter ist es. Je kleiner ein Wert, desto besser. Das Szenario Rinde ist also bezüglich der Kosten sehr günstig. Insgesamt schneiden die Szenarien F1 und F2 am besten ab.

Die Ergebnisse der Fermentationsszenarien lassen sich weiter deuten:

- Die zu Anfang des Projekts eingesetzte Stickstoffquelle NH_4Cl wurde in einer ÖEA als Faktor mit hoher Umweltauswirkung identifiziert. Durch Ersetzen dieses Salzes durch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ konnten die Umweltauswirkungen stark gedämpft werden.
- Ein hoher Titer, wie er beispielsweise bei den Szenarien F1 und F2 angesetzt wurde, ist günstig, auch wenn dieser erst nach längeren Fermentationszeiten erreicht wird.
- Der Kühlbedarf während der Fermentation hat einen deutlichen Einfluss auf das Endergebnis, dies ist jedoch wahrscheinlich schwierig zu vermeiden.

Insgesamt lässt sich die Ökoeffizienzmatrix so interpretieren, dass das Fermentationsverfahren mit der Extraktion aus Rinde konkurrieren kann und Potential hat, zu einem wirtschaftlichen und umweltfreundlichen Produktionsprozess weiterentwickelt zu werden.

4.15 Dissemination der Projektergebnisse

Das Projekt und die erzielten Ergebnisse wurden bisher in zwei Publikationen veröffentlicht (Ebert, B.E., Blank, L.M., Nachhaltige Herstellung von Triterpenen mit spezialisierten Bäckerhefen – TRITERP, ChemBioTec Review, 2012; Rugbjerg, P.; Knuf, C.; Forster, J.; Sommer, M.O., Recombination-stable multimeric green fluorescent protein for characterization of weak promoter outputs in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research* 2015, 15) sowie in 5 Konferenzbeiträgen (TERPNET 2013, 1.-5. Juni 2013, Kolymvari, Kreta, Griechenland; ProcessNet-Jahrestagung 2014 und 31. DE-CHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, 2010, Aachen, Deutschland; Metabolic Engineering X, 2014, Vancouver, Kanada, 12th Yeast Lipid Conference, 2015, Ghent, Belgien; Biochemical and Molecular Engineering XIX, 2015, Puerto Vallarta, Mexiko) vorgestellt. Mindestens 5 weitere Publikationen sind in Vorbereitung. Die generierten Stämme und gemachten Erfindungen sind durch ein Patent (WO 2015/121168 A1) geschützt, ein weiteres ist eingereicht (ORG/EP/1502, angemeldet am 4.11.2015 (Kanzlei Jungblut und Seuss)).

5 Diskussion

In dem dreijährigen TRITERP Projekt wurde erfolgreich ein Hefestamm konstruiert, der in der Lage ist beachtliche Mengen pentazyklischer Triterpene zu produzieren. Unter optimierten Fermentationsbedingungen wurde ein Gesamttiter der pentazyklischen Triterpene von 5,4 g/L erzielt (entsprechend einem spezifischen Gehalt von 30% g/g_{CDW}) bei einer Produktivität von 8.3 mg/L/h. Der Betulinsäuretitel betrug 1,3 g/L (~7% g/g_{CDW}). Dies entspricht einer 50-fachen Steigerung im Vergleich zum Produktionsstamm der ersten Generation (BA5), in welchem das als Hauptprodukt Squalen akkumulierte und in nur geringem Maße in Betulinsäure umgesetzt wurde. Ausschlaggebend für die hohe Produktivität des finalen Stammes ist die Verringerung der Lanosterolsynthese *Erg7p*, mit welcher die Oxidosqualenzyklase um die gemeinsame Vorstufe 2,3-Oxidosqualen konkurriert aber auch weitere zufällige Mutationen in diesem Stamm, die durch vergleichende Genomik identifiziert wurden. Eine umfassendere Charakterisierung des Stammes durch systembiologische Ansätze ist sinnvoll, um weitere Ansatzpunkte zur Stamm- und Prozessverbesserung zu identifizieren. Das in Bioreaktor-Fermentationen des Hefestammes gebildete Triterpen Gemisch setzte sich zusammen aus 2% Squalen, 22% Lupeol, 44% Betulin, 8% Betulinaldehyd und 24% Betulinsäure. Die verwendete Monooxygenase ist somit nicht in der Lage Lupeol vollständig in das Endoxidationsprodukt Betulinsäure umzusetzen. Eine weitere Stammoptimierung sollte daher die Integration spezifischer Alkohol und Aldehyddehydrogenasen, die den Schritt von Betulin zum Betulinaldehyd und Betulinsäure katalysieren, verfolgen. Im natürlichen Produzenten, der Platane, gibt es offensichtlich effiziente Enzyme, da hier Betulinsäure das Haupttriterpen ist (siehe Abb. 36). Vielversprechend ist auch die Verwendung der Cytochrome Reduktase MTR aus *Medicago truncatula*, sowie die Überexpression von *ERG1* und Deletion von *PAH1*, die in andern Stämmen zu einer Steigerung der Triterpensynthese beigetragen haben. Im Projektverlauf wurde ein Assay zur Charakterisierung von Triterpenexportern entwickelt, welches nun eingesetzt werden kann, um spezifische Transportproteine zu finden. Der Export der Triterpene ist sehr erstrebenswert, da es so scheint, dass die Hefen nur begrenzt mit Produkt beladen werden können und es bei hoher Beladung zu Zellyse kommt.

