

## Terpenoidsynthese in dem phototrophen Bakterium *Rhodobacter capsulatus*

Fabienne Knapp, Oliver Klaus, Vera Svensson, Achim Heck, Anita Loeschcke & Thomas Drepper

Article - Version of Record



### Suggested Citation:

Knapp, F., Klaus, O., Svensson, V., Heck, A., Loeschcke, A., & Drepper, T. (2023). Terpenoidsynthese in dem phototrophen Bakterium *Rhodobacter capsulatus*. *Biospektrum*, 29(1), 88–90.  
<https://doi.org/10.1007/s12268-023-1874-2>

Wissen, wo das Wissen ist.



UNIVERSITÄTS- UND  
LANDESBIBLIOTHEK  
DÜSSELDORF

This version is available at:

URN: <https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:hbz:061-20250213-131023-6>

Terms of Use:

This work is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International License.

For more information see: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>

## Photobiotechnologie

# Terpenoidsynthese in dem phototrophen Bakterium *Rhodobacter capsulatus*

FABIENNE KNAPP, OLIVER KLAUS, VERA SVENSSON, ACHIM HECK,  
ANITA LOESCHCKE, THOMAS DREPPER  
INSTITUT FÜR MOLEKULARE ENZYMTECHNOLOGIE, UNIVERSITÄT DÜSSELDORF;  
FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH

**Terpenoids offer various properties relevant for biotech and pharma industries. Production in microbes is a sustainable way to provide these compounds for industrial use. The phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* has some unique characteristics making it a promising alternative host for terpenoid production. Recombinant biosynthetic pathways can be individually adapted through modular engineering to meet the specific requirements of each microbial terpenoid production process.**

Die Autoren widmen diesen Artikel Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger für seine weitreichenden wissenschaftlichen Beiträge auf dem Gebiet der molekularen Enzymtechnologie.

DOI: 10.1007/s12268-023-1874-2  
© Die Autorinnen und Autoren 2023

Die Klasse der Terpene, die häufig auch als Isoprenoide bezeichnet werden, bildet mit über 80.000 identifizierten Verbindungen eine der größten Sekundärmetabolit-Gruppen [1]. Sie werden natürlicherweise von zahlreichen Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren synthetisiert und sind zum Beispiel in ätherischen Ölen vieler Nutzpflanzen und Heilpflanzen zu finden. In der Natur vorkommende Terpene bestehen in der Regel aus einer variablen Anzahl von C<sub>5</sub>-Isopreneinheiten. Diese Grundbausteine werden in Pro- und Eukaryoten über zwei unterschiedliche Biosynthesewege, den 2-C-Methylerythritol-4-phosphat (MEP)- sowie den Mevalonat (MVA)-Weg [2,3], erzeugt und anschließend durch enzymatisch katalysierte Kondensationsreaktionen miteinander verknüpft. Die so entstandenen Zwischenprodukte GPP (Geranylpyrophosphat), FPP (Farnesylpyrophosphat) bzw. GGPP (Geranylgeranylpyrophosphat) werden typischerweise anschließend in enzymatischen Schlüsselreaktionen beispielsweise zyklisiert oder chemisch „dekoriert“. Anhand der Anzahl der C<sub>5</sub>-Einheiten wird u. a. zwischen Mono(C<sub>10</sub>-), Sesqui(C<sub>15</sub>-), Di(C<sub>20</sub>-), Tri(C<sub>30</sub>-) und Tetra(C<sub>40</sub>-) Terpenoi-

den mit jeweils zwei, drei, vier, sechs beziehungsweise acht C<sub>5</sub>-Einheiten unterschieden [4]. Aufgrund ihrer strukturellen Diversität weisen Terpene eine Vielzahl von biotechnologisch und medizinisch relevanten Funktionen auf und werden daher in der Lebensmittel-, Futtermittel-, Kosmetik- und Pharmaindustrie beispielsweise als Duft-, Geschmacks-, Farb- oder Wirkstoffe eingesetzt. Bekannte Vertreter dieser Wert- und Wirkstoffklassen sind z. B. die Sesquiterpen Valencen, ein Aromastoff der Orange, und Artemisinin aus *Artemisia annua* (einjähriger Beifuß), welches erfolgreich als Wirkstoff gegen Malaria eingesetzt wird. Da die Extraktion von Terpenoiden aus Pflanzenmaterialien ein sehr zeit- und kostenaufwendiger Prozess sein kann, gibt es seit einiger Zeit zahlreiche Bestrebungen, diese Naturstoffe biotechnologisch in entsprechend modifizierten und optimierten Mikroorganismen zu produzieren. Neben dem Bakterium *Escherichia coli* und der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, die bereits heute in unzähligen industriellen Produktionsprozessen erfolgreich eingesetzt werden, rücken auch phototrophe Mikroorganismen als alternative Terpenoid-

Produktionswirte immer mehr in den Fokus der Wissenschaft [5].

