



**Entwicklung von *Pseudomonas putida*  
Ganzzellbiokatalysatoren zur Synthese  
oxyfunktionalisierter Verbindungen**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Florian Tieves**

aus Neuss

Düsseldorf, August 2016

Aus dem Institut für Biochemie, Lehrstuhl II  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Vlada B. Urlacher

Korreferent: Prof. Dr. Martina Pohl

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.2016

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Die Dissertation wurde bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
(Florian Tieves)

## Danksagung

Prof. Dr. Vlada B. Urlacher danke ich für die Überlassung des spannenden Promotionsthemas und die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut für Biochemie II sowie für die Übernahme des Erstgutachtens meiner Arbeit.

Prof. Dr. Martina Pohl danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen (AIF), dem Ministerium für Wirtschaft und Technologie sowie dem Ministerium für Innovation, Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen danke ich für die finanzielle Unterstützung während meiner Promotion.

Prof. Dr. Jens Schrader und seinen Mitarbeitern des DECHEMA Forschungsinstituts in Frankfurt a. M. danke ich für die konstruktive Zusammenarbeit bei der Entwicklung von *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren.

Allen Kollegen des Instituts für Biochemie II möchte ich herzlich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die stets vorhandene Unterstützung in großen und kleinen Dingen und die vielen fruchtbaren Diskussionen danken.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Osama Mahmoud und Dr. Marco Girhard für die vielen geführten Diskussionen und für die Hinweise und Korrekturvorschläge zu Publikationsmanuskripten und zu meiner Dissertation. Des Weiteren danke ich Sven Carsten Lehmann für die Unterstützung im Ganzzellteam und Dr. Clemens von Bühler für die stets vorhandene Ansprechbarkeit bei Fragen zur Produktanalytik.

Dr. Priska Le-Huu und Dr. Esther Ricklefs danke ich für die gegenseitige Unterstützung während der Studien- und Promotionszeit.

Reiner Schneider und Isabella Ogorek danke ich dafür, dass sie immer ein offenes Ohr hatten und für die vielen schönen Stunden seit unserer gemeinsamen Studienzeit.

„Familia Retuerta“ danke ich für die Möglichkeit in Retuerta Kraft schöpfen und neue Ideen entwickelt zu können. *Muchas gracias a todos.*

Ein sehr herzlicher Dank geht an meine Familie, die mich stets in jeglicher Hinsicht unterstützt hat. Ein ganz großes Dankeschön geht an Alba für ihre grenzenlose Unterstützung während der letzten Jahre.

## Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge

*Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits in Form eines Originalartikels veröffentlicht oder als Posterbeitrag auf internationalen Konferenzen vorgestellt:*

### Originalartikel

Tieves F, Erenburg IN, Mahmoud O, Urlacher VB. 2016. Synthesis of chiral 2-alkanols from *n*-alkanes by a *P. putida* whole-cell biocatalyst. *Biotechnol Bioeng* DOI: 10.1002/bit.25953.

*Teile aus diesem Originalartikel wurden in der vorliegenden Dissertation verwendet (Kapitel 3.4. und 4.4). Copyright © 2016 John Wiley and Sons. Der Text des Originalartikels wurde übersetzt und um weitere Teile ergänzt. Abbildungen und Tabellen wurden in angepasster oder unveränderter Form abgedruckt mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons. Der eigene Beitrag zum Originalartikel beinhaltet alle experimentellen Arbeiten sowie das Schreiben des Manuskripts (90%). Durch Isabelle N. Erenburg erfolgten eine Optimierung der Expressionsbedingungen und erste Ganzzellumsetzungen. Vlada B. Urlacher und Osama Mahmoud waren an der konzeptionellen Entwicklung des Ganzzellkatalysators und dem Schreiben des Manuskripts beteiligt.*

### Weitere Veröffentlichungen, die nicht in dieser Arbeit enthalten sind:

Hernández-Martín A, von Bühler CJ, Tieves F, Fernández S, Ferrero M, Urlacher VB. 2014. Whole-cell biotransformation with recombinant cytochrome P450 for the selective oxidation of Grundmann's ketone. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 22:5586-5592.

Girhard M, Tieves F, Weber E, Smit MS, Urlacher VB. 2013. Cytochrome P450 reductase from *Candida apicola*: versatile redox partner for bacterial P450s. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:1625-1635.

### Posterbeiträge

Tieves F, Lehmann SC, von Bühler CJ, Urlacher VB. Challenges of whole-cell biocatalysis for the production of oxyfunctionalized molecules. *7th International Congress on Biocatalysis. Biocat 2014*. Hamburg, Deutschland, 31. August - 4. September (2014).

Tieves F, Mahmoud O, Urlacher VB. *Pseudomonas putida* as a whole-cell biocatalyst for the production of oxyfunctionalized molecules. *Workshop Industrial Enzymes*. Pavia, Italien, 22. - 23. September (2015).

## Abkürzungen

Abk	Abkürzung
ADH	Alkoholdehydrogenase
AlkL	Membranprotein aus <i>Pseudomonas putida</i> GPo1
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bps	Basenpaare (engl. <i>base pairs</i> )
cdw	Zelltrockenmasse (engl. <i>cell dry weight</i> ).
C-H	Kohlenwasserstoff-Bindung
CYP	Cytochrom-P450-Monooxygenase
Cm	Chloramphenicol
cymD	Membranprotein aus <i>P. putida</i> DSM 12264
CYP154A8	P450 aus <i>Nocardia farcinica</i>
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynulkeosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Enzym-Klassifikationsnummer (engl. <i>Enzyme Commission</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ED-Weg	Entner-Doudoroff
<i>ee</i>	Enantiomerenüberschuss (engl. <i>enantiomeric excess</i> )
EMP-Weg	Embden-Meyerhof-Parnas-Weg
<i>et al.</i>	und andere (lat. <i>et alii</i> )
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FdR	Flavodoxin-Reduktase aus <i>Escherichia coli</i>
FMN	Flavinmononukleotid
g	Gramm
GC/MS	Gaschromatograph mit gekoppelter Massenspektrometrie
GDH	GDH aus <i>Bacillus megaterium</i>
gDNA	genomische DNA
GldA	Glyceroldehydrogenase aus <i>Escherichia coli</i>
GLF	Glucose-Facilitator aus <i>Zymomonas mobilis</i>
Gm	Gentamycin
h	Stunde/n
IPP	Isopentenylpyrophosphat
IS	Interner Standard
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
mA	Milliamper
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
Km	Kanamycin
KPi	Kaliumphosphat
LB-ADH	ADH aus <i>Lactobacillus brevis</i>
m/v	Masse pro Volumen
MEP-Weg	Methylerythritolphosphatweg
mg	Milligramm
min	Minute

---

mM	Millimolar
M-β-CD	Methyl-β-cyclodextrin
NAD(P)H	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid(-Phosphat)
nmol	Nanomol
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
P450	Cytochrom-P450-Monooxygenase
P450-BM3	CYP102A1 aus <i>Bacillus megaterium</i>
P450cam	CYP101A1 aus <i>Pseudomonas putida</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
PdR	Putidaredoxin-Reduktase aus <i>Pseudomonas putida</i>
Pdx	Putidaredoxin aus <i>Pseudomonas putida</i>
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP-Weg	Pentosephosphat-Weg
RE-ADH	ADH aus <i>Rhodococcus erythropolis</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SIM	Ausgewähltes Ionen Monitoring (engl. <i>selected ion monitoring</i> )
Sm	Streptomycin
Sp	Spectinomycin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tfb	Transformationspuffer (engl. <i>transformation buffer</i> )
Tc	Tetracyclin
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTN	Umsatzzahl (engl. <i>total turnover number</i> )
U	Unit/s
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
YkuN	Flavodoxin aus <i>Bacillus subtilis</i>

# Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung.....	II
Danksagung.....	III
Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge.....	IV
Abkürzungen.....	V
Inhaltsverzeichnis.....	VII
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>XII</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>XIV</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Biokatalyse.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Cytochrom-P450-Monooxygenasen.....</b>	<b>2</b>
1.2.1. Eigenschaften und Reaktionen.....	2
1.2.2. P450-Elektronentransfersysteme.....	2
1.2.3. Katalysezyklus P450-katalysierter Hydroxylierungsreaktionen.....	4
1.2.4. Einsatz von P450 in der Biokatalyse.....	5
<b>1.3. Ganzzellbiokatalyse.....</b>	<b>6</b>
1.3.1. Verwendung und beeinflussende Faktoren.....	6
1.3.2. Möglichkeiten und Herausforderungen in der Ganzzellbiokatalyse.....	7
1.3.3. <i>P. putida</i> als Ganzzellbiokatalysator.....	9
1.3.4. Redox-Kofaktor Metabolismus in <i>P. putida</i> .....	10
1.3.5. Abbau von <i>p</i> -Cymol durch <i>P. putida</i> F1.....	12
<b>1.4. Limonen als interessantes Substrat in der Biokatalyse.....</b>	<b>13</b>
1.4.1. Eigenschaften, Anwendung und Biosynthese.....	13
1.4.2. P450-katalysierte Hydroxylierung von Limonen zu Perillaalkohol.....	14
1.4.3. Ganzzellbiokatalysatoren zur selektiven Oxidation von Limonen.....	15
<b>1.5. Synthese chiraler Alkohole.....</b>	<b>16</b>
1.5.1. Chemische und biokatalytische Verfahren.....	16
1.5.2. Regio- und stereoselektive Hydroxylierung linearer Alkane.....	16
1.5.3. P450-katalysierte Hydroxylierung linearer Alkane.....	17

---

1.5.4.	P450-Ganzzellbiokatalysatoren zur Hydroxylierung von linearen Alkanen.....	18
<b>1.6.</b>	<b>Alkoholdehydrogenasen.....</b>	<b>19</b>
1.6.1.	Eigenschaften und Verwendung.....	19
1.6.2.	Einsatz von ADH- und P450-ADH-Systemen in der Biokatalyse.....	21
<b>1.7.</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>23</b>
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>24</b>
<b>2.1.</b>	<b>Chemikalien, Puffer und Enzyme.....</b>	<b>24</b>
<b>2.2.</b>	<b>Oligonukleotide, Plasmide und Bakterienstämme .....</b>	<b>24</b>
<b>2.3.</b>	<b>Medien, Puffer und Lösungen.....</b>	<b>30</b>
2.3.1.	Medien.....	30
2.3.2.	Puffer und Lösungen .....	31
<b>2.4.</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>33</b>
2.4.1.	Isolation von Plasmid-DNA .....	33
2.4.2.	Isolation von genomischer DNA.....	33
2.4.3.	Polymerasekettenreaktion zur Amplifikation von DNA .....	33
2.4.4.	Einfügen von Punktmutationen durch Polymerasekettenreaktion .....	34
2.4.5.	Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese .....	34
2.4.6.	Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten oder Plasmid-DNA.....	34
2.4.7.	Behandlung von DNA mit alkalischer Phosphatase.....	35
2.4.8.	Ligation von DNA-Fragmenten durch T4-DNA-Ligase.....	35
2.4.9.	Assemblierung von DNA-Fragmenten.....	35
2.4.10.	Überprüfung von DNA-Sequenzen .....	36
2.4.11.	Klonierung und Konstruktion von Expressionsplasmiden.....	36
2.4.11.1.	Konstruktion von pJeM1-a.....	37
2.4.11.2.	Konstruktion von pSEVA42rha und pSEVA44rha.....	37
2.4.11.3.	Klonierung von p4782.1 BM3-VVF und p4782.1 BM3-VVPF .....	37
2.4.11.4.	Klonierung von p4782.1 P450camPP .....	38
2.4.11.5.	Klonierung von pSEVA-basierten Koexpressionsplasmiden .....	38
2.4.11.6.	Klonierung von pJeM1-a-basierten Expressionsplasmiden .....	38
2.4.12.	Konstruktion des Deletionsplasmids pSUP202 $\Delta cym::aac$ .....	39

---

<b>2.5. Mikrobiologische Methoden</b> .....	<b>39</b>
2.5.1. Stammhaltung .....	39
2.5.2. Herstellung von chemisch-kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen .....	39
2.5.3. Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen .....	40
2.5.4. Herstellung von kompetenten <i>P. putida</i> -Zellen .....	40
2.5.5. Transformation von <i>P. putida</i> -Zellen durch Elektroporation .....	40
2.5.6. Heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i> .....	41
2.5.7. Proteinexpression in <i>P. putida</i> .....	41
2.5.8. Herstellung von Zelllysaten nach Proteinexpression .....	41
2.5.9. Konstruktion eines <i>P. putida</i> -Knockoutstamms .....	42
2.5.10. Wachstumstest von <i>P. putida</i> DSM 12264 $\Delta cym::aac$ .....	43
<b>2.6. Ganzzellbiokatalyse</b> .....	<b>43</b>
2.6.1. Biotransformation von <i>R</i> -(+)-Limonen .....	43
2.6.2. Umsetzung von <i>R</i> -(+)-Limonen oder (+)-Campher durch rekombinante <i>P. putida</i> -Ganzzellbiokatalysatoren .....	43
2.6.3. Umsetzung von linearen Alkanen durch rekombinante <i>E. coli</i> - oder <i>P. putida</i> -Ganzzellbiokatalysatoren .....	44
<b>2.7. Proteinbiochemische und analytische Methoden</b> .....	<b>45</b>
2.7.1. Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration .....	45
2.7.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	45
2.7.3. Bestimmung der P450-Konzentration .....	45
2.7.4. Bestimmung der Kopplungseffizienz und NADPH-Umsatzrate .....	46
2.7.5. Bestimmung der Dehydrogenase-Aktivität .....	47
2.7.6. Substrat- und Produktanalyse durch Gaschromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie (GC/MS) .....	47
2.7.6.1. Extraktion und Produktanalyse nach Umsetzung von <i>R</i> -(+)-Limonen oder (+)-Campher .....	48
2.7.6.2. Extraktion und Produktanalyse nach Umsetzung von linearen Alkanen. ....	48
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>50</b>
<b>3.1. Entwicklung eines modularen Baukastens für die Koexpression rekombinanter     Proteine in <i>P. putida</i></b> .....	<b>50</b>

---

<b>3.2.</b>	<b>Entwicklung von <i>P. putida</i>-Ganzzellbiokatalysatoren zur Umsetzung von <i>R</i>-(+)-Limonen zu <i>R</i>-(+)-Perillaalkohol .....</b>	<b>53</b>
3.2.1.	Auswahl einer P450 zur selektiven Oxidation von <i>R</i> -(+)-Limonen.....	53
3.2.2.	Herstellung des <i>P. putida</i> -Knockoutstamms <i>P. putida</i> DSM 12264 $\Delta$ <i>cym::aac</i> .	56
3.2.3.	Erste Umsetzungen von Limonen durch <i>P. putida</i> -Ganzzellbiokatalysatoren.....	59
3.2.4.	Einfluss des Stofftransfers im <i>P. putida</i> -Ganzzellbiokatalysator.....	61
3.2.5.	Einfluss der Biokatalysator- und Substratkonzentration .....	64
3.2.6.	Effekt einer unterstützten Kofaktorregenerierung.....	65
<b>3.3.</b>	<b>Entwicklung von <i>P. putida</i>-Ganzzellbiokatalysatoren zur Umsetzung von (+)-Campher.....</b>	<b>67</b>
<b>3.4.</b>	<b>Entwicklung von Ganzzellbiokatalysatoren zur selektiven Oxidation von linearen Alkanen.....</b>	<b>72</b>
3.4.1.	Auswahl und Expression von P450 zur regio- und stereoselektiven Oxidation von linearen Alkanen.....	72
3.4.2.	Umsetzung von Octan durch <i>E. coli</i> - und <i>P. putida</i> -Ganzzellbiokatalysatoren...	73
3.4.3.	<i>E. coli</i> versus <i>P. putida</i> -Ganzzellbiokatalysator .....	75
3.4.4.	Optimierung des <i>P. putida</i> -Ganzzellbiokatalysators zur Umsetzung von Alkanen .....	76
3.4.5.	Erhöhung der Enantiomerenreinheit in Alkan-hydroxylierenden <i>P. putida</i> -Ganzzellbiokatalysatoren .....	80
3.4.6.	Herstellung von Ketonen durch <i>P. putida</i> -Ganzzellbiokatalysatoren .....	84
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>87</b>
<b>4.1.</b>	<b>Entwicklung und Anwendung eines modularen Baukastens zur Koexpression rekombinanter Proteine in <i>P. putida</i>.....</b>	<b>87</b>
<b>4.2.</b>	<b>Entwicklung von <i>P. putida</i>-Ganzzellbiokatalysatoren zur Umsetzung von <i>R</i>-(+)-Limonen zu <i>R</i>-(+)-Perillaalkohol .....</b>	<b>89</b>
4.2.1.	Auswahl einer P450 zur selektiven Oxidation von <i>R</i> -(+)-Limonen.....	90
4.2.2.	Entwicklung eines <i>P. putida</i> -Ganzzellbiokatalysators zur Umsetzung von <i>R</i> -(+)-Limonen zu <i>R</i> -(+)-Perillaalkohol .....	91
4.2.3.	Optimierung des <i>P. putida</i> -Ganzzellbiokatalysators zur Umsetzung von <i>R</i> -(+)-Limonen zu <i>R</i> -(+)-Perillaalkohol .....	92

---

<b>4.3.</b>	<b>Umsetzung von (+)-Campher durch <i>P. putida</i>-Ganzzellbiokatalysatoren .....</b>	<b>96</b>
<b>4.4.</b>	<b>Entwicklung von Ganzzellbiokatalysatoren zur selektiven Oxidation von linearen Alkanen.....</b>	<b>97</b>
4.4.1.	Umsetzung von Octan durch <i>E. coli</i> - und <i>P. putida</i> -Ganzzellbiokatalysatoren...	98
4.4.2.	Optimierung der Umsetzung von linearen Alkanen durch <i>P. putida</i> -Ganzzellbiokatalysatoren .....	100
4.4.3.	Erhöhung der Enantiomerenreinheit in Alkan-hydroxylierenden <i>P. putida</i> -Ganzzellbiokatalysatoren .....	103
4.4.4.	Herstellung von Ketonen durch <i>P. putida</i> -Ganzzellbiokatalysatoren .....	104
<b>5.</b>	<b>Schlussfolgerung .....</b>	<b>106</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>108</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>119</b>

## Zusammenfassung

Eine wichtige Reaktion zur Funktionalisierung von Alkanen, Terpenen und anderen industriell relevanten Molekülen stellt die selektive Hydroxylierung inerte Kohlenwasserstoffbindungen dar. Die hohe Regio- und Stereoselektivität ihrer Hydroxylierung macht einige Cytochrom-P450-Monooxygenasen (P450) in diesem Zusammenhang zu besonders vielversprechende Katalysatoren. Zur Gewährleistung einer kontinuierlichen Bereitstellung der benötigten NAD(P)H-Kofaktoren können in P450-katalysierten Reaktionen Ganzzellsysteme eingesetzt werden. Ein dabei häufig auftretendes Problem ist die Toxizität der gebildeten Produkte oder des eingesetzten Substrats gegenüber den verwendeten rekombinanten Wirtszellen. Eine mögliche Lösung dieses Problems stellt die Verwendung von lösungsmitteltoleranten Stämmen, wie *Pseudomonas putida*, dar.

In dieser Arbeit wurde der lösungsmitteltolerante Stamm *P. putida* DSM 12264 als Wirtstamm ausgewählt und zur Herstellung oxyfunktionalisierter Moleküle eingesetzt.

Hierfür wurde zunächst ein modular einsetzbarer Baukasten auf der Basis zweier kompatibler Expressionsplasmide entwickelt, der die Koexpression einer P450 mit geeigneten Redoxpartnerproteinen und weiteren rekombinanten Proteinen zur Optimierung der Ganzzellumsetzung in *P. putida* ermöglichte.

Nach Konstruktion eines Knockoutstamms von *P. putida* DSM 12264 konnte eine hoch selektive Variante von P450-BM3 aus *Bacillus megaterium* (A264V/A328V/L437F) in dem erzeugten *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator erfolgreich zur selektiven Hydroxylierung von (*R*)-(+)-Limonen zu (*R*)-(+)-Perillaalkohol eingesetzt werden. Als Hauptursache für die geringe Produktivität im rekombinanten Ganzzellbiokatalysator konnte ein eingeschränkter Stofftransfer und eine geringe Enzymstabilität identifiziert werden. Eine verbesserte Produktion von (*R*)-(+)-Perillaalkohol konnte nach einigen Optimierungsschritten durch die Permeabilisierung der Zellen oder die Koexpression des äußeren Membranproteins AlkL aus *P. putida* erzielt werden. Unter optimierten Bedingungen konnten innerhalb von 3 h schließlich 530  $\mu$ M (*R*)-(+)-Perillaalkohol produziert werden.

Des Weiteren konnte der positive Effekt einer verbesserten Kofaktorverfügbarkeit auf die Produktivität von *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren in Verbindung mit der hoch aktiven P450cam und ihren natürlichen Redoxpartnerproteinen aus *P. putida* gezeigt werden. In der Hydroxylierung von Campher zu 5-*exo*-Hydroxycampher konnte durch die Koexpression einer Glyceroldehydrogenase (GldA) aus *Escherichia coli* oder einer Glucosedehydrogenase (GDH) aus *B. megaterium* die Produktbildung um das 6- bis 8-Fache gesteigert werden.

Zusätzlich wurde CYP154A8 aus *Nocardia farcinica* in Ganzzellbiokatalysatoren zur Synthese von chiralen 2-Alkoholen ausgehend von linearen Alkanen untersucht. Sowohl *E. coli*- als auch *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren waren in der Lage chirale 2-Alkohole herzustellen, dabei zeigte der lösungsmitteltolerante *P. putida*-Stamm im eingesetzten Zweiphasensystem eine dem *E. coli*-Stamm überlegene Aktivität und Stabilität. Ausgehend von Octan konnten durch den optimierten *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator 16 mM (*S*)-2-Octanol mit einem Enantiomerenüberschuss von 87% produziert werden. Dies entspricht mehr als dem 7-Fachen der bisher erzielten Konzentration im bereits beschriebenen System mit isolierten Enzymen. Durch die zusätzliche Koexpression einer Alkoholdehydrogenase (ADH) konnte der Enantiomerenüberschuss des Produkts bis auf 99% *ee* gesteigert werden. Ausgehend von Heptan, Octan und Nonan konnten durch Verwendung des optimierten P450-ADH-Systems 2,6 mM (*S*)-2-Heptanol mit 91% *ee*, 5,4 mM (*S*)-2-Octanol mit 97% *ee* bzw. 5,5 mM (*S*)-2-Nonanol mit 97% *ee* produziert werden. Die in dieser Arbeit erzielten Konzentrationen an chiralen 2-Alkoholen sind die höchsten, die durch ein P450-Ganzzellbiokatalysator bisher erzielten werden konnten. Neben der Produktion von chiralen 2-Alkoholen, konnte ein weiteres P450-ADH-System erfolgreich zur Herstellung von 2-Octanon und 2,7-Octandion ausgehend von Octan eingesetzt werden.

## Abstract

Hydroxylation reactions represent a key step for the functionalization of alkanes, terpenes and other industrially relevant target molecules. In this context, cytochrome P450 monooxygenases (P450s) show promising properties as catalysts, as they are able to perform hydroxylation reactions of inert C-H bonds with high regio- and stereoselectivity. In order to ensure a continuous supply of the required NAD(P)H-cofactors, bacterial whole-cell systems can be used for P450-catalyzed reactions, which allow the direct conversion of a target molecule into desired products. One of the major limitations of recombinant bacterial cells in reactions like the P450-catalyzed oxidation of terpenes or alkanes is the toxicity caused by the substrate and/or the formed products. Therefore, the application of more robust host strains, such as *Pseudomonas putida*, is one solution to improve P450-based whole-cell biocatalysis for the production of oxyfunctionalized molecules.

The first objective of this thesis was to develop a plasmid-based modular toolbox, which allows co-expression of P450s, suitable redox partners, and supportive enzymes, such as enzymes for cofactor regeneration and improved mass transfer, in *P. putida*.

The second objective of this thesis was to develop and apply *P. putida* whole-cell biocatalysts for the synthesis of selectively functionalized molecules starting from selected inert alkanes and terpenes. For this purpose, the solvent tolerant *P. putida* DSM 12264 strain was chosen as host strain. After construction of a knockout strain of *P. putida* DSM 12264, a highly selective variant of P450-BM3 from *Bacillus megaterium* (A264V/A328V/L437F) was successfully used for the selective production of (*R*)-(+)-perillyl alcohol starting from (*R*)-(+)-limonene. Low substrate mass transfer and low enzyme stability were identified as main causes for restricted productivity. After several optimization steps, improved production of (*R*)-(+)-perillyl alcohol was achieved by cell permeabilization or co-expression of the outer membrane protein AlkL from *P. putida*, respectively. Under optimized conditions 530  $\mu$ M (*R*)-(+)-perillyl alcohol was produced within 3 h.