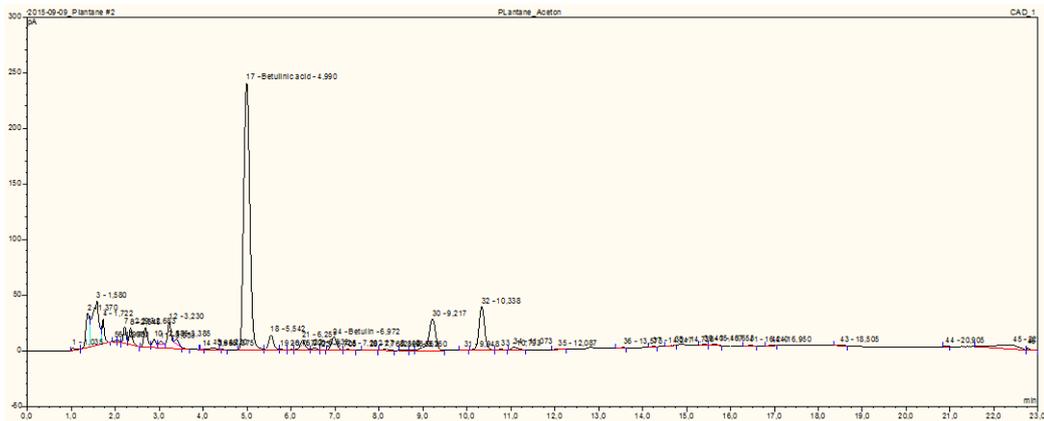


Abbildung 36: HPLC Chromatogramm des Extraktes von Platanenrinde. Die gemessene Menge Betulinsäure entspricht etwa 1.34 % g/gRinde

Insgesamt ist das Projektergebnis als sehr positiv zu werten, das Ziel der Entwicklung eines mikrobiologischen Verfahrens zur Produktion von Betulinsäure und anderen werthaltigen Derivaten wurde erreicht. Die Entwicklung eines großtechnischen Prozesses zur umweltfreundlichen und ökonomischen Produktion pentazyklischer Triterpene bewerten wir als realistisch.

6 Fazit

Das Projekt TRITERP konnte mit Erfolg abgeschlossen werden. In dem dreijährigen Projekt wurden Hefestämme konstruiert mit denen unter optimierten Fermentationsbedingungen 5,4 g/L Triterpene (ca. 30% g/g_{CDW}, Zusammensetzung: 8% Lupeol, 44% Betulin, 22% Betulinaldehyd, 24% Betulinsäure, 3% Squalen) synthetisiert wurden, der Betulinsäuretiter betrug 1,3 g/L. Die selektive Extraktion der Wertprodukte durch Aceton erlaubt eine erste Anreicherung der Hauptprodukte, ohne vorheriges Aufschließen der Zellen. Eine anschließende komplette Aufreinigung der Produkte ist durch Chromatographie und Destillation möglich. Die Ökoeffizienzanalyse ergab, dass der hohe Titer gemeinsam mit dem ressourcenschonenden und umweltfreundlichen Aufbereitungsverfahren das Verfahren nicht nur in wirtschaftlicher sondern auch aus ökologischer Sicht zu einer attraktiven Alternative zu der bisherigen Extraktion aus Pflanzenmaterial macht. Zwei Patente zum Schutz der im Projekt generierten Stämme und Verfahren wurden bereits angemeldet.