### ***Rhodobacter* sind vielversprechende alternative Terpenoidproduzenten**

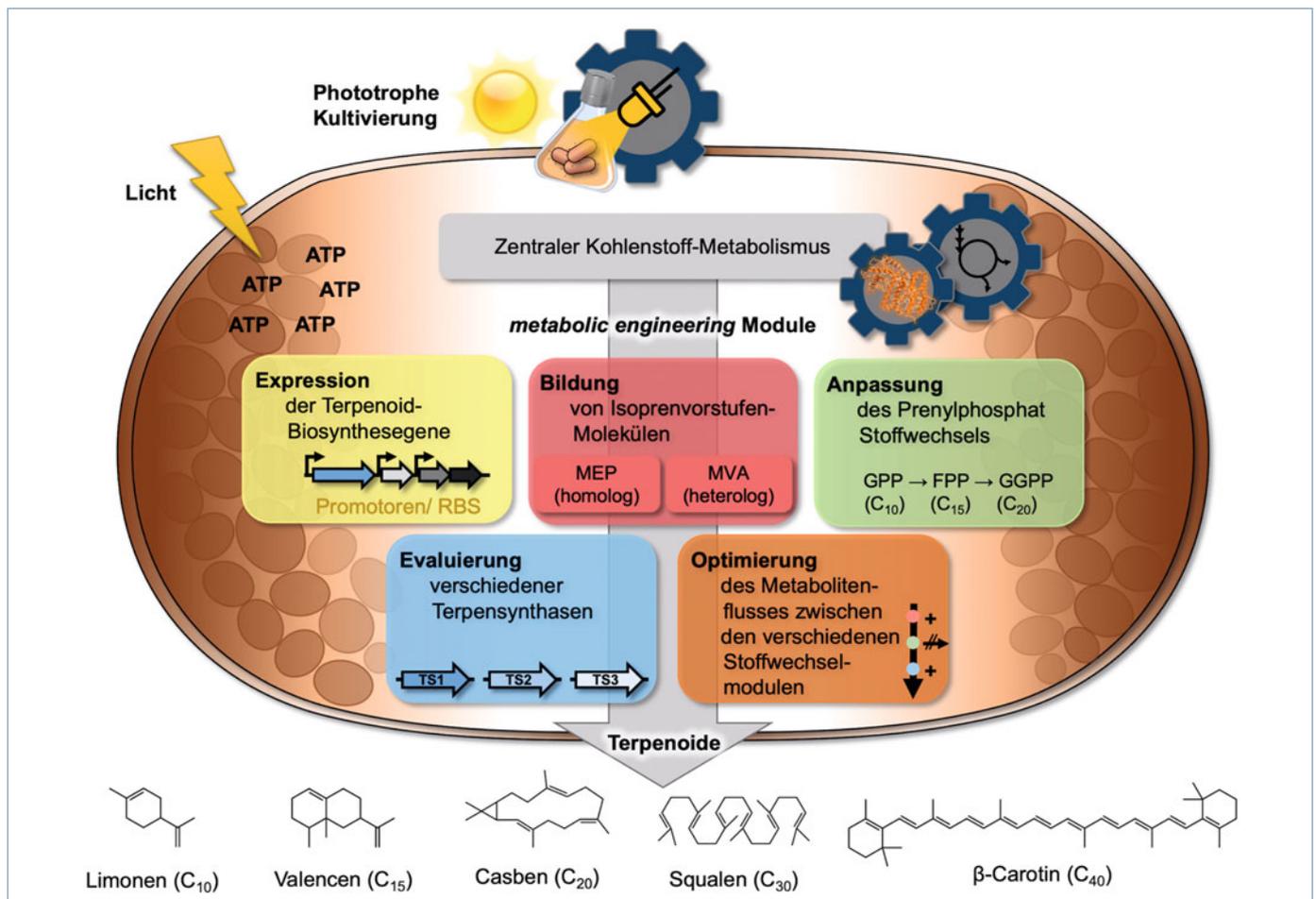
Phototrophe Bakterien, wie die Nichtschwefelpurpurbakterien *Rhodobacter capsulatus* und *Rhodobacter sphaeroides*, können mittels anoxygener Photosynthese Licht als Energiequelle für die Fixierung von Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) und Luftstickstoff (N<sub>2</sub>) sowie für biotechnologische Produktionsprozesse nutzen [6]. Aufgrund des phototrophen Stoffwechsels weisen *Rhodobacter*-Zellen neben dem intrinsischen Carotinoid-Biosyntheseweg – diese Photopigmente gehören zu der Klasse der Tetraterpene – und werden in großen Mengen in der Zelle synthetisiert – besondere morphologische Eigenschaften auf, die für die Synthese wirtsfremder Terpene von Vorteil sein können. Hierzu zählt die Ausbildung von intracytoplasmatischer Membranvesikel, die sowohl membranständige Enzyme als auch die hydrophoben Intermediate und Produkte der Terpen-Biosynthesewege aufnehmen und speichern können. Um *Rhodobacter*-Zellen für die Produktion von Terpenoiden umzuprogrammieren und zu optimieren, können verschiedene zelluläre Prozesse adressiert und in einem modularen Engineering-Konzept miteinander kombiniert werden (**Abb. 1**). Neben der Verbesserung der heterologen Genexpression werden so Maßnahmen ergriffen, die zu einem gerichteten Fluss der Stoffwechselintermediate innerhalb des rekombinanten Biosynthesewegs vom zentralen Kohlenstoffmetabolismus hin zur Zielverbindung führen.

