

**Biotransformationen**  
**mit**  
**Cytochrom P450 Monooxygenasen**

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Daniela Zehentgruber

aus Wien

Oktober 2009



Aus dem Institut für Biotechnologie 2 des Forschungszentrums Jülich GmbH

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jörg Pietruszka  
Koreferent: Apl. Prof. Dr. rer. nat. Martina Pohl

Tag der mündlichen Prüfung: 30. November 2009



## Biotransformations with Cytochrome P450 Monooxygenases

Cytochrome P450 monooxygenases (CYP, P450) are heme containing, ubiquitous enzymes that enable the hydroxylation of C-H bonds, often in a regio- and stereoselective manner. Due to this ability they are of tremendous interest for the synthesis of fine chemicals and pharmaceuticals. However, low activity, limited stability, oxygen- and NAD(P)H-dependency restrict these enzymes mainly to lab scale applications. Furthermore most P450s require additional components such as a cytochrome P450 reductase and an iron sulphur protein to enable the electron transfer from the NADPH to the P450. Within this PhD project three different P450s were studied to identify the bottlenecks of these valuable enzymatic reactions. Afterwards a concept should be provided to overcome the limitations of each biotransformation and to make these reactions more feasible for potential industrial applications.

As an example for a self sufficient P450, that contains all components necessary for hydroxylation (reductase + heme domain) on a single polypeptide chain, the well-known CYP102A1 from *Bacillus megaterium* was chosen and the conversion of  $\beta$ -ionone to 4-hydroxy- $\beta$ -ionone was studied. Therefore an *Escherichia coli* strain was constructed, that expresses a variant of this P450 together with formate dehydrogenase from *Mycobacterium vaccae* 10 or alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* to implement an enzyme coupled cofactor regeneration. Besides a strong product inhibition only a limited chemoselectivity was observed. The desired product 4-hydroxy- $\beta$ -ionone is overoxidized by the CYP102A1 to the corresponding ketone. As the (*R*)-enantiomer was not only formed in favour, but also turned out to be the preferred substrate for the overoxidation, a drop in the enantiomeric excess over the reaction time was observed. By adding dimethyl sulfoxide to the reaction medium and optimizing the reaction conditions, the enantiomeric excess could be increased up to 72 % in favour for (*R*)-4-hydroxy- $\beta$ -ionone. Thereby a volumetric productivity of  $1.25 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  and a TTN of 5 000 for the P450 was achieved.

The recombinant fission yeast strain *Schizosaccharomyces pombe* CAD 18 expresses the human CYP21, a steroid-21-hydroxylase. This enzyme obtains the reduction equivalents necessary for hydroxylation from the reductase of the host organism. To identify the bottlenecks of this P450 catalyzed reaction the conversion of 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone to 11-deoxycortisol was studied. Thereby substrate solubility and the substrate transport over the membrane turned out to be crucial. By adding 5 vol% methanol to the reaction media and by using permeabilized cells as biocatalyst, productivity could be doubled compared to previously reported results.

CYP106A2 from *B. megaterium* is one of a few known bacterial steroid hydroxylases. This enzyme has already been successfully expressed in *E. coli* together with the electron transfer partners bovine adrenodoxin and adrenodoxin reductase. Additionally an enzyme coupled cofactor regeneration system was implemented by expression alcohol dehydrogenase from *L. brevis* and progesterone and testosterone conversion was studied. Again, substrate transport over the membrane limited the whole cell biotransformation. As no membrane associated enzymes were involved in the reaction, the transport limitation could be overcome by using crude cell extract as biocatalyst. Due to a high NADP<sup>+</sup> concentration in the crude cell extract, addition of the expensive redox cofactor could be avoided. In batch reactors under optimized conditions the productivity of progesterone and testosterone conversion could be increased up to 18-fold, yielding an absolute productivity for 15 $\beta$ -OH-progesterone and 15 $\beta$ -OH-testosterone formation of  $3.7 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  and  $5.5 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  respectively. Product extraction with adsorber resins allowed not only the recovery of quantitative amounts of 15 $\beta$ -OH-progesterone and 15 $\beta$ -OH-testosterone but also the reuse of the biocatalyst.



## Biotransformationen mit Cytochrom P450 Monooxygenasen

Da Cytochrom P450 Monooxygenasen (P450, CYP) die Hydroxylierung von C-H Verbindungen ermöglichen, die häufig regio- und stereoselektiv verlaufen, sind diese Enzyme von großem Potential für die industrielle Biotechnologie. Aufgrund der geringen Aktivität und Stabilität dieser Enzyme, sowie deren Sauerstoff- und Redoxcofaktor-abhängigkeit beschränkt sich der Einsatz dieser Enzyme jedoch hauptsächlich auf Anwendungen im Labormaßstab. Zusätzlich benötigen die meisten P450 weitere Protein-komponenten die den Elektronentransport vom NAD(P)H zur P450 sicherstellen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte anhand drei verschiedener P450s ein grundlegendes Verständnis für die biotechnologische Anwendung von P450 erlangt werden. Anhand von Parameterstudien sollten die limitierenden Faktoren der einzelnen Biotransformation identifiziert werden und durch geeignete reaktionstechnische Maßnahmen überwunden werden.

Bei der CYP102A1 aus *Bacillus megaterium* handelt es sich um eine der wenigen P450, die keine weiteren Komponenten zum Elektronentransfer benötigt. Eine Variante dieses Enzyms wurde gemeinsam mit der Formiatdehydrogenase aus *Mycobacterium vaccae* 10 oder einer Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* in *Escherichia coli* exprimiert und die Hydroxylierung von  $\beta$ -Jonon zu 4-Hydroxy- $\beta$ -jonon untersucht. Neben einer starken Produktinhibierung wurde eine begrenzte Chemo-selektivität des Enzyms beobachtet, da das gewünschte Produkt 4-Hydroxy- $\beta$ -jonon von der CYP102A1 zum entsprechenden Keton weiteroxidiert wird. Dabei akzeptiert die CYP102A1 bevorzugt das (*R*)-Enantiomer als Substrat, sodass der Enantiomerenüberschuss während der Reaktion sinkt. Durch die Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen konnte unter Zugabe von Dimethylsulfoxid ein Enantiomerenüberschuss von 72 % für das (*R*)-Enantiomer erreicht werden. Darüber hinaus konnte eine Produktivität von  $1,25 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  und eine TTN von 5000 für die P450 erzielt werden.

Der rekombinante Spalthefestamm *Schizosaccharomyces pombe* CAD 18 exprimiert die humane Steroidhydroxylase CYP21, wobei der Elektronentransport von der Spalthefe-eigenen FAD/FMN abhängigen Cytochrom P450 Reduktase übernommen wird. Anhand der Hydroxylierung von  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron zu 11-Desoxycortisol wurde die CYP21 eingehend auf potentielle Limitierungen untersucht. Dabei wurde sowohl die Substratlöslichkeit als auch der Substrattransport in die Zelle als reaktionslimitierend identifiziert. Durch den Einsatz von permeabilisierten Zellen in Gegenwart von 5 vol% Methanol konnte die Produktivität im Vergleich zu Literaturwerten verdoppelt werden.

Bei der CYP106A2 aus *B. megaterium* handelt es sich um eine der wenigen bekannten bakteriellen Steroidhydroxylasen. Dieses Enzym konnte bereits gemeinsam mit den Elektronentransferkomponenten Adrenodoxin und Adrenodoxinreduktase erfolgreich in *E. coli* exprimiert werden. Zusätzlich wurde eine enzymgekoppelte Cofaktorregenerierung durch Expression der Alkoholdehydrogenase aus *L. brevis* realisiert und die  $15\beta$ -Hydroxylierung von Progesteron und Testosteron untersucht. Genau wie bei der CYP21 katalysierten Steroidhydroxylierung limitiert der Substrattransport über die Membran die Ganzzellbiotransformation, die durch die Verwendung von Zellrohextrakt als Biokatalysator überwunden werden konnte. Der Redoxcofaktor der im Rohextrakt vorhanden ist, reicht für eine effiziente Hydroxylierung aus, sodass auf eine Zugabe des kostenintensiven Redoxcofaktor verzichtet werden konnte. Unter optimierten Bedingungen wurde eine Produktivität von  $3,7 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  bzw.  $5,5 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  für die Synthese von  $15\beta$ -OH-Progesteron bzw.  $15\beta$ -OH-Testosteron erreicht, was einer 18fachen Steigerung im Vergleich zu den Literaturwerten entspricht. Außerdem wurde eine Methode zur Produktaufarbeitung entwickelt, die neben der quantitativen Produktabtrennung auch eine Wiederverwendung des Biokatalysators erlaubt.



# Inhaltsverzeichnis

<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>V</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>IX</b>
<b>SYMBOLVERZEICHNIS</b> .....	<b>XI</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 Selektiver Einbau von Sauerstoff in C-H Verbindungen.....	1
1.1.1 Chemische Methoden .....	1
1.1.2 Enzymatische Methoden.....	4
1.1.3 Vergleich beider Methoden .....	6
1.2 Cytochrom P450 Monooxygenasen .....	9
1.2.1 Katalysemechanismus .....	12
1.2.2 Redoxpartner und Elektronentransport.....	14
1.3 Biotechnologische Anwendung von Cytochrom P450 Monooxygenasen.....	15
1.3.1 Prozesse mit Cytochrom P450 Monooxygenasen .....	15
1.3.2 Herausforderungen biotechnologischer Anwendungen .....	18
<b>2 AUFGABENSTELLUNG</b> .....	<b>23</b>
<b>3 CYP102A1 AUS <i>BACILLUS MEGATERIUM</i></b> .....	<b>26</b>
3.1 Charakterisierung des Biokatalysators.....	27
3.1.1 Kultivierung des Biokatalysators .....	28
3.1.2 Charakterisierung der Ganzzellbiotransformation.....	31
3.2 Parameterstudien.....	35
3.2.1 Sauerstoffversorgung.....	35
3.2.2 Redoxcofaktorversorgung .....	37
3.2.3 Bestimmung der Enantioselektivität.....	39
3.2.4 Einfluss von Substrat und Produkt auf die Hydroxylierungsreaktion.....	42
3.3 Satzreaktor (Batch) unter optimierten Bedingungen .....	49
3.4 Zusammenfassung.....	51
<b>4 HUMANE CYP21</b> .....	<b>53</b>
4.1 Charakterisierung.....	54
4.1.1 Kultivierung des Biokatalysators .....	54
4.1.2 Charakterisierung der Ganzzellbiotransformation.....	55

4.2	Parameterstudien .....	58
4.2.1	Sauerstoffversorgung .....	58
4.2.2	Cofaktorversorgung .....	58
4.2.3	Substratlöslichkeit.....	62
4.2.4	Substrattransport in die Zelle.....	67
4.3	Satzreaktor (Batch) unter optimierten Bedingungen.....	68
4.4	Zusammenfassung.....	69
<b>5</b>	<b>CYP106A2 AUS <i>BACILLUS MEGATERIUM</i>.....</b>	<b>70</b>
5.1	Charakterisierung des Ganzzellbiokatalysators .....	72
5.1.1	Kultivierung des Biokatalysators.....	72
5.1.2	Charakterisierung der Ganzzellbiotransformation .....	75
5.2	Parameterstudien für die Ganzzellbiotransformation.....	79
5.2.1	Substratlöslichkeit.....	79
5.2.2	Substrattransport in die Zelle.....	83
5.3	Charakterisierung des Zellrohextrakts.....	85
5.4	Parameterstudien bei Verwendung von Zellrohextrakt.....	88
5.4.1	Sauerstoffversorgung .....	88
5.4.2	Cofaktorversorgung .....	88
5.4.3	Substratlöslichkeit.....	91
5.5	Biotransformation unter optimierten Bedingungen .....	92
5.5.1	Biotransformation im Satzreaktor (Batch).....	92
5.5.2	Biotransformation im repetitiven Satzreaktor.....	94
5.5.3	Identifizierung der Nebenprodukte.....	98
5.6	Zusammenfassung.....	100
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSENDER DISKUSSION UND AUSBLICK .....</b>	<b>102</b>
6.1	CYP102A1 aus <i>Bacillus megaterium</i> .....	102
6.1.1	Geänderte Cofaktorspezifität und Etablierung einer enzymgekoppelten Cofaktorregenerierung.....	102
6.1.2	Strategien zur Überwindung der Produktinhibierung .....	103
6.1.3	Potentielle Anwendungen P450 katalysierter Oxidationen von Alkoholen ..	104
6.2	Humane CYP21 .....	105
6.2.1	Quantifizierung des intrazellulären Redoxcofaktorpools.....	105
6.2.2	Lösungsmitteltoleranz der <i>S. pombe</i> CAD18.....	107
6.3	CYP106A2 aus <i>Bacillus megaterium</i> .....	108
6.3.1	Reaktorkonzept.....	108

6.3.2	Identifizierung des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts der Reaktion..	109
6.3.3	Regioselektivität der CYP106A2 katalysierten Hydroxylierung.....	111
6.4	Übergeordnete Betrachtung der untersuchten P450 Systeme.....	111
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>114</b>
<b>8</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>118</b>
8.1	Chemikalien und Geräte .....	118
8.1.1	Verwendete Chemikalien .....	118
8.1.2	Verwendete Geräte .....	120
8.2	CYP102A1 aus <i>B. megaterium</i> .....	120
8.2.1	Plasmide und Stammherstellung .....	120
8.2.2	Kultivierung von <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	121
8.2.3	Chemische Synthese von 4-Hydroxy- $\beta$ -jonon.....	121
8.2.4	Aktivitätsbestimmung des <i>E. coli</i> Stammes mit CYP102A1 Variante .....	122
8.2.5	Stabilitätsuntersuchungen des <i>E. coli</i> Stammes mit CYP102A1 Variante ...	123
8.2.6	Präparative Herstellung und Identifizierung des Nebenprodukts 4-Oxo- $\beta$ -jonon .....	123
8.2.7	CYP102A1 katalysierte Oxidation von 4-Hydroxy- $\beta$ -jonon.....	123
8.2.8	<i>In situ</i> Produktabtrennung .....	124
8.2.9	Satzreaktor unter optimierten Bedingungen.....	125
8.2.10	Instrumentelle Analytik.....	125
8.3	Humane CYP21 .....	126
8.3.1	Kultivierung der <i>S. pombe</i> CAD18 .....	126
8.3.2	Aktivitätsbestimmung der <i>S. pombe</i> CAD18.....	127
8.3.3	Stabilitätsuntersuchungen der <i>S. pombe</i> CAD18.....	127
8.3.4	Löslichkeitsuntersuchungen der Steroide .....	127
8.3.5	Bestimmung der intrazellulären Cofaktorkonzentration der <i>S. pombe</i> CAD18.....	128
8.3.6	Permeabilisierung der <i>S. pombe</i> CAD18 .....	128
8.3.7	Satzreaktor unter optimierten Bedingungen.....	129
8.3.8	Instrumentelle Analytik.....	129
8.4	CYP106A2 aus <i>B. megaterium</i> .....	130
8.4.1	Plasmide und Stammherstellung .....	130
8.4.2	Kultivierung des rekombinanten <i>E. coli</i> Stammes mit CYP106A2 .....	130
8.4.3	Herstellung des Zellrohextrakts.....	130
8.4.4	Aktivitätsbestimmung .....	131

8.4.5	Stabilitätsuntersuchungen .....	131
8.4.6	Löslichkeitsuntersuchungen der Steroide.....	132
8.4.7	Bestimmung der Cofaktorkonzentration des Zellrohextrakts .....	132
8.4.8	Bestimmung des reaktionslimitierenden Schritts der Biotransformation.....	133
8.4.9	Biotransformation unter optimierten Bedingungen .....	133
8.4.10	Instrumentelle Analytik.....	134
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>136</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>148</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Mechanismen der C-H Aktivierung .....	2
Abbildung 1.2: Oxidation von Cyclohexan mit Hilfe eines Eisen(II)bistriflatkomplexes .....	3
Abbildung 1.3: Struktur des Mangansalenkomplexes (links) und des Häms (rechts).....	3
Abbildung 1.4: Jacobsen-Epoxidierung unter Verwendung eines immobilisierten Mangansalenkomplexes .....	4
Abbildung 1.5: Durch Styrolmonooxygenase katalysierte Epoxidierung von Styrol .....	5
Abbildung 1.6: Epoxidierung von Styrol und Hydroxylierung von Cyclohexan mit Varianten der CYP102A1 .....	6
Abbildung 1.7: Herstellung von Cortison durch chemische (rot) und biotechnologische (grün) Reaktionsschritte.....	8
Abbildung 1.8: Überblick über Cytochrom P450 Monooxygenase katalysierte Reaktionen.....	10
Abbildung 1.9: Reaktionsmechanismus P450 katalysierter Hydroxylierungen geändert nach Maurer (2006) .....	12
Abbildung 1.10: Radikalischer <i>rebound</i> -Mechanismus.....	13
Abbildung 1.11: Schema des Elektronentransports am Beispiel der Klasse I P450 Systeme Abbildung schlecht gedruckt...neu!!! .....	14
Abbildung 1.12: Klassifizierung des Elektronentransports nach Chapman ( <a href="http://www.chem.ed.ac.uk/chapman/p450.html">http://www.chem.ed.ac.uk/chapman/p450.html</a> ).....	15
Abbildung 1.13: Herausforderungen P450 katalysierter Biotransformationen.....	18
Abbildung 2.1: Hydroxylierung von $\beta$ -Jonon katalysiert durch eine CYP102A1 Variante ..	23
Abbildung 2.2: CYP21 katalysierte Bildung von 11-Desoxycortisol.....	23
Abbildung 2.3: 15 $\beta$ -Hydroxylierung von Progesteron und Testosteron durch die CYP106A2 .....	24
Abbildung 3.1: Schema des Ganzzellbiokatalysators zur Hydroxylierung von $\beta$ -Jonon ....	26
Abbildung 3.2: Synthese zur Herstellung von 4-OH- $\beta$ -Jonon nach Haag et al. (1980) .....	27
Abbildung 3.3: GC-Chromatogramm der Trennung von ( <i>R</i> )- und ( <i>S</i> )-4-OH- $\beta$ -Jonon.....	28
Abbildung 3.4: Wachstum und Aktivität des <i>E. coli</i> Stammes mit CYP102A1 Variante in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer .....	29
Abbildung 3.5: Einfluss der Konzentration von IPTG (links) und 5-Aminolevulinsäure (rechts) während der Kultivierung auf die Aktivität der CYP102A1 Variante .....	30
Abbildung 3.6 CO-Differenzspektrum von Cytochrom P450 Monooxygenasen .....	31
Abbildung 3.7: CYP102A1 katalysierte Hydroxylierung von $\beta$ -Jonon mit ruhenden und wachsenden Zellen.....	32
Abbildung 3.8: Lagerstabilität der induzierten <i>E. coli</i> Zellen mit CYP102A1 Variante bei 4 °C als 20 %ige Zellsuspension .....	33
Abbildung 3.9: Einfluss des pH-Werts auf die Hydroxylierungsaktivität des <i>E. coli</i> Stammes mit CYP102A1 Variante.....	34
Abbildung 3.10: Einfluss der Temperatur auf die Aktivität (links) und Stabilität (rechts) des <i>E. coli</i> Stammes mit CYP102A1 Variante .....	35
Abbildung 3.11: Hydroxylierungsaktivität des <i>E. coli</i> Stammes mit CYP102A1 Variante in Gegenwart unterschiedlicher Biomassekonzentrationen.....	36
Abbildung 3.12: 4-OH- $\beta$ -Jononbildung bei Cofaktorregenerierung über die FDH bzw. über den Metabolismus des <i>E. coli</i> Stammes mit CYP102A1 Variante .....	37
Abbildung 3.13: Cosubstrateinfluss auf die Aktivität des <i>E. coli</i> Stammes mit CYP102A1 Variante .....	38

Abbildung 3.14: 4-OH- $\beta$ -Jononbildung und dessen ee im Verlauf der CYP102A1 katalysierten Ganzzellbiotransformation.....	39
Abbildung 3.15: Umsetzung des racemischen 4-OH- $\beta$ -Jonons durch den <i>E. coli</i> Stamm mit CYP102A1 Variante.....	41
Abbildung 3.16: Schema der CYP102A1 katalysierten Oxidation von $\beta$ -Jonon.....	41
Abbildung 3.17: Einfluss der Substratkonzentration auf die Aktivität der CYP102A1 Variante.....	42
Abbildung 3.18: Einfluss der Produktkonzentration auf die Aktivität der CYP102A1 Variante.....	43
Abbildung 3.19: Schematische Darstellung der untersuchten Strategien zur <i>in situ</i> Produktabtrennung.....	44
Abbildung 3.20: 4-OH- $\beta$ -Jononbildung im Rahmen eines Zweiphasensystems in Gegenwart von Diisononylphthalat.....	46
Abbildung 3.21: 4-OH- $\beta$ -Jononbildung in Gegenwart des Adsorbers Sepabeads EB BU	48
Abbildung 3.22: 4-OH- $\beta$ -Jononbildung in Gegenwart des Adsorbers Amberlite XAD 7....	49
Abbildung 3.23: Satzreaktor zur Synthese von 4-OH- $\beta$ -Jonon in Gegenwart von DMSO	50
Abbildung 4.1: Schema des Ganzzellbiokatalysators zur Hydroxylierung von Steroiden in Position 21.....	53
Abbildung 4.2: Wachstum der <i>S. pombe</i> CAD 18 und dessen CYP21 Aktivität in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer.....	55
Abbildung 4.3: Lagerstabilität der <i>S. pombe</i> CAD 18 bei 4 °C als 20 %ige Zellsuspension.....	56
Abbildung 4.4: Aktivität der <i>S. pombe</i> CAD 18 in Abhängigkeit des pH-Werts.....	57
Abbildung 4.5: Einfluss der Temperatur auf die Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der <i>S. pombe</i> CAD 18.....	58
Abbildung 4.6: Cytosolische Redoxcofaktorkonzentration von <i>S. pombe</i> CAD18 wenn stationär gewachsen.....	60
Abbildung 4.7: Cytosolische Cofaktorkonzentration während der CYP21 katalysierten Hydroxylierung von 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron.....	61
Abbildung 4.8: Einfluss von Glucose auf die Produktbildung bei der CYP21 katalysierten Hydroxylierung von 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron.....	62
Abbildung 4.9: Einfluss der Konzentration an 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron auf die Aktivität der <i>S. pombe</i> CAD 18.....	63
Abbildung 4.10: Löslichkeit von 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron in Gegenwart verschiedener Cosolventien.....	64
Abbildung 4.11: Einfluss von 10 vol% Cosolvent auf die Aktivität der <i>S. pombe</i> CAD 18.	65
Abbildung 4.12: Einfluss von Methanol auf die Aktivität der <i>S. pombe</i> CAD18.....	65
Abbildung 4.13: Einfluss verschiedener Cyclodextrine (0, 5, 10, 20, 50 & 100 mM) auf die Löslichkeit des 17 $\alpha$ -OH-Progesterons (links) bzw. auf die Aktivität (rechts) der <i>S. pombe</i> CAD 18.....	66
Abbildung 4.14: Aktivität ganzer und permeabilisierter <i>S. pombe</i> CAD18.....	67
Abbildung 4.15: Satzreaktor zur Hydroxylierung von 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron mit <i>S. pombe</i> CAD18 unter optimierten Bedingungen.....	68
Abbildung 5.1: Schema des Ganzzellbiokatalysators zur CYP106A2 katalysierten Steroidhydroxylierung in Position 15 $\beta$ .....	70
Abbildung 5.2: Wachstum und Aktivität des <i>E. coli</i> Stammes mit CYP106A2 in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer.....	73

Abbildung 5.3: Einfluss der IPTG Konzentration auf die Hydroxylierungsaktivität des <i>E. coli</i> Stammes mit CYP106A2 .....	74
Abbildung 5.4: Hydroxylierung von Progesteron (oben) und Testosteron (unten) durch ruhende (links) und wachsende (rechts) <i>E. coli</i> Zellen mit CYP106A2.....	76
Abbildung 5.5: Lagerstabilität des <i>E. coli</i> Stammes mit CYP106A2 bei 4 °C als 20 %ige Zellsuspension .....	77
Abbildung 5.6: Einfluss der Temperatur auf die Aktivität (links) des <i>E. coli</i> Stammes mit CYP106A2 und dessen Stabilität bei 35 °C (rechts).....	78
Abbildung 5.7: Einfluss des pH-Werts auf die Aktivität des <i>E. coli</i> Stammes mit CYP106A2 .....	79
Abbildung 5.8: Substratlöslichkeit in Abhängigkeit der Methanol- bzw. 2-Propanol-konzentration .....	80
Abbildung 5.9: Einfluss von Methanol auf die Aktivität des <i>E. coli</i> Stammes mit CYP106A2 .....	81
Abbildung 5.10: Einfluss von 2-Propanol auf die Aktivität des <i>E. coli</i> Stammes mit CYP106A2 .....	82
Abbildung 5.11: Einfluss von 2-Propanol auf die Stabilität des <i>E. coli</i> Stammes mit CYP106A2 unter Prozessbedingungen .....	83
Abbildung 5.12: Reaktionsverlauf der Hydroxylierung von Progesteron bei der Verwendung von Zellrohextrakt als Biokatalysator .....	84
Abbildung 5.13: Lagerstabilität des Zellrohextrakts als Lyophilisat bei 4 °C.....	85
Abbildung 5.14: Einfluss des pH-Werts auf die CYP106A2 Aktivität des Lyophilisats .....	86
Abbildung 5.15: Einfluss der Temperatur auf die Aktivität (links) und Stabilität (rechts) des Zellrohextrakts .....	87
Abbildung 5.16: Cofaktorverlauf während der CYP106A2 katalysierten Hydroxylierung von Progesteron .....	90
Abbildung 5.17: Einfluss von 2-Propanol auf die CYP106A2 Aktivität des Lyophilisats ....	91
Abbildung 5.18: Einfluss der Konzentration von Progesteron (links) und Testosteron (rechts) auf die CYP106A2 Aktivität des Zellrohextrakts .....	92
Abbildung 5.19: Satzreaktoren zur Hydroxylierung von Progesteron (links) und Testosteron (rechts) unter optimierten Bedingungen.....	93
Abbildung 5.20: Repetitiver Satzreaktor zur Hydroxylierung von Progesteron.....	95
Abbildung 5.21: Repetitiver Satzreaktor zur Hydroxylierung von Testosteron .....	97
Abbildung 5.22: Potentielle strukturelle Modifikationen des NP 2 am Beispiel des 15 $\beta$ -OH- Progesteron .....	99
Abbildung 6.1: Produktbildung bei Zugabe von CYP106A2 bzw. AdR/AdX .....	110
Abbildung 7.1: Schematische Darstellungen der identifizierten Limitierungen .....	114

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Freie Bildungsenthalpien von Kohlenwasserstoffverbindungen (Stull et al., 1969) .....	1
Tabelle 1.2 Parameter zur Hydroxylierung von Cyclohexan bzw. Epoxidierung von Styrol mit homogenen Katalysatoren und Biokatalysatoren .....	7
Tabelle 1.3: Industrielle Anwendungen von Cytochrom P450 Monooxygenasen .....	16
Tabelle 1.4: Aktivität und Stabilität von Cytochrom P450 Monooxygenasen .....	19
Tabelle 3.1: Michaelis Menten Konstante und Wechselzahl der CYP102A1 Variante und des Wildtyps für die Redoxcofaktoren (Maurer et al., 2005) .....	38
Tabelle 3.2: Kinetische Parameter der Hydroxylierung von $\beta$ -Jonon .....	43
Tabelle 3.3: Verteilung des $\beta$ -Jonons zwischen Adsorber und Reaktionsmedium.....	47
Tabelle 3.4: Kennzahlen des Satzreaktors in Gegenwart von DMSO.....	51
Tabelle 4.1: CYP21 Aktivität von ruhender und wachsender <i>S. pombe</i> CAD18 .....	56
Tabelle 4.2: Steigung der Kalibriergerade für NADPH in Abhängigkeit des Matrix der Probe .....	59
Tabelle 4.3: Kennzahlen des Satzreaktors zur Hydroxylierung von 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron .....	69
Tabelle 5.1 Bisher in der Literatur beschriebene Substrate und Produkte der CYP106A271	
Tabelle 5.2: Vergleich der CYP106A2 Aktivität des Ganzzellbiokatalysators mit dem Zellrohextrakt.....	84
Tabelle 5.3: Charakteristika des Zellrohextrakts .....	86
Tabelle 5.4: CYP106A2 Aktivität bei unterschiedlicher Lyophilisatkonzentration.....	88
Tabelle 5.5: CYP106A2 Aktivität des Zellrohextrakts bei Zugabe von 0,2 mM NADP <sup>+</sup> .....	89
Tabelle 5.6: Cofaktorkonzentration des Zellrohextrakts in nmol g <sub>Lyophilisat</sub> <sup>-1</sup> .....	90
Tabelle 5.7: Kennzahlen der Umsetzung von Progesteron und Testosteron im Satzreaktor .....	94
Tabelle 5.8: Kennzahlen des repetitiven Satzreaktors zur Umsetzung von Progesteron .	96
Tabelle 5.9: Kennzahlen des repetitiven Satzreaktors zur Umsetzung von Testosteron ..	97
Tabelle 5.10: Molekülionen der Nebenprodukte bei der Hydroxylierung von Progesteron	99
Tabelle 6.1: Wechselzahl und Michaelis Menten Konstante der CYP102A1 Variante und des Wildtyps (Maurer et al., 2005).....	102
Tabelle 6.2: Charakteristika der untersuchten Cytochrom P450 Monooxygenasen .....	113

## Abkürzungsverzeichnis

15 $\beta$ -Prog	15 $\beta$ -Hydroxyprogesteron
17 $\alpha$ -Prog	17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron
2-PrOH	2-Propanol
5-ALA	5-Aminolevulinsäure
ADH	Alkoholdehydrogenase
AdR	Adrenodoxin Reduktase
AdX	Adrenodoxin
AMP	Ampicillin
APCI	Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck ( <i>atmospheric pressure chemical ionization</i> )
BMIM (CF <sub>3</sub> SO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N	1-Butyl-3-methylimidazolium- bis(trifluormethylsulfonyl)imid
BMIM PF <sub>6</sub>	1-Butyl-3- methylimidazoliumhexafluorphosphat
BPEMEN	N,N'-dimethyl-N,N'-bis(2- pyridylmethyl)ethan-1,2-diamin
Cap	Chloramphenicol
CPR	Cytochrom P450 Reduktase
CPx	Eisen-Schwefel Transportprotein
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CYP	Cytochrom P450 Monooxygenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOC	11-Desoxycorticosteron
EMIM Et <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1-Ethyl-3-methylimidazoliumdiethylphosphat
EMIM MDEGSO <sub>4</sub>	1-Ethyl-3-methylimidazolium-2(2-methoxy- ethoxy)ethylsulfat
EMM	Edinburgh Minimal Medium
ESI	Elektronenspayionisierung
EtOH	Ethanol
FAD	Flavinadenindinukleotid
FDH	Formiatdehydrogenase
FMN	Flavinadeninmononukleotid
GC	Gaschromatographie
GDH	Glucosedehydrogenase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactospyranosid
Kan	Kanamycin
KP <sub>i</sub>	Kaliumphosphatpuffer
LbADH	Alkoholdehydrogenase aus <i>Lactobacillus brevis</i>
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometriekopplung

m-CPBA	meta-Chlorperbenzoesäure
MeOH	Methanol
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NMO	N-Methylmorpholin-N-oxid
NMR	Kernresonanzspektroskopie ( <i>nuclear magnetic resonance</i> )
NP	Nebenprodukt
OTf	Triflat
OTR	Sauerstofftransportrate
P450	Cytochrom P450 Monooxygenase
PEG 400	Polyethylenglykol
Prog	Progesteron
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RSS	11-Desoxycortisol, Reichstein S
Str	Streptomycin
TB	Teriffic Broth Medium
TEG	Triethylenglykol
Tes	Testosteron
THF	Tetrahydrofuran
Triglyme	Triethylenglykoldimethylether
TRIS-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
wcw	Biomassetrockengewicht ( <i>wet cell weight</i> )
YES	Yeast Extract Medium mit Supplemente

## Symbolverzeichnis

Symbol	Einheit	Bedeutung
$\Delta G_f^\circ$	$\text{kJ mol}^{-1}_f$	Freie Bildungsenthalpie
c	$\text{Mol L}^{-1}$	Konzentration
E		Enantiomerenverhältnis
ee	%	Enantiomerenüberschuss ( <i>enantiomeric excess</i> )
$k_{\text{cat}}$	$\text{min}^{-1}$	Wechselzahl
$K_i$	mM	Inhibierungskonstante
$k_{\text{LA}}$	$\text{s}^{-1}$	Sauerstofftransportkoeffizient
$K_M$	mM	Michaelis-Menten-Konstante
m	g, mg	Masse
M	$\text{g mol}^{-1}$	Molare Masse
n	mol	Stoffmenge
OTR	$\text{mM s}^{-1}$	Maximale Sauerstofftransferrate
pH	Log	Negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
rpm	$\text{min}^{-1}$	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RZA	$\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ , $\text{mM d}^{-1}$	Raum-Zeit-Ausbeute
T	$^\circ\text{C}$	Temperatur
t	d, h, min	Zeit
TOF	$\text{min}^{-1}$	<i>turnover frequency</i>
TTN		Maximale Zyklenzahl ( <i>total turnover number</i> )
U	$\mu\text{mol min}^{-1}$	Enzymaktivität
V	L	Volumen
$V_{\text{max}}$	$\text{U g}^{-1}$	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit



# 1 Einleitung

## 1.1 Selektiver Einbau von Sauerstoff in C-H Verbindungen

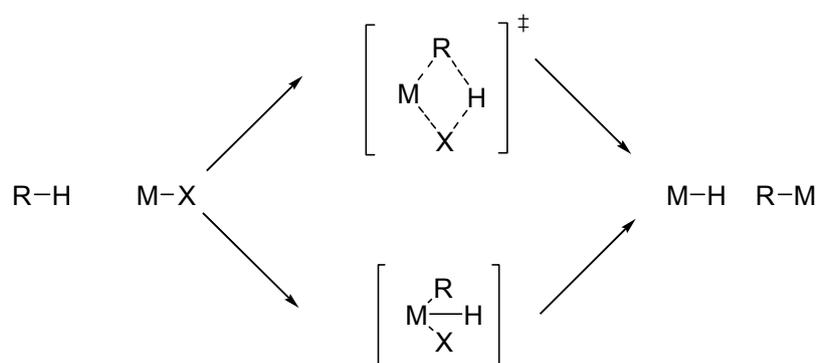
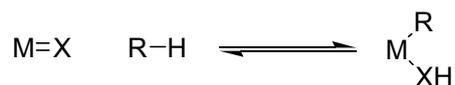
### 1.1.1 Chemische Methoden

Chirale Verbindungen sind wichtige Bausteine für die Herstellung von Wirkstoffen für Arzneimittel und Pflanzenschutzmittel (Liese et al., 2005), wobei vierzig Prozent aller Chiralitätszentren von pharmazeutischen Wirkstoffen eine Hydroxygruppe als funktionelle Gruppe haben (Meyer et al., 1997). Eine Möglichkeit diese funktionelle Gruppe gezielt in ein Molekül einzuführen, ist der selektive Einbau von Sauerstoff in C-H Verbindungen. Alkane sind aufgrund ihrer starken und lokalisierten Bindungen mit hohen Bindungsenergien (Bsp. Methan: 439,7 kJ mol<sup>-1</sup>) wenig reaktiv und müssen für entsprechende Reaktionen aktiviert werden. Zur Verdeutlichung der geringen Reaktivität sind in Tabelle 1.1 die freien Bildungsenthalpien von Alkanen, Alkenen und Alkinen dargestellt.

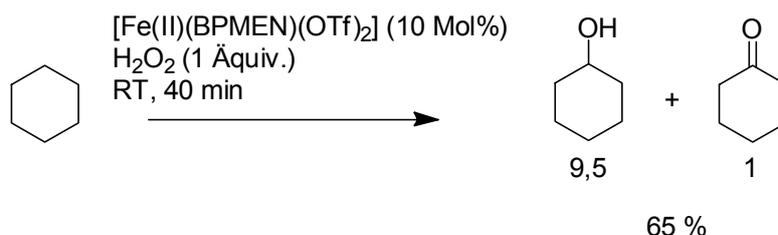
**Tabelle 1.1: Freie Bildungsenthalpien von Kohlenwasserstoffverbindungen (Stull et al., 1969)**

Verbindung	$\Delta G_f^\circ$ (25 °C) kJ mol <sup>-1</sup> <sub>f</sub>
Methan	-50,8
Ethan	-32,9
Propan	-23,5
Ethen	+68
Ethin	+209

Neueste Methoden der C-H Aktivierung werden in vielen Fällen von Übergangsmetallkatalysatoren, die Palladium, Eisen, Rhodium oder Ruthenium enthalten, katalysiert (Bergmann, 2007). Aus mechanistischer Sicht können vier verschiedene Aktivierungsmechanismen unterschieden werden, die in Abbildung 1.1 dargestellt sind: die oxidative Addition, die radikalische Aktivierung, die Aktivierung durch einen elektrophilen Angriff und die 1,2-Addition. Die elektrophile Aktivierung kann dabei sowohl konzertiert als auch über ein Intermediat ähnlich der oxidativen Addition ablaufen. Bei der 1,2-Addition handelt es sich hingegen um einen reversiblen Mechanismus (Jones, 1999). In allen Fällen bildet sich ein metallorganischer Komplex als Intermediat, der anschließend weiterreagiert (Labinger et al., 2002).

**Oxidative Addition****Radikalische Aktivierung****Elektrophile Aktivierung****1,2 Addition****Abbildung 1.1: Mechanismen der C-H Aktivierung**

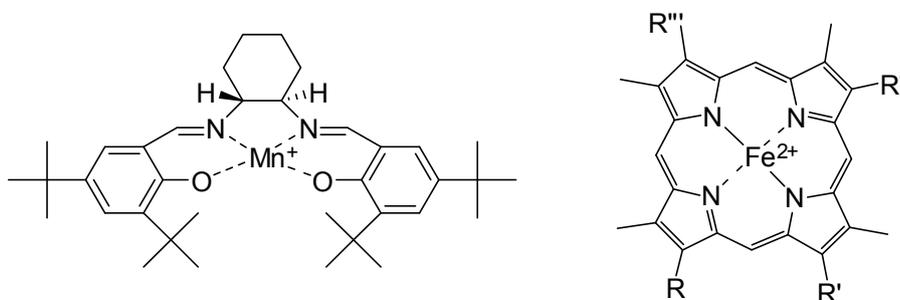
Nach der Aktivierung wird die C-H Verbindung funktionalisiert, wobei neben der Knüpfung von C-C Bindungen, Funktionalisierungen mit Heteroatomen wie Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel, Phosphaten oder Halogenen verbreitet sind (Godula et al., 2006). Als Herausforderung innerhalb der Aktivierung von C-H Verbindungen ist die selektive Oxyfunktionalisierung zu sehen. Die gebildeten Alkohole sind wesentlich oxidationsempfindlicher als das Alkan, sodass eine Weiteroxidation des Alkohols nicht ausgeschlossen werden kann und man erhält ein Produktgemisch an Alkoholen und Ketonen bzw. Aldehyden und Carbonsäuren (Bergman, 2007; Steinborn, 2007). Als Beispiel einer C-O Funktionalisierung zeigt Abbildung 1.2 die Hydroxylierung von Cyclohexan mit Hilfe eines Eisen(II)bistriflatkomplexes und Wasserstoffperoxid als Oxidationsmittel (England et al., 2009). Um den Anteil an gebildeten Cyclohexanon gering zu halten, wird ein 100facher Überschuss an Cyclohexan im Vergleich zum Oxidationsmittel eingesetzt. Dabei kann, bezogen auf das Oxidationsmittel, ein Umsatz von 65 % und eine Selektivität größer 90 % erreicht werden.



**Abbildung 1.2: Oxidation von Cyclohexan mit Hilfe eines Eisen(II)bistriflatkomplexes**

Außerdem kann eine Aktivierung von C-H Verbindungen auch von funktionellen Gruppen in der Nachbarschaft ausgehen, wie beispielsweise bei Carbonylverbindungen die in  $\alpha$ -Position ein Proton besitzen. Die Verbindung wird durch die Zugabe einer Base am  $\alpha$ -ständigen C-Atom deprotoniert und in seiner Reaktivität deutlich erhöht. Dies findet Anwendung in der elektrophilen  $\alpha$ -Hydroxylierung von Carbonylverbindungen (Adam et al., 1994).

Darüber hinaus ermöglichen asymmetrische Epoxidierungen von Alkenen den Zugang zu enantiomerenreinen Epoxiden sowie Hydroxyverbindungen. Neben der Sharpless-Epoxidierung (Katsuki et al., 2002), die eine enantioselektive Epoxidierung von Allylalkoholen erlaubt, kann die Jacobsen-Epoxidierung (Zhang et al., 2002) zur asymmetrischen Epoxidierung von unsubstituierten Alkenen eingesetzt werden. Als Katalysator zur Sauerstoffübertragung werden chirale kationische Mangan-Komplexe mit dem N,N,O,O,-Chelatliganden Salen verwendet (Behr, 2008), die ähnliche chemische Eigenschaften wie Metalloporphyrine aufweisen (Katsuki, 1996). Metalloporphyrine bilden in Form des Häms das katalytisch aktive Zentrum von Cytochrom P450 Monooxygenasen (CYP, P450), die in den Biosynthesewegen für Epoxidierungs- und Hydroxylierungsreaktionen verantwortlich sind. Sowohl beim homogenen Katalysator als auch beim Biokatalysator erfolgt die Aktivierung des Sauerstoffs in Form eines Metall-Oxo-Komplexes. Abbildung 1.3 vergleicht die Strukturen dieser beiden Komplexe.



**Abbildung 1.3: Struktur des Mangansalenkomplexes (links) und des Häms (rechts)**

Gerade am Beispiel der Epoxidierung von Styrol werden jedoch die Grenzen der Jacobsen-Epoxidierung deutlich. Je nach Substrat erreicht man mit dieser Methode nur eine sehr niedrige Enantioselektivität. So führen Synthesen mit Fluoralkyl-substituierten Mangan-salenkomplexen zwar zu hohen Ausbeuten ( $\sim 86\%$ ), die Reaktion verläuft jedoch nicht enantioselektiv (Pozzi et al., 1999). Neuere wissenschaftliche Arbeiten beschreiben eine Verbesserung der Enantioselektivität durch die Immobilisierung der Mangansalen-komplexe (Gong et al., 2009) (Abb. 1.4). Dennoch wird auch bei dieser Methode nur ein moderater Enantiomerenüberschuss (ee) von 72 % erreicht.



**Abbildung 1.4: Jacobsen-Epoxidierung unter Verwendung eines immobilisierten Mangansalenkomplexes**

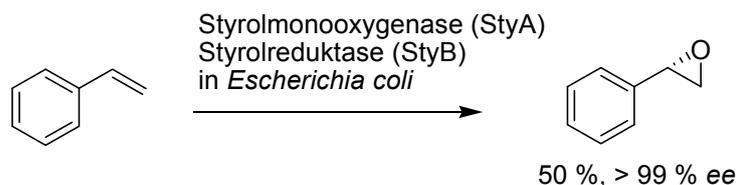
Aus dem Epoxid kann durch einen nukleophilen Angriff nach  $S_N2$  unter basischen Bedingungen eine Hydroxygruppe gebildet werden. Dabei kommt es zu einer Inversion der Konfiguration der Hydroxygruppe am stereogenen Zentrum (Walden-Umkehr). Da das Nukleophil am sterisch ungehinderten Kohlenstoff angreift, bildet sich die Hydroxygruppe am sterisch stärker gehinderten Kohlenstoff aus (Brückner, 2004).

### 1.1.2 Enzymatische Methoden

In Biosynthesen wird der Einbau von Sauerstoff in C-H Verbindungen durch Oxygenasen katalysiert. Der molekulare Sauerstoff wird dabei durch Komplexbildung mit Übergangsmetallen oder metallorganischen Verbindungen (= prosthetische Gruppe), wie dem Häm aktiviert. Monooxygenasen im speziellen erlauben den Einbau eines Sauerstoffatoms in das Substrat, während das zweite zu Wasser reduziert wird. Die benötigten Elektronen werden dabei vom Redoxcofaktor NAD(P)H zur Verfügung gestellt, wobei weitere Cofaktoren wie beispielweise Flavinadenindinukleotid (FAD) benötigt werden, die den Einzeltransport der Elektronen zum aktiven Zentrum der Monooxygenase ermöglichen (Schmid et al., 2004).

Die Bandbreite der Reaktionen, die durch Monooxygenasen katalysiert werden, ist sehr groß und beinhaltet neben der Hydroxylierung von aliphatischen und aromatischen Verbindungen die Epoxidierung von Alkenen, die Bayer-Villiger Oxidation von Ketonen, sowie die Oxidation an Heteroatomen wie Schwefel oder Stickstoff und die Dealkylierung

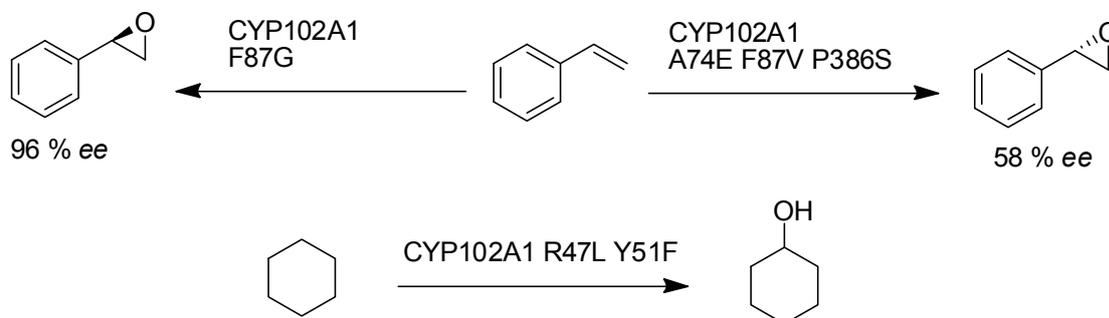
von Ethern, Thioethern oder Aminen (vgl. Kapitel 1.2) (Holland, 1992). Anhand der prosthetischen Gruppe im aktiven Zentrum werden Monooxygenasen in Flavin-Monooxygenasen, Häm-Monooxygenasen (Cytochrom P450 Monooxygenasen) und Nicht-Häm-Monooxygenasen unterteilt. Nicht-Häm-Monooxygenasen nutzen Eisen- bzw. Kupferionen als prosthetische Gruppe (Schmid et al., 2004). Ein Beispiel für Nicht-Häm-Monooxygenasen sind Laccasen, die industriell zum Bleichen in der Papier- und Textilindustrie eingesetzt werden (Ähle et al., 2008). Flavin-Monooxygenasen werden hauptsächlich für die Hydroxylierung aktivierter aromatischer Verbindungen eingesetzt. Daneben katalysieren sie Bayer-Villiger Oxidationen sowie Oxidationen an Heteroatomen (Walsh, 2002). Von Interesse ist die Flavin abhängige Styrolmonooxygenase aus *Pseudomonas sp.*, die eine enantioselektive Epoxidierung von Styrol erlaubt. Das Enzym wurde dazu gemeinsam mit einer Reduktase, die zum Elektronentransport vom NADPH zur Monooxygenase benötigt wird, in *Escherichia coli* exprimiert. Der Ganzzellbiokatalysator konnte im 50 L Maßstab erfolgreich eingesetzt werden, wobei eine Ausbeute von rund 50 % (S)-Styroloxid mit einem Enantiomerenüberschuss > 99 % erreicht werden konnte (Panke et al., 2001; Schmid et al., 2001).



**Abbildung 1.5: Durch Styrolmonooxygenase katalysierte Epoxidierung von Styrol**

Die größte Gruppe der Monooxygenasen stellen Cytochrom P450 Monooxygenasen dar. Diese Enzyme haben ein großes Substratspektrum und katalysieren neben Epoxidierungen und Oxidationen an Heteroatomen, hauptsächlich Hydroxylierungen von C-H Verbindungen, die häufig regio- und enantioselektiv verlaufen. Dabei akzeptieren diese Enzyme aliphatische und aromatische Verbindungen, gesättigte und ungesättigte Kohlenwasserstoffe sowie nicht aktivierte Alkane als Substrate (Chefson et al., 2006). Die Fähigkeit sogar nicht aktivierte Alkane selektiv zu hydroxylieren, verdeutlicht das große Potential dieser Enzyme für die präparative Synthese, da solche Hydroxylierungen auch für die chemische Synthese eine große Herausforderung darstellen (vgl. Kapitel 1.1.1) (Schmid et al., 2004; Steinborn, 2007). Abbildung 1.6 zeigt die durch eine Variante der CYP102A1 aus *Bacillus megaterium* katalysierte selektive Hydroxylierung von Cyclohexan. Enantioselektive Epoxidierungen von Styrol mit P450 sind in der Literatur ebenfalls bekannt (Farinas et al., 2004; Eiben et al., 2006; Tee et al., 2006; Funhoff et al., 2007; Fukami et al., 2008). Unter anderem ist die Entwicklung von Varianten der

CYP102A1 beschrieben, die es erlauben mit moderaten bis hohen Enantiomerenüberschüssen selektiv das (*R*)- bzw. das (*S*)-Styroxid zu synthetisieren (Eiben et al., 2006) (Abb.1.6).



**Abbildung 1.6: Epoxidierung von Styrol und Hydroxylierung von Cyclohexan mit Varianten der CYP102A1**

### 1.1.3 Vergleich beider Methoden

Zum Vergleich der chemischen und enzymatischen Methoden zum selektiven Einbau von Sauerstoff von C-H Verbindungen, werden Prozesskennzahlen wie Enantioselectivität, Raum-Zeit-Ausbeute, Wechselzahl und maximale Zyklenzahl herangezogen.

Die Raum-Zeit-Ausbeute (RZA) beschreibt die Ausnutzung des Reaktors pro Zeiteinheit.

$$\text{RZA} = \frac{\text{Stoffmenge Produkt}}{\text{Zeit} \cdot \text{Reaktorvolumen}} \quad \text{Formel 1.1}$$

Die Wechselzahl charakterisiert die Leistungsfähigkeit eines Katalysators und gibt den Umsatz an Substrat pro Zeiteinheit an. In der Biokatalyse wird die Wechselzahl als  $k_{\text{cat}}$  bezeichnet.

$$k_{\text{cat}} = \frac{\text{max. Reaktionsgeschwindigkeit}}{\text{Enzymkonzentration}} \quad \text{Formel 1.2}$$

Das Pendant der homogenen Katalyse ist die TOF (turnover frequency).

$$\text{TOF} = \frac{\text{Menge Produkt}}{\text{Menge Katalysator} \cdot \text{Zeit}} \quad \text{Formel 1.3}$$

Die maximale Zyklenzahl TTN (total turnover number) gilt als Maß für die Katalysatorausnutzung.

$$\text{TTN} = \frac{\text{gebildetes Produkt}}{\text{Menge Katalysator}} \quad \text{Formel 1.4}$$

Tabelle 1.2 vergleicht die Prozesskennzahlen verschiedener Syntheserouten zur Oxyfunktionalisierung von C-H Verbindungen anhand der Hydroxylierung von Cyclohexan und der Epoxidierung von Styrol. Styrolepoxidierungen mit P450 wurden bisher allerdings nur im Milliliter Maßstab unter nicht optimierten Reaktionsbedingungen durchgeführt. Daher sind keine Angaben zur Produktivität und Katalysatorausnutzung bekannt.

**Tabelle 1.2 Parameter zur Hydroxylierung von Cyclohexan bzw. Epoxidierung von Styrol mit homogenen Katalysatoren und Biokatalysatoren**

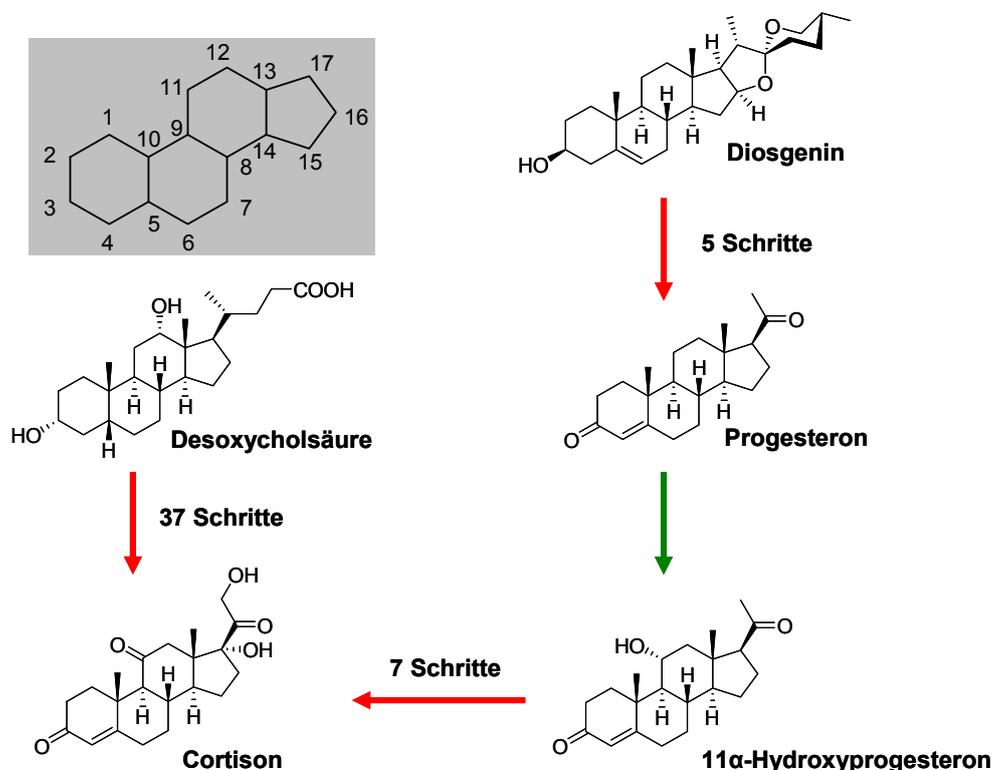
Reaktion/Katalysator	(Enantio-) Selektivität	Wechselzahl (TOF/ $K_{cat}$ ) $\text{min}^{-1}$	RZA $\text{mM d}^{-1}$	Max. Zykluszahl (TTN)	Referenz
Alkanhydroxylierung mit Fe-bis(triflat)-komplexen <sup>a</sup>	90,5 % <sup>c</sup>	0,16	163	6,5	(Comba et al., 2008)
Jacobsen-Epoxidierung <sup>b</sup>					
Mn-Salen	< 5 %	0,06	118	18	(Pozzi et al., 1999)
Immobilisiertes Mn-salen	72 % (S)	0,054	800 <sup>f</sup>	13	(Gong et al., 2009)
Flavin-abhängige Monooxygenase <sup>b</sup>					
Styrolmonooxygenase	> 99 % (S)	60000 <sup>d</sup>	156 <sup>g</sup>	10 <sup>7h</sup>	(Panke et al., 2001)
Cytochrom P450 Monooxygenase					
Epoxidierung					
CYP102A1 F87G <sup>b</sup>	96 % (R)	40,8	-	-	(Eiben et al., 2006)
CYP102A1 A74E F87V P386S <sup>b</sup>	58 % (S)	11	-	-	
Hydroxylierung					
CYP102A1 R47L Y51F <sup>a</sup>	100 % <sup>c</sup>	14 <sup>e</sup>	11	10000	(Maurer et al., 2005)

a: Hydroxylierung von Cyclohexan b: Epoxidierung von Styrol, c: Chemoselektivität d: isoliertes Enzym, Schätzwert nach (Schmid et al., 2001), e: (Maurer, 2006), f: Reaktorvolumen: geschätzt 5 mL, g: Reaktionsdauer geschätzt auf 16 h, h: bezogen auf das isolierte Enzym, Schätzwert nach (Schmid et al., 2001)

Der Einsatz von Biokatalysatoren erlaubt die Bildung von (*R*)- und (*S*)-Styroloxid mit hoher Enantioselektivität, während die Jacobsen-Epoxidierung von Styrol nur geringe Enantiomerenüberschüsse liefert. Auch bei der Hydroxylierung von Cyclohexan ist die biokatalytische Variante selektiver, da die Bildung von Cyclohexanon während der Reaktion nicht auftritt. Darüber hinaus zeigen Berechnungen der Wechselzahl, dass Biokatalysatoren im Vergleich zu den homogenen Katalysatoren aktiver sind. Selbst die im Vergleich zu anderen Enzymen geringen Wechselzahlen der Cytochrom P450 Monooxygenasen können von keinem homogenen Katalysator erreicht werden. Ähnlich verhält es sich mit der Katalysatorausnutzung.

Die Produktivitäten der chemischen Synthesen schwanken zwischen 800 und 120 mM d<sup>-1</sup>. In diesem Bereich liegt auch die Produktivität der Epoxidierung von Styrol unter Verwendung der Styrolmonooxygenase. Die Produktivitäten P450 katalysierter Reaktionen sind etwa eine Größenordnung geringer.

Gerade bei der chemischen Synthese von Steroiden, stellt die regioselektive Hydroxylierung von Steroiden eine große Herausforderung dar. Bei der Herstellung von Cortison, ging die ursprüngliche rein chemische Methode von Desoxycholsäure als Edukt aus, einer Gallsäure, die aus Schlachttieren gewonnen wird. Insgesamt 37 Syntheseschritte sind nötig, um aus diesem Steroid Cortison herzustellen (Hirschmann, 1992). Alleine die Verschiebung der Hydroxygruppe von Position 12 auf Position 11 benötigt 9 Stufen. In den 1950er erfolgte die Entwicklung eines biotechnologischen Verfahrens mit *Rhizopus nigricans* durch Murray und Peterson von der Upjohn Company, das eine selektive Hydroxylierung von Progesteron in Position 11 $\alpha$  erlaubt (Murray et al., 1952). Als neuer Ausgangsstoff zur Herstellung von Cortison konnte nun Diosgenin, das aus der Yamswurzel (*Discorea*) gewonnen wird, eingesetzt werden und die Anzahl der Syntheseschritte verringerte sich auf die Hälfte (Abb. 1.7).



**Abbildung 1.7: Herstellung von Cortison durch chemische (rot) und biotechnologische (grün) Reaktionsschritte**

In grau unterlegt ist die Nomenklatur der zyklischen Kohlenwasserstoffstruktur des Steroidgrundgerüsts Gonan dargestellt.

Andere Verfahren setzen nicht *R. nigricans*, sondern den Hefepilz *Curvularia lunata* zur biotechnologischen Herstellung von Cortison ein. Dieser ermöglicht die direkte 11 $\beta$ -Hydroxylierung von 11-Desoxycortisol zu Cortisol (Dulaney et al., 1959). Die Hydroxylierung verläuft jedoch nicht regioselektiv, da eine Bildung von 14 $\alpha$  und 7 $\alpha$ -hydroxylierten Derivaten beobachtet wird. Die Nebenproduktbildung kann allerdings unterbunden werden, wenn an Position 17 ein Acetatester als Schutzgruppe eingeführt worden ist (Schmid, 2002).

Beide Organismen, *R. nigricans* und *C. lunata*, enthalten letztendlich Cytochrom P450 Monooxygenasen, die für die jeweilige selektive Hydroxylierung verantwortlich sind. Heute werden Steroid-Hydroxylierungen in Position 11 $\alpha$ , 11 $\beta$  und 16 $\alpha$  ausschließlich mit biotechnologischen Verfahren durchgeführt (Mahato et al., 1997).

## 1.2 Cytochrom P450 Monooxygenasen

Cytochrom P450 Monooxygenasen kommen in nahezu allen Organismen vor. Bislang sind mehr als 8000 Gene, die eine Cytochrom P450 Monooxygenase kodieren bekannt<sup>1</sup>. Den Namen Cytochrom erhielten diese Enzyme aufgrund ihres Charakters als Hämprotein und die Bezeichnung P450 wegen des Absorptionsmaximums des reduzierten, Kohlenmonoxid gebundenen Komplexes bei 450 nm. Anhand von Sequenzähnlichkeiten werden P450 eindeutig benannt (Nelson et al., 1996). Ähnlichkeiten größer 40 % bedeuten, dass die Enzyme der gleichen P450-Familie angehören, bei Ähnlichkeiten größer 55 % der gleichen Unterfamilie. Der Abkürzung CYP folgt eine Zahl, die die Familie benennt, der darauffolgende Buchstabe legt die Unterfamilie fest und die letzte Zahl besagt, das wievielte Enzym dieser Unterfamilie es darstellt. Bei der CYP106A2 handelt es sich z. B. um das zweite Enzym das in der Unterfamilie A der Gruppe 106 entdeckt wurde.

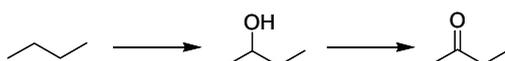
CYPs spielen eine wichtige Rolle in der Biosynthese von sekundären Metaboliten, wie beispielsweise Vitaminen und Steroidhormonen. Darüber hinaus nehmen diese Enzyme eine zentrale Funktion beim Abbau schädlicher Stoffe im Organismus ein, indem die Hydrophobizität dieser Verbindungen erniedrigt wird. Dadurch können toxische Substanzen leichter ausgeschieden werden. Bei manchen Verbindungen hat die Erniedrigung der Hydrophobizität jedoch genau den gegenteiligen Effekt, nämlich die Erzeugung noch schädlicher Stoffe, wie z. B. bei Benzo[a]pyren. Erst durch eine P450

<sup>1</sup> <http://drnelson.utmem.edu/p450stats.Feb2008.htm>

katalysierte Epoxidierung des Benzo[a]pyrens kommt es zur Bildung einer karzinogenen Substanz. Da auch pharmazeutisch aktive Substanzen durch P450 Enzyme verstoffwechselt werden können (Wong, 1998), müssen die Metabolite eines Wirkstoffs im Rahmen seiner Zulassung einhergehend auf toxische Wirkungen untersucht werden. Manchmal kommt es aber auch erst durch die Hydroxylierung der P450s zur Bildung der pharmakologisch aktiven Form einer Substanz (Prodrug) (Guengerich, 2002), wie beispielsweise bei Barbituraten, die zur Behandlung von Schlafstörungen eingesetzt werden (Gonzalez, 1992). Aufgrund der Untersuchungen zu den Metaboliten eines Wirkstoffs im Rahmen klinischer Studien, ist die heterologe Expression von menschlichen CYPs in Mikroorganismen wie *E. coli* oder Hefe von großem Interesse (Wong, 1998; Ghisalba et al., 2007).