Moreover, a positive effect of enhanced cofactor availability was shown for the highly active P450cam from *P. putida* expressed along with its natural redox partners in *P. putida* whole-cell biocatalysts producing 5-*exo*-hydroxycamphor from camphor. Co-expression of glycerol dehydrogenase (GldA) from *Escherichia coli* or glucose dehydrogenase (GDH) from *B. megaterium* for enhanced cofactor regeneration resulted in a 6 to 8-fold increased product formation.

Furthermore, CYP154A8 from *Nocardia farcinica* was integrated along with suitable redox partners into whole-cell systems for the production of chiral 2-alkanols starting from linear

alkanes. Both recombinant *E. coli* and *P. putida* whole-cell biocatalysts tested were able to produce chiral 2-alkanols, but the solvent tolerant *P. putida* strain demonstrated advantages regarding activity and stability in the applied biphasic reaction system. The optimized *P. putida* whole-cell biocatalyst produced 16 mM (*S*)-2-octanol from octane with an enantiomeric excess of 87%, which is a 7-fold higher concentration than that achieved by a previously described system using isolated enzymes. The enantiopurity of the product could further be increased up to 99% *ee* by co-expression of an alcohol dehydrogenase (ADH) in the alkane-oxidizing *P. putida* whole-cell biocatalyst. By using the optimized P450-ADH-system for the conversions of heptane, octane or nonane, 2.6 mM (*S*)-2-heptanol with 91% *ee*, 5.4 mM (*S*)-2-octanol with 97% *ee*, or 5.5 mM (*S*)-2-nonanol with 97% *ee* were produced, respectively. The achieved concentrations of chiral 2-alkanols are the highest reported for a P450-based whole-cell biocatalyst so far. Apart from the production of chiral 2-alkanols with *P. putida* whole-cell biocatalysts, a P450-ADH-cascade was also successfully used to produce 2-octanone and 2,7-octanedione starting from inert octane.

# 1. Einleitung

## 1.1. Biokatalyse

Als Biokatalyse wird die Anwendung von Enzymen zur Synthese organischer Verbindungen bezeichnet. Im Vergleich zur klassischen chemischen Synthese stellen in der enzymatischen Synthese oft die hohe Chemo-, Regio- und Stereoselektivität sowie die hohe Aktivität und Effizienz unter milden Bedingungen einen Vorteil dar (Faber 2011). Auch das steigende Interesse der chemischen und pharmazeutischen Industrie an biokatalytischen Prozessen führte im vergangenen Jahrhundert zu der Entwicklung und Anwendung neuer enzymkatalysierter Reaktionen. Nach Bornscheuer *et al.* trugen hierzu maßgeblich drei Entwicklungsstufen bei: Erstens, die Erkenntnis am Anfang des letzten Jahrhunderts, dass Komponenten lebender Zellen zur Synthese organischer Verbindungen eingesetzt werden können. Zweitens, die ersten Möglichkeiten in den 1980er-Jahren, die Proteinstruktur eines Enzyms durch gezielte Modifikationen der Aminosäuresequenz zu verändern, sodass weitere oder sogar nicht-natürliche Substrate zur Synthese von pharmazeutisch relevanten Intermediaten oder Feinchemikalien eingesetzt werden konnten; und schließlich drittens seit Mitte und Ende der 1990er-Jahre die systematische Anwendung molekularbiologischer Methoden zur Verbesserung der Stabilität, Substratspezifität und Enantioselektivität eines Enzyms für einen bestimmten Prozess (Bornscheuer *et al.* 2012).

Für die pharmazeutische Industrie von hohem Interesse ist die Herstellung von enantiomerenreinen Verbindungen. Während hierzu in einer kinetischen Racematspaltung meist Hydrolasen wie Lipasen oder Proteasen eingesetzt wurden, erhält heutzutage die asymmetrische Synthese enantiomerenreiner Verbindungen durch Oxidoreduktasen wie Alkoholdehydrogenasen und Cytochrom-P450-Monooxygenasen oder durch Transferasen wie Transaminasen immer mehr Aufmerksamkeit (Hollmann *et al.* 2011b; Hollmann *et al.* 2011a; Lima-Ramos *et al.* 2014; Nestl *et al.* 2014).

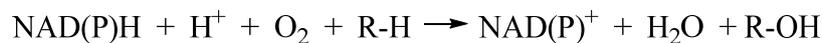
Ihre Fähigkeit, nicht-aktivierte Kohlenwasserstoffe regio- und stereoselektiv zu hydroxylieren, macht Cytochrom-P450-Monooxygenasen zu höchst interessanten Enzymen für die Herstellung von biotechnologisch relevanten Produkten (Bernhardt und Urlacher 2014; Lundemo und Woodley 2015; Schulz *et al.* 2012).

## 1.2. Cytochrom-P450-Monooxygenasen

### 1.2.1. Eigenschaften und Reaktionen

Cytochrom-P450-Monooxygenasen, auch als P450s oder CYPs bezeichnet, gehören zur Enzymklasse der Oxidoreduktasen (EC 1.14.-.-) und kommen in allen Domänen des Lebens vor. Im aktiven Zentrum besitzen sie als prosthetische Gruppe ein Häm b, das durch eine axiale Bindung zwischen dem Hämeisen und dem Thiolatrest eines konservierten Cysteinrests mit dem Protein verbunden ist. Ihren Namen verdanken P450 ihrem Vorkommen als Pigment von Lebermikrosomen und ihrem charakteristischen Absorptionsmaximum bei 450 nm im reduzierten, Kohlenmonoxid-gebundenen Zustand (Omura und Sato 1964a, 1964b).

P450 katalysieren unter anderem die selektive Hydroxylierung nicht-aktivierter C-H-Bindungen mit molekularem Sauerstoff, eine der anspruchsvollsten Reaktionen in der chemischen Synthese (Roduner *et al.* 2013). Die hierzu benötigten Elektronen stammen von den Kofaktoren Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) oder Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH). Während eines der beiden Sauerstoffatome in das Substrat eingebracht wird, wird das zweite zu Wasser reduziert (Schema 1).



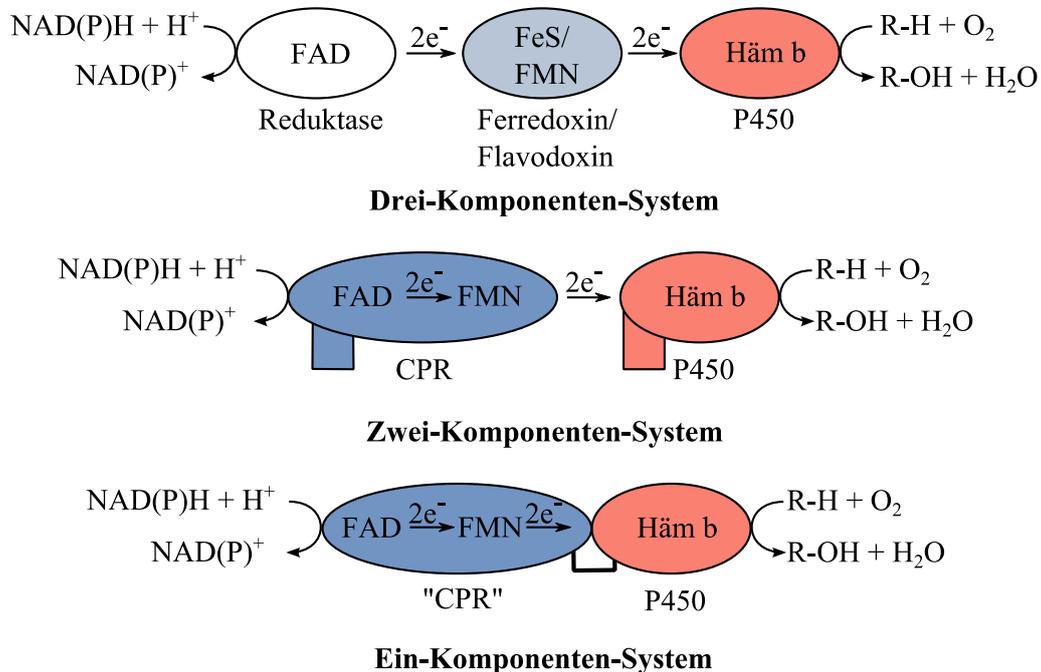
#### Schema 1. Generell katalysierte Reaktion von Cytochrom-P450-Monooxygenasen.

Aufgrund ihrer hohen Regio- und Stereoselektivität stellen P450 unter anderem für die Hydroxylierung von linearen und zyklischen Alkanen aber auch komplexeren Molekülen wie Terpenen und Terpenoiden eine vielversprechende Alternative zur chemischen Oxidation dar (Bernhardt und Urlacher 2014; Hollmann *et al.* 2011a; Lewis *et al.* 2011; Roduner *et al.* 2013). Neben der Hydroxylierung von C-H-Bindungen katalysieren P450 die Epoxidierung von Alkenen und Aromaten, die Oxidation von Alkoholen und Aldehyden oder die N-, S-, O-Dealkylierung sowie einige für sie eher ungewöhnliche Reaktion wie die intramolekulare C-H-Aminierung (Guengerich und Munro 2013; McIntosh *et al.* 2013; Sono *et al.* 1996).

### 1.2.2. P450-Elektronentransfersysteme

Außer wenigen Ausnahmen benötigt der größte Teil aller P450 Elektronentransferpartnerproteine (Redoxpartnerproteine), die ausgehend von NAD(P)H Elektronen über eine Elektronentransportkette auf die P450 übertragen. Entsprechend dieser Redoxpartnerproteine und ihrer Topologie wurden P450 in zehn Klassen eingeteilt, die aus einem Drei-, Zwei- bzw. Ein-Komponenten-System bestehen können (Hannemann *et al.* 2007; Urlacher und Girhard 2012).

Die meisten bakteriellen und mitochondrialen P450-Systeme bestehen aus drei separaten Proteinen. Ausgehend von NAD(P)H werden die Elektronen von einer Flavinadeninindinukleotid (FAD) enthaltenden Reduktase auf ein Eisen-Schwefel-Cluster enthaltendes Ferredoxin (z.B. 2Fe-2S) oder Flavinmononukleotid (FMN) enthaltendes Flavodoxin übertragen, welches schließlich der P450 die Elektronen zur Reduktion des Hämeisen bereitstellt. Während in Mitochondrien Reduktase und P450 mit der inneren Mitochondrienmembran assoziiert und nur das Ferredoxin löslich ist, liegen in Bakterien alle drei Komponenten löslich im Cytosol vor. Ein bekannter Vertreter unter den Drei-Komponenten-Systemen ist die aus *Pseudomonas putida* stammende und häufig als P450cam bezeichnete CYP101A1. Sie katalysiert die regioselektive Hydroxylierung des bicyclischen Monoterpenoids (+)-Campher zu 5-*exo*-Hydroxycampher (Katagiri *et al.* 1968). Die hierzu benötigten Elektronen werden über die natürlichen Redoxpartnerproteine Putidaredoxin-Reduktase (PdR) und Putidaredoxin (Pdx) ausgehend von NADH übertragen. Die meisten eukaryotischen P450-Systeme bestehen aus einem Zwei-Komponenten-System: einer FAD und FMN enthaltenden NAD(P)H-Cytochrom-P450-Reduktase (CPR) und der P450, die beide häufig über eine (Trans-)Membrandomäne in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums verankert sind.



**Abbildung 1. P450-Elektronentransfersysteme.** Drei-Komponenten-System bestehend aus Reduktase, Ferredoxin oder Flavodoxin und P450. Zwei-Komponenten-System bestehend aus meist membrangebundenen CPR und P450. Ein-Komponenten-System bestehend aus einer Fusion einer CPR-ähnlichen Reduktase-Domäne und P450-Domäne. FAD: Flavinadeninindinukleotid; FeS: Eisen-Schwefel-Cluster; FMN: Flavinmononukleotid; CPR: NAD(P)H-Cytochrome-P450-Reduktase (angepasst nach Urlacher und Girhard 2012).

Neben P450-Systemen, die aus mehreren separaten Proteinen bestehen, gibt es membrangebundene oder lösliche Ein-Komponenten-Systeme, in denen eine P450-Domäne über einen kurzen Proteinlinker mit der FAD und FMN enthaltenden Reduktase-Domäne (CPR-ähnlich) fusioniert ist. Das am besten untersuchte natürliche Fusionsprotein ist die als P450-BM3 bekannte Fettsäure-Hydroxylase CYP102A1 aus *Bacillus megaterium* (Miura und Fulco 1975).

### 1.2.3. Katalysezyklus P450-katalysierter Hydroxylierungsreaktionen

Die im katalytischen Zyklus benötigten Reduktionsäquivalente werden durch die Oxidation von NAD(P)H bereitgestellt und über die Elektronentransferpartner auf die P450 übertragen.

Der allgemein akzeptierte P450-Katalysezyklus (Abbildung 2) beinhaltet die Bildung von reaktiven Intermediaten und Komplexen (Denisov *et al.* 2005; Krest *et al.* 2013). Die Substratbindung im aktiven Zentrum bewirkt eine Strukturveränderung, wodurch das an der axialen Bindestelle des Hämeisens gebundene Wassermolekül aus dem Eisen<sup>III</sup>-Ausgangskomplex verdrängt wird (2). Die dabei veränderte Koordination des Hämeisens führt zu einem Übergang des Eisen<sup>III</sup>-Ions vom *low-spin*- zum *high-spin*-Zustand. Durch den Übergang in den *high-spin*-Zustand erhöht sich das Redoxpotential, sodass das Eisen<sup>III</sup>-Ion leichter zum Eisen<sup>II</sup>-Ion reduziert werden kann (3) (Sligar 1976).

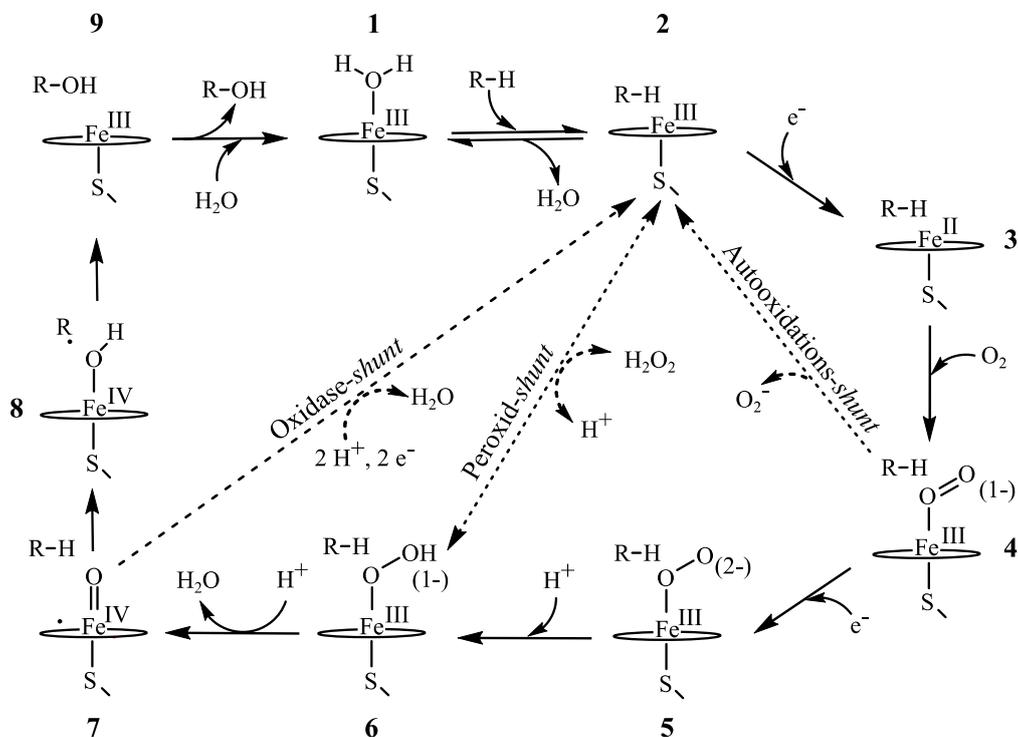


Abbildung 2. Zyklus P450-katalysierter Hydroxylierungsreaktionen (angepasst nach Krest *et al.* 2013).

Im nächsten Schritt führt die Bindung von molekularem Sauerstoff zur Bildung des Eisen<sup>III</sup>-Superoxid-Komplexes (4), der durch ein weiteres Elektron zum Eisen<sup>III</sup>-Peroxidation-Komplex reduziert wird (5). Durch die Protonierung dieses Komplexes entsteht der als *compound 0* bezeichnete Eisen<sup>III</sup>-Hydroperoxo-Komplex (6), dessen Sauerstoff-Sauerstoff-Bindung durch eine weitere Protonierung heterolytisch gespalten wird, sodass Wasser und ein als *compound I* bezeichneter Komplex (7), bestehend aus einem Porphyrinradikal und einer Eisen<sup>IV</sup>-Oxo-Verbindung, gebildet werden (Rittle und Green 2010). Die eigentliche Hydroxylierung des Substrats erfolgt ausgehend von dem hochreaktiven *compound I* über den sogenannten *rebound*-Mechanismus (Groves 1985; Ogliaro *et al.* 2000). Durch Abstraktion eines Wasserstoffradikals einer C-H-Bindung des Substrats entsteht ein Eisen<sup>IV</sup>-Hydroxid-Komplex und ein Substratradikal (8). Eine Umlagerung dieses als *compound II* bezeichneten Komplexes führt schließlich zur Hydroxylierung und der Bildung des Eisen<sup>III</sup>-Komplexes (9). Nachdem das Produkt das aktive Zentrum verlassen hat, erfolgt über die Anlagerung eines Wassermoleküls die Bildung des Eisen<sup>III</sup>-Ausgangskomplexes (1).

Im Verlauf der Katalyse kann es zu Nebenreaktionen kommen, die zur Bildung des Ausgangskomplexes (2) führen. Die hierbei auftretende Entkopplung zwischen NAD(P)H-Verbrauch und Substrathydroxylierung führt zu einer ineffizienten Verwertung der bereitgestellten Reduktionsäquivalente. Im Peroxid-*shunt* wird hierbei Wasserstoffperoxid freigesetzt. Der Autooxidations-*shunt* führt zur Bildung von Superoxid und über den Oxidase-*shunt* kann Sauerstoff vollständig zu Wasser reduziert werden (Abbildung 2). Als Maß für die Effizienz einer P450-katalysierten Reaktion wird daher häufig das Verhältnis zwischen NAD(P)H-Verbrauch und Substrathydroxylierung als Kopplungseffizienz angegeben.

#### 1.2.4. Einsatz von P450 in der Biokatalyse

Wichtige Aspekte, die bei der Verwendung von P450 als Biokatalysatoren berücksichtigt werden müssen, sind die Abhängigkeit von teuren NAD(P)H-Kofaktoren, ein effizienter Elektronentransfer über geeignete Redoxpartnerproteine sowie ihre häufig geringe Stabilität und Aktivität (Bernhardt und Urlacher 2014). In *in-vitro*-Reaktionen werden P450 daher häufig in Kombination mit kofaktorregenerierenden Enzymen eingesetzt. Zu den am häufigsten eingesetzten Enzymen zählen Glucosedehydrogenasen (GDH), Glyceroldehydrogenasen (GLD) oder Alkoholdehydrogenasen (ADH), die durch Umsetzung eines Kosubstrats die Regenerierung von NADPH oder NADH ermöglichen (Urlacher und Schulz 2014).

Trotz ihres hohen Potentials in der C-H-Funktionalisierung werden P450 bisher nur in wenigen industriellen Prozessen eingesetzt. Dennoch stellen häufig die durch P450 selektiv

hydroxylierten Moleküle interessante Ausgangsverbindungen oder Zwischenstufen zur Synthese pharmakologisch oder chemisch interessanter Verbindungen dar (Bernhardt und Urlacher 2014; Lundemo und Woodley 2015; Ortiz de Montellano 2015; Urlacher und Girhard 2012). Ein Problem in biokatalytischen Prozessen mit freien Enzymen ist neben der Abhängigkeit von Kofaktoren die Stabilität der eingesetzten Enzyme sowie deren aufwendige individuelle Herstellung für multi-enzymatische Systeme. Die Verwendung eines Ganzzellbiokatalysators kann in diesen Fällen eine geeignete Alternative zur Biokatalyse mit freien Enzymen sein (Köhler und Turner 2015; Ladkau *et al.* 2014; Muschiol *et al.* 2015; Turner und O'Reilly 2013). Ein aktuelles Beispiel für die industrielle Anwendung einer P450 in einem multi-enzymatischen System ist die durch Sanofi durchgeführte Produktion von Artemisininsäure in *S. cerevisiae* (Peplow 2013). Artemisininsäure ist eine Vorstufe von Artemisinin-Derivaten, die zur Behandlung von Malaria eingesetzt werden (WHO 2015). In der *de-novo*-Synthese von Artemisininsäure katalysiert CYP71AV1 aus *Artemisia annua* die selektive Hydroxylierung von Amorpha-4,11-dien zu Artemisininalkohol, das, unterstützt durch Dehydrogenasen, schließlich sukzessiv zu Artemisininsäure oxidiert wird (Bertea *et al.* 2005; Paddon *et al.* 2013; Ro *et al.* 2006).

## 1.3. Ganzzellbiokatalyse

### 1.3.1. Verwendung und beeinflussende Faktoren

In der Ganzzellbiokatalyse werden die an einer Reaktion beteiligten Enzyme in einem Wirtsorganismus hergestellt und der resultierende Ganzzellbiokatalysator als funktionelle Einheit eingesetzt (Ladkau *et al.* 2014). Hierbei können sowohl wachsende als auch ruhende Zellen verwendet werden. Bei wachsenden Zellen findet die Biokatalyse gleichzeitig mit der Bildung von Biomasse statt. Bei ruhenden Zellen ist die Bildung der Biomasse von der eigentlichen biokatalytischen Reaktion getrennt.

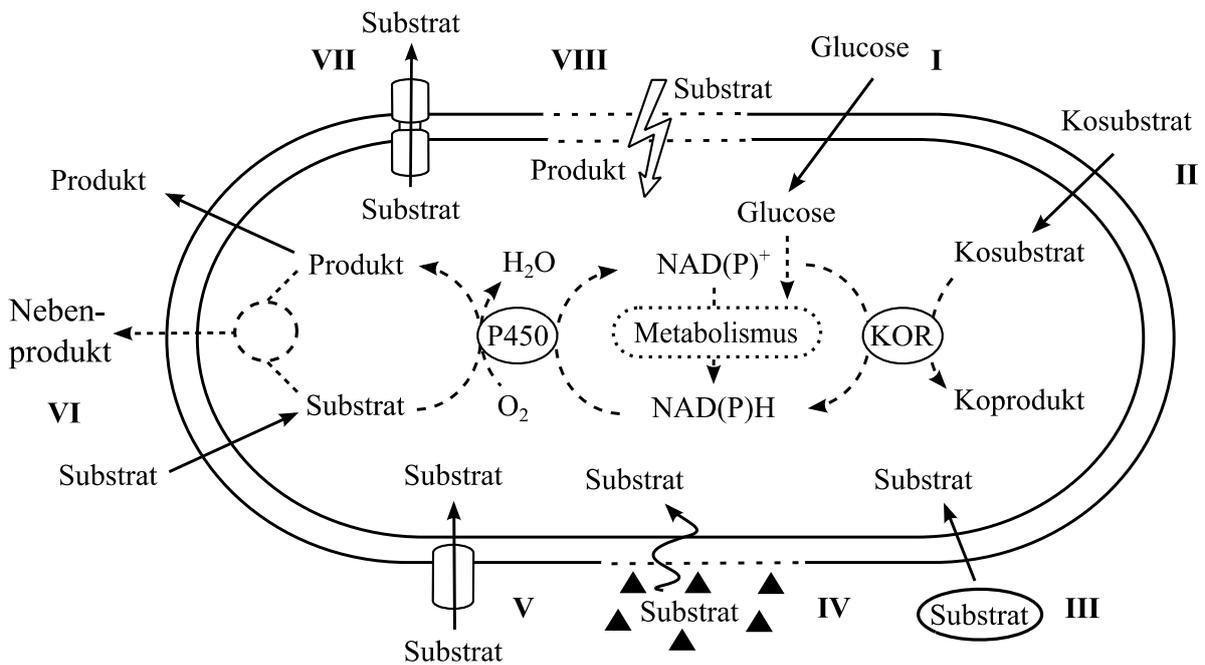
Das Verständnis eines Ganzzellbiokatalysators als funktionelle Einheit, bestehend aus den katalytisch aktiven Enzymen und dem Wirtsstamm, führte in den vergangenen Jahren zu der Entwicklung von multi-enzymatischen Ganzzellbiokatalysatoren unter Verwendung einzelner heterologer Enzyme, nativer Stoffwechselwege oder einer Kombination aus beidem (Ladkau *et al.* 2014). Die häufig niedrigeren Herstellungskosten von Ganzzellbiokatalysatoren und teilweise höhere Enzymstabilität im Vergleich zu isolierten und immobilisierten Enzymen machen die Anwendung von Ganzzellbiokatalysatoren auch für industrielle Prozesse interessant (Tufvesson *et al.* 2011). Die Bereitstellung benötigter Kofaktoren durch zelleigene Stoffwechselwege unter Verwertung günstiger und erneuerbarer Rohstoffe wie Glucose oder

Glycerol machen Ganzzellsysteme insbesondere in der durch Oxidoreduktasen wie P450 katalysierten Biokatalyse interessant (Bayer *et al.* 2015; Bernhardt und Urlacher 2014; Lundemo und Woodley 2015; Schrewe *et al.* 2013). Neben enzymespezifischen Eigenschaften wie der Selektivität, Stabilität oder Substrat-/Produktinhibierung und systembedingten Faktoren wie Substratlöslichkeit oder Sauerstoffversorgung, müssen in Ganzzellsystemen weitere zellspezifische Faktoren wie Substrataufnahme, Vitalität, Substrat-/Produkttoxizität oder Nebenreaktionen berücksichtigt werden (Bernhardt und Urlacher 2014; Schrewe *et al.* 2013).