Literaturverzeichnis

1. Raskin, I.; Ribnicky, D.M.; Komarnytsky, S.; Ilic, N.; Poulev, A.; Borisjuk, N.; Brinker, A.; Moreno, D.A.; Ripoll, C.; Yakoby, N., *et al.*, Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnol* **2002**, *20*, 522-531.
2. Muffler, K.; Leipold, D.; Scheller, M.C.; Haas, C.; Steingroewer, J.; Bley, T.; Neuhaus, H.E.; Mirata, M.A.; Schrader, J.; Ulber, R., Biotransformation of triterpenes. *Process Biochem* **2011**, *46*, 1-15.
3. Pisha, E.; Chai, H.; Lee, I.S.; Chagwedera, T.E.; Farnsworth, N.R.; Cordell, G.A.; Beecher, C.W.W.; Fong, H.H.S.; Kinghorn, A.D.; Brown, D.M., *et al.*, Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nat Med* **1995**, *1*, 1046-1051.
4. Sunder, R.; Manu, J.; Ahma, S.M.J. Use of betulinic acid and its derivatives for inhibiting cancer growth and a method of monitoring this US_6048847, 2000.
5. Ruzicka, L.; Govaert, F.; Goldberg, M.W.; Lamberton, A.H., Polyterpene und polyterpenoide CXXIII. Abbau des Allo-betulins und Oxymethylen-allo-betulons mit Chromtrioxyd. *Helvetica Chimica Acta* **1938**, *21*, 73-83.
6. Robinson, F.P.; Martel, H., Betulinic acid from *Arbutus menziesii*. *Phytochemistry* **1970**, *9*, 907-&.
7. Fukushima, E.O.; Seki, H.; Ohyama, K.; Ono, E.; Umemoto, N.; Mizutani, M.; Saito, K.; Muranaka, T., CYP716A subfamily members are multifunctional oxidases in triterpenoid biosynthesis. *Plant Cell Physiol* **2011**, *52*, 2050-2061.
8. Kuhn, D.; Blank, L.M.; Schmid, A.; Bühler, B., Systems biotechnology - Rational whole-cell biocatalyst and bioprocess design. *Eng Life Sci* **2010**, *10*, 384-397.
9. Jensen, K.; Moller, B.L., Plant NADPH-cytochrome P450 oxidoreductases. *Phytochemistry* **2010**, *71*, 132-141.
10. Hannemann, F.; Bichet, A.; Ewen, K.M.; Bernhardt, R., Cytochrome P450 systems - biological variations of electron transport chains. *Bba-Gen Subjects* **2007**, *1770*, 330-344.
11. Polakowski, T.; Stahl, U.; Lang, C., Overexpression of a cytosolic hydroxymethylglutaryl-CoA reductase leads to squalene accumulation in yeast. *Appl Microbiol Biot* **1998**, *49*, 66-71.
12. Shibuya, M.; Zhang, H.; Endo, A.; Shishikura, K.; Kushiro, T.; Ebizuka, Y., Two branches of the lupeol synthase gene in the molecular evolution of plant oxidosqualene cyclases. *Eur J Biochem* **1999**, *266*, 302-307.
13. Rugbjerg, P.; Knuf, C.; Forster, J.; Sommer, M.O., Recombination-stable multimeric green fluorescent protein for characterization of weak promoter outputs in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **2015**, *15*.
14. Taxis, C.; Knop, M., TIPI: TEV protease-mediated induction of protein instability. *Methods Mol Biol* **2012**, *832*, 611-626.
15. Jensen, N.B.; Strucko, T.; Kildegaard, K.R.; David, F.; Maury, J.; Mortensen, U.H.; Forster, J.; Nielsen, J.; Borodina, I., EasyClone: method for iterative chromosomal integration of multiple genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **2014**, *14*, 238-248.
16. Jungbluth, M.; Renicke, C.; Taxis, C., Targeted protein depletion in *Saccharomyces cerevisiae* by activation of a bidirectional degron. *BMC Syst Biol* **2010**, *4*, 176.
17. Scalcinati, G.; Knuf, C.; Partow, S.; Chen, Y.; Maury, J.; Schalk, M.; Daviet, L.; Nielsen, J.; Siewers, V., Dynamic control of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* engineered for the production of plant sesquiterpene alpha-santalene in a fed-batch mode. *Metab Eng* **2012**, *14*, 91-103.
18. Seki, H.; Ohyama, K.; Sawai, S.; Mizutani, M.; Ohnishi, T.; Sudo, H.; Akashi, T.; Aoki, T.; Saito, K.; Muranaka, T., Licorice beta-amyrin 11-oxidase, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin. *P Natl Acad Sci USA* **2008**, *105*, 14204-14209.