Wie bereits erwähnt, katalysieren Cytochrom P450 Monooxygenasen die Hydroxylierung von aktivierten und nicht aktivierten, aliphatischen und aromatischen C-H Verbindungen, die in vielen Fällen regio- bzw. enantioselektiv ablaufen. Darüber hinaus sind jedoch noch eine Vielzahl weiterer Reaktionen, wie die Hydroxylierung von Alkoholen und Aldehyden, die Epoxidierung von C-C Doppelbindungen, die Oxidation an Heteroatomen wie beispielsweise Schwefel oder Stickstoff aber auch Dealkylierungen bekannt (Sono et al., 1996; Isin et al., 2007). Abbildung 1.8 gibt einen Überblick über die wichtigsten Reaktionen.

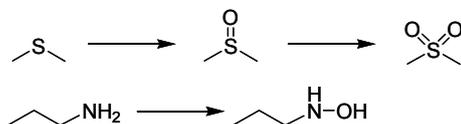
#### Oxidation von Alkanen zu Alkoholen und Aldehyden/Ketonen



#### Epoxidierung von Alkenen



#### Oxidationen an Schwefel- und Stickstoffatomen



#### Oxidative Dealkylierung

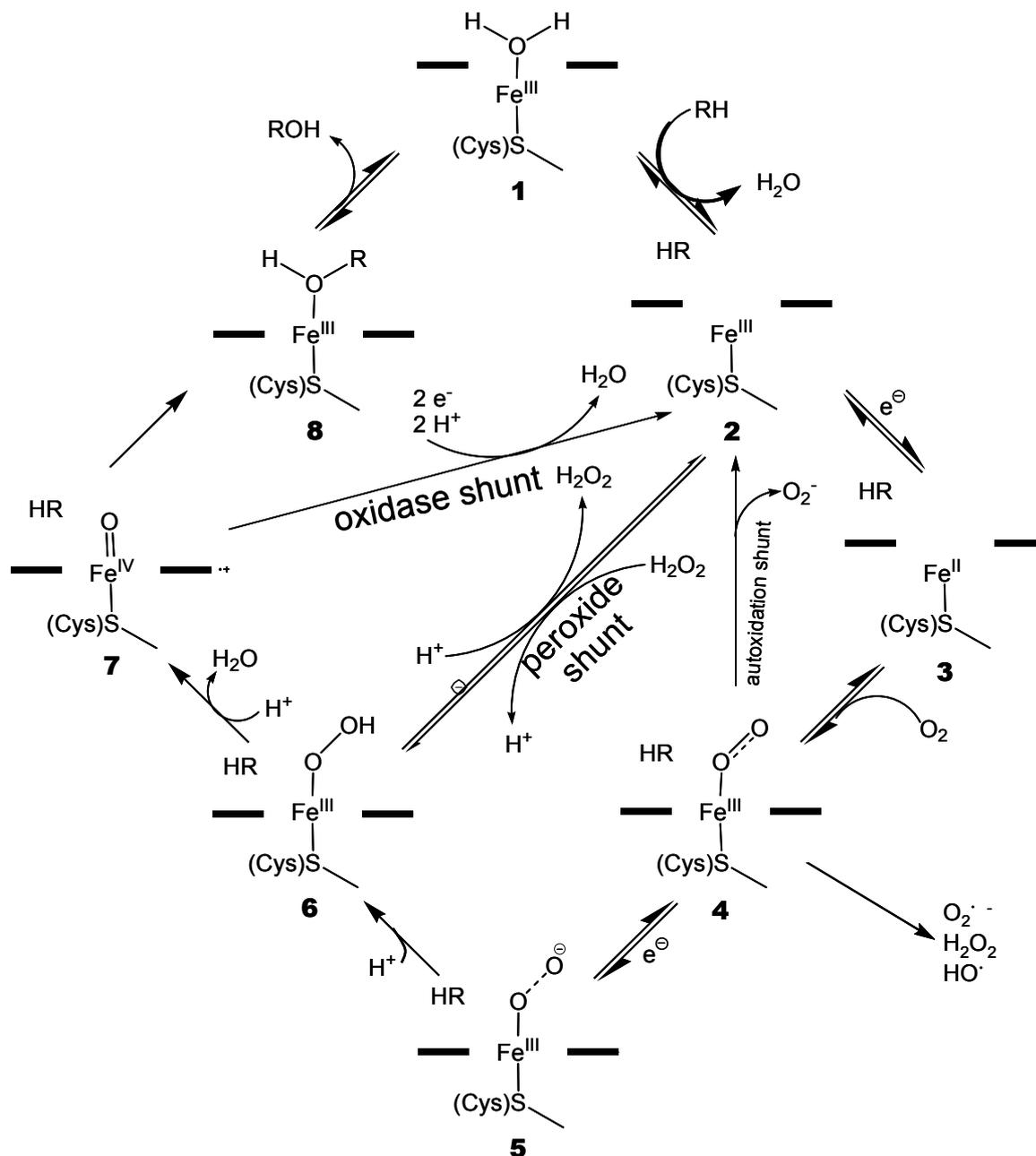


Abbildung 1.8: Überblick über Cytochrom P450 Monooxygenase katalysierte Reaktionen

Manche Cytochrom P450 Monooxygenasen können die gebildeten Alkohole zu Carbonylverbindungen weiteroxidieren. Anwendung findet diese Überoxidation beispielsweise bei der Synthese von (+)-Nootkaton über Nootkatol aus Valencen (Sowden et al., 2005; Girhard et al., 2009). Oxidationen an Heteroatomen sind sowohl bei Schwefel als auch Stickstoff bekannt. Sulfide werden dabei über das Sulfoxid in Sulfonverbindungen überführt. Die Oxidation am Stickstoff führt je nach Substituenten zur Bildung von Hydroxylaminen bzw. N-Oxiden. Bei oxidativen Dealkylierungen werden im ersten Schritt instabile Halbactale gebildet, die sich im nächsten Schritt in einen Alkohol und ein Aldehyd spalten. Handelt es sich beim Heteroatom nicht um Sauerstoff, sondern um Stickstoff oder Schwefel, entstehen Amine bzw. Thiole (Guengerich, 2001).

### 1.2.1 Katalysemechanismus

Abbildung 1.9 zeigt den heute allgemein gültigen Katalysezyklus, nach dem P450 katalysierte Hydroxylierungen ablaufen und in weiten Teilen gesichert ist (Makris et al., 2005).

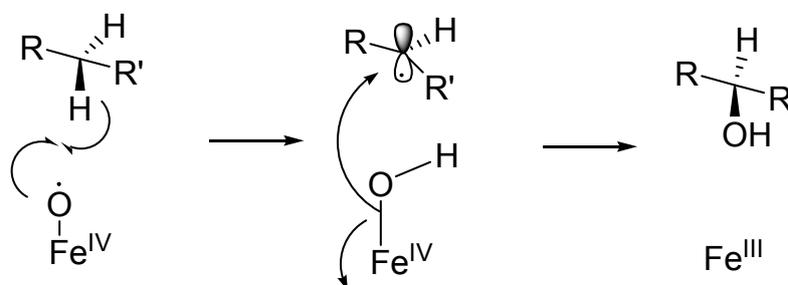


**Abbildung 1.9: Reaktionsmechanismus P450 katalysierter Hydroxylierungen geändert nach Maurer (2006)**

Mit Erlaubnis von PD Dr. Vlada Urlacher, Institut für technische Biochemie, Universität Stuttgart

Die horizontalen Striche stellen die äquatorialen Bindungsstellen des Eisens dar. Das Substrat, als HR bezeichnet, wird durch Wechselwirkungen mit den Aminosäureseitenketten am aktiven Zentrum gebunden.

Im inaktiven Zustand liegt das Eisen des Häm als 6fach koordiniertes Metall vor, wobei die 4 äquatorialen Bindungsstellen durch die Stickstoffe des Liganden Protoporphyrin XI besetzt sind. An den axialen Stellen ist Cysteinat sowie Wasser gebunden. Im ersten Schritt verdrängt das Substrat das Wasser als sechsten Liganden vom Eisen. Dabei ändert sich der Spin-Zustand des Eisens von low zu high-spin **2**. Durch die Erhöhung des Redoxpotentials kann  $\text{Fe}^{\text{III}}$  zu  $\text{Fe}^{\text{II}}$  reduziert werden **3**. Die Änderung des Redoxpotentials in Gegenwart von Substrat soll eine unkontrollierte Elektronenversorgung und den damit verbundenen NAD(P)H Verbrauch unterbinden. Daraufhin erfolgt die Bindung von molekularem Sauerstoff, wodurch ein instabiler Oxy-Eisenkomplex entsteht **4**. Ein weiterer Reduktionsschritt führt zur Bildung der Peroxoeisenspezies **5**, die anschließend durch Protonierung in eine Hydroperoxoeisenspezies übergeht **6**. Die zweite Protonierung bewirkt, dass unter Wasserabspaltung, der sogenannte *compound I* entsteht **7**, der das gebundene Substrat oxidiert **8**. Als ungesichert gilt immer noch der Mechanismus der Substratoxidation im Katalysezyklus. Aufgrund der hohen Reaktivität der Intermediate sind diese Zwischenstufen nur sehr schwer zu charakterisieren. Im Rahmen von Untersuchungen zur Chlorperoxidase aus *Caldariomyces fumago*, wurde ein Oxo-Eisenkomplex identifiziert, der dem *compound I* P450 katalysierter Reaktionen entspricht. Daher wird vermutet, dass Sauerstoff durch einen radikalischen *rebound*-Mechanismus auf das Substrat übertragen wird (Groves, 2005), was im Rahmen von Untersuchungen zu CYP101 und CYP102A1 bestätigt werden konnte (He et al., 2004).



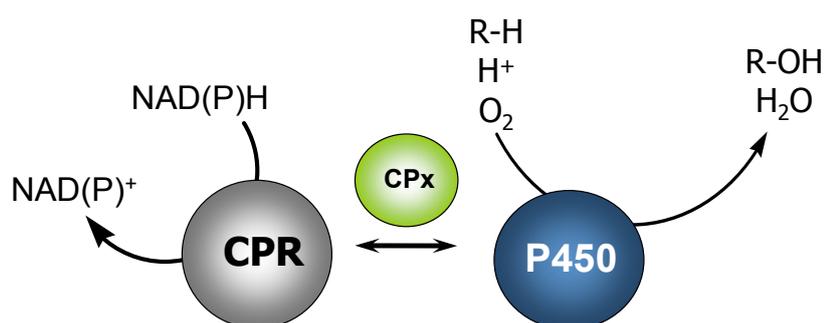
**Abbildung 1.10: Radikalischer *rebound*-Mechanismus**

Zusätzlich existieren 3 sogenannte *shunt pathways*, in denen es zur Dissoziation des Sauerstoffs vom Hämeisen ohne Substrathydroxylierung kommen kann. Der *autoxidation shunt* beschreibt die Abspaltung des Sauerstoffs von instabilen Oxy-Eisenkomplex **4**. Beim *peroxide shunt* spaltet sich Wasserstoffperoxid von der Hydroperoxoeisen-Spezies **6** ab, die dadurch wieder in einen  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Komplex übergeht **2**. Der *peroxide shunt* kann auch in umgekehrter Richtung durchgeführt werden. Prozesstechnisch spielt dieser, wenn auch nur begrenzt, eine Rolle, da die Redoxcofaktorabhängigkeit einer P450 katalysierten Reaktion so umgangen werden kann (Cirino et al., 2003). Wasserstoffperoxid, das als

Elektronenlieferant dient, inaktiviert jedoch das Enzym (Coon et al., 1996). Durch den *oxidase shunt* entsteht aus dem *compound I 7* wieder der  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Komplex **2**. Sauerstoff wird unter Verbrauch von zwei Äquivalenten  $\text{NAD(P)H}$  zu Wasser reduziert. Neben den *shunt pathways* kann es zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), wie z. B. dem radikalischen Hyperoxidanion aus dem instabilen Komplex **4** kommen, die das Enzym ebenfalls inaktivieren (Bernhardt, 1995). Diese Reaktionen werden auch als Entkopplungsreaktionen (*uncoupling*) bezeichnet. Die Elektronen, die durch den Cofaktor zur Verfügung gestellt werden, werden verbraucht, ohne dass das Substrat hydroxyliert wird.

### 1.2.2 Redoxpartner und Elektronentransport

Wie der Katalysezyklus zeigt, müssen die Elektronen zur Aktivierung des Sauerstoffs einzeln nacheinander zum Häm transportiert werden. Dazu werden weitere Proteinkomponenten benötigt. Die Diversität der Elektronentransportkomponenten ist dabei ähnlich groß wie die der P450 (Hannemann et al., 2007), wobei die wichtigsten Vertreter in vier Klassen unterteilt werden können. Am Beispiel der Klasse I P450 Systeme soll der Elektronentransport näher beschrieben werden (Abb. 1.11). Neben der CYP werden zwei weitere Proteinkomponenten, eine Cytochrom P450 Reduktase (CPR) und ein Eisen-Schwefelprotein vom Typ  $[\text{2Fe-2S}]$  (CPx) benötigt. Im ersten Schritt werden die Elektronen vom Redoxcofaktor auf eine CPR übertragen, dabei wird das  $\text{NAD(P)H}$  zu  $\text{NAD(P)}$  oxidiert. Die FAD abhängige Reduktase ermöglicht den einzelnen, aufeinander folgenden Transfer der Elektronen. Über ein CPx werden die Elektronen schließlich zur P450 transportiert (Bernhardt, 2006).



**Abbildung 1.11: Schema des Elektronentransports am Beispiel der Klasse I P450 Systeme**

Eine Klassifizierung der wichtigsten Elektronentransportsysteme ist in Abbildung 1.12 dargestellt. Zu den Klasse I Enzymen gehören neben den meisten bakteriellen CYPs auch mitochondriale P450. Im Unterschied zu den bakteriellen Systemen, sind bei mitochondrialen P450 sowohl die CPR als auch die CYP membrangebunden. Vertreter des Klasse II Elektronentransportes sind mikrosomale P450 Systeme. Diese liegen

ebenfalls membranassoziiert am endoplasmatischen Retikulum vor. Sie benötigen kein Eisen-Schwefel-Protein, das die Elektronen von der CPR zur P450 transportiert. Anstelle dessen verfügt die CPR über eine weitere prosthetische Gruppe, das Flavinmononukleotid (FMN), das diese Aufgabe übernimmt. Vertreter aus Klasse III und IV sind Fusionsproteine aus den Elektronentransportkomponenten und der P450. Je nachdem ob sie über eine FAD/FMN abhängige Reduktasedomäne oder eine [2Fe-2S]-Domäne verfügen, gehören sie Klasse III oder IV an. Bei der am besten charakterisierten P450, der CYP102A1 aus *B. megaterium* handelt es sich um ein Fusionsprotein der Klasse III. Darüber hinaus gibt es noch zahlreiche andere Elektronentransportsysteme die von Hannemann et al. (2007) zusammengefasst wurden.

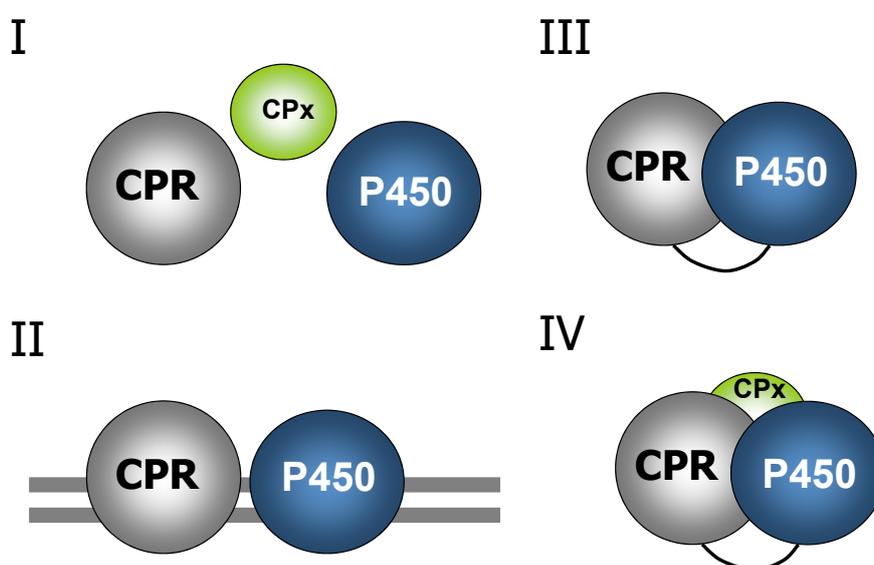


Abbildung 1.12: Klassifizierung des Elektronentransports nach Chapman (<http://www.chem.ed.ac.uk/chapman/p450.html>)

## 1.3 Biotechnologische Anwendung von Cytochrom P450 Monooxygenasen

### 1.3.1 Prozesse mit Cytochrom P450 Monooxygenasen

Aufgrund der Fähigkeit C-H Verbindungen meist selektiv zu hydroxylieren und des sehr breiten Substratspektrums sind P450 von großem Interesse für die industrielle Biokatalyse. Trotzdem beschränkt sich der Einsatz der P450 auf einige wenige Prozesse, die in Tabelle 1. 3 zusammengefasst sind (van Beilen et al., 2003; Julsing et al., 2008). Bei allen Prozessen handelt es sich um Ganzzellbiotransformationen, die aus mehreren Gründen als am geeignetsten erachtet werden (Urlacher et al., 2006a). So verfügen Zellen über einen eigenen Redoxcofaktorpool, die eine Zugabe des kostenintensiven Cofaktors entbehrlich machen. Darüber hinaus handelt es sich bei P450 Systemen in der

Regel um komplexe Systeme, die aus mehreren Proteinkomponenten bestehen. Eukaryotische P450 liegen zudem membranassoziiert vor, was den Einsatz isolierter Enzyme erschwert.

Mit Ausnahme der Synthese von Artemisininsäure, werden alle P450 katalysierten industriell angewandten Hydroxylierungen mit Organismen durchgeführt, bei denen bereits der Wildtypstamm die geforderte Aktivität besitzt. Besonders hohe Produktkonzentrationen werden bei der Hydroxylierung von n-Tridecan mit *Candida tropicalis* erreicht, was durch gezieltes Ausschalten der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren im Stoffwechsel des Organismus erzielt wurde (Craft et al., 2003).

**Tabelle 1.3: Industrielle Anwendungen von Cytochrom P450 Monooxygenasen**

Reaktion/Katalysator	Katalysator	Kennzahlen des Prozesses	Unternehmen
11-Deoxycortisol $\rightarrow$ Cortisol	<i>Curvularia lunata</i> P450 <sub>lun</sub>	-	Bayer Schering AG
Hydroxylierung von ( <i>R</i> )-2-Phenoxypropionsäure an <i>para</i> -Position	<i>Beauveria bassiana</i>	Produktkonzentration: 7 g L <sup>-1</sup>	BASF AG
n-Tridecan $\rightarrow$ $\alpha,\omega$ -Tridecansäure	<i>Candida tropicalis</i> CYP52A1	Produktkonzentration: 166 g L <sup>-1</sup>	Cognis
Amorpha-4,11-dien $\rightarrow$ Artemisininsäure	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CYP71AV1	Produktkonzentration: 0,12 g L <sup>-1</sup>	Amyris Biotechnologies
Compactin $\rightarrow$ Pravastin	<i>Streptomyces</i> sp. Y 110 CYP105A3	Produktkonzentration: 1 g L <sup>-1</sup>	Bristol-Meyer-Squibb, Sankyo Pharma
Simvastatin $\rightarrow$ 6 $\beta$ -Hydroxymethylsimvastatin	<i>Nocardia autotropica</i>	Produktkonzentration: 0,8 g L <sup>-1</sup>	Merck und Co Inc.

Darüber hinaus gab es in den letzten Jahren zahlreiche Entwicklungen im Labormaßstab zu Cytochrom P450 Monooxygenasen. Diese umfassen die Entwicklung verbesserter P450-Varianten, die heterologe Expression zahlreicher P450 gemeinsam mit Elektronentransferpartnern in Hefen und Bakterien und die Integration dieser Enzyme in Biosynthesewege. Auf dem Gebiet des *protein engineering*s von Cytochrom P450 Monooxygenasen gibt es zahlreiche Veröffentlichungen. So wurden z. B. Varianten mit geänderter Substratspezifität, verbesserter Aktivität und Stabilität, erhöhter Selektivität und auch mit erhöhter Lösungsmitteltoleranz generiert (Bernhardt, 2006; Urlacher et al.,

2006b). Für das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde eine Variante der CYP102A1 identifiziert, die ohne Aktivitätseinbußen bis zu 30 vol% DMSO toleriert (Wong et al., 2004). Des Weiteren wurde die Substratspezifität dieses Enzyms hin zu kurzkettigen Alkanen geändert. Obwohl dieses Enzym in seiner ursprünglichen Funktion eine Fettsäurehydroxylase ist, gelang es, Varianten zu erzeugen, die Ethan und Propan hydroxylieren (Meinhold et al., 2005; Fasan et al., 2007). Darüber hinaus konnte die Cofaktorspezifität dieses Enzyms von NADPH zum kostengünstigeren NADH geändert werden (Maurer et al., 2005).

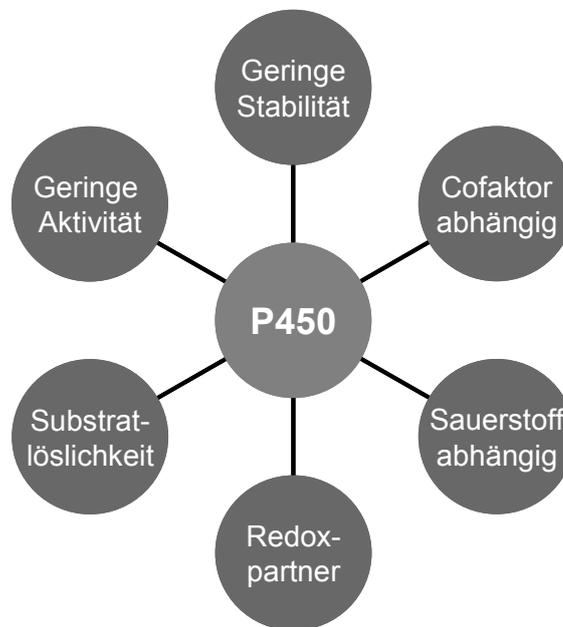
Durch die Etablierung eines neuen Biosynthesewegs in *Saccharomyces cerevisiae* in dem vier P450 integriert wurden, ist es möglich, Cortisol aus einfachen C-Quellen, wie Glucose, herzustellen (Szczebara et al., 2003). Ähnlich wurde auch der rekombinante Hefestamm entwickelt, der zur Herstellung von Artemisininsäure eingesetzt wird (Ro et al., 2006). Artemisininsäure ist die Vorstufe des Artemisinin, das zur Behandlung von Malaria eingesetzt wird. Neben der Integration der Arthropadiensynthase, exprimiert der Hefestamm zur Biosynthese der Artemisininsäure die CYP71AV1 gemeinsam mit einer CPR (Tabelle 1.3).

Auf reaktionstechnischer Ebene gibt es bislang nur wenige Entwicklungen, die sich mit Cytochrom P450 Monooxygenasen beschäftigen. Die wenigen bekannten Untersuchungen beschränken sich fast ausschließlich auf bakterielle P450, da diese im Vergleich zu eukaryotischen CYPs aktiver sind. Zudem handelt es sich dabei um lösliche und nicht membrangebundene Proteine, die im Cytosol vorliegen. Die Entwicklungen umfassen z. B. die Implementierung einer enzymgekoppelten Cofaktorregenerierung bei Ganzzellsystemen (Michizoe et al., 2005; Schewe et al., 2008) und zellfreien Anwendungen (Maurer et al., 2005) zur effizienten Cofaktorversorgung des Biokatalysators. Darüber hinaus konnte durch die Immobilisierung in einer Sol-Gel Matrix die Stabilität der CYP102A1 erhöht werden (Maurer et al., 2003).

In der Regel sind die Substrate P450 katalysierter Reaktionen schwer wasserlöslich, sodass eine Limitierung durch die geringe Substratlöslichkeit nicht ausgeschlossen werden kann. Sowohl Ganzzellbiokatalysatoren die die CYP102A1 exprimieren als auch isolierte CYP102A1 konnten erfolgreich im Zweiphasensystem eingesetzt werden. Neben dem Einsatz des Substrats als zweite Phase (Maurer et al., 2005; Schewe et al., 2008) konnte bei der Hydroxylierung von ( $\alpha$ )-Pinen Diisononylphthalat als Lösungsmittel der organischen Phase erfolgreich eingesetzt werden (Schewe et al., 2009).

### 1.3.2 Herausforderungen biotechnologischer Anwendungen

Die effiziente biotechnologische Anwendung von Cytochrom P450 Monooxygenasen wird durch verschiedene Faktoren erschwert, die in Abbildung 1.13 schematisch zusammengefasst sind und im Folgenden im Detail erläutert werden.



**Abbildung 1.13: Herausforderungen P450 katalysierter Biotransformationen**

#### 1.3.2.1 Geringe Enzymaktivität und –stabilität

Im Vergleich zu anderen biotechnologisch relevanten Enzymen verfügen Cytochrom P450 Monooxygenasen über geringe Enzymaktivitäten und –stabilitäten, wobei explizit zwischen eukaryotischen und prokaryotischen CYPs unterschieden werden muss (Tabelle 1.4). Betrachtet man die Aktivität des Fusionsproteins CYP102A1, so verfügt diese P450 je nach Substrat sogar über Wechselzahlen von rund  $1800 \text{ min}^{-1}$ . Die menschliche CYP2D6 hingegen besitzt mit einer Wechselzahl von nur  $4 \text{ min}^{-1}$  eine sehr viel geringere Aktivität. Die geringe Aktivität kann zwar prinzipiell durch eine höhere Konzentration an Biokatalysator ausgeglichen werden, dies setzt jedoch eine effiziente Überexpression des Enzyms voraus. Zu diesem Zweck wurde bereits ein Protokoll zur Expression der CYP102A1 in *E. coli* entwickelt (Pflug et al., 2007). Darüber hinaus kann auch ein Wechsel des Expressionsorganismus zu einer Steigerung des P450 Expressionslevels führen, wie beispielsweise bei der humanen CYP11B1. Eine deutlich höhere Aktivität dieses Enzyms wird erreicht, wenn *Schizosaccharomyces pombe* anstelle von *Saccharomyces cerevisiae* als Expressionswirt verwendet wird (Dumas et al., 1996; Bureik et al., 2002; Dragan et al., 2005). Die höchste Katalysatorausnutzung einer P450 unter Prozessbedingungen wurde mit einem Wert von rund 30000 bei der durch die

CYP102A1 katalysierten Hydroxylierung von Myristinsäure, dem natürlichen Substrat dieses Enzyms, erreicht (Maurer et al., 2005). Noch geringere TTNs unter 100 wurden für Säuger-P450 bestimmt (Zhao et al., 2007).

**Tabelle 1.4: Aktivität und Stabilität von Cytochrom P450 Monooxygenasen**

Enzym	Aktivität / $K_{cat} \text{ min}^{-1}$	Stabilität/ TTN	Quelle
CYP102A1 Mutante	35 – 1 800	2000 – 30000	(Appel et al., 2001; Maurer et al., 2005)
Menschliche CYP2D6 <sup>a</sup>	4	90	(Zhao et al., 2007)

a: Bildung von Dextromethorphan, *in vitro* Messungen

### 1.3.2.2 Redoxcofaktorabhängigkeit

NAD(P)H wird bei P450 katalysierten Reaktionen in mindestens stöchiometrischen Mengen benötigt. Aufgrund von Entkopplungsreaktionen kann der Cofaktorbedarf jedoch auch weitaus höher liegen (vgl. Kapitel 1.2.1). Ein Ganzzellansatz ist vorteilhaft, da auf die Zugabe des kostspieligen Cofaktors verzichtet werden kann. Darüber hinaus kann eine heterologe enzymgekoppelte Cofaktorregenerierung etabliert werden, wenn eine Regenerierung über den Stoffwechsel des Organismus nicht ausreicht. Insbesondere der Einsatz von Formiatdehydrogenasen (FDH), Glucosedehydrogenasen (GDH) und Alkoholdehydrogenasen (ADH) ist zur enzymgekoppelten Cofaktorregenerierung etabliert (Wichmann et al., 2005). Welches Enzym zur Cofaktorregenerierung im Speziellen Verwendung findet, hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie z. B. der Cofaktorpräferenz und dem Temperatur- und pH-Optimum des Produktionsenzym.

Vorteil einer Regenerierung über die FDH ist neben dem kostengünstigen Cosubstrat Formiat, das thermodynamische Gleichgewicht der Reaktion (Popov et al., 1994). Allerdings akzeptieren FDHs üblicherweise nur die nicht phosphorylierte Form des Cofaktors (Tishkov et al., 1999), was nicht unbedingt der Cofaktorpräferenz von Cytochrom P450 Monooxygenasen entspricht. Mittlerweile stehen allerdings auch Varianten von FDHs zur Verfügung, die eine  $\text{NADP}^+$  Regenerierung ermöglichen (Seelbach et al., 1996; Andreadeli et al., 2008).

GDHs sind in der Regel NADPH abhängig (Kizaki et al., 2001). Auch diese Reaktion ist thermodynamisch stark begünstigt, da das gebildete Gluconolacton leicht zur korrespondierenden Säure hydrolysiert. Bei der Verwendung von GDHs bei Ganzzellbiotransformationen muss berücksichtigt werden, dass das Cosubstrat Glucose beim

Transport in die Zelle phosphoryliert wird. Das dabei entstehende Produkt Glucose-6-phosphat ist der GDH nicht mehr zugänglich, sodass die heterologe Expression spezieller Transportproteine (Weisser et al., 1995) bzw. die Permeabilisierung der Zellen unumgänglich ist (Kataoka et al., 1999).

Alternativ können Alkoholdehydrogenasen eingesetzt werden, die durch die Oxidation von Alkoholen zum entsprechenden Keton, meist 2-Propanol, eine Regenerierung des Cofaktors ermöglichen. Aufgrund der Reversibilität der Transferhydrierung ist diese Reaktion thermodynamisch nicht so stark begünstigt wie die Oxidation des Formiats oder der Glucose (Stillger et al., 2002). Allerdings zeigen Ganzzellbiokatalysatoren, die ADHs exprimieren, in der Regel eine hohe Toleranz gegenüber 2-Propanol (Schroer et al., 2007), die bei Verwendung schwer wasserlöslicher Substrate von Vorteil sein könnte.

Neben der enzymgekoppelten Cofaktorregenerierung kann der Cofaktor auch direkt elektrochemisch oder indirekt über Mediatoren regeneriert werden (Kohlmann et al., 2008). Elektrochemische Ansätze erlauben darüber hinaus den kompletten Verzicht des Redoxcofaktors, indem Strom direkt als Elektronenquelle oder über Mediatoren genutzt wird, um die Redoxäquivalente bereitzustellen (Nazor et al., 2006; Nazor et al., 2008). Allerdings können diese Methoden zur Bereitstellung der Elektronen bei weitem noch nicht so effizient genutzt werden wie NAD(P)H (Urlacher et al., 2004). Die Inkompatibilität bestimmter Mediatoren mit Enzymen erschwert zusätzlich die elektrochemische Cofaktorregenerierung (Hildebrand et al., 2009). Darüber hinaus kann die Redoxcofaktorabhängigkeit P450 katalysierter Reaktionen umgangen werden, indem man sich den *peroxide shunt pathway* zu Nutze macht (vgl. Kapitel 1.2.1). Hierfür müssen jedoch starke Oxidationsmittel, wie Wasserstoffperoxid, eingesetzt werden, die einen starken inaktivierenden Effekt auf die Cytochrom P450 Monooxygenase haben (Coon et al., 1996).

### **1.3.2.3 Sauerstoffabhängigkeit**

Genauso wie der Redoxcofaktor wird Sauerstoff mindestens äquimolar für P450 katalysierte Hydroxylierungen benötigt. In wässrigen Lösungen zeigt Sauerstoff bei Luftsättigung nur eine geringe Löslichkeit von 250  $\mu\text{M}$  (Mutzall, 1993). Sollte der Sauerstoffverbrauch der Reaktion höher sein als der Sauerstofftransfer von der Luft ins Reaktionsmedium, so liegt eine Sauerstofftransportlimitierung vor. Gegebenenfalls sind dann reaktionstechnische Maßnahmen wie Begasen nötig, um eine effiziente Sauerstoffversorgung zu gewährleisten.

#### 1.3.2.4 Redoxpartner

Abgesehen von den Fusionsproteinen der Klasse III und IV (vgl. Kapitel 1.2.2) werden bei P450 katalysierten Hydroxylierung weitere Proteinkomponenten für den Elektronentransport benötigt. Eine heterologe Expression der P450 mit den natürlichen Redoxpartnern ist dabei aus verschiedenen Gründen nicht immer möglich. So können die Redoxpartner einer bestimmten P450 noch nicht bekannt sein oder aber deren heterologe Expression kann problematisch sein. Die Wahl eines nicht natürlichen Redoxpartners ist dabei nicht immer einfach, da oft unklar ist, welche Redoxpartner für die Elektronenversorgung welcher CYP eingesetzt werden können. Am Erfolg versprechendsten ist die Wahl eines Redoxpartners der gleichen Klasse (Hannemann et al., 2007). Darüber hinaus kann die Wahl der Elektronenpartner die Gesamthydroxylierungsaktivität entscheidend beeinflussen, wie Untersuchungen zur CYP106A2 zeigen (Ruijssenaars et al., 2007). Wird Putidaredoxin und Putidaredoxin Reduktase als Redoxpartner bei dieser P450 eingesetzt, so ist die Aktivität um ein Vielfaches geringer, als bei der Verwendung eines Eisen-Schwefel Proteins aus *Bacillus subtilis*.

#### 1.3.2.5 Substratlöslichkeit

Bei typischen Substraten der P450 handelt es sich um schwerwasserlösliche Substanzen, deren geringe Löslichkeit auch die Gesamthydroxylierungsaktivität der CYP limitieren kann. Um die geringe Substratlöslichkeit überwinden zu können, müssen geeignete Strategien angewendet werden. So kann die Zugabe von Lösungsvermittlern, wie Wasser-mischbaren organischen Lösungsmitteln oder ionische Flüssigkeiten (IL) zur Verbesserung der Substratlöslichkeit beitragen. Üblicherweise werden kurzkettige Alkohole oder DMSO zu diesem Zweck eingesetzt (Jeromin et al., 2005). Ein löslichkeitsverbessernder Effekt tritt in der Regel erst bei Konzentrationen größer 10 vol% auf. Bei dieser Konzentration kann allerdings ein negativer Einfluss des Cosolvens auf den Biokatalysator nicht ausgeschlossen werden. Neben der Denaturierung des Produktionsenzymys können organische Lösungsmittel den Ganzzellbiokatalysator schädigen, indem sie die Membranfluidität erhöhen und so die Membran zum Quellen bringen und membranständige Proteine denaturieren (Sikkema et al., 1995; Weber et al., 1996). Alternativ zu Cosolventien können Cyclodextrine eingesetzt werden, die als zyklische Oligosaccharide hydrophobe Substanzen in ihrem Inneren aufnehmen (Hesselink et al., 1989) und so deren Löslichkeit erhöhen. Eine weitere Alternative ist der Einsatz von Zweiphasensystemen. Die zweite Phase wird durch ein nicht Wasser-mischbares Lösungsmittel oder eine IL gebildet und dient als Substratreservoir. Der Biokatalysator befindet sich in der wässrigen Phase und konvertiert das in dieser Phase vorliegende Substrat in das Produkt. Das gebildete Produkt verteilt sich anhand seines

Verteilungskoeffizienten zwischen organischer und wässriger Phase. Zweiphasensysteme sind vor allem dann von Vorteil, wenn das Substrat oder Produkt einen toxischen oder inhibierenden Effekt auf den Biokatalysator haben, da das Substrat bzw. Produkt nur in geringen Konzentrationen in der wässrigen Phase verbleibt (Carrea, 1984).

Bei Ganzzellbiotransformationen kann zusätzlich zur geringen Substratlöslichkeit der Substrattransport in die Zelle die Reaktion limitieren. Apolare Substanzen, wie beispielsweise Steroide, gelangen durch Diffusion in die Zelle (Mendel, 1989). Die Diffusionsgeschwindigkeit hängt dabei von der Membranstärke und der Substratkonzentration im Reaktionsmedium ab, sodass eine Substrattransportlimitierung ebenfalls durch eine erhöhte Substratlöslichkeit oder durch die Permeabilisierung der Zellmembran überwunden werden kann.

## 2 Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte anhand dreier verschiedener Cytochrom P450 Monooxygenasen ein grundlegendes Verständnis für die biotechnologische Anwendung von Cytochrom P450 Monooxygenase katalysierten Reaktionen erlangt werden. Durch systematische Parameterstudien sollten potentielle Limitierungen identifiziert und überwunden werden und eine effizientere Anwendung dieser Enzyme ermöglicht werden. Aufgrund der Cofaktorabhängigkeit und der Beteiligung mehrerer Proteinkomponenten wurden ganze Zellen rekombinanter Hefen und Bakterien als Biokatalysator eingesetzt, die die P450 exprimieren. Jeweils eine P450 aus den Klassen 1 – 3 des Elektronentransportsystems, wovon zwei CYPs bakteriellen Ursprungs sind, wurden eingehend charakterisiert.

Als Beispiel einer autarken P450, die keine weiteren Elektronentransportkomponenten zur Hydroxylierung benötigt, wurde eine Variante der CYP102A1 aus *B. megaterium* herangezogen. Dieses Enzym wurde in *E. coli* heterolog exprimiert und die Hydroxylierung des Terpens  $\beta$ -Jonon untersucht.

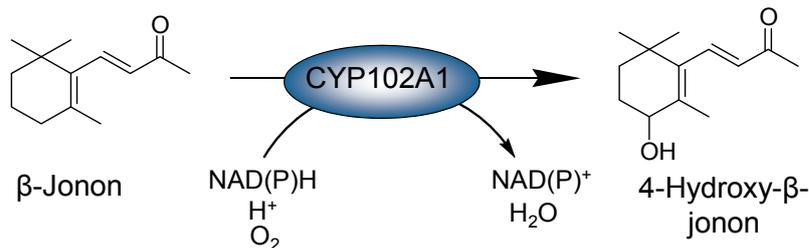


Abbildung 2.1: Hydroxylierung von  $\beta$ -Jonon katalysiert durch eine CYP102A1 Variante

Bei der humanen CYP21 handelt es sich um eine mikrosomale P450, die membranassoziiert vorliegt und für den Elektronentransport eine FAD und FMN abhängige Reduktase benötigt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein *Schizosaccharomyces pombe* Stamm, der dieses Enzym exprimiert, reaktionstechnisch untersucht.

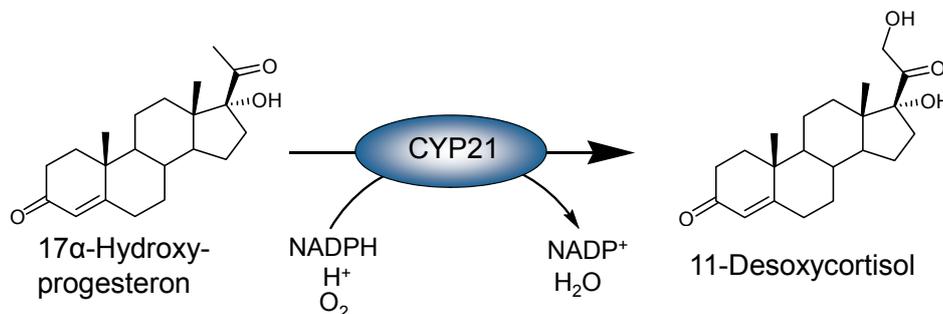
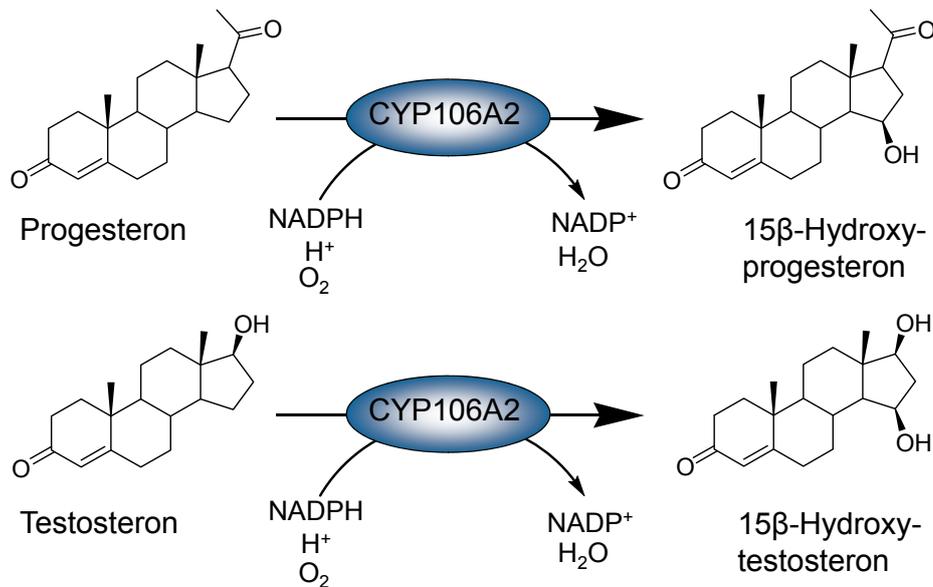


Abbildung 2.2: CYP21 katalysierte Bildung von 11-Desoxycortisol

Anhand der bakteriellen CYP106A2 wurde die 15 $\beta$ -Hydroxylierung von Progesteron und Testosteron untersucht. Dieses Enzym benötigt zur Bereitstellung der Elektronen neben einer FAD abhängigen Reduktase noch ein Eisen-Schwefel Protein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die CYP106A2 gemeinsam mit den Elektronentransportkomponenten bovines Adrenodoxin und der bovinen Adrenodoxinreduktase in *E. coli* heterolog exprimiert.



**Abbildung 2.3: 15 $\beta$ -Hydroxylierung von Progesteron und Testosteron durch die CYP106A2**

Folgende Parameter sollten im Hinblick auf eine mögliche Limitierung im Detail untersucht werden:

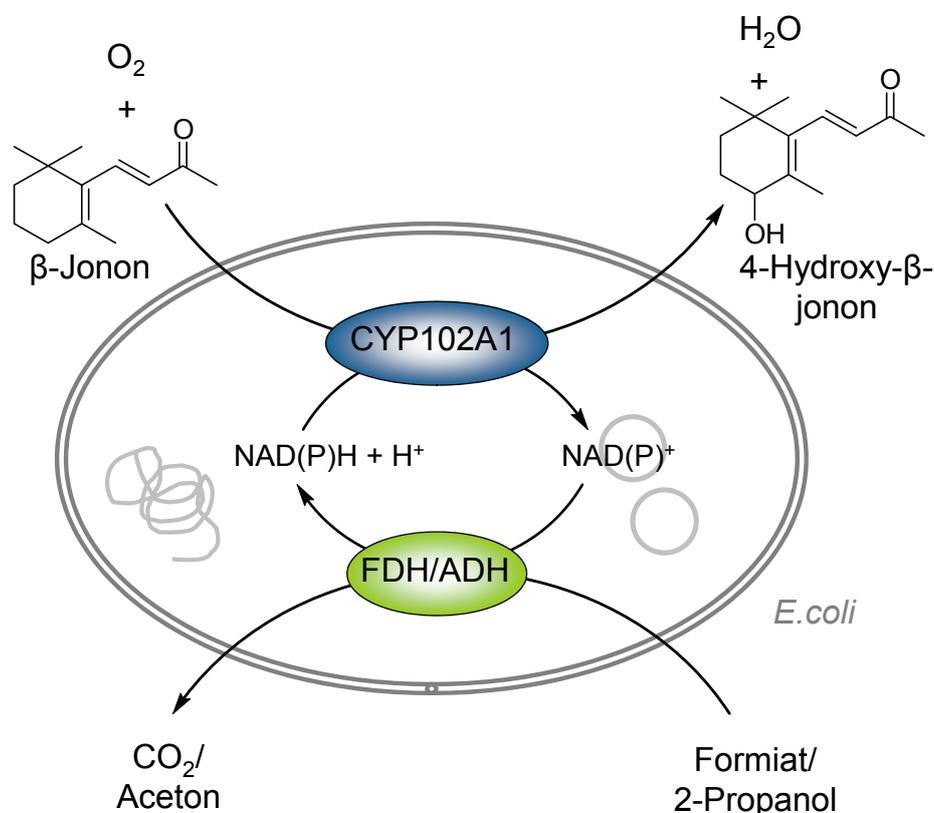
- Sauerstoffversorgung: bei P450 katalysierten Reaktionen wird Sauerstoff mindestens äquimolar benötigt. Aufgrund der geringen Sauerstofflöslichkeit in wässrigen Medien kann eine eventuelle Limitierung durch unzureichende Sauerstoffversorgung nicht ausgeschlossen werden.
- Cofaktorverfügbarkeit: die Redoxcofaktoren NAD(P)H dienen zur Bereitstellung von Elektronen. Neben der Implementierung einer enzymgekoppelten Cofaktoregenerierung sollte untersucht werden, ob die Cofaktorversorgung die Biotransformationen limitiert.
- Substratlöslichkeit: sowohl Terpene als auch Steroide sind schwer wasserlösliche Substanzen, sodass die geringe gelöste Substratkonzentration die Hydroxylierungsaktivität beeinträchtigen könnte. Daher wurde die Zugabe von Löslichkeitsvermittlern untersucht. Darüber hinaus könnten das Substrat und das Produkt einen inhibierenden bzw. toxischen Effekt auf den Biokatalysator haben und der

Einfluss des Substrats und Produkts auf die Hydroxylierungsaktivität wurde untersucht.

- Substrattransport in die Zelle: Der Transport apolarer Substanzen über die Membran kann die Gesamtaktivität von Ganzzellbiotransformationen ebenfalls limitieren. Durch Erhöhung der Substratlöslichkeit oder durch Permeabilisieren der Zellmembran könnte eine mögliche Transportlimitierung überwunden werden.

Nach der Identifizierung der Limitierungen der einzelnen Reaktionen sollten diese gezielt durch reaktionstechnische Strategien überwunden werden um die biotechnologische Anwendung der untersuchten P450 gezielt zu verbessern.

### 3 CYP102A1 aus *Bacillus megaterium*



**Abbildung 3.1: Schema des Ganzzellbiokatalysators zur Hydroxylierung von  $\beta$ -Jonon**

Bei der CYP102A1 (P450-BM3) aus *B. megaterium* handelt es sich um eine der am besten untersuchten Monooxygenasen. Deren ursprüngliche Funktion, die Hydroxylierung von Fettsäuren wurde bereits 1974 beschrieben (Miura et al., 1974). Mit Aktivitäten größer  $1500 \text{ min}^{-1}$  zählt dieses Enzym zu den aktivsten Cytochrom P450 Monooxygenasen (Li et al., 1991). Des Weiteren ist die CYP102A1 das erste bekannte lösliche Fusionsprotein, das alle zur Hydroxylierung benötigten Komponenten (FAD und FMN abhängige Reduktasedomäne und Häm-domäne) in einer einzigen Polypeptidkette vereint. Durch Methoden des *protein engineering*s wurden zahlreiche Varianten mit veränderter Substratspezifität entwickelt (Li et al., 2000; Appel et al., 2001; Glieder et al., 2002; Landwehr et al., 2006). So akzeptiert die Tripel-Variante A74G F87V L188Q Alkane, wie Oktan, Aromaten, wie Naphthalen, heterozyklische Verbindungen, wie Quinolin und auch Alizyklen, wie Jononderivate als Substrat (Appel et al., 2001). Jonone und insbesondere auch deren hydroxylierten Derivate sind von großem Interesse für die Duft- und Aromastoffindustrie (Krasnobajew, 1984) und zur Synthese von Carotinoiden von Bedeutung (Haag et al., 1980; Eschenmoser et al., 1981; Brenna et al., 2002). Die Tripel-

Variante hydroxyliert  $\beta$ -Jonon regioselektiv in Position 4, wobei ein geringer Enantiomerenüberschuss von 39 % in Präferenz für das (*R*)-Enantiomer erreicht wird. Die katalytische Aktivität ist mit einem Wert von  $90 \text{ min}^{-1}$  allerdings um mehr als eine Größenordnung geringer als bei der Fettsäurehydroxylierung (Urlacher et al., 2006c). Durch das Hinzufügen zweier weiterer Mutationen in der Reduktasedomäne, ist es gelungen, die Cofaktorpräferenz von NADPH zu dem 10fach kostengünstigeren NADH zu ändern (Maurer et al., 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Fünffachvariante A74G F87V L188Q R966D W1046S gemeinsam mit einem weiteren Enzym zur Cofaktorregenerierung in *E. coli* exprimiert und die Hydroxylierung von  $\beta$ -Jonon bezüglich seiner Prozesseigenschaften untersucht. Die Cofaktorregenerierung wurde durch eine heterologe Coexpression der Formiatdehydrogenase (FDH) aus *Mycobacterium vaccae* 10 oder der Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (LbADH) realisiert.

### 3.1 Charakterisierung des Biokatalysators

Zunächst wurden die in dieser Arbeit verwendeten Stämme zur Hydroxylierung von  $\beta$ -Jonon konstruiert. Dazu wurden die beiden Plasmide, die die Gene für die CYP102A1 Variante und das Enzym zur Cofaktorregenerierung kodieren, einzeln nacheinander mittels Hitzeschockmethode in kompetente *E. coli* eingebracht (Hanahan, 1983). Zur Langzeitkultivierung wurden die rekombinanten Stämme als Glycerinkultur bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert, die jedes Mal als Ausgangspunkt für eine Kultivierung des Organismus diente. Eine präzise Bestimmung der Biokatalysatoraktivität ist für eine reaktionstechnische Charakterisierung von grundlegender Bedeutung. Daher wurde die Enzymaktivität anhand der zeitabhängigen Verfolgung der Produktbildungsrate mittels Gaschromatographie (GC) berechnet. Zur Trennung von (*R*)- und (*S*)-4-OH- $\beta$ -Jonon wurde nach erfolgreicher Herstellung einer Referenzsubstanz (Abb. 3.2) (Haag et al., 1980) eine Enantiomerenanalytik mittels Gaschromatographie entwickelt. Abbildung 3.3 zeigt ein Chromatogramm.

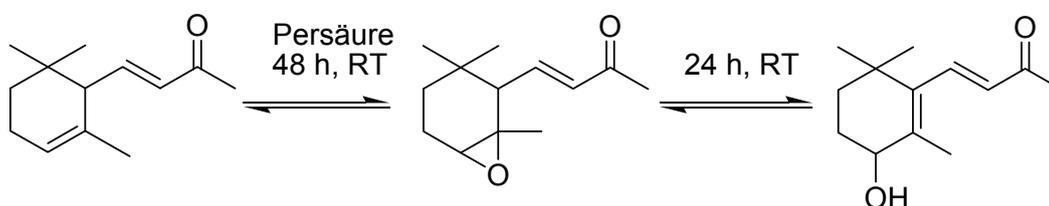
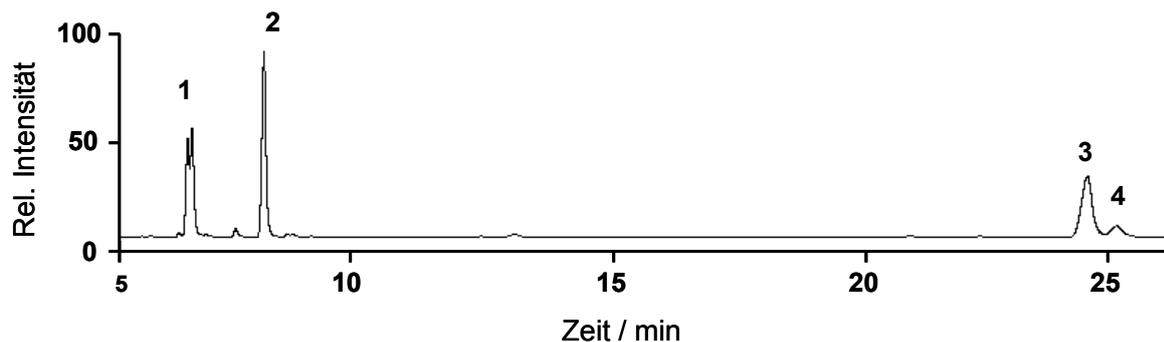


Abbildung 3.2: Synthese zur Herstellung von 4-OH- $\beta$ -Jonon nach Haag et al. (1980)

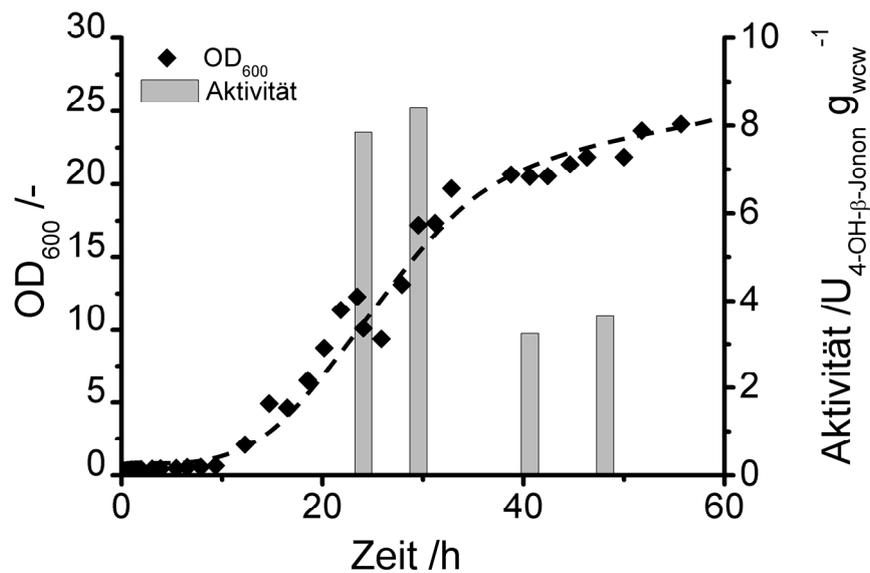


**Abbildung 3.3: GC-Chromatogramm der Trennung von (R)- und (S)-4-OH-β-Jonon**

1: α-Jonon (Interner Standard - IS), 2: β-Jonon, 3: (R)-4-OH-β-Jonon, 4: (S)-4-OH-β-Jonon

### 3.1.1 Kultivierung des Biokatalysators

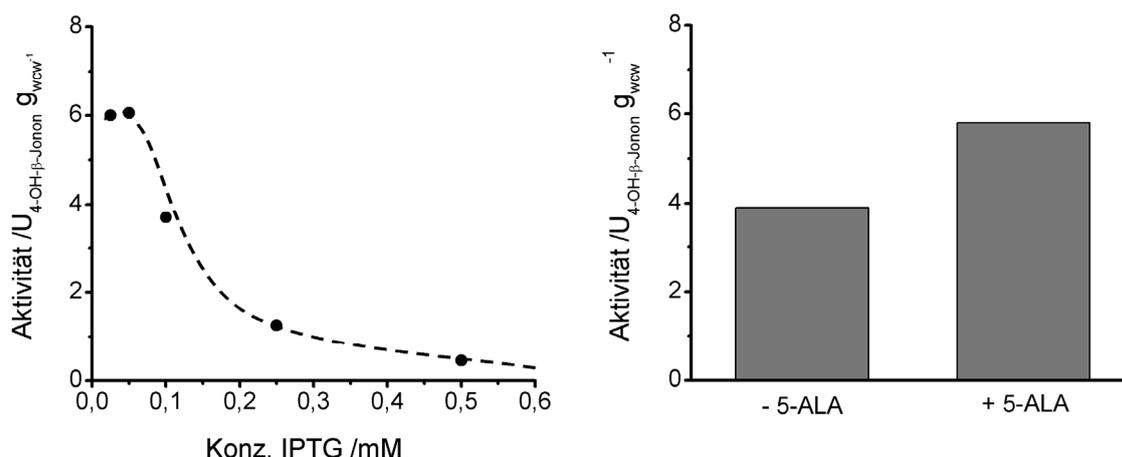
Zur effizienten Überexpression der CYP102A1 ausgehend von pET28a-Vektoren wurde bereits ein Fermentationsprotokoll entwickelt (Pflug et al., 2007). Dabei führte eine Kultivierung bei 30 °C unter Verwendung von Glycerin als C-Quelle zu den höchsten P450 Expressionsraten. Für die Kultivierung des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Organismus wurde dieses Protokoll adaptiert. Neben dem Wachstum des Biokatalysators unter den gegebenen Kultivierungsbedingungen wurde untersucht, zu welchem Zeitpunkt der Kultivierung die gewünschte Hydroxylierungsaktivität am höchsten ist (Abb. 3.4). Nach etwa 10 h begann die exponentielle Wachstumsphase des rekombinanten *E. coli* Stammes. Das Wachstum verlangsamte sich nach 40 h und erreichte nach 55 h eine maximale OD<sub>600</sub> von 24. Zur Bestimmung der Hydroxylierungsaktivität wurde zu gegebenen Zeitpunkten ein Aliquot des Kultivierungsmediums entnommen, die Zellen durch Zentrifugation geerntet und anschließend deren Hydroxylierungsaktivität bestimmt. Innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase zwischen 24 und 30 Stunden wurde die höchste Aktivität von rund 8,5 U<sub>4-OH-β-Jonon</sub> g<sub>wcw</sub><sup>-1</sup> beobachtet. Danach sank die Aktivität auf die Hälfte. Um eine möglichst hohe Aktivität zu erreichen, sollte die Kultivierung daher nicht länger als 30 h dauern.



**Abbildung 3.4: Wachstum und Aktivität des *E. coli* Stammes mit CYP102A1 Variante in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer**

Kultivierung: 1 L Schüttelkolben, V = 200 mL, T = 30 °C, 160 rpm, TB Medium mit 0,05 mM IPTG induziert; Aktivitätsbestimmung: 250 mL Erlenmeyerkolben, V = 25 mL, T = 30 °C, 200 rpm, 50 mM KP<sub>i</sub> Puffer pH 6, 2 g L<sup>-1</sup> *E. coli* CYP102A1 + FDH, 1 mM β-Jonon (in 1 vol% EtOH vorgelöst), 50 mM Natriumformiat

Zusätzlich wurde die optimale Konzentration an Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG), das zum Induzieren der Enzymexpression benötigt wird, bestimmt (Abb. 3.5). Die höchste Aktivität wurde bei einer geringen Induktorkonzentration von 0,025 – 0,05 mM verzeichnet. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass bei höherer IPTG-Konzentration inaktives Protein in Form von *inclusion bodies* gebildet wird. Des Weiteren wurde die Zugabe der 5-Aminolevulinsäure (5-ALA), der Vorstufe des Häms, während der Kultivierung des rekombinanten *E. coli* Stammes untersucht. Da eine 50 %ige Aktivitätssteigerung in Gegenwart von 5-ALA beobachtet wurde, ist die Zugabe dieser Substanz während der Kultivierung vorteilhaft.



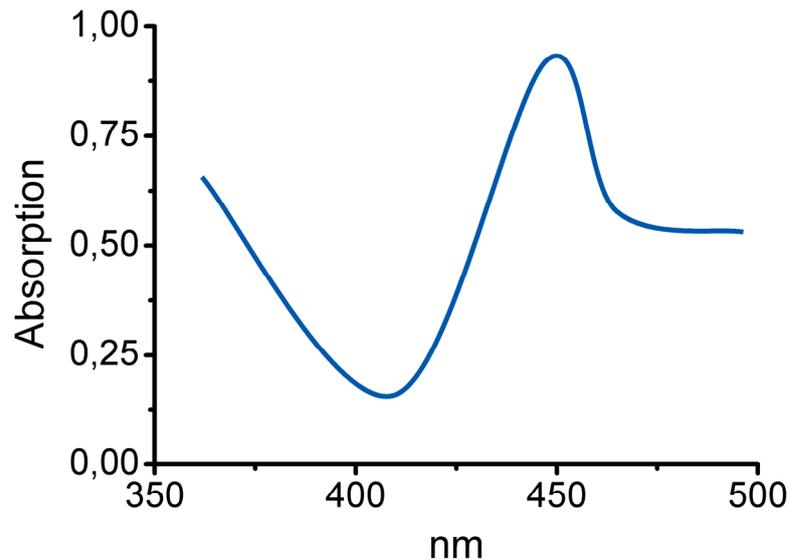
**Abbildung 3.5: Einfluss der Konzentration von IPTG (links) und 5-Aminolevulinsäure (rechts) während der Kultivierung auf die Aktivität der CYP102A1 Variante**

Reaktionsbedingungen: Untersuchungen zum IPTG Einfluss bei der Kultivierung: 1 L Erlenmeyerkolben, V = 200 mL, T = 30°C, 160 rpm, TB Medium

Reaktionsbedingungen Untersuchungen zum Einfluss der 5-ALA: Kultivierung: 1 L Erlenmeyerkolben, V = 200 mL, T = 30°C, 160 rpm, TB Medium, mit 0,05 mM IPTG induziert, 0,5 mM 5-ALA

Aktivitätsbestimmung: 250 mL Erlenmeyerkolben, V = 25 mL, T = 30 °C, 200 rpm, 50 mM KP<sub>i</sub> Puffer pH 6, 2 g L<sup>-1</sup> *E. coli* CYP102A1 + FDH, 1 mM β-Jonon (in 2,5 vol% EtOH vorgelöst), 50 mM Natriumformiat

Darüber hinaus konnte mit Hilfe der CO-Differenzspektroskopie die CYP102A1 Konzentration des eingesetzten Ganzzellbiokatalysators bestimmt werden. Der reduzierte, Kohlenmonoxid-gebundene Komplex jeder Cytochrom P450 Monooxygenase zeigt ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 450 nm, über welches die Konzentration bestimmt werden kann (Abb. 3.6) (Omura et al., 1964). Da *E. coli* selbst über keine eigene P450 verfügt, gibt der Wert die Menge an CYP102A1 wieder. Unter den gegebenen Kultivierungsbedingungen betrug die CYP102A1 Konzentration rund 50 nmol pro Gramm Biomasse und ist damit um den Faktor 5 geringer als bei Pflug et al. (2007) beschrieben. Die geringere Menge an CYP102A1 liegt vermutlich darin begründet, dass neben der P450 noch ein weiteres Enzym heterolog exprimiert wird.