### **Heterologe Synthese verschiedener Terpene in *Rhodobacter capsulatus***

In allen bislang evaluierten Terpenoid-Biosynthesewegen führte die alleinige Expression des jeweiligen heterologen Terpensynthasegens in *R. capsulatus* zu einer sehr geringen Produktausbeute. Erst durch die Kombination einiger der in **Abbildung 1** genannten Engineering-Module konnten in den letzten Jahren verschiedene wirtsfremde

**Tab. 1:** Erfolgreich produzierte Terpene in *Rhodobacter capsulatus*, die angewandten Engineering-Strategien sowie die anwendungsrelevanten Eigenschaften der Produkte. Farben der Module siehe Abb. 1.

Terpen	Heterologe Synthese	engineering Module	Eigenschaften	Referenz
Valencen	CnVS ( <i>Callitropsis nootkatensis</i> )	rotes, grünes & blaues Modul	Geschmacks- und Duftstoff	[8]
Patchoulol	PcPS ( <i>Pogostemon cablin</i> )	rotes & grünes Modul	Duftstoff	[8]
$\beta$ -Caryophyllen	QHS1 ( <i>Artemisia annua</i> )	rotes & grünes Modul	entzündungshemmende Wirkung; antiphytopathogen	[11]
Casben	RcCS ( <i>Ricinius communis</i> )	grünes Modul	antimykotisch	[10]
Squalen	McSQS ( <i>Methylococcus capsulatus</i> )	gelbes, grünes & blaues Modul	Antioxidationsmittel und Impfstoffzusatz	[7, 10]
Cycloartenol	CAS1 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	rotes, blaues & oranges Modul	Phyosterol-Vorstufe	[7, 9]
$\beta$ -Carotin	CrtYI ( <i>Pantoea ananatis</i> )	grünes Modul	Lebensmittelfarbstoff, Vitamin A-Vorstufe	[10]



**▲ Abb. 1:** Modulares Konzept zur Implementierung und Verbesserung der Terpenoidproduktion in *Rhodobacter*. Die jeweiligen Module sind farblich markiert und umfassen die folgenden Strategien: Gelbes Modul: Optimierung der Expression von Terpenoid-Biosynthesegenen. RBS: Ribosomenbindestelle. Rotes Modul: Metabolic Engineering der Isoprenbiosynthese. Dieser Optimierungsschritt kann die heterologe Expression der MVA-Biosynthesegene einschließen. MEP: 2-C-Methylerythritol 4-phosphat; MVA: Mevalonat. Grünes Modul: Optimierung der Prenylphosphat-Synthese. Die Prenylphosphat-Verbindungen GPP, FPP sowie GGPP sind die direkten Terpenoidvorstufen, die durch geeignete Terpensynthasen (blaues Modul) zu den gewünschten Zielverbindungen umgesetzt werden. Oranges Modul: Optimierung des Zusammenspiels der einzelnen Engineering-Module. Im unteren Teil der Abbildung sind einige der Terpene dargestellt, die mithilfe des modularen Engineering-Konzepts erfolgreich in *R. capsulatus* erzeugt werden konnten. CC BY 4.0, aus [5].

Sesqui-, Di-, Tri und Tetraterpene in *R. capsulatus* erfolgreich synthetisiert werden (Tab. 1, [7–11]). Dabei wurde gezeigt, dass die effektive Synthese fast jeder Zielverbindung eine individuelle Anpassung des rekombinanten Stoffwechselwegs erforderlich macht.