19. Urban, P.; Mignotte, C.; Kazmaier, M.; Delorme, F.; Pompon, D., Cloning, yeast expression, and characterization of the coupling of two distantly related *Arabidopsis thaliana* NADPH-Cytochrome P450 reductases with P450 CYP73A5. *J Biol Chem* **1997**, *272*, 19176-19186.
20. Meijer, A.H.; Cardoso, M.I.L.; Voskuilen, J.T.; Dewaal, A.; Verpoorte, R.; Hoge, J.H.C., Isolation and characterization of a cDNA Clone from *Catharanthus roseus* encoding NADPH-cytochrome-P-450 reductase, an enzyme essential for reactions catalyzed by cytochrome-P-450 Mono oxygenases in plants. *Plant J* **1993**, *4*, 47-60.
21. Young, N.D.; Debelle, F.; Oldroyd, G.E.; Geurts, R.; Cannon, S.B.; Udvardi, M.K.; Benedito, V.A.; Mayer, K.F.; Gouzy, J.; Schoof, H., *et al.*, The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature* **2011**, *480*, 520-524.
22. Murakami, H.; Yabusaki, Y.; Sakaki, T.; Shibata, M.; Ohkawa, H., Expression of cloned yeast NADPH cytochrome P450 reductase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem-Tokyo* **1990**, *108*, 859-865.
23. Huang, L.L.; Li, J.; Ye, H.C.; Li, C.F.; Wang, H.; Liu, B.Y.; Zhang, Y.S., Molecular characterization of the pentacyclic triterpenoid biosynthetic pathway in *Catharanthus roseus*. *Planta* **2012**, *236*, 1571-1581.
24. Tuskan, G.A.; Difazio, S.; Jansson, S.; Bohlmann, J.; Grigoriev, I.; Hellsten, U.; Putnam, N.; Ralph, S.; Rombauts, S.; Salamov, A., *et al.*, The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* **2006**, *313*, 1596-1604.
25. Sui, C.; Zhang, J.; Wei, J.; Chen, S.; Li, Y.; Xu, J.; Jin, Y.; Xie, C.; Gao, Z.; Chen, H., *et al.*, Transcriptome analysis of *Bupleurum chinense* focusing on genes involved in the biosynthesis of saikosaponins. *BMC Genomics* **2011**, *12*, 539.
26. Nour-Eldin, H.H.; Hansen, B.G.; Norholm, M.H.; Jensen, J.K.; Halkier, B.A., Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments. *Nucleic Acids Res* **2006**, *34*, e122.
27. Verduyn, C., Physiology of yeasts in relation to biomass yields. *Anton Leeuw Int J G* **1991**, *60*, 325-353.
28. Lang, C.; Looman, A.C., Efficient expression and secretion of *Aspergillus niger* RH5344 polygalacturonase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biot* **1995**, *44*, 147-156.
29. Baddiley, J.; Hughes, D.E.; Mathias, A.P.; Pierpoint, W.S., The phosphorylation of pantothenic acid by *Lactobacillus arabinosus* 17-5. *Biochem J* **1954**, *56*, R22-R23.
30. Thomas, D.S.; Hossack, J.A.; Rose, A.H., Plasma-membrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* **1978**, *117*, 239-245.
31. Agudo, A.; Gonzalez, C.A.; Marcos, G.; Sanz, M.; Saigi, E.; Verge, J.; Boleda, M.; Ortego, J., Consumption of alcohol, coffee, and tobacco, and gastric cancer in Spain. *Cancer Causes Control* **1992**, *3*, 137-143.
32. Pons, A.; Dussap, C.G.; Pequignot, C.; Gros, J.B., Metabolic flux distribution in *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965 for various carbon sources. *Biotechnol Bioeng* **1996**, *51*, 177-189.
33. Wittmann, C., Metabolic flux analysis using mass spectrometry. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* **2002**, *74*, 39-64.
34. Heyland, J.; Blank, L.M.; Schmid, A., Quantification of metabolic limitations during recombinant protein production in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* **2011**, *155*, 178-184.
35. Heyland, J.; Fu, J.A.; Blank, L.M., Correlation between TCA cycle flux and glucose uptake rate during respiro-fermentative growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol-Sgm* **2009**, *155*, 3827-3837.
36. Poskar, C.H.; Huege, J.; Krach, C.; Franke, M.; Shachar-Hill, Y.; Junker, B.H., iMS2Flux - a high-throughput processing tool for stable isotope labeled mass spectrometric data used for metabolic flux analysis. *BMC Bioinformatics* **2012**, *13*, 295.
37. Quek, L.E.; Wittmann, C.; Nielsen, L.K.; Kromer, J.O., OpenFLUX: efficient modelling software for ¹³C-based metabolic flux analysis. *Microb Cell Fact* **2009**, *8*, 25.