**Abbildung 3.6 CO-Differenzspektrum von Cytochrom P450 Monoxygenasen**

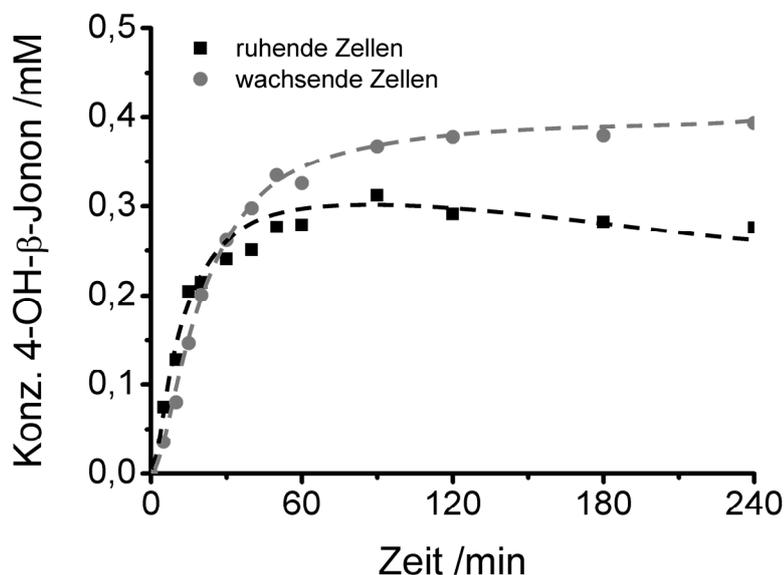
Um eine hohe Hydroxylierungsaktivität zu erhalten, sollte der rekombinante Organismus im Schüttelkolben unter den folgenden Bedingungen kultiviert werden:

- TB Medium, Glycerin als C-Quelle, 0,5 mM 5-ALA, T = 30 °C
- Induktion der Enzymexpression: 0,05 mM IPTG nach 3 h Kultivierungsdauer
- Dauer der Fermentation: 30 h

### 3.1.2 Charakterisierung der Ganzzellbiotransformation

Neben wachsenden Zellen, können auch ruhende Zellen als Biokatalysator eingesetzt werden. Dabei wird die Biotransformation getrennt von der Kultivierung der Zellen, unter Bedingungen, die keine Vermehrung des rekombinanten Organismus erlauben, durchgeführt. Anstelle eines Kultivierungsmediums, wird Puffer ohne Nährstoffe als Reaktionsmedium verwendet. Dies kann beispielsweise die Nebenproduktbildung reduzieren, vor allem aber erlauben wachstumsentkoppelte Biotransformationen die gezielte Untersuchung der gewünschten Reaktion, ohne dass wachstumsbedingte Einflüsse zum Tragen kommen (Ähle et al., 2008). Experimentell bedeutet dies, dass nach der Kultivierung der Zellen, die Biomasse geerntet und gewaschen werden müssen, bevor die Zellen zur Biotransformation eingesetzt werden. Ob sich ruhende Zellen prinzipiell als Biokatalysator zur Hydroxylierung von  $\beta$ -Jonon eignen, muss gezielt überprüft werden. Abbildung 3.7 vergleicht die Bildung des gewünschten Produkts 4-OH- $\beta$ -Jonon von wachsenden Zellen mit ruhenden Zellen. Zu Beginn der Reaktion waren keine Unterschiede in der Produktbildung zu beobachten, allerdings brach der Umsatz bei der Verwendung von ruhenden Zellen etwas früher ein. Nach 240 min Reaktionszeit

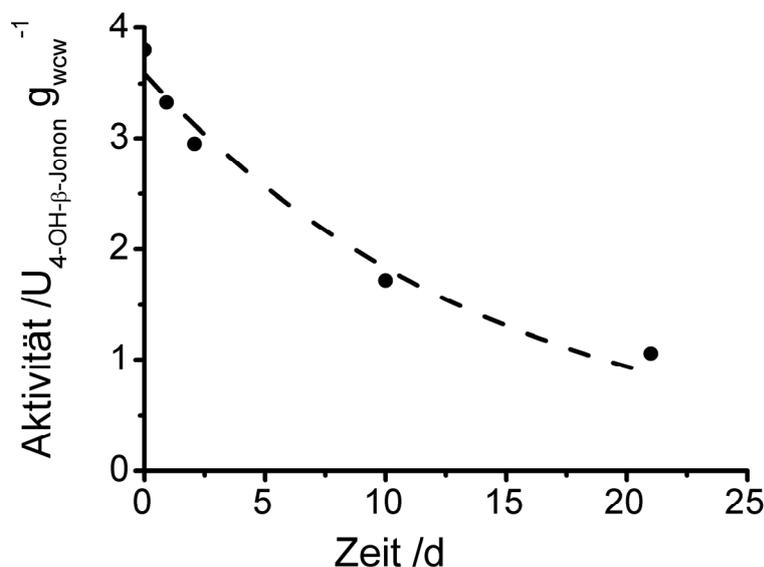
standen 30 % Umsatz beim Einsatz von ruhenden Zellen etwa 38 % Umsatz bei wachsenden Zellen gegenüber. Diese Ergebnisse zeigen, dass ruhende Zellen für diese Anwendung als Biokatalysator verwendet werden können, dass aber mit einem geringeren Umsatz als unter Bedingungen, die ein Wachstum erlauben, zu rechnen ist.



**Abbildung 3.7: CYP102A1 katalysierte Hydroxylierung von  $\beta$ -Jonon mit ruhenden und wachsenden Zellen**

Reaktionsbedingungen: 250 mL Erlenmeyerkolben,  $V = 25$  mL,  $T = 30$  °C, 200 rpm, 50 mM  $KP_i$  Puffer pH 6 (ruhende Zellen) /TB Medium (wachsende Zellen),  $2$  g  $L^{-1}$  *E. coli* CYP102A1 + FDH, 1 mM  $\beta$ -Jonon (in 1 vol% EtOH vorgelöst), 50 mM Natriumformiat

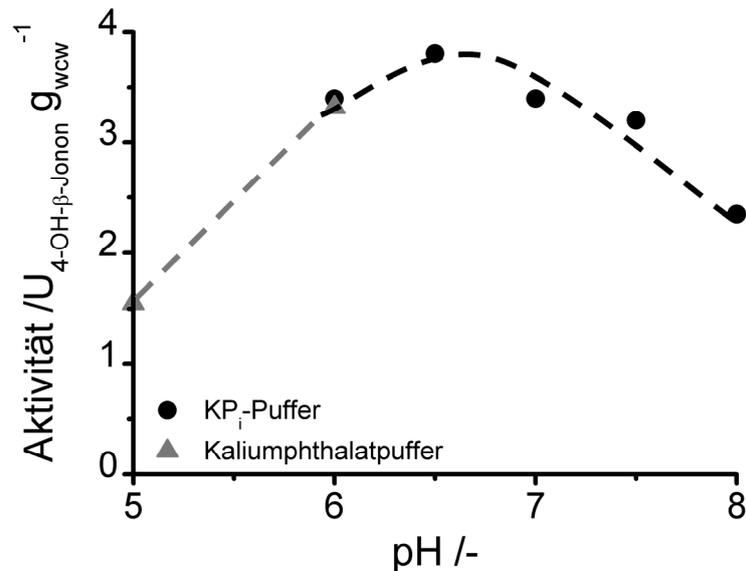
Zur weiteren Charakterisierung ruhender Zellen, wurde die Lagerstabilität bereits induzierter Zellen untersucht. Eine stabile Lagerung bereits induzierter Zellen vereinfacht nicht nur die Versuchsplanung, da die Biotransformation nicht unmittelbar nach der Kultivierung durchgeführt werden muss, sie erlaubt auch die Kultivierung des rekombinanten Organismus im größeren Maßstab, sodass die Versorgung an Biokatalysator für einen längeren Zeitraum sichergestellt werden kann. Eine gängige Methode ist die Lagerung des Biokatalysators als Zellsuspension bei 4 °C. Zur Bestimmung der Stabilität wurde der zeitabhängige Verlauf der CYP102A1 Aktivität der Zellen untersucht (Abb. 3.8). Unter den gegebenen Lagerungsbedingungen beläuft sich die Halbwertszeit der gewünschten Hydroxylierungsaktivität auf 10 Tage. Um Aktivitätsverluste zu minimieren, sollte die Biotransformation binnen weniger Tage nach der Kultivierung des rekombinanten *E. coli* Stammes durchgeführt werden.



**Abbildung 3.8: Lagerstabilität der induzierten *E. coli* Zellen mit CYP102A1 Variante bei 4 °C als 20 %ige Zellsuspension**

Reaktionsbedingungen Lagerung: 20 %ige Zellsuspension, 50 mM KP<sub>i</sub> Puffer pH 6,5, T = 4 °C  
 Aktivitätsbestimmung: 250 mL Erlenmeyerkolben, V = 25 mL, T = 30 °C, 200 rpm, 50 mM KP<sub>i</sub> Puffer pH 6, 4 g L<sup>-1</sup> *E. coli* CYP102A1 + FDH, 1 mM β-Jonon (in 1 vol% EtOH vorgelöst), 50 mM Natriumformiat

Darüber hinaus beeinflusst auch das Reaktionsmedium und vor allem der pH-Wert die Aktivität des Ganzzellbiokatalysators. Dessen Einfluss auf die Hydroxylierungsaktivität wurde im Bereich pH 5 – 8 untersucht (Abb. 3.9). Zwischen pH 6 – 8 wurde Kaliumhydrogenphosphatpuffer (KP<sub>i</sub>) als Reaktionsmedium eingesetzt. Da dieser Puffer keine Pufferkapazität bei niedrigeren pH Werten aufweist, wurde die Biotransformation bei pH 5 in Kaliumphthalatpuffer durchgeführt. Um eventuelle Einflüsse der Puffersalze auszuschließen, wurde die Biotransformation in Gegenwart beider Puffer bei gleichen pH durchgeführt und die Aktivität verglichen. Dabei wurde eine vergleichbar hohe Aktivität des Ganzzellbiokatalysators in KP<sub>i</sub> und Kaliumphthalatpuffer festgestellt. Die höchste Aktivität lag bei pH 6,5, sodass die Hydroxylierung von β-Jonon bei diesem pH-Wert durchgeführt werden sollte.



**Abbildung 3.9: Einfluss des pH-Werts auf die Hydroxylierungsaktivität des *E. coli* Stammes mit CYP102A1 Variante**

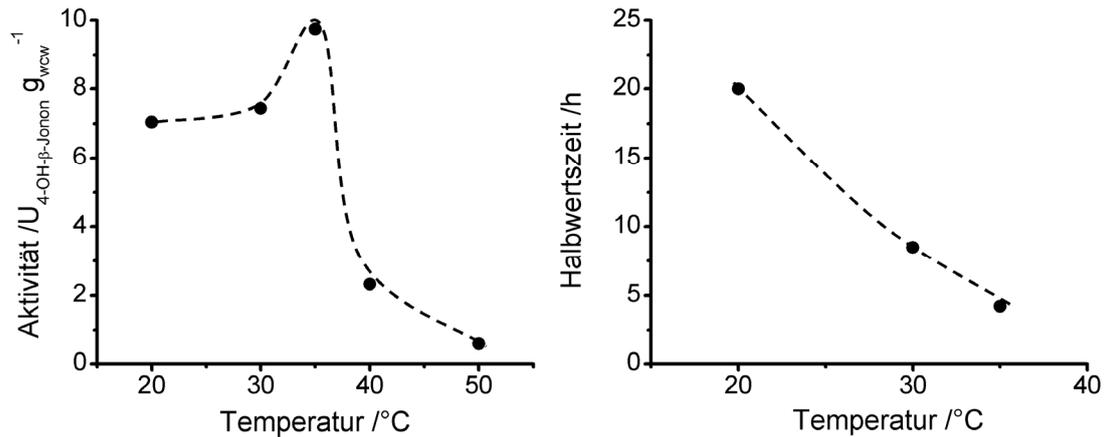
Reaktionsbedingungen: Aktivitätsbestimmung: 250 mL Erlenmeyerkolben, V = 25 mL, T = 30 °C, 200 rpm, 50 mM KP<sub>i</sub> Puffer (pH 6 – 8)/50 mM Kaliumphthalatpuffer (pH 5), 2 g L<sup>-1</sup> *E. coli* CYP102A1 + FDH, 1 mM β-Jonon (in 1 vol% EtOH vorgelöst), 50 mM Natriumformiat

Des Weiteren wurde der Einfluss der Temperatur auf die Aktivität und Stabilität des Biokatalysators bestimmt. Im Allgemeinen lässt sich der Einfluss der Temperatur auf die Aktivität durch die Arrhenius Gleichung beschreiben. Diese besagt, dass die Aktivität mit zunehmender Temperatur exponentiell steigt (Atkins, 1996).

$$k = Ae^{E_a/RT}$$

**Formel 3.1**

Diesem exponentiellen Anstieg der Aktivität stehen destabilisierende Effekte gegenüber, da Enzyme bei höheren Temperaturen leichter denaturieren und ihre Funktion verlieren. Daher muss bei der Bestimmung der optimalen Temperatur der Biotransformation immer sowohl die Aktivität als auch die Stabilität untersucht werden. Abbildung 3.10 zeigt den Einfluss der Temperatur auf die Aktivität und Stabilität des Biokatalysators. Ein exponentieller Anstieg der Aktivität wurde im Abschnitt von 20 – 35 °C beobachtet. Bei höherer Temperatur wurde wahrscheinlich aufgrund destabilisierender Effekte bereits eine geringere Aktivität verzeichnet. Daher wurden die Stabilitätsuntersuchungen nur bei Temperaturen zwischen 20 und 35 °C durchgeführt. Zur Bestimmung der Stabilität wurde der zeitabhängige Aktivitätsverlauf gemessen und daraus die Halbwertszeit berechnet. Bei 35 °C, bei der die maximale Aktivität des Biokatalysators festgestellt wurde, beträgt die Halbwertszeit nur 5 h. Selbst bei 20 °C ist die Halbwertszeit des Biokatalysators mit einem Wert von 20 h sehr gering. Dies verdeutlicht die geringe Stabilität der CYP102A1 Variante. Die Biotransformation sollte daher bei 20 °C durchgeführt werden.



**Abbildung 3.10: Einfluss der Temperatur auf die Aktivität (links) und Stabilität (rechts) des *E. coli* Stammes mit CYP102A1 Variante**

Reaktionsbedingungen Aktivitätsbestimmung: 250 mL Erlenmeyerkolben,  $V = 25$  mL, 200 rpm, 50 mM  $KP_i$  Puffer pH 6,5  $2 \text{ g L}^{-1}$  *E. coli* CYP102A1 + FDH, 1 mM  $\beta$ -Jonon (in 1 vol% EtOH vorgelöst), 50 mM Natriumformiat

Reaktionsbedingungen Stabilitätsuntersuchungen: 10 %ige Zellsuspension, 50 mM  $KP_i$  pH 6,5

## 3.2 Parameterstudien

Im Folgenden wurden gezielte Untersuchungen zur Ermittlung der Faktoren, die die Hydroxylierung von  $\beta$ -Jonon limitieren, durchgeführt. Neben der Sauerstoff- und Cofaktorversorgung, wurde insbesondere der Einfluss von Substrat und Produkt untersucht. Dabei wurde auch die Selektivität, mit der die Reaktion abläuft, berücksichtigt.

### 3.2.1 Sauerstoffversorgung

Vor der Durchführung experimenteller Messungen, sollte zunächst auf Basis theoretischer Grundlagen festgestellt werden, ob eine Sauerstofflimitierung überhaupt vorliegen kann. Eine Limitierung durch unzureichenden Sauerstoff ist nur unter der Voraussetzung gegeben, dass die Produktbildungsrate die maximale Sauerstofftransferrate (OTR) überschreitet. Unter den gegebenen Bedingungen, also im Schüttelkolben, der maximal zu 30 % befüllt ist und mit einer Geschwindigkeit von 200 rpm geschüttelt wird, beträgt der Sauerstofftransportkoeffizient ( $K_{La}$ )  $34,92 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  (Storhas, 2003). Neben dem  $K_{La}$  hängt die OTR auch von der maximal löslichen Sauerstoffkonzentration ( $c^*$ ) im Reaktionsmedium ab. Bei Luftsättigung sind höchstens 250  $\mu\text{M}$  Sauerstoff in Wasser löslich (Muttzall, 1993). Unter diesen Gegebenheiten ergibt sich eine maximale Sauerstofftransferrate (OTR) von  $3,14 \text{ mM h}^{-1}$ .

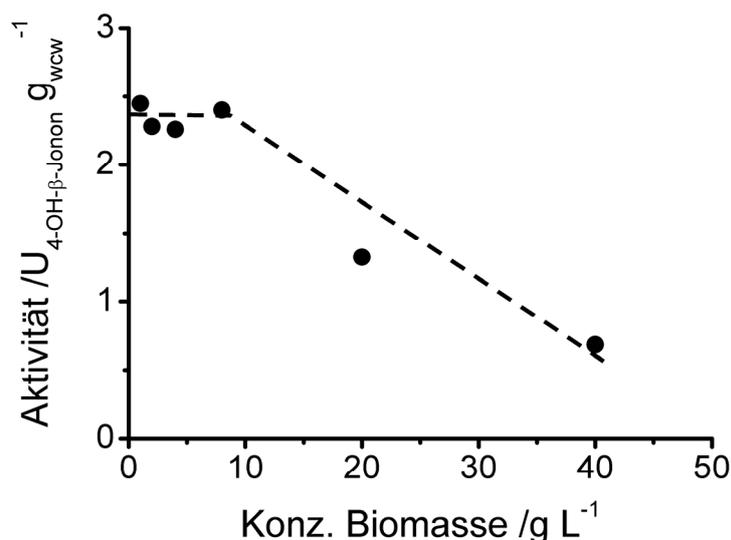
$$OTR = kLa(c^* - c)$$

**Formel 3.2**

Bei äquimolarem Sauerstoffbedarf einer Reaktion bedeutet dies, dass keine Sauerstofflimitierung vorliegt, solange die Produktbildungsrate  $3,14 \text{ mM h}^{-1}$  nicht überschreitet.

Aufgrund möglicher *uncoupling*-Effekte bei Cytochrom P450 Monooxygenase katalysierten Reaktionen (vgl. Kapitel 1.2.1), wird der Sauerstoff in größeren Mengen als das Substrat benötigt (Murataliev et al., 2008). Daher kann nicht automatisch von der Produktbildungsrate auf eine mögliche Sauerstofflimitierung geschlossen werden.

Bei der Hydroxylierung von  $\beta$ -Jonon beträgt die Produktbildungsrate bei einer Biokatalysatorkonzentration von  $4 \text{ g L}^{-1}$   $0,54 \text{ mM h}^{-1}$  und ist damit um den Faktor 5,7 geringer als die maximale Sauerstofftransferrate. Da der Grad der Entkopplung nicht bekannt ist und der Sauerstoffverbrauch auch von der Biomasse abhängig ist, kann eine Sauerstofflimitierung nicht ausgeschlossen werden und eine experimentelle Überprüfung muss erfolgen. Zu diesem Zweck wurde die Biotransformation unter identischen Bedingungen, aber in Gegenwart unterschiedlicher Biokatalysatorkonzentrationen durchgeführt und die Aktivität pro Gramm Biomasse verglichen (Abb. 3.11). Sinkt die Aktivität bezogen auf die Biokatalysatormenge mit zunehmender Biomasse, so liegt eine Sauerstofftransportlimitierung vor. Da ab einer Biokatalysatorkonzentration von  $8 \text{ g L}^{-1}$  die Aktivität abnahm, kommt die Sauerstofflimitierung bei mehr als  $8 \text{ g L}^{-1}$  Zellen zum Tragen. Die Produktbildungsrate erreicht dabei bei  $8, 20$  und  $40 \text{ g L}^{-1}$  Biomasse ein Maximum von rund  $1,6 \text{ mM h}^{-1}$ , die etwa um den Faktor 2 geringer als die maximale Sauerstofftransferrate ist. Geht man davon aus, dass der Sauerstoff nur zur P450 katalysierten Hydroxylierung eingesetzt wird und nicht für Stoffwechselaktivitäten des Organismus, wird für die Hydroxylierung von  $\beta$ -Jonon etwa doppelt so viel Sauerstoff wie Substrat benötigt. Dies entspricht einer Kopplungsrate von rund 50 %.

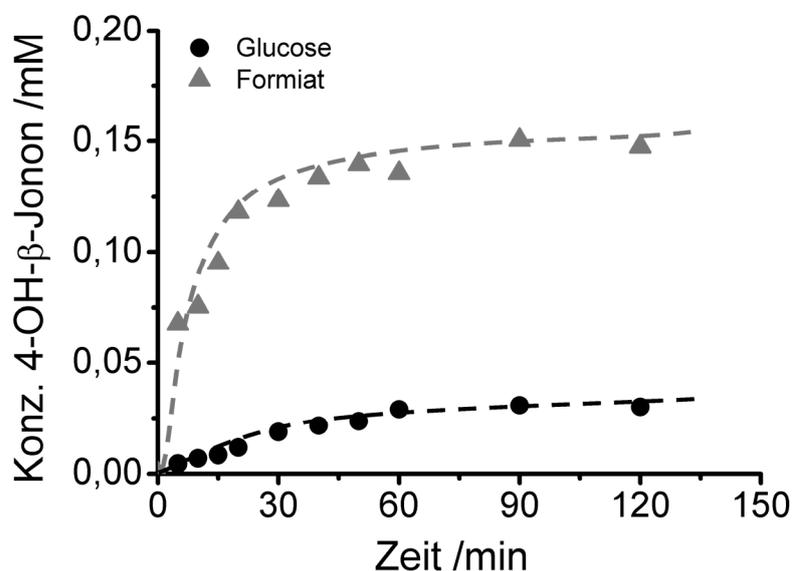


**Abbildung 3.11: Hydroxylierungsaktivität des *E. coli* Stammes mit CYP102A1 Variante in Gegenwart unterschiedlicher Biomassekonzentrationen**

Reaktionsbedingungen: 250 mL Erlenmeyerkolben,  $V = 25 \text{ mL}$ ,  $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ , 200 rpm, 50 mM  $\text{KPi}$ , Puffer pH 6,5, *E. coli* CYP102A1 + FDH, 1 mM  $\beta$ -Jonon (in 1 vol% EtOH vorgelöst), 50 mM Natriumformiat

### 3.2.2 Redoxcofaktorversorgung

Genauso wie Sauerstoff wird der Redoxcofaktor mindestens äquimolar für die Hydroxylierung von  $\beta$ -Jonon benötigt. Unter der Annahme, dass der doppelt so hohe Sauerstoffbedarf im Vergleich zur Substratkonzentration ausschließlich auf *uncoupling*-Effekte zurückzuführen ist, würde sich die Cofaktorversorgung ähnlich verhalten. 2 Mol NADPH wären nötig, um 1 Mol  $\beta$ -Jonon zu hydroxylieren. Um zu untersuchen, ob eine enzymgekoppelte Cofaktorregenerierung notwendig ist, oder eine Regenerierung über den Stoffwechsel des Bakteriums ausreicht, wurde die 4-OH- $\beta$ -Jononbildung in Gegenwart beider Regeneriermöglichkeiten verglichen (Abb. 3.12). Zur enzymgekoppelten Regenerierung wurde die FDH unter Oxidation von Formiat zu  $\text{CO}_2$  eingesetzt, während die Regenerierung des Redoxcofaktors über den Stoffwechsel durch die Zugabe von Glucose erfolgte. Sowohl bei der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit als auch beim Umsatz wurden in Gegenwart der enzymgekoppelten Cofaktorregenerierung deutlich bessere Werte erzielt. Während bei einer Cofaktorregenerierung über den Stoffwechsel weniger als 0,03 mM des gewünschten Produkts gebildet wurden, war dessen Konzentration bei der Regenerierung über die FDH fünfmal höher. Daher ist der Einsatz einer enzymgekoppelten Cofaktorregenerierung zur Gewährleistung einer ausreichenden Cofaktorversorgung unumgänglich.



**Abbildung 3.12: 4-OH- $\beta$ -Jononbildung bei Cofaktorregenerierung über die FDH bzw. über den Metabolismus des *E. coli* Stammes mit CYP102A1 Variante**

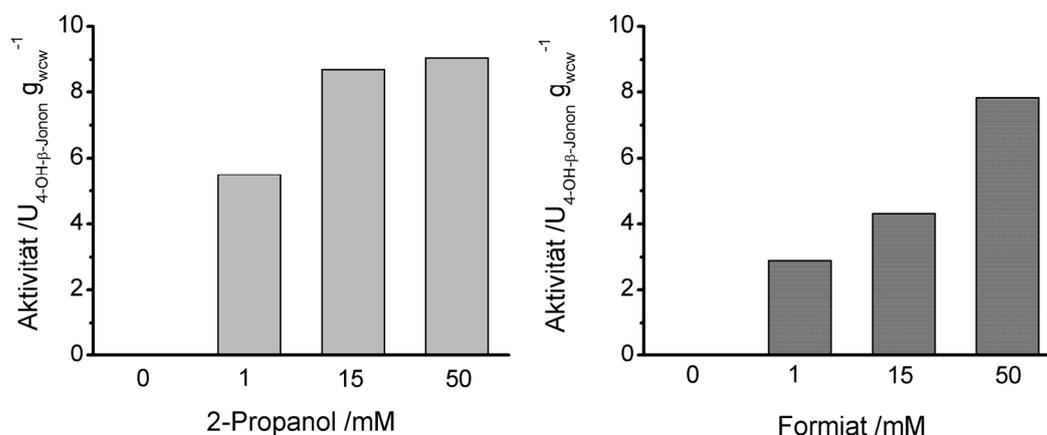
Reaktionsbedingungen: 250 mL Erlenmeyerkolben, V = 25 mL, T = 30 °C, 200 rpm, 50 mM  $\text{KPi}$  Puffer pH 6,5, 2 g  $\text{L}^{-1}$  *E. coli* CYP102A1 + FDH, 1 mM  $\beta$ -Jonon (in 1 vol% EtOH vorgelöst), 50 mM Natriumformiat/1,5 g Glucose

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Variante der CYP102A1 akzeptiert sowohl NADH als auch NADPH als Elektronenquelle (Maurer et al., 2005), sodass sowohl die *Lb*ADH als auch die FDH zur Cofaktorregenerierung eingesetzt werden können. Tabelle 3.1 vergleicht die Cofaktorspezifität des Wildtyps (WT) mit der Fünffachvariante.

**Tabelle 3.1: Michaelis Menten Konstante und Wechselzahl der CYP102A1 Variante und des Wildtyps für die Redoxcofaktoren (Maurer et al., 2005)**

Enzym	Wechselzahl / $K_{cat} \text{ min}^{-1}$	Michaelis Menten Konstante ( $K_M$ ) / $\mu\text{M}$
CYP102A1 WT		
NADH	2800	1400
NADPH	7930	2,5
CYP102A1 Variante		
NADH	14600	11,6
NADPH	5400	1,6

Um etwaige Informationen zu erhalten, ob die *Lb*ADH oder die FDH besser zur Cofaktorregenerierung geeignet ist, wurde der Einfluss der Cosubstratkonzentration auf die CYP102A1 Hydroxylierungsaktivität untersucht (Abb. 3.13). Ein direkter Vergleich der *Lb*ADH und FDH war aufgrund des unbekanntenen Expressionslevels beider Enzyme nicht möglich. Bei einer Regenerierung über die *Lb*ADH erreicht die Hydroxylierungsaktivität der CYP102A1 Variante bereits bei einem 15fachen Überschuss an Cosubstrat einen konstanten Wert, während ein Anstieg der Aktivität in Abhängigkeit der Formiatkonzentration im gesamten untersuchten Bereich beobachtet wurde. Bei einer Regenerierung über die *Lb*ADH sind geringere Cosubstratkonzentrationen nötig, um eine effiziente Hydroxylierung von  $\beta$ -Jonon zu erreichen.

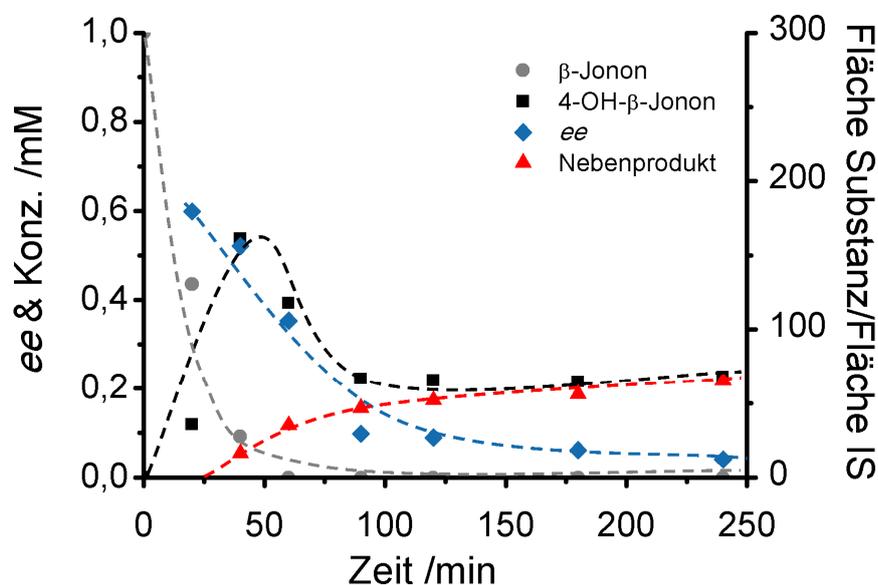


**Abbildung 3.13: Cosubstrateinfluss auf die Aktivität des *E. coli* Stammes mit CYP102A1 Variante**

Reaktionsbedingungen: 250 mL Erlenmeyerkolben,  $V = 25 \text{ mL}$ ,  $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ , 200 rpm, 50 mM  $\text{KPi}$  Puffer pH 6,5,  $2 \text{ g L}^{-1}$  *E. coli* CYP102A1 + FDH/ADH, 1 mM  $\beta$ -Jonon (in 1 vol% EtOH vorgelöst)

### 3.2.3 Bestimmung der Enantioselektivität

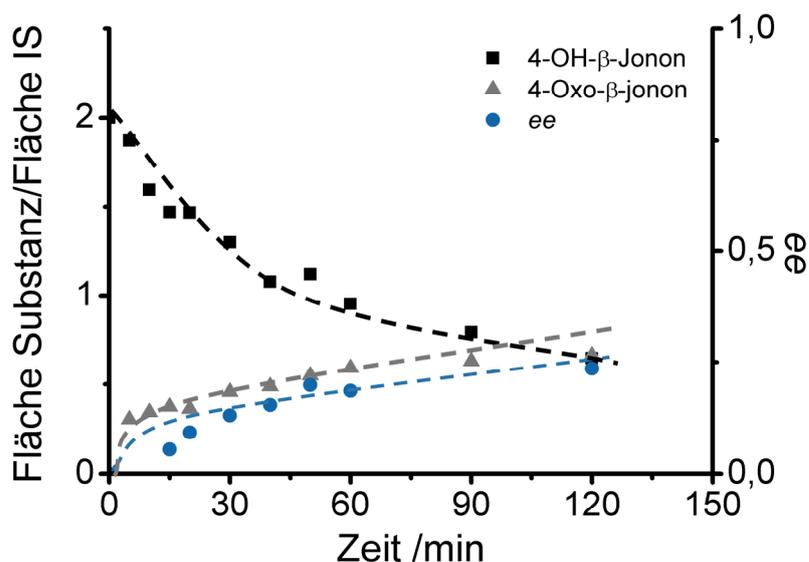
Die CYP102A1 katalysierte Hydroxylierung von  $\beta$ -Jonon läuft zwar regioselektiv aber nur mit einem geringen Enantiomerenüberschuss von 39 % für das (*R*)-Enantiomer ab. Die Bestimmung dieses Werts erfolgte am Ende der Biotransformation durch eine Messung des Drehwerts (Urlacher et al., 2006c). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten detaillierte Untersuchungen zur Enantioselektivität der Hydroxylierung von  $\beta$ -Jonon durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurde eine Enantiomerenanalytik für eine Trennung von (*R*)- und (*S*)-4-OH- $\beta$ -Jonon mittels Gaschromatographie entwickelt und der ee des Produkts während der Biotransformation bestimmt. Abbildung 3.14 zeigt den Enantiomerenüberschuss während des Reaktionsverlaufs. Zu Beginn der Biotransformation wurde ein ee von 60 % für das (*R*)-Enantiomer erreicht, der allerdings unter den gegebenen Reaktionsbedingungen im weiteren Reaktionsverlauf abnahm, bis ein nahezu racemisches Gemisch an 4-OH- $\beta$ -Jonon vorlag. Gleichzeitig wurde eine Konzentrationsabnahme des gewünschten Produkts beobachtet und ein weiterer Peak im Chromatogramm identifiziert. Die Fläche des Peaks der unbekannten Substanz, bezogen auf die Fläche des internen Standards (IS) ist im Diagramm dargestellt. Aufgrund des Reaktionsverlaufs wurde vermutet, dass dieses Nebenprodukt aus dem gewünschten Produkt 4-OH- $\beta$ -Jonon gebildet wird.



**Abbildung 3.14: 4-OH- $\beta$ -Jononbildung und dessen ee im Verlauf der CYP102A1 katalysierten Ganzzellbiotransformation**

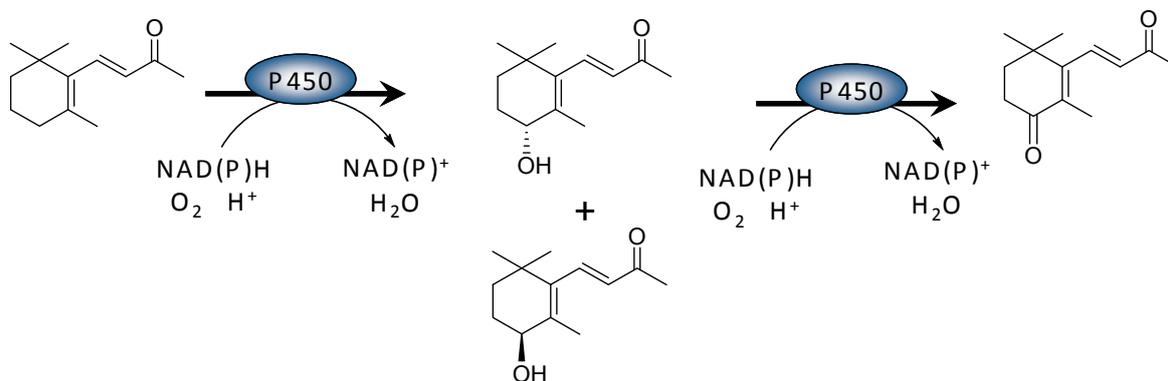
Reaktionsbedingungen: 250 mL Erlenmeyerkolben, V = 25 mL, T = 30 °C, 200 rpm, 50 mM  $KP_i$  Puffer pH 6,5 20 g L<sup>-1</sup> *E. coli* CYP102A1 + FDH, 1 mM  $\beta$ -Jonon (in 1 vol% EtOH vorgelöst), 50 mM Natriumformiat

Um nähere Hinweise zur Nebenproduktbildung zu erhalten, wurde die Struktur der unbekannt Substanz mittels Kernresonanzspektroskopie (NMR) identifiziert. Zu diesem Zweck wurde racemisches 4-OH- $\beta$ -Jonon in Gegenwart des Biokatalysators für mehrere Tage inkubiert und anschließend das Nebenprodukt durch Extraktion vom Reaktionsgemisch abgetrennt und durch eine präparative Dünnschichtchromatographie weiter aufgereinigt. Die so erhaltenen 8 mg der unbekannt Substanz wurden mit Hilfe der Kernresonanzspektroskopie zur Strukturaufklärung analysiert. Die Durchführung von  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$ -NMR Experimenten ermöglichte eine eindeutige Strukturaufklärung des Nebenprodukts. Im  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum wurde ein Signal bei 189 ppm beobachtet, dass auf eine weitere Carbonylgruppe im Molekül schließen lässt. Zusammen mit der Analyse des  $^1\text{H}$ -NMR Spektrums konnte die unbekannt Substanz als 4-Oxo- $\beta$ -jonon, das Oxidationsprodukt des 4-OH- $\beta$ -Jonons identifiziert werden (vgl. Kapitel 8.2.6). Um festzustellen, ob es sich dabei um eine Autoxidation oder um eine enzymatisch katalysierte Oxidation handelt, wurde der Reaktionsverlauf in Gegenwart von rekombinanten *E. coli* Stämmen, die die CYP102A1 Variante exprimieren und in Abwesenheit des Biokatalysators verfolgt. Um zusätzlich feststellen zu können, ob möglicherweise ein anderes Enzym die Oxidation katalysiert, wurde der Reaktionsverlauf in Gegenwart des *E. coli* Stamms, der nur die *LbADH* bzw. die *FDH* zur Cofaktorregenerierung exprimiert, untersucht. In beiden Fällen, in Abwesenheit der CYP102A1 Variante und in Abwesenheit des Ganzzellbiokatalysators konnte die Bildung des 4-Oxo- $\beta$ -jonons nicht festgestellt werden. Abbildung 3.15 zeigt den Reaktionsverlauf in Gegenwart der CYP102A1 Variante. Da keine Kalibrierung des 4-Oxo- $\beta$ -jonons vorgenommen wurde, ist die Fläche der Substanzen bezogen auf die Fläche des IS aufgetragen worden. Dabei war eine deutliche Abnahme der Konzentration an 4-OH- $\beta$ -Jonon über den gesamten Reaktionsverlauf ersichtlich. Gleichzeitig wurde 4-Oxo- $\beta$ -jonon gebildet. Dieser Versuch zeigt, dass die Monooxygenase selbst die Oxidation des Alkohols zum Keton katalysiert. Außerdem kam es im Lauf der Reaktion zu einer Verschiebung des Enantiomerenüberschusses. Da racemisches 4-OH- $\beta$ -Jonon als Substrat eingesetzt wurde, betrug der ee zu Beginn der Reaktion 0 %. Der Anteil an (*R*)-Enantiomer nahm jedoch im Lauf der Reaktion ab und ein Überschuss an (*S*)-4-OH- $\beta$ -Jonon entstand. Der Enantiomerenüberschuss an (*S*)-Produkt betrug unter den gegebenen Reaktionsbedingungen nach 120 min 25 %. Die Monooxygenase bildet also nicht nur bevorzugt das (*R*)-Enantiomer, sondern oxidiert es auch bevorzugt zum Keton. Abbildung 3.16 stellt die CYP102A1 katalysierte Oxidation von  $\beta$ -Jonon schematisch dar.



**Abbildung 3.15: Umsetzung des racemischen 4-OH-β-Jonons durch den *E. coli* Stamm mit CYP102A1 Variante**

Reaktionsbedingungen: 250 mL Erlenmeyerkolben, V = 25 mL, T = 20 °C, 200 rpm, 50 mM KP<sub>i</sub>, Puffer pH 6,5, 20 g L<sup>-1</sup> *E. coli* CYP102A1 + LbADH, 1 mM rac. 4-Hydroxy-β-jonon (in 1 vol% EtOH vorgelöst), 50 mM 2-Propanol



**Abbildung 3.16: Schema der CYP102A1 katalysierten Oxidation von β-Jonon**

Der Versuch racemisches 4-OH-β-Jonon zu oxidieren zeigt darüber hinaus, dass die CYP102A1 Variante auch prinzipiell zur kinetischen Racematspaltung von 4-OH-β-Jonon eingesetzt werden kann und so das (S)-Enantiomer zugänglich wäre. Durch die Berechnung des Enantiomeren-Verhältnisses (E) bei kinetischen Racematspaltungen kann die Qualität der Racematspaltung beurteilt werden (Chen et al., 1982).

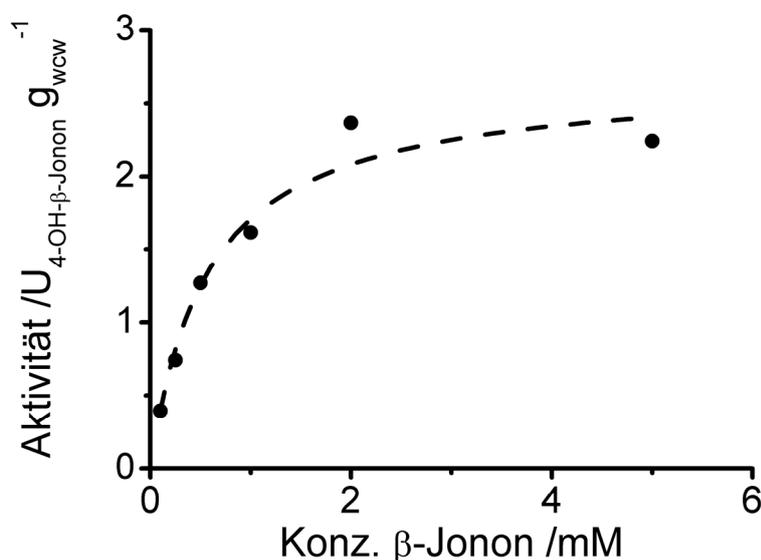
$$E = \frac{\ln(1 - c(1 + ee_p))}{\ln(1 - c(1 - ee_p))}$$

**Formel 3.3**

Racematspaltungen, die in der Praxis Anwendung finden, sollten einen E-Wert größer 30 haben. Der berechnete E-Wert dieser kinetischen Racematspaltung liegt bei 2,1 und ist zu gering für eine effiziente Reaktion. Für eine praktische Anwendung müsste das Enzym noch weiter optimiert werden.

### 3.2.4 Einfluss von Substrat und Produkt auf die Hydroxylierungsreaktion

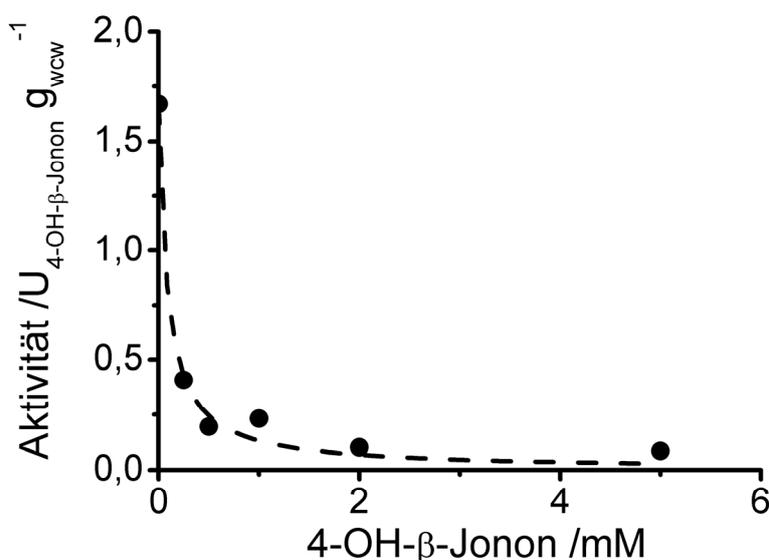
Alle bisher durchgeführten Versuche zur Hydroxylierung von  $\beta$ -Jonon erreichten keinen vollständigen Umsatz, was auf eine Substrat- bzw. Produktüberschussinhibierung deuten könnte. Deshalb wurde der Einfluss des Substrats und des Produkts auf die Aktivität des Biokatalysators untersucht. Abbildung 3.17 zeigt den Einfluss unterschiedlicher Substratkonzentrationen im Bereich 0,1 – 5 mM, in welchem die Löslichkeit von  $\beta$ -Jonon gewährleistet ist. Dabei wurde ein linearer Anstieg der Aktivität bis zu einer Substratkonzentration von ungefähr 0,75 mM beobachtet. Ab 1 mM  $\beta$ -Jonon tritt ein Sättigungseffekt ein und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit von  $2,75 \text{ U}_{4\text{-OH-}\beta\text{-Jonon}} \text{ g}_{\text{wcv}}^{-1}$  wurde erreicht. Eine Inhibierung durch das Substrat ist also bei  $\beta$ -Jononkonzentrationen  $< 5 \text{ mM}$  nicht ersichtlich.



**Abbildung 3.17: Einfluss der Substratkonzentration auf die Aktivität der CYP102A1 Variante**

Reaktionsbedingungen: 250 mL Erlenmeyerkolben,  $V = 25 \text{ mL}$ ,  $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ , 200 rpm, 50 mM  $\text{KPi}$  Puffer pH 6,5  $1 \text{ g L}^{-1}$  *E. coli* CYP102A1 + FDH,  $\beta$ -Jonon (in 1 vol% EtOH vorgelöst), 50 mM Natriumformiat

Abbildung 3.18 zeigt den Einfluss des Produkts auf die Aktivität des Biokatalysators. Die Aktivität sinkt stark mit zunehmender Produktkonzentration. Bereits bei Produktkonzentrationen von 0,5 mM waren nur noch 10 % der ursprünglichen Aktivität vorhanden. Die kinetischen Parameter, die vereinfacht nach einer Michaelis Menten Kinetik mit Produktinhibierungsterm bestimmt wurden, verdeutlichen die starke Produktinhibierung (Tabelle 3.2). Der  $K_i$  für das Produkt, der die Konzentration angibt, bei der noch die halbmaximale Aktivität des Biokatalysators vorhanden ist, liegt bei einer Konzentration von lediglich 0,035  $\mu\text{M}$ . Der geringe Umsatz der Biotransformation ist also durch die starke Produktinhibierung begründet.



**Abbildung 3.18: Einfluss der Produktkonzentration auf die Aktivität der CYP102A1 Variante**

Reaktionsbedingungen: 250 mL Erlenmeyerkolben,  $V = 25 \text{ mL}$ ,  $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ , 200 rpm, 50 mM  $\text{KPi}$ , Puffer pH 6,5  $1 \text{ g L}^{-1}$  *E. coli* CYP102A1 + FDH, 1 mM  $\beta$ -Jonon + rac. 4-OH- $\beta$ -Jonon (in 1 vol% EtOH vorgelöst), 50 mM Natriumformiat

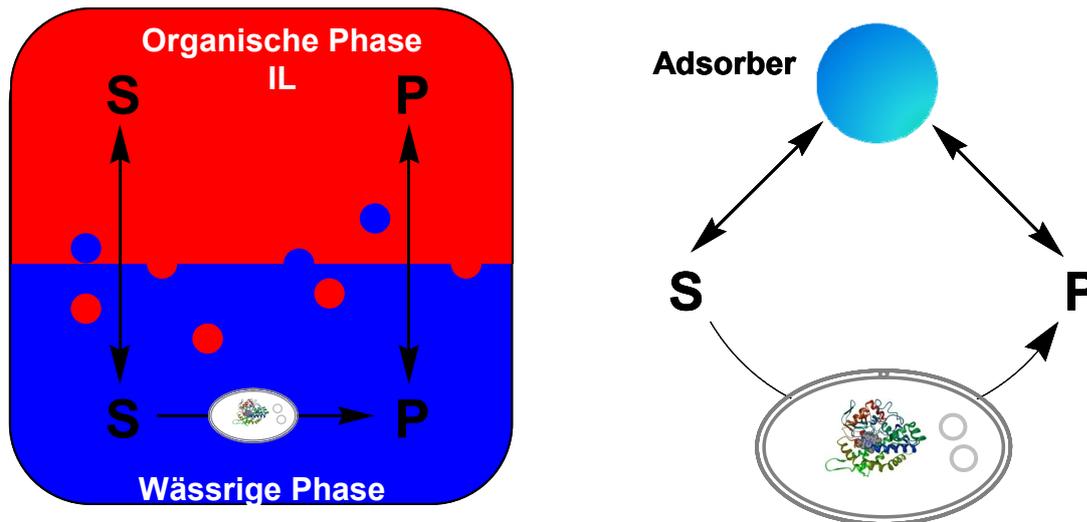
**Tabelle 3.2: Kinetische Parameter der Hydroxylierung von  $\beta$ -Jonon**

$V_{\text{max}}$	$2,75 \pm 0,21 \text{ U}_{4\text{-OH-}\beta\text{-Jonon}} \text{ g}_{\text{wcv}}^{-1}$
$K_M$	$0,65 \pm 0,15 \text{ mM}$
$K_{IP}$	$0,034 \pm 0,015 \text{ mM}$

### 3.2.4.1 *In situ* Produktabtrennung

Die Produktinhibierung sowie die Überoxidation des 4-OH- $\beta$ -Jonons zum 4-Oxo- $\beta$ -jonon könnte durch *in situ* Produktabtrennung überwunden werden. Um das Produkt während der Reaktion abzutrennen, können zwei Strategien angewandt werden: der Einsatz eines Zweiphasensystems oder die Verwendung von Adsorberharzen. Beim Zweiphasensystem können sowohl nicht Wasser-mischbare ionische Flüssigkeiten (IL) oder ein entsprechendes organisches Lösungsmittel als zweite Phase eingesetzt werden (Prinzip

siehe Kapitel 1.3.2.5). Ähnlich wie das Zweiphasensystem funktioniert das Prinzip der *in situ* Produktabtrennung mit Adsorberharzen. Substrat und Produkt weisen aufgrund ihrer Hydrophobizität eine hohe Affinität zum Adsorber auf und liegen nur in geringen Mengen im Reaktionsmedium vor. Das desorbierte Substrat wird zum Produkt umgesetzt, anschließend adsorbiert der Großteil des Produkts an den Adsorber und ist dem Biokatalysator nicht mehr zugänglich. Abbildung 3.19 veranschaulicht beide *in situ* Produktabtrennungskonzepte.

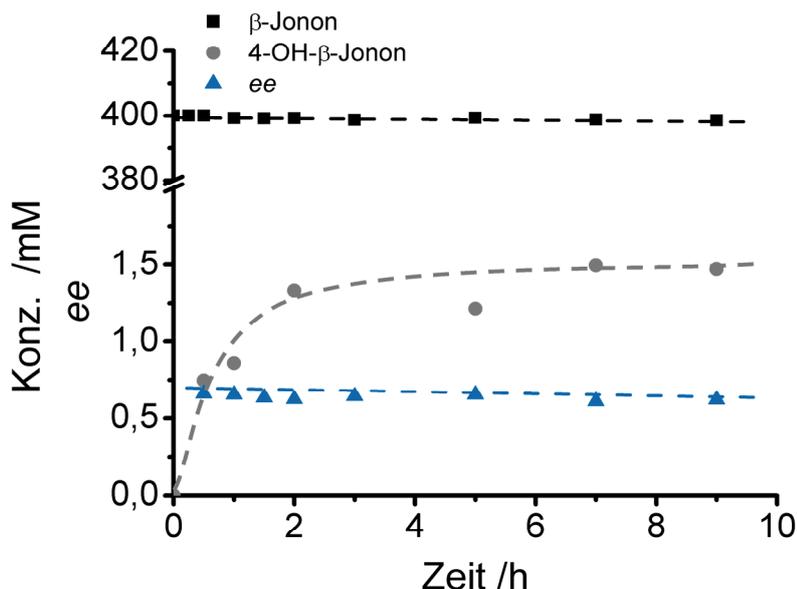


**Abbildung 3.19:** Schematische Darstellung der untersuchten Strategien zur *in situ* Produktabtrennung

Die Wahl eines adäquaten Lösungsmittels zur Etablierung eines Zweiphasensystems ist aufgrund der Substratspezifität der CYP102A1 eingeschränkt. Alkane können nicht als organische Phase eingesetzt werden, da alle flüssigen Vertreter von CYP102A1 Varianten bzw. dem Wildtyp selbst als Substrat akzeptiert werden (Appel et al., 2001; Farinas et al., 2001; Glieder et al., 2002; Peters et al., 2003). Die Untersuchungen beschränkten sich deshalb auf folgende nicht mit Wasser mischbare organische Lösungsmittel und ionische Flüssigkeiten:

- *tert*-Butylmethylether
- Toluol
- Decalin
- Chloroform
- Ethylacetat
- Diisononylphthalat
- BMIM (CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N
- BMIM PF<sub>6</sub>

Diisononylphthalat wurde bereits erfolgreich bei der durch die CYP102A1 katalysierten Ganzzellbiotransformation von  $\alpha$ -Pinen eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen beim Einsatz dieses Lösungsmittels als zweite Phase wurden daher von Schewe et al. (2009) adaptiert. Bei den anderen Lösungsmitteln wurde die zweite Phase im Verhältnis 1:1 und 1:5 zur wässrigen Phase eingesetzt. Des Weiteren wurde die Biotransformation sowohl im Schüttelkolben als auch in zylindrischen Reaktionsgefäßen mit geringerem Phasengrenzfläche-Volumenverhältnis durchgeführt, um eine Inaktivierung des Biokatalysators durch die Dispersion der zweiten Phase in der wässrigen Phase auszuschließen. Die Dispersion hängt neben der Rührgeschwindigkeit auch vom Phasengrenzflächen-Volumenverhältnis ab und ist umso höher, je größer das Verhältnis ist. Um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu garantieren, wurde die wässrige Phase vor Beginn der Biotransformation mit reinem Sauerstoff gesättigt. Lediglich in Gegenwart von Diisononylphthalat konnte eine Hydroxylierung von  $\beta$ -Jonon festgestellt werden (Abb. 3.20). Nach rund 9 h wurden unter den gegebenen Reaktionsbedingungen nur 1,5 mM 4-OH- $\beta$ -Jonon gebildet, was einem Umsatz von weniger als 1 % entspricht. Da sich die 4-OH- $\beta$ -Jonon Konzentration in der wässrigen Phase auf 10  $\mu$ M beschränkte, konnte eine Produktinhibierung als Grund für den geringen Umsatz ausgeschlossen werden. Höchstwahrscheinlich beruht die niedrige Produktbildung auf einer Inaktivierung des Enzyms. Der ee blieb über den Zeitraum annähernd konstant bei 65 %, sodass die Überoxidation des gewünschten Produkts verhindert werden konnte. Die *in situ* Produktabtrennung durch ein Zweiphasensystem scheint prinzipiell geeignet zu sein, um die Produktinhibierung und die Nebenreaktion unterbinden zu können. Im präparativen Maßstab allerdings scheidet das Zweiphasensystem aufgrund des geringen Umsatzes dennoch für eine Produktabtrennung während der Reaktion aus.



**Abbildung 3.20: 4-OH- $\beta$ -Jononbildung im Rahmen eines Zweiphasensystems in Gegenwart von Diisononylphthalat**

Reaktionsbedingungen: 250 mL Erlenmeyerkolben,  $V = 40$  mL,  $T = 20$  °C, 200 rpm, 50 mM  $KP_i$  Puffer pH 6,5, 40 vol% organische Phase, wovon 20 %  $\beta$ -Jonon, 80 % Diisononylphthalat,  $8 \text{ g L}^{-1}$  *E. coli* CYP102A1 + ADH, 1 vol% 2-Propanol

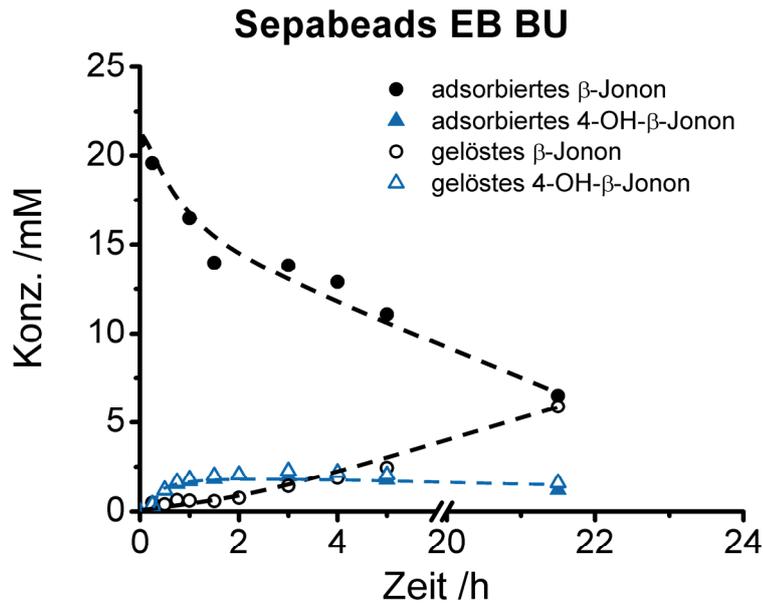
Alternativ wurden neun verschiedene Adsorberharze auf ihre Eignung zur *in situ* Produktabtrennung untersucht. Diese konnten bereits erfolgreich zur kontinuierlichen Substratdosierung und Produktabtrennung bei der Bayer-Villiger Monooxygenase katalysierten Synthese von Bicyclo[3.2.0]hept-2-en-6-on eingesetzt werden (Hilker et al., 2004). Um geeignete Harze zu identifizieren, muss die Substrat- und Produktverteilung am Adsorber und im Reaktionsmedium untersucht werden. Da nur wenige mg Referenzsubstanz 4-OH- $\beta$ -Jonon zur Verfügung standen, wurde lediglich die Verteilung des Substrats am Adsorber/Reaktionsmedium untersucht (Tabelle 3.3). Es wurde davon ausgegangen, dass das Produkt aufgrund geringer struktureller Unterschiede ein ähnliches Verteilungsverhalten besitzt.  $\beta$ -Jonon hat eine hohe Affinität zu allen Adsorbentmaterialien, da die verbleibende Substratkonzentration im Medium  $< 2$  mM ist. Mit Ausnahme des Adsorbenters Sepabeads EB BU wurde selbst der millimolare-Bereich nicht überschritten. In Gegenwart von Sepabeads EB HG, Amberlite XAD 4, Lewatit VPOC 1163, Sepabeads SP207, Diaion HP 20L und Amberlite XAD 16 Adsorbentien verbleiben nur wenige  $\mu\text{M}$   $\beta$ -Jonon in Lösung. Die Substratkonzentration im Medium ist somit um Größenordnungen geringer als die Michaelis Menten Konstante des Biokatalysators für das Substrat ( $K_M$  0,65 mM). Folglich ist die Aktivität des Biokatalysators in Gegenwart so niedriger Substratkonzentrationen zu gering um eine effiziente Biotransformation durchführen zu können. Daher scheiden diese Adsorber zur *in situ* Produktabtrennung

aus. Die Adsorber Sepabeads EB BU und Amberlite XAD 7 wurden als am besten geeignet erachtet und während der Biotransformation zur Produktabtrennung eingesetzt.

**Tabelle 3.3: Verteilung des  $\beta$ -Jonons zwischen Adsorber und Reaktionsmedium**

	Beladungskapazität /mg $\beta$ -Jonon $\text{mg}^{-1}$ Adsorber	$\beta$ -Jonon gelöst im Reaktionsmedium (50 mM $\text{KPi}$ pH 6,5 + 1 vol% EtOH) /mM
Amberlite XAD 4	0,12	0,02
Amberlite XAD 7	0,16	0,3
Amberlite XAD 16	0,15	0,06
Diaion HP 20L	0,13	0,04
Diaion HP2MGL	0,06	0,28
Sepabeads SP207	0,11	0,02
Sepabeads EB BU	0,10	1,80
Sepabeads EB HG	0,05	0,00
Lewatit VPOC 1163	0,12	0,04

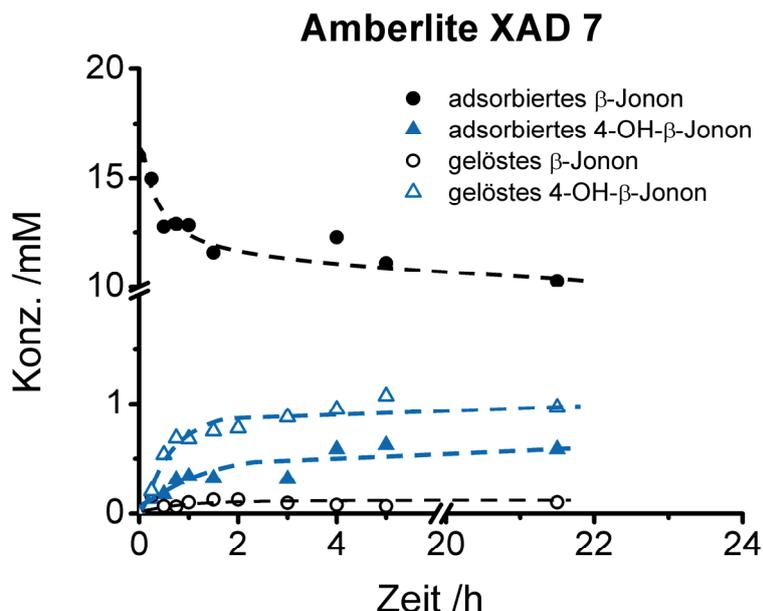
Die Biotransformation wurde im Schüttelkolben durchgeführt, wobei die mit Substrat beladenen Adsorber in einem Nylonsack mit einer definierten Porengröße von 20  $\mu\text{m}$  zurückgehalten wurden. Dieser Versuchsaufbau erlaubt eine einfache Probenahme aus dem wässrigen Medium und der Adsorberharze. Abbildung 3.21 zeigt den Reaktionsverlauf in Gegenwart der Sepabeads EB BU Harze. Die jeweilige Menge an Substrat und Produkt die sich am Adsorber befindet, wurde bezogen auf dessen entsprechende Konzentration im Medium umgerechnet. Die Sepabeads EB BU erlaubten zwar einen Umsatz im millimolaren-Bereich, allerdings war die Produktkonzentration in Lösung immer noch so hoch, dass nach 1 h der Umsatz einbricht und die Produktinhibierung zum Tragen kommt. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich etwa 2 mM 4-OH- $\beta$ -Jonon in Lösung. Des Weiteren wurde die Entstehung des Nebenproduktes 4-Oxo- $\beta$ -jonon beobachtet. Im Reaktionsverlauf nahm zudem der Anteil an gelöstem  $\beta$ -Jonon stark zu und betrug nach 21,5 Stunden bereits mehr als 6 mM. Die Affinität des Substrats zum Adsorber nimmt also im Lauf der Reaktion ab. Daher scheinen die Sepabeads EB BU zur Produktabtrennung während der Reaktion nicht geeignet zu sein.



**Abbildung 3.21: 4-OH- $\beta$ -Jononbildung in Gegenwart des Adsorbers Sepabeads EB BU**

Reaktionsbedingungen: 250 mL Erlenmeyerkolben,  $V = 25$  mL,  $T = 20$  °C, 200 rpm, 50 mM  $KP_i$ , Puffer pH 6,5,  $50$  g  $L^{-1}$  *E. coli* CYP102A1 + *LbADH*, 1 vol% 2-Propanol, 1,5 vol% EtOH, 1 g Sepabeads EB BU 405 beladen mit  $\beta$ -Jonon

Des Weiteren wurde die Biotransformation in Gegenwart des Amberlite XAD 7 Harzes durchgeführt (Abb. 3.22). Die Menge an adsorbiertem Substrat und Produkt ist bezogen auf dessen entsprechende Konzentration in Lösung angegeben. Da nur eine sehr geringe Menge an  $\beta$ -Jonon im Reaktionsmedium vorlag, ist die Produktbildung deutlich geringer. Nach rund 2 Stunden wurden 1,3 mM 4-OH- $\beta$ -Jonon gebildet, wovon fast 1 mM 4-OH- $\beta$ -Jonon im Reaktionsmedium vorlagen. Daher kam die Produktinhibierung zum Tragen und die Hydroxylierung von  $\beta$ -Jonon stoppte. Auch Amberlite XAD 7 ist daher nicht zur *in situ* Produktabtrennung geeignet.