### **1.3.2. Möglichkeiten und Herausforderungen in der Ganzzellbiokatalyse**

Von entscheidender Bedeutung für die erfolgreiche Anwendung eines Ganzzellbiokatalysators sind Stabilität, Produktivität und Effizienz. Die Eignung ruhender oder wachsender Zellen ist hierbei von Fall zu Fall unterschiedlich (Lundemo und Woodley 2015). Wachsende Zellen besitzen eine höhere metabolische Flexibilität im Vergleich zu ruhenden Zellen, sodass sie sich besser an neue Reaktionsbedingungen anpassen können. Ruhende Zellen sind metabolisch-aktiv, jedoch wird keine Biomasse gebildet, sodass in ruhenden Zellen keine Konkurrenz zwischen Wachstum und Biokatalyse um Energiequellen besteht. Dies macht ruhende Zellen insbesondere für kofaktorabhängige Reaktionen wie die P450-katalysierte Hydroxylierung interessant (Schrewe *et al.* 2013).

Die Wahl des Wirtsstamms und insbesondere die kritische Betrachtung der zellulären und zellphysiologischen Besonderheiten ist entscheidend für die Funktionalität des eingesetzten Ganzzellbiokatalysators (Abbildung 3). Eine wichtige Rolle in der Ganzzellbiokatalyse spielen die Zellmembranen, die für die Integrität der Zelle und für den Erhalt optimaler physiologischer Bedingungen sorgen (Bernhardt und Urlacher 2014; Lundemo und Woodley 2015; Schrewe *et al.* 2013). Bei einigen P450-Substraten handelt es sich um kleine hydrophobe Verbindungen, die in der Lage sind, die äußere Zellenmembran zu passieren, jedoch teilweise, ebenso wie einige ihrer Produkte, in der Plasmamembran akkumulieren (Schrewe *et al.* 2013). Dies kann zu einem Verlust der Membranintegrität führen, sodass die Funktionalität der Zelle und die Produktivität des Ganzzellbiokatalysators beeinträchtigt wird (Sikkema *et al.* 1995). Manche Mikroorganismen, wie einige Pseudomonaden, sind in der Lage, sich den toxischen Bedingungen in Anwesenheit hydrophober Substrate oder organischer Lösungsmittel anzupassen.



**Abbildung 3. Möglichkeiten und Herausforderungen in der Ganzzellbiokatalyse.** Die Bereitstellung benötigter Kofaktoren (z.B. in der durch P450 katalysierten Hydroxylierung) erfolgt über den zelleigenen Metabolismus (I) und kann zusätzlich durch weitere kofaktorregenerierende Enzyme (KOR) unterstützt werden (II). Zur Verbesserung der Substratverfügbarkeit können Löslichkeitsvermittler und Kosolvents (III) eingesetzt werden. Ein gesteigerter Stofftransfer kann durch die Destabilisierung/Permeabilisierung der Membranbarriere (IV) oder Expression von Facilitatoren (V) erreicht werden. In Ganzzellbiokatalysatoren kann die Aktivität zelleigener Enzyme zu Nebenreaktionen führen, sodass es neben dem Zielprodukt zur Bildung weiterer Produkte kommen kann (VI). Die Toxizität einiger Substrate oder Produkte kann in manchen Organismen durch einen aktiven Export verringert werden (VII), dennoch können sich toxische Effekte des Substrats oder der gebildeten Produkte auf den Zellmetabolismus oder die Membranintegrität (VIII) auswirken und somit die Funktionalität des Ganzzellbiokatalysators beeinflussen.

Hierzu gehören unter anderem eine Veränderung der Membranzusammensetzung, ein aktiver Export über Efflux-Pumpen und eine Anpassung des Energiestoffwechsels sowie eine veränderte Zellmorphologie (Ramos *et al.* 2015; Schrewe *et al.* 2013; Segura *et al.* 2012). Dies ermöglicht einerseits eine Adaption an die zelltoxische Umgebung (Heipieper *et al.* 2007), kann jedoch andererseits auch die Produktivität des Ganzzellbiokatalysators, beispielsweise aufgrund einer verringerten Substrataufnahme, beeinträchtigen.

Größere hydrophobe Substrate hingegen können die äußere Membran häufig nicht ohne weiteres überwinden, sodass ein eingeschränkter Substrattransfer zu einer geringen Produktivität des Ganzzellbiokatalysators führen kann (Cornelissen *et al.* 2013; Grant *et al.* 2011; Janocha und Bernhardt 2013). In diesen Fällen kann eine Destabilisierung oder Permeabilisierung der Membran zu einem verbesserten Stofftransfer und infolge dessen zu einer höheren Produktivität beitragen. Methoden zur Destabilisierung oder Permeabilisierung beinhalten unter anderem die Behandlung der Zellen mit organischen Lösungsmitteln, Detergenzien oder Chelat-Bildnern (Chen 2007). Nach Permeabilisierung der Zellen durch das

Peptidantibiotikum Polymyxin B konnte beispielsweise der Stofftransfer eines Diterpenoids gesteigert werden, sodass die Produktivität des *Escherichia coli*-Ganzzellbiokatalysators verbessert wurde (Janocha und Bernhardt 2013). Eine weitere Möglichkeit ist die Expression von Membranproteinen, die zu einem erleichterten Stofftransfer über die äußere Membran führen. Ein Beispiel hierfür ist AlkL, das in einem Gencluster auf dem OCT-Plasmid in *P. putida* GPo1 codiert wird, dessen Enzyme an der Metabolisierung von Alkanen beteiligt sind (van Beilen *et al.* 1992). Durch die Expression von AlkL in *E. coli*-Ganzzellbiokatalysatoren konnte die Umsetzungen von Alkanen, Fettsäuren, einem Dodecansäuremethylester und dem Monoterpene Limonen verbessert werden (Cornelissen *et al.* 2013; Julsing *et al.* 2012; Schneider *et al.* 1998). Auch in der kofaktorabhängigen Ganzzellbiokatalyse wie beispielsweise der Oxidation von Styrol zu (*S*)-Styrolepoxid zeigte sich, dass eine ausreichende und kontinuierliche Bereitstellung der benötigten Kofaktoren essentiell für die Funktionalität des Biokatalysators sein kann (Bühler *et al.* 2008). Durch die Optimierung der metabolischen Kofaktorregenerierung oder die Koexpression kofaktorregenerierender Enzyme konnte in P450- und weiteren Ganzzellbiokatalysatoren der Umsatz aufgrund einer verbesserten Kofaktorversorgung gesteigert werden (Mouri *et al.* 2006; Schewe *et al.* 2008; Siedler *et al.* 2011; Yang *et al.* 2014). Die Toxizität einiger Substrate führt oftmals zur Destabilisierung des verwendeten Ganzzellbiokatalysators. Durch die sukzessive Substratzugabe kann in diesen Fällen die Stabilität und Produktivität positiv beeinflusst werden, jedoch führt häufig erst die höhere Toxizität der gebildeten Produkte im Laufe der Reaktion zu einer Inaktivierung des Biokatalysators. Die Verwendung einer zweiten, unpolaren Phase, die als Substratreservoir dient und gleichzeitig zur *in-situ*-Produktabtrennung genutzt werden kann, kann in diesen Fällen zu einer verbesserten Produktivität und höheren Produktkonzentrationen beitragen. In *E. coli*-Ganzzellbiokatalysatoren zur Herstellung von Perillaalkohol oder 1-Octanol führte beispielsweise die Verwendung von Bis-2-ethylhexyl-phthalat (BEHP) zu einem höheren Umsatz (Cornelissen *et al.* 2011; Olaofe *et al.* 2013).

### **1.3.3. *P. putida* als Ganzzellbiokatalysator**

*Pseudomonas putida* ist ein Gram-negatives Bakterium, das zur Gattung der Pseudomonaden zählt. Pseudomonaden gehören zur Klasse der  $\gamma$ -Proteobacteria und kommen häufig in Böden und Gewässern vor. Ihr Vermögen auf endogene und exogene Stressfaktoren flexibel zu reagieren ermöglichte ihnen die Ausbreitung in unterschiedlichen Lebensräumen (Nikel *et al.* 2014b). Manche Pseudomonaden, wie *P. aeruginosa*, besitzen aufgrund der Produktion diverser Virulenzfaktoren (Balasubramanian *et al.* 2012) und ihrer Anpassungsfähigkeit in

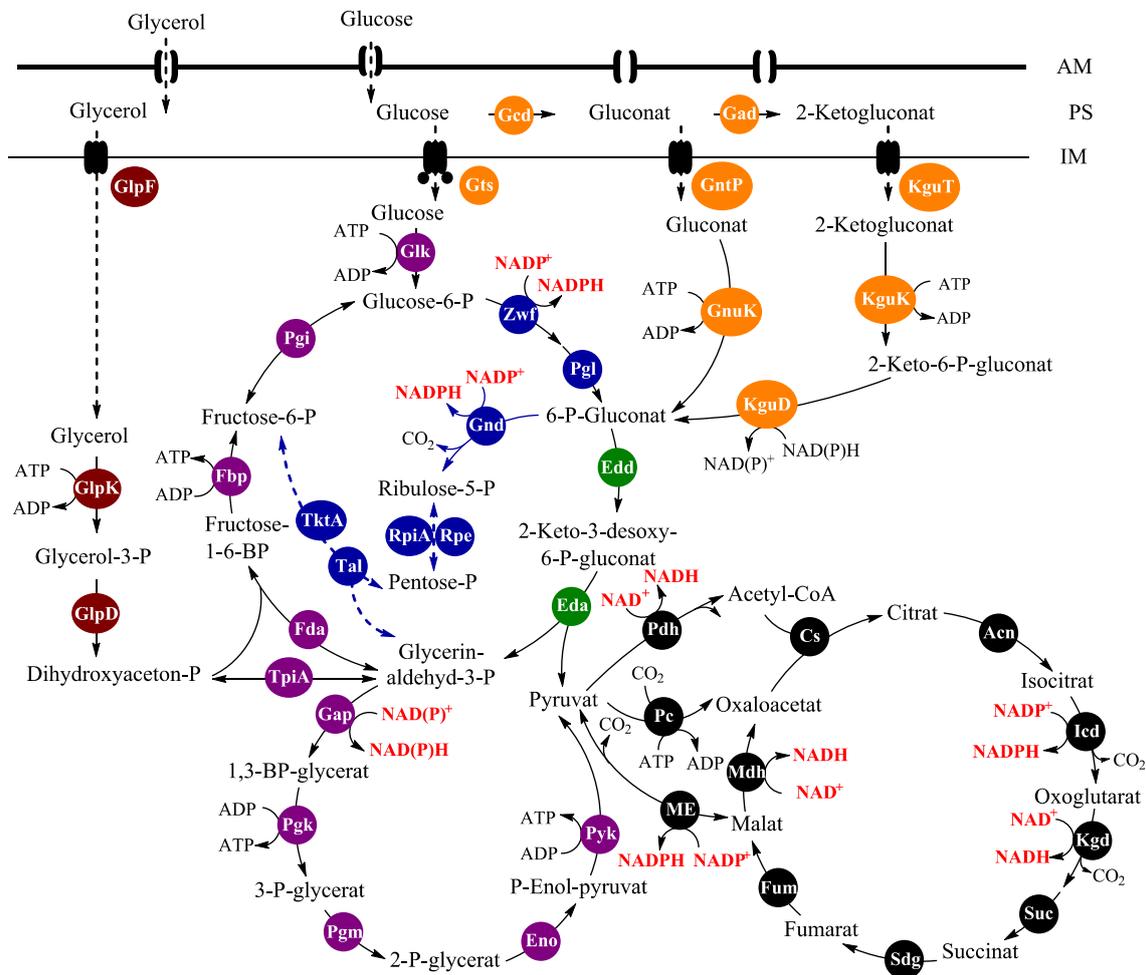
Anwesenheit von einigen Antibiotika eine Bedeutung als Pflanzen- und Tierpathogen. Ihre metabolische Vielseitigkeit aufgrund der Gegenwart komplexer Enzymsysteme macht Pseudomonaden jedoch ebenfalls für die Entwicklung von Biokatalysatoren interessant. Einige Pseudomonaden sind in der Lage, ausgehend von Terpenen, industriell relevante Duft- und Aromastoffe mit vielversprechenden Eigenschaften zu produzieren (Molina *et al.* 2013). Neben einigen Terpenoiden wurden Pseudomonas-Ganzzellbiokatalysatoren erfolgreich zur Herstellung von Rhamnolipiden, Polyketiden, nicht-ribosomalen Peptiden oder aromatischen bzw. nicht-aromatischen Naturstoffen, ausgehend von Aminosäuren, eingesetzt (Loeschcke und Thies 2015). Darüber hinaus zeigten Pseudomonaden die Fähigkeit, einen gesteigerten Energiebedarf in Anwesenheit organischer Lösungsmittel oder zelltoxischer Substrate bzw. Produkte zu kompensieren und dabei gleichzeitig Kofaktoren für biokatalytische Reaktionen bereitzustellen (Blank *et al.* 2008; Ramos *et al.* 2015). Dies macht lösungsmitteltolerante nicht-pathogene *P. putida*-Stämme höchst interessant für den Einsatz in der kofaktorabhängigen Ganzzellbiokatalyse (Poblete-Castro *et al.* 2012).

#### **1.3.4. Redox-Kofaktor Metabolismus in *P. putida***

Von zentraler Bedeutung für kofaktorabhängige Reaktionen ist die Bereitstellung der benötigten Kofaktoren NADH bzw. NADPH. *P. putida* ist in der Lage neben Zuckern wie Glucose, auch Glycerol, Fettsäuren oder aromatische Verbindungen als Energiequelle zu verwerten (Poblete-Castro *et al.* 2012). *P. putida* fehlt eine 6-Phosphofruktokinase, sodass Glucose ausgehend von 6-Phosphogluconat über den Entner-Doudoroff(ED)-Weg zu Glycerinaldehyd-3-phosphat und Pyruvat abgebaut wird (Chavarría *et al.* 2013; del Castillo *et al.* 2007; Nikel *et al.* 2015). 6-Phosphogluconat wird hierbei ausgehend von Glucose oder den Intermediaten Gluconat bzw. 2-Ketogluconat gebildet (del Castillo *et al.* 2007).

NADPH und NADH werden in *P. putida* über den ED- und Pentosephosphat(PP)-Weg sowie im Citratzyklus erzeugt (Abbildung 4). In *P. putida* ist der PP-Weg überwiegend im anabolen Stoffwechsel wachsender Zellen an der Produktion von Biomasse beteiligt, sodass im katabolen Stoffwechsel (z.B. in ruhenden Zellen) NADPH und NADH durch den ED-Weg und Citratzyklus bereitgestellt werden (Ebert *et al.* 2011; Nikel *et al.* 2015; Spaans *et al.* 2015). Das über den ED- bzw. unteren Teil des Embden-Meyerhof-Parnas(EMP)-Weg, ausgehend von 2-Keto-3-desoxy-6-P-gluconat bzw. Glycerinaldehyd-3-P gebildete Pyruvat, gelangt hierbei schließlich über Acetyl-CoA bzw. Oxaloacetat in den Citratzyklus, indem durch die Isocitratdehydrogenase und das Malat-Enzym NADPH und durch die Isocitratdehydrogenase NADH erzeugt wird. Im ED-Weg wird im Vergleich zur Glykolyse, ausgehend von Glucose,

mehr NADPH bereitgestellt. Dies ermöglicht *P. putida* eine höhere Toleranz gegenüber endogenem und exogenem oxidativen Stress wie beispielsweise der kofaktorabhängige Oxidation durch P450 (Chavarría *et al.* 2013). Glycerol wird über Dihydroxyacetonphosphat dem Zentralstoffwechsel zugeführt.

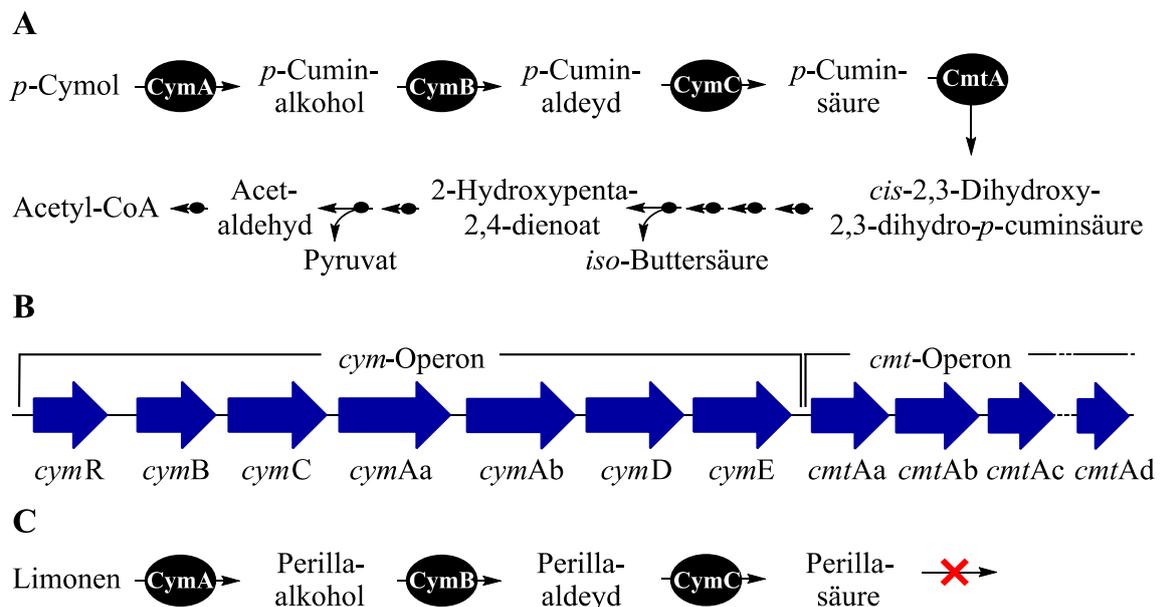


**Abbildung 4. Glycerol und Glucose-Stoffwechsel in *P. putida*.** Bereitstellung von Energie in Form von NADPH und NADH (rot) im Zentralstoffwechsel von *P. putida*. PS: Periplasma, IM: innere Membran, AM: äußere Membran. P: Phosphat, BP: Bisphosphat, Pentose-P: Ribulose-5-phosphat bzw. Xylulose-5-Phosphat. Glucose-Aufnahme-Stoffwechsel (orange): Gts: Glucose-ABC-Transporter, GntP: Gluconant-Transporter, KguT: 2-Ketogluconat-Transporter, Gcd: Glucosedehydrogenase, Gad: Gluconat-2-Dehydrogenase, GnuK: Gluconatkinase, KguK: Ketogluconatkinase, KguD: 2-Ketogluconat-6-P-Reduktase; Glycerol-Aufnahme-Stoffwechsel (rot-braun): GlpF: Glycerolfacilitator, GlpK: Glycerolkinase, GlpD: Glycerol-3-P-Dehydrogenase; PP-Weg (blau): Pgl: 6-Phosphogluconolactonase, Zwf: Glucose-6-P-1-Dehydrogenase, Gnd: 6-Phosphogluconat-dehydrogenase, RpiA: Ribose-5-P-Isomerase, Rpe: Ribose-5-3-epimerase, TktA: Transketolase, Tal: Transaldolase; ED-Weg (grün): Edd: 6-P-Gluconatdehydratase, Eda: 2-Keto-3-desoxy-6-P-gluconataldolase; EMP-Weg (lila): Glk: Glucosekinase, Gap: Glycerinaldehyd-3-P-Dehydrogenase, PgK: Phosphoglyceratkinase, Pgm: Phosphoglyceratmutase, Eno: Phosphopyruvathydratase, Pyk: Pyruvatkinase, TpiA: Triosephosphat-isomerase, Fda: Fructose-1,6-BP-Aldolase, Fbp: Fructose-6-Bisphosphatase, Pgi: Glucose-6-P-Isomerase; Citratzyklus und anaplerotische Reaktionen (schwarz): Pdh: Pyruvat-dehydrogenasekomplex, Pc: Pyruvatcarboxylase, ME: Malat-Enzym, Cs: Citratsynthese, Acn: Aconitase, Icd: Isocitratdehydrogenase, Kgd: 2-Oxoglutaratdehydrogenase, Suc: Succinat-CoA-Synthetase, Sgd: Succinat-dehydrogenase, Fum: Fumarase, Mdh: Malatdehydrogenase. Glyoxilat-shunt im Citratzyklus hier nicht dargestellt. Angepasst nach Nickel *et al.* 2015.

Die geringere Aktivität der katabolen Stoffwechselwege unter Verwendung von Glycerol führt im Vergleich zu Glucose zu einer geringeren Bereitstellung von Kofaktoren (Nikel *et al.* 2014a). Wie einige  $\gamma$ -Proteobacteria besitzt *P. putida* energieunabhängige lösliche Transhydrogenasen, die eine Umwandlung von NADH in NADPH und umgekehrt ermöglichen. Es wird angenommen, dass der hierdurch balancierte Redox-Stoffwechsel auch in kofaktorabhängigen Reaktionen zu einer höheren Stabilität und Produktivität beitragen kann (Spaans *et al.* 2015). Neben Glucose oder Glycerol können einige *P. putida*-Stämme aromatische Verbindungen wie Toluol, *p*-Xylol oder *p*-Cymol abbauen, die in Form von Acetyl-CoA, Pyruvat oder Succinat im Stoffwechsel verwertet werden (Fuchs *et al.* 2011).

### 1.3.5. Abbau von *p*-Cymol durch *P. putida* F1

*P. putida* F1 ist in der Lage *p*-Cymol, ein monozyklisches aromatisches Monoterpen, als Kohlenstoffquelle zu verwerten. Verantwortlich für den Abbau von *p*-Cymol sind die *cym*- und *cmt*-Stoffwechselwege, durch die *p*-Cymol zu *p*-Cuminsäure und anschließend zu *Iso*-Buttersäure sowie Pyruvat und Acetyl-CoA abgebaut wird (Eaton 1996, 1997).



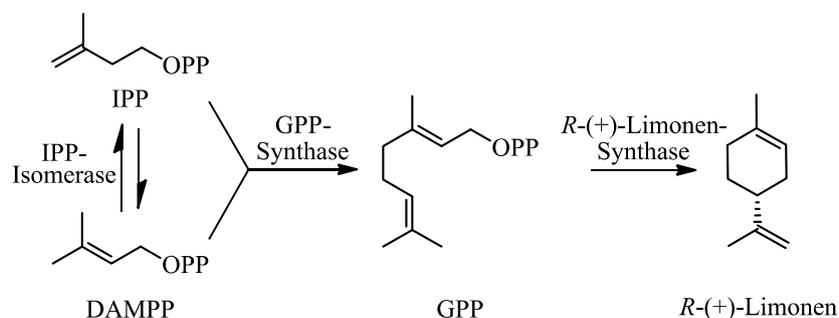
**Abbildung 5. Abbau von *p*-Cymol durch *P. putida*.** *p*-Cymol wird in *P. putida* F1 über die *cym*- und *cmt*-Stoffwechselwege über das Zwischenprodukt *p*-Cuminsäure zu *Iso*-Buttersäure, Pyruvat und Acetyl-CoA abgebaut (A). Im *cym*-Operon werden die Gene der Enzyme codiert, die an der initialen Oxidation von *p*-Cymol zu *p*-Cuminsäure beteiligt sind (B): einer Monooxygenase bestehend aus einer Hydroxylase- (*cymAa*) und einer Reduktase-Untereinheit (*cymAb*) sowie einer Alkohol- (*cymB*) und Aldehyddehydrogenase (*cymC*). Des Weiteren werden im *cym*-Operon die Gene eines Regulators (*cymR*), einer Acetyl-CoA-Synthetase (*cymE*) und eines Membranproteins (*cymD*) codiert. Dem *cym*-Operon nachgelagert befindet sich das *cmt*-Operon, indem die Gene des Schlüsselenzyms Cumatdioxygenase, bestehend aus der Ferredoxin-Reduktase- (*cmtAa*), der großen und kleinen (*cmtAb* und *cmtAc*) Dioxygenase- und einer Ferredoxin-Untereinheit (*cmtAd*), sowie die Gene aller weiteren Enzyme codiert sind, die *p*-Cuminsäure zu *iso*-Buttersäure, Pyruvat und Acetyl-CoA abbauen. Analog zu *p*-Cymol kann Limonen in *P. putida* DSM 12264 durch CymA, CymB und CymC zu Perillasäure umgesetzt werden (C).