38. Antoniewicz, M.R.; Kelleher, J.K.; Stephanopoulos, G., Determination of confidence intervals of metabolic fluxes estimated from stable isotope measurements. *Metab Eng* **2006**, *8*, 324-337.
39. Mo, M.L.; Palsson, B.O.; Herrgard, M.J., Connecting extracellular metabolomic measurements to intracellular flux states in yeast. *BMC Syst Biol* **2009**, *3*, 37.
40. Cox, J.S.; Chapman, R.E.; Walter, P., The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane. *Mol Biol Cell* **1997**, *8*, 1805-1814.
41. Schuck, S.; Prinz, W.A.; Thorn, K.S.; Voss, C.; Walter, P., Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response. *J Cell Biol* **2009**, *187*, 525-536.
42. Adeyo, O.; Horn, P.J.; Lee, S.K.; Binns, D.D.; Chandrabhas, A.; Chapman, K.D.; Goodman, J.M., The yeast lipin orthologue Pah1p is important for biogenesis of lipid droplets. *J Cell Biol* **2011**, *192*, 1043-1055.
43. Guerfal, M.; Claes, K.; Knittelfelder, O.; De Rycke, R.; Kohlwein, S.D.; Callewaert, N., Enhanced membrane protein expression by engineering increased intracellular membrane production. *Microb Cell Fact* **2013**, *12*.
44. Sato, M.; Sato, K.; Nishikawa, S.; Hirata, A.; Kato, J.; Nakano, A., The yeast RER2 gene, identified by endoplasmic reticulum protein localization mutations, encodes cis-prenyltransferase, a key enzyme in dolichol synthesis. *Mol Cell Biol* **1999**, *19*, 471-483.
45. Metzger, M.B.; Maurer, M.J.; Dancy, B.M.; Michaelis, S., Degradation of a cytosolic protein requires endoplasmic reticulum-associated degradation machinery. *J Biol Chem* **2008**, *283*, 32302-32316.
46. Greenspan, P.; Mayer, E.P.; Fowler, S.D., Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol* **1985**, *100*, 965-973.
47. Spanova, M.; Zweytick, D.; Lohner, K.; Klug, L.; Leitner, E.; Hermetter, A.; Daum, G., Influence of squalene on lipid particle/droplet and membrane organization in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta* **2012**, *1821*, 647-653.
48. Elusiyana, C.A.; Msagati, T.A.M.; Shode, F.O.; Mamba, B.B., Measurements of distribution coefficients and lipophilicity values for oleanolic acid and betulinic acid extracted from indigenous plants by hollow fibre supported liquid membrane. *B Chem Soc Ethiopia* **2011**, *25*, 321-332.
49. Jager, S.; Winkler, K.; Pfuller, U.; Scheffler, A., Solubility studies of oleanolic acid and betulinic acid in aqueous solutions and plant extracts of *Viscum album L.* *Planta Med* **2007**, *73*, 157-162.
50. Bergs, D.; Merz, J.; Delp, A.; Joehneck, M.; Martin, G.; Schembecker, G., A standard procedure for the selection of solvents for natural plant extraction in the early stages of process development. *Chem Eng Technol* **2013**, *36*, 1739-1748.
51. Winkelkemper, T. Key performance indicators for economic downstream process development. TU Dortmund University, 2011.
52. Draeger, B.H., DE), Galgon, Tino (Halle, DE), Neubert, Reinhard (Halle, DE), Wohlrab, Wolfgang (Halle, DE) Method of producing betulinic acid. 2001.
53. Standardization, I.O.f., Environmental management - Life cycle assessment - Principles and framework (ISO 14040). 2006.
54. Standardization, I.O.f., Environmental management - Life cycle assessment - Requirements and guidelines (ISO 14044). 2006.
55. Inventories, S.C.f.L.C., ecoinvent v3. Dübendorf, Switzerland, 2013.
56. Goedkoop, M.; Spriensma, R. *The Eco-indicator99: a damage oriented method for life cycle impact assessment: methodology report*; 2001; pp 1-144.