**Abbildung 3.22: 4-OH- $\beta$ -Jononbildung in Gegenwart des Adsorbers Amberlite XAD 7**

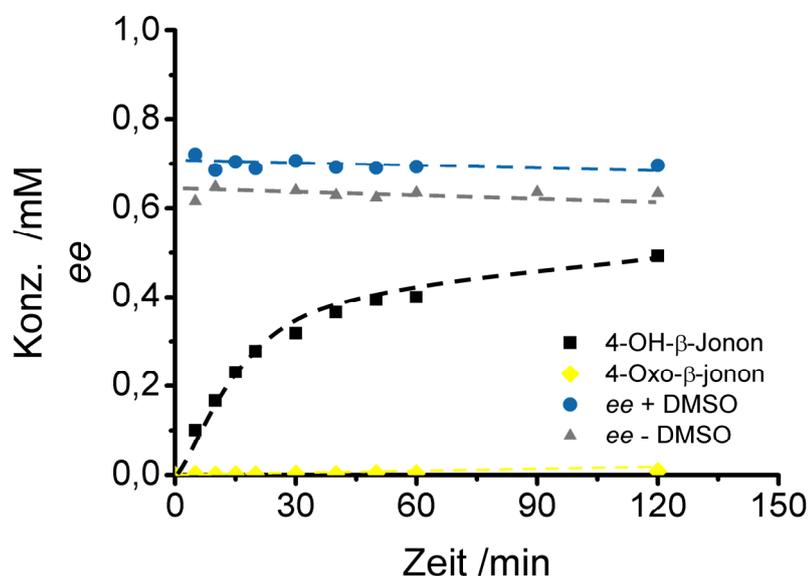
Reaktionsbedingungen: 250 mL Erlenmeyerkolben,  $V = 25$  mL,  $T = 20$  °C, 200 rpm, 50 mM  $KP_i$  Puffer pH 6,5,  $50$  g  $L^{-1}$  *E. coli* CYP102A1 + *LbADH*, 1 vol% 2-Propanol, 1,5 vol% EtOH, 0,6 g Amberlite XAD 7 beladen mit  $\beta$ -Jonon

Bei beiden untersuchten Adsorbentmaterialien ist die Affinität des Substrats zum Adsorbent höher als die des Produkts, was in der höheren Polarität des Produkts begründet liegt. Dies erschwert allerdings den Einsatz von Adsorbentmaterialien zur *in situ* Produktabtrennung. Setzt man Adsorbentharze, an die viel Produkt adsorbiert ein, so adsorbiert noch mehr Substrat und die verbleibende Substratkonzentration in Lösung wäre wohl so gering, dass die Biotransformation praktisch zum Erliegen kommt.

### 3.3 Satzreaktor (Batch) unter optimierten Bedingungen

Nachdem eine kontinuierliche Produktabtrennung während der Reaktion nicht realisiert werden konnte und die Produktinhibierung nicht überwunden werden konnte, wurde versucht, die Enantioselektivität der Biotransformation zu verbessern. Diese wird vor allem durch die Weiteroxidation des Produkts zu 4-Oxo- $\beta$ -jonon beeinflusst, da das (*R*)-Enantiomer nicht nur bevorzugt gebildet, sondern auch bevorzugt oxidiert wird. Die unerwünschte Bildung des Ketons kommt vor allem bei hoher Biokatalysatormenge und langer Reaktionsdauer zum Tragen, da die Nebenreaktion langsamer abläuft als die gewünschte Hydroxylierung. Die Biotransformation wurde deswegen in Gegenwart einer geringen Biokatalysatorkonzentration von  $2$  g  $L^{-1}$  durchgeführt und nach einer Reaktionsdauer von 120 Minuten gestoppt. Zudem kann die Zugabe von DMSO die Enantioselektivität von Enzym katalysierten Reaktion verbessern (Zocher et al., 2000). Daher wurde die Zugabe von DMSO während der Biotransformation hinsichtlich einer

Verbesserung der Enantioselektivität der Hydroxylierungsreaktion untersucht. Abbildung 3.23 zeigt die Produktbildung und den Enantiomerenüberschuss über den Reaktionsverlauf. Ein Einfluss von DMSO auf die Produktbildung konnte nicht festgestellt werden. Aufgrund der Produktinhibierung wurde unter den gegebenen Reaktionsbedingungen nur ein Umsatz von 50 % erreicht. Eine Analyse des Enantiomerenüberschusses zeigte, dass DMSO die Enantioselektivität der Hydroxylierung von  $\beta$ -Jonon signifikant verbessert. In Gegenwart von DMSO belief sich der ee-Wert für das (*R*)-Enantiomer auf 72 %, in dessen Abwesenheit nur auf 65 %. In beiden Fällen war aber eine leichte abnehmende Tendenz des Enantiomerenüberschusses ersichtlich, wobei gleichzeitig die Bildung von geringen Mengen 4-Oxo- $\beta$ -jonon detektiert wurde. Dies verdeutlicht die Bedeutung der Wahl der Reaktionszeit. Trotzdem konnte unter den gegebenen Bedingungen im Satzreaktor eine Produktivität von 6 mM d<sup>-1</sup> bzw. 1,25 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> für die Bildung von 4-OH- $\beta$ -Jonon erreicht werden. Bei diesem Satzreaktor mit 2 h Reaktionsdauer wurde zudem eine Produktausbeute von 104 mg L<sup>-1</sup> erlangt. Da die CYP102A1 Konzentration in der Zelle bekannt ist, konnte die Katalysatorausnutzung bezogen auf das eigentliche Produktionsenzym angegeben werden, die unter den gegebenen Reaktionsbedingungen 5000 beträgt. Tabelle 3.4 fasst die Kennzahlen des Satzreaktors zusammen.



**Abbildung 3.23: Satzreaktor zur Synthese von 4-OH- $\beta$ -Jonon in Gegenwart von DMSO**

Reaktionsbedingungen: 250 mL Erlenmeyerkolben,  $V = 25$  mL,  $T = 20$  °C, 200 rpm, 50 mM KP<sub>i</sub> Puffer pH 6,5, 2 g L<sup>-1</sup> *E. coli* CYP102A1 + ADH, 1 mM  $\beta$ -Jonon (in 1 vol% EtOH vorgelöst), 50 mM 2-Propanol, 2 vol% DMSO

**Tabelle 3.4: Kennzahlen des Satzreaktors in Gegenwart von DMSO**

Umsatz	50,2 %
Produktivität	1,25 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> 6 mM d <sup>-1</sup>
Ausbeute <sup>a</sup>	2,6 mg
ee	72 %
TTN P450	5000

a: berechnet

### 3.4 Zusammenfassung

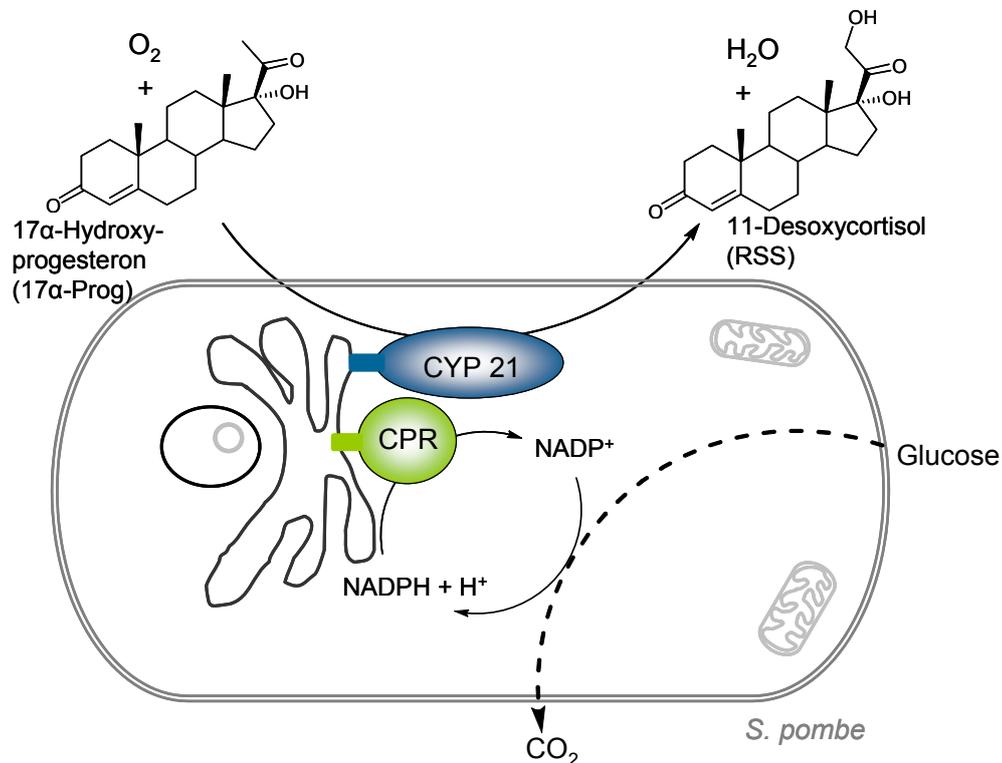
Im Rahmen der Parameterstudien wurden folgende Limitierungen der CYP102A1 katalysierten Hydroxylierung festgestellt:

- Bei Biokatalysatorkonzentrationen größer 8 g L<sup>-1</sup> kam es unter den gegebenen Reaktionsbedingungen zu einer Sauerstofftransportlimitierung.
- Um eine ausreichende Cofaktorversorgung gewährleisten zu können, reicht eine Cofaktorregenerierung über den Stoffwechsel des Organismus nicht aus, die Implementierung einer enzymgekoppelten Cofaktorregenerierung war nötig.
- Die Reaktion ist durch eine Produktinhibierung limitiert. Der K<sub>i</sub>-Wert des Produkts, bei dem nur noch die halbmaximale Aktivität beobachtet wurde, beträgt 35 µM.
- Die Variante der CYP102A1 katalysiert nicht nur die Hydroxylierung von β-Jonon zu 4-OH-β-Jonon, sondern auch die Oxidation von 4-OH-β-Jonon zu 4-Oxo-β-Jonon. Das (*R*)-Enantiomer wird nicht nur bevorzugt gebildet, sondern auch bevorzugt zum entsprechenden Keton weiteroxidiert. Daher nimmt der Enantiomerenüberschuss während der Reaktion ab.

Durch *in situ* Produktabtrennung mit Hilfe eines Zweiphasensystems oder durch Adsorberharze, könnte sowohl die Produktinhibierung als auch die Oxidierung des gewünschten Produkt 4-OH-β-Jonon verhindert werden. Durch die bisherigen Untersuchungen, konnte allerdings weder ein geeignetes Zweiphasensystem, noch ein geeignetes Adsorbentmaterial zur kontinuierlichen Produktabtrennung während der Reaktion identifiziert werden. Der Biokatalysator zeigte lediglich eine geringe Aktivität in Anwesenheit von Diisononylphthalat, alle anderen untersuchten nicht Wasser-mischbaren Lösungsmittel führten zu einer vollständigen Inaktivierung des Biokatalysators. Die Adsorberharze scheiden aufgrund der ungünstigen Substrat- und Produktverteilung im Medium /am Adsorber aus.

Darüber hinaus konnte erstmals gezeigt werden, dass Cytochrom P450 Monooxygenasen für kinetische Racematspaltungen eingesetzt werden können. Bei der Überoxidation von 4-OH- $\beta$ -Jonon zu 4-Oxo- $\beta$ -jonon wird bevorzugt das (*R*)-Enantiomer weiteroxidiert. Setzt man racemisches 4-OH- $\beta$ -Jonon als Substrat ein, so bildet sich im Lauf der Reaktion ein Überschuss an (*S*)-Enantiomer. Die Zugabe von DMSO wirkt sich positiv auf den Enantiomerenüberschuss (72 %) des gebildeten 4-OH- $\beta$ -Jonon aus. Trotz Produktinhibierung wurde im Satzreaktor unter optimierten Reaktionsbedingungen ein Umsatz von 50 % erreicht. Die Produktivität des Satzreaktors lag bei 6 mM d<sup>-1</sup> bzw. 1,25 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> bei einer TTN von 5000.

## 4 Humane CYP21



**Abbildung 4.1:** Schema des Ganzzellbiokatalysators zur Hydroxylierung von Steroiden in Position 21

An der menschlichen Biosynthese von Steroiden in der Nebennierenrinde sind vier Cytochrom P450 Monooxygenasen beteiligt: zwei mitochondriale (CYP11B1 und CYP11A1) sowie zwei mikrosomale (CYP17 und CYP21) (Miller, 1988). Die CYP21, eine der Klasse 2 zugehörige P450 (vgl. Kapitel 1.2.2), die in der Membran des endoplasmatischen Retikulum verankert ist, katalysiert die Hydroxylierung von Progesteron (Prog) und 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron (17 $\alpha$ -Prog) in Position 21 zu 11-Desoxycorticosteron (DOC) bzw. 11-Desoxycortisol (RSS, Reichstein S) (Kominami et al., 1980). Bei RSS handelt es sich um die direkte Vorstufe des pharmazeutisch relevanten Cortisols. Dieses Enzym konnte erfolgreich in *Schizosaccharomyces pombe* (Spaltheife) exprimiert werden, wobei der Elektronentransport von der spaltheifeeigenen FAD/FMN abhängigen Cytochrom P450 Reduktase (CPR) übernommen wird. Der Spaltheifestamm erreicht dabei höhere Produktivitäten als ein *Saccharomyces cerevisiae* Stamm, der die bovine CYP21 exprimiert (Dragan et al., 2006a). Darüber hinaus konnten in den letzten Jahren zahlreiche humane P450 erfolgreich in Spaltheife exprimiert werden, wodurch dieser Organismus als Expressionsplattform eukaryotischer P450s zunehmend an

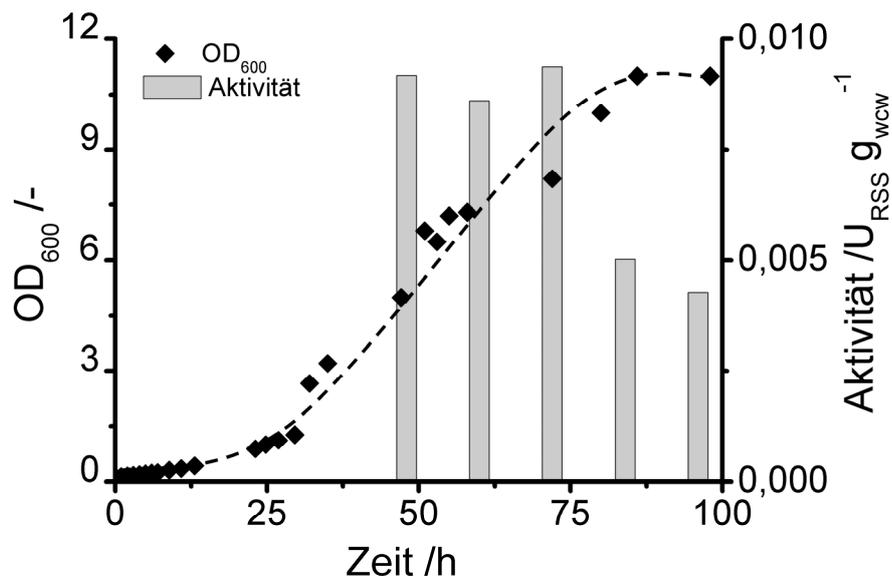
Bedeutung gewinnt (Bureik et al., 2002; Dragan et al., 2005; Dragan et al., 2006a; Dragan et al., 2006b; Palabiyik et al., 2008; Peters et al., 2009a; Peters et al., 2009b; Zöllner et al., 2009).

## 4.1 Charakterisierung

Zur Langzeitkultivierung wurde der rekombinante *S. pombe* Stamm CAD 18 als Glycerinkultur bei -80 °C gelagert, die immer als Ausgangspunkt der weiteren Kultivierung diente. Die Enzymaktivitätsbestimmung erfolgte durch die Verfolgung der Produktbildungsrate mittels HPLC.

### 4.1.1 Kultivierung des Biokatalysators

Der rekombinante Spalthestamm CAD18 wurde bezüglich seines Wachstums in Edinburgh Minimal Medium (EMM) charakterisiert. Ein Vollmedium kann nicht zur Enzymexpression verwendet werden, da die Enzymexpression unter Kontrolle des *pnmt1* Promotors (= *no message with thiamine*) steht (Maundrell, 1990), der nur in Abwesenheit von Thiamin eine Expression des Enzyms erlaubt. Da der verwendete Stamm zusätzlich Auxotrophien gegenüber Adenin, Histidin und Uracil zeigt, müssen diese Substanzen dem Medium supplementiert werden. Neben dem Wachstumsverhalten des Stammes wurde untersucht, zu welchem Zeitpunkt der Kultivierung die CYP21 Aktivität am höchsten ist (Abb. 4.1). Die exponentielle Wachstumsphase des rekombinanten Organismus begann nach etwa 25 Stunden, während nach 80 Stunden eine maximale OD<sub>600</sub> von etwa 11 erreicht wurde. Dies entspricht einer Verdopplungszeit von etwa 5 Stunden. Um festzustellen, zu welchem Zeitpunkt der Kultivierung die CYP21 Aktivität am höchsten ist, wurde ein Aliquot des Kultivierungsmedium entnommen, die Zellen durch Zentrifugation geerntet und anschließend ein Aktivitätsassay durchgeführt. Zwischen 48 h und 72 h betrug die Aktivität 0,0095 U<sub>RSS</sub> g<sub>wcw</sub><sup>-1</sup>. Über diese Wachstumsdauer hinweg, sank die Aktivität. Um eine hohe CYP21 Aktivität und gleichzeitig hohe Biomasseausbeuten gewährleisten zu können, sollte die Kultivierung der Zellen daher rund 72 Stunden betragen.



**Abbildung 4.2: Wachstum der *S. pombe* CAD 18 und dessen CYP21 Aktivität in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer**

Reaktionsbedingungen: Kultivierung: 1 L Erlenmeyerkolben, 100 mL EMM Medium, T = 30 °C, 200 rpm

Aktivitätsbestimmung: 250 mL Erlenmeyerkolben, V = 25 mL, T = 30 °C, 200 rpm, 50 mM KP<sub>i</sub> Puffer pH 6, 20 g L<sup>-1</sup> Biomasse (Feuchtgewicht), 100 µM 17α-Prog (in 1 vol% EtOH vorgelöst)

Des Weiteren wurde die Zugabe der Hämvorstufe 5-ALA während der Kultivierung des Organismus untersucht. Im Gegensatz zur Expression der CYP102A1 wurde allerdings keine Erhöhung der gewünschten Aktivität festgestellt (vgl. Kapitel 3.1). Da die Spalthefe über zwei eigene Cytochrom P450 Monooxygenasen verfügt<sup>2</sup>, konnte nicht, wie bei den anderen untersuchten Ganzzellsystemen, mittels CO-Differenzspektroskopie die CYP21 Konzentration bestimmt werden (vgl. Kapitel 3.1 und 5.1). Dragan et al. (2006a) schätzen die CYP21 Konzentration auf rund 5 nmol L<sup>-1</sup> EMM Medium, dies entspricht einer CYP21 Konzentration von rund 0,5 nmol g<sub>wcw</sub><sup>-1</sup>. Die CYP21 Konzentration ist also deutlich geringer als die der CYP102A1 und CYP106A2 in *E. coli*.

#### 4.1.2 Charakterisierung der Ganzzellbiotransformation

Da ruhende Zellen eine gezielte Untersuchung der Biotransformation ohne wachstumsbedingte Einflüsse ermöglichen, wurde überprüft, ob dieser rekombinante Stamm wachstumsentkoppelt als Biokatalysator eingesetzt werden kann. Anstelle von EMM Medium wurde KP<sub>i</sub> Puffer als Reaktionsmedium gewählt. Tabelle 4.1 vergleicht die Hydroxylierungsaktivität von wachsenden Zellen mit ruhenden Zellen. In beiden Fällen

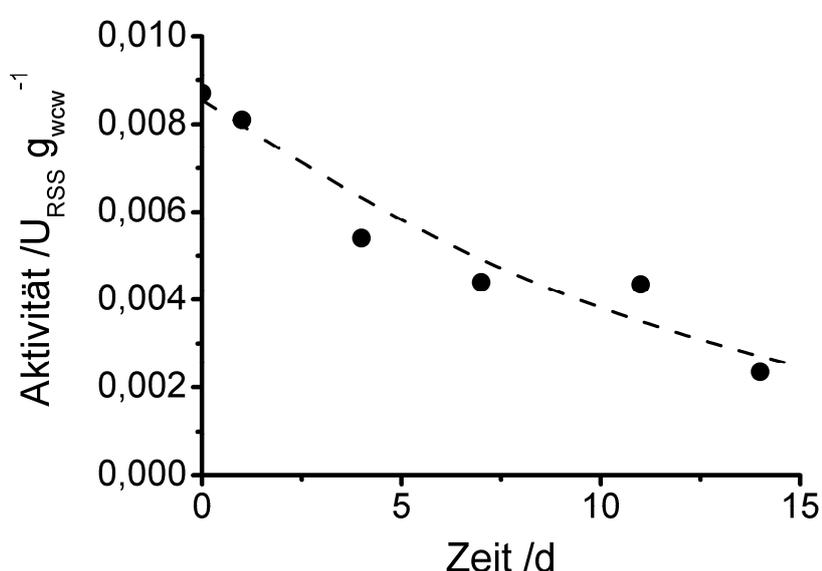
<sup>2</sup> Cytochrome P450 Knowledgebase 2006: <http://cpd.ibmh.msk.su/>

wurde eine Aktivität von rund  $0,006 \text{ U}_{\text{RSS}} \text{ g}_{\text{wcv}}^{-1}$  erreicht. Ruhende Zellen können also als Biokatalysator eingesetzt werden.

**Tabelle 4.1: CYP21 Aktivität von ruhender und wachsender *S. pombe* CAD18**

Ruhende Zellen	Wachsende Zellen
$0,0059 \text{ U}_{\text{RSS}} \text{ g}_{\text{wcv}}^{-1}$	$0,0063 \text{ U}_{\text{RSS}} \text{ g}_{\text{wcv}}^{-1}$

Ein wichtiger Aspekt beim Einsatz ruhender Zellen, ist die Lagerstabilität bereits induzierter Zellen (vgl. Kapitel 3.1.2). Wie bei der CYP102A1 wurde die Lagerstabilität als 20 %ige Zellsuspension bei  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  untersucht (Abb. 4.3). Bereits nach 7 Tagen sank die Aktivität des Biokatalysators auf 50 %, weshalb die Biotransformation innerhalb von drei Tagen nach der Kultivierung durchgeführt werden sollte.

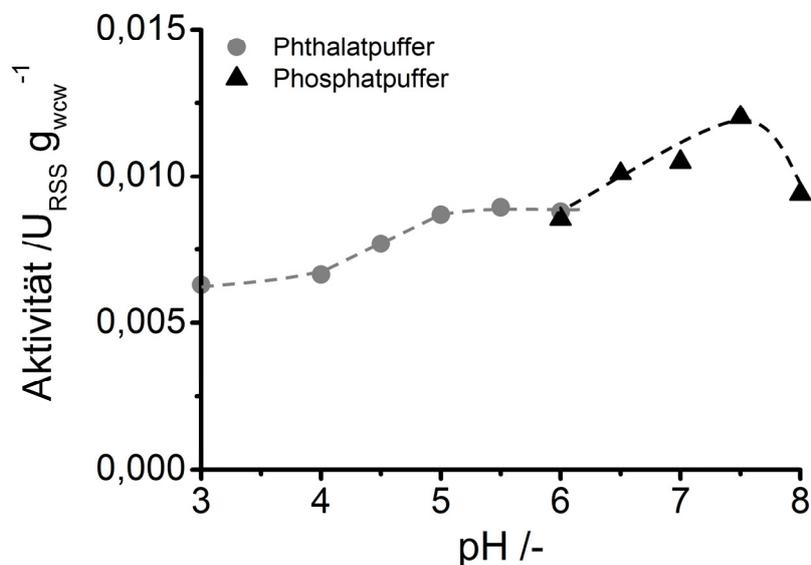


**Abbildung 4.3: Lagerstabilität der *S. pombe* CAD 18 bei  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  als 20 %ige Zellsuspension**

Reaktionsbedingungen:  $T = 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 20 %ige Zellsuspension in 50 mM  $\text{KPi}$  pH 6  
Aktivitätsbestimmung: 250 mL Erlenmeyerkolben,  $V = 25 \text{ mL}$ ,  $T = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 200 rpm, 50 mM  $\text{KPi}$   
Puffer pH 6,  $20 \text{ g L}^{-1}$  Biomasse (Feuchtwicht),  $100 \text{ } \mu\text{M}$   $17\alpha\text{-Prog}$  (in 1 vol% EtOH vorgelöst)

Die Kultivierung der Spalthefe erfolgt in der Regel bei einem sauren pH-Wert. Dies muss nicht unbedingt auf die CYP21 zutreffen, weshalb die pH-Abhängigkeit der Aktivität zur Auswahl eines geeigneten Reaktionsmediums untersucht wurde (Abb. 4.4). Von pH 6 – pH 8 diente  $\text{KPi}$  Puffer als Reaktionsmedium, bei saureren pH-Werten wurde Kaliumphthalatpuffer herangezogen. Um etwaige Effekte des Puffersalzes auf die Hydroxylierungsaktivität auszuschließen, wurde die Biotransformation bei pH 6 in Gegenwart beider Puffersalze durchgeführt. Da keine signifikanten Aktivitätsunterschiede zu erkennen waren, scheinen beide Puffer gleich gut für die Biotransformation geeignet zu

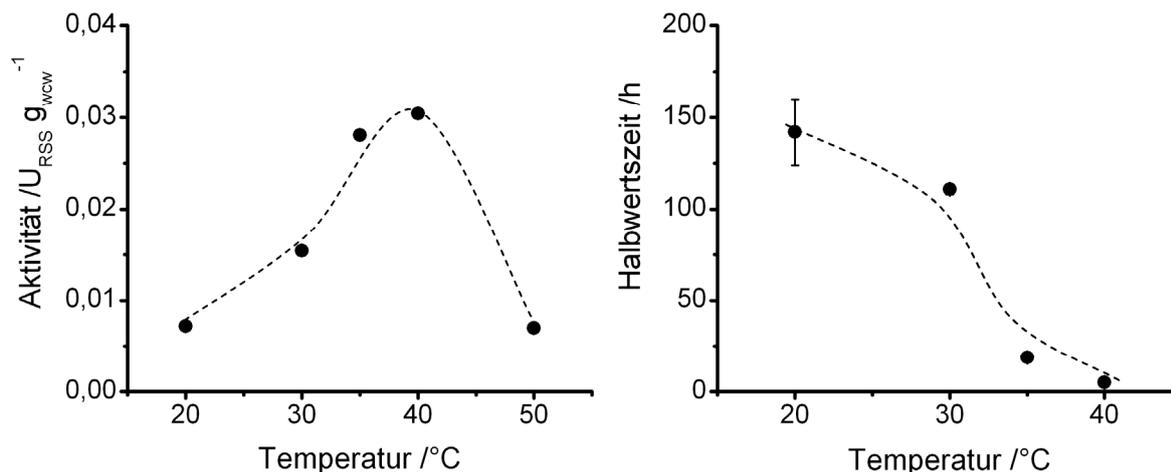
sein. Die höchste Aktivität wurde bei pH 7,5 beobachtet, bei dem die Biotransformation durchgeführt werden sollte.



**Abbildung 4.4: Aktivität der *S. pombe* CAD 18 in Abhängigkeit des pH-Werts**

Reaktionsbedingungen: 250 mL Erlenmeyerkolben,  $V = 25$  mL,  $T = 30$  °C, 200 rpm, 50 mM Puffer,  $20$  g  $L^{-1}$  Biomasse (Feuchtwicht),  $100$   $\mu$ M  $17\alpha$ -Prog (in 1 vol% EtOH vorgelöst)

Darüber hinaus wurde der Einfluss der Temperatur auf die Aktivität und Stabilität des Biokatalysators untersucht. Von  $20$  bis  $35$  °C wurde ein exponentieller Anstieg der Aktivität beobachtet. Mit einer Aktivität von rund  $0,031$   $U_{RSS} g_{wcv}^{-1}$  wurde das Maximum bei  $40$  °C erreicht, bevor destabilisierende Effekte eintraten. Daher wurden die Stabilitätsuntersuchungen nur von  $20 - 40$  °C durchgeführt. Bei  $35$  °C und  $40$  °C wurde eine Halbwertszeit des Biokatalysators unter 24 Stunden gemessen, die deshalb zu gering für eine effiziente Biotransformation über einen längeren Zeitraum ist. Ein guter Kompromiss aus Aktivität und Stabilität ist eine Reaktionstemperatur von  $30$  °C. Die Aktivität des Biokatalysators beläuft sich auf  $0,015$   $U_{RSS} g_{wcv}^{-1}$  bei einer Halbwertszeit von über 100 h (4,2 d).



**Abbildung 4.5: Einfluss der Temperatur auf die Aktivität (links) und Stabilität (rechts) der *S. pombe* CAD 18**

Reaktionsbedingungen: Aktivitätsbestimmung: 250 mL Erlenmeyerkolben, V = 25 mL, 200 rpm, 50 mM KP<sub>i</sub> Puffer pH 6, 20 g L<sup>-1</sup> Biomasse (Feuchtwicht), 100 μM 17α-Prog (in 1 vol% EtOH vorgelöst)

Stabilitätsuntersuchungen: 20 % Zellsuspension, 50 mM KP<sub>i</sub> Puffer pH 6

## 4.2 Parameterstudien

### 4.2.1 Sauerstoffversorgung

Durch Berechnungen der maximalen Sauerstofftransferrate (vgl. Kapitel 3.2.1) kann auf eine mögliche Sauerstofftransportlimitierung geschlossen werden. Liegt die Produktbildungsrate um Größenordnungen unterhalb der maximalen OTR, so kann eine Sauerstofflimitierung ausgeschlossen werden. Selbst unter optimierten Reaktionsbedingungen belief sich die RSS-Bildungsrate bei dieser Ganzzellbiotransformation auf maximal 0,05 mM h<sup>-1</sup> (vgl. Kapitel 4.3) und ist daher um den Faktor 60 geringer als die maximale OTR (3,14 mM h<sup>-1</sup>), weshalb eine Sauerstofflimitierung ausgeschlossen werden konnte und keine experimentelle Überprüfung erfolgte.

### 4.2.2 Cofaktorversorgung

Die hefeeigene CPR ermöglicht den Elektronentransport vom NADPH zur P450. Da eine Vielzahl von Biotransformationen durch unzureichende Cofaktorversorgung limitiert ist (Wandrey, 2004), wurde die Cofaktorversorgung bei einer Regenerierung über den Stoffwechsel der Spaltheife durch die Quantifizierung der intrazellulären Cofaktorkonzentration analysiert. Die Bestimmung intrazellulärer Metabolite mittels LC-MS/MS in Kombination mit einer „schnellen Probenahmetechnik“ konnte schon bei verschiedensten Fermentationsprozessen (van Dam et al., 2002; Yamada et al., 2006; Luo et al., 2007) und Biotransformationen (Schroer et al., 2009) erfolgreich eingesetzt werden.

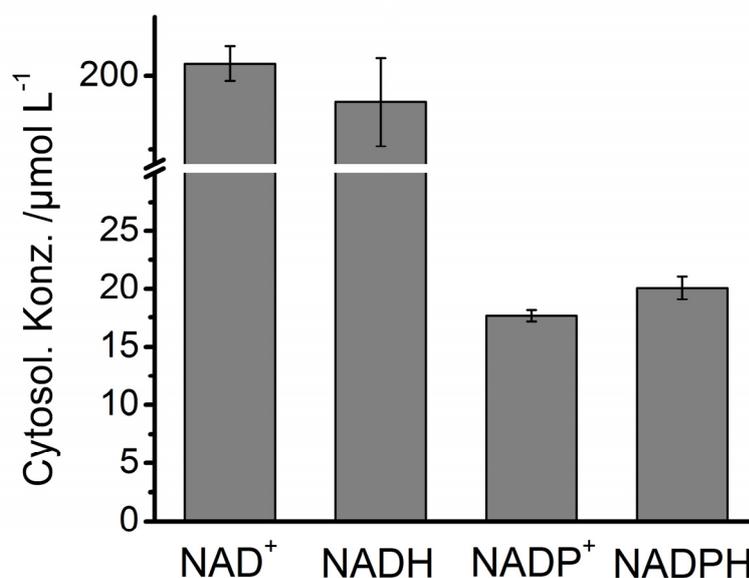
Durch die Zugabe von -50 °C kaltem Methanol wurden jegliche Stoffwechselfvorgänge der Zelle gestoppt (= *quenching*). Allerdings kann es dabei zu einer Schädigung der Zellmembran und dem damit verbundenen Verlust (*leaking*) intrazellulärer Metabolite, wie beispielsweise der Redoxcofaktoren kommen (Wittmann et al., 2004; Magnus et al., 2006). Daher wurde die Cofaktorkonzentration in der gequenchten Lösung bei jeder Messung ebenfalls bestimmt und in die Berechnungen miteinbezogen. Nach dem Quenching wurden die Zellen durch Zentrifugation vom Überstand getrennt und mit Chloroform aufgeschlossen. Nach 3 h Inkubation mit Chloroform wurde die wässrige Phase filtriert und mittels LC-MS/MS vermessen. Um die cytosolische Cofaktorkonzentration zu bestimmen, wurde die Menge an Cofaktor berechnet auf 1 g Biomasse (Feuchtgewicht) durch 0,8 geteilt, da 80 % der Zelle aus Cytosol bestehen (Mutzall, 1993).

Die Ionisation im Massenspektrometer wird durch die Hintergrundinformationen (Matrix) der zu analysierenden Probe, wie beispielsweise Zellreste und Stoffwechselprodukte beeinflusst, wodurch die Sensitivität des MS erniedrigt wird. Aufgrund dieses sogenannten Matrixeffekts, wurde die Quantifizierung der Redoxcofaktoren mit Kalibriergeraden durchgeführt, die die gleiche Matrix (= Zellsuspension) enthalten wie die zu vermessende Probe. Um die Größenordnung des Matrixeffekts zu verdeutlichen, zeigt Tabelle 4.2 die Steigung der Kalibriergeraden für NADPH in Gegenwart unterschiedlicher Matrices. Die Steigung der Standardgerade ist in Wasser um den Faktor 15 größer als in Gegenwart der biologischen Matrix. Die Werte verdeutlichen, dass das Heranziehen einer Standardgeraden, die in Wasser vermessen wurde, zur Quantifizierung der Cofaktorkonzentration in biologischen Proben zu zu geringen Konzentrationen führen würde.

**Tabelle 4.2: Steigung der Kalibriergerade für NADPH in Abhängigkeit des Matrix der Probe**

Kalibriergeraden gemessen in	Steigung /Fläche $\mu\text{M}^{-1}$ NADPH
Wasser	$1,5 \text{ e}^6$
Matrix (1:5 verdünnt)	$9,6 \text{ e}^5$
Matrix (unverdünnt)	$7,2 \text{ e}^4$

Um eine Vorstellung über die Größenordnung des intrazellulären Redoxcofaktorpools der Spaltheife zu erhalten, wurde die intrazelluläre Cofaktorkonzentration der Spaltheife während der stationären Wachstumsphase gemessen (Abb. 4.6). Mit einer Konzentration von rund  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$  ist die cytosolische Konzentration von  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADH}$  am höchsten. Die Konzentration der phosphorylierten Cofaktoren ist um den Faktor 10 geringer, außerdem liegt ein Verhältnis von 1:1 an oxidierten zu reduzierten Cofaktoren vor. Ein ähnliches Verhältnis von oxidierten zu reduzierten Cofaktor wurde auch in *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben (Theobald et al., 1997). Cofaktorkonzentrationsbestimmungen in anderen *S. cerevisiae* Stämmen zeigten einen höheren Anteil an oxidierten Cofaktoren (Teusink et al., 2000; Visser et al., 2004), wobei nur die nichtphosphorylierten Cofaktoren in die Berechnung miteinbezogen wurden. Die im Rahmen dieser Arbeit in Spaltheife gemessenen absoluten Werte an  $\text{NADH}$  von rund  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$  sind vergleichbar mit denen in *S. cerevisiae*, die  $\text{NAD}^+$  Werte sind allerdings um den Faktor 5 – 9 geringer. In der Literatur sind darüber hinaus keine Werte zur Konzentration phosphorylierter Cofaktoren in Hefen bekannt, die einen Vergleich zu den hier gemessenen Werten zulassen würden.

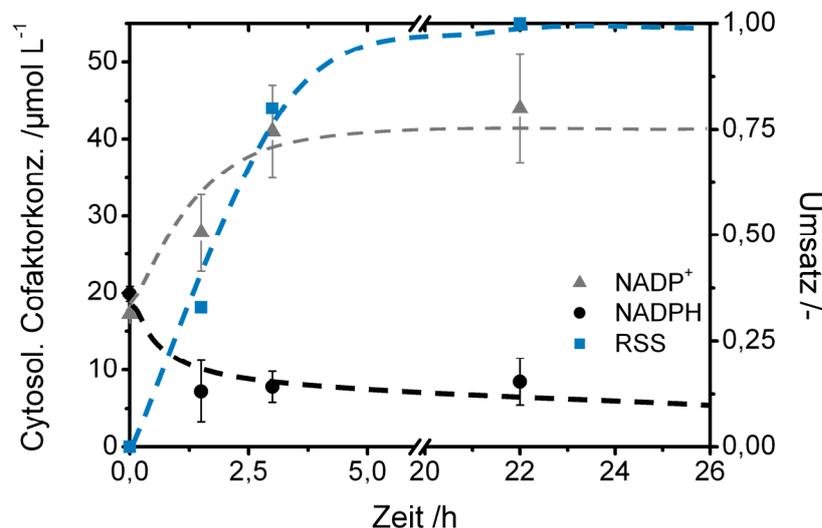


**Abbildung 4.6: Cytosolische Redoxcofaktorkonzentration von *S. pombe* CAD18 wenn stationär gewachsen**

Reaktionsbedingungen: 1,5 g Biomasse (Feuchtwicht), Quenching: 2,5 mL - 50 °C 60 vol% MeOH, Zellaufschluss: 1 mL MeOH, 1 mL TE Puffer, 2 mL Chloroform, - 20 °C

Zur Messung der Cofaktorkonzentration während der Biotransformation wurden nur die phosphorylierten Cofaktoren herangezogen, da die CPR der *S. pombe*, die die Elektronen für die Steroidhydroxylierung zur Verfügung stellt, nur  $\text{NADPH}$  als Reduktionsäquivalent akzeptiert (Miles, 1992). Abbildung 4.7 zeigt den Cofaktorkonzentrationsverlauf und die

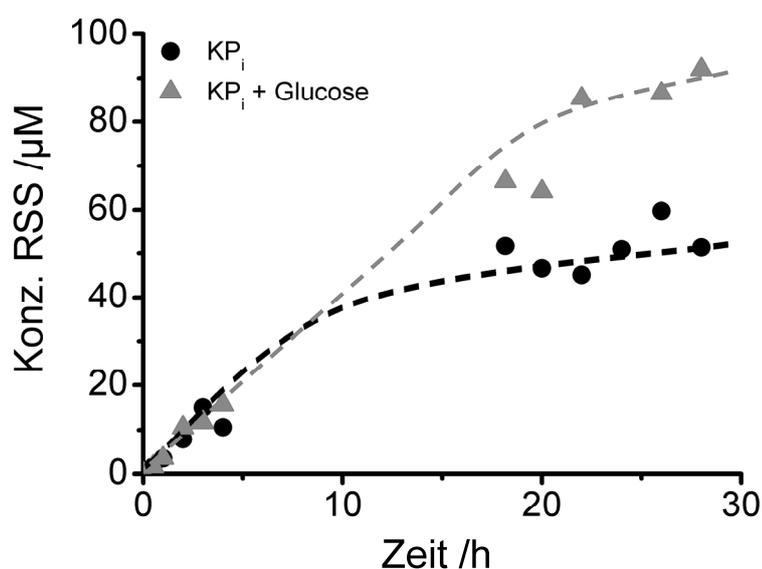
Produktbildung in Gegenwart von  $80 \text{ g L}^{-1}$  Glucose als Substrat für die Cofaktoregenerierung über den zellulären Stoffwechsel. Um zu gewährleisten, dass die Cofaktorkonzentration stets oberhalb der Sensitivitätsgrenze des MS liegt, musste die Biotransformation in Gegenwart einer hohen Biokatalysatorkonzentration von  $400 \text{ g L}^{-1}$  durchgeführt werden. Im Lauf der Reaktion sank die NADPH Konzentration, während die  $\text{NADP}^+$  Konzentration zunahm. In Abwesenheit von Substrat und Glucose kam es hingegen zu keiner signifikanten Änderung des Cofaktorpools. Die Beobachtungen konnten also auf die Steroidhydroxylierungsreaktion zurückgeführt werden. Nach 22 h wurde vollständiger Umsatz an  $17\alpha\text{-OH-Progesteron}$  erreicht und  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  NADPH und  $42 \mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{NADP}^+$  lagen im Cytosol vor. Da gegen Ende der Reaktion noch reduzierter Cofaktor in der Zelle nachweisbar war, wurde davon ausgegangen, dass der Cofaktor vermutlich nicht die Biotransformation limitiert. Allerdings kann mit der angewandten Messmethode nur die durchschnittliche Gesamtcofaktorkonzentration gemessen werden, die keinen Aufschluss über die Verteilung des Cofaktors zwischen dem Cytosol und den Zellkompartimenten gibt. So könnte es sein, dass das so detektierte NADPH in den Kompartimenten lokalisiert ist, wo es für die CYP21 nicht zugänglich ist oder die Konzentration im Cytosol zu gering ist und eine kinetische Limitierung könnte vorliegen. Da der  $K_M$ -Wert der Spalthefe-eigenen CPR für NADPH nicht bekannt ist, können hierzu keine Aussagen gemacht werden.



**Abbildung 4.7: Cytosolische Cofaktorkonzentration während der CYP21 katalysierten Hydroxylierung von  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron**

Reaktionsbedingungen Biotransformation: 250 mL Schüttelkolben,  $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ , 200 rpm,  $V = 25 \text{ mL}$ , 50 mM  $\text{KPi}$  pH 7,5, 250  $\mu\text{M}$   $17\alpha\text{-Prog}$ , 5 vol% MeOH,  $400 \text{ g L}^{-1}$  Biomasse  
 Quenching: 2,5 mL  $- 50 \text{ }^\circ\text{C}$  60 vol% MeOH, Zellaufschluss: 1 mL MeOH, 1 mL TE Puffer, 2 mL Chloroform,  $- 20 \text{ }^\circ\text{C}$

Um auszuschließen, dass die Steroidhydroxylierung durch unzureichende Cofaktorversorgung limitiert ist, wurde der Einfluss der Cofaktorregenerierung über den Stoffwechsel bestimmt, indem der Einfluss der Glucose auf die Produktbildung untersucht wurde (Abb. 4.8). Innerhalb der ersten vier Stunden war die Produktbildungsrate gleich, anschließend sank in Abwesenheit von Glucose die Produktbildungsrate. Wahrscheinlich ist das in der Zelle vorliegende NADPH komplett zu  $\text{NADP}^+$  oxidiert worden und die Hydroxylierungsreaktion kommt zum Erliegen. In Gegenwart von Glucose kann  $\text{NADP}^+$  wieder zu NADPH reduziert werden, was die Reaktion weiter antreibt. Da bei einer Regenerierung des Cofaktors über den Stoffwechsel keine erhöhte Anfangsgeschwindigkeit verzeichnet wurde, kann eine Limitierung zu Beginn der Biotransformation durch unzureichende Cofaktorversorgung ausgeschlossen werden. Die Bereitstellung der Elektronen ist also nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Steroidhydroxylierung.



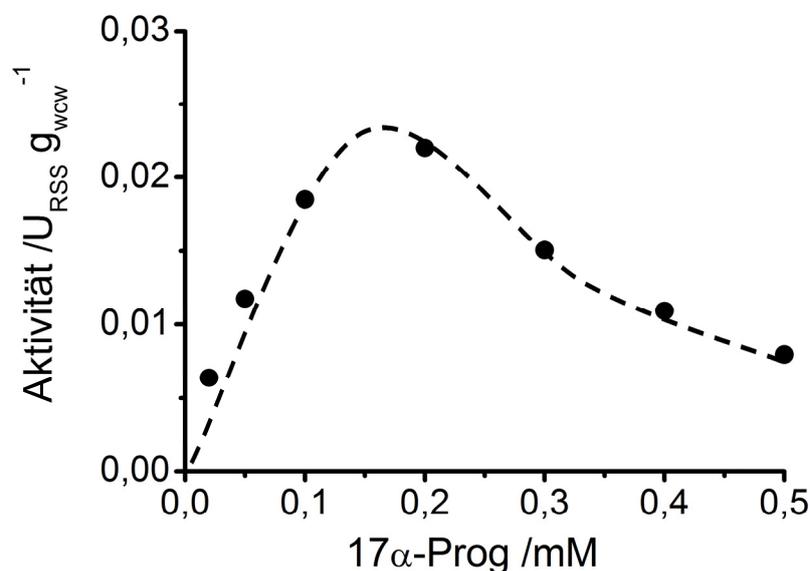
**Abbildung 4.8: Einfluss von Glucose auf die Produktbildung bei der CYP21 katalysierten Hydroxylierung von 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron**

Reaktionsbedingungen: 250 mL Erlenmeyerkolben,  $V = 25$  mL,  $T = 30$  °C, 200 rpm, 50 mM  $\text{KP}_i$  Puffer pH 6,  $20 \text{ g L}^{-1}$  Biomasse (Feuchtgewicht), 1 mM 17 $\alpha$ -Prog (in 1 vol% EtOH vorgelöst),  $40 \text{ g L}^{-1}$  Glucose

### 4.2.3 Substratlöslichkeit

Steroide sind aufgrund ihrer Hydrophobizität in Wasser kaum löslich. So beträgt die Löslichkeit des verwendeten Substrats 17 $\alpha$ -OH-Progesteron bei 30 °C nur 10  $\mu\text{M}$ . Deshalb wurde das Substrat bei den Biotransformationen in höheren Konzentrationen als Suspension eingesetzt (= Zweiphasensystem). Um eine möglichst homogene Verteilung des ausgefallenen Substrats im Reaktionsmedium erreichen zu können, wurde das

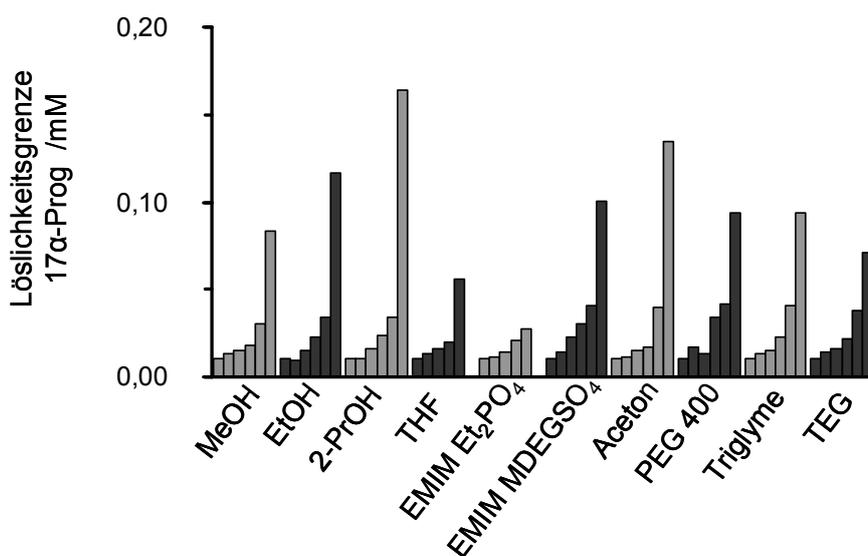
Substrat in einem organischen Lösungsmittel vorgelöst und anschließend schnell in das Reaktionsmedium pipettiert. Dabei fällt das Substrat in Form sehr kleiner Kristalle aus, die sich gut im Medium verteilen können und keine Stofftransportlimitierung auftritt (Schmitz et al., 2000). Da das ausgefallene Substrat Auswirkungen auf die Aktivität des Biokatalysators haben kann, wurde der Einfluss der Substratkonzentration auf die Aktivität des Biokatalysators untersucht (Abb. 4.9). Die maximale Aktivität wurde bei einer Substratkonzentration von 0,2 mM beobachtet. In Gegenwart höherer Substratkonzentrationen nahm die Hydroxylierungsaktivität wieder ab. Das ungelöste Substrat inhibiert also bei Konzentrationen größer 0,2 mM die Ganzzellbiotransformation.



**Abbildung 4.9: Einfluss der Konzentration an 17α-Hydroxyprogesteron auf die Aktivität der *S. pombe* CAD 18**

Reaktionsbedingungen: 250 mL Erlenmeyerkolben, V = 25 mL, T = 30 °C, 200 rpm, 50 mM KP<sub>i</sub>, Puffer pH 6, 20 g L<sup>-1</sup> Biomasse (Feuchtwicht), 1 vol% EtOH

Durch die Zugabe von Lösungsvermittlern kann die Löslichkeit des Substrats erhöht werden. Zu diesem Zweck können sowohl organische Lösungsmittel als auch ionische Flüssigkeiten eingesetzt werden. Abbildung 4.10 zeigt den Einfluss verschiedener Cosolventien in Konzentrationen von 1 – 20 vol% auf die Löslichkeit des 17α-OH-Progesteron. Die geringste Löslichkeitsverbesserung zeigten die ionische Flüssigkeit 1-Ethyl-3-methylimidazoliumdiethylphosphat (EMIM Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) und Tetrahydrofuran. 2-Propanol hingegen erhöhte die Löslichkeit des 17α-OH-Progesteron am deutlichsten, da in Gegenwart von 20 vol% 2-Propanol sogar 160 μM 17α-OH-Progesteron löslich sind.

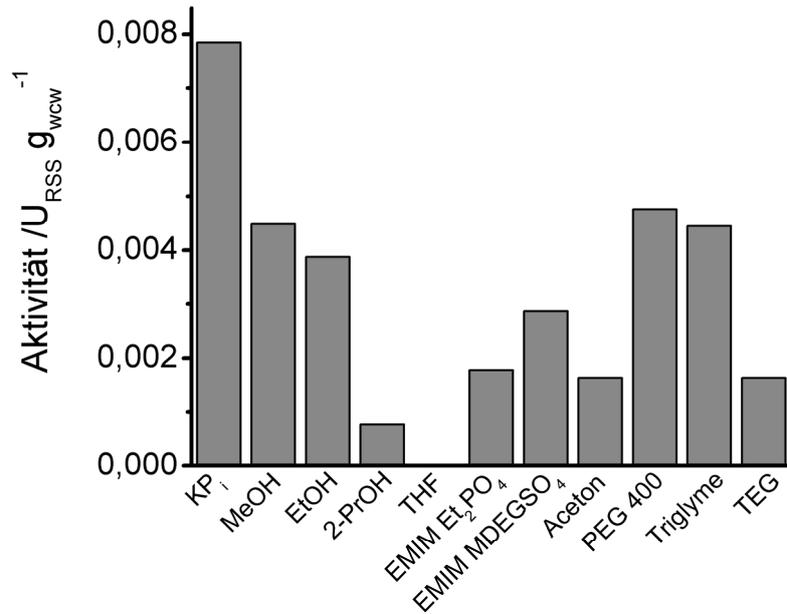


**Abbildung 4.10: Löslichkeit von 17α-Hydroxyprogesteron in Gegenwart verschiedener Cosolventien**

Reaktionsbedingungen: V = 1 mL, H<sub>2</sub>O + jeweils 1, 2, 5, 10, 20 vol% Cosolvent (Balken von links nach rechts) gesättigt mit 17α-Prog, T = 30 °C

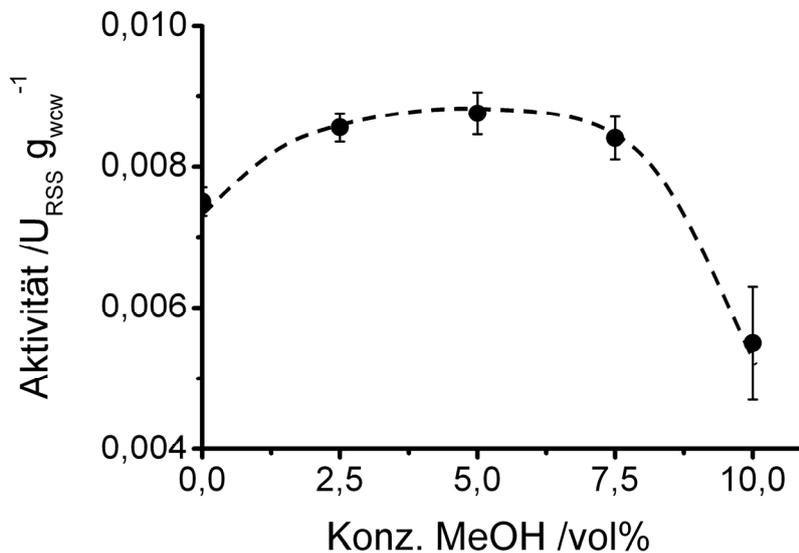
Methanol (MeOH), Ethanol (EtOH), 2-Propanol (2-PrOH), Tetrahydrofuran (THF), 1-Ethyl-3-methylimidazoliumdiethylphosphat (EMIM Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 1-Ethyl-3-methylimidazolium-2-(2-methoxyethoxy)ethylsulfat (EMIM MDEGSO<sub>4</sub>), Polyethylenglycol 400 (PEG 400), Triethylenglykoldimethylether (Triglyme), Triethylenglykol (TEG)

Allerdings kann die Zugabe des Cosolvens negative Auswirkungen auf den Ganzzellbiokatalysator haben (siehe Kapitel 1.3.2). Aus diesem Gründen wurde der Einfluss der Lösungsvermittler in einer Konzentration von 10 vol% auf die Hydroxylierungsaktivität des Biokatalysators bestimmt (Abb. 4.11). Im Vergleich zu reinem Puffer war die Aktivität in Gegenwart aller Cosolventien geringer. Wurde Tetrahydrofuran als Lösungsvermittler eingesetzt, so wurde keine Steroidhydroxylierung detektiert. 2-Propanol, welches die besten lösungsvermittelnden Eigenschaften zeigt, verringerte die Aktivität des Biokatalysators um 90 %. Die höchste Aktivität mit rund 60 % des Werts in reinem Puffer wurde in Gegenwart von Methanol und Polyethylenglykol 400 beobachtet. Die Verwendung von Methanol ist wegen einfacherer Produktaufarbeitung im Vergleich zu PEG 400 vorteilhaft. Daher wurde der Einfluss von geringen Methanolkonzentrationen auf den Biokatalysator untersucht (Abb. 4.12). Eine leichte Aktivitätssteigerung im Vergleich zu Puffer konnte beobachtet werden, wobei das Aktivitätsmaximum in Gegenwart von 2,5 - 5 vol% Methanol gemessen wurde. 5 vol% sollten als Cosolvent bei der CYP21 katalysierten Hydroxylierung eingesetzt werden.



**Abbildung 4.11: Einfluss von 10 vol% Cosolvent auf die Aktivität der *S. pombe* CAD 18**

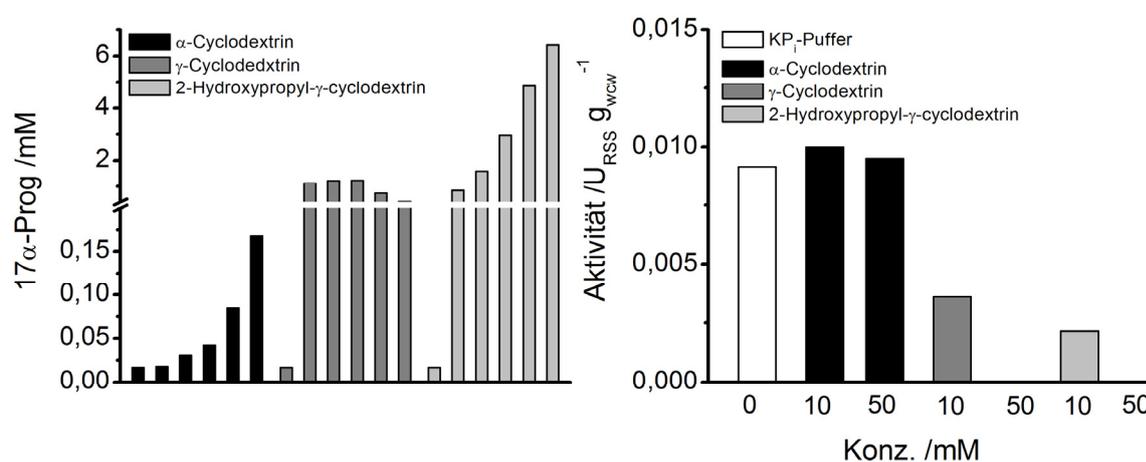
Reaktionsbedingungen: 250 mL Erlenmeyerkolben, V = 25 mL, T = 30 °C, 200 rpm, 50 mM KP<sub>i</sub>, Puffer pH 6, 10 vol% Cosolvent, 20 g L<sup>-1</sup> Biomasse (Feuchtgewicht), 100 μM 17α-Prog (in 1 vol% EtOH vorgelöst)



**Abbildung 4.12: Einfluss von Methanol auf die Aktivität der *S. pombe* CAD18**

Reaktionsbedingungen: 250 mL Erlenmeyerkolben, V = 25 mL, T = 30 °C, 200 rpm, 50 mM KP<sub>i</sub>, Puffer pH 6, 20 g L<sup>-1</sup> Biomasse (Feuchtgewicht), 100 μM 17α-Prog (in 1 vol% EtOH vorgelöst)

Als Alternative zu Cosolventien wurden drei verschiedene Cyclodextrine auf ihre Löslichkeitsverbessernde Wirkung untersucht (Abb. 4.13). Cyclodextrine sind zyklische Kohlenhydratverbindungen, die in ihrem Inneren hydrophobe Substanzen binden und so die Löslichkeit hydrophober Verbindungen erhöhen können (Hesslink et al., 1989). In Gegenwart von 100 mM der  $\gamma$ -Cyclodextrine, stieg die Löslichkeit des  $17\alpha$ -OH-Progesteron sogar in den Millimolaren Bereich. Allerdings toleriert der Biokatalysator nur sehr geringe Mengen der Cyclodextrine. Bereits in Gegenwart von 10 mM  $\gamma$ -Cyclodextrin bzw. 2-Hydroxypropyl- $\gamma$ -cyclodextrin betrug die Aktivität nur noch 40 % bzw. 23 % der Aktivität im Vergleich zu reinem Puffer. In Gegenwart von  $\alpha$ -Cyclodextrin, das die geringste Löslichkeitsverbessernde Wirkung zeigte, war die Aktivität in etwa genauso hoch wie in reinem Puffer. Der Biokatalysator zeigt also, genauso wie gegenüber Cosolventien, nur eine geringe Toleranz gegenüber Cyclodextrinen.



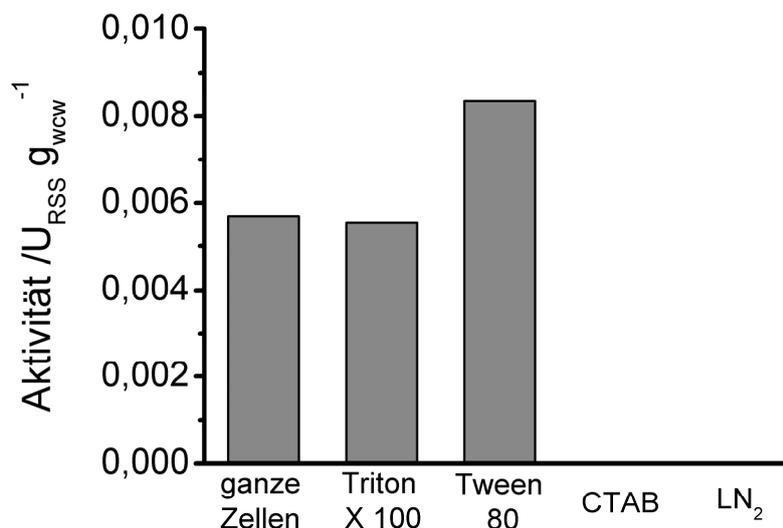
**Abbildung 4.13: Einfluss verschiedener Cyclodextrine (0, 5, 10, 20, 50 & 100 mM) auf die Löslichkeit des  $17\alpha$ -OH-Progesterons (links) bzw. auf die Aktivität (rechts) der *S. pombe* CAD 18**

Reaktionsbedingungen: Löslichkeitsuntersuchungen: V = 1 mL, H<sub>2</sub>O + Cyclodextrin mit  $17\alpha$ -Prog gesättigt, T = 30 °C

Aktivitätsbestimmungen: 250 mL Erlenmeyerkolben, V = 25 mL, T = 30 °C, 200 rpm, 50 mM KP<sub>i</sub> Puffer pH 6, 10 (50) mM Cyclodextrin, 20 g L<sup>-1</sup> Biomasse (Feuchtgewicht), 100  $\mu$ M  $17\alpha$ -Prog (in 1 vol% EtOH vorgelöst)

#### 4.2.4 Substrattransport in die Zelle

Neben der Substratlöslichkeit kann auch der Substrattransport über die Membran die Ganzzellbiotransformation limitieren. Steroide werden nicht aktiv in die Zelle transportiert sondern diffundieren über die Zellmembran (Mendel, 1989). Die Diffusionsgeschwindigkeit ist dabei von der Substratkonzentration im Reaktionsmedium und der Stärke der Membran abhängig. Um die Diffusion des Substrats zu verbessern, kann die Substratkonzentration im Reaktionsmedium erhöht werden. Im Fall der CYP21 katalysierten Steroidhydroxylierung ist die Substratkonzentration im Reaktionsmedium durch dessen Löslichkeit limitiert. Darüber hinaus kann die Durchlässigkeit der Membran durch Permeabilisieren erhöht werden. Dazu wurden die Zellen entweder mit bestimmten Detergenzien oder Lösungsmittel behandelt oder eingefroren. Da durch das Permeabilisieren niedermolekulare Substanzen wie beispielsweise die Redoxcofaktoren aus der Zelle austreten können, wurde dem Reaktionsmedium Redoxcofaktor zugegeben. Abbildung 4.14 vergleicht die Aktivität von permeabilisierten mit intakten Zellen. Die Permeabilisierung mit CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid) und mit flüssigem Stickstoff führte zu einem kompletten Aktivitätsverlust. Die Behandlung der Zellen mit Tween 80 resultierte in einer Steigerung der Aktivität um 50 %, was die Eignung dieses Detergenzes zum Permeabilisieren der Spaltheefe verdeutlicht. Darüber hinaus zeigt die Aktivitätssteigerung, dass der Substrattransport in die Zelle die Ganzzellbiotransformation limitiert.