Die Oxidation von *p*-Cymol zu *p*-Cuminsäure wird durch eine Monooxygenase (CymA) und zwei Dehydrogenasen (CymB und CymC) katalysiert (Abbildung 5 A). Ihre Gene liegen im *cym*-Operon zusammen mit den Genen eines Regulators (CymR), einer Acetyl-CoA-Synthetase (CymE) und eines Membranproteins (CymD), das Ähnlichkeit zu membranassoziierten *Facilitator*-Proteinen aufweist (Eaton 1997) (Abbildung 5 B). Neben dem Abbau von *p*-Cymol, ermöglichen CymA, CymB und CymC ebenfalls die Oxidation des strukturell ähnlichen Limonens zu Perillasäure durch *P. putida* DSM 12264 (Mars *et al.* 2001). Ausschlaggebend für die Akkumulation von Perillasäure in der Biotransformation von Limonen durch *P. putida* DSM 12264 ist die Selektivität der Cumatdioxygenase (CmtA), die dazu führt, dass Perillasäure im Gegensatz zur Cuminsäure nicht weiter abgebaut wird (Speelmans *et al.* 1998) (Abbildung 5 C). Neben aromatischen Verbindungen wie *p*-Cymol, sind einige Pseudomonaden wie *P. aeruginosa* oder *P. citronellolis* in der Lage, acylische Terpenoide wie Geraniol oder Citronellol als Kohlenstoffquelle zu verwenden (Förster-Fromme und Jendrossek 2006; Höschle und Jendrossek 2005; Marmulla und Harder 2014).

## 1.4. Limonen als interessantes Substrat in der Biokatalyse

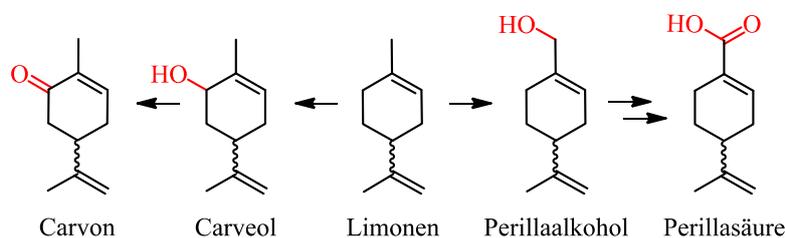
### 1.4.1. Eigenschaften, Anwendung und Biosynthese

Das Monoterpen Limonen kommt als Hauptbestandteil ätherischer Öle in der Schale von Zitrusfrüchten vor (Tranchida *et al.* 2012). Wie bei anderen Terpenen auch, erfolgt die Biosynthese von Limonen in Pflanzen ausgehend von Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP), die im Cytosol über den Mevalonatweg (MVA-Weg) oder in Plastiden über den Methylerythritolphosphatweg (MEP-Weg) bereitgestellt werden (Hemmerlin *et al.* 2012; Tholl 2015). In der Biosynthese von *R*-(+)-Limonen in Zitruspflanzen katalysiert die Geranylpyrophosphatsynthase die Kondensation von IPP und DMAPP zu Geranylpyrophosphat (GPP), das anschließend durch die *R*-(+)-Limonensynthase zu *R*-(+)-Limonen umgesetzt wird (Lange 2015) (Abbildung 6).



**Abbildung 6. Biosynthese von *R*-(+)-Limonen in Zitruspflanzen.** IPP: Isopentenylpyrophosphat, DMAPP: Dimethylallylpyrophosphat, GPP: Geranylpyrophosphat. Die Bereitstellung von IPP und DAMPP erfolgt über den Mevalonat- und Methylerythriolphosphatweg.

Von Interesse sind insbesondere die Oxidationsprodukte von Limonen wie beispielsweise Carveol und Carvon oder Perillaalkohol und Perillasäure (Abbildung 7).



**Abbildung 7. Oxidationsprodukte von Limonen.** Die regiospezifische Oxyfunktionalisierung von Limonen ist in Rot dargestellt.

Während Carveol und Carvon unter anderem als Duft- und Aromastoff in der Kosmetik- und Lebensmittelindustrie eingesetzt werden können, sind Perillaalkohol und Perillasäure vor allem aufgrund der antimikrobiellen und chemopreventiven und/oder chemotherapeutischen Wirksamkeit pharmakologisch interessante Naturstoffe (Chen *et al.* 2015; Schrader und Bohlmann 2015). Die geringe Konzentration in Pflanzengewebe führt jedoch dazu, dass Perillaalkohol, wie viele andere Terpenoide, nur in geringen Mengen durch Extraktion gewonnen werden kann. Infolgedessen stellt die Herstellung von *R*-(+)-Perillaalkohol ausgehend von *R*-(+)-Limonen, das als Abfallstoff in der zitrusverarbeitenden Industrie leicht und in hohen Mengen verfügbar ist, eine biokatalytisch höchst interessante Reaktion dar. Eine wichtige Rolle hierbei spielen mikrobielle P450 (Janocha *et al.* 2015).

#### 1.4.2. P450-katalysierte Hydroxylierung von Limonen zu Perillaalkohol

Die kontinuierliche Identifizierung neuer Terpen-hydroxylierender P450 und die Möglichkeiten des Protein-Engineerings führen zu einer stetig wachsenden Zahl an P450, die zur Hydroxylierung von Terpenen eingesetzt werden (Janocha *et al.* 2015; Schewe *et al.* 2011). Die regioselektive Hydroxylierung von *S*-(-)-Limonen zu *S*-(-)-Perillaalkohol wurde unter anderem für P450cam aus *P. putida* und CYP153A6 aus *Mycobacterium* sp. HXN-1500 beschrieben (Kim und Ortiz de Montellano 2009; van Beilen *et al.* 2005). Eine der am besten untersuchten P450 ist P450-BM3 (CYP102A1) aus *B. megaterium*, die natürlicherweise die Hydroxylierung von Fettsäuren katalysiert (Miura und Fulco 1975). Intensive Mutagenesestudien führten dazu, dass das Substratspektrum von P450-BM3 auch auf nicht-physiologische Substrate ausgeweitet werden konnte (Whitehouse *et al.* 2012). Seifert und Kollegen gelang es, eine P450-BM3-Variante (A264V/A328V/L437F) zu entwickeln, die *R*-(+)-Limonen mit einer Regioselektivität von 97% zu *R*-(+)-Perillaalkohol oxidiert (Seifert *et al.* 2011).

### 1.4.3. Ganzzellbiokatalysatoren zur selektiven Oxidation von Limonen

*P. putida* DSM 12264 kann als Ganzzellbiokatalysator zur selektiven Biotransformation von *R*-(+)-Limonen zu *R*-(+)-Perillasäure eingesetzt werden (Speelmans *et al.* 1998). Verantwortlich für die Herstellung von bis zu 3 g/l *R*-(+)-Perillasäure war die Aktivität einer Monooxygenase und zweier Dehydrogenasen, die im *cmt*-Stoffwechselweg den Abbau von *p*-Cymol katalysieren (s. Kapitel 1.3.5). In dem anschließend entwickelten Fed-Batch-Prozess konnte durch *P. putida* DSM 12264 11 g/l *R*-(+)-Perillasäure hergestellt werden; jedoch führte die Inhibierung des Zellwachstums und der biokatalytischen Aktivität durch die gebildete *R*-(+)-Perillasäure dazu, dass trotz der außergewöhnlich hohen Lösungsmitteltoleranz von *P. putida* DSM 12264 keine höheren Produktkonzentrationen erzielt werden konnten (Mars *et al.* 2001). Durch Kombination der Fed-Batch-Kultivierung mit einer *in-situ*-Produktabtrennung (ISPR) konnte schließlich die Produktion von *R*-(+)-Perillasäure auf 31 g/l nach 7 Tagen gesteigert werden (Mirata *et al.* 2009; Mirata *et al.* 2010).

Zur Biosynthese von *S*-(-)-Perillaalkohol wurde in umfangreichen Studien vor allem CYP153A6 in *E. coli*-, *P. putida* KT2440- bzw. *P. putida* GPo23-Ganzzellbiokatalysatoren eingesetzt (Cornelissen *et al.* 2011; Cornelissen *et al.* 2013; van Beilen *et al.* 2005). Dabei stellten sich die Toxizität und geringe Membrangängigkeit von *S*-(-)-Limonen sowie die Aktivität wirtintrinsic Enzyme als limitierend für die Produktion von *S*-(-)-Perillaalkohol heraus. In der optimierten Fed-Batch-Kultivierung mit einem *E. coli*-Ganzzellbiokatalysator konnten schließlich 6 g/l *S*-(-)-Perillaalkohol sowie 0,5 g/l *S*-(-)-Perillaaldehyd produziert werden (Cornelissen *et al.* 2013). Zur Biosynthese von (+)-*trans*-Carveol, ausgehend von *R*-(+)-Limonen, konnte kürzlich eine Cumin-Dioxygenase im lösemitteltoleranten *P. putida* S12-Stamm eingesetzt werden (Groeneveld *et al.* 2015).

Weitere Studien propagieren die *de-novo*-Synthese von Terpenen und Terpenoiden wie Limonen und Perillaalkohol, ausgehend von einfachen Kohlenstoffquellen wie Glycerol oder Glucose in *E. coli* (Alonso-Gutierrez *et al.* 2013; Willrodt *et al.* 2014; Willrodt *et al.* 2015a). Mit maximal 435 mg/l *S*-(-)-Limonen und 105 mg/l *S*-(-)-Perillaalkohol wurden hierbei bisher jedoch nur vergleichsweise geringe Produktkonzentrationen erzielt (Alonso-Gutierrez *et al.* 2013).

## 1.5. Synthese chiraler Alkohole

### 1.5.1. Chemische und biokatalytische Verfahren

In der chemischen Synthese werden zur Herstellung von achiralen und chiralen Alkoholen häufig Übergangsmetall-Katalysatoren mit aufwendig zu synthetisierenden Ligandensystemen eingesetzt (Landaeta und Rodríguez-Lugo 2015; Roduner *et al.* 2013). Neben dem Einsatz organischer Lösungsmittel und harschen Reaktionsbedingungen stellt häufig ihre geringe Selektivität ein Problem dar (Roduner *et al.* 2013). In biokatalytischen Verfahren wurden zur Herstellung chiraler Alkohole vor allem Oxidoreduktasen wie ADH oder Hydrolasen wie Lipasen eingesetzt (Goldberg *et al.* 2007). Während die Herstellung chiraler Alkohole mit Lipasen durch die kinetische Racematspaltung von Carbonsäureestern und mit ADHs durch die Reduktion prochiraler Ketone erfolgt, können chirale Alkohole ebenfalls mit P450 durch direkte regio- und stereoselektive Oxidation von Alkanen hergestellt werden. Die leichte Verfügbarkeit linearer Alkane macht eine Synthese von chiralen Alkoholen durch P450-katalysierte regio- und stereoselektive Hydroxylierung zu einer attraktiven und kostengünstigeren Alternative zur Reduktion prochiraler Ketone oder Verwendung reaktiverer Alkenen (Nolte und Urlacher 2015). Zudem ist die P450-katalysierte Hydroxylierung von Alkanen irreversibel, während es sich bei der ADH-katalysierten Reduktion prochiraler Ketone um eine reversible Reaktion handelt, sodass bei Vorliegen eines ungünstigen Reaktionsgleichgewichts die Bildung des chiralen Alkohols durch die ADH erschwert sein kann. Des Weiteren besitzen Ketone meist eine höhere Toxizität als Alkane. Dies kann insbesondere bei der Verwendung von Ganzzellsystemen die Stabilität des Biokatalysators beeinträchtigen.

### 1.5.2. Regio- und stereoselektive Hydroxylierung linearer Alkane

Alkane kommen in der Natur als Bestandteil von Erdöl vor. Einige Mikroorganismen sind in der Lage lineare Alkane als Kohlenstoffquelle zu verwerten (Rojo 2009), wodurch sie beispielsweise in der biologischen Bodensanierung oder Abwasserreinigung eingesetzt werden können (Gargouri *et al.* 2011; Hu *et al.* 2013; Margesin und Schinner 2001). Der erste Schritt im Rahmen des mikrobiellen Abbaus linearer Alkane ist eine terminale oder subterminale Hydroxylierung, die durch Oxidoreduktasen wie Methan-Monooxygenasen (MMOs), die AlkB-Typ-Alkan-Hydroxylase (AlkB) oder einige P450 katalysiert wird (Soussan *et al.* 2016). Während MMOs eher kurzkettige und mittelkettige Alkane hydroxylieren ( $C_1$ - $C_7$ ), können AlkB oder einige P450 zur selektiven Hydroxylierung mittel- und langkettiger Alkane ( $C_5$ - $C_{20}$ ) eingesetzt werden (Bordeaux *et al.* 2012; van Beilen und Funhoff 2007).

Fortschritte bei der Identifizierung neuer P450 und bei der gezielten Modifikation bekannter P450 führten dazu, dass in den letzten Jahren immer häufiger P450 zur regio- und stereoselektiven Hydroxylierung von linearen Alkanen eingesetzt wurden (Soussan *et al.* 2016).

### 1.5.3. P450-katalysierte Hydroxylierung linearer Alkane

Die Hydroxylierung linearer Alkane wird überwiegend durch P450 der CYP52- und der CYP153-Familie katalysiert (Nolte und Urlacher 2015). Während CYP52 die terminale Hydroxylierung eher langkettiger Alkane (C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>) katalysieren, können bakterielle CYP153 ebenfalls zur terminalen Hydroxylierung kürzerer Alkane (C<sub>5</sub>-C<sub>11</sub>) eingesetzt werden (Iida *et al.* 2000; van Beilen und Funhoff 2005, 2007). Die Möglichkeit der heterologen Expression in bakteriellen Wirten machten CYP153 zu vielversprechenden Katalysatoren für die terminale Hydroxylierung von Alkanen. So konnte CYP153A6 aus *Mycobacterium* sp. nach heterologer Expression in *P. putida* mit ihren natürlichen Redoxpartnern, einer Ferredoxin-Reduktase und einem Ferredoxin, zur terminalen Hydroxylierung linearer Alkane (C<sub>6</sub>-C<sub>11</sub>) mit einer Regioselektivität von  $\geq 95\%$  eingesetzt werden (Funhoff *et al.* 2006). Auch CYP153A16 aus *Mycobacterium marinum* und CYP153A aus *Polaromonas* sp. wurden nach heterologer Expression in *E. coli* und Reinigung zur terminalen Hydroxylierung linearer Alkane (C<sub>5</sub>-C<sub>9</sub>) mit einer Regioselektivität von 83-100% eingesetzt (Scheps *et al.* 2011). Als heterologe Redoxpartner wurden hier PdR und Pdx aus *P. putida* eingesetzt. Parallel dazu konnten durch Protein-Engineering Varianten von P450-BM3 aus *B. megaterium* (A78T/A82G/A328L) und CYP102A3 aus *B. subtilis* (S189Q/A328V) entwickelt werden, die im Vergleich zu den wildtypischen Enzymen mit 52% und 48% verstärkt die terminale Hydroxylierung von Octan katalysierten (Lentz *et al.* 2006; Meinhold *et al.* 2006). Die verbesserte Regioselektivität war jedoch Octan-spezifisch, sodass die entsprechenden Varianten nicht zur terminalen Hydroxylierung kürzerer oder längerer Alkane eingesetzt werden konnten.

Auch zur selektiven subterminalen Hydroxylierung linearer Alkane konnten P450-BM3-Varianten eingesetzt werden. Glieder und Kollegen gelang es durch 11 Punktmutationen eine P450-BM3-Variante (139-3) zu erzeugen, die Octan mit einer Regioselektivität von 66% zu 2-Octanol umsetzte. In weiterführenden Studien wurde die P450-BM3-Variante 1-12G erzeugt, die neben Octan auch weitere lineare Alkane (C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>) mit einer Regioselektivität von 76-86% zu den entsprechenden 2-Alkoholen oxidierte (Peters *et al.* 2003). P450-BM3 1-12G katalysierte die subterminale Hydroxylierung von Octan mit einer Regioselektivität von 82% an der C2-Position, wobei bevorzugt (*R*)-2-Octanol (39% *ee*) gebildet wurde. Arbeiten in unserer Gruppe zeigten, dass bereits durch das gezielte Einfügen

von zwei Punktmutationen (F87V/A328F) eine P450-BM3-Variante entwickelt werden konnte, die in der Lage war, Octan mit einer Regioselektivität von 92% zu (*R*)-2-Octanol (46% *ee*) umzusetzen (Weber *et al.* 2011). Hierbei zeigte sich, dass in der subterminalen Hydroxylierung linearer Alkane neben der Regioselektivität die Stereoselektivität eine weitere Herausforderung darstellt. Die momentan selektivste P450 zur subterminalen Hydroxylierung von Octan ist P450pyrSM1, eine Sechsfachmutante von CYP153A7 (P450pyr) aus *Sphingomonas* sp. HXN-200 (Yang *et al.* 2014). Die durch gerichtete Evolution erhaltene P450pyrSM1 katalysiert die Umsetzung von Octan zu (*S*)-2-Octanol mit einer Regioselektivität von 99% und einer exzellenten Stereoselektivität von 98% *ee*. Als bisher einzige natürliche P450, die die subterminale Hydroxylierung verschiedener linearer Alkane mit hoher Regioselektivität in Kombination mit einer hohen Stereospezifität katalysiert (C<sub>7</sub>-C<sub>10</sub>), wurde in unserer Gruppe CYP154A8 aus *Nocardia farcinica* identifiziert (von Bühler *et al.* 2013). In *in-vitro*-Systemen konnte CYP154A8 zur Herstellung chiraler (*S*)-2-Alkohole ausgehend von linearen Alkanen (C<sub>7</sub>-C<sub>10</sub>) eingesetzt werden. Ausgehend von Octan konnten bei einer Regioselektivität von 98%, 2,2 mM (*S*)-2-Octanol mit 91% *ee* produziert werden (von Bühler und Urlacher 2014). Die hohe Regio- und Stereoselektivität, gepaart mit einer hohen Produktivität in Verbindung mit heterologen Redoxpartnerproteinen, machen CYP154A8 zu einer vielversprechenden P450 für die Entwicklung von Alkan-hydroxylierenden Ganzzellbiokatalysatoren.

#### 1.5.4. P450-Ganzzellbiokatalysatoren zur Hydroxylierung von linearen Alkanen

Auch in der P450-katalysierten Hydroxylierung linearer Alkane werden infolge der Abhängigkeit von Kofaktoren und Redoxpartnerproteinen sowie der Instabilität einiger Enzyme in *in-vivo*-Systemen häufig Ganzzellbiokatalysatoren verwendet (Soussan *et al.* 2016). CYP153A aus *Acinetobacter* sp. war eine der erste P450, die nach Expression mit ihren natürlichen Redoxpartnern in *E. coli*-Ganzzellbiokatalysatoren zur terminalen Hydroxylierung von *n*-Heptan, *n*-Octan und *n*-Nonan eingesetzt wurde (Fujii *et al.* 2006). Unter Verwendung der *E. coli*-Ganzzellbiokatalysatoren gelang es Fujii und Kollegen 1,2 g/l 1-Heptanol, 2,3 g/l 1-Octanol bzw. 0,6 g/l 1-Nonanol zu produzieren. Die bisher höchsten Konzentrationen an 1-Octanol, 6,5 g/l bzw. 8,8 g/l 1-Octanol wurden durch *E. coli*-Ganzzellbiokatalysatoren mit CYP153A6 aus *Mycobacterium* sp. HXN-1500 erzielt (Gudimich *et al.* 2012; Olaofe *et al.* 2013). Dabei stellte sich heraus, dass die Löslichkeit des Substrats, die Toxizität der eingesetzten Alkane und/oder deren Hydroxylierungsprodukte sowie die ausreichende zelluläre Kofaktorversorgung einen direkten Einfluss auf die Produktivität des Ganzzellbiokatalysators haben können. In Untersuchung von bereits literaturbeschriebenen CYP153 und

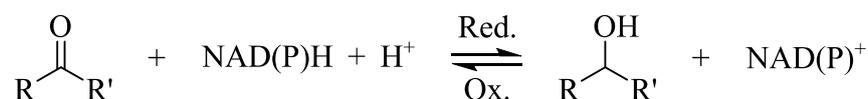
P450-BM3-Varianten mit dem Ziel, eine möglichst ideale Kombination aus Substrat und Enzym zur Umsetzung von linearen Alkanen und Cycloalkanen (C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>) zu finden, zeigten Pennecc und Kollegen, dass die Kopplungseffizienz und Stabilität der eingesetzten P450 mindestens genauso wichtig sein können wie die Löslichkeit des Substrats und die physiologischen Eigenschaften des Wirtsstamms (Pennecc *et al.* 2015).

Aufgrund der Toxizität einiger Alkane und Alkohole für *E. coli*-basierte Ganzzellbiokatalysatoren wird die Anwendung alternativer Wirtsstämme wie einige Pseudomonaden, die eine höhere Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln aufweisen, auch für die Entwicklung von Ganzzellbiokatalysatoren zur Umsetzung von Alkanen als eine vielversprechende Alternative diskutiert (Soussan *et al.* 2016). In der Oxidation von Cyclohexan zu Cyclohexanol zeigten Jelsing und Kollegen kürzlich, dass hierbei insbesondere eine Kombination aus einem leistungsfähigen Biokatalysator und einem angepassten Reaktions- oder Reaktordesigns dazu beitragen kann, kritische Faktoren wie Toxizität, Flüchtigkeit und geringe Löslichkeit zu überwinden (Karande *et al.* 2016).

## 1.6. Alkoholdehydrogenasen

### 1.6.1. Eigenschaften und Verwendung

Alkoholdehydrogenasen (ADHs) gehören ebenfalls wie P450 zur Enzymklasse der Oxidoreduktasen (EC 1.1.1.-). Sie katalysieren die reversible Reduktion von Ketonen und Aldehyden zu sekundären oder primären Alkoholen durch einen Hydridionentransfer unter Oxidation von NAD(P)H zu NAD(P)<sup>+</sup> (Schema 2).

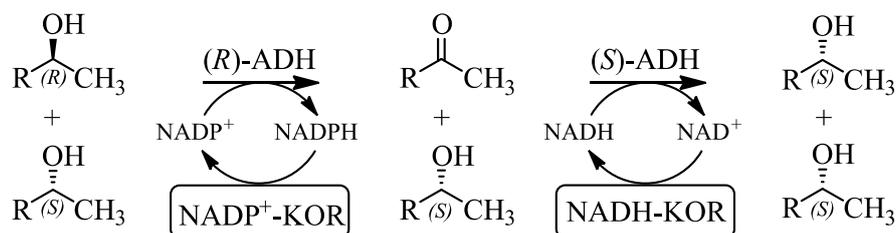


**Schema 2. Reduktion von Ketonen/Aldehyden und Oxidation von Alkoholen durch Alkoholdehydrogenasen.**

Neben einigen *R*-selektiven ADHs, beispielsweise aus *Leifsonia* sp., *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus brevis* oder *Pseudomonas fluorescens* (Hildebrandt *et al.* 2002; Hummel 1997; Inoue *et al.* 2005; Weckbecker und Hummel 2006), sind ebenfalls *S*-selektive ADHs wie beispielsweise aus *Rhodococcus erythropolis* oder *Rhodococcus ruber* bekannt (Abokitse und Hummel 2003). ADHs sind aufgrund ihrer hohen Enantioselektivität für die Synthese von chiralen Alkoholen ausgehend von prochiralen Ketonen interessant (Goldberg *et al.* 2007). Auch die umgekehrte Reaktion, die Oxidation eines sekundären Alkohols zur Synthese eines Ketons, ist möglich, jedoch aufgrund der Zerstörung des Stereozentrums oft weniger

interessant. Darüber hinaus ermöglicht die hohe Enantioselektivität den Einsatz von ADHs in der kinetischen Spaltung eines Racemats (Racematspaltung) oder eines nicht-racemischen Enantiomergemischs. Dabei wird eines der beiden Enantiomere durch die enantioselektive ADH zum Keton oxidiert, während das „gewünschte“ Enantiomer unverändert bleibt. Während in der enantioselektiven Reduktion prochiraler Ketone theoretisch eine Ausbeute von 100% erzielt werden kann, kann in der kinetischen Racematspaltung nur eine Ausbeute von maximal 50% erzielt werden. Dies führt dazu, dass die Reduktion prochiraler Ketone unter dem Gesichtspunkt der Prozessökonomie häufig die bevorzugte Synthesestrategie zur Herstellung eines enantiomerenreinen Alkohols darstellt.