57. Bruijn, H.; Duin, R.; Huijbregts, M.; Guinee, J.; Gorree, M.; Heijungs, R., *Handbook on life cycle assessment : operational guide to the ISO standards*. Kluwer Academic: Dordrecht , NL, 2004.
58. Saling, P.; Kicherer, A.; Dittrich-Krämer, B.; Wittlinger, R.; Zombik, W.; Schmidt, I.; Schrott, W.; Schmidt, S., Eco-efficiency analysis by BASF: the method. *Int J LCA* **2002**, *7*, 203-218.
59. Biwer, A. Modellbildung, Simulation und ökologische Bewertung in der Entwicklung biotechnologischer Prozesse. Saarbrücken, 2003.
60. Puder, C.H.; Graef, H.; Thumerer, M.J.; Heitzmann, M. Improved method for the production of betulinic acid. 2007.
61. Puder, C.H.; Graef, H.; Thumerer, M.J.; Heitzmann, M. Poces for the extraction of betulinic acid. 2007.

Anhang

Tabelle A1: Übersicht der entwickelten Stämme

Stamm	Genotyp	Beschreibung
CEN.PK 102-5B (URA ⁻ ; HIS ⁻ ; LEU ⁻)	<i>MATa</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3Delta1</i> , <i>leu2-3/112</i> <i>MAL2-8c</i> <i>SUC2</i>	Referenzstamm
CFB1010	CEN.PK 102-5B + <i>tHMG are2Δ</i>	Basisstamm für die Metabolic Engineering Arbeiten der DTU
CK24, P _{CUP1}	CFB1010 + P _{CUP1} -3vGFP	Test von induzierbaren oder wachstumsabhängigen Promotoren zur Steuerung der TEV Protease Expression
CK25, P _{ADH2} ;	CFB1010 + P _{ADH2} -3vGFP	
CK26, P _{HXT7}	CFB1010 + P _{HXT7} -3vGFP	
CK28, P _{CUP1-SPO13}	CFB1010 + P _{CUP1-SPO13} -3vGFP	
CFB2105	CFB1010 mit <i>ERG7</i> +Degronkassette	Gerichtete Degradation des Erg7p Proteins
CK11	CFB2105 + p _{CUP1} regulierte TEV Protease	Transkriptionelle Kontrolle der <i>ERG7</i> Expression
CK41	CFB2105 + p _{ADH2} regulierte TEV Protease	
CK42	CFB2105 + p _{HXT7} regulierte TEV Protease	
CK43	CFB2105 + p _{CUP1-SPO13} regulierte TEV Protease	
CK51	CFB1010 + p _{ERG7} Austausch durch p _{HXT1}	
BA4	CFB1010 + <i>TDH3</i> kontrollierte Überexpression von <i>ERG1</i> + <i>AtLUP1</i> + <i>CYP716A11</i> (multiple Integration), einfache Integration von <i>ATR2</i> und <i>tHMG1</i>	Betulinsäureproduzent
Simo1578	entspricht CK11	<i>ERG7</i> -degron <i>tHMG1</i> ↑ <i>ATR2</i> <i>ARE2Δ</i> p _{CUP1} -TEV clone A5
Simo1575	entspricht CK11, Mutation im <i>ERG7</i> Gen führt zu Außerkräftsetzen des Stopcodons	<i>ERG7</i> -degron <i>tHMG1</i> ↑ <i>ATR2</i> <i>ARE2Δ</i> p _{CUP1} -TEV clone A1
CEN.PK111-61A	<i>MATa</i> ; <i>ura3-52</i> ; <i>leu2-3_112</i> ; <i>TRP1</i> ; <i>his3delta1</i> ; <i>MAL2-8C</i> ; <i>SUC2</i>	Laborstamm/Ausgangsstamm
CEN.PK2A	CEN.PK111-61A <i>are2::tHMG1</i> , <i>kanMX</i>	Squalen-überproduzierende Stämme
CEN.PK2U	CEN.PK111-61A <i>ura3::tHMG1</i> , <i>kanMX</i>	CEN.PK2U ist Basisstamm der Metabolic Engineering von Organobalance
CEN.PK2U pTT1-OEW pTT2-LjCPR1-A9	CEN.PK2U + <i>OEW</i> , <i>LjCPR1</i> , <i>CYP716A9</i> (episomale Expression über CEN/ARS Plasmide)	Betulinsäureproduzent
CEN.PK111-61A pTT1-OEW pTT2-LjCPR1-A9	CEN.PK111-61A <i>OEW</i> , <i>LjCPR1</i> , <i>CYP716A9</i> (episomale Expression über CEN/ARS Plasmide)	Vergleichsstamm zum Betulinsäureproduzenten
CEN.PK111-61A pTT1-OEW	CEN.PK111-61A <i>OEW</i> (episomale Expression über CEN/ARS Plasmid)	Vergleich der <i>OSC</i> Gene
CEN.PK111-61A pTT1-GuLUP1	CEN.PK111-61A <i>GuLUP1</i> (episomale Expression über CEN/ARS Plasmid)	
CEN.PK2U pTT1-OEW	CEN.PK2U <i>OEW</i> (episomale Expression über CEN/ARS Plasmid)	
CEN.PK2U pTT1-GuLUP1	CEN.PK2U <i>GuLUP1</i> (episomale Expression über CEN/ARS Plasmid)	
CEN.PK2U pTT1-OEW pTT2-LjCPR1-A12	CEN.PK2U <i>OEW</i> , <i>LjCPR1</i> , <i>CYP716A12</i> (episomale Expression über CEN/ARS Plasmide)	Vergleich der <i>CYP</i> -Gene