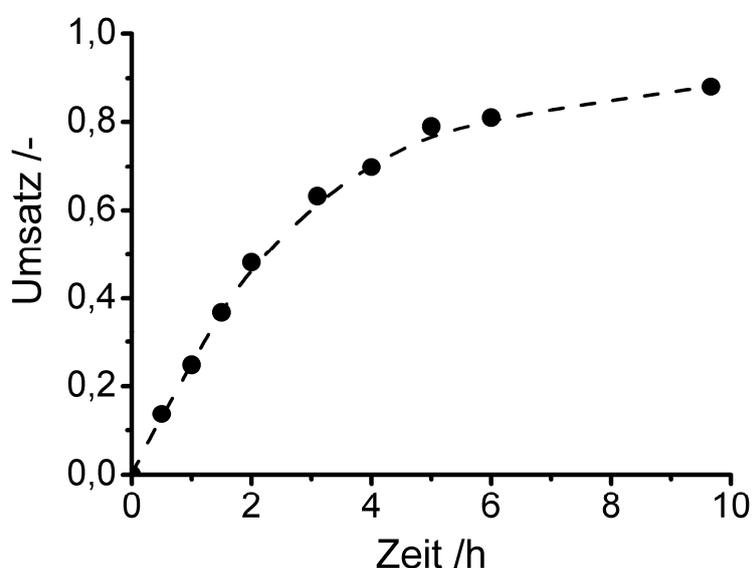


**Abbildung 4.14: Aktivität ganzer und permeabilisierter *S. pombe* CAD18**

Reaktionsbedingungen: 250 mL Erlenmeyerkolben, T = 30 °C, V = 25 mL, 200 rpm, 50 mM KP<sub>i</sub> Puffer pH 6, 20 g L<sup>-1</sup> (permeabilisierte) Biomasse (Feuchtgewicht), 100 µM 17α-Prog (in 1 vol % EtOH vorgelöst), 1,1 mM NADPH  
CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid), LN<sub>2</sub> (Flüssiger Stickstoff)

### 4.3 Satzreaktor (Batch) unter optimierten Bedingungen

Durch die zuvor gewonnenen Erkenntnisse wurde die Biotransformation unter optimierten Bedingungen, in Gegenwart von 5 vol% Methanol als Cosolvent und mit durch Tween 80 permeabilisierte Zellen durchgeführt. Um die Erniedrigung der Cofaktorkonzentration durch die Permeabilisierung zu kompensieren, wurde die Biotransformation in Gegenwart einer hohen Biokatalysatorkonzentration von  $360 \text{ g L}^{-1}$  durchgeführt. Zur effizienten Cofaktorregenerierung über den Stoffwechsel der Spalthefe wurden  $80 \text{ g L}^{-1}$  Glucose zugegeben und durch die Zugabe von  $17\alpha\text{-OH-Progesteron}$  in einer Endkonzentration von  $250 \text{ }\mu\text{M}$  die Reaktion gestartet. Abbildung 4.15 veranschaulicht den Reaktionsverlauf des Satzreaktors unter optimierten Bedingungen. Binnen 10 Stunden wurden 90 % des Substrats zum gewünschten Produkt 11-Desoxycortisol hydroxyliert. Dabei wurde eine Produktivität von  $0,54 \text{ mM d}^{-1}$  bzw.  $18 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  erreicht. Dies entspricht einer Verdopplung im Vergleich zum bisher beschriebenen Prozess (Dragan et al., 2006a). Darüber hinaus wurde mit Hilfe des Schätzwerts der CYP21 Konzentration in *S. pombe* CAD18 (Dragan et al., 2006a) die TTN berechnet. Mit einem Wert von 1 250 liegt sie in einer ähnlichen Größenordnung wie die anderen untersuchten P450 Enzyme (vgl. Kapitel 3.3 und 5.5). Tabelle 4.3 fasst die Kennzahlen des Satzreaktors zusammen.



**Abbildung 4.15: Satzreaktor zur Hydroxylierung von  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron mit *S. pombe* CAD18 unter optimierten Bedingungen**

Reaktionsbedingungen: 250 mL Schüttelkolben,  $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $V = 25 \text{ mL}$ , 200 rpm, 50 mM KPi pH 7,5,  $250 \text{ }\mu\text{M}$   $17\alpha\text{-Prog}$ , 5 vol% MeOH,  $360 \text{ g L}^{-1}$  mit Tween 80 permeabilisierte Biomasse

**Tabelle 4.3: Kennzahlen des Satzreaktors zur Hydroxylierung von 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron**

Umsatz	90 %
Ausbeute <sup>a</sup>	1,95 mg
Produktivität	18 mg L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> 0,54 mM d <sup>-1</sup>
TTN P450	1 250

a: berechnet

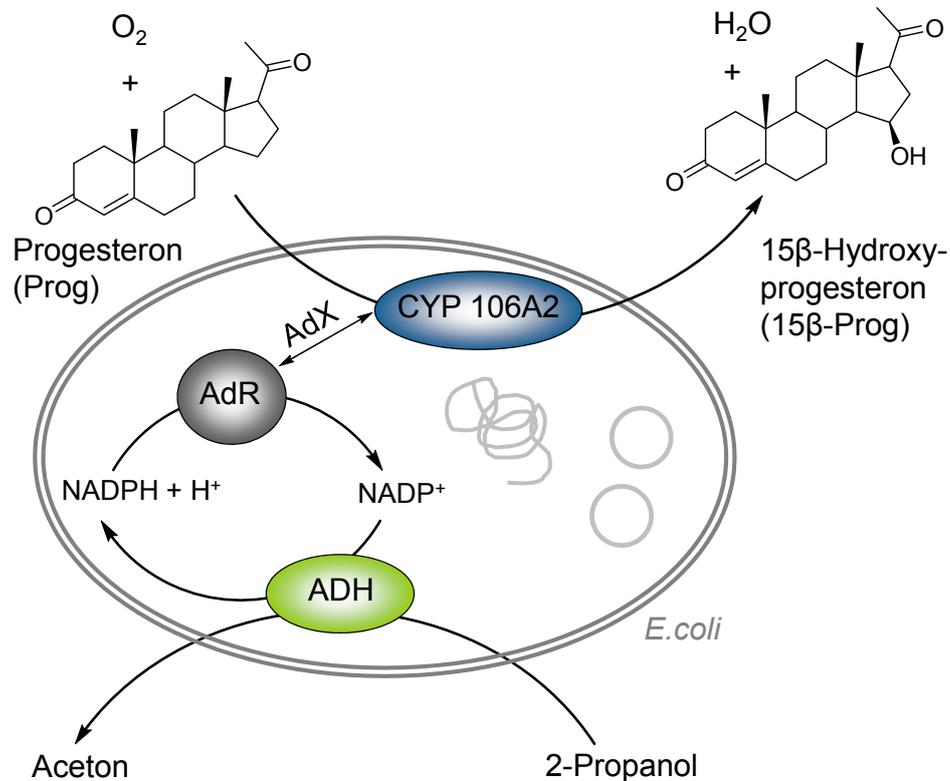
#### 4.4 Zusammenfassung

Der Einfluss verschiedener Parameter auf die CYP21 Aktivität der *S. pombe* CAD 18 wurde ermittelt:

- Eine Sauerstofflimitierung der Biotransformation konnte aufgrund theoretischer Überlegungen unter den gegebenen Bedingungen ausgeschlossen werden.
- Erstmals konnte die intrazelluläre Cofaktorkonzentration von *Schizosaccharomyces pombe* und während einer P450 katalysierten Biotransformation mittels LC-MS/MS bestimmt werden. Die Verstoffwechslung von Glucose über den Metabolismus der Spalthefe stellt eine ausreichende Versorgung an NADPH sicher.
- Die Löslichkeit des Substrats 17 $\alpha$ -OH-Progesteron in Wasser ist sehr gering (~10  $\mu$ M). Durch die Zugabe eines Wasser-mischbaren Cosolvents konnte die Substratlöslichkeit zwar gesteigert werden, allerdings nahm die Aktivität des Biokatalysators in Gegenwart von 10 vol% Cosolvents bereits drastisch ab. Die geringsten Aktivitätsverluste wurden in Gegenwart von Methanol beobachtet, dass bei einer Zugabe von 5 vol% sogar zu einer leichten Aktivitätssteigerung führt.
- Eine Limitierung der Ganzzellbiotransformation durch den Substrattransport in die Zelle wurde festgestellt. Durch Permeabilisieren mit Hilfe des Detergenzes Tween 80 konnte die Substrattransportlimitierung über die Membran überwunden werden und die Aktivität um 50 % gesteigert werden.

Durch die Optimierung der Prozessparameter konnte die Produktivität der Biotransformation im Satzreaktor von 250  $\mu$ M d<sup>-1</sup> auf 540  $\mu$ M d<sup>-1</sup> verdoppelt werden.

## 5 CYP106A2 aus *Bacillus megaterium*



**Abbildung 5.1: Schema des Ganzzellbiokatalysators zur CYP106A2 katalysierten Steroidhydroxylierung in Position 15 $\beta$**

Die CYP106A2 aus *B. megaterium* ist eine der wenigen bekannten bakteriellen Steroidhydroxylasen und wurde erstmals 1975 beschrieben (Berg et al., 1975). Dieses Enzym hydroxyliert 3-Keto-4-ensteroiden hauptsächlich in Position 15 $\beta$  (Berg et al., 1975), weshalb die CYP106A2 auch als 15 $\beta$ -Hydroxylase bezeichnet wird. Neben der Oxidation in Position 6 $\beta$  (Berg et al., 1976) ist ebenfalls die Hydroxylierung in Position 9 $\alpha$  und 11 $\alpha$  beschrieben (Lisurek et al., 2004). In Tabelle 5.1 sind bisher identifizierte Substrate und Produkte der CYP106A2 zusammengefasst. Darunter befinden sich auch zwei nicht steroidale Substrate, Anilin und Betulinsäure. Betulinsäure weist aufgrund ihrer pentazyklischen Triterpenstruktur eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu Steroiden auf. Chatterjee et al. (2000) konnten zeigen, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit die CYP106A2 für die Metabolisierung der Betulinsäure in *B. megaterium* verantwortlich ist. Die Hydroxylierung von Anilin wurde im Rahmen von Studien zu potentiellen Substraten identifiziert (Berg et al., 1981).

**Tabelle 5.1 Bisher in der Literatur beschriebene Substrate und Produkte der CYP106A2**

Substrat	Produkt(e)	Quelle
Progesteron	15 $\beta$ -Hydroxyprogesteron 11 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron 9 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron 6 $\beta$ -Hydroxyprogesteron	(Berg et al., 1976; Lisurek et al., 2004)
11-Desoxycorticosteron	15 $\beta$ -Hydroxy-11-desoxycorticosteron	(Berg et al., 1976)
Testosteron	15 $\beta$ -Hydroxytestosteron 6 $\beta$ -Hydroxytestosteron	(Berg et al., 1976)
11-Desoxycortisol (RSS)	15 $\beta$ -Hydroxy-11-desoxycortisol	(Berg et al., 1976)
17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron	15 $\beta$ -17 $\alpha$ -Dihydroxyprogesteron	(Berg et al., 1976)
Corticosteron	15 $\beta$ -Hydroxycorticosteron	(Berg et al., 1976)
Androstendion	15 $\beta$ -Hydroxyandrostendion	(Berg et al., 1976)
6-Fluor-16-methyl-11-deoxycorticosteron	6-Fluor-15 $\beta$ -hydroxy-16-methyl-11-deoxycorticosteron	(Rauschenbach et al., 1993)
Anilin	p-Aminophenol	(Berg et al., 1981)
Betulinsäure	-	(Chatterjee et al., 2000)

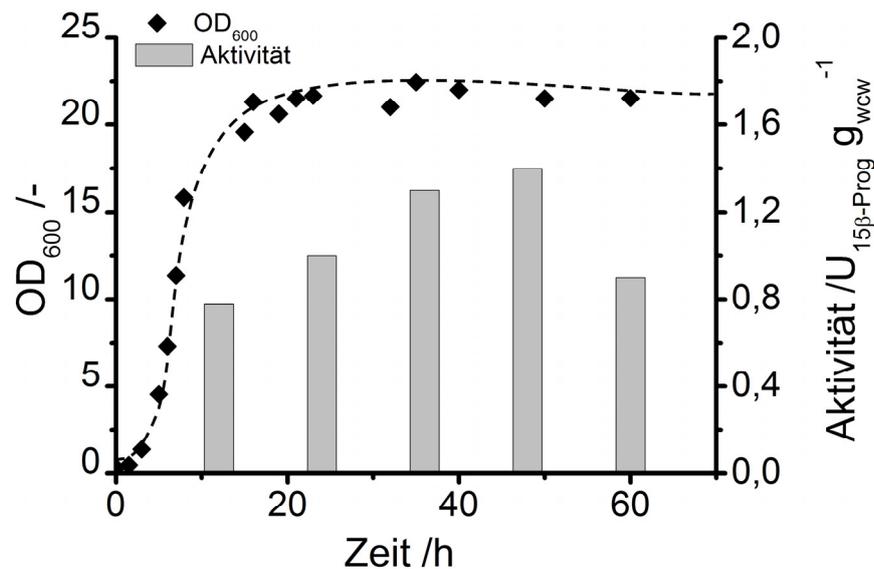
Die CYP106A2 benötigt zur Steroidhydroxylierung die Reduktase CPR und das Eisen-Schwefel Protein CPx, wobei das Enzym bereits mit unterschiedlichen Redoxpartnern erfolgreich zur Hydroxylierung eingesetzt worden ist. Neben bovinem Adrenodoxin (AdX) und Adrenodoxin Reduktase (AdR) (Berg et al., 1979; Simgen, 2000), wurden Putidareduktase und Puditaredoxin aus *Pseudomonas putida* (Agematu et al., 2006), Ferredoxin und Ferredoxin Reduktase aus *Anabaena* PCC 7119 (Lisurek et al., 2004) und ein Ferredoxin aus *Bacillus subtilis* (Ruijsenaars et al., 2007) für CYP106A2 katalysierte Reaktionen verwendet. Darüber hinaus ist die Expression der CYP106A2 in *Pseudomonas putida* (Ruijsenaars et al., 2007) und *E. coli* bekannt (Hannemann et al., 2006). Die höchste Produktivität wurde bisher mit einem Wert von 0,3 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> bei der Hydroxylierung von DOC bei einer Expression der CYP106A2 in Kombination mit Adrenodoxin und Adrenodoxin Reduktase in *E. coli* erreicht (Hannemann et al., 2006). Im Rahmen dieser Arbeit wurde zusätzlich eine enzymgekoppelte Cofaktorregenerierung durch Expression der LbADH implementiert und die Hydroxylierung von Progesteron (Prog) und Testosteron (Tes) eingehend untersucht.

## 5.1 Charakterisierung des Ganzzellbiokatalysators

Das Institut für Biochemie an der Universität des Saarlandes stellte neben einem Plasmid, das die CYP106A2 kodiert, ein Plasmid zur Verfügung, das neben den Genen der Elektronentransferkomponenten auch das Gen der *LbADH* trägt. Die Plasmide wurden mittels Hitzeschockmethode nacheinander in kompetente *E. coli* eingebracht (Hanahan, 1983). Zur Langzeitkultivierung wurden die rekombinanten Stämme als Glycerinkultur bei -80 °C gelagert, die als Ausgangspunkt der weiteren Kultivierung diente. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte durch die zeitabhängige Verfolgung der Produktbildungsrate mittels HPLC. Da eine reproduzierbare Probenahme aufgrund der inhomogenen Verteilung des Substrats und des Produkts aus einem großen Reaktionsansatz im Schüttelkolben bei der Ganzzellbiotransformation nicht möglich war, wurde die Biotransformation in Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt und pro Probenahmepunkt komplett aufgearbeitet. Es wird vermutet, dass die Steroide an der lipophilen Membran des *E. coli* adsorbieren.

### 5.1.1 Kultivierung des Biokatalysators

Ähnlich wie der rekombinante *E. coli*, der die CYP102A1 exprimiert (vgl. Kapitel 3.1.1), wurde der hier verwendete rekombinante Organismus in TB Medium mit Glycerin als C-Quelle bei 30 °C kultiviert. Abbildung 5.2 zeigt das Wachstumsverhalten des rekombinanten Organismus und die 15 $\beta$ -Hydroxylierungsaktivität in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer. Bereits nach 3 Stunden begann die etwa 9 Stunden andauernde exponentielle Wachstumsphase der Zellen, zu deren Ende eine maximale OD<sub>600</sub> von 22 erreicht wurde. Die Hydroxylierungsaktivität war nicht während des exponentiellen Wachstums am höchsten, sondern erreichte ihr Maximum in der stationären Phase nach rund 48 h Kultivierungsdauer. Da bei längerer Kultivierung die Aktivität wieder abnahm, sollte die Kultivierung des *E. coli* Stammes maximal 48 h betragen.

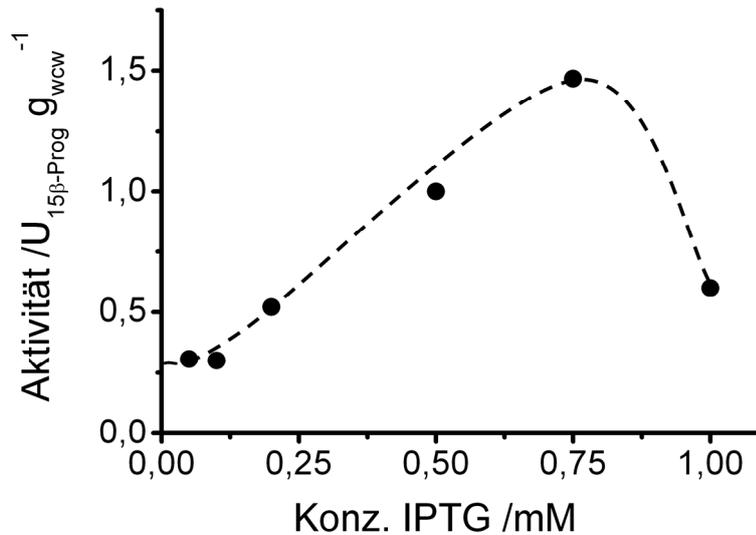


**Abbildung 5.2: Wachstum und Aktivität des *E. coli* Stammes mit CYP106A2 in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer**

Reaktionsbedingungen: Kultivierung: 1 L Erlenmeyerkolben, V = 200 mL, T = 30 °C, 200 rpm, TB Medium, mit 0,5 mM IPTG induziert

Aktivitätsbestimmungen: 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße, V = 500 µL, T = 30 °C, 1000 rpm, 50 mM KPi Puffer pH 8, 100 µM Prog (in 400 mM 2-Propanol vorgelöst), 6 g L<sup>-1</sup> Biomasse (Feuchtgewicht)

Um eine hohe Proteinexpression zu erreichen, wurde der Einfluss der Konzentration des Induktors IPTG während der Kultivierung des Organismus auf die Aktivität des Biokatalysators ermittelt (Abb. 5.3). Die maximale Hydroxylierungsaktivität lag mit  $1,5 \text{ U}_{15\beta\text{-Prog}} \text{ g}_{\text{wcw}}^{-1}$  bei einer Induktorkonzentration von 0,75 mM IPTG. Darüber hinaus wurde untersucht, ob sich die Zugabe der Hämvorstufe 5-Aminolevulinsäure (5-ALA) während der Kultivierung des *E. coli* Stammes positiv auf die Aktivität auswirkt. Eine Erhöhung der Aktivität wie bei der Expression der CYP102A1 (vgl. Kapitel 3.1) konnte aber nicht festgestellt werden. Die Zugabe von 5-ALA hat also wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Expression der CYP106A2.



**Abbildung 5.3: Einfluss der IPTG Konzentration auf die Hydroxylierungsaktivität des *E. coli* Stammes mit CYP106A2**

Reaktionsbedingungen: Kultivierung: 1 L Erlenmeyerkolben, V = 200 mL, T = 30 °C, 200 rpm, TB Medium,

Aktivitätsbestimmungen: 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße, V = 500 µL, T = 30 °C, 1000 rpm, 50 mM KPi Puffer pH 8, 100 µM Prog (in 400 mM 2-Propanol vorgelöst), 6 g L<sup>-1</sup> Biomasse (Feuchtwicht)

Mittels CO-Differenzspektroskopie (vgl. Kapitel 3.1) wurde die Menge an CYP106A2 in den Zellen bestimmt. Unter optimierten Bedingungen wurde das Enzym in Konzentrationen von 19 nmol pro Gramm Biomasse exprimiert. Das Expressionslevel ist um mehr als Faktor 2 geringer als die Expression der CYP102A1 (vgl. Kapitel 3.1). Die geringere Expression liegt höchstwahrscheinlich daran, dass das Gen des Enzyms auf einem *low-copy* Plasmid kodiert ist, das nur in einer geringen Anzahl in der Zelle vorliegt. Da beim „Ablesevorgang“ der DNA im Gegensatz zu *high-copy* Plasmiden weniger Kopien des Gens vorhanden sind, ist letztendlich auch die Genexpression geringer.

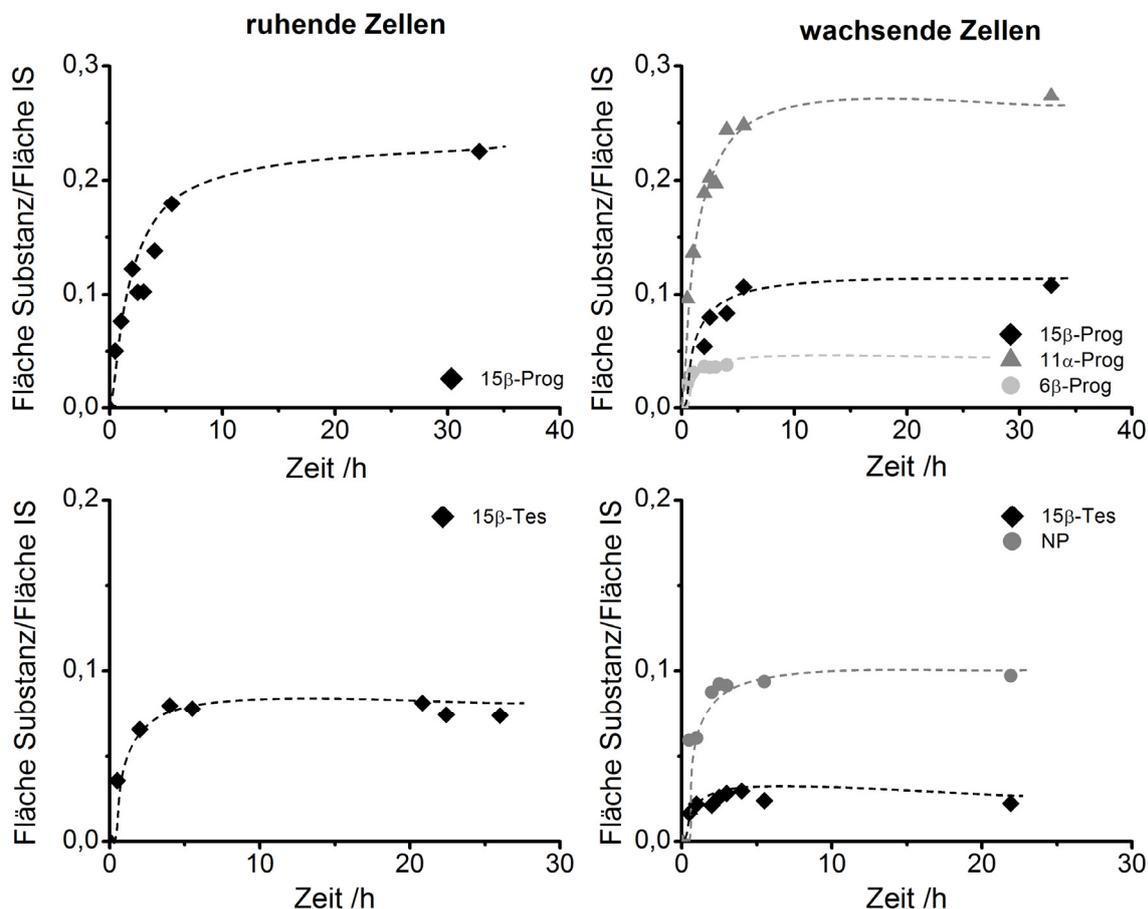
Um eine möglichst hohe 15β-Hydroxylierungsaktivität während der Biotransformation gewährleisten zu können, sollte die Kultivierung des rekombinanten *E. coli* Stammes in TB Medium etwa 48 Stunden betragen und mit 0,75 mM IPTG bei einer OD von 0,3 und bei 30 °C induziert werden.

### 5.1.2 Charakterisierung der Ganzzellbiotransformation

Neben wachsenden Zellen, kann die Biotransformation auch wachstumsentkoppelt mit ruhenden Zellen durchgeführt werden. Abbildung 5.4 vergleicht die Hydroxylierung von Testosteron und Progesteron von wachsenden und ruhenden Zellen. Wurden wachsende Zellen als Biokatalysator eingesetzt, so wurde die Bildung von zwei Nebenprodukten (NP) bei Progesteron und einem Nebenprodukt bei Testosteron als Substrat beobachtet. Anhand von kommerziell erhältlichen Referenzsubstanzen wurde versucht, die auftretenden Nebenprodukte durch einen Vergleich der Retentionszeiten in der HPLC mit entsprechenden Referenzsubstanzen zu identifizieren. Konnte bei mehreren Analysen mit geänderter Laufmittelzusammensetzung immer die gleiche Retentionszeit von Nebenprodukt und Referenzsubstanz festgestellt werden, so wurde die Probe mit der Referenzsubstanz versetzt und erneut mit der HPLC analysiert. Wurde ein eindeutiger, symmetrischer Peak für das Nebenprodukt-Referenzsubstanzgemisch identifiziert, so wurde angenommen, dass es sich bei diesem Nebenprodukt höchstwahrscheinlich um die besagte Substanz handelt. Zu einer sicheren Identifizierung der Verbindungen wären NMR-Experimente nötig, auf die vor allem wegen der Schwierigkeit die Nebenprodukte in ausreichender Menge und Reinheit zu isolieren verzichtet wurde. Mit Hilfe von Referenzsubstanzen konnten die bei der Hydroxylierung von Progesteron auftretenden Nebenprodukte  $11\alpha$ -OH-Progesteron und  $6\beta$ -OH-Progesteron wahrscheinlich identifiziert werden. Das Auftreten dieser Nebenprodukte bei der CYP106A2 katalysierten Hydroxylierung von Progesteron ist bereits in der Literatur beschrieben (Berg et al., 1976; Lisurek et al., 2004). Auffällig ist aber, dass nicht die Bildung des  $15\beta$ -OH-Progesteron überwog, sondern das Regioisomer  $11\alpha$ -OH-Progesteron, dessen Anteil nach 30 h etwa 62 % betrug. Das Nebenprodukt, das bei der Hydroxylierung von Testosteron gebildet wurde, konnte nicht identifiziert werden, da die entsprechende Referenzsubstanz nicht zur Verfügung stand. Es konnte allerdings ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem Nebenprodukt um  $6\beta$ -OH-Testosteron handelt, dessen Bildung bereits bekannt ist (Berg et al., 1976; Ruijsenaars et al., 2007), da die Retentionszeit des  $6\beta$ -OH-Testosteron nicht mit der Retentionszeit des Nebenprodukts übereinstimmte. Dies trifft genauso auf  $11\alpha$ -OH-Testosteron zu. Vermutlich handelt es sich bei dieser Substanz dennoch um ein hydroxyliertes Testosteronderivat, wie bei der Hydroxylierung von Progesteron.

Interessanterweise konnte die Nebenproduktbildung unter den gegebenen Bedingungen bei Verwendung ruhender Zellen sowohl für die Umsetzung von Progesteron als auch Testosteron komplett unterdrückt werden. Kontrollexperimente mit dem Wildtypstamm und einem rekombinanten *E. coli* der nur die *LbADH* exprimiert, zeigten keine Umsetzung

von Progesteron und Testosteron. Dadurch konnte die Nebenproduktbildung eindeutig auf das P450 Reaktionssystem zurückgeführt werden. Aufgrund der verbesserten Selektivität sind ruhende Zellen als Biokatalysator vorzuziehen.



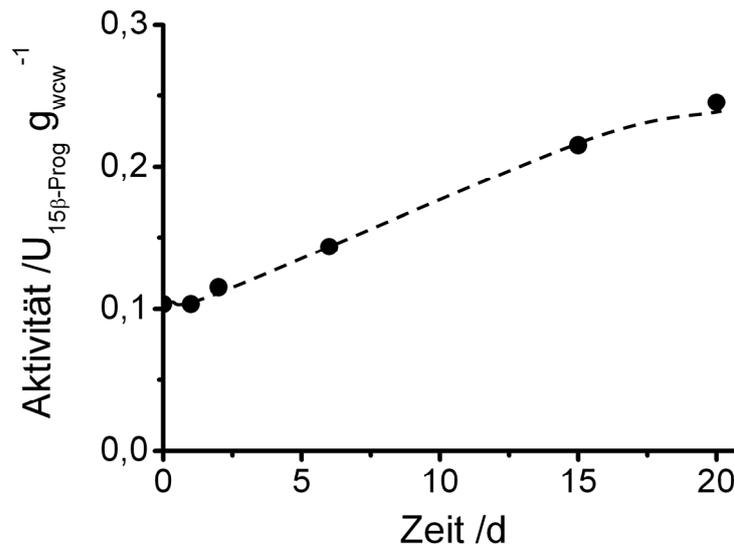
**Abbildung 5.4: Hydroxylierung von Progesteron (oben) und Testosteron (unten) durch ruhende (links) und wachsende (rechts) *E. coli* Zellen mit CYP106A2**

Aufgrund des Fehlens von Kalibriergeraden wird die Fläche der Peaks bezogen auf die Peakfläche des IS angegeben.

Reaktionsbedingungen: 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße,  $V = 500 \mu\text{L}$ ,  $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ , 1000 rpm, 50 mM  $\text{KPi}$  Puffer pH 8/TB-Medium, 250  $\mu\text{M}$  Prog/Tes (in 400 mM 2-Propanol vorgelöst), 20  $\text{g L}^{-1}$  Biomasse (Feuchtgewicht)

Die Lagerung bereits induzierter Zellen ohne Aktivitätsverluste vereinfacht den experimentellen Aufwand, da die Biotransformation nicht unmittelbar nach der Kultivierung der Zellen durchgeführt werden muss. Zusätzlich kann die Kultivierung auch im größeren Maßstab durchgeführt werden, um die Biokatalysatorversorgung für die Biotransformationen, die in einem längeren Zeitraum durchgeführt werden, sicherzustellen. Abbildung 5.5 zeigt die Aktivität des Biokatalysators über einen Zeitraum von 20 Tagen bei Lagerung als 20 %ige Zellsuspension bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Im Gegensatz zur Lagerstabilität der

rekombinanten Spalthefe und des rekombinanten *E. coli*, der die CYP102A1 exprimiert (vgl. Kapitel 3.1.2 und 4.1.2), stieg die Aktivität über den gesamten untersuchten Zeitraum von 20 Tagen. Die Aktivitätssteigerung könnte ihre Ursache in einer Substrattransportlimitierung über die Zellmembran haben. Im Laufe der Lagerung könnte die Membran löchrig werden, wodurch die Durchlässigkeit für lipophile Substanzen, wie Steroide, steigt und es kommt zu einer Aktivitätssteigerung. Um dies zu belegen, sind allerdings weitere Untersuchungen nötig, die an anderer Stelle erläutert werden (vgl. Kapitel 5.2.2).



**Abbildung 5.5:** Lagerstabilität des *E. coli* Stammes mit CYP106A2 bei 4 °C als 20 %ige Zellsuspension

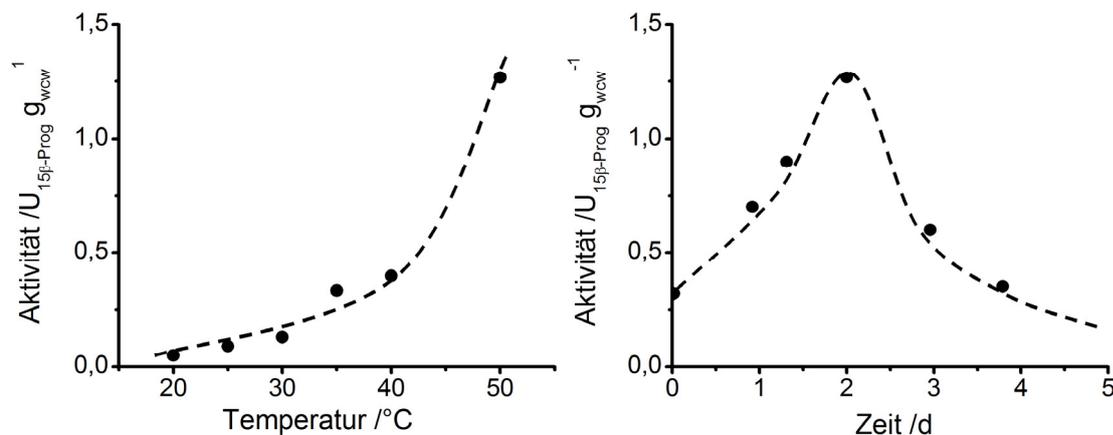
Reaktionsbedingungen: Lagerung: 50 mM  $\text{KPi}$  Puffer pH 8, 20 % Biomasse (Feuchtwicht),  $T = 4 \text{ °C}$

Aktivitätsbestimmungen: 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße,  $V = 500 \text{ }\mu\text{L}$ ,  $T = 30 \text{ °C}$ , 1000 rpm, 50 mM  $\text{KPi}$  Puffer pH 8, 100  $\mu\text{M}$  Prog (in 25 mM 2-Propanol vorgelöst),  $6 \text{ g L}^{-1}$  Biomasse (Feuchtwicht)

Die Untersuchungen zum Einfluss der Temperatur auf die Aktivität und Stabilität des Biokatalysators zeigen ähnliche Ergebnisse. Bei den Stabilitätsuntersuchungen bei unterschiedlichen Temperaturen konnte die Halbwertszeit nicht bestimmt werden, da kein exponentieller Abfall der Aktivität über den Untersuchungszeitraum beobachtet wurde. Abbildung 5.6 zeigt exemplarisch den Aktivitätsverlauf des Biokatalysators über einen Zeitraum von 5 Tagen bei einer Lagerung von 35 °C. In den ersten beiden Tagen wurde ein Anstieg der Aktivität verzeichnet, bis diese ein Maximum von  $1,28 \text{ U}_{15\beta\text{-Prog}} \text{ g}_{\text{wcv}}^{-1}$  erreichte. Anschließend nahm die Aktivität wieder ab und ist nach 4 Tagen wieder auf den ursprünglichen Wert zurückgegangen. Diese Beobachtungen könnten ebenfalls durch eine Substrattransportlimitierung erklärt werden. Zu Beginn der Lagerung würde die Hydroxylierungsaktivität aufgrund einer Steigerung der Membrandurchlässigkeit

zunehmen, solange bis die Destabilisierung des Biokatalysators zum Tragen kommt. Zu diesem Zeitpunkt wäre nicht mehr die Diffusion des Substrats über die Membran der reaktionslimitierende Schritt, sondern die eigentliche Hydroxylierungsreaktion.

Die Aktivität des Ganzzellbiokatalysators stieg exponentiell über den gesamten untersuchten Bereich von 20 – 50 °C und die maximale Aktivität wurde mit einem Wert  $1,2 \text{ U}_{15\beta\text{-Prog}} \text{ g}_{\text{wcv}}^{-1}$  bei 50 °C erreicht. Da auch der exponentielle Aktivitätsanstieg bis 50 °C höchstwahrscheinlich auf eine Substrattransportlimitierung zurückzuführen ist, wurde die Biotransformation im Rahmen der weiteren Untersuchungen bei 30 °C durchgeführt.

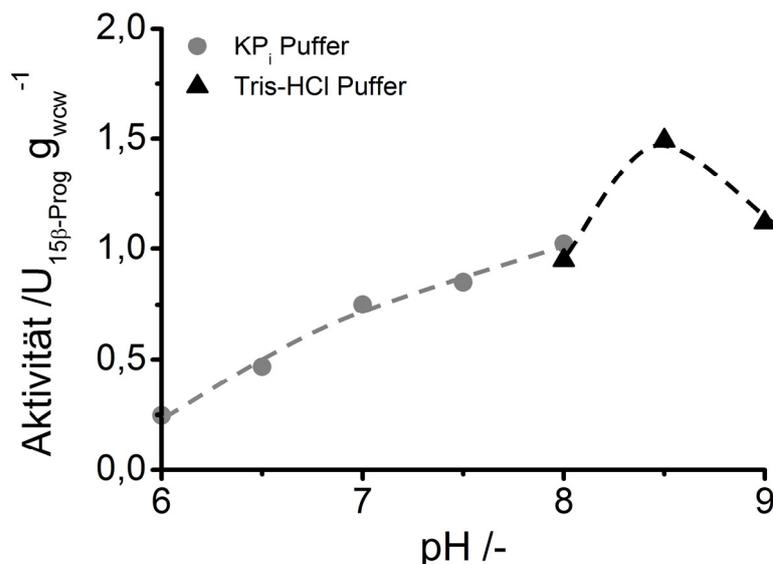


**Abbildung 5.6: Einfluss der Temperatur auf die Aktivität (links) des *E. coli* Stammes mit CYP106A2 und dessen Stabilität bei 35 °C (rechts)**

Reaktionsbedingungen: Aktivitätsbestimmungen: 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße,  $V = 500 \mu\text{L}$ , 1000 rpm, 50 mM  $\text{KP}_i$  Puffer pH 8, 100  $\mu\text{M}$  Prog (in 25 mM 2-Propanol vorgelöst),  $6 \text{ g L}^{-1}$  Biomasse (Feuchtwicht)

Stabilitätsuntersuchungen: 50 mM  $\text{KP}_i$  Puffer pH 8, 20 %ige Zellsuspension

Zusätzlich wurde der Einfluss des pH-Werts auf die Aktivität des Ganzzellbiokatalysators im Bereich pH 6 – 9 bestimmt (Abb. 5.7). Da die Pufferkapazität des Kaliumhydrogenphosphatpuffers nur bis pH 8 reicht, wurde für den basischen Bereich der Puffer Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris-HCl) eingesetzt. Um einen möglichen Einfluss der Puffersalze festzustellen, wurde die Biotransformation bei pH 8 in Gegenwart beider Puffer durchgeführt, wobei die Aktivität bei Verwendung von  $\text{KP}_i$  Puffer geringfügig höher war. Die maximale Aktivität des Biokatalysators lag bei pH 8,5. Daher sollten die Ganzzellbiotransformationen bei diesem pH-Wert durchgeführt werden.



**Abbildung 5.7: Einfluss des pH-Werts auf die Aktivität des *E. coli* Stammes mit CYP106A2**

Reaktionsbedingungen: 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße, V = 500 µL, T = 30 °C, 1000 rpm, 50 mM KP<sub>i</sub> Puffer/ 50 mM Tris-HCl Puffer, 100 µM Prog (in 25 mM 2-Propanol vorgelöst), 6 g L<sup>-1</sup> Biomasse (Feuchtwicht)

## 5.2 Parameterstudien für die Ganzzellbiotransformation

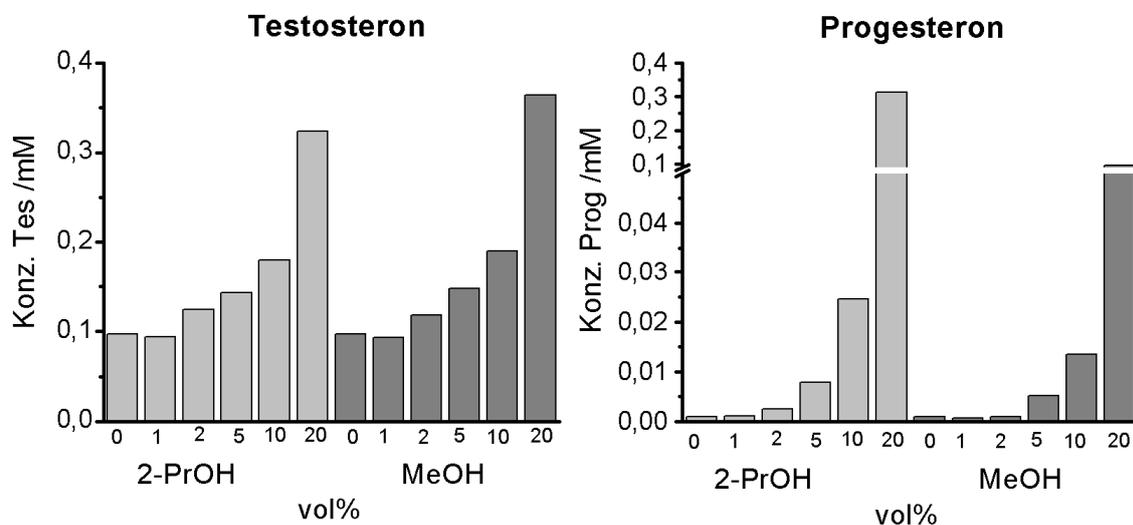
Im Rahmen der Parameterstudien sollten reaktionslimitierende Faktoren der CYP106A2 katalysierten Ganzzellbiotransformation identifiziert werden. Bisherige Voruntersuchungen zur Lagerstabilität und zum Einfluss der Temperatur auf die Stabilität des Biokatalysators deuteten auf eine Substrattransportlimitierung über die Membran hin. Solch eine Limitierung konnte auch bei der zuvor untersuchten CYP21 katalysierten Steroidhydroxylierung festgestellt werden (vgl. Kapitel 4.2.4). Deswegen wurde mit den Untersuchungen zur Substratlöslichkeit und zum Substrattransport in die Zellen begonnen, ohne vorher Sauerstoff- und Cofaktorversorgung eingehend zu charakterisieren.

### 5.2.1 Substratlöslichkeit

Die Wasserlöslichkeit der verwendeten Substrate Testosteron und Progesteron ist mit 97 µM und 1 µM sehr gering. Daher wurden die Substrate stets in Konzentrationen oberhalb deren Löslichkeitsgrenze eingesetzt. Testosteron und Progesteron wurden in einem organischen Lösungsmittel vorgelöst und anschließend schnell in das Reaktionsmedium pipettiert, wobei das nicht lösliche Substrat ausfällt. Durch die Zugabe eines Wasser-mischbaren Cosolvens kann die Löslichkeit der Steroide erhöht werden. Im Rahmen der Untersuchungen zur Identifizierung eines geeigneten Cosolvens bei der *S. pombe* CAD 18 katalysierten Hydroxylierung wurden 2-Propanol und Methanol als die

am besten geeigneten Löslichkeitsvermittler identifiziert. Die Toleranz des Biokatalysators gegenüber Methanol war am höchsten, während 2-Propanol die Substratlöslichkeit am deutlichsten steigern konnte (vgl. Kapitel 4.2.3). Außerdem ist bekannt, dass rekombinante *E. coli* Stämme, die die *LbADH* exprimieren, eine hohe Toleranz gegenüber 2-Propanol haben (Schroer et al., 2007).

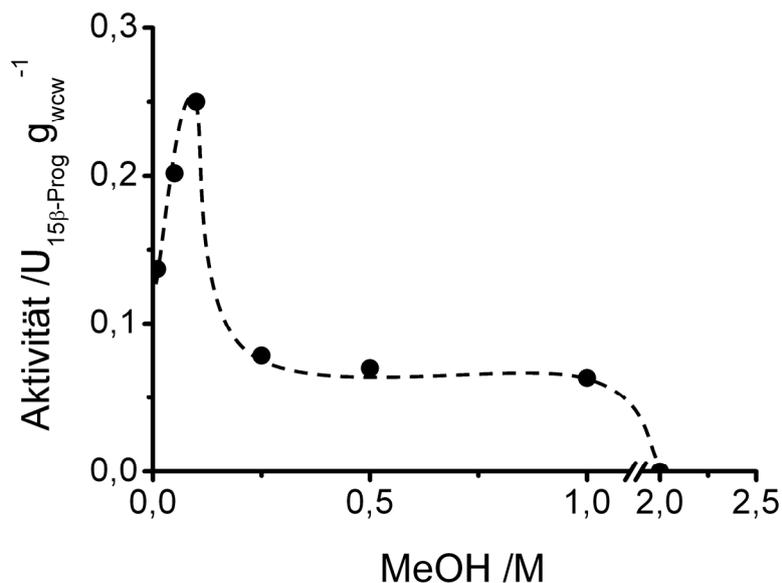
Abbildung 5.8 zeigt den Einfluss von 1 – 20 vol% Methanol und 2-Propanol auf die Löslichkeit von Progesteron und Testosteron. Methanol zeigte etwas bessere löslichkeitsvermittelnde Eigenschaften bei Testosteron während sich 2-Propanol bei Progesteron als vorteilhaft erwies. In Gegenwart von 20 vol% Methanol konnten etwa 370  $\mu\text{M}$  Testosteron und mit 20 vol% 2-Propanol etwa genauso viel Progesteron gelöst werden.



**Abbildung 5.8: Substratlöslichkeit in Abhängigkeit der Methanol- bzw. 2-Propanolkonzentration**

Reaktionsbedingungen:  $V = 1 \text{ mL}$ ,  $\text{H}_2\text{O} + 1, 2, 5, 10, 20 \text{ vol\%}$  Cosolvent gesättigt mit Prog/Tes,  $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$

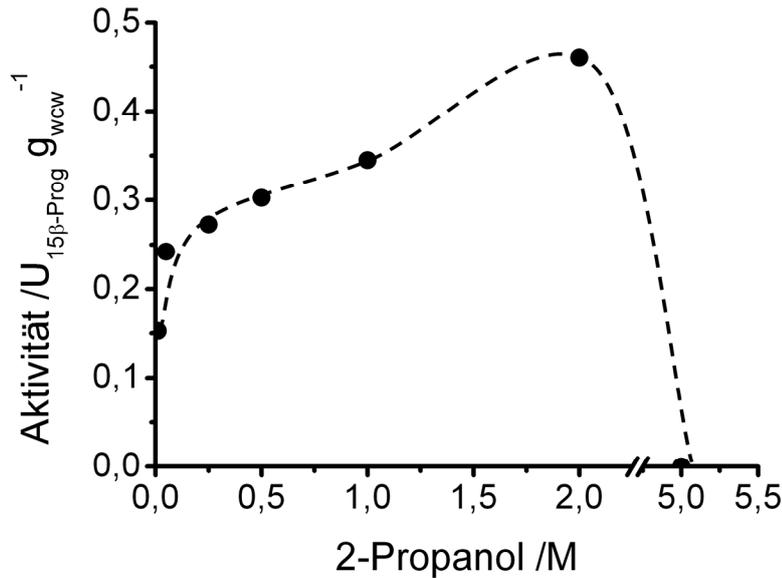
Da das jeweilige Cosolvens aber inaktivierende Effekte auf den Biokatalysator haben kann (vgl. Kapitel 1.3.2), wurde der Einfluss des Cosolvens auf die Aktivität untersucht. Wie Abbildung 5.9 zeigt, hat der rekombinante Organismus gegenüber Methanol nur eine geringe Toleranz. Die höchste Aktivität von  $0,24 \text{ U}_{15\beta\text{-Prog}} \text{ g}_{\text{wcv}}^{-1}$  wurde in Gegenwart von 0,4 vol% Methanol verzeichnet. Bei höheren Methanolkonzentrationen sank die Aktivität bis bei rund 8 vol% dieses Lösungsmittels keine Hydroxylierung von Progesteron mehr beobachtet wurde. Aufgrund der geringen Toleranz des Biokatalysators gegenüber Methanol, ist dieses Lösungsmittel als Cosolvens nicht geeignet.



**Abbildung 5.9: Einfluss von Methanol auf die Aktivität des *E. coli* Stammes mit CYP106A2**

Reaktionsbedingungen: 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße,  $V = 500 \mu\text{L}$ ,  $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ , 1000 rpm, 50 mM Tris-HCl Puffer pH 8,5, 100  $\mu\text{M}$  Prog (in 25 mM 2-Propanol vorgelöst), 6  $\text{g L}^{-1}$  Biomasse (Feuchtgewicht)

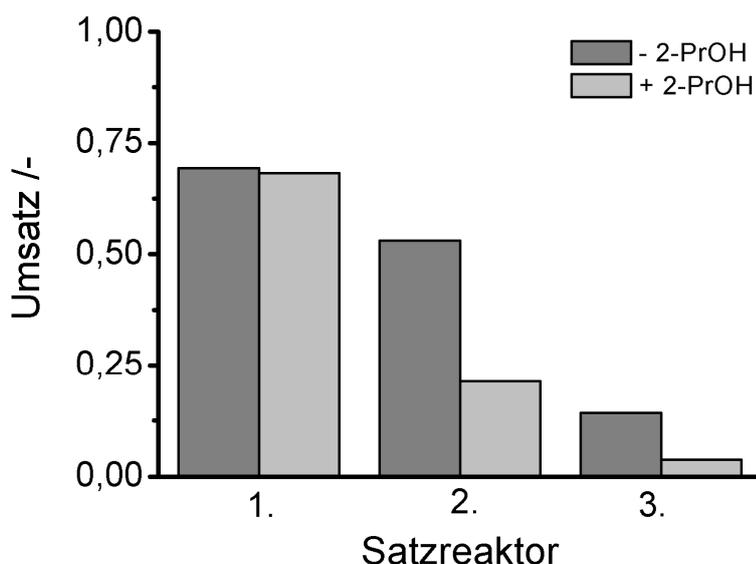
Abbildung 5.10 zeigt den Einfluss von 2-Propanol auf die Aktivität des Ganzzellbiokatalysators. Im Gegensatz zu Methanol kann der Biokatalysator hohe Konzentrationen an 2-Propanol tolerieren. Die maximale Aktivität mit  $U_{15\beta\text{-Prog}} \text{ g}_{\text{wcv}}^{-1}$  wurde bei einer Konzentration von 15,4 vol% (2 M) 2-Propanol verzeichnet. Da 2-Propanol neben der löslichkeitsvermittelnden Eigenschaft, auch als Substrat der *LbADH* dient, könnte die erhöhte Aktivität auch auf eine effizientere Cofaktorregenerierung zurückzuführen sein. Da die maximale Aktivität aber erst bei einer Konzentration von 2 M 2-Propanol, also bei einem 4000-fachen Überschuss im Vergleich zur eingesetzten Menge an Progesteron gemessen wurde, kann der Effekt nicht alleine auf einer effizienteren Cofaktorverfügbarkeit beruhen. Möglicherweise könnte die Aktivitätssteigerung auch zum Teil auf eine erhöhte Membrandurchlässigkeit zurückzuführen sein, da 2-Propanol auch zur Permeabilisierung von Zellen eingesetzt werden kann (Vrsalovic-Presecki et al., 2005).



**Abbildung 5.10: Einfluss von 2-Propanol auf die Aktivität des *E. coli* Stammes mit CYP106A2**

Reaktionsbedingungen: 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße,  $V = 500 \mu\text{L}$ ,  $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ , 1000 rpm, 50 mM Tris-HCl Puffer pH 8,5, 100  $\mu\text{M}$  Prog (in 1 vol% EtOH vorgelöst), 6 g  $\text{L}^{-1}$  Biomasse (Feuchtgewicht)

Aufgrund des beobachteten positiven Einflusses von 2-Propanol auf die Aktivität des Biokatalysators wurde eine weitere Charakterisierung dieses Lösungsvermittlers vorgenommen, indem die Stabilität des Biokatalysators in Gegenwart von 2-Propanol untersucht wurde. Die Bestimmung erfolgte unter Prozessbedingungen mit Hilfe eines repetitiven Satzreaktors, wobei 2-Propanol in einer Konzentration von rund 5 vol% (650 mM) eingesetzt wurde (Abb. 5.11). Nach jedem Reaktionszyklus wurde nach 18 Stunden Reaktionszeit der Umsatz bestimmt und mit dem Umsatz eines weiteren repetitiven Satzreaktors verglichen, der in Abwesenheit von 2-Propanol parallel durchgeführt wurde. Anschließend wurde der Ganzzellbiokatalysator durch Zentrifugation vom Reaktionsmedium abgetrennt, gewaschen und erneut zur Biotransformation eingesetzt. Beim ersten Reaktionszyklus war der Umsatz in An- und Abwesenheit des 2-Propanols mit rund 70 % gleich hoch. Beim zweiten Zyklus allerdings brach der Umsatz in Gegenwart von 2-Propanol deutlich ein und betrug nur noch 22 %, während beim Referenzsatzreaktor noch mehr als 50 % 15 $\beta$ -OH-Progesteron gebildet wurden. Beim dritten Reaktionszyklus war der Umsatz in Gegenwart von 2-Propanol ebenfalls geringer, jedoch betrug selbst der Umsatz des Referenzsatzreaktors nur noch 15 %. 2-Propanol hat also eine destabilisierende Wirkung auf den Ganzzellbiokatalysator und eignet sich daher nur bedingt als Löslichkeitsvermittler.



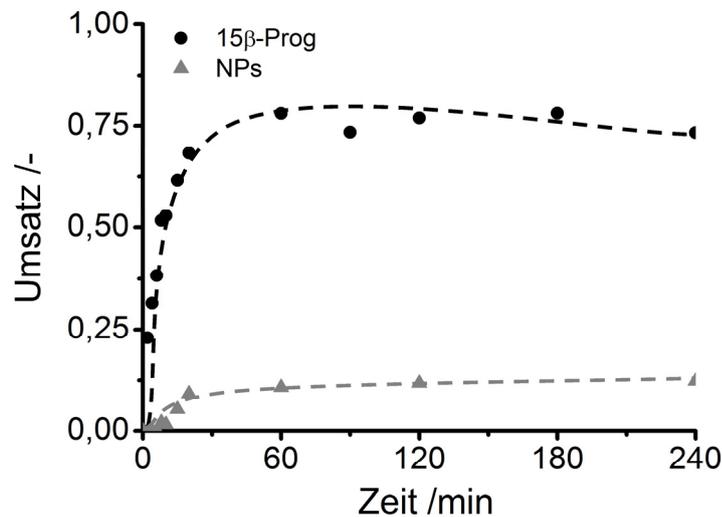
**Abbildung 5.11: Einfluss von 2-Propanol auf die Stabilität des *E. coli* Stammes mit CYP106A2 unter Prozessbedingungen**

Reaktionsbedingungen: 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß,  $V = 500 \mu\text{L}$ ,  $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ , 1000 rpm, 50 mM Tris-HCl Puffer pH 8,5, 100  $\mu\text{M}$  Prog (in 1 vol% EtOH vorgelöst),  $6 \text{ g L}^{-1}$  Biomasse (Feuchtgewicht), 650 mM 2-Propanol

## 5.2.2 Substrattransport in die Zelle

Der Steroidtransport in die Zelle kann durch eine Erhöhung der Membrandurchlässigkeit verbessert werden. Alternativ kann Zellrohextrakt als Biokatalysator verwendet werden, wodurch die Zellmembran als Diffusionsbarriere für das Substrat wegfällt. Da im Gegensatz zur CYP21 katalysierten Steroidhydroxylierung keine membranassoziierten Komponenten an der Reaktion beteiligt sind, scheint der Einsatz von Zellrohextrakt als Biokatalysator erfolgsversprechend und wurde daher eingehend untersucht. Zur Herstellung des Rohextrakts wurden die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen und der Überstand mit den löslichen Bestandteilen der Zelle durch Zentrifugation von den übrigen Zelltrümmern abgetrennt. Anschließend wurde der Überstand gefriergetrocknet (lyophilisiert) und zur Biotransformation eingesetzt. Abbildung 5.12 zeigt den Reaktionsverlauf. Dabei wurde eine deutliche Steigerung der Produktbildung gegenüber der Ganzzellbiotransformation beobachtet. Bereits binnen 30 Minuten wurden etwa 90 % Progesteron umgesetzt obwohl die Substratkonzentration fünfmal so hoch wie bei der Ganzzellbiotransformation war. Vergleicht man die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der Ganzzellbiotransformation mit der Verwendung von Zellrohextrakt unter der Berücksichtigung, dass 4 Gramm Biomasse nötig sind um 1 g lyophilisiertes Zellrohextrakt herzustellen, ist ersichtlich, dass die Aktivität im Vergleich zur Ganzzellbiotransformation um den Faktor 6 höher ist. Allerdings sinkt die Selektivität der Hydroxylierungsreaktion, da

rund 20 % Nebenprodukte gebildet wurden. Die Nebenproduktbildung ist in Kapitel 5.5.3 näher beschrieben, deshalb wird an dieser Stelle nicht näher darauf eingegangen.



**Abbildung 5.12: Reaktionsverlauf der Hydroxylierung von Progesteron bei der Verwendung von Zellrohextrakt als Biokatalysator**

Reaktionsbedingungen: 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß, V = 500  $\mu$ L, T = 30 °C, 1000 rpm, 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 2,5 mg mL<sup>-1</sup> Lyophilisat, 0,5 mM Prog (in 25 mM 2-Propanol vorgelöst)

**Tabelle 5.2: Vergleich der CYP106A2 Aktivität des Ganzzellbiokatalysators mit dem Zellrohextrakt**

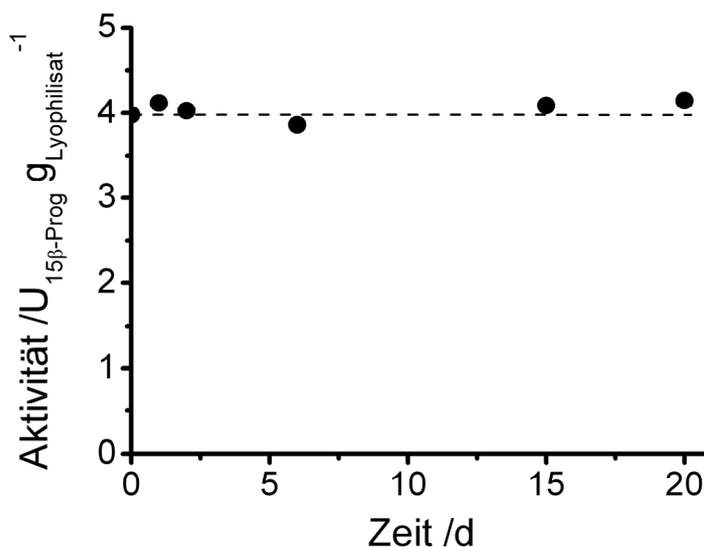
(4 g Biomasse (Feuchtgewicht) sind nötig um 1 g Lyophilisat zu erhalten)

Ganzzellbiokatalysator	Zellrohextrakt
0,4 U <sub>15β-Prog</sub> g <sub>wcw</sub> <sup>-1</sup>	9,6 U <sub>15β-Prog</sub> g <sub>Lyophilisat</sub> <sup>-1</sup>

Eine Substrattransportlimitierung über die Membran bei der Ganzzellbiotransformation konnte im Rahmen eines Vergleichs der Aktivität mit dem Zellrohextrakt eindeutig festgestellt werden. Diese Substrattransportlimitierung kann durch die Verwendung von Zellrohextrakt als Biokatalysator überwunden werden und ist dem Ganzzellbiokatalysator vorzuziehen.

### 5.3 Charakterisierung des Zellrohextrakts

Zur Charakterisierung des Zellrohextrakts für einen effizienten Einsatz als Biokatalysator wurde zunächst die Lagerstabilität des Lyophilisats bei 4 °C untersucht (Abb. 5.13). Über einen Zeitraum von 20 Tagen wurde eine gleichbleibende Aktivität registriert. Aufgrund der stabilen Lagerung können größere Mengen Zellrohextrakt hergestellt werden, die eine Vielzahl an Experimenten gewährleisten.



**Abbildung 5.13: Lagerstabilität des Zellrohextrakts als Lyophilisat bei 4 °C**

Reaktionsbedingungen: Aktivitätsbestimmung: 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß, V = 500 µL, T = 30 °C, 1000 rpm, 50 mM Tris-HCl Puffer pH 8, 500 µM Prog (in 2 vol% EtOH vorgelöst), 2,5 mg mL<sup>-1</sup> Lyophilisat, 400 mM 2-Propanol

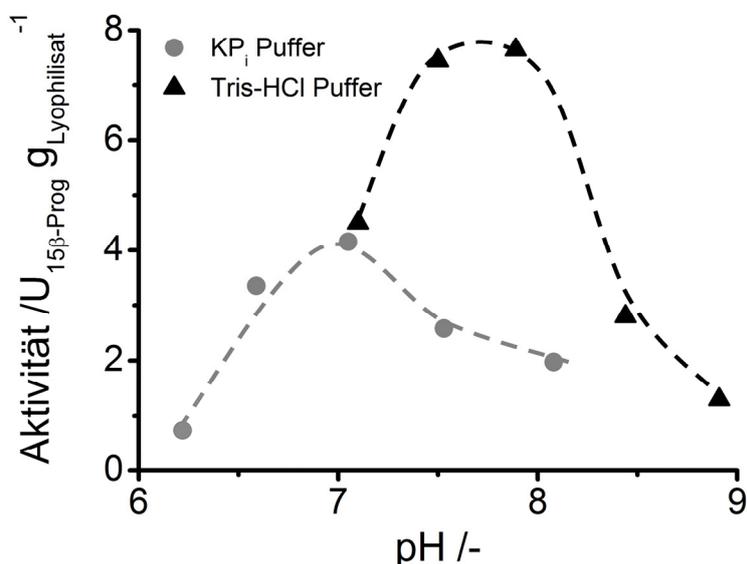
Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Chargen Lyophilisat hergestellt, deren Kennzahlen in Tabelle 5.3 zusammengefasst sind. Pro Liter Fermentationsbrühe wurden rund 2,1 g Lyophilisat erhalten, wobei der Proteingehalt des Lyophilisats 71 bzw. 82,4 % beträgt. Zur Bestimmung der P450 Konzentration im Reaktionsmedium wurde eine CO-Differenz-spektroskopie durchgeführt. Die Konzentration an CYP106A2 im Lyophilisat beträgt lediglich rund 3,5 mg g<sub>Lyophilisat</sub><sup>-1</sup> (vgl. Kapitel 5.1) Über eine photometrische NADP<sup>+</sup> Verbrauchsbestimmung wurde die Aktivität der *Lb*ADH bestimmt. Im Vergleich zur 15β-Hydroxylierungsaktivität ist sie um Faktor 100 bis 200 größer. Die unterschiedliche CYP106A2-Hydroxylierungsaktivität beider Chargen resultiert daraus, dass nur die zweite Charge unter optimalen Kultivierungsbedingungen hergestellt wurde, da die Kultivierungsdauer bei der ersten Charge nur 24 h betrug. Die P450 Konzentration der zweiten Charge ist lediglich um 15 – 20 % höher und kann also nicht der einzige Grund für die doppelt so hohe Hydroxylierungsaktivität sein. Neben der Monooxygenase tragen

auch die jeweiligen Anteile an AdR und AdX entscheidend zur Höhe der Hydroxylierungsaktivität bei (vgl. Kapitel 6.3.2).