Zwei enantiokomplementäre ADHs können zur Deracemisierung sekundärer Alkohole eingesetzt werden (Voss *et al.* 2008). In der Deracemisierung wird, ausgehend von einem racemischen Gemisch, eines der beiden Enantiomere zum Keton oxidiert. Aufgrund unterschiedlicher Kofaktorpräferenz der eingesetzten ADHs kann das gebildete Keton durch die enantiokomplementäre ADH zum „gewünschten“ Enantiomer reduziert und hierdurch ebenfalls eine Ausbeute von 100% erzielt werden (Abbildung 8).

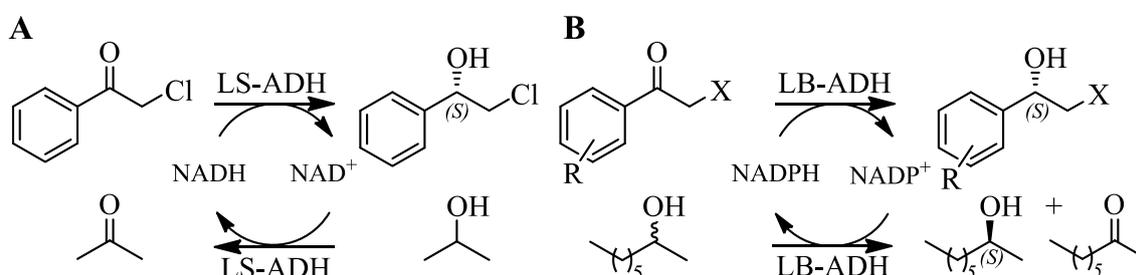


**Abbildung 8. Deracemisierung eines racemischen Gemischs durch zwei enantiokomplementäre ADHs mit unterschiedlicher Kofaktorpräferenz.** NADP<sup>+</sup>-KOR: System zur Regenerierung des durch die (R)-selektive ADH benötigten NADP<sup>+</sup>-Kofaktors; NADH-KOR: System zur Regenerierung des durch die (S)-selektive ADH benötigten NADH-Kofaktors. Angepasst nach García-Urdiales *et al.* 2012.

Die in dieser Arbeit eingesetzte *R*-selektive ADH aus *Lactobacillus brevis* (LB-ADH) zählt zu den kurzkettigen Alkoholdehydrogenasen, ist NADPH-abhängig und benötigt Mg<sup>2+</sup>-Ionen zum Erhalt der Enzymaktivität (Hummel 1997; Niefind *et al.* 2003). Des Weiteren wurde in dieser Arbeit die *S*-selektive ADH aus *Rhodococcus erythropolis* (RE-ADH) verwendet. Sie gehört zu den mittelkettigen, Zink-abhängigen Alkoholdehydrogenasen und benötigt NADH als Kofaktor (Abokitse und Hummel 2003; Hummel 1997). Neben den kurz- und mittelkettigen Alkoholdehydrogenasen gibt es ebenfalls langkettige, Eisen-abhängige Alkoholdehydrogenasen.

### 1.6.2. Einsatz von ADH- und P450-ADH-Systemen in der Biokatalyse

In der organischen Synthese wurden ADHs sowohl zur Synthese chiraler Alkohole ausgehend von prochiralen Ketonen als auch zur Synthese von Aldehyden und Ketonen eingesetzt (Hollmann *et al.* 2011b; Hollmann *et al.* 2011a). Halogenierte chirale Alkohole wie (*S*)-2-Chloro-1-phenylethanol sind als Baustein zur Synthese pharmakologisch relevanter Verbindungen interessant. Zur enantioselektiven Reduktion von (*S*)-2-Chloro-1-phenylethanol ausgehend von  $\omega$ -Chloracetophenon konnte die LS-ADH aus *Leifsonia* sp. eingesetzt werden (Abbildung 9 A). Die Verwendung der LS-ADH in einem *E. coli*-Ganzzellbiokatalysator ermöglichte die Herstellung von 144 g/l (*S*)-2-Chloro-1-phenylethanol (Inoue *et al.* 2005; Itoh *et al.* 2012). Im *E. coli*-Ganzzellbiokatalysator erfolgte die Bereitstellung des NADH sowohl über die gekoppelte Oxidation von Isopropanol zu Aceton als auch über den Zellmetabolismus. Bisogno und Kollegen setzten zur Herstellung von weiteren halogenierten chiralen Alkoholen sowohl die LB-ADH als auch ADH-A aus *R. ruber* ein (Bisogno *et al.* 2009). Durch die Kombination aus einer enantioselektiven Reduktion des halogenierten Ketons mit einer Racematspaltung gelang es ihnen, die gleichzeitige Synthese von zwei chiralen Alkoholen zu ermöglichen. Neben halogenierten chiralen Alkoholen konnte so enantiomerenreines (*S*)-2-Octanol produziert werden (Abbildung 9 B).

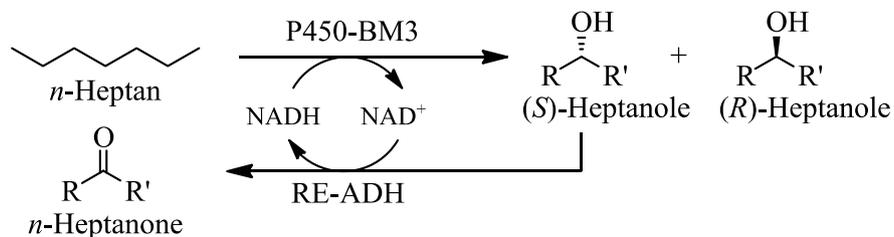


**Abbildung 9.** Herstellung von (*S*)-2-Chloro-1-phenylethanol (A) sowie weiteren halogenierten chiralen Alkoholen und (*S*)-2-Octanol (B) durch gekoppelte Oxidations-Reduktions-Reaktion mit ADH-Systemen.

Neben vielen weiteren chiralen Alkoholen konnten (*S*)-2-Octanol bzw. (*R*)-2-Octanol ebenfalls durch die enantioselektive Reduktion von 2-Octanon mit RE-ADH bzw. LB-ADH hergestellt werden (Hummel *et al.* 2003; Leuchs und Greiner 2011). Kohlmann und Kollegen gelang es durch den Einsatz der LB-ADH in einem Membranreaktor in Kombination mit einer Festphasenextraktion 9,4 g/l pro Tag (*R*)-2-Octanol zu produzieren (Kohlmann *et al.* 2011).

Auch die Deracemisierung durch zwei enantiokomplementäre ADHs mit unterschiedlicher Kofaktorpräferenz konnte zur Herstellung enantiomerenreiner Alkohole eingesetzt werden. Paul und Kollegen gelang es hierbei einen *E. coli*-Ganzzellbiokatalysatoren mit der ADH-A aus *R. ruber* in Kombination mit der LB-ADH aus *L. brevis* einzusetzen (Paul *et al.* 2013).

Des Weiteren können ADHs in Kombination mit P450 zur Herstellung von Ketonen ausgehend von inerten Alkanen angewendet werden. Müller und Kollegen entwickelten beispielsweise eine *in vitro* P450-ADH-Kaskade zur Oxidation von Heptan zu Heptanonen (Müller *et al.* 2013). Dabei katalysiert eine sowohl NADH- als auch NADPH-abhängige P450-BM3-Variante die Hydroxylierung des Heptans zu (*S/R*)-Heptanolen (1-, 2-, 3- oder 4-Heptanol). In einem gekoppelten Oxidationsschritt wird dabei durch die Verwendung der *S*-selektiven und NAD(H)-abhängigen RE-ADH das in der P450-katalysierten Oxidation entstandene NAD<sup>+</sup> zur Oxidation der gebildeten (*S*)-Heptanole zu Heptanonen verwendet. Gleichzeitig wird der für die P450-Reaktion benötigte NADH-Kofaktor regeneriert (Abbildung 10). Neben den Heptanolen wurden ebenfalls enantiomerenreine (*R*)-Heptanole erhalten. In nachfolgenden Studien verwendeten Müller und Kollegen P450-ADH-Kaskaden in Ganzzellbiokatalysatoren. Unter optimierten Bedingungen konnten durch den *E. coli*-Ganzzellbiokatalysator 5,7 mM Heptanone und (*R*)-Heptanole gebildet werden (Müller *et al.* 2014). Die Verwendung der LB-ADH anstelle der RE-ADH ermöglichte die Herstellung von Heptanonem und einer geringen Menge an (*S*)-Heptanolen. Durch die Koexpression der NAD(P)H-abhängigen P450-BM3-Variante mit RE-ADH und LB-ADH in *E. coli* konnten die gebildeten (*S/R*)-Heptanole vollständig zu den entsprechenden Heptanonem umgesetzt werden (Müller *et al.* 2014).



**Abbildung 10. P450-ADH-Kaskade zur Herstellung von Heptanonem und (*R*)-Heptanolen.** Eingesetzt wurde eine NADH-abhängige P450-BM3-Variante zur Oxidation von Heptan. Die NAD(H)-abhängige RE-ADH katalysiert die enantioselektive Oxidation der gebildeten *S*-Heptanole zu den entsprechenden Heptanonem unter Regenerierung von NADH (Müller *et al.* 2014).

## 1.7. Zielsetzung

Einige *P. putida*-Stämme sind aufgrund ihrer hohen Robustheit gegenüber organischen Lösungsmitteln interessante Kandidaten für die Entwicklung von Ganzzellbiokatalysatoren.

In der vorliegenden Dissertation sollten *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren zur P450-katalysierten Synthese oxyfunktionalisierter Moleküle eingesetzt werden.

Dabei sollte die Eignung von *P. putida* DSM 12264 als Wirt für die P450-basierte Ganzzellbiokatalyse unter Verwendung verschiedener Substratgruppen und bakterieller P450-Systeme untersucht werden. Als Substrate sollten das monocyclischen Monoterpen *R*-(+)-Limonen, das bicyclische Monoterpenoid (+)-Campher und die linearen Alkane Heptan, Octan und Nonan eingesetzt werden. Zur Entwicklung und Anwendung der entsprechenden *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren sollten folgende Arbeitsschritte durchgeführt werden.

- (1) Entwicklung und Etablierung eines modular einsetzbaren Baukastens, der auf der Basis kompatibler Expressionsplasmide die Koexpression von P450 mit weiteren Enzymen in *P. putida* ermöglicht.
- (2) Entwicklung und Optimierung eines *P. putida*-Ganzzellbiokatalysators zur selektiven Oxidation von *R*-(+)-Limonen zu *R*-(+)-Perillaalkohol unter Verwendung einer selektiven P450-BM3-Variante. In diesem Zusammenhang sollte ein Knockoutstamm von *P. putida* DSM 12264 erzeugt werden, der keine Aktivität gegenüber *R*-(+)-Limonen aufweist.
- (3) Entwicklung und Optimierung eines *P. putida*-Ganzzellbiokatalysators zur P450cam-katalysierten Umsetzung von (+)-Campher zu 5-*exo*-Hydroxycampher.
- (4) Entwicklung und Optimierung eines *P. putida*-Ganzzellbiokatalysators zur CYP154A8-katalysierten regio- und stereoselektiven Hydroxylierung linearer Alkane zu chiralen Alkoholen. In weiterführenden Studien sollten hierbei P450-ADH-Kaskaden entwickelt werden, die die Herstellung enantiomerenreiner Alkohole bzw. Ketone durch den *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator ermöglichen.

Über die Diversität der verwendeten Substrate und P450-Systeme sollte die Vielseitigkeit des *P. putida*-Ganzzellbiokatalysators untersucht werden. Die Auswertung der auftretenden Limitierungen und der eingesetzten Optimierungsstrategien sollten Aufschluss über die Eignung lösungsmitteltoleranter *P. putida*-Stämme als Ganzzellbiokatalysatoren für die P450-katalysierte Oxidation ermöglichen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Chemikalien, Puffer und Enzyme

Alle Chemikalien, Puffer und Enzyme wurden, sofern nicht anders angegeben, von AppliChem, Carl Roth, New England Biolabs, Sigma-Aldrich, Thermo Scientific, VWR, oder Merck bezogen. Die zur Umsetzung und Analyse eingesetzten Chemikalien wurden in hoher Reinheit (>99%) verwendet.

### 2.2. Oligonukleotide, Plasmide und Bakterienstämme

**Tabelle 1.** Übersicht der zur Amplifikation von DNA verwendeten Oligonukleotide (Primer). Die eingesetzten Oligonukleotide wurden über die Firma MWG-Biotech bezogen.

Abk.	Name	Sequenz (5'-3')
<b>Assemblierungsprimer</b>		
A1	up-cym-F	TTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTC TGTGACTGGTGGAGTCCAGCCGTAGCCCACGATCGC C
A2	up-cym-Gm-R	CTCCCTGCGTCCGCTGATGGCCGGCAGCAGCCCGT CGTTGCCTGATGGATGGACGGAGGTACCGTCCCTG CG
A3	dw-cym-Gm-F	GCTGGCCGTGCATTTGTACGGCTCCGCAGTGGATG GCGGCCTGAAGCCATAGAGGTACGGCTCTGCTAGC TCG
A4	dw-cym-R	CCAATAACTGCCTTAAAAAATTACGCCCCGCCCT GCCACTCATCGCAGTACCGTCATCCAAGACGATGC TGTG
A5	Gm-F	CCTAGCACACGGAGTGGGTCTCGTGCCTCGCAGGG ACGGTACCTCCGTCCATCCATCAGGCAACGACGGG CTGC
A6	Gm-R	GATTTACAACCGGATCCCTCACTAATTTGAGCTA GCAGAGCCGTACCTCTATGGCTTCAGGCCGCCATC CAC
A7	cymD-F	GGTCGTAATGAACAATTCTTAAGAGTACTTTTGG AGGAGATATATCTAGAATGAAAAACAATATAC AGCTTAAGTGCC
A8	cymD-R	GGAGTCCAAGACTAGTCCGTTTAAACCTAGAACT CTTGGTATAGGAAATCG
A9	AlkL-F	GGTCGTAATGAACAATTCTTAAGAGTACTTTTGGG TTTAAGGAGATATATCTAGAATGAATCCGCCTATC CTGAAAAAACTG

Fortsetzung der Tabelle 1

<b>Abk.</b>	<b>Name</b>	<b>Sequenz (5'-3')</b>
A10	AlkL-R	CAACAGGAGTCCAAGACTAGTCCGTTTAACTTAG AATTTATAGCTGGCACCCAGG
A11	GDH-F	GGTCGTAATGAACAATTCTTAAGAGTACTTTTGGG TTTAAGGAGATATACTCGAGATGTATACAGATTTA AAAGATAAAGTAGTAGTTG
A12	GDH-R	GGCGGATTCATTCTAGATATATCTCCTTGGTACCG AGCTCTAACCTCTTCCCGCTTGGAAAG
A13	GLF-F	GGTACCGTCGACAAGGAGATATATCTAGAATGAGT TCTGAAAGTAGTCAGGGTCTAG
A14	GLF-R	CTATCAACAGGAGTCCAAGACTAGTCCGTTTGAGC TCGTGACCTACTTCTGGGAGCGCCACATC
A15	GldA-F	GGTCGTAATGAACAATTCTTAAGAGTACTTTTGGG TTTAAGGAGATATATCTAGAATGGACCGCATTATT CAATCACC
A16	GldA-R	CAACAGGAGTCCAAGACTAGTCCGTTTAACTTAT TCCCCTCTTGCAGGAAAC
A17	RE-F	CTGGTCGTAATGAACAATTCTTAAGAGTACTTTTG GGTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAGGCAATCC AGTACACGAGAATCG
A18	RE-R	CATTACTGGATCTATCAACAGGAGTCCAAGACTAG TCCGTTTAACTTACAGACCAGGGACCACAACCGC ACG
A19	LB-F	CTGGTCGTAATGAACAATTCTTAAGAGTACTTTTG GGTTTAAGAAGGAGATATAGATATGTCTAACCGTT TGGATGGTAAGGTAGC
A20	LB-R	CATTACTGGATCTATCAACAGGAGTCCAAGACTAG TCCGTTTAACTCATTGAGCAGTGTAGCCACCGTC AACTAC
A21	A8-F	CTGGTCGTAATGAACAATTCTTAAGAGTACTTTTG GGTTTAAGAAGGAGATATACATATGGAGTCAACCC AGATGCCGCTCGTG
A22	A8camAB-R	CACTACTTTAGACATAAAGACCTCCTATAAACTAGT GAATTCCTACTCCGCCGTCAGGTACACCGGCAG
A23	A8YF-R	CATATGTAATCAAGGCTTTAGCCATGGAAGACCTC CTATAAACTAGTGAATTCCTACTCCGCCGTCAGGT ACACCGGCAG
A24	YF-F	GAATTCCTAGTTTATAGGAGGTCTTCCATGGCTA AAGCCTTGATTACATATG

Fortsetzung der Tabelle 1

<b>Abk.</b>	<b>Name</b>	<b>Sequenz (5'-3')</b>
A25	YF-R	CACTGCTTCCGGTAGTCAATAAACCGGTAAGCTTG GGGTTTCTCGAGGAGCTCGGATCCTTACCAGTAAT GCTCCGCTG
A26	camAB-F	GAATTCAGTATTTATAGGAGGTCTTATGTCTAAA GTAG
A27	camAB-R	CACTGCTTCCGGTAGTCAATAAACCGGTAAGCTTG GGGTTTGAATTCGAGCTCATGTTTGACAGCTTATTC TAG
<b>Amplifizierungsprimer</b>		
B1	cym-Gm-F	CGTAGCCCACGATCGCCACATTTCC
B2	cym-Gm-R	TCCAAGACGATGCTGTGCGCCTGAG
B3	cym-check-F	CGTTTGTGCTGCTCGCAGAGCTAC
B4	cym-check-R	CAAGCTGGCGACCGTCATCCAAG
B5	GmR-check-F	GGCTTACGTTCTGCCAGGTTTGAG
B6	cym-F	GATACTCCAGATCAGCCGATCAGTG
B7	cym-R	GCCCGATCCAGATAAGCGGAAACC
B8	rhaRSP-F	TGCATGCATGCAAAAAGTACTTTTTTAATCTTTCTG CGAATTGAGATGACGCCAC
B9	rhaRSP-R	CCCAAGCTTGGGGTTTAAACCCAAAAGTACTCTTA AGAATTGTTTCATTACGACCAGTCTAAAAAGC
B10	rhaRSP2-F	CCTTAATTAAGGAGTACTTTTTTAATCTTTCTGCGA ATTGAGATGACGCCAC
B11	rhaRSP2-R	GGACTAGTCCGTTTAAACCCAAAAGTACTCTTAAG AATTGTTTCATTACGACCAGTCTAAAAAGC
B12	XbaI-BM3-F	CCAGTCTAGAATGACAATTAAGAAATGC
B13	BsrGI-BM3-R	CAGTGTGTACATTACCCAGCCCACAC
B14	NdeI-Cam-F	GACGAGCTCCATATGACGACTGAAACC
B15	SacI-Cam-R	TTTGAGCTCATGTTTGACAGCTTATTCTAGACTGCA TTCAGG
<b>Punktmutationsprimer</b>		
P1	BM3-A264V-F	CAAATTATTACATTCTTAATTGTGGGACACGAAAC ACAAG
P2	BM3-A264V-R	CTTGTTGTTTCGTGTCCCACAATTAAGAATGTAATA ATTTG

Fortsetzung der Tabelle 1

Abk.	Name	Sequenz (5'-3')
P3	BM3-A328V-F	GCTGCGCTTATGGCCAACCTGTTTCCTGCGTTTTCCCT ATATGC
P4	BM3-A328V-R	GCATATAGGGAAAACGCAGGAACAGTTGGCCATA AGCGCAGC
P5	BM3-L437-F	GCTGGATATTAAGAACTTTTACGTTAAAACCTG AAGGC
P6	BM3-L437-R	GCCTTCAGGTTTTAACGTAAAAGTTTCTTTAATATC CAGC
P7	BM3-I401P-F	GTCAGCGTGCGTGTCCCGGTCAGCAGTTCGC
P8	BM3-I401P-R	GCGAACTGCTGACCGGGACACGCACGCTGAC
Sequenzierungsprimer		
S1	Del-cym-s1	GGTAGGTCAGCACATTCAG
S2	Del-cym-s2	CCATACTTGAGCCACCTAAC
S3	Del-cym-s3	GATATCGACCCAAGTACCG
S4	Del-cym-s4	CCAACGATCGCTAGTGAC

Tabelle 2. Übersicht der verwendeten Plasmide.

Plasmid	relevante Eigenschaften	Resistenz	Referenz/Quelle
p4782.1	pBR322, <i>rhaR rhaS</i> <i>rhaP<sub>BAD</sub>, mob, egfp, malE</i>	Km <sup>R</sup>	AG Altenbuchner
p4782.1 BM3	p4782.1 :: <i>bm3</i>		aus dem Institut
p4782.1 BM3-VVF	p4782.1 :: <i>bm3-VVF</i>	Km <sup>R</sup>	diese Arbeit
p4782.1 BM3-VVPF	p4782.1 :: <i>bm3-VVPF</i>	Km <sup>R</sup>	diese Arbeit
p4782.1 P450camPP	p4782.1 :: <i>p450cam, pdx,</i> <i>pdr</i>	Km <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET28a(+)	pBR322, T7lac	Km <sup>R</sup>	Novagen
pET28a(+) BM3	pET28a(+) :: <i>bm3</i>	Km <sup>R</sup>	(Weber <i>et al.</i> 2011)
pET28a(+) BM3-VVF	pET28a(+) :: <i>bm3-VVF</i>	Km <sup>R</sup>	diese Arbeit
pJeM1	pBR322, <i>rhaR, rhaS</i> <i>rhaP<sub>BAD</sub>, egfp, mob</i>	Km <sup>R</sup>	(Jeske und Altenbuchner 2010)
pJeM1-a	pBR322, <i>rhaR, rhaS</i> <i>rhaP<sub>BAD</sub>, mob</i>	Km <sup>R</sup>	diese Arbeit
pJeM1-a A8PP	pJeM1-a :: <i>cyp154A8</i> <i>camAB</i>	Km <sup>R</sup>	diese Arbeit

Fortsetzung der Tabelle 2

<b>Plasmid</b>	<b>relevante Eigenschaften</b>	<b>Resistenz</b>	<b>Referenz/Quelle</b>
pJeM1-a A8YF	pJeM1-a :: <i>cyp154A8</i> <i>ykuN fdr</i>	Km <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSEVA247C	pRO1600/ColE1, <i>cfp</i>	Km <sup>R</sup>	(Silva-Rocha <i>et al.</i> 2013)
pSEVA438	pBBR1, <i>xyIS-Pm</i>	Sm <sup>R</sup> /Sp <sup>R</sup>	(Silva-Rocha <i>et al.</i> 2013)
pSEVA44rha	pRO1600/ColE1, <i>rhaR</i> <i>rhaS</i> rhaP <sub>BAD</sub>	Sm <sup>R</sup> /Sp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSEVA44rha LB	pSEVA44rha :: <i>lb-adh</i>	Sm <sup>R</sup> /Sp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSEVA44rha RE	pSEVA44rha :: <i>re-adh</i>	Sm <sup>R</sup> /Sp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSEVA227R	RK2, <i>mcherry</i>	Km <sup>R</sup>	(Silva-Rocha <i>et al.</i> 2013)
pSEVA42rha	RK2, <i>rhaR</i> , <i>rhaS</i> , rhaP <sub>BAD</sub>	Sm <sup>R</sup> /Sp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSEVA42rha GDH-GLF	pSEVA42rha :: <i>gdh</i> , <i>glf</i>	Sm <sup>R</sup> /Sp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSEVA42rha GDH	pSEVA42rha :: <i>gdh</i>	Sm <sup>R</sup> /Sp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSEVA42rha GldA	pSEVA42rha :: <i>gldA</i>	Sm <sup>R</sup> /Sp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSEVA42rha AlkL	pSEVA42rha :: <i>alkL</i>	Sm <sup>R</sup> /Sp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pSEVA42rha CymD	pSEVA42rha :: <i>cymD</i>	Sm <sup>R</sup> /Sp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pCOLA YkuN-FdR	ColA, <i>T7lac</i> , <i>ykuN fdr</i> (MCS-1)	Km <sup>R</sup>	(Hernández-Martín <i>et al.</i> 2014)
pET-154A8	pBR322, <i>T7lac</i> , <i>cyp154A8</i>	Km <sup>R</sup>	(von Bühler <i>et al.</i> 2013)
pT7NS camAB	pBR322, <i>T7lac</i> , <i>camAB</i>	Ap <sup>R</sup>	(Girhard <i>et al.</i> 2009)
pETDuet-1 GDH	ColE1, <i>T7lac</i> , <i>gdh</i>	Ap <sup>R</sup>	DFI
pZY507 GLF	p15A, <i>P<sub>lac</sub></i> , <i>lacI</i> , <i>glf</i>	Cm <sup>R</sup>	DFI, (Weisser <i>et al.</i> 1995)
pWKR202 Gm	Cm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup>		(Drepper 2003)
pSUP202	pBR325, <i>mob</i>	Ap <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	(Simon <i>et al.</i> 1983)
pSUP202 Δcym::aac	pSUP202 :: Δcym::aac	Gm <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup>	diese Arbeit
pUCPK18-RedS	<i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i> , <i>araC</i> , <i>sacB</i>	Ap <sup>R</sup>	(Lesic und Rahme 2008)
pCWOri/101:Pdx:PdR	<i>p450cam</i> , <i>pdx</i> , <i>pdr</i>	Km <sup>R</sup>	(Kim und Ortiz de Montellano 2009)

Tabelle 3. Übersicht der verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>P. putida</i> DSM 12264	Wildtyp	DMSZ
<i>P. putida</i> DSM 12264 $\Delta$ cym:: <i>aac</i>	$\Delta$ cym:: <i>aac</i>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sub>k-</sub> , m <sub>k+</sub> ) <i>gal<sup>-</sup> phoA</i> <i>supE44</i> $\lambda$ <i>thi<sup>-1</sup> gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B-</sub> , m <sub>B-</sub> ) <i>gal dcm</i> (DE3)	Invitrogen
<i>E. coli</i> JM109	<i>endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17</i> (r <sub>k-</sub> , m <sub>k+</sub> ) <i>relA1 supE44</i> $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ) [F' <i>traD36</i> <i>proAB lacI<sup>q</sup>Z</i> $\Delta$ M15]	Promega

Tabelle 4. Übersicht der erzeugten Ganzzellbiokatalysatoren.

