Schriftenreihe des DECHEMA-Forschungsinstituts

Band 7

Isabell Schmidt

**Untersuchungen zur biotechnologischen *in vivo* und
in vitro Produktion von Carotinoiden**

D30 (Diss. Universität Frankfurt am Main)

Shaker Verlag
Aachen 2014

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Frankfurt am Main, Univ., Diss., 2014

Copyright Shaker Verlag 2014

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-2854-6

ISSN 2197-6155

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden ausgewählte mikrobielle Expressionssysteme genutzt, um eine biotechnologische *in vivo* und *in vitro* Xanthophyllsynthese zu etablieren. Hierbei wurde zum einen die Astaxanthin Synthase im Zusammenhang mit ihrer kompatiblen Reduktase und zum anderen verschiedene β -Carotin-Hydroxylasen und -Ketolasen auf ihre Eignung und Nutzbarkeit untersucht.

Durch heterologe Expression der Gene, die für die Astaxanthin Synthase sowie ihre Reduktase kodieren, wurde, trotz einer großen Zahl genetischer Modifikationen und vielfältiger Versuche zur Optimierung des verwendeten Expressionssystems sowie der zugehörigen Bedingungen, weder eine *in vitro* noch *in vivo* Xanthophyllsynthese in den Prokaryoten *E. coli* und *R. sphaeroides* erreicht. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen führten zu der Schlussfolgerung, dass die Expression der Astaxanthin Synthase und ihrer Reduktase spezifische Voraussetzungen im Rahmen der posttranslationalen Prozessierung sowie der Insertion in die Zellmembran bedarf, die in den untersuchten Prokaryoten nicht gegeben sind. So wurde hingegen eine (His)₆-Tag gekoppelte Astaxanthin Synthase erfolgreich in der *P. rhodozyma*-Mutante PR-1-104 homolog exprimiert und damit eine Komplementierung der *in vivo* Astaxanthinsynthese erzielt. Hierbei konnte in Abhängigkeit der Lokalisation des Tags eine um 14 % höhere intrazelluläre Astaxanthinkonzentration erreicht werden als mit dem Wildtyp CBS 6938. Allerdings war aufgrund des hohen Grades der Proteindenaturierung in Folge der Membranproteinextraktion aus der rigiden *Phaffia*-Zellwand eine *in vitro* Astaxanthinsynthese nicht etablierbar und so eine Enzymcharakterisierung nicht möglich. Die heterologe Expression des Astaxanthin Synthase- sowie Reduktase-Gens war in einer carotinogenen Bäckerhefe ebenso erfolgreich. Hier konnte eine *in vivo* Astaxanthinsynthese etabliert werden, die mit $5,4 \mu\text{g g}^{-1}$ TM die publizierten Daten um 80 % übersteigt. Allerdings zeigte sich bei Expression verschiedener Varianten des Astaxanthin Synthase- sowie Reduktase-Gens in unterschiedlichen carotinogenen Stämmen, dass die Wahl des Expressionsvektors von immenser Bedeutung für deren funktionelle Expression in *S. cerevisiae* ist.

Für die *in vivo* Xanthophyllsynthese mittels heterologer Expression von verschiedenen β -Carotin-Hydroxylasen und -Ketolasen in carotinogenen Bäckerhefen wurde zunächst die Konstruktion von *S. cerevisiae*-Stämmen mit gesteigerter β -Carotinbereitstellung durch Überexpression der trunkierten HMGC_oA-

Reduktase bzw. des ABC-Transporters PDR10 angestrebt. Hierbei wurde ausschließlich durch Einbringen des modifizierten *HMG1*-Gens die β -Carotinsynthese im Vergleich zum Ausgangsstamm leicht gesteigert. Nach heterologer Expression von *crtZ* aus *P. ananatis* wurden mit maximalen *in vivo* Zeaxanthinmengen von $309 \mu\text{g g}^{-1}$ TM die bisher höchsten Werte für eine heterologe Synthese mit *S. cerevisiae* erreicht. Höchste *in vivo* Astaxanthinkonzentrationen von $10 \mu\text{g g}^{-1}$ TM wurden bei Co-Expression von *bkt* aus *H. pluvialis* mit *crtZ* aus *Paracoccus* sp. PC-1 sowie mit *crtZ* aus *Brevundimonas* sp. SD212 erzielt. *In vitro* wurde eine maximale Astaxanthinakkumulation von $0,009 \mu\text{g mL}^{-1}$ mittels BKT aus *H. pluvialis* in Kombination mit CRTZ aus *Brevundimonas* sp. SD212 erreicht. Des Weiteren gaben die durchgeführten *in vitro* Studien Aufschluss über die Substratpräferenz und Aktivität der β -Carotin-Hydroxylasen sowie -Ketolasen, so dass sich hier katalytische Engpässe als Ziele für eine zukünftige genetische Optimierung der sukzessiven Oxygenierung von β -Carotin zu Astaxanthin ableiten ließen.