**Tabelle 5.3: Charakteristika des Zellrohextrakts**

	1. Charge	2. Charge
Lyophilisat pro $L_{TB}$ -Medium	2,14 g	2,1 g
Protein pro $g_{Lyophilisat}$	71 %	82,4 %
CYP106A2 pro $g_{Lyophilisat}$	3,4 mg	3,84 mg
<i>Lb</i> ADH Aktivität pro $g_{Lyophilisat}$	600 $U_{Aceton}$	710 $U_{Aceton}$
$15\beta$ -Hydroxylierungsaktivität pro $g_{Lyophilisat}$	2,91 $U_{15\beta-Tes}$	6,00 $U_{15\beta-Tes}$

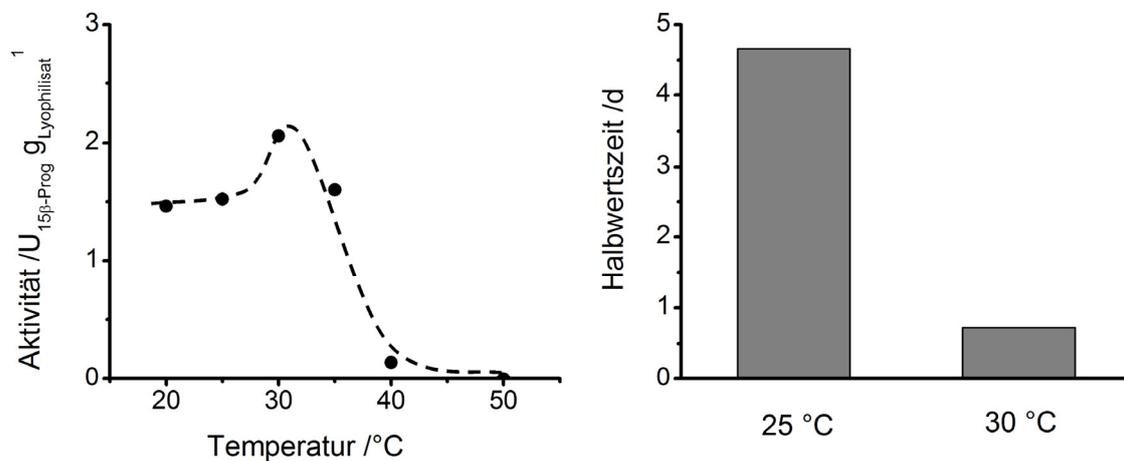
Des Weiteren wurde der Einfluss des pH-Werts auf die Aktivität des Biokatalysators bestimmt. Wie bei der Ganzzellbiotransformation wurde der Bereich pH 6 – 9 unter Verwendung von Tris-HCl und  $KP_i$  Puffer charakterisiert (Abb. 5.14). Interessanterweise lag das Aktivitätsmaximum bei  $KP_i$  Puffer bei pH 7, in Gegenwart von Tris-HCl Puffer ist die maximale Aktivität mit  $7,9 U_{15\beta-Prog} g_{Lyophilisat}^{-1}$  fast doppelt so hoch wie in  $KP_i$  Puffer und lag nicht bei pH 7, sondern zwischen pH 7,5 und 8. Warum es zu diesem Effekt kommt ist unklar. Tris-HCl Puffer ist jedoch dem Phosphatpuffer vorzuziehen.



**Abbildung 5.14: Einfluss des pH-Werts auf die CYP106A2 Aktivität des Lyophilisats**

Reaktionsbedingungen: 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß,  $V = 500 \mu L$ ,  $T = 30 \text{ }^\circ C$ , 1000 rpm, 50 mM  $KP_i$  Puffer/Tris-HCl Puffer, 500  $\mu M$  Prog (in 2 vol% EtOH vorgelöst),  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$  Lyophilisat, 400 mM 2-Propanol

Darüber hinaus wurde der Einfluss der Temperatur auf die Aktivität und Stabilität des Biokatalysators untersucht (Abb. 5.15). Zwischen 20 und 25 °C änderte sich die 15 $\beta$ -Hydroxylierungsaktivität kaum, während sie anschließend bis 30 °C exponentiell stieg und bei dieser Temperatur mit 2,2 U<sub>15 $\beta$ -Prog</sub> g<sub>Lyophilisat</sub><sup>-1</sup> ihr Maximum erreichte, bevor sie wieder abnahm. Bei 40 °C war kaum noch Aktivität vorhanden. Daher wurde die Stabilität nur bei Temperaturen von 25 °C und 30 °C untersucht. Im Gegensatz zum Ganzzellbiokatalysator, nahm die Aktivität über den Untersuchungszeitraum exponentiell ab, sodass die Effekte bei den Stabilitätsuntersuchungen des Ganzzellbiokatalysators eindeutig auf die Substrattransportlimitierung über die Zellmembran zurückzuführen sind (vgl. Kapitel 5.1.2). Die Halbwertszeit des Lyophilisats bei 30 °C betrug weniger als einen Tag, bei 25 °C waren es rund 4,5 Tage. Daher sollte die Biotransformation bei 25 °C durchgeführt werden.



**Abbildung 5.15: Einfluss der Temperatur auf die Aktivität (links) und Stabilität (rechts) des Zellrohextrakts**

Reaktionsbedingungen: Aktivitätsbestimmungen: 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß, V = 500  $\mu$ L, 1000 rpm, 50 mM Tris-HCl Puffer pH 8, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 500  $\mu$ M Prog (in 2 vol% EtOH vorgelöst), 2,5 mg mL<sup>-1</sup> Lyophilisat, 400 mM 2-Propanol  
 Stabilitätsuntersuchungen: 50 mg mL<sup>-1</sup> Lyophilisat, 50 mM Tris-HCl Puffer pH 8

## 5.4 Parameterstudien bei Verwendung von Zellrohextrakt

Nachdem bereits eine Substrattransportlimitierung über die Zellmembran festgestellt werden konnte, die durch die Verwendung von Zellrohextrakt überwunden werden konnte, sollten weitere Faktoren, wie Sauerstoff- und Cofaktorversorgung, auf eine potentielle Limitierung der Biotransformation mit Zellrohextrakt untersucht werden.

### 5.4.1 Sauerstoffversorgung

Die Aktivitätsbestimmungen wurden bei dieser P450 katalysierten Hydroxylierung nicht wie bei den beiden anderen untersuchten CYPs im Schüttelkolben, sondern in 1,5 mL geschlossenen Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Um eine mögliche Sauerstofflimitierung auszuschließen, wurde die Aktivität der Hydroxylierungsreaktion unter den gleichen Reaktionsbedingungen, jedoch in Gegenwart unterschiedlicher Lyophilisatmenge gemessen. Wie Tabelle 5.4 zeigt, unterschied sich die Aktivität pro Gramm Lyophilisat nicht signifikant, wodurch eine Sauerstofflimitierung in den geschlossenen Eppendorf-Reaktionsgefäßen ausgeschlossen werden kann. Eine Sauerstofflimitierung der CYP106A2 katalysierten Hydroxylierung sollte daher auch bei der Durchführung der Reaktion im präparativen Maßstab nicht vorliegen.

**Tabelle 5.4: CYP106A2 Aktivität bei unterschiedlicher Lyophilisatkonzentration**

2 mg mL <sup>-1</sup> Lyophilisat	4 mg mL <sup>-1</sup> Lyophilisat
9,3 U <sub>15β-Prog</sub> g <sub>Lyophilisat</sub> <sup>-1</sup>	8,76 U <sub>15β-Prog</sub> g <sub>Lyophilisat</sub> <sup>-1</sup>

### 5.4.2 Cofaktorversorgung

Bei Ganzzellbiotransformationen muss der kostenintensive Cofaktor üblicherweise nicht dem Reaktionsmedium zugegeben werden, da die Zelle über einen eigenen Redoxcofaktorpool verfügt. Beim Herstellungsprozess des Zellrohextrakts kann es aber zum Verlust des in der Zelle vorhandenen Redoxcofaktors kommen, wodurch die im Rohextrakt vorhandene Redoxcofaktorkonzentration für eine effiziente Hydroxylierung zu gering sein könnte. Daher wurde die Aktivität mit und ohne Zugabe von 0,2 mM NADP<sup>+</sup> Zugabe verglichen (Tabelle 5.5). In beiden Fällen lag die Aktivität bei rund 3 U<sub>15β-Prog</sub> g<sub>Lyophilisat</sub><sup>-1</sup>. Die im Zellrohextrakt vorhandene Menge an Cofaktor reicht also für die Biotransformation aus.

**Tabelle 5.5: CYP106A2 Aktivität des Zellrohextrakts bei Zugabe von 0,2 mM NADP<sup>+</sup>**

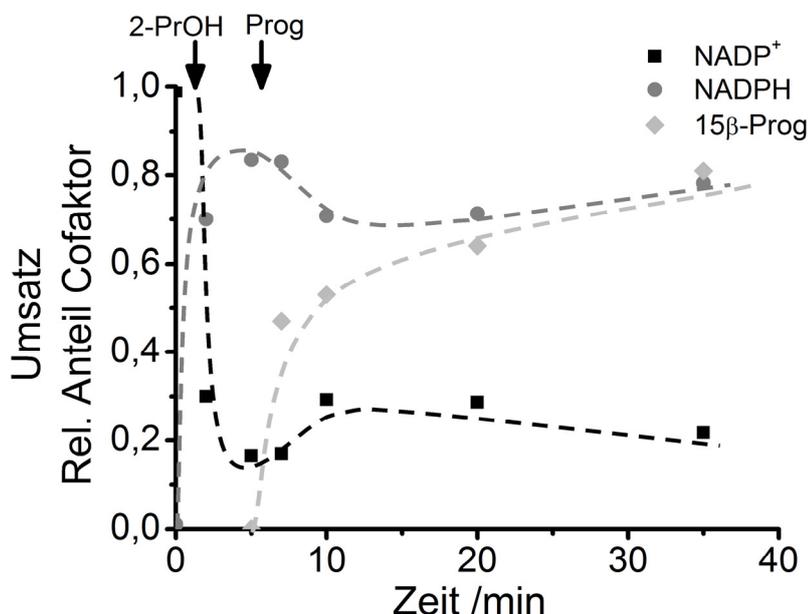
Ohne NADP <sup>+</sup> Zugabe	Bei NADP <sup>+</sup> Zugabe
3,3 U <sub>15β-Prog</sub> g <sub>Lyophilisat</sub> <sup>-1</sup>	3,03 U <sub>15β-Prog</sub> g <sub>Lyophilisat</sub> <sup>-1</sup>

Um nähere Informationen über die Cofaktorkonzentration im Zellrohextrakt zu erhalten, wurden LC-MS/MS Messungen durchgeführt. Hierfür wurde das Protokoll zur Bestimmung der intrazellulären Cofaktorkonzentration des rekombinanten Spalthefestamm adaptiert (vgl. Kapitel 4.2.2). Zuerst wurde die zu untersuchende Zellrohextraktlösung mit -50 °C kaltem Methanol gequenchet und nach der Ultrafiltration über eine Membran (*cut off*: 10kDA) zur Abtrennung eines Großteils der Proteine erfolgte die LC-MS/MS Messung. Die absolute Cofaktorkonzentration wurde über Kalibriergeraden, die in Gegenwart von Zellrohextrakt, das unter den gleichen Aufarbeitungsschritten wie die Probe vorbereitet wurde, berechnet (vgl. Matrixeffekt Kapitel 4.2.2). Tabelle 5.6 zeigt die gemessenen Cofaktorkonzentrationen der beiden im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellrohextraktchargen. Zwischen den beiden Chargen wurden nur geringe Konzentrationsunterschiede festgestellt. Im Vergleich zu den oxidierten Cofaktoren ist die Konzentration der reduzierten Cofaktoren mit Konzentrationen zwischen 8 und 35 nmol g<sub>Lyophilisat</sub><sup>-1</sup> sehr gering. NAD<sup>+</sup> ist in einer Konzentration von rund 900 nmol g<sub>Lyophilisat</sub><sup>-1</sup> vertreten und NADP<sup>+</sup> mit einer Konzentration von rund 1700 nmol g<sub>Lyophilisat</sub><sup>-1</sup> am meisten vorhanden. Der Anteil an phosphoryliertem Cofaktor, der für dieses Reaktionssystem von Bedeutung ist, ist daher etwa zwei Mal so hoch wie der des nicht phosphorylierten Redoxcofaktors. Wie hoch die Cofaktorkonzentration im Biotransformationsansatz sein muss, um nicht reaktionslimitierend zu sein, kann mit Hilfe des K<sub>M</sub> Werts des entsprechenden Enzyms abgeschätzt werden. Der K<sub>M</sub> Wert gibt die jeweilige Cofaktorkonzentration an, bei der die halbmaximale Aktivität des Enzyms erreicht wird. Die Cofaktorkonzentration in Lösung sollte daher unbedingt diesen Wert überschreiten. Der K<sub>M</sub> Wert der *LbADH* für NADP<sup>+</sup> liegt bei 1,6 μM (Schroer et al., 2009), der bereits bei einer Lyophilisatkonzentration von 1 mg mL<sup>-1</sup> erreicht wird. Die AdR, die NADPH oxidiert, um die Elektronen für die gewünschte Steroidhydroxylierung bereitstellen zu können, hat einen K<sub>M</sub> Wert für NADPH von 1,8 μM (Chu et al., 1973). Unter der Annahme einer effizienten Cofaktorregenerierung durch die *LbADH*, die etwa 80 % des oxidierten NADP<sup>+</sup> reduziert, würden bei einer Lyophilisatkonzentration von 1,4 mg mL<sup>-1</sup> 1,8 μM NADPH im Reaktionsmedium vorliegen. Dies bestätigt, dass bereits geringe Lyophilisatkonzentrationen ausreichen, um genügend Cofaktor für eine effiziente Biotransformation bereitzustellen.

**Tabelle 5.6: Cofaktorkonzentration des Zellrohextrakts in nmol g<sub>Lyophilisat</sub><sup>-1</sup>**

	NAD <sup>+</sup>	NADH	NADP <sup>+</sup>	NADPH
1. Charge	996 ± 45	10,57 ± 4,2	1636 ± 126	8,4 ± 1,4
2. Charge	819 ± 14	20,36 ± 0,2	1833 ± 17	35 ± 2

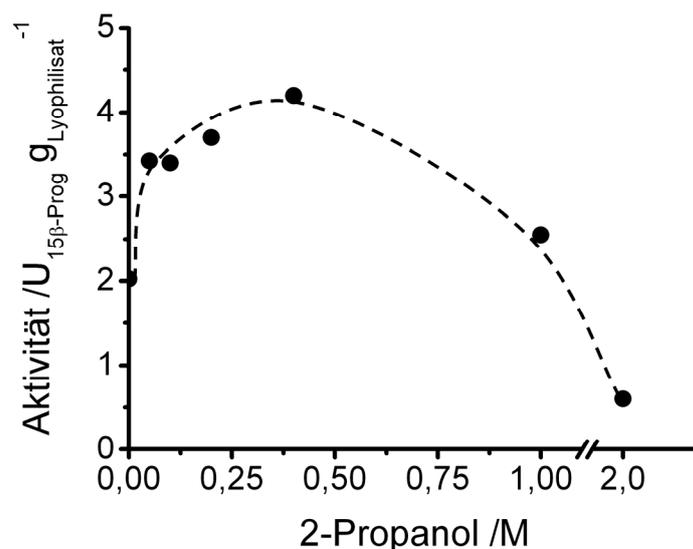
Des Weiteren wurde die Cofaktorkonzentration während der Biotransformation bestimmt. Da die AdR nur NADPH als Cofaktor akzeptiert (Chu et al., 1973) wurden nur die phosphorylierten Redoxcofaktoren für die Messungen herangezogen. Abbildung 5.16 stellt den relativen Anteil an Cofaktor und den Umsatz der Hydroxylierung von Progesteron über den Reaktionsverlauf dar. Um den Einfluss der Cofaktorregenerierung zu erfassen, wurde zuerst 2-Propanol zugegeben ohne gleichzeitig die CYP106A2 katalysierte Hydroxylierung von Progesteron zu starten. Binnen weniger Minuten stieg der Anteil des reduzierten Cofaktors von 1 % auf rund 85 %. Dies verdeutlicht die hohe Effizienz der Cofaktorregenerierung durch die *Lb*ADH. Wurde die Hydroxylierung von Progesteron gestartet, sank der Anteil des NADPH auf rund 70 %. Zu diesem Zeitpunkt wurden bereits 50 % 15 $\beta$ -OH-Progesteron gebildet. Anschließend verlangsamte sich die Produktbildung, wodurch auch der Anteil an reduzierten Cofaktor etwas stieg. Über die gesamte Dauer der Biotransformation lag der Cofaktor zum größten Teil in seiner reduzierten Form vor. Daher kann eine Limitierung der Steroidhydroxylierung durch unzureichende Cofaktorregenerierung ausgeschlossen werden.

**Abbildung 5.16: Cofaktorverlauf während der CYP106A2 katalysierten Hydroxylierung von Progesteron**

Reaktionsbedingungen: 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß, V = 500  $\mu$ L, T= 25 °C, 1000 rpm, 10 mg mL<sup>-1</sup> Lyophilisat, 50 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 300 mM 2-Propanol (Gesamtkonz. während der Biotransformation 400 mM) 500  $\mu$ M Prog (in 100 mM 2-Propanol vorgelöst)

### 5.4.3 Substratlöslichkeit

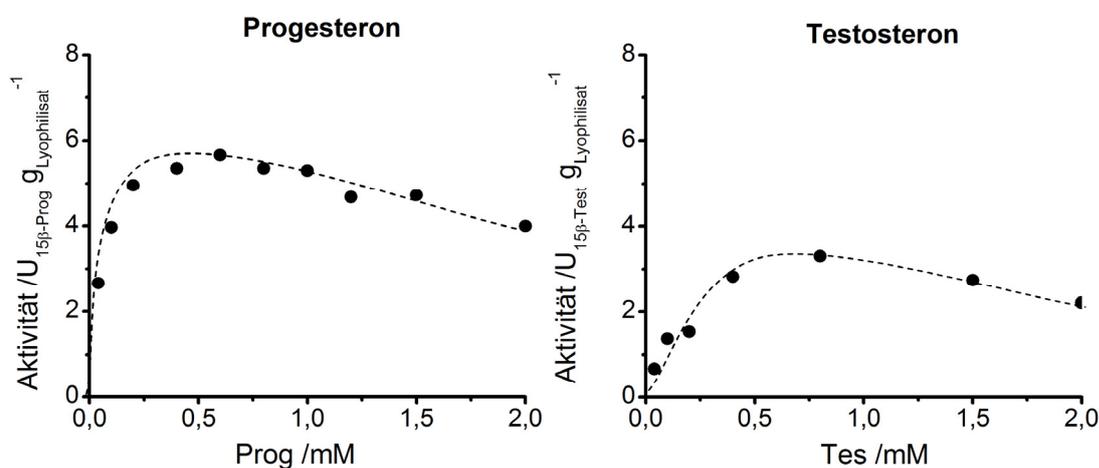
Die geringe Wasserlöslichkeit von Progesteron und Testosteron kann durch die Zugabe eines geeigneten Lösungsvermittlers, wie beispielsweise 2-Propanol, erhöht werden. Untersuchungen zur CYP106A2 katalysierten Ganzzellbiotransformation ergaben, dass der rekombinante *E. coli* Stamm eine hohe Toleranz gegenüber 2-Propanol zeigt. Die maximale Aktivität des Biokatalysators wurde in Gegenwart von 2 M (15,4 vol%) 2-Propanol erreicht (Vgl. Kapitel 5.2.1). Den Einfluss von 2-Propanol auf die CYP106A2 Aktivität des Zellrohextrakts verdeutlicht Abbildung 5.17. Die Zugabe von lediglich 50 mM 2-Propanol führte bereits zu einer 75 %igen Erhöhung der Aktivität. In diesem Konzentrationsbereich ist aber höchstwahrscheinlich nicht eine Verbesserung der Substratlöslichkeit, sondern die effizientere Cofaktorversorgung durch die Cofaktorregenerierung über die *LbADH* für die Steigerung der Aktivität verantwortlich. Bis zu einer Zugabe von 400 mM 2-Propanol wurde eine stetige Zunahme der Aktivität beobachtet. Im Gegensatz zum Ganzzellbiokatalysator ist die Stabilität des Zellrohextrakts geringer, denn in Gegenwart von 2 M 2-Propanol, bei der der Biokatalysator die maximale Aktivität zeigte, ist im Zellrohextrakt nur noch ein Viertel der ursprünglichen Aktivität vorhanden. Die verringerte 2-Propanoltoleranz beruht wahrscheinlich darauf, dass im Zellrohextrakt die Konzentration an 2-Propanol auf die an der Reaktion beteiligten Proteinkomponenten wirkt, die im Reaktionsmedium vorliegt. Beim Ganzzellbiokatalysator hingegen wirkt die Zellmembran als Diffusionsbarriere für das 2-Propanol und so ist die Konzentration an 2-Propanol im Cytosol vermutlich geringer als im Reaktionsmedium. Die 2-Propanolkonzentration sollte aufgrund destabilisierender Effekte maximal 400 mM betragen.



**Abbildung 5.17: Einfluss von 2-Propanol auf die CYP106A2 Aktivität des Lyophilisats**

Reaktionsbedingungen: 1,5 mL Eppendorf Reaktionsgefäß, V = 500 mL, T = 25 °C, 1000 rpm, 2,5 mg mL<sup>-1</sup> Lyophilisat, 50 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 µM Prog (in 1 vol% EtOH vorgelöst)

Unter den gegebenen Reaktionsbedingungen wurde die maximale Löslichkeit des in einer Konzentration von 0,5 mM eingesetzten Substrats bei weitem überschritten (vgl. Kapitel 5.2.1) und der Großteil der Steroide lag als Feststoff im Reaktionsansatz vor. Um festzustellen, ob das unlösliche Substrat den Biokatalysator inhibiert, wurde der Einfluss der Substratkonzentration auf die Aktivität des Biokatalysators bestimmt (Abb. 5.18). Sowohl bei Progesteron als auch bei Testosteron, wurde im untersuchten Konzentrationsbereich eine Inhibierung beobachtet. Bis zu einer Substratkonzentration von etwa 0,6 mM nahm die Aktivität in beiden Fällen zu, bevor sie ihr Maximum erreichte und anschließend wieder abnahm. Um eine möglichst hohe Aktivität während der Biotransformation gewährleisten zu können, sollte also eine geringe Substratkonzentration von maximal 0,6 mM gewählt werden.



**Abbildung 5.18: Einfluss der Konzentration von Progesteron (links) und Testosteron (rechts) auf die CYP106A2 Aktivität des Zellrohextrakts**

Die Löslichkeit des Prog beläuft sich auf 22  $\mu\text{M}$ , die des Tes auf 125  $\mu\text{M}$  unter den gegebenen Bedingungen

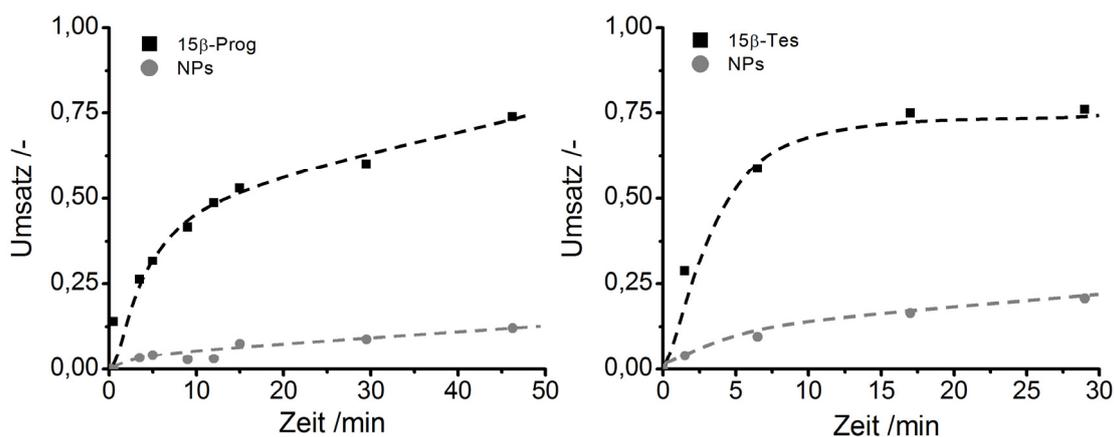
Reaktionsbedingungen: 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße,  $V = 500 \text{ mL}$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ , 1000 rpm,  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  Lyophilisat ( $4 \text{ mg mL}^{-1}$  bei Tes), 50 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 400 mM 2-Propanol, Prog und Tes in 1 vol% EtOH vorgelöst

## 5.5 Biotransformation unter optimierten Bedingungen

### 5.5.1 Biotransformation im Satzreaktor (Batch)

Nach der Charakterisierung der CYP106A2 katalysierten  $15\beta$ -Hydroxylierung, wurde die Biotransformation im Milliliter-Maßstab unter optimierten Bedingungen zur präparativen Herstellung von  $15\beta$ -OH-Progesteron und  $15\beta$ -OH-Testosteron durchgeführt. Sowohl bei der Hydroxylierung von Progesteron als auch von Testosteron wurde eine Startsubstratkonzentration von 0,5 mM gewählt und 2-Propanol in einer Konzentration von 400 mM zugegeben. Da die Testosteronhydroxylierung langsamer abläuft als die

Umsetzung von Progesteron wurde eine Lyophilisatkonzentration von  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  gewählt, bei der Hydroxylierung von Progesteron betrug sie  $4 \text{ mg mL}^{-1}$ . Abbildung 5.19 zeigt den Reaktionsverlauf. Die Umsetzung von Prog wurde nach 45 Minuten bei einem Umsatz von 85 % gestoppt, wobei sich rund 14 % Nebenprodukte innerhalb des entsprechenden Zeitraums gebildet hatten. Dabei wurde eine Produktivität von  $3,75 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  für das gewünschte Produkt erreicht. Um Aufschluss über die Katalysator- und Cofaktorausnutzung zu erhalten, wurde die maximale Zyklenzahl für die CYP106A2 und den Cofaktor bestimmt. Für die P450 konnte eine TTN von 1300 ermittelt werden während ein Wert von 56 für den Cofaktor erreicht wurde. Der Satzreaktor zur Hydroxylierung des Testosterons wurde bereits nach etwa 30 Minuten gestoppt. Dabei wurde ein Umsatz von 96 % erreicht und das gewünscht Produkt  $15\beta\text{-OH-Testosteron}$  mit einer Selektivität von 79 % gebildet. Die erreichte Produktivität ist größer  $5,5 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , die TTNs für die Cytochrom P450 Monooxygenase und den Cofaktor sind allerdings im Vergleich zum Satzreaktor zur Hydroxylierung von Progesteron mit Werten von rund 600 und 25 um den Faktor 2 geringer.



**Abbildung 5.19: Satzreaktoren zur Hydroxylierung von Progesteron (links) und Testosteron (rechts) unter optimierten Bedingungen**

Reaktionsbedingungen: Progesteronumsetzung:  $V = 20 \text{ mL}$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $50 \text{ mM}$  Tris-HCl Puffer pH 8,  $1 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $4 \text{ mg mL}^{-1}$  Lyophilisat,  $0,5 \text{ mM}$  Prog (in  $400 \text{ mM}$  2-Propanol vorgelöst)  
 Testosteronumsetzung:  $V = 40 \text{ mL}$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $50 \text{ mM}$  Tris-HCl Puffer pH 8,  $1 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  Lyophilisat,  $0,5 \text{ mM}$  Tes (in  $400 \text{ mM}$  2-Propanol vorgelöst)

Die Kennzahlen der Satzreaktoren sind in Tabelle 5.7 zusammengefasst. Mit einer Produktivität von  $5,5 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  für die Bildung von  $15\beta\text{-OH-Testosteron}$ , konnte im Vergleich zu in der Literatur beschriebenen Werten eine Steigerung der Produktivität um den Faktor 18 erreicht werden (Hannemann et al., 2006). Damit konnten im Rahmen dieser Arbeit erstmals Produktivitäten für die CYP106A2 katalysierte Steroidhydroxylierung im Gramm Bereich erzielt werden.

**Tabelle 5.7: Kennzahlen der Umsetzung von Progesteron und Testosteron im Satzreaktor**

	Progesteron	Testosteron
Umsatz	85 %	96 %
Selektivität	86 %	79 %
Produktausbeute <sup>a</sup>	73 %	76 %
	3 mg	5,7 mg
Produktivität	11,4 mM d <sup>-1</sup>	18,2 mM d <sup>-1</sup>
	3,75 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>	5,5 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>
TTN P450	1323	605
TTN Cofaktor	56	25

a: berechnet

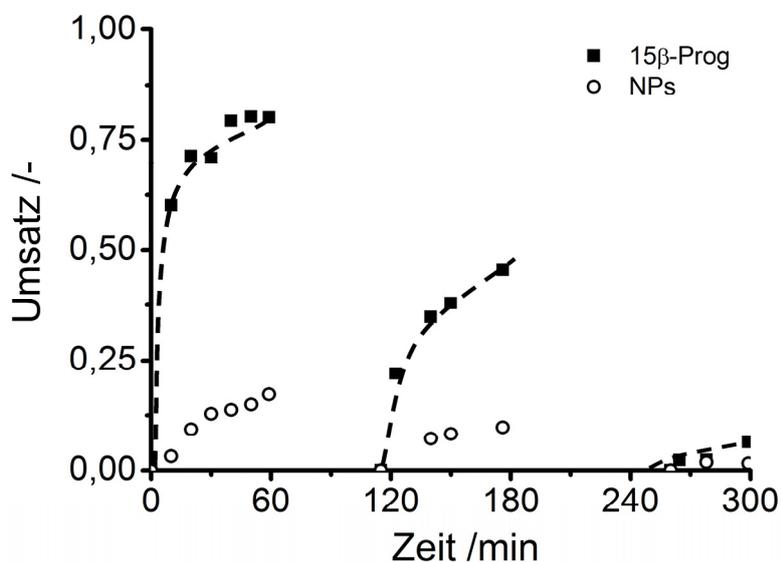
### 5.5.2 Biotransformation im repetitiven Satzreaktor

Nach der erfolgreichen Durchführung der Biotransformation im Milliliter-Maßstab wurde ein Produktaufarbeitungskonzept entwickelt, das neben der Abtrennung der Steroide aus dem Reaktionsmedium auch die Produktaufreinigung beinhaltet. Steroide werden im Allgemeinen durch Extraktion mit Hilfe eines organischen Lösungsmittels aus wässrigen Reaktionsmedien abgetrennt. Dabei kann eine Inaktivierung des in der wässrigen Phase verbleibenden Biokatalysators auftreten. Außerdem fungieren die Proteine des Zellrohextrakts als Emulgatoren, wodurch die Trennung der organischen von der wässrigen Phase erschwert wird. Alternativ können Adsorberharze zur Abtrennung hydrophober Substanzen aus dem wässrigen Reaktionsmedium genutzt werden. Die Steroide adsorbieren an diese inerten Polymere, die durch Filtration vom Reaktionsmedium abgetrennt werden. Durch Waschen der Adsorberharze mit einem geeigneten organischen Lösungsmittel erfolgt die Desorption der Steroide. Dabei kommt es zu keinem Kontakt zwischen dem Biokatalysator und dem organischen Lösungsmittel, wodurch eine Inaktivierung der an der Reaktion beteiligten Enzyme und Proteine verhindert werden kann. Dadurch wird die Wiederverwendung des Biokatalysators möglich und durch die Durchführung von repetitiven Satzreaktoren könnte die Katalysatorausnutzung gesteigert werden.

Die eingesetzten Adsorberharze sollten eine möglichst quantitative Produktabtrennung aus dem Reaktionsmedium ermöglichen. Zur Abtrennung des 15 $\beta$ -OH-Progesteron erwies sich der Adsorber Amberlite XAD 16 am geeignetsten, da nur Spuren des 15 $\beta$ -OH-Progesteron und des Substrats Progesteron nach einstündiger Inkubation des Reaktionsansatzes mit dem Adsorber im Reaktionsmedium verblieben. Zur Abtrennung

des 15 $\beta$ -OH-Testosteron, wurde der Adsorber Sepabeads SP 207 verwendet, da nach 1 h Extraktion mit den Sepabeads nur noch etwa 4 % des 15 $\beta$ -OH-Testosteron im Reaktionsmedium nachweisbar waren. Aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit des jeweiligen Produkts mit dem Substrat und vermutlich auch mit den Nebenprodukten adsorbieren diese ebenfalls an das Trägermaterial, wodurch ein weiterer Aufreinigungsschritt des Rohprodukts unerlässlich ist.

Abbildung 5.20 zeigt den Verlauf des repetitiven Satzreaktors bei der Umsetzung von Progesteron. Nach einer Stunde Reaktionszeit, wurden die Steroide mittels Amberlite XAD16 Adsorberharzen vom Reaktionsmedium abgetrennt, bevor der nächste Reaktionszyklus des repetitiven Satzreaktors durch erneute Substratzugabe gestartet wurde. Hatten sich beim ersten Reaktionszyklus noch rund 80 % 15 $\beta$ -OH-Progesteron gebildet, so belief sich der Umsatz beim zweiten und beim dritten Reaktionszyklus nur mehr auf 48 % bzw. 10 %. Das entspricht einem Gesamtumsatz von 55 %. Die Produktivität lag mit einem Wert von 1,05 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> immer noch im Gramm Bereich, wobei im Vergleich zum Satzreaktor sowohl die Cofaktor- als auch die P450-Ausnutzung verdoppelt werden konnte. Tabelle 5.8 fasst die Kennzahlen des repetitiven Satzreaktors zusammen.



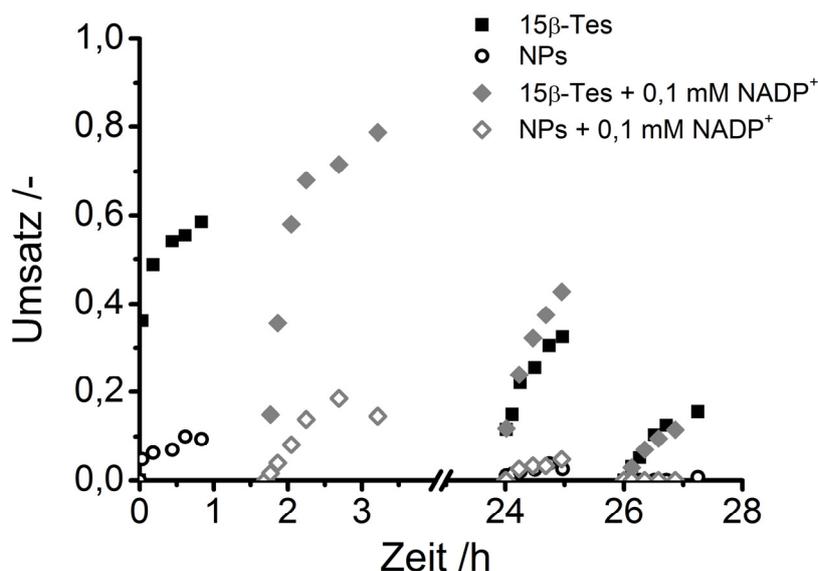
**Abbildung 5.20: Repetitiver Satzreaktor zur Hydroxylierung von Progesteron**

Reaktionsbedingungen pro Lauf: V = 250 mL, T = 25 °C, 50 mM Tris-HCl Puffer pH 8, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mg mL<sup>-1</sup> Lyophilisat, 0,5 mM Prog (in 400 mM 2-Propanol vorgelöst), Steroidabtrennung durch 4 g Amberlite XAD 16 Zugabe, Start des nächsten Lauf durch Zugabe 0,5 mM Prog

**Tabelle 5.8: Kennzahlen des repetitiven Satzreaktors zur Umsetzung von Progesteron**

Progesteron	
Umsatz	56 %
Selektivität	79 %
Produktivität	1,05 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> 3,2 mM d <sup>-1</sup>
Ausbeute 15 $\beta$ -Prog	40 mg 75 %
TTN P450	2600
TTN Cofaktor	102

Zur Umsetzung von Testosteron wurde ein weiterer repetitiver Satzreaktor im 500 mL Maßstab durchgeführt. Um zu identifizieren, warum bei der Hydroxylierung von Progesteron der Umsatz nach nur zwei Reaktionszyklen zurückging, wurde neben der Produktbildung auch die Aktivität der *Lb*ADH und der CYP106A2 bestimmt. Zur Bestimmung der ADH Aktivität wurde photometrisch der NADP<sup>+</sup> Verbrauch bei der Oxidation von 2-Propanol zu Aceton bestimmt. Mittels CO-Differenzspektroskopie wurde kontrolliert, ob noch aktive CYP106A2 im Reaktionsmedium vorlag. Nur aktive Cytochrom P450 Monooxygenasen besitzen ein Absorptionsmaximum bei 450 nm, während inaktives Enzym bei 420 nm am stärksten absorbiert. Darüber hinaus wurde untersucht, ob die Cofaktorversorgung beim repetitiven Satzreaktor ausreicht, indem der Umsatz bei Zugabe von 0,1 mM NADP<sup>+</sup> bestimmt wurde. Abbildung 5.21 zeigt die Produktbildung des repetitiven Satzreaktors zur Umsetzung von Testosteron. Der Umsatz des zweiten Reaktionszykluses der unter NADP<sup>+</sup> Zugabe durchgeführt wurde, war mit einem Wert von 95 % deutlich höher als der des ersten Laufs. Dies deutet auf eine Limitierung durch den Cofaktor hin. Zur Überprüfung wurde beim dritten Reaktionszyklus der Ansatz geteilt und bei einem Teil des Ansatzes erneut 0,1 mM NADP<sup>+</sup> zugegeben und der Umsatz verglichen. Bei NADP<sup>+</sup> Zugabe hatten sich 12 % mehr 15 $\beta$ -OH-Testosteron gebildet. Um einen hohen Umsatz über mehrere Läufe des repetitiven Satzreaktors garantieren zu können, sollte also Cofaktor dem Reaktionsmedium zugegeben werden. Beim vierten Reaktionszyklus wurde allerdings selbst bei NADP Zugabe nur noch ein Umsatz von 18 % erreicht. Dieser Rückgang muss daher auf eine andere Ursache zurückzuführen sein. Die CO-Differenzspektroskopie zeigte, dass zu diesem Zeitpunkt keine aktive CYP106A2 mehr im Reaktionsansatz vorhanden war. Neben der Cofaktorverfügbarkeit limitiert also die Stabilität der CYP106A2 die Leistung des repetitiven Satzreaktors.



**Abbildung 5.21: Repetitiver Satzreaktor zur Hydroxylierung von Testosteron**

Reaktionsbedingungen:  $V = 500 \text{ mL}$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $50 \text{ mM Tris-HCl Puffer pH } 8$ ,  $1 \text{ mM MgCl}_2$ ,  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  Lyophilisat,  $0,5 \text{ mM Tes}$  (in  $400 \text{ mM } 2\text{-Propanol}$  vorgelöst), Steroidabtrennung durch  $4 \text{ g Sepabeads SP 207}$  Zugabe, Start des nächsten Lauf durch Zugabe  $0,5 \text{ mM Tes}$

Tabelle 5.9 fasst die Kennzahlen des repetitiven Satzreaktors zusammen. Der Gesamtumsatz betrug  $54 \%$ , wobei eine Selektivität von  $87 \%$  erreicht wurde. Die Produktivität war wegen der langen „Pause“ zwischen dem 2. und 3. Reaktionszyklus mit  $0,83 \text{ mM pro Tag}$  gering. Wegen der Cofaktorzugabe belief sich die maximale Zyklenzahl, bezogen auf die Bildung des gewünschten Produkts  $15\beta\text{-OH-Testosteron}$  lediglich auf 4. Allerdings konnte die Katalysatorausnutzung mit einem Wert von  $1165$  im Vergleich zum Satzreaktor fast verdoppelt werden.

**Tabelle 5.9: Kennzahlen des repetitiven Satzreaktors zur Umsetzung von Testosteron**

	Testosteron
Umsatz	$54 \%$
Selektivität	$87 \%$
Produktivität	$0,25 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ $0,83 \text{ mM d}^{-1}$
Ausbeute	$88 \text{ mg}$
$15\beta\text{-Tes}$	$62 \%$
TTN P450	$1165$
TTN Cofaktor	$4,3$

Die 15 $\beta$ -Hydroxylierung konnte unter Anwendung des vorgestellten Reaktionskonzepts als repetitiver Satzreaktor durchgeführt werden. Nach der Abtrennung der Steroide aus dem Reaktionsmedium durch den jeweiligen Adsorber erfolgte die Aufreinigung der gewünschten Produkte 15 $\beta$ -OH-Progesteron und 15 $\beta$ -OH-Testosteron chromatographisch an Kieselgel. 40 mg 15 $\beta$ -OH-Progesteron in einer Reinheit von 95% (HPLC) und 88 mg 15 $\beta$ -OH-Testosteron in einer Reinheit von 99,5 % (HPLC) konnten isoliert werden. Die Identität der Substanzen wurde mittels NMR überprüft.

### 5.5.3 Identifizierung der Nebenprodukte

Im Rahmen der präparativen Produktabtrennung wurden auch die Nebenprodukte vom jeweiligen 15 $\beta$ -Derivat abgetrennt und zu einem gewissen Grad aufgereinigt. Anschließend wurde versucht, die Identität der Nebenprodukte aufzuklären. In der Literatur ist bei der Hydroxylierung von Progesteron die Bildung der entsprechenden Regioisomere 11 $\alpha$ -OH-Progesteron, 9 $\alpha$ -OH-Progesteron (Lisurek et al., 2004), sowie die Bildung des 6 $\beta$ -OH-Progesteron (Berg et al., 1976) beschrieben. Außerdem wird die Bildung di- oder polyhydroxylierter Progesteronderivate vermutet (Virus, 2006). Bei der Hydroxylierung von Testosteron ist dem gegenüber lediglich die Bildung von 6 $\beta$ -OH-Testosteron bekannt (Berg et al., 1976; Ruijssenaars et al., 2007).

Leider war im Rahmen dieser Arbeit eine Strukturbestimmung der Nebenprodukte aufgrund der geringen Menge (< 1 mg) und Reinheit (< 90 % n. HPLC) mittels NMR nicht möglich. Auf eine weitere Aufreinigung wurde aufgrund eventueller weiterer Ausbeuteverluste verzichtet. Eine LC-MS/MS Analyse konnte aber Hinweise bezüglich der Identität der Nebenprodukte liefern. Mittels chemischer Ionisierung bei Atmosphärendruck (APCI) wurden die Proben im MS ionisiert. Bei dieser Methode bleibt der Analyt weitestgehend intakt und es kommt kaum zu Fragmentierungen. Dadurch konnte der Molekülionenpeak identifiziert werden und gezielte Hinweise auf die molare Masse der einzelnen Substanzen erlangt werden.

Bei der Hydroxylierung von Progesteron konnten drei Nebenprodukte isoliert werden, die fortan als NP 1, NP 2 und NP 3 bezeichnet werden. Tabelle 5.10 fasst die Molekülionenpeaks dieser Nebenprodukte zusammen. NP 1 und NP 3 haben mit einer molaren Masse von 330 die gleiche Masse wie das gewünschte Produkt. Daher wurde davon ausgegangen, dass es sich bei diesen beiden Substanzen ebenfalls um hydroxylierte Progesteronderivate handelt. Ein Vergleich der Retentionszeiten mit Referenzsubstanzen zeigte, dass es sich bei NP 1 mit hoher Wahrscheinlichkeit um 11 $\alpha$ -OH-Progesteron handelt. Selbst bei anderer Laufmittelzusammensetzung waren die

Retentionszeiten des 11 $\alpha$ -OH-Progesteron und des NP 1 identisch. Ein Vergleich der Retentionszeit von NP 3 mit der der hydroxylierten Progesteronderivate 6 $\beta$ -OH-Progesteron, 9 $\alpha$ -OH-Progesteron und 17 $\alpha$ -OH-Progesteron zeigte hingegen keine Übereinstimmungen. Aufgrund fehlender weiterer Referenzsubstanzen konnte die Position der Hydroxylierung des NP 3 daher nicht bestimmt werden.

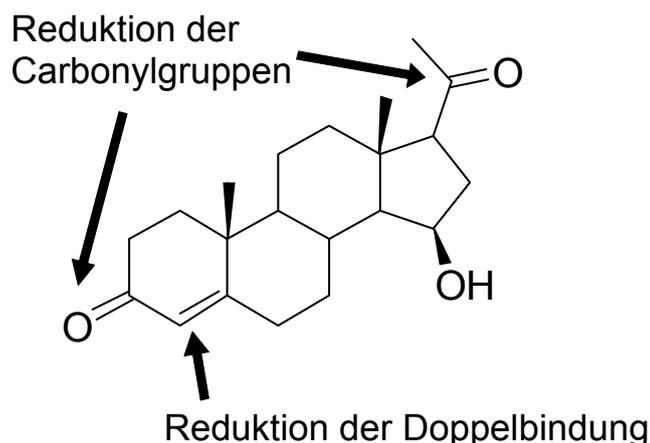
**Tabelle 5.10: Molekülionen der Nebenprodukte bei der Hydroxylierung von Progesteron**

Nebenprodukte	MH <sup>+</sup> /m/z
1 (11 $\alpha$ -Prog)	331
2	333
3	331

Die Molekülmasse des NP 2 ist im Vergleich zu einfach hydroxylierten Progesteronderivaten um 2 höher. Neben der Hydroxylierung des Substrats, besitzt diese Substanz also eine weitere Modifikation. Aufgrund einer Änderung der Masse um + 2 sind jedoch nur folgende Reaktionen möglich:

- Reduktion der Doppelbindung
- Reduktion des Ketons an Pos. 3 oder Pos. 20

Die Abbildung veranschaulicht die potentiellen Modifikationen am Beispiel des 15 $\beta$ -OH-Progesterons. Genauere Aussagen sind aufgrund fehlender Referenzsubstanzen nicht möglich.



**Abbildung 5.22: Potentielle strukturelle Modifikationen des NP 2 am Beispiel des 15 $\beta$ -OH-Progesteron**

Bei der Hydroxylierung von Testosteron konnten vier Nebenprodukte isoliert werden. Alle vier Nebenprodukte zeigten bei der Analyse im MS, genauso wie das gewünschte Produkt 15 $\beta$ -OH-Testosteron, einen Molekülionenpeak bei m/z 305. Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei diesen Substanzen um hydroxylierte Testosteronderivate handelt. Ein Vergleich der Retentionszeiten eines Nebenprodukts mit 6 $\beta$ -OH-Testosteron zeigte, dass die Retentionszeiten übereinstimmten. Bei dieser Substanz handelt es sich höchstwahrscheinlich um 6 $\beta$ -OH-Testosteron. Keines der übrigen Nebenprodukte stimmte hinsichtlich seiner Retentionszeit in der HPLC mit der weiteren Referenzsubstanz 11 $\alpha$ -OH-Testosteron überein. Daher konnten diese Nebenprodukte nicht identifiziert werden, sondern lediglich die Aussage getroffen werden, dass es sich bei diesen Substanzen um einfachhydroxylierte Testosteronderivate handelt.

## 5.6 Zusammenfassung

Im Rahmen der Parameterstudie wurden folgende limitierende Faktoren bei der CYP106A2 katalysierten Steroidhydroxylierung festgestellt:

- Die Ganzzellbiotransformation ist durch den Substrattransport in die Zelle limitiert. Die Aktivität konnte durch die Verwendung von Zellrohextrakt als Biokatalysator um Faktor 6 gesteigert werden. Daher ist der Rohextrakt den ganzen Zellen vorzuziehen.
- Die Löslichkeit von Progesteron und Testosteron in Wasser beträgt jeweils nur 1 bzw. 97  $\mu$ M. Durch den Einsatz von Lösungsvermittlern konnte die Löslichkeit zwar erhöht werden, jedoch haben viele Cosolventien einen negativen Einfluss auf den Biokatalysator. Im Rahmen der Untersuchungen zeigte der Ganzzellbiokatalysator eine hohe Toleranz gegenüber 2-Propanol. Die maximale Aktivität konnte in Gegenwart von 2 M (15,4 vol%) 2-Propanol verzeichnet werden. Der Zellrohextrakt toleriert immer noch 400 mM 2-Propanol ohne Aktivitätsverluste. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass das ungelöste Substrat den Biokatalysator inhibiert. Ab einer Konzentration von 0,6 mM Testosteron oder Progesteron kommt diese Inhibierung bei der Verwendung von Zellrohextrakt als Biokatalysator zum Tragen.
- Eine Sauerstofflimitierung konnte selbst in geschlossenen Eppendorf-Reaktionsgefäßen nicht nachgewiesen werden und kann ausgeschlossen werden.
- Messungen der Redoxcofaktorkonzentration des Zellrohextrakts mittels LC-MS/MS zeigten eine hohe NADP Konzentration von etwa 1,7  $\mu$ mol g<sub>Lyophilisat</sub><sup>-1</sup>, die für eine effiziente Hydroxylierung ausreichend ist. Ferner konnte festgestellt

werden, dass der Redoxcofaktor während der Biotransformation aufgrund des deutlich aktivierten Cofaktorregenerierungsenzym *LbADH* hauptsächlich in seiner reduzierten Form vorliegt. Eine Limitierung durch unzureichende Cofaktorversorgung im Zellrohextrakt kann ausgeschlossen werden.

Anschließend wurde die Biotransformation unter optimierten Bedingungen im Satzreaktor durchgeführt. Dabei wurde eine Produktivität von  $3,7 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  für die Bildung von  $15\beta$ -OH-Progesteron und von  $5,5 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  für die Testosteronhydroxylierung erreicht. Dies entspricht einer 18fachen Steigerung der Produktivität im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Werten (Hannemann et al., 2006). Darüber hinaus erlaubte die Produktabtrennung mittels Adsorberharzen, eine Wiederverwendung des Biokatalysators. Dadurch konnte die Biokatalysatorausnutzung im repetitiven Satzreaktor verdoppelt werden. Für die Hydroxylierung von Progesteron wurden TTNs von 2300 für die CYP106A2 und TTNs von 102 für den Cofaktor erreicht. Unter optimierten Bedingungen konnten so 40 mg  $15\beta$ -OH-Progesteron in einer Reinheit von 95 % und 88 mg  $15\beta$ -OH-Testosteron (99,5 % Reinheit) hergestellt werden.

## 6 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

### 6.1 CYP102A1 aus *Bacillus megaterium*

#### 6.1.1 Geänderte Cofaktorspezifität und Etablierung einer enzymgekoppelten Cofaktorregenerierung

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Variante der CYP102A1 weist eine geänderte Cofaktorspezifität auf. Anstelle des ursprünglich bevorzugten Cofaktors NADPH präferiert sie NADH. Tabelle 6.1 fasst die Wechselzahl und die Michaelis Menten Konstanten der Variante und des Wildtyps für beide Redoxcofaktoren zusammen. Mit einem Wert von  $14600 \text{ min}^{-1}$  ist die Wechselzahl dieser Variante für NADH fast drei mal so hoch wie die von NADPH (Maurer et al., 2005). Darüber hinaus ist die Reduktaseaktivität der Variante gegenüber dem Wildtyp generell erhöht. Die Gesamtwechselzahl für beide Redoxcofaktoren beträgt rund  $20000 \text{ min}^{-1}$  und ist doppelt so hoch wie die des Wildtyps.

**Tabelle 6.1: Wechselzahl und Michaelis Menten Konstante der CYP102A1 Variante und des Wildtyps (Maurer et al., 2005)**

Enzym	Wechselzahl / $k_{\text{cat}} \text{ min}^{-1}$	Michaelis Menten Konstante ( $K_M$ ) / $\mu\text{M}$
CYP102A1 WT		
NADH	2800	1400
NADPH	7930	2,5
CYP102A1 Variante		
NADH	14600	11,6
NADPH	5400	1,6

Prozesstechnisch ist die veränderte Cofaktorspezifität vor allem aus Kostengründen interessant, da NADH um den Faktor 16 günstiger ist als NADPH (Preise Firma Carl Roth, 10. 06. 2009). Dieser Vorteil ist vor allem bei Anwendungen mit isoliertem Enzym interessant. Bei Ganzzellbiotransformationen dient der Organismus als Cofaktorlieferant, sodass der Kostenfaktor meist keine Rolle spielt. Allerdings ist der Anteil des jeweiligen Cofaktors in der Zelle unterschiedlich. Untersuchungen zum Redoxcofaktorpool von *E. coli* zeigen beispielsweise, dass die Konzentration an NADH/NAD<sup>+</sup> etwa um den Faktor 6 höher ist als die des phosphorylierten Redoxcofaktors (Schroer et al., 2009). Enzyme mit NADH Spezifität können also auf einen sechsmal so großen Cofaktorpool zurückgreifen, was das Risiko einer Limitierung der Reaktion durch unzureichende Cofaktorversorgung verringert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl die FDH als auch die *LbADH* zur Cofaktorregenerierung einer CYP102A1 katalysierten Ganzzellbiotransformation erfolgreich eingesetzt. Die Verwendung einer GDH gemeinsam mit einem Transportprotein ist bei der CYP102A1 katalysierten Hydroxylierung von Pinen beschrieben (Schewe et al., 2008). Ähnlich wie bei der Hydroxylierung von  $\beta$ -Jonon kommt es, bei der Hydroxylierung von Pinen zu einer höheren Produktbildungsrate in Gegenwart der enzymgekoppelten Cofaktorregenerierung.

Die Verwendung der *LbADH* hat den Vorteil, dass dieses Enzym genauso wie die verwendete CYP102A1 Variante beide Cofaktoren akzeptiert, sodass insgesamt ein größerer Cofaktorpool zur Verfügung steht als bei einer Regenerierung über die FDH, die nur den nicht-phosphorylierten Cofaktor akzeptiert. Darüber hinaus kann durch die Zugabe von 2-Propanol, das Cosubstrat der *LbADH*, die Löslichkeit schwer wasserlöslicher Substrate verbessert werden. Ganzzellbiokatalysatoren, die die *LbADH* exprimieren zeigen in der Regel eine hohe Toleranz gegenüber 2-Propanol (Schroer et al., 2007) (vgl. Kapitel 5.2.1), sodass dieses Lösungsmittel auch in Konzentrationen, die einen löslichkeitsverbessernden Effekt bewirken, eingesetzt werden kann. Dies könnte insbesondere bei der P450 katalysierten Hydroxylierung von schlecht wasserlöslichen Substanzen von Vorteil sein.

### **6.1.2 Strategien zur Überwindung der Produktinhibierung**

Um die Hydroxylierung von  $\beta$ -Jonon weiter zu verbessern, müsste die Produktinhibierung überwunden werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl Zweiphasensysteme als auch Adsorberharze zur *in situ* Produktabtrennung untersucht. Adsorberharze scheinen jedoch aufgrund der ungünstigen Substrat/Produktverteilung im Reaktionsmedium nicht geeignet zu sein. Bis auf Diisononylphthalat wurde im Rahmen der untersuchten Zweiphasensysteme keine Hydroxylierungsaktivität des Biokatalysators festgestellt. In Gegenwart von Diisononylphthalat wurde zwar die Bildung von 4-OH- $\beta$ -Jonon beobachtet, allerdings war der Umsatz sehr gering (< 1 % nach 9 h) und reicht nicht aus, um im Zweiphasensystem effizient 4-OH- $\beta$ -Jonon herstellen zu können. Die geringe Effizienz liegt wahrscheinlich in destabilisierenden Effekten des Zweiphasensystems auf die Enzyme begründet. Andere Phthalate könnten möglicherweise eine höhere Kompatibilität mit dem Biokatalysator zeigen. Darüber hinaus könnte eine Separierung der beiden Phase durch eine Membran, die Inaktivierung verringern (Kühl, 2009).

Eine andere Strategie zur Überwindung stellt das *protein engineering* dar, wobei zwei verschiedene Lösungsansätze gewählt werden können. Durch die Methoden der Gerichteten Evolution könnten einerseits Varianten identifiziert werden, die nicht durch das Produkt inhibiert werden. Andererseits könnte man zur Überwindung der Produktinhibierung die *in situ* Produktabtrennung durch ein Zweiphasensystem aufgreifen und Varianten mit verbesserter Lösungsmitteltoleranz zu identifizieren. Die erfolglose Anwendung eines Zweiphasensystems im Rahmen dieser Arbeit beruhte letztendlich auf einer geringen Lösungsmitteltoleranz des Biokatalysators. Durch eine gezielte Verbesserung der Lösungsmitteltoleranz des Enzyms durch *protein engineering* wäre nicht nur eine effizientere Hydroxylierung von  $\beta$ -Jonon möglich, sondern solche Varianten wären auch für die Hydroxylierung anderer schwer wasserlöslicher Substanzen interessant. In der Literatur ist bereits eine lösungsmittelstabilere CYP102A1 Variante beschrieben worden, die mittels Sättigungsmutagenese zu erzeugt wurde und die DMSO in Konzentrationen bis zu 30 vol% ohne Aktivitätseinbußen tolerieren kann (Wong et al., 2004). Außerdem zeigt die Variante ebenfalls eine erhöhte Toleranz gegenüber anderen, Wasser-mischbaren Lösungsmittel. Der Einfluss nicht Wasser-mischbarer Lösungsmittel auf diese Variante wurde nicht untersucht. Diese Variante wäre sicherlich ein interessanter Ausgangspunkt für weitere Optimierungen für einen Einsatz von Zweiphasensystemen. Die Generierung von Varianten mit erhöhter Lösungsmitteltoleranz wird im Fall der CYP102A1 allerdings durch das Substratspektrum dieses Enzyms deutlich limitiert. Mit Ausnahme von Decalin, hydroxyliert diese P450 alle flüssigen Vertreter der Alkane (Appel et al., 2001; Farinas et al., 2001; Glieder et al., 2002; Peters et al., 2003), die somit nicht als zweite Phase eingesetzt werden können.

### **6.1.3 Potentielle Anwendungen P450 katalysierter Oxidationen von Alkoholen**

Eine durch eine P450 katalysierte Überoxidation des jeweiligen Alkohols zum entsprechenden Keton wurde nicht nur bei der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Hydroxylierung von  $\beta$ -Jonon beobachtet. Sie tritt auch bei der der CYP101 (P450<sub>cam</sub>) katalysierten Oxidation von (+)- $\alpha$ -Pinen auf (Bell et al., 2003). Eine Anwendung im Labormaßstab findet die Überoxidierung bei der Oxidierung des (+)-Valencens zu (+)-Nootkaton über Nootkatol, die durch die CYP101, CYP102A1 und CYP109B1 katalysiert wird (Sowden et al., 2005; Girhard et al., 2009). Das biotechnologisch interessante Produkt ist hierbei das Keton, da (+)-Nootkaton als Geruchsstoff der Grapefruit für die Aroma- und Duftstoffindustrie von großem Interesse ist (Fraatz et al., 2009).

Darüber hinaus konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass aufgrund der Überoxidation Cytochrom P450 Monooxygenasen prinzipiell zu einer kinetischen Racematspaltung eingesetzt werden können. Setzt man racemisches 4-OH- $\beta$ -Jonon als Substrat ein, so wird das (*R*)-Enantiomer bevorzugt zum entsprechenden Keton oxidiert, wodurch ein Überschuss an (*S*)-4-OH- $\beta$ -Jonon entsteht. Für eine effiziente Anwendung der Racematspaltung müsste die Selektivität der Oxidation jedoch noch weiter verbessert werden, da auch das (*S*)-Enantiomer zu einem geringeren Anteil von der CYP102A1 Variante oxidiert wird. Durch Methoden des *protein engineering*s müsste diese CYP102A1 Variante noch weiter hinsichtlich ihrer Stereoselektivität verbessert werden. Dann wäre es möglich, mit verschiedenen CYP102A1 Varianten sowohl (*R*)- als auch (*S*)-4-OH- $\beta$ -Jonon herzustellen.

## 6.2 Humane CYP21

### 6.2.1 Quantifizierung des intrazellulären Redoxcofaktorpools

Die Quantifizierung der intrazellulären Cofaktorkonzentration während Ganzzellbiotransformationen, kann wichtige Erkenntnisse für die Verbesserung von Ganzzellbiokatalysatoren liefern. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine LC-MS/MS Methode zur Quantifizierung der intrazellulären Cofaktorkonzentration bei Ganzzellbiotransformationsprozessen in *E. coli* (Schroer et al., 2009) erfolgreich für die Analyse der Redoxcofaktoren in Spaltheefe adaptiert werden. Erstmals konnte hiermit die cytosolische Cofaktorkonzentration von Spaltheefe und während P450 katalysierter Ganzzellbiotransformationen quantifiziert werden.

Diese noch sehr neue Messmethode ist allerdings aus mehreren Gründen sehr aufwendig. Aufgrund der geringen vorhandenen Mengen an Redoxcofaktor in den Zellen, wird sehr viel Biomasse zur Messung benötigt. Darüber hinaus beeinflusst der Hintergrund der Probe stark die Ionisation im MS und damit die Peakgröße der Analyten (Matrixeffekt, vgl. 3.2.2). Daher müssen die Kalibriergeraden ebenfalls in Gegenwart dieser störenden Hintergrundinformation gemessen werden. Die Kalibriergeraden müssen folglich bei jeder Messung neu aufgenommen werden, wodurch sich der Messaufwand stark erhöht. Abhilfe könnte die Zugabe isotope markierter Redoxcofaktoren als internen Standard zur Probe schaffen. Dieses Prinzip findet z. B. bei der Quantifizierung von Intermediaten der Glykolyse und des Zitratzyklus bereits Anwendung (Wu et al., 2005). Da allerdings isotope markierte Redoxcofaktoren nur sehr schwer zugänglich sind, müsste zuerst ein effizientes Verfahren zu deren Herstellung entwickelt werden. Hierzu könnten Phosphitdehydrogenasen herangezogen werden. Das Substrat dieser Enzyme,

Phosphit liegt abhängig vom pH-Wert als unterschiedliches Tautomer vor. Bei pH 7 liegt es fast ausschließlich als vierfach koordiniertes Isomer vor, während sich bei saurem pH das Gleichgewicht zur phosphorigen Säure verschiebt. Legt man phosphorige Säure in deuterierten Wasser vor und neutralisiert anschließend den pH-Wert, bildet sich deuteriertes Phosphit, das zur Deuterierung des Cofaktors mit Hilfe der Phosphit-dehydrogenasen verwendet werden kann (Vrtis et al., 2002).