Abk.	Eigenschaften
BM3-VVF	<i>P. putida</i> $\Delta$ cym p4782.1 BM3-VVF
BM3-VVFP	<i>P. putida</i> $\Delta$ cym p4782.1 BM3-VVFP
BM3-VVF*	<i>P. putida</i> $\Delta$ cym p4782.1 BM3-VVF pSEVA42rha
BM3-VVF/CymD	<i>P. putida</i> $\Delta$ cym p4782.1 BM3-VVF pSEVA42rha CymD
BM3-VVF/AlkL	<i>P. putida</i> $\Delta$ cym p4782.1 BM3-VVF pSEVA42rha AlkL
BM3-VVF/GDH	<i>P. putida</i> $\Delta$ cym p4782.1 BM3-VVF pSEVA42rha GDH
BM3-VVF/GDH/GLF	<i>P. putida</i> $\Delta$ cym p4782.1 BM3-VVF pSEVA42rha GDH/GLF
P450camPP	<i>P. putida</i> DSM 12264 p4782.1 P450camPP
P450camPP*	<i>P. putida</i> DSM 12264 p4782.1 P450camPP pSEVA42rha
P450camPP/GldA	<i>P. putida</i> DSM 12264 p4782.1 P450camPP pSEVA42rha GldA
P450camPP/GDH	<i>P. putida</i> DSM 12264 p4782.1 P450camPP pSEVA42rha GDH
P450camPP/GDH/GLF	<i>P. putida</i> DSM 12264 p4782.1 P450camPP pSEVA42rha GDH/GLF
A8PP ( <i>P. putida</i> )	<i>P. putida</i> DSM 12264 pJeM1-a A8PP
A8PP*	<i>P. putida</i> DSM 12264 pJeM1-a A8PP pSEVA42rha
A8PP/GDH	<i>P. putida</i> DSM 12264 pJeM1-a A8PP pSEVA42rha GDH
A8PP*	<i>P. putida</i> DSM 12264 pJeM1-a A8PP pSEVA44rha
A8PP/LB	<i>P. putida</i> DSM 12264 pJeM1-a A8PP pSEVA44rha LB
A8YF*	<i>P. putida</i> DSM 12264 pJeM1-a A8YF pSEVA44rha
A8YF/LB	<i>P. putida</i> DSM 12264 pJeM1-a A8YF pSEVA44rha LB
A8PP/RE	<i>P. putida</i> DSM 12264 pJeM1-a A8PP pSEVA44rha RE
A8PP ( <i>E. coli</i> )	<i>E. coli</i> JM109 pJeM1-a A8PP

\*Die Information über das in einem Ganzzellbiokatalysator zusätzlich vorliegende Leerplasmid wird in der Abbildungs- oder Tabellenbeschriftung gegeben.

## 2.3. Medien, Puffer und Lösungen

### 2.3.1. Medien

Alle Medien, die zur Kultivierung von Bakterienstämmen verwendet wurden, wurden vor ihrer Verwendung autoklaviert oder steril filtriert. Zur Selektion auf Antibiotikaresistenz wurde ein entsprechendes Antibiotikum zugesetzt (Tabelle 5).

**Tabelle 5. Verwendete Antibiotikakonzentrationen in Fest- und Flüssigmedien.**

Antibiotikum	Konzentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	<i>E. coli</i>	<i>P. putida</i>
Ampicillin	100	-
Chloramphenicol	10	25
Gentamycin	25	25
Kanamycin	30	30
Streptomycin	100	200
Tetracyclin	34	-

#### LB (Luria-Bertani)-Medium (Bertani 1951)

NaCl	3,5 g
Pepton	7,0 g
Hefeextrakt	3,5 g

ad 700 ml mit ddH<sub>2</sub>O

Zur Herstellung von LB-Festmedium wurden zusätzlich 11,2 g Agar pro 700 ml zugesetzt.

#### TB (Terrific Broth)-Medium

Pepton	12,0 g
Hefeextrakt	24,0 g
Glycerol (87%)	4,0 ml

ad 900 ml mit ddH<sub>2</sub>O

Nach dem Autoklavieren erfolgte die Zugabe von 100 ml autoklaviertem Phosphatpuffer (10x), pH 7,0.

#### Phosphatpuffer (10x), pH 7,0

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	23,6 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	164,3 g

ad 1000 ml mit ddH<sub>2</sub>O

#### 2YT-Medium

Hefeextrakt	10 g
Pepton	16 g
NaCl	5 g

ad 1000 ml mit ddH<sub>2</sub>O, pH 7,0

Zur Herstellung von 2YT-Festmedium wurde zusätzlich 16 g Agar pro 1000 ml zugesetzt.

**E2-Medium**

NH <sub>4</sub> Cl	0,91 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	7,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,7 g
Glycerol	4,6 g
*MgSO <sub>4</sub> (100 mM)	10 ml/l
*MT	1 ml/l

ad 1000 ml mit ddH<sub>2</sub>O

\*MT Spurenelement-Lösung und MgSO<sub>4</sub>-Lösung wurden dem E2-Medium nach dem Autoklavieren zugegeben. Zur Herstellung von E2-Festmedium wurden 11,2 g Agar pro 700 ml zugesetzt.

**MT Spurenelement-Lösung (MT)**

FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2,78 g
CoSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2,81 g
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,29 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,47 g
CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,17 g
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1,98 g
ad 1000 ml 1 M HCl	

**2.3.2. Puffer und Lösungen****TfbI-Puffer**

Kaliumacetat	0,59 g
RbCl	2,42 g
CaCl <sub>2</sub>	0,29 g
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	2,0 g
Glycerol (87%)	30 ml
ad 200 ml mit ddH <sub>2</sub> O, pH 5,8 mit Essigsäure	

**TfbII-Puffer**

MOPS	0,21 g
RbCl	0,12 g
CaCl <sub>2</sub>	1,10 g
Glycerol (87%)	15 ml
ad 100 ml mit ddH <sub>2</sub> O, pH 6,5 mit NaOH	

**TAE-Puffer (50x)**

EDTA (0,5 M, pH 8,0)	100 ml
Essigsäure	57,1 ml
Tris	242 g
ad 1000 ml mit ddH <sub>2</sub> O	

**DNA-Probenpuffer**

Saccharose	2,0 g
Orange G	10 mg
ad 5 ml ddH <sub>2</sub> O	

**Färbelösung**

Methanol	300 ml
Essigsäure	100 ml
Coomassie Brilliant Blue	2,5 g
ad 1000 ml mit ddH <sub>2</sub> O	

**Entfärbelösung**

Methanol	300 ml
Essigsäure	100 ml
ad 1000 ml mit ddH <sub>2</sub> O	

**Lower-Tris-Puffer**

Tris	36,5 g
SDS	0,8 g
ad 200 ml mit ddH <sub>2</sub> O, pH 8,5 mit HCl	

**Upper-Tris-Puffer**

Tris	6,0 g
SDS	0,4 g
ad 100 ml mit ddH <sub>2</sub> O, pH 6,8 mit HCl	

**Trenngel (12,5%)**

Lower-Tris-Puffer	2,00 ml
ddH <sub>2</sub> O	2,67 ml
Rotiphorese Gel 30	3,33 ml
10% APS in ddH <sub>2</sub> O	40 µl
TEMED	4 µl

**Sammelgel (4%)**

Upper-Tris-Puffer	1,00 ml
ddH <sub>2</sub> O	2,47 ml
Rotiphorese Gel 30	0,52 ml
10% APS in ddH <sub>2</sub> O	40 µl
TEMED	4 µl

**Laufpuffer (5x) für SDS-PAGE**

Tris	30 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
ad 2 l mit ddH <sub>2</sub> O	

**SDS-Probenpuffer (2x)**

1 M Tris/ HCl-Lösung, pH 6,8	2 ml
MgCl <sub>2</sub>	190 mg
Glycerol	2 ml
SDS	0,8 g
Bromphenolblau	2 mg
DTT	200 mM
ad 20 ml mit ddH <sub>2</sub> O	

## 2.4. Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1. Isolation von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA erfolgte nach Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen aus einer Übernachtskultur (s. Kapitel 2.5.3). Hierzu wurde nach Herstellerangaben das ZR Plasmid Miniprep™ Classic oder Zyppy™ Plasmid Midiprep Kit der Firma Zymo Research verwendet.

### 2.4.2. Isolation von genomischer DNA

Die Isolation genomischer DNA (gDNA) von *P. putida* DSM 12264 oder *E. coli* mit Hilfe des ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ Kit der Firma Zymo Research erfolgte nach Herstellerangaben.

### 2.4.3. Polymerasekettenreaktion zur Amplifikation von DNA

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte durch Polymerasekettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) mit Hilfe von selektiven Primern (Tabelle 1). Als DNA-Matrize wurde Plasmid-DNA oder genomische DNA eingesetzt. Amplifizierte DNA-Fragmente wurden anschließend zur Subklonierung (s. Kapitel 2.4.11) oder Sequenzierung (s. Kapitel 2.4.10) eingesetzt.

#### PCR-Ansatz

DNA-Matrize	50-500 ng
5'-Primer (10 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
3'-Primer (10 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Phusion Puffer (5x)	10 $\mu$ l
dNTP (10 mM)*	5 $\mu$ l
Phusion Polymerase (2 U/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
ad 50 $\mu$ l mit ddH <sub>2</sub> O	

\*enthält jeweils 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP bzw. dTTP

Die PCR wurde in einem Thermocycler über ein Temperaturprogramm durchgeführt:

1. Initiale Denaturierung	98°C	2 min
2. Denaturierung	98°C	10 sek
3. Anlagerung der Primer	T <sub>m</sub> + 3°C	30 sek
4. Elongation	72°C	30 sek/kb
Wiederholung der Schritte 2. – 4.		35 x
5. abschließende Elongation	72°C	5 min

#### **2.4.4. Einfügen von Punktmutationen durch Polymerasekettenreaktion**

Das Einfügen von Punktmutationen erfolgte ebenfalls per PCR (s. Kapitel 2.4.3). Hierzu wurden zwei komplementäre Punktmutationsprimer (Tabelle 1) verwendet, die mittig den gewünschten Basenaustausch enthielten. Als Matrize wurde Plasmid-DNA, die das zu modifizierende Gen trägt, eingesetzt. Nach erfolgter PCR wurden dem Reaktionsansatz 2 µl des Restriktionsenzym *DpnI* (20 U/µl) zugesetzt. Der Reaktionsansatz wurde für zunächst 1 h bei 37°C und anschließend für 20 min bei 80°C inkubiert. Im Anschluss wurden 4 µl des Reaktionsansatzes zur Transformation von 50 µl kompetenten *E. coli* DH5α-Zellen verwendet (s. Kapitel 2.5.3) und nach Isolation der Plasmid-DNA (s. Kapitel 2.4.1) die erfolgte Punktmutation überprüft (s. Kapitel 2.4.10).

#### **2.4.5. Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese**

Zu analytischen bzw. präparativen Zwecken wurde DNA entsprechend ihrer Größe durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Hierzu wurde ein 0,8%tiges Agarosegel in TAE-Puffer (1x) hergestellt (40 ml bzw. 70 ml), das mit einer 1%igen Ethidiumbromid-Lösung (5 µl bzw. 9 µl) versetzt wurde. Als DNA-Größenstandard wurden 3 µl bzw. 5 µl des DNA-Markers GeneRuler™ 1kb plus der Firma Thermo Scientific aufgetragen. Vor dem Auftragen auf das Agarosegel wurden die DNA-Proben mit 1/5 des Probenvolumens an DNA-Probenpuffer versetzt. Die gelelektrophoretische Auftrennung wurde in 1x TAE-Puffer bei 120 V für 35-45 min durchgeführt. Zur Visualisierung und Quantifizierung der DNA wurden die Proben unter UV-Licht analysiert. Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte im Vergleich zu dem eingesetzten DNA-Größenstandard über die Software GeneTools (Syngene).

Zur Isolation von DNA-Fragmenten aus einem präparativen Agarosegel wurde das GeneJet Extraction Kit der Firma Thermo Scientific nach Herstellerangaben verwendet. Im Anschluss an die Isolation wurde die vorliegende DNA-Konzentration per analytischer Agarosegelelektrophorese bestimmt.

#### **2.4.6. Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten oder Plasmid-DNA**

Im Rahmen der Konstruktion von Expressionsplasmiden (s. Kapitel 2.4.11) wurden Plasmid-DNA und PCR-Produkte durch Restriktionsenzyme geschnitten. Im Fall der PCR-Produkte wurden entsprechende Schnittstellen über Amplifizierungsprimer (Tabelle 1) per PCR eingebracht.

**Restriktionsverdau-Ansatz**

DNA	1-5 ng
Restriktionsenzym/e	10-20 U
Reaktionspuffer	enzymspezifisch
ad 20-50 µl ddH <sub>2</sub> O	

Der Reaktionspuffer wurde entsprechend der Herstellerempfehlung gewählt. Die Restriktion erfolgte über 16 h bei 37°C mit anschließender thermischer Inaktivierung bei 65°C für 10 min oder 80°C für 20 min.

**2.4.7. Behandlung von DNA mit alkalischer Phosphatase**

Zur Vermeidung einer Religation linearisierter Plasmid-DNA wurden 5'-Phosphatreste durch eine Behandlung mit alkalischer Phosphatase entfernt. Hierzu wurde die thermosensitive alkalische Phosphatase, FastAP der Firma Thermo Scientific) verwendet.

DNA	1 µg
10x FastAP Puffer	2 µl
FastAP (1 U/µl)	1 µl
ad 20 µl mit ddH <sub>2</sub> O	

**2.4.8. Ligation von DNA-Fragmenten durch T4-DNA-Ligase**

Im Rahmen der Klonierung von Expressionsplasmiden (s. Kapitel 2.4.11) erfolgte die Ligation von DNA-Fragmenten mittels der T4-DNA-Ligase (Thermo Scientific). Es wurden 50 ng linearisiertes Plasmid verwendet. Das einzufügende DNA-Fragment wurde in einem molaren Verhältnis von 3:1 oder 5:1 zum entsprechenden Plasmid eingesetzt. Die Ligation erfolgte über 2,5 h oder 16 h bei 22°C. Im Anschluss erfolgte eine thermische Inaktivierung bei 65°C für 10 min. Zur Transformation chemisch-kompetenter *E. coli* DH5α-Zellen wurden 10 µl Ligationsansatz verwendet (s. Kapitel 2.5.3).

**2.4.9. Assemblierung von DNA-Fragmenten**

Die Assemblierung von DNA-Fragmenten (Gibson *et al.* 2009) wurde im Rahmen der Klonierung von Expressionsplasmiden eingesetzt (s. Kapitel 2.4.11). Vorteil dieser Methode im Vergleich zur „herkömmlichen“ Klonierung über diverse Restriktionsenzyme und die T4-DNA-Ligase ist die Unabhängigkeit von Restriktionsenzymen, die das zu insertierende DNA-Fragment und das Plasmid spezifisch schneiden. In der DNA-Assemblierungsreaktion werden PCR-Produkte eingesetzt, deren DNA-Fragmente überlappende Sequenzbereiche zu

dem 5'- bzw. 3'-Enden des benachbarten DNA-Fragments und/oder des linearisierten Plasmids besitzen. Die komplementären Bereiche werden im Vorfeld im Rahmen einer PCR über die eingesetzten Assemblierungsprimer eingefügt. Zur Assemblierung von DNA-Fragmenten wurde zunächst ein 5x isothermaler Reaktionspuffer hergestellt, mit dem der Assemblierungs-Mix angesetzt wurde. Der Assemblierungs-Mix wurde bei -20°C gelagert.

<b>5x Isothermaler Reaktionspuffer</b>		<b>Assemblierungs-Mix</b>	
Tris/HCl (1 M) pH 7,5	3000 µl	5x Isothermaler Reaktionspuffer	320 µl
MgCl <sub>2</sub> (2 M)	150 µl	T5-Exonuklease (10 U/µl)	0,64 µl
dGTP (100 mM)	60 µl	Phusion-DNA-Polymerase (2 U/µl)	20 µl
dATP (100 mM)	60 µl	Taq-DNA-Ligase (40 U/µl)	160 µl
dTTP (100 mM)	60 µl	ddH <sub>2</sub> O	699,36 µl
dCTP (100 mM)	60 µl		
DTT (1 M)	300 µl		
PEG-8000	1,5 g		
NAD <sup>+</sup> (100 mM)	300 µl		

Zur Assemblierung wurden 15 µl Assemblierungs-Mix und insgesamt 5 µl der verschiedenen DNA-Fragmente (10-100 ng) eingesetzt. Die Assemblierung erfolgte über 60 min bei 50°C. Anschließend erfolgte die Transformation von chemisch-kompetenten *E. coli* DH5α-Zellen (s. Kapitel 2.5.3) mit 10 µl des Assemblierungsansatzes.

#### **2.4.10. Überprüfung von DNA-Sequenzen**

Die Überprüfung von DNA-Sequenzen erfolgte ausgehend von einem PCR-Produkt oder Plasmid-DNA über Sanger Sequenzierung durch die Firma GATC Biotech. Zur Sequenzierung wurden spezielle Sequenzierungsprimer (Tabelle 1) oder Standardsequenzierungsprimer der Firma GATC Biotech verwendet.

#### **2.4.11. Klonierung und Konstruktion von Expressionsplasmiden**

Zur Klonierung oder Konstruktion von Plasmiden wurden gereinigte DNA-Fragmente (s. Kapitel 2.4.5) nach PCR (s. Kapitel 2.4.3) oder Restriktionsverdau (s. Kapitel 2.4.6) verwendet. Die Konstruktion erfolgte über Ligation (s. Kapitel 2.4.8) oder DNA-Assemblierung (s. Kapitel 2.4.9). Nach Transformation (s. Kapitel 2.5.3) von kompetenten *E. coli* DH5α-Zellen und Vermehrung der Plasmid-DNA (s. Kapitel 2.5.1) wurde die Sequenzidentität entsprechender Konstrukte durch Sequenzierung überprüft (s. Kapitel 2.4.10).

#### 2.4.11.1. Konstruktion von pJeM1-a

Das Expressionsplasmid pJeM1-a wurde durch den Austausch des *egfp* Gens von pJeM1 (Jeske und Altenbuchner 2010) gegen die Schnittstelle von *PmeI* erzeugt. Hierzu wurde durch PCR (s. Kapitel 2.4.3) das L-Rhamnose-Promotorsystem amplifiziert. Als DNA-Matrize wurde pJeM1 eingesetzt. Die abwärts des Promotors liegenden Modifikationen (*PmeI*-Schnittstelle) und die zum Austausch notwendiger Schnittstellen für *NsiI* und *HindIII* wurden über die verwendeten Primer eingefügt (Tabelle 1, B8/B9). Nach Restriktionsverdau (s. Kapitel 2.4.6) des PCR-Produkts und pJeM1 durch *NsiI* und *HindIII* wurden Plasmidrückgrat und DNA-Fragment ligiert (s. Kapitel 2.4.8).

#### 2.4.11.2. Konstruktion von pSEVA42rha und pSEVA44rha

Zur Konstruktion von pSEVA42rha (Anhang, Schema 3) wurden drei DNA-Fragmente ligiert (s. Kapitel 2.4.8): (1) das L-Rhamnose-Promotorsystem mit der *PmeI*-Schnittstelle aus pJeM1-a nach PCR-Amplifikation (Primer: Tabelle 2, B10/B11) und Restriktionsverdau mit *PacI* und *SpeI*, (2) ein DNA-Fragment mit dem Replikationsursprung (RK2) aus pSEVA227R nach Restriktionsverdau mit *PacI* und *PshAI* und (3) ein DNA-Fragment mit Antibiotika-Selektionsmarker ( $Sm^R/Sp^R$ ) aus pSEVA438 nach Restriktionsverdau mit *SpeI* und *PshAI*. Die Klonierung von pSEVA44rha erfolgte in gleicher Weise (Anhang, Schema 4). Anstelle des DNA-Fragments mit dem Replikationsursprung (RK2) aus pSEVA227R wurde das DNA-Fragment mit dem Replikationsursprung (pRO1600/ColE1) aus pSEVA247C nach Restriktionsverdau mit *PacI* und *PshAI* eingesetzt.

#### 2.4.11.3. Klonierung von p4782.1 BM3-VVF und p4782.1 BM3-VVPF

Zur Umsetzung von *R*-(+)-Limonen zu *R*-(+)-Perillaalkohol wurde die P450-BM3-Variante A264V/A328V/L437F (BM3-VVF) gewählt (Seifert *et al.* 2011). Nach dem Einfügen der entsprechenden Punktmutationen in pET28a(+) BM3 über PCR (Tabelle 1, P1-P6) wurde das Gen der BM3-VVF ausgehend von pET28a(+) BM3-VVF per PCR amplifiziert (Tabelle 1, B12/B13). Nach Restriktionsverdau des PCR-Produkts und p4782.1 BM3 mit *XbaI* und *BsrGI* wurden Plasmidrückgrat und DNA-Fragment ligiert. Durch das Einfügen einer weiteren Punktmutation (I401P) wurde über PCR (Tabelle 1, P7-P8) die P450-BM3-Variante A264V/A38V/L437F/I401P (BM3-VVPF) in p4782.1 BM3-VVPF erzeugt. Als DNA-Matrize wurde p4782.1 BM3-VVF eingesetzt.

#### 2.4.11.4. Klonierung von p4782.1 P450camPP

Zur Klonierung von p4782.1 P450camPP wurde ausgehend von pCWori/101:Pdx:PdR das tricistronische Operon, bestehend aus den Genen der P450cam, Pdx und PdR über PCR amplifiziert (Tabelle 1, B14/B15). Die Ligation erfolgte nach Restriktionsverdau des PCR-Produkts und p4782.1 durch *NdeI* und *SacI*.