Tabelle A1: Übersicht der entwickelten Stämme (fortgesetzt)

Stamm	Genotyp	Beschreibung
CEN.PK2U <i>OEW</i> pTT2- <i>LjCPR1-AL1</i>	pTT1- CEN.PK2U <i>OEW, LjCPR1, CYP716A11</i> (episomale Expression über CEN/ARS Plasmide)	
CEN.PK2U <i>OEW</i> pTT2- <i>LjCPR1-A15</i>	pTT1- CEN.PK2U <i>OEW, LjCPR1, CYP716A15</i> (episomale Expression über CEN/ARS Plasmide)	
CEN.PK2U <i>OEW</i> pTT2- <i>LjCPR1-A17</i>	pTT1- CEN.PK2U <i>OEW, LjCPR1, CYP716A17</i> (episomale Expression über CEN/ARS Plasmide)	
CEN.PK2U <i>OEW</i> pTT2- <i>LjCPR1-A9</i>	pTT1- CEN.PK2U <i>OEW, LjCPR1, CYP716A9</i> (episomale Expression über CEN/ARS Plasmide)	
CEN.PK2U <i>OEW</i> pTT2- <i>LjCPR1-B1</i>	pTT1- CEN.PK2U <i>OEW, LjCPR1, CYP716AB1</i> (episomale Expression über CEN/ARS Plasmide)	
CEN.PK2U <i>OEW</i> pTT2- <i>LjCPR1-A41</i>	pTT1- CEN.PK2U <i>OEW, LjCPR1, CYP716A41</i> (episomale Expression über CEN/ARS Plasmide)	
CEN.PK2U <i>OEW</i> pTT2- <i>LjCPR1-B2</i>	pTT1- CEN.PK2U <i>OEW, LjCPR1, CYP716AB2</i> (episomale Expression über CEN/ARS Plasmide)	
CEN.PK2U <i>OEW</i> pTT2- <i>ATR-A15</i>	pTT1- CEN.PK2U <i>OEW, ATR, CYP716A15</i> (episomale Expression über CEN/ARS Plasmide)	Vergleich der <i>CPR</i> -Gene
CEN.PK2U <i>OEW</i> pTT2- <i>ATR-A17</i>	pTT1- CEN.PK2U <i>OEW, ATR, CYP716A17</i> (episomale Expression über CEN/ARS Plasmide)	
CEN.PK2U <i>OEW</i> pTT2- <i>ATR-A9</i>	pTT1- CEN.PK2U <i>OEW, ATR, CYP716A9</i> (episomale Expression über CEN/ARS Plasmide)	
CEN.PK2U <i>OEW</i> pTT2- <i>NCP1-A15</i>	pTT1- CEN.PK2U <i>OEW, NCP1, CYP716A15</i> (episomale Expression über CEN/ARS Plasmide)	
CEN.PK2U <i>OEW</i> pTT2- <i>NCP1-A17</i>	pTT1- CEN.PK2U <i>OEW, NCP1, CYP716A17</i> (episomale Expression über CEN/ARS Plasmide)	
CEN.PK2U <i>OEW</i> pTT2- <i>NCP1-A9</i>	pTT1- CEN.PK2U <i>OEW, NCP1, CYP716A9</i> (episomale Expression über CEN/ARS Plasmide)	