Kontrovers diskutiert wird zudem, ob die gemessenen Redoxcofaktorkonzentrationen auch die Cofaktorkonzentration wiedergeben, die dem Enzym in der Zelle zur Verfügung stehen. Bei eukaryotischen Organismen mit Zellkompartimentierung, können sich die Redoxcofaktorkonzentrationen je nach Kompartiment unterscheiden. Mit der in dieser Arbeit angewandten Methode zur Quantifizierung intrazellulärer Metabolite kann die Kompartimentierung nicht berücksichtigt werden und so nur die durchschnittliche Cofaktorkonzentration innerhalb der Zelle bestimmt werden. Zusätzlich muss beachtet werden, dass nicht der gesamte Cofaktor in der Zelle frei zugänglich ist, sondern zum Teil auch an andere Enzyme gebunden ist (Bucher et al., 1972; Veech, 2006). Informationen über die im Cytosol frei vorliegenden Cofaktorkonzentrationen sind nur sehr schwer zugänglich, da die aktuell zur Verfügung stehenden Messmethoden wie LC-MS/MS und *cycling assays* nicht zwischen an Enzym gebundenen und frei im Cytosol vorliegenden Cofaktor unterscheiden können. Die Messung der intrazellulären Cofaktorkonzentration mittels *cycling assays* basiert auf Farbänderungen, die von redoxcofaktorabhängigen enzymkatalysierten Reaktionen ausgehen (Oldiges et al., 2007). Im letzten Jahr hat eine Arbeitsgruppe die indirekte Bestimmung des Verhältnisses an frei vorliegenden oxidierten zu reduzierten Cofaktor beschrieben. Befindet sich eine redoxcofaktorabhängige Reaktion im Gleichgewicht, so kann, wenn der pH-Wert bekannt ist, von der Substrat- und Produktkonzentration auf das Verhältnis der Cofaktoren geschlossen werden. Der intrazelluläre pH kann allerdings nicht gemessen, sondern nur abgeschätzt werden. Unter der Annahme, dass der pH im Cytosol neutral ist (pH 7), ist das NAD/NADH-Verhältnis größer 100 und daher 10 Mal größer, als das Verhältnis das unter den gleichen Bedingungen mit *cycling assays* bestimmt wurde (Canelas et al., 2008). Aufgrund der Schätzung des pH-Werts erheben allerdings auch diese Werte keinen Anspruch auf Richtigkeit und können stark variieren. Sollte der pH des Cytosols nicht pH 7, sondern pH 8 betragen, würde sich das Verhältnis an oxidiertem zu reduziertem Cofaktor um Faktor 10 verringern und das Verhältnis würde in etwa den Ergebnissen des *cycling assays* entsprechen. Mit den derzeitigen Methoden ist also eine Quantifizierung der im Cytosol frei vorliegenden Cofaktorkonzentration nicht möglich.

Trotz der noch fehlerbehafteten LC-MS/MS Methode zur Bestimmung der Cofaktorkonzentration können die Veränderungen der intrazellulären Cofaktorkonzentration, die auf Biotransformationen zurückzuführen sind, verfolgt werden, indem die gemessenen Werte mit einem Kontrollexperiment verglichen werden. Darüber hinaus kann die durchschnittliche Gesamtofaktor-konzentration von *S. pombe*, auf jeden Fall als Richtwert für die dem Enzym zugänglichen Cofaktorkonzentration gesehen werden.

### **6.2.2 Lösungsmitteltoleranz der *S. pombe* CAD18**

Bei Steroiden handelt es sich um schlecht wasserlösliche Verbindungen. Untersuchungen zur Erhöhung der Löslichkeit des Substrats 17 $\alpha$ -OH-Progesterons zeigten, dass der Biokatalysator nur sehr geringe Mengen an Lösungsvermittlern tolerieren kann. Neben dem Einsatz eines Cosolvens können auch andere Strategien, die im Umgang mit schwer wasserlöslichen Substraten angewandt werden, wie der Einsatz von Cyclodextrinen oder „wässrig-organischen“ Zweiphasensystemen, erfolgsversprechend sein. Cyclodextrine scheiden genauso wie Cosolventien wegen der geringen Toleranz des Biokatalysators aus. Wässrig-organische Zweiphasensysteme sind aufgrund der Verteilung des Substrats zwischen wässriger und organischer Phase ungünstig. Aufgrund der hohen Hydrophobizität würde 17 $\alpha$ -OH-Progesteron fast ausschließlich in der organischen Phase vorliegen und die Hydroxylierungsaktivität wäre durch die geringe Substratkonzentration in Lösung limitiert.

Zur Verbesserung der Effizienz der Biotransformation müsste die Toleranz des Biokatalysators gegenüber Lösungsmitteln oder Cyclodextrinen erhöht werden, wobei eine toxische Wirkung sowohl auf das Enzym als auch auf den Wirtsorganismus denkbar wäre. Eine Evolvierung des Enzyms durch *protein engineering* hin zu höherer Lösungsmitteltoleranz ist jedoch nur bedingt einsetzbar. Die Expression humaner P450 dient in der Regel nicht der Herstellung von Feinchemikalien, sondern speziell humane CYPs der Leber werden im Rahmen klinischer Studien zur Zulassung neuer Arzneistoffe bei toxikologischen Tests eingesetzt (Guengerich, 2001). Da CYPs eine entscheidende Rolle bei der Metabolisierung von Arzneistoffen spielen, müssen P450-Metabolite im Rahmen der klinischen Studien auf ihre pharmakologische Wirkung getestet werden. Hierfür müssen die Metabolite in ausreichenden Mengen hergestellt werden, wofür rekombinante Mikroorganismen wie Hefen oder Bakterien, die humane CYPs exprimieren herangezogen werden (Wong, 1998; Ghisalba et al., 2007). Varianten des Enzyms könnten zu einem veränderten Metabolitspektrum führen und die Ergebnisse der Studien verfälschen. Daher ist es bei der Metabolitherstellung von Vorteil, die Effizienz der Biotransformation ausschließlich durch reaktionstechnische Überlegungen zu verbessern.

Alternativ könnte der Spalthefestamm bezüglich der Lösungsmitteltoleranz verbessert werden. In der Literatur sind Beispiele bekannt, die eine Steigerung der Lösungsmittelresistenz verschiedener Hefen beschreiben (Smit et al., 2004; Matsui et al., 2008), sodass eine Verbesserung auch für die Spaltheefe möglich sein sollte.

## **6.3 CYP106A2 aus *Bacillus megaterium***

### **6.3.1 Reaktorkonzept**

Für die CYP106A2 katalysierte Steroidhydroxylierung wurde im Rahmen dieser Arbeit festgestellt, dass aufgrund einer Substrattransportlimitierung über die Zellmembran, der Zellrohextrakt als Biokatalysator dem Ganzzellbiokatalysator vorzuziehen ist. Die Aktivität konnte so um den Faktor 6 gesteigert werden, wobei sich die Bereitstellung des Biokatalysators durch die Herstellung des lyophilisierten Rohextrakts lediglich um zwei Aufarbeitungsschritte verlängerte. Die beiden Schritte umfassen den Zellaufschluss mittels Ultraschall, der im kontinuierlichen Modus durchgeführt werden kann, und die anschließende Gefriertrocknung des Rohextrakts, die eine über mehrere Wochen hinweg stabile Lagerung erlaubt. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die Zugabe des teuren Redoxcofaktors NADP<sup>+</sup> zur effizienten Biotransformation nur bedingt nötig ist. Die Reaktion läuft im Satzreaktor ohne Zugabe von Cofaktor mit fast vollständigem Umsatz ab. Wird jedoch angestrebt, die verbesserte Biokatalysatorausnutzung im repetitiven Satzreaktor zu nutzen, führt eine Zudosierung des Cofaktors zu höherem Umsatz. Aufgrund der geringen Stabilität der CYP106A2 waren bis jetzt nur vier Reaktionszyklen im repetitiven Satzreaktor möglich. Zur weiteren Verbesserung der Biokatalysatorausnutzung müsste die Stabilität der CYP106A2 beispielsweise durch eine Immobilisierung des Enzyms oder durch *protein engineering* gezielt verbessert werden. Versuche, die CYP106A2 zu immobilisieren wurden laut Literatur noch nicht unternommen. Strategien zur Immobilisierung wären neben dem Einschluss des Enzyms in polymere Matrices, eine kovalente Bindung oder Adsorption der CYP106A2 an inerte Trägermaterialien. Für Steroidhydroxylierungen sind sicherlich letztere Methoden vorteilhaft, da es bei einem Einschluss des Enzyms zu einer Substrattransportlimitierung durch die polymere Matrix kommen könnte.

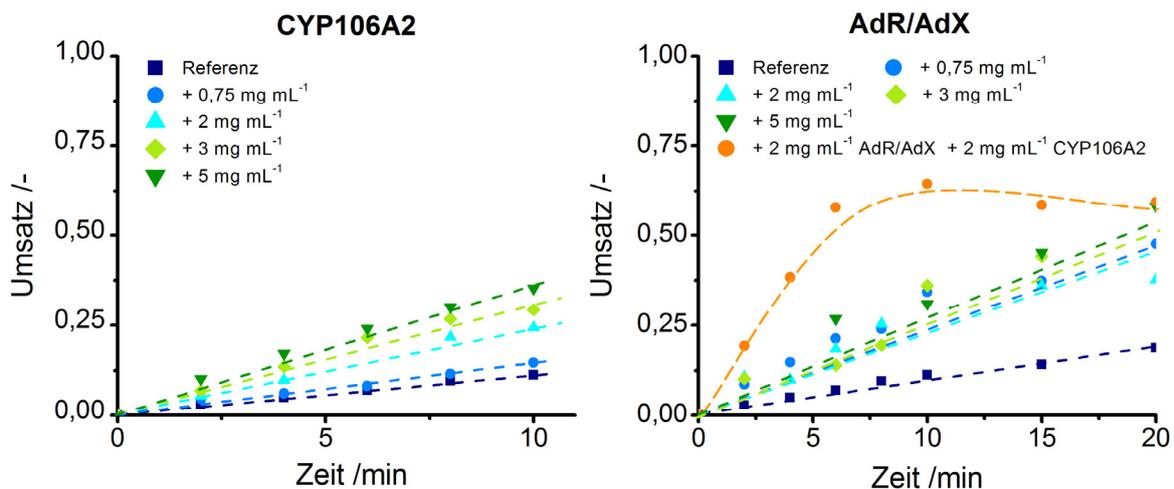
### 6.3.2 Identifizierung des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts der Reaktion

An der 15 $\beta$ -Hydroxylierung sind mehrere Proteinkomponenten beteiligt: Die Cytochrom P450 Reduktase AdR, das Eisenschwefelprotein AdX und die CYP106A2. Vereinfacht gesehen oxidiert die AdR den Cofaktor und gibt die dabei erhaltenen Elektronen nacheinander an das Eisenschwefelprotein AdX weiter, das die Elektronen wiederum der P450 zuführt, die die Hydroxylierung des Substrats katalysiert (vgl. Abb. 5.1). Die Gesamtaktivität der Steroidhydroxylierung ist dabei durch den langsamsten Schritt der Reaktionssequenz limitiert. Durch die Identifizierung dieses Reaktionsschritts könnte die Produktivität der Biotransformation verbessert werden, indem die Proteinkomponente, die die Reaktion limitiert im Reaktionsmedium in größeren Mengen vorgelegt wird oder durch *protein engineering* verbessert wird. Bleibt man bei dem derzeitigen Konzept, dass alle an der Reaktion beteiligten Proteine in einem Organismus exprimiert werden, bevor das Zellrohextrakt erzeugt wird, so müsste die Expressionsrate der jeweiligen Komponente erhöht werden. Dies gelingt, indem man beispielsweise für das Gen einen für die Proteinexpression geeigneteren Vektor mit höherer Kopienzahl wählt, oder die Expression unter die Kontrolle eines stärkeren Promotors setzt. Alternativ könnten die Proteinkomponenten auch einzeln exprimiert werden und nach Herstellung des Zellrohextrakts in einem optimalen Verhältnis zusammengemischt werden.

Für CYP11B1 katalysierte Steroidhydroxylierungen, bei denen der Elektronentransport ebenfalls von bovinem AdR und AdX übernommen wird, wurden die Geschwindigkeitskoeffizienten der Einzelreaktionen bestimmt. Abgesehen von der eigentlichen Steroidhydroxylierung, schien die Elektronenübertragung von AdX zur P450 der langsamste Reaktionsschritt zu sein (Schiffler et al., 2004). Um festzustellen, ob das auch auf die CYP106A2 katalysierte Steroidhydroxylierung zutrifft, wurde experimentell der langsamste Schritt der Reaktionssequenz bestimmt. Hierfür wurde zusätzlich zum eingesetzten Zellrohextrakt, das alle benötigten Proteinkomponenten für die Steroidhydroxylierung enthielt, entweder die Elektronentransportkomponenten AdR und AdX bzw. die CYP106A2 zugegeben und jeweils die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten verglichen. Steigt die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit lediglich bei Zugabe der P450, wäre die eigentliche Steroidhydroxylierung der langsamste Schritt der Reaktion. Nimmt die Produktbildungsrate nur bei Zugabe der Elektronentransportkomponenten zu, so wäre die Oxidation des Cofaktors zur Elektronenbereitstellung der reaktionslimitierende Schritt. Steigt die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit sowohl bei der Zugabe der P450 als auch bei

AdR/AdX Zugabe, wäre die Reaktion durch den Elektronentransport über AdX limitiert. In diesem Fall hängt die Geschwindigkeit des Elektronentransports nicht nur von der Menge des Transporters AdX ab, sondern auch von der Strecke die der Transporter zurücklegen muss. Die Strecke ist umso kürzer, je höher die Konzentration an AdR bzw. P450 in Lösung ist, da die Wahrscheinlichkeit des Transportproteins auf die beiden anderen Komponenten zu treffen, größer ist.

Abbildung 6.3 zeigt die Produktbildungsrate bei Zugabe von P450 bzw. AdR/AdX. Ein Anstieg der Produktbildungsrate war sowohl bei AdR/AdX Zugabe als auch bei P450 Zugabe ersichtlich. Daraus konnte geschlossen werden, dass der Elektronentransport durch AdX die Reaktion limitiert. Interessanterweise scheint die zugegebene Menge an AdR/AdX die Produktbildungsrate nicht zu beeinflussen. Daher wurde vermutet, dass sich bei Zugabe von AdR/AdX der geschwindigkeitsbestimmende Reaktionsschritt ändert. Nicht mehr der Elektronentransport durch AdX, sondern die Steroidhydroxylierung durch die CYP106A2 ist in diesem Fall reaktionslimitierend. Diese Aussage wurde überprüft, indem zusätzlich zu AdR/AdX noch P450 zugegeben wurde. Wie erwartet war ein weiterer Anstieg der Produktbildungsrate zu verzeichnen.



**Abbildung 6.1: Produktbildung bei Zugabe von CYP106A2 bzw. AdR/AdX**

Reaktionsbedingungen: Reaktionsbedingungen: 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß, V = 500 µL, T = 30 °C, 1000 rpm, 50 mM Tris-HCl Puffer pH 8, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 µM Prog (in 2 vol% EtOH vorgelöst), 400 mM 2-Propanol, 0,75 mg mL<sup>-1</sup> Lyophilisat, (+ P450 bzw. AdR/AdX)

### 6.3.3 Regioselektivität der CYP106A2 katalysierten Hydroxylierung

Die Selektivität der CYP106A2 katalysierten Hydroxylierung wird beeinflusst, ob wachsende Zellen, ruhende Zellen oder Zellrohextrakt als Biokatalysator eingesetzt werden. Mit ruhenden Zellen konnte weder für die Hydroxylierung von Progesteron noch für die von Testosteron eine Nebenproduktbildung detektiert werden. Hingegen wurden etwa 20 % Nebenprodukte gebildet, wenn Zellrohextrakt verwendet wurde. Mit wachsenden Zellen als Biokatalysator stieg der Nebenproduktanteil sogar auf 75 %. Die Ursache für diese großen Selektivitätsunterschiede konnte bisher nicht geklärt werden.

Darüber hinaus beeinflusst auch die Wahl des Elektronentransportsystems die Selektivität der CYP106A2. Ruijssenaars et al. (2007) haben festgestellt, dass der Anteil der Nebenprodukte je nach eingesetzten Elektronentransportkomponenten stark variieren kann. Prozesstechnisch ist die Änderung der Selektivität vor allem deshalb interessant, da die geschickte Wahl der Reaktionsbedingungen ermöglichen könnte, nicht nur 15 $\beta$ -hydroxylierte Derivate, sondern auch andere Regioisomere herzustellen. So konnte bei der Hydroxylierung von Progesteron mit wachsenden Zellen bereits eine Verschiebung des Hauptprodukts von 15 $\beta$ -OH-Progesteron hin zu 11 $\alpha$ -OH-Progesteron festgestellt werden, was ein guter Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen wäre.

Alternativ kann die Selektivität der Hydroxylierung durch Methoden des *protein engineering*s verändert werden. Die Selektivität der 15 $\beta$ -Hydroxylierung konnte bereits deutlich verbessert werden, indem das Threonin an Position 248 gezielt gegen Valin getauscht wurde (Ruijssenaars et al., 2007). Darüber hinaus gelang es, Varianten mit verbesserter 11 $\alpha$ -Hydroxylierungsaktivität zu erzeugen (Lisurek et al., 2008). Da der gebildete Anteil an 11 $\alpha$ -OH-Progesteron allerdings 40 % der gebildeten Produkte nicht übersteigt, sind weitere Verbesserungen nötig, um eine effiziente Hydroxylierung an dieser Position durchführen zu können.

## 6.4 Übergeordnete Betrachtung der untersuchten P450 Systeme

Zur Gegenüberstellung der einzelnen Systeme sind Charakteristika wie die Enzymaktivität und Stabilität der untersuchten Cytochrom P450 Monooxygenasen und der entwickelten Prozesse zusammengefasst (Tabelle 6.2). Die Expressionslevel der CYP102A1 und der CYP106A2 in *E. coli* sind ähnlich, hingegen ist die Konzentration der CYP21 in *S. pombe* CAD18 um etwa 2 Größenordnungen geringer. Dies wirkt sich auch auf die 21-Hydroxylierungsaktivität des *S. pombe* Stammes aus, die mindestens 50fach geringer ist als die der anderen Ganzzellbiokatalysatoren. Betrachtet man hingegen die spezifische

Aktivität der P450, ist die Aktivität der CYP21 und der CYP106A2 *in vivo* durchaus vergleichbar. Die Erhöhung des Expressionslevels der CYP21, beispielsweise durch weitere Optimierungen des Anzuchtprotokolls oder die Verwendung anderer Expressionsvektoren wären Strategien um das Expressionslevel der CYP21 in *S. pombe* zu erhöhen. Eine Erhöhung des Expressionslevels der CYP106A2 hingegen wäre nur bedingt von Nutzen. Bei Verwendung eines Ganzzellbiokatalysator würde nicht zu einer Steigerung der Aktivität führen, da nicht die Hydroxylierung selbst, sondern der Substrattransport in die Zelle geschwindigkeitsbestimmend ist. Wird Zellrohextrakt als Biokatalysator eingesetzt, ist der Elektronentransport über das Eisen-Schwefelprotein limitierend. Eine höhere CYP106A2 Konzentration würde zwar in diesem Fall zu einer höheren Aktivität führen (vgl. Kapitel 6.3.2), aber eine Verbesserung der Expression von AdX wäre vermutlich effektiver. Darüber hinaus zeigten Untersuchungen zu den Stabilitäten der Enzyme, dass die Halbwertszeiten aller untersuchten P450 relativ gering sind. Die der bakteriellen CYP102A1 und der CYP106A2 sind jedoch mit 10 – 18 h deutlich kleiner als die der CYP21. Bei der CYP106A2 katalysierten Steroidhydroxylierung limitiert letztendlich die geringe Stabilität der P450 die Anzahl der Reaktionszyklen im repetitiven Satzreaktor. Zur effektiven biotechnologischen Anwendung der untersuchten bakteriellen P450 sollten daher Maßnahmen getätigt werden, um die Stabilität zu erhöhen (vgl. Kapitel 6.31).

Die Produktivitäten der CYP102A1 und der CYP106A2 katalysierten Hydroxylierungen erreichen unter optimierten Prozessparameter den Gramm-Maßstab. Bei der humanen CYP21 beträgt die Produktivität unter optimierten Bedingungen nur  $18 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Insbesondere die geringe CYP21-Aktivität des Ganzzellbiokatalysators spiegelt sich in diesem Wert wider. Die erreichte Biokatalysatorausnutzung ist bei allen Prozessen ähnlich, da TTNs zwischen 1200 und 5000 erreicht werden. Da bisher keine Optimierung bei der Biokatalysatorausnutzung bei der CYP21 und CYP102A1 katalysierten Biotransformation vorgenommen wurde, könnten durch entsprechende Maßnahmen noch weitere Verbesserungen möglich sein.

Insbesondere in Bezug auf die Limitierungen der biotechnologischen Anwendung der jeweils untersuchten P450 und der anzuwendenden Strategie zur Überwindung der Limitierung gab es große Unterschiede bei den in dieser Arbeit untersuchten Biokatalysatoren. Bei der CYP102A1 katalysierten Hydroxylierung von  $\beta$ -Jonon limitierten vor allem substratspezifische Merkmale die effiziente Nutzung des Enzyms. Neben der starken Produktinhibierung wurde eine Oxidation des gewünschten Produkts 4-OH- $\beta$ -Jonon zum entsprechenden Keton beobachtet. Abgesehen davon, wurde eine geringe

Stabilität des Enzyms gegenüber organischen Lösungsmitteln und ionischen Flüssigkeiten festgestellt, die den Einsatz eines Zweiphasensystems zur *in situ* Produktabtrennung. Bei den beiden untersuchten Steroidhydroxylasen CYP21 und CYP106A2 limitierte zwar der Substrattransport in die Zelle die Ganzzellbiotransformation. Die Überwindung der Substrattransportlimitierung gelang jedoch auf unterschiedlichen Wegen. Eine effektive Überwindung der Substrattransportlimitierung bei der CYP106A2 ist durch die Verwendung von Zellrohextrakt möglich. Da es sich bei der CYP21 um ein membran-assoziiertes Enzym handelt, konnte dort dieser Lösungsansatz nicht verfolgt werden. Eine Aktivitätssteigerung wurde aber durch die Verwendung von permeabilisierten Zellen erreicht.

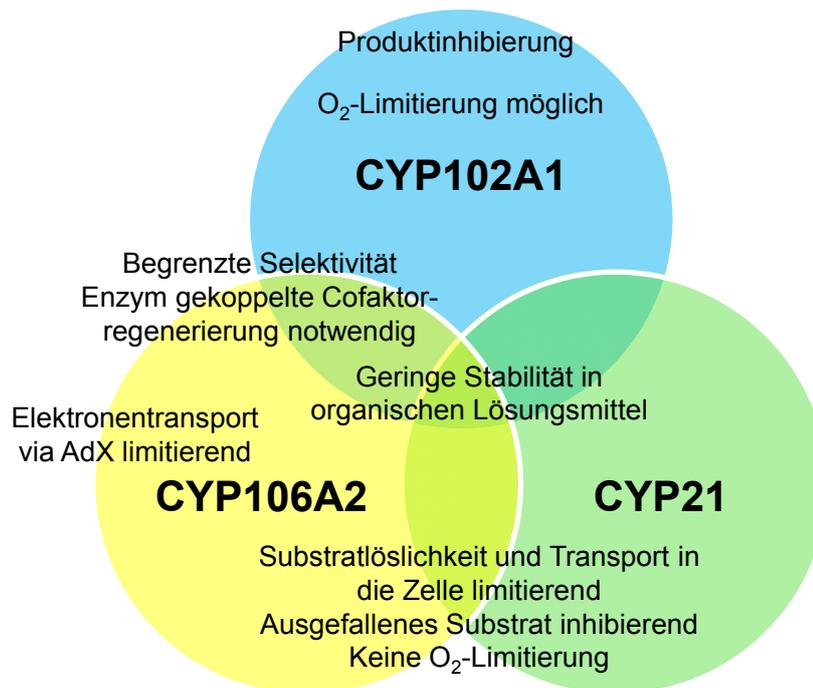
**Tabelle 6.2: Charakteristika der untersuchten Cytochrom P450 Monooxygenasen**

	CYP102A1	CYP21	CYP106A2
Expressionslevel	50 nmol g <sub>wcw</sub> <sup>-1</sup>	0,5 nmol g <sub>wcw</sub> <sup>-1 a</sup>	19,5 nmol g <sub>wcw</sub> <sup>-1</sup>
Aktivität			
Ganzzellbiokat.			
/Pro g Biomasse	8,9 U g <sub>wcw</sub> <sup>-1</sup>	0,008 U g <sub>wcw</sub> <sup>-1</sup>	0,4 U g <sub>wcw</sub> <sup>-1</sup>
/Pro mg Enzym	1,5 U mg <sub>CYP102A1</sub> <sup>-1</sup>	0,3 U mg <sub>CYP21</sub> <sup>-1 b</sup>	0,47 U mg <sub>CYP106A2</sub> <sup>-1</sup>
Lyophilisat			
/Pro g Lyophilisat			9 U g <sub>Lyophilisat</sub> <sup>-1</sup>
/Pro mg Enzym			2,6 U mg <sub>CYP106A2</sub> <sup>-1</sup>
(Lager)Stabilität			
Halbwertszeit bei 30 °C	10 h <sup>c</sup>	110 h <sup>c</sup>	18 h <sup>d</sup>
Maximale Produktivitäten	1,25 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> 6 mM d <sup>-1</sup>	0,018 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> 0,54 mM d <sup>-1</sup>	5,54 g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> 18,25 mM d <sup>-1</sup>
Maximale Katalysatorausnutzung /TTN	5 000	1 250 <sup>b</sup>	2 600

a: Schätzwert nach Dragan et al. (2006a), b: mit dem Schätzwert berechnet, c: Ganzzellbiokatalysator, d: Zellrohextrakt

## 7 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Cytochrom P450 Monooxygenasen charakterisiert, um die Limitierungen P450 katalysierter Hydroxylierungen zu identifizieren und so Ansätze für deren verbesserte biotechnologische Nutzung durch geeignete reaktionstechnische Maßnahmen zu identifizieren. Abbildung 7.1 fasst die identifizierten Limitierungen der untersuchten P450 katalysierten Reaktionen zusammen.



**Abbildung 7.1: Schematische Darstellungen der identifizierten Limitierungen**

Alle drei Enzyme weisen eine relativ geringe Stabilität gegenüber organischen Lösungsmitteln auf. Dies gilt soweit untersucht, auch für ionischen Flüssigkeiten. Der *E. coli* Stamm, der die bakterielle CYP102A1 exprimiert, wurde mit Ausnahme von Diisononylphthalat durch alle untersuchten organischen Lösungsmittel bzw. ionischen Flüssigkeiten vollständig inaktiviert. Der *S. pombe* CAD 18 Stamm mit der humanen membranassoziierten CYP21 zeigte ebenfalls in Gegenwart von 10 vol % verschiedener organischer Cosolventien deutliche Aktivitätsverluste im Vergleich zu reinem Puffer. Die höchste Toleranz gegenüber Lösungsmitteln zeigte der *E. coli* Stamm, der die bakterielle CYP106A2 exprimiert. Selbst in Gegenwart 15 vol% 2-Propanol konnten keine Aktivitätseinbußen des Biokatalysators festgestellt werden. Die Stabilität des Ganzzellbiokatalysators wurde hingegen schon in Gegenwart von 5 vol% 2-Propanol beeinträchtigt.

Bei beiden bakteriellen P450s, CYP106A2 und CYP102A1, konnte die Bildung von Nebenprodukten beobachtet werden. Bei der CYP106A2 katalysierten  $15\beta$ -Hydroxylierung entstehen Regioisomere, während bei der CYP102A1 katalysierten Hydroxylierung von  $\beta$ -Jonon die Weiteroxidation des gewünschten Produkts 4-OH- $\beta$ -Jonon zum entsprechenden Keton beobachtet wurde. Darüber hinaus wurde lediglich eine moderate Enantioselektivität bezüglich der Hydroxylierung von  $\beta$ -Jonon festgestellt. Unter optimierten Bedingungen wurde ein Enantiomerenüberschuss für das (*R*)-4-OH- $\beta$ -Jonon von 72 % erreicht, der im Verlauf der Reaktion aufgrund der bevorzugten Oxidation des (*R*)-Enantiomers zum Keton abnahm.

Beide untersuchten bakteriellen P450 zeigten außerdem eine Limitierung durch unzureichende Cofaktorversorgung, wenn keine enzymgekoppelte Cofaktorregenerierung im System implementiert worden war. Bei der CYP102A1 katalysierten Hydroxylierung von  $\beta$ -Jonon war sowohl die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit als auch der Umsatz in Gegenwart der FDH bzw. *Lb*ADH um mehr als das fünffache erhöht. Hingegen kam es bei der CYP106A2 ohne enzymgekoppelter Cofaktorregenerierung nur bei der Verwendung des Zellrohextrakts und nicht beim Ganzzellbiokatalysator zu einer unzureichenden Cofaktorversorgung.

Aufgrund der geringen Substratlöslichkeit im wässrigen Reaktionsmedium sind die beiden untersuchten Ganzzellbiotransformationen zur CYP106A2 und CYP21 katalysierten Steroidhydroxylierung durch den Substrattransport in die Zelle limitiert. Die Transportlimitierung über die Zellmembran konnte bei der CYP21 durch den Einsatz permeabilisierter Zellen und bei der CYP106A2 durch Verwendung von Zellrohextrakt überwunden werden.

Weder bei der CYP106A2 noch bei der CYP21 katalysierten Steroidhydroxylierung konnte eine Limitierung durch unzureichende Sauerstoffversorgung festgestellt werden. Anders bei der CYP102A1: In Gegenwart von Biokatalysatorkonzentrationen größer  $8 \text{ g L}^{-1}$  wurde unter den gegebenen Reaktionsbedingungen eine Sauerstofftransport-limitierung beobachtet.

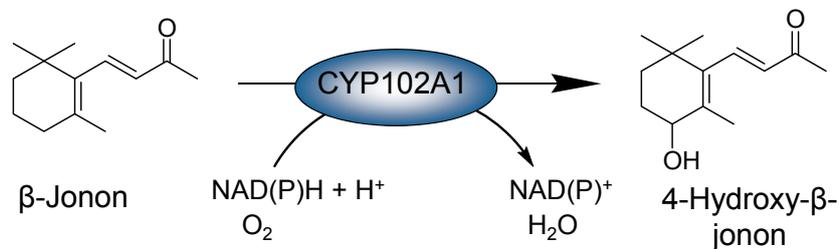
Darüber hinaus wurde bei allen untersuchten P450 katalysierten Reaktionen eine Inhibierung durch das Produkt oder das Substrat beobachtet. Bei der CYP102A1 katalysierten Hydroxylierung von  $\beta$ -Jonon wurde eine Produktinhibierung identifiziert, während beide Steroidhydroxylasen durch das unlösliche Substrat, das im

Reaktionsmedium vorliegt, inhibiert werden. Für eine Anwendung ist es also vorteilhaft, eine geringe Substratkonzentration kleiner 0,5 mM während der Reaktion einzustellen.

Bei der CYP106A2 katalysierten Hydroxylierung sind insgesamt drei Proteinkomponenten an der Reaktion beteiligt, wobei die Gesamthydroxylierungsaktivität durch den langsamsten Schritt der Reaktionssequenz bestimmt wird. Untersuchungen dazu, identifizierten den Elektronentransport über das Eisenschwefelprotein AdX von der Reduktase zur P450 als geschwindigkeitslimitierend.

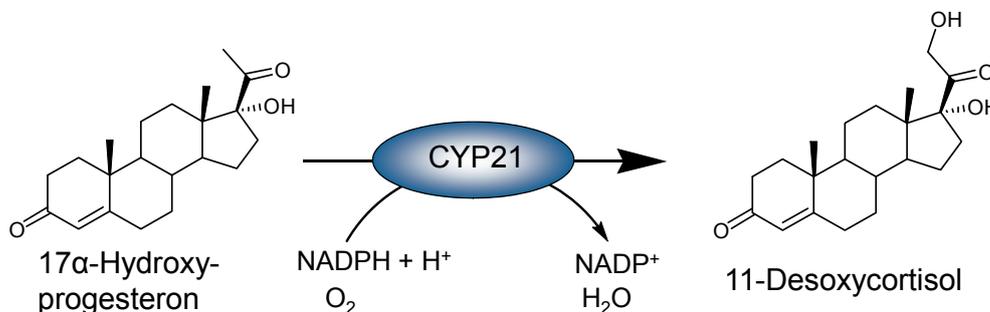
Auf Basis dieser Erkenntnisse wurden die Hydroxylierungen durch geeignete reaktionstechnische Maßnahmen hinsichtlich höherer Produktivitäten optimiert.

### CYP102A1 katalysierte Hydroxylierung von $\beta$ -Jonon



- Durch die Zugabe von DMSO konnte der Enantiomerenüberschuss für das (*R*)-Enantiomer auf 72 % gesteigert werden.
- Erstmals konnte gezeigt werden, dass Cytochrom P450 Monooxygenasen zur kinetischen Racematspaltung eingesetzt werden können.
- Unter optimierten Bedingungen im Satzreaktor wurde eine Produktivität von 6 mM d<sup>-1</sup> bzw. 1,25 g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> für die Bildung von 4-Hydroxy- $\beta$ -jonon erreicht.

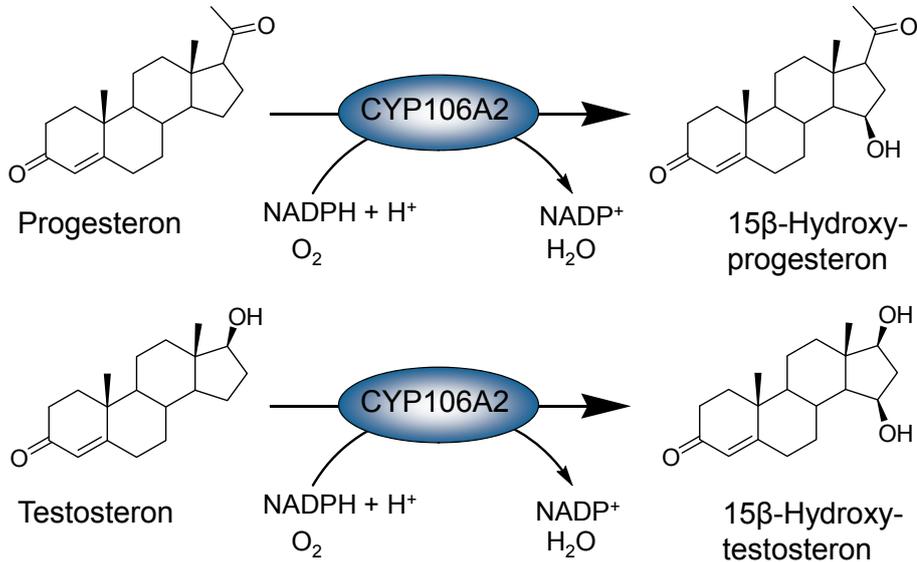
### CYP21 katalysierte Hydroxylierung von 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron



- Durch LC-MS/MS Messungen konnte erstmals die intrazelluläre Cofaktorkonzentrationen von *Schizosaccharomyces pombe* während einer P450 katalysierten Ganzzellbiotransformation bestimmt werden.

- Unter optimierten Reaktionsbedingungen konnte die Produktivität der Hydroxylierung mit  $540 \mu\text{M d}^{-1}$  bzw.  $18 \text{ mg d}^{-1}$  mehr als verdoppelt werden.

### CYP106A2 katalysierte Hydroxylierung von Progesteron und Testosteron



- Im Satzreaktor wurde eine Produktivität von  $11,4 \text{ mM d}^{-1}$  bzw.  $3,75 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  für die Hydroxylierung von Progesteron und  $18,25 \text{ mM d}^{-1}$  bzw.  $5,54 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$  für die Oxidation von Testosteron erreicht. Dies entspricht einer Verbesserung von den Faktor 18 gegenüber den Literaturwerten.
- Durch repetitive Satzreaktoren wurde die Katalysatorausnutzung im Vergleich zu den Biotransformationen im Satzreaktor verdoppelt. Eine TTN von 2600 für die CYP106A2 und von 100 für den Cofaktor wurden erreicht. 88 mg 15β-OH-testosteron und 40 mg 15β-OH-progesteron konnten in einer Reinheit von 99,5 % (HPLC) bzw. 95 % (HPLC) hergestellt werden.

## 8 Material und Methoden

### 8.1 Chemikalien und Geräte

#### 8.1.1 Verwendete Chemikalien

Biosolve, Valkenswaard, Niederlande	Acetonitril Methanol
Calbiochem, Bad Soden, Deutschland	Chloramphenicol
Codexis, Redwood City, USA	NAD <sup>+</sup> NADH (Dinatriumsalz) NADP <sup>+</sup> (Dinatriumsalz) NADPH (Tetranatriumsalz)
Fisher Scientific, Hampton, USA	11 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron
Fluka, Neu-Ulm, Deutschland	5-Aminolevulinsäure Agar-Agar Ammoniumchlorid Diisononylphthalat Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat Glucose Monohydrat Hefeextrakt Histidin Kupfersulfat Pentahydrat Lysozym Magnesiumchlorid Hexahydrat Myo-Inositol Natriumethanolat Natriumformiat Natriumsulfat Nicotinsäure Phthalmonopersäure Testosteron Trypton Uracil Zitronensäure
Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	chemisch kompetente <i>E. coli</i> BL21 Star chemisch kompetente <i>E. coli</i> BL21 (DE3)
KMF Laborchemie, Lohmar, Deutschland	2-Propanol Aceton Diethylether Ethylacetat
Linde AG, Pullach, Deutschland	Kohlenmonoxid
Merck, Darmstadt, Deutschland	Borsäure Calciumchlorid Dihydrat Chloroform

	<p>Dikaliumhydrogenphosphat Eisen(II)-chlorid Hexahydrat Ethanol Hexan IL: BMIM (CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N IL: BMIM PF<sub>6</sub> IL: EMIM Et<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> IL: EMIM MDEGSO<sub>4</sub> Kaliumchlorid Kaliumdihydrogenphosphat Kaliumhydrogenphthalat Kaliumiodid Kieselgel F60; 254 nm Natriumhydrogencarbonat Natriummolybdat Dihydrat Salzsäure Toluol Zinksulfat Heptahydrat</p>
Resindion, Binasco, Italien	<p>Diaion HP 20L Diaion HP2MGL Sepabeads EB BU Sepabeads EB HG Sepabeads SP207</p>
Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	<p>Carbenicillin Isopropylthiogalactosid (IPTG) Kanamycin</p>
Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland	<p>(+)-Phanthothensäure 11-Desoxycorticosteron 11-Desoxycortisol 17<math>\alpha</math>-Hydroxyprogesteron 6<math>\beta</math>-Hydroxytestosteron Adenin Amberlite XAD 16 Amberlite XAD 4 Amberlite XAD 7 Biotin Dimethylsulfoxid Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat DNase Glycerin Lewatit VPOC 1163 Mangansulfat Hydrat Natriumdithionit Progesteron Streptomycin Triton X 100 Tween 80 <math>\alpha</math>-Jonon <math>\beta</math>-Jonon</p>
SPI BIO, Montigny le Bretonneux, Frankreich	<p>11<math>\alpha</math>-Hydroxytestosteron</p>

## 8.1.2 Verwendete Geräte

Analysenwaage	Firma Sartorius, BP211D
Autoklav	Firma Systec, DX 65
GC	Firma Agilent, 7683 series
GC Kapillarsäulen	Firma Macherey & Nagel, Lipodex E 25 m x 0,25 mm
HPLC	Firma Agilent, 1100 series
HPLC Säule	Firma Macherey & Nagel, LiChrospher RP18 EC 5 µM 250 x 4 mm
HPLC Säule für das MS	Firma Phenomenex, Synergi Fusion 4u RP 80A 150*2 mm
LC-MS/MS	
MS	Firma AB/MDS Sciex, API 4000 Triple Quadrupole Mass Spectrometer
LC	Firma Jasco, X-LC System
NMR	Firma Bruker, AMX300 & DMX 600
pH-Meter	Firma Metrohm, pH-Meter 691
Photometer	Firma Shimadzu, UV 1601
Rotationsverdampfer	Firma Büchi, Rotavapor R144
Schüttelschrank	Firma Satorius, Certomat – BS 1
Sonifier	Firma Branson, Sonifier W-250
Sterilwerkbank	Firma Heraeus, HERASafe 1540V10
Thermostat	Firma Eppendorf, Thermostat plus
Zentrifugen	Firma Eppendorf, Zentrifuge 5415 D Firma Beckmann Coulter, Zentrifuge AV-J20XP Firma Heraeus, Multifuge 3 S-R

## 8.2 CYP102A1 aus *B. megaterium*

### 8.2.1 Plasmide und Stammherstellung

Plasmid	Eigenschaften	Quelle
pET28a_P450-BM3	Kan <sup>R</sup> , CYP102A1 A74G F87V L188Q R966D W1046S aus <i>B. megaterium</i>	(Maurer et al., 2005)
pCDF_Duett_FDHDH	Str <sup>R</sup> , FDH aus <i>M. vaccae</i> 10	Stephanie Bringer-Meyer, IBT 1
pCDF_Duett_LbADHDH	Str <sup>R</sup> , ADH aus <i>L. brevis</i>	Stephanie Bringer-Meyer, IBT 1

Die verwendeten Plasmide wurden einzeln nacheinander in chemisch kompetente *E. coli* BL21 (DE3) mittels Hitzeschockmethode eingebracht (Hanahan, 1983).

### **8.2.2 Kultivierung von *E. coli* BL21 (DE3)**

Für die Vorkultur wurden 50 mL frisches Terrific Broth (TB) Medium, welches die Antibiotika Kanamycin und Streptomycin als Selektionsmarker in einer Konzentration von jeweils 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  beinhaltet, mit ca. 200  $\mu\text{L}$  einer Kryokultur beimpft. Die Inkubation erfolgte im 250 mL Schüttelkolben über Nacht bei 30 °C und 160 rpm. Anschließend wurde ein mit 195 mL TB-Medium befüllter 1 L Kolben mit 5 mL Vorkultur beimpft und für weitere 3 h bei 30 °C und 160 rpm inkubiert. Durch die Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 0,05 mM wurde die Enzymexpression gestartet, bevor die Zellen für 27 h bei 30 °C und 160 rpm inkubiert wurden.

Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation (Beckmann Coulter AV-J20XP) bei 6000 rpm und 4 °C für 20 min geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde mit 50 mM  $\text{KPi}$  pH 6 gewaschen und erneut bei 6000 rpm und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde mit dem Zellpellet eine 10 %ige Zellsuspension (Feuchtgewicht) mit 50 mM  $\text{KPi}$  pH 6 hergestellt und bei 4 °C gelagert.

#### **8.2.2.1 Glycerinkultur**

Zur Vorbereitung der Langzeitkultivierung wurde ein 250 mL Schüttelkolben, der mit 50 mL TB Medium und den entsprechenden Selektionsmarkern befüllt war, mit einer Kolonie einer Agarplatte beimpft und über Nacht bei 30 °C und 160 rpm inkubiert. Die Übernachtskultur wurde 1:1 mit sterilem Glycerin versetzt und zu je 1 mL in sterile Kryoröhrchen aliquotiert, bevor sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80°C gelagert wurden.

### **8.2.3 Chemische Synthese von 4-Hydroxy- $\beta$ -jonon**

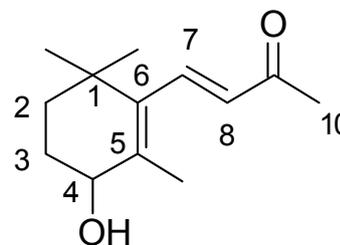
Die Synthese erfolgte laut (Haag et al., 1980).

3 g (15,6 mmol)  $\alpha$ -Jonon wurden in 12 mL Diethylether gelöst und in einem 250 mL Dreihalskolben vorgelegt. 75 mL in Methanol gelöster 0,58 M (43,5 mmol) Phthalmonopersäurelösung wurden mit 75 mL Diethylether verdünnt und bei 0 °C tropfenweise zu dem Reaktionsansatz gegeben und anschließend für 48 h bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wurde das Reaktionsgemisch mit Diethylether verdünnt und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Nach der Kontrolle auf vorhandene Peroxide wurde das Lösungsmittel unter Vakuum abgedampft. Das Rohprodukt wurde chromatographisch an Kieselgel F60 unter Verwendung des

Laufmittelgemisches Toluol:Ethylacetat im Verhältnis 9:1 aufgereinigt. Die entsprechenden UV-aktiven Fraktionen wurden einrotiert und mittels NMR die Identität des Produkts überprüft (Ausbeute: 1,95 g, 9,3 mmol, 60 %).

1 g (4,8 mmol) des 4,5-Epoxy-4,5-dihydro- $\alpha$ -jonon wurde in 9 mL Methanol gelöst, mit 430  $\mu$ L einer 1,7 M Natriummethanolatlösung versetzt und für 24 h unter Argonatmosphäre gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit H<sub>2</sub>O verdünnt und mit verdünnter Salzsäure neutralisiert bevor es am Rotationsverdampfer eingeeengt und erneut chromatographisch an Kieselgel F60 mit Toluol:Hexan:Aceton 3:6:2 aufgereinigt wurde. Die entsprechenden UV-aktiven Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Die weitere Aufreinigung erfolgte durch eine Kugelrohrdestillation am Hochvakuum (90°C, 10<sup>-2</sup> mbar). Zur Überprüfung der Synthese wurden <sup>1</sup>H-NMR Experimente durchgeführt. Ausbeute: 500 mg (30 %).

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 7,19 (1 H, d,  $J$  = 18 Hz, H 7); 6,12 (1 H, d,  $J$  = 18 Hz, H 8), 4,02 (1 H, s, H 4), 2,30 (3 H, s, H 10), 1,93 (2 H, m, ), 1,85 (3 H, s, Me an C 5), 1,93 - 1,45 (5 H, m, OH; H 2, H 3), 1,07 (3 H, s, Me an C1), 1,04 ppm (3 H, s, Me an C1).



## 8.2.4 Aktivitätsbestimmung des *E. coli* Stammes mit CYP102A1 Variante

Die Aktivitätsbestimmungen wurden im 250 mL Schüttelkolben mit einem Gesamtflüssigvolumen von 25 mL in 50 mM KP<sub>i</sub> pH 6,5 durchgeführt.  $\beta$ -Jonon wurde in Ethanol vorgelöst und in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben, die Cosubstratkonzentration (Formiat bzw. 2-Propanol) betrug 50 mM. Durch die Zugabe des Biokatalysators in einer Konzentration von 2 g L<sup>-1</sup> wurde die Reaktion gestartet. Zum Zeitpunkt  $t$  = 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 90 120 min wurden Proben von 900  $\mu$ L genommen und für 1 min bei 99 °C inkubiert. Zur Probenaufarbeitung wurden 20  $\mu$ L 20 mM  $\alpha$ -Jononlösung als interner Standard zugegeben. Mit Hilfe von 500  $\mu$ L Ethylacetat wurden die Jononderivate extrahiert und anschließend mittels GC vermessen.

## 8.2.5 Stabilitätsuntersuchungen des *E. coli* Stammes mit CYP102A1 Variante

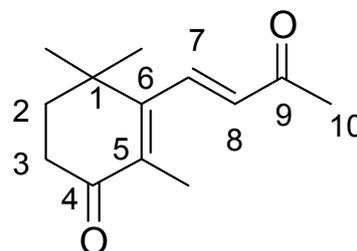
Die Zellen wurden bei der entsprechenden Temperatur als 10 %ige Zellsuspension in 50 mM  $\text{KPi}$  pH 6,5 inkubiert und in regelmäßigen Abständen wurde die Aktivität mit dem unter Punkt 8.2.4 beschriebenen Assay bestimmt.

## 8.2.6 Präparative Herstellung und Identifizierung des Nebenprodukts 4-Oxo- $\beta$ -jonon

20 mg (0,1 mmol) des 4-Hydroxy- $\beta$ -jonons wurden in 50 mM  $\text{KPi}$  Puffer pH 6,5 in Gegenwart von 5 g *E. coli* CYP102A1 + FDH (Feuchtgewicht) und 1 vol% 2-Propanol im Schüttelkolben bei 30 °C inkubiert. Mittels GC wurde die Bildung der unbekannt Substanz kontrolliert. Nachdem etwa 70 % des Substrats zum Nebenprodukt umgesetzt waren, wurde die Reaktion gestoppt und der Reaktionsansatz dreimal mit je 25 mL Ethylacetat extrahiert. Nach Einengen der organischen Phase wurde das Nebenprodukt mittels präparativer Dünnschichtchromatographie an Kieselgel F 60 mit Hexan:Ethylacetat im Verhältnis 3:2 aufgereinigt und isoliert. Zur Strukturaufklärung wurden  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  NMR Experimente durchgeführt.

$^1\text{H}$ -NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7,25 (1 H, d,  $J$  = 18 Hz, H 7), 6,19 (1 H, d,  $J$  = 18 Hz, H 8), 2,54 (2 H, t,  $J$  = 6,3 Hz, H 3), 2,35 (3 H, s, H 10), 1,91 (2 H, t,  $J$  = 6,3 Hz, H 2), 1,82 (3 H, s, Me an C 5) 1,2 ppm (6 H, 2 x Me an C 1).

$^{13}\text{C}$ -NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 197 (C 9), 189 (C 4), 157 (C 6), 140 (C 7), 133 (C 8), 130 (C 5), 37 (C 2), 34,5 (C 1), 34 (C 3), 29 (C 10), 27, 9 (2x Me an C 1), 13,4 ppm (Me an C 5).



## 8.2.7 CYP102A1 katalysierte Oxidation von 4-Hydroxy- $\beta$ -jonon

In einem 250 mL Schüttelkolben mit einem Gesamtflüssigvolumen von 25 mL wurde 50 mM  $\text{KPi}$  pH 6,5 der 50 mM 2-Propanol beinhaltete, vorgelegt. Der *E. coli* mit CYP102A1 + *Lb*ADH wurde in einer Endkonzentration von 20 g  $\text{L}^{-1}$  zugegeben und durch die Zugabe von 1 mM racemischen 4-OH- $\beta$ -Jonon, das in 1 vol% Ethanol vorgelöst wurde, wurde die Biotransformation gestartet und bei 20 °C und 200 rpm inkubiert. Zu gegebenen Zeitpunkten wurden 900  $\mu\text{L}$  Reaktionsmedium als Probe genommen und für 1 min bei 99 °C inkubiert. Zur Probenaufarbeitung wurden diese mit 20  $\mu\text{L}$  20 mM  $\alpha$ -Jononlösung als internen Standard versetzt, die Jononderivate mit 500  $\mu\text{L}$  Ethylacetat extrahiert und anschließend mittels GC vermessen.

## 8.2.8 *In situ* Produktabtrennung

### 8.2.8.1 Zweiphasensystem

Die Lösungsmittel MTBE, Toluol, Decalin, Chloroform und Ethylacetat und die ILs BMIM ( $\text{CF}_3\text{SO}_2$ )<sub>2</sub>N und BMIM PF<sub>6</sub> wurden zur Untersuchung von Zweiphasensystemen herangezogen. Als Reaktionsgefäß diente ein 250 mL Schüttelkolben und ein zylindrisches Glasgefäß mit einem Volumen von 20 mL. Als wässrige Phase wurde 50 mM KP<sub>i</sub> pH 6,5 verwendet, der mit reinem Sauerstoff gesättigt wurde. Die organische Phase bzw. die ionische Flüssigkeit wurde jeweils in einem Verhältnis 1:1 oder 1:5 zur wässrigen Phase eingesetzt. Das jeweilige Cosubstrat des Enzyms zur Cofaktorregenerierung wurde in einer Konzentration von 50 mM zugegeben.  $\beta$ -Jonon wurde in Ethanol vorgelöst und in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Durch die Zugabe des Ganzzellbiokatalysators (*E. coli* CYP102A1 + FDH/*Lb*ADH) in einer Konzentration von 8 g L<sup>-1</sup> wurde die Reaktion gestartet. Zu gegebenen Zeitpunkten wurden sowohl von der wässrigen als auch von der organischen Phase/ionischen Flüssigkeit Proben genommen. Bevor die wässrigen Proben mittels GC analysiert wurden, wurden diese mit 20  $\mu$ L 20 mM  $\alpha$ -Jononlösung (IS) versetzt und anschließend mit Ethylacetat extrahiert. Die ionischen Flüssigkeiten wurden ebenfalls mit IS versetzt und mit Hexan extrahiert. Zur Untersuchung von Diisononylphthalat als zweite Phase wurden die Reaktionsbedingungen, die zur Hydroxylierung von  $\alpha$ -Pinen angewandt wurden, adaptiert (Schewe et al., 2009). Die Reaktion wurde genauso im Schüttelkolben durchgeführt, allerdings wurde die organische Phase in einem Verhältnis von 1:2 eingesetzt, wobei der Anteil von  $\beta$ -Jonon an der organische Phase 20 vol% betrug. Des Weiteren wurde eine Cosubstratkonzentration von 1 vol% 2-Propanol eingestellt und durch die Zugabe von *E. coli* CYP102A1 + *Lb*ADH in einer Konzentration von 8 g L<sup>-1</sup> wurde die Reaktion gestartet.

### 8.2.8.2 Adsorberharze

Zur Vorbereitung wurde die Adsorbermaterialien bei 60 °C getrocknet und anschließend wurden 2 g der Adsorberharze in eine Filterspritze gefüllt, bevor sie mit 5 mL einer 500 mM  $\beta$ -Jononlösung versetzt und bei 30 °C für 3 – 4 Stunden inkubiert wurden. Anschließend wurden die Adsorbermaterialien 3 Mal mit 50 mM KP<sub>i</sub> pH 6 gewaschen und gefriergetrocknet. Zur Bestimmung der Beladungskapazität wurde eine definierte Menge an Adsorber entnommen und mit Ethanol für 3 – 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Konzentration an  $\beta$ -Jonon in Lösung mittels GC bestimmt und auf die Konzentration bezogen auf den Adsorber umgerechnet.

Das Verteilungsverhältnis zwischen Adsorber und dem wässrigen Reaktionsmedium wurde bestimmt, indem 1 g Adsorberharze in 25 mL 50 mM  $KP_i$  pH 6,5 + 1 vol% EtOH für 4 Stunden inkubiert wurden, sodass sich ein Verteilungsgleichgewicht für das  $\beta$ -Jonon einstellen konnte. Anschließend wurden die Adsorberharze durch Filtration vom Reaktionsmedium abgetrennt. 900  $\mu$ L der wässrigen Phase wurden vor der GC-Analyse mit 20  $\mu$ L 20 mM IS versetzt und mit 500  $\mu$ L Ethylacetat extrahiert. Mit den Adsorberharzen wurde, wie im obigen Absatz beschrieben, fortgefahren.

Die Biotransformation in Gegenwart der Adsorbentien wurde im 250 mL Schüttelkolben bei 20 °C und 200 rpm durchgeführt. 0,6 g mit  $\beta$ -Jonon beladene Amberlite XAD 16 und 1 g Sepabeads EB BU wurden jeweils in einem Nylonsack mit einer definierten Porengröße von 20  $\mu$ m zurückgehalten. 1 vol% 2-Propanol wurde zur Cofaktoregenerierung zugegeben und durch die Zugabe von 50 g L<sup>-1</sup> *E. coli* CYP102A1 + LbADH wurde die Reaktion gestartet. In regelmäßigen Zeitabständen wurden sowohl von der wässrigen Phase, als auch von den Adsorberharzen Proben genommen. Die wässrigen Proben wurden wie üblich aufgearbeitet, während die Adsorberharze gefriergetrocknet und ausgewogen wurden bevor sie für 3 – 4 h mit Ethanol inkubiert wurden. Nach Filtration wurde die ethanolhaltige Lösung mittels GC analysiert.

### 8.2.9 Satzreaktor unter optimierten Bedingungen

50 mM  $KP_i$  pH 6,5 der DMSO in einer Endkonzentration von 2 vol% beinhaltete, wurde in einem 250 mL Schüttelkolben vorgelegt. 2-Propanol wurde in einer Konzentration von 50 mM zugegeben und eine  $\beta$ -Jonon Konzentration von 1 mM wurde eingestellt. Durch die Zugabe von 2 g L<sup>-1</sup> *E. coli* CYP102A1 + LbADH wurde die Biotransformation gestartet und bei 20 °C und 200 rpm inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden 900  $\mu$ L Probe gezogen, 1 min bei 99 °C inkubiert. Nach Zugabe von 20  $\mu$ L 20 mM  $\alpha$ -Jonon als internen Standard wurden die Jononderivate mit Ethylacetat extrahiert und mittels GC analysiert.

### 8.2.10 Instrumentelle Analytik

#### 8.2.10.1 GC

Die Quantifizierung von Substrat und Produkt erfolgte mit einem GC der Firma Agilent, auf der Säule Lipodex E (Firma Macherey und Nagel). Die Trennung der beiden Enantiomere (*R*)- & (*S*)-4-OH- $\beta$ -Jonon, ermöglichte die Anwendung des folgenden Temperaturgradienten:

- 130 °C für 1 min
- $\Delta 1$  °C min<sup>-1</sup> bis 150 °C
- 150 °C für 6 min

- $\Delta 1 \text{ } ^\circ\text{C min}^{-1}$  bis  $170 \text{ } ^\circ\text{C}$

Retentionszeiten der analysierten Substanzen:

- $\alpha$ -Jonon: 6,6 min
- $\beta$ -Jonon: 8,7 min
- (R)-4-OH- $\beta$ -Jonon: 24,5 min
- (S)-4-OH- $\beta$ -Jonon: 25,2 min

### 8.2.10.2 CO-Differenzspektroskopie

Zwei 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden mit je 2 mL 10 %iger Zellsuspension befüllt und für 5 min bei 14 000 rpm und  $4 \text{ } ^\circ\text{C}$  zentrifugiert (Eppendorf 5415 D). Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Pellet in 1 mL Aufschlusspuffer (50 mM KPi, 0,10 mM  $\text{MgCl}_2$ ,  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  Lysozym,  $0,1 \text{ } \mu\text{g/mL}^{-1}$  DNase I, pH-Wert 8,0) resuspendiert und für 2 h bei  $35 \text{ } ^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde für weitere 10 min bei 14 000 rpm und  $4 \text{ } ^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand jedes Eppendorf-Reaktionsgefäßes wurde in eine Küvette überführt und eine Spatelspitze Natriumdithionit wurde zugegeben bevor die Lösung für 5 min bei RT inkubiert wurde. Eine der beiden Küvetten wurde für 1 min mit CO begast und anschließend die Absorption zwischen 450 und 490 nm gemessen. Als „Nullprobe“ diente die nicht begaste Küvette. Die Cytochrom P450 Konzentration wurde mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{450-490} = 91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bestimmt (Omura et al., 1964).

## 8.3 Humane CYP21

Der Stamm *Schizosaccharomyces pombe* CAD18, welcher das Gen für die CYP21 trägt, wurde von der Firma Pombiotech, Saarbrücken hergestellt (Dragan et al., 2006b).

### 8.3.1 Kultivierung der *S. pombe* CAD18

200  $\mu\text{L}$  einer Kryokultur wurden auf EMM- Agarplatten, die mit je  $0,1 \text{ g L}^{-1}$  Uracil, Histidin und Adenin supplementiert sind, ausplattiert und 3 Tage bei  $30 \text{ } ^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden in einem 250 mL Schüttelkolben 25 mL frisches EMM-Medium + Supplemente vorgelegt, mit ausreichend Zellen einer Platte beimpft und für 32 h bei  $30 \text{ } ^\circ\text{C}$  und 200 rpm inkubiert. Die Hauptkultur wurde in 1 L Schüttelkolben durchgeführt, die mit 95 mL frischen EMM Medium + Supplemente befüllt wurden. Nach der Inokulation mit 5 mL der Vorkultur wurden die Zellen für rund 64 h bei  $30 \text{ } ^\circ\text{C}$  und 200 rpm inkubiert.

Durch Zentrifugation (Beckmann Coulter AV-J20XP) bei 6000 rpm und  $4 \text{ } ^\circ\text{C}$  für 20 min wurden die Zellen geerntet. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Zellpellet mit 50 mM KPi pH 6 gewaschen und erneut bei 6000 rpm und  $4 \text{ } ^\circ\text{C}$  für 20 min zentrifugiert.

Nach erneuten Verwerfen des Überstands wurde eine 20%ige Zellsuspension (Feuchtgewicht) mit 50 mM  $KP_i$  pH 6 hergestellt, die bei 4 °C gelagert wurde.

#### **8.3.1.1 Glycerinkultur**

Die Langzeitlagerung des rekombinanten Spalthefestammes erfolgte als Glycerinkultur. Zur Vorbereitung wurde ein 250 mL Schüttelkolben der mit 25 mL sterilem YES-Medium befüllt wurde, mit Zellen einer EMM Agarplatte beimpft und über Nacht bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Die Übernachtskultur wurde anschließend mit 25 mL sterilem Glycerin verdünnt und zu 1 mL in sterile Kryoröhrchen aliquotiert und in flüssigen Stickstoff schockgefroren, bevor sie bei -80 °C gelagert wurden.

#### **8.3.2 Aktivitätsbestimmung der *S. pombe* CAD18**

In einem 250 mL Schüttelkolben, mit einem Gesamtflüssigvolumen von 25 mL wurden 50 mM  $KP_i$  pH 7,5 vorgelegt. 17 $\alpha$ -Prog, das in 1 vol% Ethanol vorgelöst wurde, wurde in einer Endkonzentration von 100  $\mu$ M zugegeben und durch die Zugabe von 20 g L<sup>-1</sup> *S. pombe* CAD 18 die Reaktion gestartet und bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Zum Zeitpunkt t = 20, 40, 60, 90, 120, 180, 240 min wurden 500  $\mu$ L Probe gezogen und für 1 min bei 99 °C inkubiert. Zur Probenaufarbeitung wurden 25  $\mu$ L einer 20 mM DOC-Lösung als interner Standard zugegeben und mit 500  $\mu$ L Chloroform extrahiert. 400  $\mu$ L der organischen Phase wurden entnommen, anschließend das Lösungsmittel abgedampft und der Rückstand erneut in 400  $\mu$ L EtOH aufgenommen, bevor die Probe mittels HPLC analysiert wurde.

#### **8.3.3 Stabilitätsuntersuchungen der *S. pombe* CAD18**

Der rekombinante Spalthefestamm wurde als 20 %ige Zellsuspension in 50 mM  $KP_i$  pH 6 bei einer bestimmten Temperatur inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurde die Aktivität der Zellen, wie unter Punkt 8.3.2 beschrieben, bestimmt.

#### **8.3.4 Löslichkeitsuntersuchungen der Steroide**

Die Löslichkeit von 17 $\alpha$ -Prog wurde sowohl in reinem Wasser als auch in Gegenwart verschiedener Cosolventien untersucht. Dabei wurden die Cosolventien in verschiedenen Konzentrationen von jeweils 1, 2, 5, 10 und 20 vol% eingesetzt. 1 mL der jeweiligen Lösung wurde mit einer Spatelspitze 17 $\alpha$ -Prog versetzt und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde kontrolliert, ob die Lösungen noch mit Steroid übersättigt sind, gegebenenfalls 17 $\alpha$ -Prog nachdosiert und weiter inkubiert. Anschließend wurden die übersättigten Lösungen über einen 20  $\mu$ m Filter filtriert und mittels HPLC die

gelösten Mengen an  $17\alpha$ -Prog quantifiziert. Analog erfolgten die Untersuchungen zur Löslichkeitsbestimmung bei Zugabe von Cyclodextrinen.