#### 2.4.11.5. Klonierung von pSEVA-basierten Koexpressionsplasmiden

Die Klonierung von Genen in pSEVA44rha oder pSEVA42rha erfolgte über DNA-Assemblierungsreaktionen (s. Kapitel 2.4.9). Hierzu wurden die Gene von *CymD*, *AlkL*, *GDH*, *GLF*, *GldA*, *LB-ADH* oder *RE-ADH* zunächst durch PCR mit Hilfe von Assemblierungsprimer (Tabelle 1, A7-A20) amplifiziert. Als DNA-Matrize wurde Plasmid-DNA (Tabelle 2) oder genomische DNA von *P. putida* DSM 12264 (*cymD*) bzw. *E. coli* (*gldA*) verwendet. Nach Restriktionsverdau von pSEVA42rha bzw. pSEVA44rha mit *PmeI* wurden das linearisierte Plasmid und die entsprechenden DNA-Fragmente in Assemblierungsreaktionen eingesetzt. Die erhaltenen Plasmide pSEVA44rha LB, pSEVA44rha RE, pSEVA42rha *CymD*, pSEVA42rha *AlkL*, pSEVA42rha *GldA* und pSEVA42rha *GDH-GLF* wurden zur Koexpression entsprechender Gene in *P. putida* eingesetzt. Um das Koexpressionsplasmid pSEVA42rha *GDH* zu erhalten, wurde das Gen *glf* über die Restriktionsschnittstellen von *SacI* aus pSEVA42rha *GDH-GLF* herausgeschnitten und das Plasmidrückgrat religiert.

#### 2.4.11.6. Klonierung von pJeM1-a-basierten Expressionsplasmiden

Das Plasmid pJeM1-a wurde zunächst mit *PmeI* geschnitten. Anschließend wurde das Gen der CYP154A8 und DNA-Fragmente bicistronischer Operons, die die Gene *ykuN* und *fdr* oder *camAB* (*pdx* und *pdr*) enthalten, in separaten PCRs amplifiziert und gereinigt. Durch die in der PCR eingesetzten Assemblierungsprimer (Tabelle 1, A21-A27) enthielten die resultierenden PCR-Produkte überlappende Sequenzbereiche, die die Assemblierung der DNA-Fragmente und des pJeM1-a Plasmids zu einem tricistronischen Operon (CYP154A8:YkuN:FdR bzw. CYP154A8:Pdx:PdR) ermöglichten. Die erhaltenen Plasmide pJeM1-a A8YF und pJeM1-a A8PP wurden zur Koexpression entsprechender Gene in *P. putida* und *E. coli* eingesetzt.

#### 2.4.12. Konstruktion des Deletionsplasmids pSUP202 $\Delta cym::aac$

Die Konstruktion des Deletionsplasmids pSUP202  $\Delta cym::aac$  erfolgte über DNA-Assemblierung (Schema 5). Unter Verwendung der Assemblierungsprimer A1-A6 (Tabelle 1) wurden durch PCR zwei 450 bp lange DNA-Fragmente homolog zu den am 5'- bzw. 3'-Ende anliegenden Bereichen des *cym*-Operons amplifiziert. Zusätzlich wurde das Gentamycin-Resistenzgen (*aac*) ausgehend von pWKR202 Gm per PCR (s. Kapitel 2.4.3) mit komplementären Bereichen zu diesen DNA-Fragmenten amplifiziert. Durch Restriktionsverdau mit *ScaI* wurde das Plasmid pSUP202 linearisiert. Anschließend wurden das Plasmidrückgrat und die nach PCR erhaltenen DNA-Fragmente gereinigt und jeweils ca. 50 ng in einer DNA-Assemblierungsreaktion eingesetzt (s. Kapitel 2.4.9). Ein Aliquot der Assemblierungsreaktion wurde zur Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$  verwendet (s. Kapitel 2.5.3).

### 2.5. Mikrobiologische Methoden

#### 2.5.1. Stammhaltung

Die kurzfristige Stammhaltung erfolgte auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika bei 6°C. Zur langfristigen Lagerung von Bakterienstämmen wurden 30%ige Glyceroldauerkulturen hergestellt. Hierzu wurden 500  $\mu$ l Bakterienkultur mit 500  $\mu$ l einer sterilen Glycerol-Lösung (60%) versetzt und bei -80°C gelagert. Zum Animpfen einer Hauptkultur wurde ausgehend von einer Einzelkolonie bzw. einer Glyceroldauerkultur eine Vorkultur in 5 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Zur Selektion wurde ein entsprechendes Antibiotikum zugesetzt (Tabelle 5).

#### 2.5.2. Herstellung von chemisch-kompetenten *E. coli*-Zellen

Zur Transformation von *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA wurden chemisch-kompetente Zellen mittels RbCl<sub>2</sub> hergestellt. Hierzu wurde aus einer Vorkultur eine Hauptkultur in 50 ml LB-Medium entsprechend einer OD<sub>600</sub> von 0,05 angeimpft und bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 wurde die Hauptkultur für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend durch Zentrifugation (10 min, 4750 g, 4°C) geerntet. Das Zellpellet wurde in 20 ml TfbI-Puffer resuspendiert und die Zellsuspension für 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 4750 g, 4°C) wurde das Zellpellet in 2 ml TfbII-Puffer resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert und aliquotiert. Bis zur Transformation wurden die Zellen bei -80°C gelagert.

### 2.5.3. Transformation von *E. coli*-Zellen

Zur Transformation von *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA wurden 10 µl chemisch-kompetente *E. coli*-Zellen (s. Kapitel 2.5.2) und 1 µl Plasmid-DNA (40-200 ng) eingesetzt. Nach Ligation (s. Kapitel 2.4.8) bzw. DNA-Assemblierung (s. Kapitel 2.4.9) wurden zur Transformation 100 µl chemisch-kompetente *E. coli*-Zellen (s. Kapitel 2.5.2) und 10 µl Ligations- bzw. Assemblierungsansatz verwendet. Nachdem der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert wurde, wurden die Zellen per Hitzeschock im Wasserbad (45 sek, 42°C) mit dem Plasmid transformiert. Nach Zugabe von 80 µl bzw. 800 µl LB-Medium wurde der Ansatz 1 h bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz auf einer LB-Agarplatte mit entsprechendem/n Antibiotikum/a ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.5.4. Herstellung von kompetenten *P. putida*-Zellen

Zur Herstellung von kompetenten *P. putida*-Zellen wurde eine Vorkultur in 5 ml LB-Medium mit 20 µl aus einer Glyceroldauerkultur von *P. putida* angeimpft und über Nacht bei 30°C und 180 rpm kultiviert. Aus der Vorkultur wurde eine Hauptkultur in 100 ml LB-Medium entsprechend einer OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und über Nacht bei 30°C und 180 rpm kultiviert. Anschließend wurden je 50 ml der Hauptkultur in 50 ml Falcon-Gefäße überführt und für 10 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation (20 min, 4750 g, 4°C) wurden die Zellen pelletiert und die Zellpellets mit je 50 ml 300 mM Saccharose-Lösung gewaschen. Durch Zentrifugation (20 min, 4750 g, 4°C) wurden die Zellen erneut pelletiert und die Zellpellets mit je 20 ml 300 mM Saccharose-Lösung gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden vereinigt und zentrifugiert (20 min, 4750 g, 4°C). Nachdem der Überstand vollständig verworfen wurde, wurde das Zellpellet in 3 ml Saccharose-Lösung und 1 ml 80% Glycerol (m/v) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu 170 µl aliquotiert und bei 80°C gelagert.

### 2.5.5. Transformation von *P. putida*-Zellen durch Elektroporation

Zur Transformation von *P. putida*-Zellen durch Elektroporation wurden die gelagerten kompetenten *P. putida*-Zellen (s. Kapitel 2.5.4) auf Eis aufgetaut, abzentrifugiert (2 min, 13.000 g, RT) und der Überstand verworfen. Das Zellenpellet wurde mit 1 ml 300 mM Saccharose-Lösung gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (2 min, 13.000 g, RT) und Verwerfen des Überstands, wurde das Zellpellet in 100 µl 300 mM Saccharose-Lösung resuspendiert. Zu dieser Zellsuspension wurden 2 µl Plasmid-DNA (ca. 20-100 ng/µl) gegeben und der Ansatz in eine Elektroporationsküvette (2 mm, LE) der Firma PEQLAB (VWR) überführt. Die Elektroporation erfolgte unter Verwendung des MicroPulser (Bio-Rad) bei 2,5 kV (Programm: Ec2). Anschließend wurden 700 µl LB-Medium auf die Zellen in die

Elektroporationsküvette gegeben, das gesamte Volumen in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt und bei 30°C und 180 rpm für 1,5-3 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden 100 µl dieses Ansatzes oder das in 100 µl LB-Medium resuspendierte Zellpellet auf LB-Agarplatten mit Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 30°C inkubiert.

#### **2.5.6. Heterologe Proteinexpression in *E. coli***

Zur heterologen Proteinexpression in *E. coli* wurden die Stämme *E. coli* JM109 und *E. coli* BL21 (DE3) verwendet. Die Expression in *E. coli* JM109 erfolgte ausgehend von den L-Rhamnose-induzierbaren Expressionsplasmiden p4782.1 oder pJeM1-a bzw. in *E. coli* BL21 (DE3) ausgehend von dem IPTG-induzierbaren Expressionsplasmid pET28a(+). Aus einer Vorkultur wurde hierzu eine Hauptkultur in 400 ml TB-Medium entsprechend einer Zellmenge von OD<sub>600</sub> 0,025 angeimpft und bei 37°C und 180 rpm bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,3 inkubiert. Die Expression wurde durch Zugabe von 0,2% L-Rhamnose bzw. 0,1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Zusätzlich wurden 200 µl 5-Aminolävulinsäure (80 mg/ml) und 40 µl FeSO<sub>4</sub> (1 M) zugegeben. Nach Induktion wurden die Zellen bei 25°C und 160 rpm für bis zu 40 h inkubiert.

#### **2.5.7. Proteinexpression in *P. putida***

Die Proteinexpression in *P. putida* erfolgte ausgehend von L-Rhamnose-induzierbaren Expressionsplasmiden. Als Expressionswirte wurden *P. putida* DSM 12264 und der Knockoutstamm *P. putida* DSM 12264 Δ*cym::aac* (s. Kapitel 2.5.9) verwendet. Aus einer Vorkultur wurde eine Hauptkultur in 50-400 ml TB-Medium entsprechend einer Zellmenge von OD<sub>600</sub> 0,02-0,04 angeimpft und bei 30°C und 180 rpm bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,8 inkubiert. Die Expression wurde durch Zugabe von 0,2% L-Rhamnose induziert. Zusätzlich wurden 200 µl 5-Aminolävulinsäure (80 mg/ml) und 40 µl FeSO<sub>4</sub> (1 M) zugegeben. Nach Induktion wurden die Zellen bei 25°C und 160 rpm für weitere ~40 h inkubiert.

#### **2.5.8. Herstellung von Zelllysaten nach Proteinexpression**

Nach der Proteinexpression wurden die Zellen durch Zentrifugation (8000 g, 20 min, 4°C) geerntet und in 5-10 ml 50 mM KPi-Puffer mit 0,1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte unter Eiskühlung durch Ultraschall (Brandson Sonifier 25: Output 4, Cycle 40%) über drei Zyklen für je 1,5 min mit einer Unterbrechung von 1 min zwischen den einzelnen Zyklen. Die Zelltrümmer wurden im Anschluss durch Zentrifugation (20.000 rpm, 30 min, 4°C) abzentrifugiert. Die Lagerung von Zelllysaten erfolgte bei -20°C.

### 2.5.9. Konstruktion eines *P. putida*-Knockoutstamms

Um einen vollständigen Aktivitätsverlust von *P. putida* DSM 12264 gegenüber *R*-(+)-Limonen zu erzielen, wurde eine Deletion des gesamten *cym*-Operon durch lambda Red-Rekombination durchgeführt (Lesic und Rahme 2008). Die Deletion des *cym*-Operons erfolgte über homologe Rekombination unter Verwendung eines PCR-Produkts (Deletions-Fragment). Ausgehend von pSUP202  $\Delta cym::aac$  wurde hierzu per PCR das Deletions-Fragment ( $\Delta cym::aac$ ) bestehend aus dem Gentamycin-Resistenzgen und den anliegenden Bereichen des *cym*-Operons amplifiziert (Tabelle 1, B1/B2) und anschließend gereinigt (s. Kapitel 2.4.3).

Kompetente *P. putida* DSM 12264-Zellen wurden mit dem Helferplasmid pUCPK18-RedS durch Elektroporation transformiert (s. Kapitel 2.5.5). Aus einer Vorkultur rekombinanter *P. putida* DSM 12264 pUCPK18-RedS-Zellen wurde eine Hauptkultur in 250 ml LB-Medium mit Kanamycin (30  $\mu\text{g/ml}$ ) auf eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,05 angeimpft und bei 30°C und 180 rpm inkubiert. Bei Erreichen einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,3 erfolgte eine Induktion mit 0,4% L-(+)-Arabinose (m/v). Nach einer Kultivierung für weitere 3 h wurden die Zellen per Zentrifugation geerntet (8000 g, 20 min, 4°C), viermal mit 35 ml eiskalter 10%iger Glycerol-Lösung gewaschen und in 250  $\mu\text{l}$  10%iger Glycerol-Lösung aufgenommen. Zur erneuten Transformation wurden 150  $\mu\text{l}$  dieser *P. putida* DSM 12264 pUCPK18-RedS-Zellen und 2-4  $\mu\text{g}$  Deletions-Fragment eingesetzt. Nach erfolgter Elektroporation (s. Kapitel 2.5.5) wurden die Zellen mit 900  $\mu\text{l}$  LB-Medium und 0,2% L-(+)-Arabinose (m/v) versetzt und über Nacht bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Agar mit Gentamycin (25  $\mu\text{g/ml}$ ) ausplattiert und über 2-3 Tage bei 30°C inkubiert. Mit Einzelkolonien wurden je 5 ml Flüssigkultur in LB-Medium mit Gentamycin (25  $\mu\text{g/ml}$ ) angeimpft und über Nacht bei 30°C und 180 rpm inkubiert. Zur ersten Überprüfung der erfolgten Deletion wurde gDNA der potentiellen Knockoutstämme isoliert (s. Kapitel 2.4.2) und unter Verwendung der Primer B3-B5 (Tabelle 1), die außerhalb des *cym*-Operons bzw. im Gentamycin-Resistenzgen binden, charakteristische DNA-Fragmente (3,3 kb bzw. 1,25 kb) amplifiziert (im Vergleich zu 9,5 kb bei Vorliegen des Wildtyp-Genlocus). Zur Ausdünnung des Helferplasmids pUCPK18-RedS wurde der potentielle Knockoutstamm auf 2YT-Agarplatten mit Gentamycin (25  $\mu\text{g/ml}$ ) und 10% Saccharose ausplattiert und über Nacht bei 30°C kultiviert. Einzelne Kolonien von dieser Agarplatte wurden parallel auf LB-Agarplatten mit Kanamycin (25  $\mu\text{g/ml}$ ) und 2YT-Agarplatten mit Gentamycin (25  $\mu\text{g/ml}$ ) und 10% Saccharose überimpft und für 2-3 Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Mit Einzelkolonien, die nicht auf LB-Agarplatten mit Kanamycin, jedoch auf 2YT-Agarplatten mit Gentamycin und Saccharose anwuchsen, wurden Flüssigkulturen in 5 ml LB-Medium mit Gentamycin (25  $\mu\text{g/ml}$ ) angeimpft und über Nacht bei

30°C und 180 rpm inkubiert. Nach Isolation von gDNA (s. Kapitel 2.4.2) wurde der Genlocus des ehemaligen *cym*-Operons per PCR amplifiziert (Tabelle 1, B6/B7) und nach Reinigung (s. Kapitel 2.4.3) des PCR-Produkts die erfolgte Deletion per DNA-Sequenzierung (s. Kapitel 2.4.10) überprüft (Tabelle 1, S1-S4).

#### **2.5.10. Wachstumstest von *P. putida* DSM 12264 $\Delta$ *cym::aac***

Eine Einzelkolonie des Wildtypstamms bzw. Knockoutstamms wurde ausgehend von einer Agarplatte in Wasser aufgenommen. Anschließend wurden beide Stämme auf E2-Festmedium (s. Kapitel 2.3.1) mit und ohne Glycerol ausgestrichen. Im Fall des E2-Festmediums ohne Glycerol wurde als Kohlenstoffquelle in den Deckel der Agarplatte ein in *p*-Cymol getränktes Filterpapier gelegt und die Petrischale abgedichtet. Die Inkubation erfolgte bei 30°C über Nacht.

## **2.6. Ganzzellbiokatalyse**

### **2.6.1. Biotransformation von *R*-(+)-Limonen**

Zur Überprüfung des vollständigen Aktivitätsverlusts gegenüber *R*-(+)-Limonen wurde der Knockoutstamm *P. putida* DSM 12264  $\Delta$ *cym::aac* und als Kontrolle der Wildtypstamm *P. putida* DSM 12264 in einer Biotransformation von *R*-(+)-Limonen eingesetzt. Aus Glyceroldauerkulturen wurden hierzu Vorkulturen in 100 ml TB-Medium angeimpft und mit 150 mM *R*-(+)-Limonen versetzt. Die Kulturen wurden über Nacht bei 30°C und 180 rpm kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet (15 min, 4750 g, RT), dreimal mit 20 ml E2-Medium gewaschen und das Zellpellet in E2-Medium resuspendiert. Ausgehend von dieser Zellsuspension wurde eine Hauptkultur in 50 ml E2-Medium entsprechend einer OD<sub>600</sub> von 1,3 angeimpft und 150 mM *R*-(+)-Limonen zugesetzt. Die Biotransformation wurde in Dreifachbestimmung bei 30°C und 180 rpm über 146 h durchgeführt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden jeder Kultur 1 ml entnommen und nach Extraktion analysiert (s. Kapitel 2.7.6.1).

### **2.6.2. Umsetzung von *R*-(+)-Limonen oder (+)-Campher durch rekombinante *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren**

Nach der Expression (s. Kapitel 2.5.7) wurden die Zellen durch Zentrifugation (20 min, 8000 g, 4°C) geerntet. Das Zellpellet wurde in 100 mM bzw. 200 mM KPi-Puffer (pH 7,5) aufgenommen und auf eine definierte Zellfeuchtmasse (engl. *cell wet weight*, cww) von ~100 g/l eingestellt. Proben dieser Zellsuspension (1 ml) wurden zur Ermittlung der in den Zellen vorliegenden P450-Konzentration und Dehydrogenase-Aktivität verwendet (s. Kapitel

2.7.3/2.7.5). Zur Bestimmung der tatsächlich eingesetzten Zelltrockenmasse (engl. *cell dry weight*, cdw) wurden 500 µl Zellsuspension in ein Eppendorfggefäß (1,5 ml) überführt, die Zellen abzentrifugiert (5 min, 13.000 g, RT) und der Überstand vollständig verworfen. Im Anschluss wurde das Zellpellet bei 80°C getrocknet. Nach ca. 48 h wurde die Zelltrockenmasse bestimmt. Zur Ganzzellumsetzung wurden in einem 2 ml Reaktionsgefäß 500 µl der Zellsuspension (~100 g/l) und 500 µl eines wässrigen Reaktionsgemischs eingesetzt. Das resultierende Reaktionsgemisch, bestehend aus Zellsuspension und wässrigem Reaktionsgemisch, enthielt folgende Bestandteile in unterschiedlichen Zusammensetzungen: Zellmenge entsprechend der eingesetzten Zellfeuchtmasse ~50 g/l, 2% (m/v) Glycerol oder Glucose (100 mM), 2-100 mM *R*-(+)-Limonen mit 2-10% DMSO, 10 mM Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M- $\beta$ -CD), 10-200 µg/ml Polymyxin B oder 5,8 mM (+)-Campher mit 2% DMSO. Die Ganzzellumsetzungen wurden in einem Rotator (neoLab Rotator mit Vortexfunktion: C2, 20 rpm, 25°C) über einen Zeitraum von maximal 24 h durchgeführt. Die Ganzzellumsetzungen erfolgten in Einfach- bzw. Dreifachbestimmung.

### **2.6.3. Umsetzung von linearen Alkanen durch rekombinante *E. coli*- oder *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren**

Wie unter Kapitel 2.6.2 beschrieben, wurde nach der Expression eine Zellsuspension mit einer Zellfeuchtmasse von ~100 g/l in 200 mM KPi-Puffer (pH 7,5) hergestellt und Proben zur Bestimmung der Zelltrockenmasse, der P450-Konzentration und der Dehydrogenase-Aktivität entnommen (2.7.3/2.7.5). Die Ganzzellumsetzungen erfolgten als Dreifachbestimmung in 100 ml Erlenmeyerkolben. Hierzu wurden 5 ml Zellsuspension mit 5 ml eines wässrigen Reaktionsgemischs unterschiedlicher Zusammensetzung versetzt: 200 mM Glycerol oder 100 mM Glucose, 0,5-4% (m/v) M- $\beta$ -CD sowie 1 mM MgCl<sub>2</sub> im Fall von Experimenten, bei denen eine ADH koexprimiert wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml Heptan, Octan oder Nonan (~ 9,1% (v/v)) gestartet und erfolgte bis zu 48 h bei 25°C und 200 rpm. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Produkte extrahiert und analysiert (s. Kapitel 2.7.6.2).

## 2.7. Proteinbiochemische und analytische Methoden

### 2.7.1. Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford durchgeführt (Bradford 1976). Hierzu wurden in Mikrotiterplatten 160  $\mu\text{l}$  einer verdünnten proteinhaltigen Lösung mit 40  $\mu\text{l}$  Roti-Quant (5x) der Firma Roth versetzt, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption bei 595 nm bestimmt. Anhand einer zuvor in gleicher Weise mit Rinderserumalbumin erstellten Kalibriergerade (0-50  $\mu\text{g/ml}$ ) wurde die Proteinkonzentration in Lösung bestimmt.

### 2.7.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Analyse der Proteinexpression erfolgte durch SDS-PAGE. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Expression wurde hierzu eine Probe der Kultur genommen, die einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,25 entsprach. Das entnommene Kulturvolumen wurde zentrifugiert (12.300 rpm, 2 min, RT) und das Zellpellet in 50  $\mu\text{l}$  SDS-Probenpuffer (1x) resuspendiert. Proben von Zelllysaten wurden auf eine Proteinkonzentration von 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  eingestellt und mit dem gleichen Volumen an SDS-Probenpuffer (2x) versetzt. Die mit SDS-Probenpuffer versetzten Proben wurden bei 95°C für 15 min erhitzt. Je 10-15  $\mu\text{l}$  Probe wurden auf ein SDS-Gel, bestehend aus einem 4%igen Sammelgel und 12,5%igen Trenngel, aufgetragen. Es wurde 1x Laufpuffer verwendet. Nach einer Fokussierung der Probe im Sammelgel bei 10 mA erfolgte die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Molekülmasse bei 25 mA im Trenngel. Im Anschluss wurden die Proteine durch eine Coomassiefärbung fixiert und gefärbt. Hierbei erfolgte eine Färbung der Gele über 45 min mit Färbelösung und eine Entfärbung über Nacht mit Entfärbelösung.

### 2.7.3. Bestimmung der P450-Konzentration

Die im Zelllysate vorliegende P450-Konzentration wurde durch CO-Differenzspektroskopie bestimmt (Omura und Sato 1964b). Hierzu wurde ein Differenzspektrum (400-500 nm) von einer reduzierten unbegasteten Probe gegenüber einer reduziert begasteten Probe gemessen. Die Begasung mit Kohlenmonoxid erfolgte über 1 min. Die Reduktion der in Lösung vorhandenen P450 erfolgte durch Zugabe von Natriumdithionit unmittelbar vor der Messung.