CEN.PK2U <i>OEW</i> pTT2- <i>CrCPR-A15</i>	pTT1- CEN.PK2U <i>OEW, CrCPR, CYP716A15</i> (episomale Expression über CEN/ARS Plasmide)	
CEN.PK2U <i>OEW</i> pTT2- <i>CrCPR-A17</i>	pTT1- CEN.PK2U <i>OEW, CrCPR, CYP716A17</i> (episomale Expression über CEN/ARS Plasmide)	
CEN.PK2U <i>OEW</i> pTT2- <i>MTR-A15</i>	pTT1- CEN.PK2U <i>OEW, MTR, CYP716A15</i> (episomale Expression über CEN/ARS Plasmide)	
CEN.PK2U <i>OEW</i> pTT2- <i>CrCPR-A9</i>	pTT1- CEN.PK2U <i>OEW, CrCPR, CYP716A9</i> (episomale Expression über CEN/ARS Plasmide)	

Tabelle A1: Übersicht der entwickelten Stämme (fortgesetzt)

Stamm	Genotyp	Beschreibung
CEN.PK2U <i>OEW</i>	pTT1- CEN.PK2U <i>OEW, MTR, CYP716A17</i> (episomale Expression über CEN/ARS Plasmide)	
pTT2- <i>MTR-A17</i>		
CEN.PK2U <i>OEW</i>	pTT1- CEN.PK2U <i>OEW, MTR, CYP716A9</i> (episomale Expression über CEN/ARS Plasmide)	
pTT2- <i>MTR-A9</i>		
CEN.PK111-61A <i>opi1Δ</i>	CEN.PK111-61A, YHL020C::kanMX	
CEN.PK111-61A <i>pah1Δ</i>	CEN.PK111-61A <i>YMR165C::hphMX</i>	
BA5	CEN.PK2U <i>OEW, LjCPR1, CYP716A15</i> (einfache genomische Integration)	Betulinsäureproduzent
BA5 Erg1 pTY	BA5 + Überexpression von <i>ERG1</i> , multiple Integration von <i>OEW, CYP716A15</i> über pTY-System	Betulinsäureproduzent
BA5.2	BA5 Erg1 + <i>OEW, CYP716A15</i> (Expression über multiple Plasmid move)	Betulinsäureproduzent
BA5 <i>pah1Δ</i>	BA5, <i>YMR165C::hphMX</i>	Betulinsäureproduzent
Simo1575 pTY	Simo1575 + multiple Integration von <i>OEW, CYP716A15</i> über pTY-System	Betulinsäureproduzent
CK12_10	CFB2105 + p _{CUP1} regulierte TEV Protease + multiple Integration von <i>AtLUP1, CYP716AL1</i> über TY System	Betulinsäureproduzent
CK18_2_7	CFB2105 + p _{HXT7} regulierte TEV Protease + multiple Integration von <i>AtLUP1, CYP716AL1</i> über TY System	Betulinsäureproduzent
CK18_3_5	CFB2105 + p _{HXT7} regulierte TEV Protease + multiple Integration von <i>AtLUP1, CYP716AL1</i> über TY System	Betulinsäureproduzent