### **8.3.5 Bestimmung der intrazellulären Cofaktorkonzentration der *S. pombe* CAD18**

Für die Bestimmung der cytosolischen Cofaktorkonzentration in der stationären Wachstumsphase wurden Zellen, die sich im entsprechenden Wachstumsstadium befanden mittels Zentrifugation abgeerntet und mit 50 mM  $KP_i$  pH 6 gewaschen (siehe 8.3.1). Anschließend wurden pro Messung 1,5 g Biomasse (Feuchtgewicht) mit 2,5 mL  $-50\text{ }^\circ\text{C}$  60 vol% Methanol gequenchet und für 5 Minuten bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  und 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und sowohl unverdünnt als auch 1:5 verdünnt mittels LC-MS/MS vermessen. Das Zellpellet wurde in 1 mL Methanol ( $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ) und 1 mL TE-Puffer (10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,0;  $4\text{ }^\circ\text{C}$ ) resuspendiert und nach der Zugabe von 2 mL Chloroform für 3 Stunden bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  geschüttelt. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  und 10000 rpm, wurde die wässrige Phase durch einen  $0,2\text{ }\mu\text{m}$  Filter filtriert bevor die Proben unverdünnt, 1:5 und 1:20 verdünnt mittels LC-MS/MS vermessen wurden.

Für die Bestimmung der intrazellulären Cofaktorkonzentration während der Biotransformation wurden folgende Reaktionsbedingungen zur Steroidhydroxylierung im 250 mL Schüttelkolben gewählt. 50 mM  $KP_i$  pH 7 mit Glucose und Methanol in einer Endkonzentration von  $80\text{ g L}^{-1}$  bzw. 5 vol%, diente als Reaktionsmedium.  $17\alpha$ -Prog wurde in einer Endkonzentration von  $250\text{ }\mu\text{M}$  zugegeben und durch die Zugabe von  $400\text{ g L}^{-1}$  Spaltheefe wurde die Biotransformation gestartet. Zu  $t = 0, 90, 180\text{ min}$  wurden jeweils 3,75 mL der Reaktionslösung mit 2,5 mL  $-50\text{ }^\circ\text{C}$  kaltem Methanol verdünnt. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  und 10 000 rpm zentrifugiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie bei der Analyse der Redoxcofaktorkonzentration während der stationären Wachstumsphase.

### **8.3.6 Permeabilisierung der *S. pombe* CAD18**

Um *S. pombe* CAD 18 mit den Detergenzien Tween 80, Triton X 100, Hexadodecyltrimethylammoniumbromid (CTAB) zu permeabilisieren wurden die Zellen mit einer 2 vol% Lösung der entsprechenden Substanz für 1 h inkubiert. Bevor die Zellen für die Biotransformation eingesetzt wurden, wurden sie zweimal mit 50 mM  $KP_i$  pH 6 gewaschen (Zentrifugation 14000 rpm,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ , 10 min). Erfolgte die Permeabilisierung durch Einfrieren in flüssigen Stickstoff, so beschränkten sich die Arbeitsschritte auf das Einfrieren und Auftauen.

### 8.3.7 Satzreaktor unter optimierten Bedingungen

Im 250 mL Schüttelkolben, der zu 10 % befüllt wurde, wurden 50 mM  $KP_i$  pH 7,5 vorgelegt, der Glucose und Methanol in einer Endkonzentration von 80 g L<sup>-1</sup> bzw. 5 vol% enthielt. Eine Substratkonzentration von 250  $\mu$ M wurde eingestellt und durch die Zugabe von 360 g L<sup>-1</sup> mit Tween 80 permeabilisierter *S. pombe* CAD18 wurde die Biotransformation gestartet. In regelmäßigen Abständen wurden Proben gezogen, die wie unter Punkt 8.3.2 beschrieben aufgearbeitet und mittels HPLC vermessen wurden.

### 8.3.8 Instrumentelle Analytik

#### 8.3.8.1 HPLC

Die Messung der Steroidkonzentration wurde mittels HPLC auf einem Gerät der Firma Agilent, Palo Alto, USA durchgeführt. Als Säule wurde eine LiChrospher 100 RP18 EC-5 $\mu$ , 250 mm \*4 mm der Firma CS, Langerwehe, Deutschland verwendet.

- Laufmittel: Acetonitril und Wasser im Verhältnis 6:4
- Flussrate: 1 mL min<sup>-1</sup>
- Druck: 120 mbar
- Temperatur: 20 °C

Die Messung der Absorption erfolgte bei einer Wellenlänge von 254 nm.

Retentionszeiten der analysierten Substanzen:

- 17 $\alpha$ -Prog: 6,4 min
- RSS: 3,7 min
- DOC: 5,7 min

#### 8.3.8.2 LC-MS/MS

Die Messungen wurden auf einer LC der Firma Jasco (Deutschland) und einem MS/MS API 400 (AB/MDS Sciex, Applied Biosciences) durchgeführt und die Betriebsparameter des MS wurden von Luo et al. (2007) übernommen.

Betriebsparameter Massenspektrometer:

- Ionisierung: Elektronensprayionisierung (ESI) mit negativer Polarität

Betriebsparameter Chromatographie:

- Säule: Synergi Fusion 4u RP 80A 150\*2 mm (Phenomenex, Utrecht, Niederlande)
- Flussrate: 0,25 mL min<sup>-1</sup>
- Laufmittel: TBA Puffer (10 mM Tributylamin, 10 mM Essigsäure, pH 4,95); Methanol

– Gradient:

Zeit	TBA-Puffer	MeOH
3	70	30
5	65	35
7	65	35
10	40	60
13	10	90

Die Quantifizierung der Redoxcofaktoren erfolgte mit Kalibriergeraden, die in Gegenwart des gleichen biologischen Hintergrunds wie die Proben vermessen wurden.

## 8.4 CYP106A2 aus *B. megaterium*

### 8.4.1 Plasmide und Stammherstellung

Plasmid	Eigenschaften	Quelle
pBAR_Triple	AmpR, bovines AdR und AdX, ADH aus <i>L. brevis</i>	Prof. Rita Bernhardt, Universität des Saarlandes
pBAR_Twin	AmpR, bovines AdR und AdX	(Hannemann et al., 2006)
pACYC_FHH2	CapR, CYP106A2 aus <i>B. megaterium</i>	(Hannemann et al., 2006)

Die verwendeten Plasmide wurden einzeln nacheinander in chemisch kompetente *E. coli* BL21 Star mittels Hitzeschockmethode eingebracht (Hanahan, 1983).

### 8.4.2 Kultivierung des rekombinanten *E. coli* Stammes mit CYP106A2

Die Kultivierung erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie der rekombinante *E. coli*, der die CYP102A1 (siehe 8.2.2) exprimiert. Als Selektionsmarker wurden die Antibiotika Chloramphenicol und Carbenicillin in einer Konzentration von 35  $\mu\text{g mL}^{-1}$  und 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  eingesetzt. Durch die Zugabe von 0,75 mM IPTG wurde die Enzymexpression induziert und die Kultur für weitere 36 – 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und eine 20 %ige Zellsuspension mit 50 mM  $\text{KPi}$  pH 8 hergestellt, die bei 4 °C gelagert wurde.

Zur Langzeitlagerung als Glycerinkultur siehe 8.2.2.1.

### 8.4.3 Herstellung des Zellrohextrakts

Nach dem Ernten der Zellen und der Herstellung einer 20 %igen Zellsuspension wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Dies geschah im kontinuierlichen Modus mit einer Verweilzeit von 15 min in der Aufschlusszelle, bei 15 sekundiger Beschallung mit

jeweils 15 sekündiger Pause. Durch Zentrifugation (Multifuge 3S-R, Heraeus) bei 5080 rpm, 15 min und 4 °C wurden die Zellrümpfer abgetrennt und das Rohextrakt wurde anschließend gefriergetrocknet bevor es bei 4 °C gelagert wurde.

#### **8.4.4 Aktivitätsbestimmung**

##### **8.4.4.1 Aktivitätsbestimmung bei der Ganzzellbiotransformation**

Die Aktivitätsbestimmung wurde in 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei 30 °C und 1000 rpm durchgeführt. 475 µL 50 mM Tris-HCl pH 8,5, dem 1 vol% 2-Propanol zugegeben wurde, wurden vorgelegt. Das jeweilige Substrat Prog bzw. Tes wurde in Ethanol vorgelöst, bevor es in einer Endkonzentration von 100 µM dem Reaktionsansatz zugegeben wurde. Durch die Zugabe von 6 g L<sup>-1</sup> Biomasse wurde die Reaktion gestartet. Zu gegebenen Zeitpunkten wurde jeweils ein Reaktionsgefäß für 1 min bei 99 °C zur Inaktivierung des Biokatalysators inkubiert und anschließend komplett aufgearbeitet. Als IS wurde DOC bei der Umsetzung von Prog und RSS bei der Umsetzung von Tes jeweils in einer Endkonzentration von 0,5 mM zugegeben. Anschließend wurden die Steroide mit 500 µL Chloroform extrahiert. 200 µL der organischen Phase wurden abgenommen, das Lösungsmittel abgedampft und der Rückstand in 200 µL Ethanol aufgenommen, bevor die Proben mittels HPLC analysiert wurden.

##### **8.4.4.2 Aktivitätsbestimmung unter Verwendung des Zellrohextrakts**

Als Reaktionsgefäße dienten erneut 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße. Die Versuche wurden in 50 mM Tris-HCl pH 8 in Gegenwart von 1 mM MgCl<sub>2</sub> durchgeführt. 2-Propanol wurde in einer Endkonzentration von 400 mM zugegeben und eine Substratkonzentration von 0,5 mM wurde eingestellt. Durch die Zugabe von Lyophilisat in einer Konzentration zwischen 1 und 4 mg mL<sup>-1</sup> wurde die Biotransformation bei 30 °C gestartet. In regelmäßigen Abständen wurden Proben genommen und zur Inaktivierung des Biokatalysators 1 min bei 99 °C inkubiert. Die Probenaufarbeitung erfolgte wie bei den Aktivitätsmessungen der Ganzzellbiotransformation.

#### **8.4.5 Stabilitätsuntersuchungen**

##### **8.4.5.1 Stabilitätsuntersuchungen im Rahmen des Temperaturscreenings**

Eine 20%ige Zellsuspension bzw. eine 10 mg mL<sup>-1</sup> haltige Lyophilisatlösung, die zuvor steril filtriert wurde, wurde bei der jeweiligen Temperatur inkubiert und zu gegebenen Zeitpunkten die Aktivität mit dem unter 8.4.4 beschriebenen Assay bestimmt.

#### **8.4.5.2 Stabilitätsuntersuchungen unter Prozessbedingungen**

Die Stabilitätsuntersuchungen unter Prozessbedingungen erfolgten im repetitiven Satzreaktor, indem der Umsatz untersucht wurde. Die Durchführung erfolgte im 500  $\mu\text{L}$  Maßstab in 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei 30 °C und 1000 rpm. 50 mM  $\text{KPi}$  Puffer pH 8 wurden vorgelegt und Prog, das in Ethanol vorgelöst wurde (Endkonzentration 1 vol%), wurde in einer Endkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  zugegeben. Zusätzlich lagen 650 mM 2-Propanol bei einem der repetitiven Satzreaktoren vor. Durch die Zugabe von 6 g  $\text{L}^{-1}$  Biomasse wurde die Reaktion gestartet und nach 18 h wurde der Umsatz bestimmt (Probenaufarbeitung siehe Kapitel 8.4.4). Anschließend wurde die Biomasse mittels Zentrifugation (10 min, 10 000 rpm) geerntet, zweimal mit 50 mM  $\text{KPi}$  pH 8 gewaschen bevor diese erneut zur Biotransformation eingesetzt wurde.

#### **8.4.6 Löslichkeitsuntersuchungen der Steroide**

Die Löslichkeit von Progesteron und Testosteron wurde wie unter Punkt 8.3.4 beschrieben bestimmt.

#### **8.4.7 Bestimmung der Cofaktorkonzentration des Zellrohextrakts**

Zur Bestimmung der Cofaktorkonzentration des Zellrohextrakts wurde eine 10 mg  $\text{mL}^{-1}$  konzentrierte Zellrohextraktlösung in 50 mM Tris-HCl pH 8, der 1 mM  $\text{MgCl}_2$  enthielt, hergestellt. Durch Ultrafiltration (Microcons, Firma Millipore) wurden Proteine größer als 10 kDa abgetrennt, und anschließend wurde die Lösung mit - 50 °C kaltem Methanol 1:1 verdünnt und mittels LC-MS/MS vermessen. Zur Bestimmung der Cofaktorkonzentration während der Biotransformation wurden folgende Reaktionsbedingungen für die Biotransformation gewählt: Als Reaktionsgefäß wurden 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße eingesetzt. 500  $\mu\text{L}$  50 mM Tris-HCl pH 8, der 1 mM  $\text{MgCl}_2$  enthielt, wurde vorgelegt und Lyophilisat in einer Konzentration von 10 mg  $\text{mL}^{-1}$  eingesetzt. Durch die Zugabe von 300 mM 2-Propanol wurde die Cofaktorregenerierung gestartet und in regelmäßigen Abständen Proben genommen. Durch Zugabe von 500  $\mu\text{L}$  -50 °C kaltem Methanol wurde die Biotransformation gestoppt, die Proben ultrafiltriert bevor sie mittels LC-MS/MS analysiert wurden. Anschließend wurde Prog, das in 2-Propanol (Endkonzentration 100 mM) vorgelöst wurde, in einer Endkonzentration von 0,5 mM zugegeben und die Steroidhydroxylierung gestartet. In regelmäßigen Abständen wurden Proben genommen und wie oben beschrieben aufgearbeitet.

#### **8.4.8 Bestimmung des reaktionslimitierenden Schritts der Biotransformation**

Rekombinante *E. coli* Zellen, die jeweils nur die CYP106A2 bzw. die Elektronentransportkomponenten AdR/AdX exprimieren, wurden unter den unter Punkt 8.4.2 beschriebenen Bedingungen kultiviert und anschließend aufgeschlossen. Das Zellrohextrakt wurde laut Punkt 8.4.3 hergestellt. Anschließend wurde eine Aktivitätsbestimmung bei Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen an CYP106A2 bzw. AdR/AdX vorgenommen (siehe Punkt 8.4.4.2).

#### **8.4.9 Biotransformation unter optimierten Bedingungen**

##### **8.4.9.1 Satzreaktor unter optimierten Bedingungen (V= 20 mL)**

Als Reaktionsmedium wurde 50 mM Tris-HCl pH 8 mit 1 mM MgCl<sub>2</sub> verwendet. Die Tes bzw. Prog Konzentration betrug 0,5 mM, während 400 mM 2-Propanol als Cosubstrat eingesetzt wurden. Die Hydroxylierung wurde durch die Zugabe von 4 mg mL<sup>-1</sup> bzw. 10 mg mL<sup>-1</sup> Zellrohextrakt gestartet und in regelmäßigen Abständen wurden Proben gezogen und wie beschrieben aufgearbeitet (siehe Punkt 8.4.4.2)

##### **8.4.9.2 Präparativer repetitiver Satzreaktor (V = 250 mL)**

Für die präparativen repetitiven Satzreaktoren wurden die gleichen Reaktionsbedingungen, wie für die Satzreaktoren herangezogen. Nach einer Stunde wurde die Biotransformation gestoppt und das Reaktionsmedium mit 4 g des entsprechenden Adsorbers versetzt. Amberlite XAD 16 Harze bzw. Sepabeads SP207 wurden zur Extraktion von 15 $\beta$ -Prog bzw. 15 $\beta$ -Tes eingesetzt. Nach einstündiger Inkubation wurden die Adsorber durch Filtration vom Reaktionsmedium abgetrennt, bevor der nächste Reaktionszyklus durch die Zugabe von 0,5 mM Prog bzw. Tes gestartet wurde.

Bei Tes als Substrat wurde zusätzlich zwischen den einzelnen Läufen kontrolliert, ob die LbADH (Messung des NADP<sup>+</sup> Verbrauchs bei 340 nm) und die P450 (CO-Differenzspektroskopie) noch aktiv sind. Außerdem wurde beim zweiten Reaktionszyklus 0,1 mM NADP<sup>+</sup> zugegeben. Nach dem zweiten Lauf wurde der Reaktionsansatz geteilt, wobei einem Teil des Batches weiterhin mit 0,1 mM NADP<sup>+</sup> zugegeben wurden.

##### **8.4.9.3 Produktabtrennung und Aufreinigung**

Die mit Steroid beladenen Adsorber wurden anschließend dreimal mit je 50 mL Ethanol gewaschen, wodurch die Steroide in Lösung übergehen. Nach Entfernen des Ethanols unter Vakuum wurden die entstandenen Produkte durch Säulenchromatographie an Kieselgel F 60 weiter aufgereinigt. Zur Aufreinigung von 15 $\beta$ -Prog wurde Chloroform und

Diethylether im Verhältnis 9:1 als mobile Phase verwendet, bei 15 $\beta$ -Tes Diethylether: Ethanol im Verhältnis 30:1 eingesetzt. Die UV-aktiven Fraktionen, die das gewünschte Produkt beinhalten wurden vereinigt und anschließend das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Mit NMR Experimenten wurde die Struktur der einzelnen Substanzen überprüft.

Ausbeute: 45 mg 15 $\beta$ -Prog und 88 mg 15 $\beta$ -Tes

## **8.4.10 Instrumentelle Analytik**

### **8.4.10.1 Quantifizierung der Steroide mittels HPLC**

Die Analyse erfolgte mit der gleichen Methode wie die Untersuchung der Hydroxylierung von 17 $\alpha$ -Prog (siehe Punkt 8.3.8.1), die Retentionszeiten sind:

- Prog: 13 min
- 15 $\beta$ -Prog: 4,1 min

Zur Analyse der Testosteronhydroxylierung wurde Acetonitril:Wasser im Verhältnis 38:62 eingesetzt. Die Retentionszeiten sind:

- Tes: 19,5 min
- 15 $\beta$ -Tes: 4,05 min

### **8.4.10.2 LC-MS/MS Messung zur Quantifizierung der Redoxcofaktoren**

Siehe Punkt 8.3.7.2

### **8.4.10.3 MS Messungen zur Identifizierung der Nebenprodukte**

Die Messungen erfolgten auf einem API 4000 Triple Quadrupol Massenspektrometer (AB/MDS Sciex; Concord, Canada) mittels APCI Ionisierung. Das Declusteringpotential betrug 60 eV. Die Proben wurden in 50 vol% Methanol gelöst und mit einem Fluss von 30  $\mu\text{L min}^{-1}$  ins MS injiziert. Ionen im Bereich von 200 bis 400 m/z wurden aufgezeichnet.

### **8.4.10.4 CO-Differenzspektroskopie**

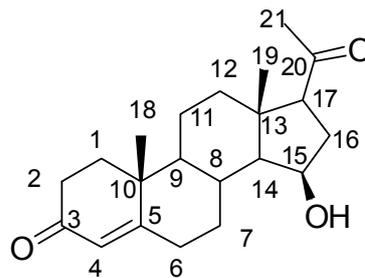
Siehe Punkt 8.2.10.2

### **8.4.10.5 NMR Messungen**

30 mg 15 $\beta$ -Prog und 15 $\beta$ -Tes wurden in 1 mL  $\text{CDCl}_3$  gelöst und an einem 600 MHz NMR Gerät der Firma Bruker vermessen. Neben  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$ -NMR Experimenten, wurden  $^{135}^\circ$  DEPT, COSY und HSQC Experimente durchgeführt.

15 $\beta$ -Hydroxyprogesteron:

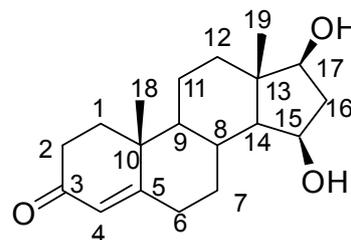
<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 5,75 (1 H, s, H 4), 4,32 (1 H, dt,  $J_t$  = 6 Hz,  $J_d$  = 2,6 Hz, H 15), 2,52 – 2,4 (3 H, m, H 17, H 2 und H 6), 2,37 – 2,32 (3 H, m, H 2, H 6 und OH 15) 2,28 – 2,2 (2 H, m, H 16), 2,18 – 2,15 (1 H, m, H 7), 2,15 (3 H, s, H 21), 2,09 – 2,03 (2 H, m, H 1 und H 12), 1,97 (1 H, dq,  $J_q$  = 10 Hz,  $J_d$  = 3 Hz, H 8) 1,73 (1 H, dt,  $J_t$  = 13,6 Hz,  $J_d$  = 5 Hz, H 1), 1,65 (1H, m, H 11) 1,53 – 1,42 (2 H, m, H 11 und H 12) 1,22 (3 H, s, H 18), 1,15 ppm (1 H, dq,  $J_q$  = 13 Hz,  $J_d$  = 4,2 Hz, H. 7), 1,09 – 1,02 (2 H, m, H 14 und 9), 0,92 ppm (3 H, s, H 19).



<sup>13</sup>C-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 208 (C 20), 199,5 (C 3), 170,98 (C 5), 123 (C 4), 70,3 (C 15), 63,5 (C 17), 60,3 (C 14), 53,5 (C 9), 43,5 (C 13), 40,1 (C 12), 38,5 (C 10), 36,2 (C 16), 35,2 (C 1), 34,1 und 32,7 (C 2 und C 6), 31,7 und 31,4 (C 21 und C 8), 31,12 (C 7), 20,93 (C 11), 17,3 (C 18), 15,9 ppm (C 19).

15 $\beta$ -Hydroxytestosteron:

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 5,75 (1 H, s, H 4), 4,22 (1 H, t,  $J_t$  = 7 Hz, H 15), 3,60 (1 H, t,  $J_t$  = 9 Hz, H 17) 2,62 (1 H, dq,  $J_q$  = 9 Hz,  $J_d$  = 1,5 Hz, H 16), 2,48 – 2,41 (2 H, m, H 2 und H 6) 2,38 – 2,28 (2 H, m, H 2 und H 6) 2,11 (1 H, m, H 7) 2,05 (1 H, qd,  $J_q$  = 13 Hz,  $J_d$  = 3 Hz, H 1), 1,98 (1H, dq,  $J_q$  = 13 Hz,  $J_d$  = 3,7 Hz, H 8) 1,82 (1 H, td,  $J_t$  = 1,3 Hz,  $J_d$  = 12 Hz, H 12), 1,71 (1H, dt,  $J_t$  = 14 Hz,  $J_d$  = 4 Hz, H 1), 1,6 (3 H, m, H 11, OH 15 und H 16), 1,45 (2 H, m, H 11 und OH 17), 1,23 (3H, s, H 18) 1,12 (1 H, m, H 7), 1,08 (3 H, s, H 19), 1,05 (1 H, m, H 12), 0,99 (1 H, dt,  $J_t$  = 11,6 Hz,  $J_d$  = 1,5 Hz, H 9), 0,9-0,8 ppm (1 H, m, H 14).



<sup>13</sup>C-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 199,5 (C 3), 170,9 (C 5), 123,97 (C 4), 81,1 (C 17), 69,13 (C 15), 55,18 (C14), 54,29 (C 9), 43,44 (C 16), 42,24 (C 13), 38,78 (C 10), 37,88 (C 12), 35,8 (C 1), 33,98 und 32,68 (C 2 und C 6), 31,5 (C 8), 31,01 (C 7), 20,58 (C 11) ,17,34 (C 18), 13,75 ppm (C 19).

## 9 Literaturverzeichnis

- Adam W., Müller M., Prechtl F. (1994)** Dimethyldioxirane oxidation of titanium enolates: diastereoselective  $\alpha$ -hydroxylations. *The Journal of Organic Chemistry* 59, 2358-2364.
- Agematu H., Matsumoto N., Fuji Y., Kabumoto H., Doi S., Machida K., Isihikawa J., Arisawa A. (2006)** Hydroxylation of testosterone by bacterial cytochromes p450 using the *Escherichia coli* expression system. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 70, 307-311.
- Ähle W., Perham R.N., Michal G., Caddiw A.J., Concoby B. (2008)** Enzymes, 1. General. In *Ullmanns Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley VCH, Weinheim.
- Andreadeli A., Platis D., Tishkov V., Popov V., Labrou N.E. (2008)** Structure-guided alteration of coenzyme specificity of formate dehydrogenase by saturation mutagenesis to enable efficient utilization of NADP<sup>+</sup>. *FEBS Journal* 275, 3859-3869.
- Appel D., Lutz-Wahl S., Fischer P., Schwaneberg U., Schmid R.D. (2001)** A P450 BM-3 mutant hydroxylates alkanes, cycloalkanes, arenes and heteroarenes. *Journal of Biotechnology* 88, 167-171.
- Atkins P.W. (1996)** *Physikalische Chemie*. Wiley VCH, Weinheim.
- Behr A. (2008)** *Angewandte homogene Katalyse*. Wiley VCH, Weinheim.
- Bell S.G., Chen X., Sowden R.J., Xu F., Williams J.N., Wong L.L., Rao Z. (2003)** Molecular recognition in (+)- $\alpha$ -pinene oxidation by cytochrome P450cam. *Journal of the American Chemical Society* 125, 705-714.
- Berg A., Rafter J.J. (1981)** Studies on the substrate specificity and inducibility of cytochrome P450meg. *The Biochemical Journal* 196, 781-786.
- Berg A., Gustafsson J.A., Ingelman-Sundberg M. (1976)** Characterization of a cytochrome P450-dependent steroid hydroxylase system present in *Bacillus megaterium*. *Journal of Biological Chemistry* 251, 2831-2838.
- Berg A., Ingelman-Sundberg M., Gustafsson J.A. (1979)** Purification and characterization of cytochrome P450meg. *Journal of Biological Chemistry* 254, 5264-5271.
- Berg A., Carlstrom K., Gustafsson J.A., Ingelman-Sundberg M. (1975)** Demonstration of a cytochrome P450-dependent steroid 15 $\beta$ -hydroxylase in *Bacillus megaterium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 66, 1414-1423.
- Bergman R.G. (2007)** Organometallic chemistry: C-H activation. *Nature* 446, 391-393.
- Bernhardt R. (1995)** Cytochrome P450: Structure, Function and Generation of Reactive Oxygen Species. *Reviews in Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 127, 138-221.
- Bernhardt R. (2006)** Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *Journal of Biotechnology* 124, 128-145.

- Brenna E., Fuganti C., Serra S., Kraft P. (2002)** Optically active ionones and derivatives: preparation and olfactory properties. *European Journal of Organic Chemistry* 2002, 967-978.
- Brückner R. (2004)** Reaktionsmechanismen. Spektrum Akademischer Verlag, München.
- Bucher T., Brauser B., Sies H., Langguth O., Conze A., Klein F. (1972)** State of oxidation-reduction and state of binding in cytosolic NADH-system as disclosed by equilibration with extracellular lactate pyruvate in hemoglobin-free perfused rat-liver. *European Journal of Biochemistry* 27, 301-305.
- Bureik M., Schiffler B., Hiraoka Y., Vogel F., Bernhardt R. (2002)** Functional expression of human mitochondrial CYP11B2 in fission yeast and identification of a new internal electron transfer etp1. *Biochemistry* 41, 2311-2321.
- Canelas A.B., van Gulik W.M., Heijnen J.J. (2008)** Determination of the cytosolic free NAD/NADH ratio in *Saccharomyces cerevisiae* under steady-state and highly dynamic conditions. *Biotechnology and Bioengineering* 100, 734-743.
- Carrea G. (1984)** Biocatalysis in water-organic solvent two-phase systems. *Trends in Biotechnology* 2, 102-106.
- Chatterjee P., Kouzi S.A., Pezzuto J.M., Hamann M.T. (2000)** Biotransformation of the Antimelanoma Agent Betulinic Acid by *Bacillus megaterium* ATCC 13368. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3850-3855.
- Chefson A., Auclair K. (2006)** Progress towards the easier use of P450 enzymes. *Molecular BioSystems* 2, 462-469.
- Chen C.S., Fujimoto Y., Girdaukas G., Sih C.J. (1982)** Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. *Journal of the American Chemical Society* 104, 7294-7299.
- Chu J.-W., Kimura T. (1973)** Studies on Adrenal Steroid Hydroxylases. Molecular and catalytic properties of adrenodoxin reductase (a flavoprotein). *Journal of Biological Chemistry* 248, 2089-2094.
- Cirino P.C., Arnold F.H. (2003)** A self-sufficient peroxide-driven hydroxylation biocatalyst. *Angewandte Chemie International Edition* 42, 3299-3301.
- Coon M., Vaz A., Bestervelt L. (1996)** Cytochrome P450 2: peroxidative reactions of diversozymes. *FASEB Journal* 10, 428-434.
- Craft D.L., Madduri K.M., Eshoo M., Wilson C.R. (2003)** Identification and characterization of the CYP52 family of *Candida tropicalis* ATCC 20336, important for the conversion of fatty acids and alkanes to  $\alpha,\omega$ -dicarboxylic acids. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 5983-5991.
- Dragan C.A., Blank L., Bureik M. (2006a)** Increased TCA cycle activity and reduced oxygen consumption during cytochrome P450-dependent biotransformation in fission yeast. *Yeast* 11, 779-794.
- Dragan C.A., Hartmann R.W., Bureik M. (2006b)** A fission yeast based test system for the determination of IC50 values of anti prostate tumor drugs acting on cyp21. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* 21, 547-556.

- Dragan C.A., Zearo S., Hannemann F., Bernhardt R., Bureik M. (2005)** Efficient conversion of 11-deoxycortisol to cortisol (hydrocortisone) by recombinant fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. FEMS Yeast Research 5, 621-625.
- Dulaney E.L., Stapley E.O. (1959)** Studies on the transformation of 11-deoxy-17 $\alpha$ -hydroxycorticosterone to hydrocortisone with a strain of *Curvularia lunata*. Applied Microbiology 7, 276-284.
- Dumas B., Cauet G., Lacour T., Degryse E., Laruelle L., Ledoux C., Spagnoli R., Achstetter T. (1996)** 11 $\beta$ -Hydroxylase Activity in Recombinant Yeast Mitochondria. In vivo Conversion of 11-Deoxycortisol to Hydrocortisone. European Journal of Biochemistry 238, 495-504.
- Eiben S., Kaysser L., Maurer S., Kühnel K., Urlacher V.B., Schmid R.D. (2006)** Preparative use of isolated CYP102 monooxygenases - A critical appraisal. Journal of Biotechnology 124, 662-669.
- England J., Gondhia R., Bigorra-Lopez L., Petersen A.R., White A.J.P., Britovsek G.J.P. (2009)** Towards robust alkane oxidation catalysts: electronic variations in non-heme iron(II) complexes and their effect in catalytic alkane oxidation. Dalton Transactions 2009, 5319-5334.
- Eschenmoser W., Uebelhart P., Eugster C.H. (1981)** Synthese und Chiralität der enantiomeren 6-Hydroxy- $\beta$ -jonone sowie von *cis*- und *trans*-5,6-Dihydroxy-5,6-dihydro- $\beta$ -jononen. Helvetica Chimica Acta 64, 2681-2690.
- Farinas E.T., Alcalde M., Arnold F.H. (2004)** Alkene epoxidation catalyzed by cytochrome P450 BM-3 139-3. Tetrahedron 60, 525-528.
- Farinas E.T., Schwaneberg U., Glieder A., Arnold F.H. (2001)** Directed evolution of a cytochrome P450 monooxygenase for alkane oxidation. Advanced Synthesis and Catalysis 343, 601-606.
- Fasan R., Chen M.M., Crook N.C., Arnold F.H. (2007)** Engineered alkane hydroxylating cytochrome P450-BM3 exhibiting natively catalytic properties. Angewandte Chemie International Edition 46, 8414-8418.
- Fraatz M.A., Berger R.G., Zorn H. (2009)** Nootkatone-a biotechnological challenge. Applied Microbiology and Biotechnology 83, 35-41.
- Fukami T., Katoh M., Yamazaki H., Yokoi T., Nakajima M. (2008)** Human cytochrome P450 2A13 efficiently metabolizes chemicals in air pollutants: Naphthalene, styrene, and toluene. Chemical Research in Toxicology 21, 720-725.
- Funhoff E.G., Salzmann J., Bauer U., Witholt B., van Beilen J.B. (2007)** Hydroxylation and epoxidation reactions catalyzed by CYP153 enzymes. Enzyme and Microbial Technology 40, 806-812.
- Ghisalba O., Kittelmann M. (2007)** Preparation of Drug Metabolites using Fungal and Bacterial Strains. In Modern Biooxidations: Enzymes, Reactions and Applications, R.D. Schmid and V. Urlacher, Wiley VCH, Weinheim.

- Girhard M., Machida K., Itoh M., Schmid R.D., Arisawa A., Urlacher V.B. (2009)** Regioselective biooxidation of (+)-valencene by recombinant *E. coli* expressing CYP109B1 from *Bacillus subtilis* in a two-liquid-phase system. Microbial Cell Factories published online, doi: 10.1186/1475-2859-1188-1136.
- Glieder A., Farinas E.T., Arnold F.H. (2002)** Laboratory evolution of a soluble, self-sufficient, highly active alkane hydroxylase. Nature Biotechnology 20, 1135-1139.
- Godula K., Sames D. (2006)** C-H Bond Functionalization in Complex Organic Synthesis. Science 312, 67-72.
- Gong B., Fu X., Chen J., Li Y., Zou X., Tu X., Ding P., Ma L. (2009)** Synthesis of a new type of immobilized chiral salen Mn(III) complex as effective catalysts for asymmetric epoxidation of unfunctionalized olefins. Journal of Catalysis 262, 9-17.
- Gonzalez F.J. (1992)** Human cytochromes P450: problems and prospects. Trends in Pharmacological Sciences 13, 346-352.
- Groves J.T. (2005)** Models and mechanisms of cytochrome P450 action. In Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry, P.R.O. de Montellano, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York.
- Guengerich F.P. (2001)** Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. Chemical Research in Toxicology 14, 611-650.
- Guengerich F.P. (2002)** Rate-Limiting Steps in Cytochrome P450 Catalysis. Biological Chemistry 383, 1553 - 1564.
- Haag A., Eschenmoser W., Eugster C.H. (1980)** Synthese von (-)-(R)-4-Hydroxy- $\beta$ -jonon und (-)-(5R, 6S)-5-Hydroxy-4,5-dihydro- $\beta$ -jonon aus (-)-(S)- $\alpha$ -Jonon. Helvetica Chimica Acta 63, 10-15.
- Hanahan D. (1983)** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Journal of Molecular Biology 166, 557-580.
- Hannemann F., Virus C., Bernhardt R. (2006)** Design of an *Escherichia coli* system for whole cell mediated steroid synthesis and molecular evolution of steroid hydroxylases. Journal of Biotechnology 124, 172-181.
- Hannemann F., Bichet A., Ewen K.M., Bernhardt R. (2007)** Cytochrome P450 systems-biological variations of electron transport chains. Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects 1770, 330-344.
- He X., de Montellano P.R.O. (2004)** Radical rebound mechanism in cytochrome P450 catalyzed hydroxylation of the multifaceted radical clocks  $\alpha$ - and  $\beta$ -Thujone. Journal of Biological Chemistry 279, 39479-39484.
- Hesselink P.G.M., van Vliet S., de Vries H., Witholt B. (1989)** Optimization of steroid side chain cleavage by *Mycobacterium sp.* in the presence of cyclodextrins. Enzyme and Microbial Technology 11, 398-404.
- Hildebrand F., Lütz S. (2009)** Stable Electroenzymatic Processes by Catalyst Separation. Chemistry-A European Journal 15, 4998-5001.

- Hilker I., Alphand V., Wohlgemuth R., Furstoss R. (2004)** Microbial transformations, 56. Preparative scale asymmetric Baeyer-Villiger oxidation using a highly productive two-in-one resin-based *in situ* SFPR concept. *Advanced Synthesis and Catalysis* 346, 203-214.
- Hirschmann R. (1992)** The cortisone era: aspects of its impact. Some contributions of the Merck Laboratories. *Steroids* 57, 579-592.
- Holland H.L. (1992)** Organic Synthesis with Oxidative Enzymes. Wiley VCH, Weinheim.
- Isin E.M., Guengerich F.P. (2007)** Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1770, 314-329.
- Jeromin E.G., Bertau M. (2005)** Bioorganikum. Wiley VCH, Weinheim.
- Jones W. (1999)** Activation of C-H Bonds: Stoichiometric Reactions. In *Activation of Unreactive Bonds and Organic Synthesis*, 9-46.
- Julsing M.K., Cornelissen S., Buhler B., Schmid A. (2008)** Heme-iron oxygenases: powerful industrial biocatalysts? *Current Opinion in Chemical Biology* 12, 177-186.
- Kataoka M., Yamamoto K., Kawabata H., Wada M., Kita K., Yanase H., Shimizu S. (1999)** Stereoselective reduction of ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate by *Escherichia coli* transformant cells coexpressing the aldehyde reductase and glucose dehydrogenase genes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51, 486-490.
- Katsuki T. (1996)** Mn-salen catalyst, competitor of enzymes, for asymmetric epoxidation. *Journal of Molecular Catalysis A-Chemical* 113, 87-107.
- Katsuki T., Sharpless K.B. (2002)** The first practical method for asymmetric epoxidation. *Journal of the American Chemical Society* 124, 5974-5976.
- Kizaki N., Yasohara Y., Hasegawa J., Wada M., Kataoka M., Shimizu S. (2001)** Synthesis of optically pure ethyl (S)-4-chloro-3-hydroxybutanoate by *Escherichia coli* transformant cells coexpressing the carbonyl reductase and glucose dehydrogenase genes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55, 590-595.
- Kohlmann C., Märkle W., Lütz S. (2008)** Electroenzymatic synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 51, 57-72.
- Kominami S., Ochi H., Kobayashi Y., Takemori S. (1980)** Studies on the steroid hydroxylation system in adrenal cortex microsomes. Purification and characterization of cytochrome P-450 specific for steroid C-21 hydroxylation. *Journal of Biological Chemistry* 255, 3386-3394.
- Krasnobajew V. (1984)** Terpenoids. In *Biotechnology-Biotransformations*, K. Kieslich, Verlag Chemie GmbH, Weinheim.
- Kühl S. (2009)** Enzymkatalysierte C-C Knüpfung. Reaktionstechnische Untersuchungen zur Synthese pharmazeutischer Intermediate. Dissertation, Universität Bonn.
- Labinger J.A., Bercaw J.E. (2002)** Understanding and exploiting C-H bond activation. *Nature* 417, 507-514.

- Landwehr M., Hochrein L., Otey C.R., Kasrayan A., Backvall J.-E., Arnold F.H. (2006)** Enantioselective  $\alpha$ -hydroxylation of 2-arylacetic acid derivatives and buspirone catalyzed by engineered cytochrome P450 BM-3. *Journal of the American Chemical Society* 128, 6058-6059.
- Li H., Darwish K., Poulos T. (1991)** Characterization of recombinant *Bacillus megaterium* cytochrome P450 BM-3 and its two functional domains. *Journal of Biological Chemistry* 266, 11909-11914.
- Li Q.-S., Schwaneberg U., Fischer P., Schmid R.D. (2000)** Directed evolution of the fatty-acid hydroxylase P450 BM-3 into an indole-hydroxylating catalyst. *Chemistry - A European Journal* 6, 1531-1536.
- Liese A., Seelbach K., Wandrey C. (2005)** *Industrial Biotransformations*. Wiley VCH, Weinheim.
- Lisurek M., Kang M.-J., Hartmann R.W., Bernhardt R. (2004)** Identification of monohydroxy progesterones produced by CYP106A2 using comparative HPLC and electrospray ionisation collision-induced dissociation mass spectrometry. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 319, 677-682.
- Lisurek M., Simgen B., Antes I., Bernhardt R. (2008)** Theoretical and experimental evaluation of a CYP106A2 low homology model and production of mutants with changed activity and selectivity of hydroxylation. *ChemBioChem* 9, 1439-1449.
- Luo B., Groenke K., Takors R., Wandrey C., Oldiges M. (2007)** Simultaneous determination of multiple intracellular metabolites in glycolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1147, 153-164.
- Magnus J., Hollwedel D., Oldiges M., Takors R. (2006)** Monitoring and modeling of the reaction dynamics in the valine/leucine synthesis pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology Progress* 22, 1071-1083.
- Mahato S.B., Garai S. (1997)** Advances in microbial steroid biotransformation. *Steroids* 62, 332-345.
- Makris T.M., Denisov I.G., Schlichting I., Sligar S.G. (2005)** Activation of molecular oxygen by cytochrome P450. In *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*, P.R.O. de Montellano, Kluwer Academic / Plenum Publisher, New York.
- Matsui K., Teranishi S., Kamon S., Kuroda K., Ueda M. (2008)** Discovery of a modified transcription factor endowing yeasts with organic-solvent tolerance and reconstruction of an organic-solvent-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 4222-4225.
- Maudrell K. (1990)** Nmt1 of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by thiamine. *Journal of Biological Chemistry* 265, 10857-10864.
- Maurer S.C. (2006)** Oxidationsreaktionen mit Cytochrom P450 Monooxygenase CYP102A1 in Enzymreaktoren. Dissertation, Universität Stuttgart.

- Maurer S.C., Urlacher V., Schulze H., Schmid R.D. (2003)** Immobilisation of P450 BM-3 and an NADP cofactor recycling system: Towards a technical application of heme-containing monooxygenases in fine chemical synthesis. *Advanced Synthesis and Catalysis* 345, 802-810.
- Maurer S.C., Kühnel K., Kaysser L.A., Eiben S., Schmid R.D., Urlacher V. (2005)** Catalytic hydroxylation in biphasic systems using CYP102A1 mutants. *Advanced Synthesis and Catalysis* 347, 1090-1098.
- Meinhold P., Peters M.W., Chen M.M.Y., Takahashi K., Arnold F.H. (2005)** Direct conversion of ethane to ethanol by engineered cytochrome P450 BM3. *ChemBioChem* 6, 1765-1768.
- Mendel C.M. (1989)** The free hormone hypothesis - a physiologically based mathematical-model. *Endocrine Reviews* 10, 232-274.
- Meyer H.P., Kiener A., Imwinkelried R., Shaw N. (1997)** Biotransformations for fine chemical production. *Chimia* 51, 287-289.
- Michizoe J., Ichinose H., Kamiya N., Maruyama T., Goto M. (2005)** Functionalization of the cytochrome P450cam monooxygenase system in the cell-like aqueous compartments of water-in-oil emulsions. *The Society for Biotechnology, Japan* 99, 12-17.
- Miles J.S. (1992)** Structurally and functionally conserved regions of cytochrome P450 reductase as targets for DNA amplification by the polymerase chain-reaction - cloning and nucleotide-sequence of the *Schizosaccharomyces pombe* cDNA. *Biochemical Journal* 287, 195-200.
- Miller W.L. (1988)** Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocrine Reviews* 9, 295-318.
- Miura Y., Fulco A.J. (1974)**  $\omega$ -2-Hydroxylation of fatty acids by a soluble system from *Bacillus megaterium*. *Journal of Biological Chemistry* 249, 1880-1888.
- Murataliev M.B., Guzov V.M., Walker F.A., Feyereisen R. (2008)** P450 reductase and cytochrome b5 interactions with cytochrome P450: Effects on house fly CYP6A1 catalysis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38, 1008-1015.
- Murray H.C., Peterson D.H. (1952)** Oxygenation of steroids by *Mucorales fungi*. USA, Patent 2602769.
- Mutzall. (1993)** Einführung in die Fermentationstechnik. Behr's Verlag, Hamburg.
- Nazor J., Schwaneberg U. (2006)** Laboratory Evolution of P450 BM-3 for Mediated Electron Transfer. *ChemBioChem* 7, 638-644.
- Nazor J., Dannenmann S., Adjei R.O., Fordjour Y.B., Ghampson I.T., Blanusa M., Roccatano D., Schwaneberg U. (2008)** Laboratory evolution of P450 BM-3 for mediated electron transfer yielding an activity-improved and reductase-independent variant. *Protein Engineering Design and Selection* 21, 29-35.

- Nelson D.R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J.J., Feyereisen R., Waxman D.J., Waterman M.R., Gotoh O., Coon M.J., Estabrook R.W., Gunsalus I.C., Nebert D.W. (1996)** P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6, 1-42.
- Omura T., Sato R. (1964)** The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *Journal of Biological Chemistry* 239, 2370-2378.
- Palabiyik B., Karaer S., Arda N., Toker S.E., Temizkan G., Kelly S., Sarikaya A.T. (2008)** Expression of human cytochrome p450 3A4 gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biologia* 63, 450-454.
- Panke S., Held M., Wubbolts M.G., Witholt B., Schmid A. (2001)** Pilot-scale production of (S)-styrene oxide from styrene by recombinant *Escherichia coli* synthesizing styrene monooxygenase. *Biotechnology and Bioengineering* 80, 33-41.
- Peters F.T., Dragan C.A., Kauffels A., Schwaninger A.E., Zapp J., Bureik M., Maurer H.H. (2009a)** Biotechnological synthesis of the designer drug metabolite 4'-hydroxymethyl- $\alpha$ -pyrrolidinohexanophenone in fission yeast heterologously expressing human cytochrome P450 2D6-a versatile alternative to multistep chemical synthesis. *Journal of Analytical Toxicology* 33, 190-197.
- Peters F.T., Dragan C.-A., Schwaninger A.E., Sauer C., Zapp J., Bureik M., Maurer H.H. (2009b)** Use of fission yeast heterologously expressing human cytochrome P450 2B6 in biotechnological synthesis of the designer drug metabolite N-(1-phenylcyclohexyl)-2-hydroxyethanamine. *Forensic Science International* 184, 69-73.
- Peters M.W., Meinhold P., Glieder A., Arnold F.H. (2003)** Regio- and enantioselective alkane hydroxylation with engineered cytochromes P450 BM-3. *Journal of the American Chemical Society* 125, 13442-13450.
- Pflug S., Richter S.M., Urlacher V.B. (2007)** Development of a fed-batch process for the production of the cytochrome P450 monooxygenase CYP102A1 from *Bacillus megaterium* in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 129, 481-488.
- Popov V.O., Lamzin V.S. (1994)** NAD<sup>+</sup> dependent formate dehydrogenase. *Biochemical Journal* 301, 625 - 643.
- Pozzi G., Cavazzini M., Cinato F., Montanari F., Quici S. (1999)** Enantioselective catalysis in fluorinated media - synthesis and properties of chiral perfluoroalkylated (Salen)manganese complexes. *European Journal of Organic Chemistry* 1999, 1947-1955.
- Rauschenbach R., Isernhagen M., Noeske-Jungblut C., Boidol W., Siewert G. (1993)** Cloning sequencing and expression of the gene for cytochrome P450meg, the steroid-15 $\beta$ -monooxygenase from *Bacillus megaterium* ATCC 13368. *Molecular and General Genetics* MGG 241, 170-176.
- Ro D.-K., Paradise E.M., Ouellet M., Fisher K.J., Newman K.L., Ndungu J.M., Ho K.A., Eachus R.A., Ham T.S., Kirby J., Chang M.C.Y., Withers S.T., Shiba Y., Sarpong R., Keasling J.D. (2006)** Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature Biotechnology* 440, 940-943.

- Ruijsenaars H.J., Sperling E.M.G.M., Wiegerinck P.H.G., Brands F.T.L., Wery J., de Bont J.A.M. (2007)** Testosterone 15 $\beta$ -hydroxylation by solvent tolerant *Pseudomonas putida* S12. *Journal of Biotechnology* 131, 205-208.
- Schewe H., Kaup B.-J., Schrader J. (2008)** Improvement of P450 BM-3 whole cell biocatalysis by integrating heterologous cofactor regeneration combining glucose facilitator and dehydrogenase in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78, 55-65.
- Schewe H., Holtmann D., Schrader J. (2009)** P450BM-3-catalyzed whole-cell biotransformation of ( $\pm$ )-pinene with recombinant *Escherichia coli* in an aqueous-organic two-phase system. *Applied Microbiology and Biotechnology* 83, 849-857.
- Schiffler B., Zollner A., Bernhardt R. (2004)** Stripping down the mitochondrial cholesterol hydroxylase system, a kinetics study. *Journal of Biological Chemistry* 279, 34269-34276.
- Schmid A., Hofstetter K., Feiten H.J., Hollmann F., Witholt B. (2001)** Integrated biocatalytic synthesis of gram scale: The highly enantioselective preparation of chiral oxiranes with styrene monooxygenase. *Advanced Synthesis and Catalysis* 343, 732-737.
- Schmid R.D. (2002)** Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik. Wiley VCH, Weinheim.
- Schmid R.D., Pleiss J., Urlacher V. (2004)** Biokatalyse: Selektivoxidation von C-H Bindungen mit Sauerstoff. *Nachrichten aus der Chemie* 52, 767-772.
- Schmitz G., Franke D., Stevens S., Takors R., Weuster-Botz D., Wandrey C. (2000)** Regioselective oxidation of terfenadine with *Cunninghamella blakesleeana*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 10, 313-324.
- Schroer K., Zelic B., Oldiges M., Lütz S. (2009)** Metabolomics for biotransformations - Intracellular redox cofactor analysis and enzyme kinetic offer insight into whole cell processes. *Biotechnology and Bioengineering* 104, 251-260.
- Schroer K., Mackfeld U., Tan I.A.W., Wandrey C., Heuser F., Bringer-Meyer S., Weckbecker A., Hummel W., Daußmann T., Pfaller R., Liese A., Lütz S. (2007)** Continuous asymmetric ketone reduction processes with recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 132, 438-444.
- Seelbach K., Riebel B., Hummel W., Kula M.R., Tishkov V.I., Egorov A.M., Wandrey C., Kragl U. (1996)** A novel, efficient regenerating method of NADPH using a new formate dehydrogenase. *Tetrahedron Letters* 37, 1377-1380.
- Sikkema J., Debont J.A.M., Poolman B. (1995)** Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews* 59, 201-222.
- Simgen B. (2000)** Substrate binding to 15 $\beta$ -hydroxylase (CYP106A2) probed by FT infrared spectroscopic studies of the iron ligand CO stretch vibration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 269, 737-742.
- Smit M.S., Mokgoro M.M., Setati E., Nicaud J.M. (2004)** Preparation of dodecanol-tolerant strains of *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters* 26, 849-854.

- Sono M., Roach M.P., Coulter E.D., Dawson J.H. (1996)** Heme-containing oxygenases. *Chemical Reviews* 96, 2841-2888.
- Sowden R.J., Yasmin S., Rees N.H., Bell S.G., Wong L.-L. (2005)** Biotransformation of the sesquiterpene (+)-valencene by cytochrome P450cam and P450BM-3. *Organic and Biomolecular Chemistry* 3, 57-64.
- Steinborn D. (2007)** Grundlagen der metallorganischen Komplexkatalyse. Vieweg und Teubner Verlag, Wiesbaden.
- Stillger T., Bönitz M., Villela Filho M., Liese A. (2002)** Überwindung von thermodynamischen Limitierungen in substratgekoppelten Cofaktorregenerierungsverfahren. *Chemie Ingenieur Technik* 74, 1035-1039.
- Storhas W. (2003)** Bioverfahrensentwicklung. Wiley VCH, Weinheim.
- Stull D.R., Westrum E.F., Sinke G.C. (1969)** The chemical thermodynamics of organic compounds. John Wiley, New York.
- Szcebara F., Chandelier C., Villeret C., Masurel A., Bourot S., Duport C., Blanchard S., Groisillier A., Testet E., Costagliolo P., Cauet G., Degryse E., Balbuena D., Winter J., Achstetter T., Spagnoli R., Pompon D., Dumas B. (2003)** Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast. *Nature Biotechnology* 21, 143-149.
- Tee K.L., Schwaneberg U. (2006)** A screening system for the directed evolution of epoxygenases: Importance of position 184 in P450 BM3 for stereoselective styrene epoxidation. *Angewandte Chemie International Edition* 45, 5380-5383.
- Teusink B., Passarge J., Reijenga C.A., Esgalhado E., van der Weijden C.C., Schepper M., Walsh M.C., Bakker B.M., van Dam K., Westerhoff H.V., Snoep J.L. (2000)** Can yeast glycolysis be understood in terms of in vitro kinetics of the constituent enzymes? Testing biochemistry. *European Journal of Biochemistry* 267, 5313-5329.
- Theobald U., Mailinger W., Baltes M., Rizzi M., Reuss M. (1997)** In vivo analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: I. Experimental observations. *Biotechnology and Bioengineering* 55, 305-316.
- Tishkov V.I., Galkin A.G., Fedorchuk V.V., Savitsky P.A., Rojkova A.M., Gieren H., Kula M.R. (1999)** Pilot scale production and isolation of recombinant NAD<sup>+</sup>- and NADP<sup>+</sup>-specific formate dehydrogenases. *Biotechnology and Bioengineering* 64, 187-193.
- Urlacher V.B., Eiben S. (2006a)** Cytochrome P450 monooxygenases: perspectives for synthetic application. *Trends in Biotechnology* 24, 324-330.
- Urlacher V.B., Schmid R.D. (2006b)** Recent advances in oxygenase-catalyzed biotransformations. *Current Opinion in Chemical Biology* 10, 156-161.
- Urlacher V.B., Lutz-Wahl S., Schmid R.D. (2004)** Microbial P450 enzymes in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64, 317-325.

- Urlacher V.B., Makhsumkhanov A., Schmid R.D. (2006c)** Biotransformation of  $\beta$ -ionone by engineered cytochrome P450 BM-3. *Applied Microbiology and Biotechnology* 70, 53-59.
- van Beilen J.B., Duetz W.A., Schmid A., Withold B. (2003)** Practical issues in the application of oxygenases. *Trends in Biotechnology* 21, 170-177.
- van Dam J.C., Eman M.R., Frank J., Lange H.C., van Dedem G.W.K., Heijnen S.J. (2002)** Analysis of glycolytic intermediates in *Saccharomyces cerevisiae* using anion exchange chromatography and electrospray ionization with tandem mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta* 460, 209-218.
- Veech R.L. (2006)** The determination of the redox states and phosphorylation potential in living tissues and their relationship to metabolic control of disease phenotypes. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 34, 168-179.
- Virus C. (2006)** Etablierung und Evaluierung eines Screeningsystems für die molekulare Evolution der Steroid-15 $\beta$ -Hydroxylase (CYP106A2) aus *Bacillus megaterium* ATCC 13368. Dissertation, Universität des Saarlandes.
- Visser D., van Zuylen G.A., van Dam J.C., Eman M.R., Pröll A., Ras C., Wu L., van Gulik W.M., Heijnen J.J. (2004)** Analysis of in vivo kinetics of glycolysis in aerobic *Saccharomyces cerevisiae* by application of glucose and ethanol pulses. *Biotechnology and Bioengineering* 88, 157-167.
- Vrsalovic-Presecki A., Vasic-Racki D. (2005)** Production of L-malic acid by permeabilized cells of commercial *Saccharomyces sp.* strains. *Biotechnology Letters* 27, 1835-1839.
- Vrtis J.M., White A.K., Metcalf W.W., van der Donk W.A. (2002)** Phosphite dehydrogenase: a versatile cofactor-regeneration enzyme. *Angewandte Chemie International Edition* 41, 3257-3259.
- Walsh C. (2002)** Flavin coenzymes: at the crossroads of biological redox chemistry. *Accounts of Chemical Research* 13, 148-155.
- Wandrey C. (2004)** Biochemical reaction engineering for redox reactions. *The Chemical Record* 4, 254-265.
- Weber F.J., de Bont J.A.M. (1996)** Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes* 1286, 225-245.
- Weisser P., Kramer R., Sahm H., Sprenger G.A. (1995)** Functional expression of the glucose-transporter of *Zymomonas mobilis* leads to restoration of glucose and fructose uptake in *Escherichia coli* mutants and provides evidence for its facilitator action. *Journal of Bacteriology* 177, 3351-3354.
- Wichmann R., Vasic-Racki D. (2005)** Cofactor Regeneration at the Lab Scale. *Advances in Biochemical Engineering, Biotechnology* 92, 225 - 260.
- Wittmann C., Krömer J., Kiefer P., Binz T., Heinzle E. (2004)** Impact of the cold shock phenomenon on quantification of intracellular metabolites in bacteria. *Analytical Biochemistry* 327, 135-139.

- Wong L.L. (1998)** Cytochrome P450 monooxygenases. *Current Opinion in Chemical Biology* 2, 263-268.
- Wong T.S., Arnold F.H., Schwaneberg U. (2004)** Laboratory evolution of cytochrome P450 BM-3 monooxygenase for organic cosolvents. *Biotechnology and Bioengineering* 85, 351-358.
- Wu L., Mashego M.R., van Dam J.C., Proell A.M., Vinke J.L., Ras C., van Winden W.A., van Gulik W.M., Heijnen J.J. (2005)** Quantitative analysis of the microbial metabolome by isotope dilution mass spectrometry using uniformly <sup>13</sup>C-labeled cell extracts as internal standards. *Analytical Biochemistry* 336, 164-171.
- Yamada K., Hara N., Shibata T., Osago H., Tsuchiya M. (2006)** The simultaneous measurement of nicotinamide adenine dinucleotide and related compounds by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 352, 282-285.
- Zhang W., Loebach J.L., Wilson S.R., Jacobsen E.N. (2002)** Enantioselective epoxidation of unfunctionalized olefins catalyzed by salen manganese complexes. *Journal of the American Chemical Society* 112, 2801-2803.
- Zhao J., Tan E., Ferras J., Auclair K. (2007)** Activity of human P450 2D6 in biphasic solvent systems. *Biotechnology and Bioengineering* 98, 508-513.
- Zocher F., Enzelberger M.M., Bornscheuer U.T., Hauer B., Wohlleben W., Schmid R.D. (2000)** Epoxide hydrolase activity of *Streptomyces* strains. *Journal of Biotechnology* 77, 287-292.
- Zöllner A., Dragan C.A., Pistorius D., Müller R., Bode H.B., Peters F.T., Maurer H.H., Bureik M. (2009)** Human CYP4Z1 catalyzes the in-chain hydroxylation of lauric acid and myristic acid. *Biological Chemistry* 390, 313-317.

# Danksagung

Meinem Doktorvater Herr Prof. Dr. Pietruszka danke ich für die Möglichkeit an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zu promovieren und für den chemischen Blickwinkel auf meine Arbeit.

Frau Prof. Dr. Pohl danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats, sowie für ihr Engagement und die wertvollen Tipps zum Fortgang meiner Arbeit im Rahmen ihres Wechsels an das Institut für Biotechnologie 2.

Den Herren Prof. Dr. Wandrey und Prof. Dr. Wiechert gilt mein Dank für die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut für Biotechnologie 2.

Herrn Dr. Stephan Lütz gilt mein besonderer Dank für die interessante Themenstellung, das in mich gesetzte Vertrauen und den gewährten Freiraum bei der Bearbeitung des Themas.

Mein besonderer Dank gilt auch Lilia Härter und Ursula Mackfeld für die tatkräftige experimentelle Unterstützung, die zahlreichen Diskussionen und Vorschläge, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Saskia Marina Schuback danke ich für die experimentelle Unterstützung insbesondere bei den zahlreichen Synthesen und Aufreinigungen. Es hat mir sehr viel Freude bereitet, zu Deiner Ausbildung beitragen zu können.

Roland Moussa danke ich für sein großes Engagement und das Durchhaltevermögen bei den Scale-up Versuchen mit der Spaltheife im Rahmen seiner Masterarbeit.

Außerdem möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Technische Biokatalyse für das hervorragende Arbeitsklima, die stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und das ein oder andere lustige Stündchen bedanken. In diesem Zusammenhang danke ich ganz herzlich meinen Bürokollegen für die gute Atmosphäre und die schöne Zeit.

Meine Kooperationspartnern Frau Prof. Dr. Rita Bernhardt und Herrn Dr. Matthias Bureik danke ich für die Bereitstellung der CYP21 und der CYP106A2, sowie für zahlreiche

Diskussionen und das rege Interesse am Fortschritt der Arbeit. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Frank Hannemann und Frau Sabrina Bleif für die Klonierungsarbeiten bedanken.

Frau PD Dr. Vlada Urlacher danke ich für die Bereitstellung der CYP102A1 Variante und die Möglichkeit eines Forschungsaufenthalts am Institut für Technische Biochemie, Universität Stuttgart.

Dr. Stephanie Bringer-Meyer gilt mein Dank für die zahlreichen Tipps und die freundliche Bereitstellung der FDH und der *LbADH*.

Frau Dr. Kohlmann danke ich sehr herzlich für die Korrektur der Arbeit und die wertvollen Diskussionen, insbesondere aber für die zahlreichen gemeinsamen Freizeitaktivitäten.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung und das stete offene Ohr, wenn es im Labor mal wieder nicht so richtig klappen wollte, bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Jan für seine liebevolle Unterstützung und den bedingungslosen Rückhalt.

## **Wissenschaftliche Veröffentlichungen im Rahmen dieser Promotion**

### **Artikel in Fachjournalen**

**Zehentgruber D., Hannemann F., Bleif S., Bernhardt R., Lütz S.;** Towards preparative scale steroid hydroxylation with Cytochrome P450 monooxygenase CYP106A2, *ChemBioChem*, *akzeptiert*.

**Zehentgruber D., Dragan C. A., Bureik M., Lütz S.;** Challenges of steroid biotransformation with human Cytochrome P450 monooxygenase CYP21 using recombinant *Schizosaccharomyces pombe*; *Journal of Biotechnology*, *eingereicht*.

**Zehentgruber D., Urlacher V. B., Lütz S.;** Limitations of Cytochrome P450 monooxygenase BM-3 catalyzed hydroxylation of  $\beta$ -ionone, *ChemCatChem*, *eingereicht*.

### **Tagungsbeiträge**

**Zehentgruber D., Dragan C. A., Bureik M., Lütz S.;** Limitations of CYP21 catalysed whole cell biotransformation, Posterbeitrag European Bioprospectives 2008, Hannover.

**Zehentgruber D., Hannemann F., Bleif S., Bernhardt R., Lütz S.;** Towards preparative scale steroid hydroxylation with Cytochrome P450 monooxygenase CYP106A2, Posterbeitrag Biotrans 2009, Bern.

**Zehentgruber D., Hannemann F., Bleif S., Bernhardt R., Lütz S.;** Towards preparative scale steroid hydroxylation with Cytochrome P450 monooxygenase CYP106A2, Vortrag Dechema Jahrestagung der Biotechnologen 2009, Mannheim.

Die vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Außerdem habe ich bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

Daniela Zehentgruber