Neben dem modularen Engineering kann auch die Änderung der Belichtungsbedingungen zu einer deutlichen Verbesserung der Produktausbeute führen. Am Beispiel der Synthese des Sesquiterpens  $\beta$ -Caryophyllen in *R. capsulatus* konnten wir zeigen, dass insbesondere ein hoher Infrarotlichtanteil (~850 nm) im Spektrum der verwendeten Lichtquelle zu hohen Produkttitern beitragen kann [11]. Dabei gewährleistet die Anpassung der Belichtungsbedingungen vermutlich eine verbesserte Anregung des Photopigments Bakteriochlorophyll *a*, welches im Gegensatz zu den Chlorophyllen aus Pflanzen und Cyanobakterien hauptsächlich Licht dieses Wellenlängenbereichs absorbiert.

Die in der letzten Dekade entwickelten Strategien zur Erzeugung und Optimierung komplexer rekombinanter Stoffwechselwege ermöglichten es, biotechnologisch relevante Terpene in mikrobiellen Produktionswirtsorganismen herzustellen. Diese Strategien wurden nun auf phototrophe Bakterien zur Evaluierung ihres biotechnologischen Potenzials erfolgreich übertragen und angewendet. Hierbei scheint insbesondere die Kombination der phototrophen Lebensweise mit der Synthese von wirtsfremden Terpenoiden eine vielversprechende Strategie zu sein, die

in naher Zukunft eine nachhaltige Gewinnung dieser Wert- und Wirkstoffe ermöglichen kann.

### Danksagung

Die präsentierten Arbeiten wurden vom Europäischen Fonds für regionale Entwicklung (EFRE, 34.EFRE-0300096) innerhalb des CLIB-Kompetenzzentrums Biotechnologie (CKB) sowie vom Bioeconomy Science Center (BioSC) gefördert. Die wissenschaftlichen BioSC-Aktivitäten wurden vom Ministerium für Kultur und Wissenschaft des Landes Nordrhein-Westfalen (MKW) im Rahmen des NRW Strategiprojekts BioSC (no. 313/323-400-00213) finanziell unterstützt. ■

### Literatur

- [1] Pichersky E, Raguso RA (2018) Why do plants produce so many terpenoid compounds? *New Phytol* 220: 692–702
- [2] Frank A, Groll M (2017) The methylerythritol phosphate pathway to isoprenoids. *Chem Rev* 117: 5675–5703
- [3] Lombard J, Moreira D (2011) Origins and early evolution of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis in the three domains of life. *Mol Biol Evol* 28: 87–99
- [4] Ruzicka L (1953) The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia* 9: 357–367
- [5] Klaus O, Hilgers F, Nakielski A et al. (2022) Engineering phototrophic bacteria for the production of terpenoids. *Curr Opin Biotechnol* 77: 102764
- [6] Stephens S, Mahadevan R, Allen DG (2021) Engineering photosynthetic bioprocesses for sustainable chemical production: a review. *Front Bioeng Biotechnol* 8: 1–15
- [7] Loeschcke A, Dienst D, Wewer V et al. (2017) The photosynthetic bacteria *Rhodobacter capsulatus* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 as new hosts for cyclic plant triterpene biosynthesis. *PLoS One* 12: e0189816
- [8] Troost K, Loeschcke A, Hilgers F et al. (2019) Engineered *Rhodobacter capsulatus* as a phototrophic platform organism for the synthesis of plant sesquiterpenoids. *Front Microbiol* 10: 1998
- [9] Hage-Hülsmann J, Metzger S et al. (2019) Biosynthesis of cycloartenol by expression of plant and bacterial oxidosqualene cyclases in engineered *Rhodobacter capsulatus*. *J Biotechnol* 306S: 100014

[10] Hage-Hülsmann J, Klaus O, Linke K et al. (2021) Production of C20, C30 and C40 terpenes in the engineered phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *J Biotechnol* 338: 20–30

[11] Hilgers F, Habash SS, Loeschcke A et al. (2021) Heterologous production of  $\beta$ -caryophyllene and evaluation of its activity against plant pathogenic fungi. *Microorganisms* 9: 168

**Funding note:** Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.  
**Open Access:** Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.



Achim Heck, Thomas Drepper, Fabienne Knapp, Oliver Klaus, Vera Svensson und Anita Loeschcke (v.l.n.r.).

### Korrespondenzadresse:

Dr. Thomas Drepper  
 Forschungszentrum Jülich GmbH  
 Institut für Molekulare Enzymtechnologie (IMET)  
 der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
 (HHUD)  
 Wilhelm-Johnen-Straße  
 D-52428 Jülich  
 t.drepper@fz-juelich.de