P450-haltige Probe	100 $\mu\text{l}$
Natriumdithionit-Lösung (1 M)	50 $\mu\text{l}$
50 mM KPi-Puffer, pH 7,5	850 $\mu\text{l}$

Über die Gleichung (1) wurde unter Verwendung der Absorptionsdifferenz bei 450 nm und 490 nm und des molaren Extinktionskoeffizienten  $91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Omura und Sato 1964b) die P450-Konzentration in Lösung bestimmt.

$$c_{\text{P450}} = \frac{\Delta A_{450-490} \cdot V}{\epsilon \cdot d} \quad (1)$$

$c_{\text{P450}}$	P450-Konzentration (mM)
$\Delta A_{450-490}$	Absorptionsdifferenz bei 450 nm und 490 nm
$\epsilon$	molarer Extinktionskoeffizient von P450 ( $91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )
$d$	Schichtdicke der Küvette (1 cm)
$V$	Verdünnungsfaktor

#### 2.7.4. Bestimmung der Kopplungseffizienz und NADPH-Umsatzrate

Die Kopplungseffizienz und die NADPH-Umsatzrate wurden photometrisch in 1 ml Reaktionsvolumen bei  $25^\circ\text{C}$  in Dreifachbestimmung durchgeführt. Der Reaktionsansatz in 50 mM KPi-Puffer (pH 7,5) enthielt  $200 \mu\text{M}$  *R*-(+)-Limonen, 2% DMSO, 600 U Katalase und  $0,1 \mu\text{M}$  oder  $1 \mu\text{M}$  P450. Die Reaktion wurde durch Zugabe von  $200 \mu\text{M}$  NADPH gestartet. Die volumetrische Enzymaktivität (in U/ml) wurde über den molaren Extinktionskoeffizienten von NADPH bei 340 nm ( $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) über die Gleichung (2) bestimmt. Eine Unit (U) entspricht der Enzymmenge, die zur Umsetzung von einem  $\mu\text{mol}$  NADPH pro Minute benötigt wird. Zur Bestimmung der NADPH-Umsatzrate (in nmol NADPH pro min pro nmol P450, angegeben als  $\text{min}^{-1}$ ) wurde die eingesetzte P450-Konzentration berücksichtigt.

$$\text{Volumetrische Aktivität (U/ml)} = \frac{\Delta A_{340} \times V}{\epsilon \times l} \quad (2)$$

$\Delta A_{340}$ :	Absorptionsänderung pro min bei 340 nm
$V$ :	Verdünnungsfaktor
$l$ :	Schichtdicke der Küvette (1 cm)
$\epsilon$ :	Extinktionskoeffizient von NADPH bei 340 nm ( $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

Nach vollständigem NADPH-Verbrauch wurden  $800 \mu\text{l}$  des Reaktionsansatzes entnommen, dieser mit  $800 \mu\text{l}$  Ethylacetat extrahiert und analysiert (s. Kapitel 2.7.6.1) Der Substratumsatz und die Kopplungseffizienz wurden durch Integration der Substrat- und Produktpeakflächen bestimmt. Zur Bestimmung der Kopplungseffizienz wurde berücksichtigt, dass zwei NADPH Moleküle zur Bildung von einem Molekül Perillaaldehyd benötigt werden.

### 2.7.5. Bestimmung der Dehydrogenase-Aktivität

Eine Probe der in einer Ganzzellumsetzung eingesetzten Zellsuspension (s. Kapitel 2.6.2/2.6.3) wurde durch eine Ultraschallbehandlung (s. Kapitel 2.5.8) aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (20 min, 4750 g, 4°C) wurde das erhaltene Zelllysate zur Bestimmung der Dehydrogenase-Aktivität eingesetzt. Die Bestimmung erfolgte photometrisch über die Bildung von NADPH bzw. NADH bei 340 nm ( $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) über die Gleichung (2). Unter Berücksichtigung der eingesetzten Zellmenge konnte die Dehydrogenase-Aktivität pro Zellmenge ( $U/g_{\text{cdw}}$ ) in den Ganzzellsystemen berechnet werden.

Zur Bestimmung der GDH- bzw. GldA-Aktivität wurde als Reaktionspuffer 50 mM KPi-Puffer (pH 7,5) verwendet. In einem Reaktionsvolumen von 1 ml wurden 100 mM Glucose bzw. Glycerol und 10  $\mu\text{l}$  oder 100  $\mu\text{l}$  Zelllysate eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 mM NAD(P)<sup>+</sup> gestartet. Zur Bestimmung der ADH-Aktivität wurden als Reaktionspuffer 50 mM Tris/HCl (pH 9) mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> verwendet. Der Reaktionsansatz enthielt 120  $\mu\text{M}$  (*R/S*)-2-Octanol, 2% DMSO und 50  $\mu\text{l}$  verdünntes Zelllysate. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500  $\mu\text{M}$  NAD(P)<sup>+</sup> gestartet.

### 2.7.6. Substrat- und Produktanalyse durch Gaschromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie (GC/MS)

Die qualitative und quantitative Analyse erfolgte über einen Gaschromatographen mit gekoppelter Massenspektrometrie (GC/MS-QP2010 der Firma Shimadzu (Tokyo, Japan)). Zur gaschromatographischen Auftrennung von Substanzgemischen wurde entweder eine achirale Säule FS-Supreme-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ) oder eine chirale Säule FS-CYCLODEX beta-I/P (50 m x 0,25 mm) der Firma Chromatographie Service GmbH (Langerwehe, Deutschland) verwendet. Als Trägergas wurde Helium mit einer Lineargeschwindigkeit von 30 cm/sek verwendet. Die qualitative Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte über das charakteristische Fragmentierungsmuster nach MS. Zum Vergleich wurden kommerziell erhältliche Referenzsubstanzen analysiert oder die charakteristischen Fragmentierungsmuster mit einer Datenbank (NIST 08 *Mass Spectral Library*) des *National Institut of Standards and Technology* (Gaithersburg, Maryland, USA) verglichen. Die Quantifizierung erfolgte im Scan- ( $m/z$  40-400) bzw. SIM-Modus (unter Verwendung charakteristischer Haupt- und Referenzmassenfragmente) über eine Kalibrierung mit internem Standard. Hierzu wurde das Verhältnis der Substrat- bzw. der Produktpeakfläche und der Peakfläche des verwendeten internen Standards bei verschiedenen Konzentrationen gebildet und gegen die eingesetzte Substrat- bzw. Produktkonzentration aufgetragen.

### 2.7.6.1. Extraktion und Produktanalyse nach Umsetzung von *R*-(+)-Limonen oder (+)-Campher

Die Reaktionsansätze (1 ml) der Umsetzung von *R*-(+)-Limonen und (+)-Campher durch rekombinante *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren (s. Kapitel 2.6.2) wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit 0,25 mM oder 1 mM internem Standard (Fenchon in DMSO) versetzt und mit 1 ml Ethylacetat extrahiert. Nach der Extraktion wurde der Ansatz zentrifugiert (5 min, 13.000 g, RT) und die organische Phase per GC/MS analysiert. Hierzu wurden bei einer Injektortemperatur von 300°C 0,5 µl Probe bei einem Split von 10 injiziert. Die initiale Ofentemperatur betrug 100°C. Zur Trennung des Substanzgemisches wurde ein Temperaturprogramm verwendet: nach einer isothermen Phase bei 100°C für 2,5 min wurde der Ofen mit einer Heizrate von 10°C/min auf 180°C und weiter mit 40°C/min auf 300°C aufgeheizt. Abschließend wurde in einer zweiten isothermen Phase die Ofentemperatur für 3 min bei 300°C gehalten.

In der Umsetzung von *R*-(+)-Limonen wurden zur Kalibrierung der Produkte in 1 ml 50 mM KPi-Puffer verschiedene Konzentrationen (0-2,5 mM) von *R*-(+)-Perillaalkohol und *R*-(+)-Perillaaldehyd eingesetzt. Als interner Standard wurde 0,25 mM oder 1 mM Fenchon verwendet. In der Ganzzellumsetzung von (+)-Campher zu 5-*exo*-Hydroxycampher wurde nach der Umsetzung die verbleibende Konzentration an (+)-Campher über eine Kalibrierung ermittelt. Zur Kalibration wurden verschiedene Konzentrationen an (+)-Campher (0-10 mM) und 1 mM Fenchon als interner Standard eingesetzt. Aus der Differenz zur eingesetzten Anfangskonzentration wurde die Produktkonzentration ermittelt. Die Extraktion und Analyse erfolgte wie weiter oben beschrieben.

Während der Biotransformation von *R*-(+)-Limonen durch *P. putida* DSM 12264 bzw. *P. putida* DSM 12264  $\Delta$ *cym::aac* (s. Kapitel 2.6.1) wurde zur Produktanalyse 1 ml der entnommenen Probe mit 75 mM internem Standard (Carvon in Ethylacetat) versetzt. Anschließend wurde zweimal mit je 500 µl Ethylacetat extrahiert, die organische Phase 1:10 in Ethylacetat verdünnt und wie weiter oben beschrieben per GC/MS analysiert.

### 2.7.6.2. Extraktion und Produktanalyse nach Umsetzung von linearen Alkanen.

Die Produktanalyse nach Umsetzung von Alkanen (Heptan, Octan oder Nonan) erfolgte durch achirale und chirale GC/MS-Analytik. Zur Produktextraktion wurden die Reaktionsansätze in Erlenmeyerkolben mit 250 µl HCl (37%) und 2 mM interner Standard (1-Decanol in Toluol) versetzt. Anschließend wurde der gesamte Kolbeninhalt in ein 50 ml Falcon-Gefäß überführt, der Kolben zweimal mit je 5 ml Toluol ausgespült und das dabei verwendete Toluol ebenfalls

in das 50 ml Falcon-Gefäß überführt. Nach Extraktion und Zentrifugation (10 min, 4750 g, RT) wurde die organische Phase abgenommen, durch Zugabe von wasserfreiem  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und per achiraler GC/MS analysiert. Hierzu wurden bei einer Injektortemperatur von  $300^\circ\text{C}$   $1\ \mu\text{l}$  Probe bei einem Split von 60 injiziert. Die initiale Ofentemperatur betrug  $80^\circ\text{C}$ . Die Trennung des Substanzgemisches erfolgte über ein Temperaturprogramm: nach einer isothermen Phase bei  $80^\circ\text{C}$  für 6 min wurde der Ofen mit einer Heizrate von  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  auf  $140^\circ\text{C}$  und weiter mit  $50^\circ\text{C}/\text{min}$  auf  $300^\circ\text{C}$  aufgeheizt. Abschließend wurde in einer zweiten isothermen Phase die Ofentemperatur für 2 min bei  $300^\circ\text{C}$  gehalten.

Für die Quantifizierung der gebildeten Produkte (2-Alkohole und 2-Ketone) wurden eine Kalibrierung unter Verwendung von 2 mM 1-Decanol als internem Standard eingesetzt. Hierzu wurden 1 ml Octan mit 0-220 mM 2-Alkohol oder 0-55 mM 2-Keton versetzt und zu 10 ml 100 mM KPi-Puffer (pH 7,5) gegeben (Endkonzentrationen: 2-Alkohol 0-20 mM bzw. 2-Keton 0-5 mM). Die Extraktion und Analyse erfolgte wie weiter oben beschrieben.

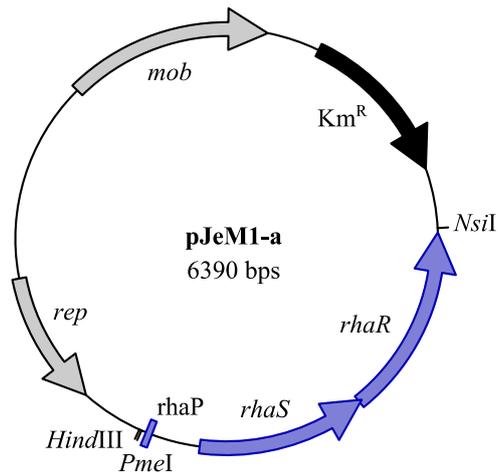
Die Bestimmung des *ee*-Werts erfolgte per chiraler GC/MS Analytik nach Derivatisierung der Alkohole durch Acetylierung mit Essigsäureanhydrid. Hierzu wurden nach Extraktion  $500\ \mu\text{l}$  der getrockneten organischen Phase in einem GC-Gefäß mit  $200\ \mu\text{l}$  Essigsäureanhydrid versetzt. Nach einer Inkubation für 2 h bei  $90^\circ\text{C}$  wurde der Ansatz zweimal mit je  $500\ \mu\text{l}$  Wasser gewaschen, mit  $\text{MgSO}_4$  getrocknet und die organische Phase per chiraler GC/MS analysiert. Bei einer Injektortemperatur von  $200^\circ\text{C}$  wurde hierzu  $1\ \mu\text{l}$  Probe mit einem Split von 50 injiziert. Nach einer isothermen Phase bei  $100^\circ\text{C}$  für 17 min wurde der Ofen mit einer Heizrate von  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  auf  $200^\circ\text{C}$  aufgeheizt. Abschließend wurde die Ofentemperatur für 2 min bei  $200^\circ\text{C}$  gehalten. Die Bestimmung des *ee*-Wert erfolgte über die Peakflächen der derivatisierten Enantiomere.

### 3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung von *P. putida* DSM 12264 als Wirt für P450-basierte Ganzzellbiokatalyse untersucht. Im ersten Teil der Ergebnisse (Kapitel 3.1) wird die Entwicklung modularer Expressionsplasmide für die Koexpression verschiedener P450-Monooxygenasen mit weiteren Enzyme in *P. putida* beschrieben. Im zweiten und dritten Teil (Kapitel 3.2 und 3.3) werden Untersuchungen zur Umsetzung des monocyclischen Monoterpens *R*-(+)-Limonen zu *R*-(+)-Perillaalkohol und des bicyclischen Monoterpenoids (+)-Campher zu 5-*exo*-Hydroxycampher durch *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren dargestellt. Der vierte Teil (Kapitel 3.4) beschäftigt sich mit dem Einsatz von *E. coli*- und *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren zur Herstellung chiraler Alkohole und Ketone ausgehend von linearen Alkanen.

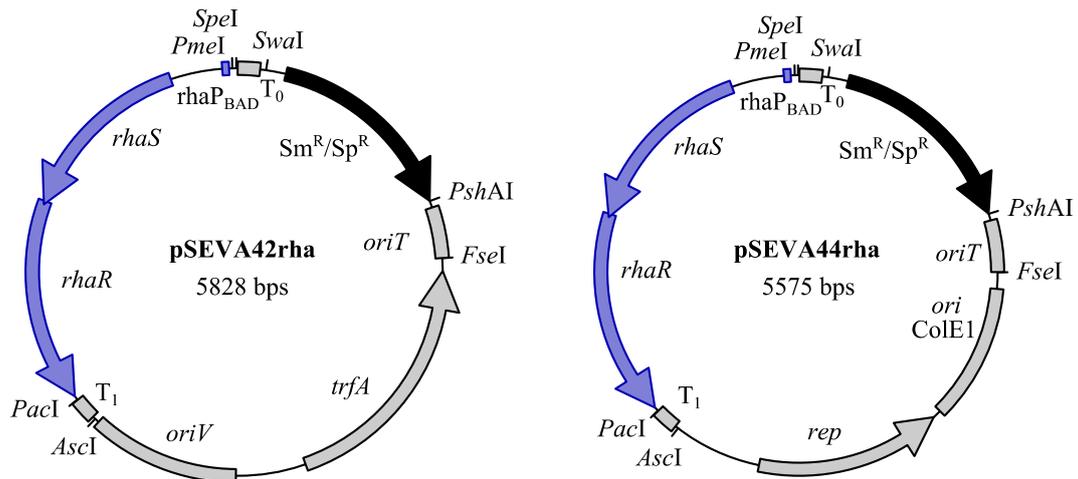
#### 3.1. Entwicklung eines modularen Baukastens für die Koexpression rekombinanter Proteine in *P. putida*

Die Entwicklung und Verwendung von erweiterbaren modularen Systemen, die den Einsatz unterschiedlicher Strategien ermöglichen, können in P450-katalysierten Prozessen zu einem besseren Verständnis und einer beschleunigten Anwendung beitragen (Bernhardt und Urlacher 2014). Für die Entwicklung von *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren zur Synthese oxyfunktionalisierter Moleküle wurde daher in dieser Arbeit ein modularer Baukasten entwickelt, der die Koexpression rekombinanter Proteine unter Verwendung von zwei kompatiblen Expressionsplasmiden ermöglichte. Als Expressionsplasmid wurde zunächst p4782.1, das das *rhaP*<sub>BAD</sub>-Promotorsystem trägt, verwendet. Das in der Arbeitsgruppe von Altenbuchner entwickelte und vergleichsweise neue L-Rhamnose-induzierbare *rhaP*<sub>BAD</sub>-Promotorsystem aus *E. coli* konnte bereits in *P. putida* zur Expression rekombinanter Proteine eingesetzt werden (Jeske und Altenbuchner 2010; Stumpp *et al.* 2000). Da gelegentlich die Sequenzen der zu klonierenden DNA-Fragmente aufgrund mehrfach vorhandener Schnittstellen die herkömmliche Klonierung über zwei Restriktionsenzyme erschweren kann und auch die Kompatibilität der verwendeten Restriktionsenzyme teilweise zu Problemen während der Klonierung führt, wurde ausgehend von pJeM1 (Weiterentwicklung von p4782.1) zusätzlich das universelle Expressionsplasmid pJeM1-a erzeugt (Abbildung 11). Das Plasmid pJeM1-a trägt neben dem *rhaP*<sub>BAD</sub>-Promotorsystem eine dem *rhaP*<sub>BAD</sub>-Promotor nachgelagerte „blunt end“-Schnittstelle (*PmeI*), die eine von Restriktionsenzymen unabhängige Klonierung einzelner Gene oder artifizieller Operons durch DNA-Assemblierung ermöglicht (Gibson *et al.* 2009; Hill und Eaton-Rye 2014; Li und Elledge 2012).



**Abbildung 11. Schematische Darstellung des Expressionsplasmids pJeM1-a.** Selektionsmarker: Kanamycinresistenzgen (schwarz), L-Rhamnose-Promotorsystem: Promotor rhaP und Aktivatorgene rhaR und rhaS (hell-blau), rep, mob als weitere Plasmidelemente (grau). Die Klonierung erfolgte über die Restriktionsschnittstellen NsiI und HindIII (s. Kapitel 2.4.11.1).

Zur Koexpression weiterer Gene in *P. putida* wurden die Koexpressionsplasmide pSEVA42rha und pSEVA44rha konstruiert (Anhang, Schema 3 und Schema 4). Die Konstruktion erfolgte gemäß der *Standard European Vector Architecture* (SEVA) (Martínez-García *et al.* 2015; Silva-Rocha *et al.* 2013). Wie alle Plasmide der SEVA-Datenbank (<http://seva.cnb.csic.es/>) bestehen pSEVA42rha und pSEVA44rha aus drei Modulen: einem sogenannten Cargo, einem Replikationsursprung und einem Antibiotika-Selektionsmarker, die durch drei Regionen (T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub> und *oriT*) voneinander getrennt sind. Als Cargo-Modul wurde in pSEVA42rha und pSEVA44rha das modifizierte rhaP<sub>BAD</sub>-Promotorsystem aus pJeM1-a verwendet. Eine Voraussetzung für die stabile Aufrechterhaltung zweier Plasmide in einer Zelle ist die Verwendung kompatibler Replikationsursprünge und unterschiedlicher Antibiotikaselektionsmarker (Davison 2002; Tolia und Joshua-Tor 2006). Die Plasmide p4782.1 und pJeM1-a tragen das pBBR1-Replikon (Antoine und Loch 1992) und ein Kanamycin-Resistenzgen. Zur stabilen Koexistenz der Koexpressionsplasmide mit p4782.1 bzw. pJeM1-a in *P. putida* wurden in pSEVA42rha bzw. pSEVA44rha das mit dem pBBR1-Replikon kompatible RK2-Replikon (Pansegrau *et al.* 1994) bzw. pRO1600-Replikon (Olsen *et al.* 1982) und ein Streptomycin/Spectinomycin-Resistenzgen aus Plasmiden der SEVA-Datenbank verwendet (Abbildung 12). Aufgrund des RK2-Replikons liegen pSEVA42rha-Konstrukte in *Pseudomonas* eher mit einer geringen Plasmidkopienzahl (3-5) vor (Montie 1998), sodass sie für die Koexpression kofaktorregenerierender Enzyme oder membranständiger Proteine zur Verbesserung des Stofftransfers eingesetzt werden sollten.



**Abbildung 12. Schematische Darstellung der Koexpressionsplasmide pSEVA42rha und pSEVA44rha.** Antibiotika-Selektionsmarker (*aadA*) zur Resistenz gegenüber Streptomycin und Spectinomycin (schwarz), L-Rhamnose-Promotorsystem aus pJeM1-a, einer modifizierten Variante des pJeM1 bzw. p4782.1 L-Rhamnose-Promotorsystem mit *PmeI*-Schnittstelle (blau), Replikationsursprung RK2 bzw. pRO1600/ColE1 sowie weitere Plasmidelemente (grau). Die Konstruktion erfolgte über die Restriktionsschnittstellen *SpeI/PacI*, *SpeI/PshAI* und *PacI/PshAI* (s. Kapitel 2.4.11.2, siehe auch Anhang Schema 2 und 3).

Die Koexpression von weiteren Enzymen sollte ausgehend von pSEVA44rha-Konstrukten erfolgen, die aufgrund des verwendeten pRO1600-Replikons in *Pseudomonas* mit einer mittleren Plasmidkopienzahl (13-16) vorliegen (Farinha und Kropinski 1989). Die Konstruktion eines Koexpressionsplasmids mit geringer (pSEVA42rha) und eines mit mittlerer Plasmidkopienzahl (pSEVA44rha) sollte einen Einfluss auf die Stärke der Koexpression ermöglichen, auch wenn die Expression nicht notwendigerweise von der Plasmidkopienzahl abhängen muss. Die in dieser Arbeit erzeugten und eingesetzten Koexpressionsplasmide werden in den nachfolgenden Ergebnisteilen näher beschrieben.

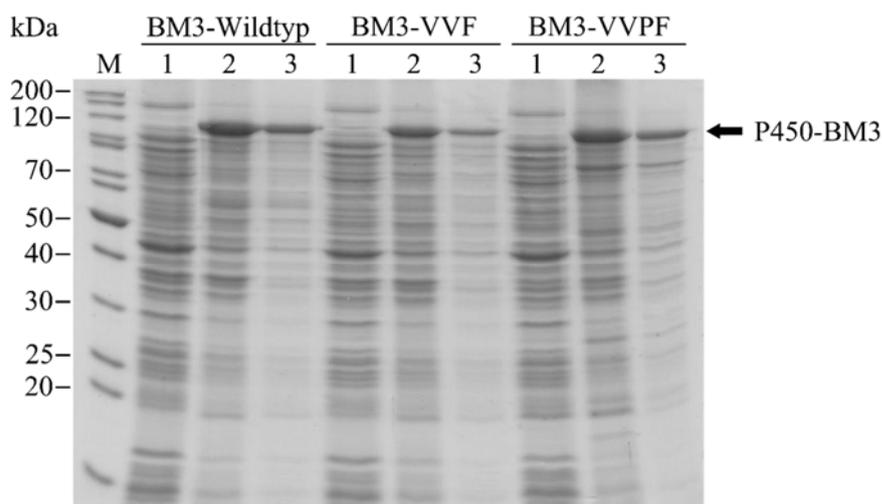
## 3.2. Entwicklung von *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren zur Umsetzung von *R*-(+)-Limonen zu *R*-(+)-Perillaalkohol

### 3.2.1. Auswahl einer P450 zur selektiven Oxidation von *R*-(+)-Limonen

Die Entwicklung eines Ganzzellbiokatalysators zur Oxidation von *R*-(+)-Limonen zu *R*-(+)-Perillaalkohol beinhaltete die Auswahl einer möglichst selektiven P450. Im Vergleich zu Mehrkomponentensystemen bietet P450-BM3 (CYP102A1) aus *B. megaterium* als natürliches Fusionsprotein den Vorteil, dass keine zusätzlichen Redoxpartner benötigt werden (s. Kapitel 1.2). Jedoch oxidiert die wildtypische P450-BM3 *R*-(+)-Limonen zu Limonen-1,2-epoxid (30%) Limonen-8,9-epoxid (7%), Isopiperitenol (54%) und Carveol (9%) und nicht zu *R*-(+)-Perillaalkohol (Seifert *et al.* 2009). Die durch Seifert und Kollegen entwickelte P450-BM3-Variante VVF (A264V/A328V/L437F) zeigt hingegen im Vergleich zur wildtypischen P450-BM3 und weiteren P450-BM3-Varianten mit 97% eine deutlich erhöhte Selektivität für die allylische Hydroxylierung des C7-Atoms von *R*-(+)-Limonen zu *R*-(+)-Perillaalkohol (Seifert *et al.* 2011). Neben *R*-(+)-Perillaalkohol wurden als weitere Produkte nur geringe Anteile an Limonen-1,2-epoxid (2%) und Limonen-8,9-epoxid (1%) gebildet (Seifert *et al.* 2009). Die von Redoxpartnern abhängigen P450cam und CYP153A6 wurden bereits erfolgreich zur selektiven Oxidation von *S*-(-)-Limonen zu *S*-(-)-Perillaalkohol in *E. coli*- und *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren eingesetzt (Cornelissen *et al.* 2011; Cornelissen *et al.* 2013; Kim und Ortiz de Montellano 2009; van Beilen *et al.* 2005). Aufgrund der hohen Selektivität und der Unabhängigkeit von Redoxpartnern wurde die P450-BM3-Variante VVF (BM3-VVF) für die Entwicklung eines *P. putida*-Ganzzellbiokatalysators zur Hydroxylierung von *R*-(+)-Limonen, zu *R*-(+)-Perillaalkohol ausgewählt, die im Weiteren nur noch als Limonen und Perillaalkohol bezeichnet werden.

Durch den Aminosäureaustausch I401P konnte in früheren Studien im Vergleich zur wildtypischen P450-BM3 sowohl die Aktivität als auch die Kopplungseffizienz für nicht-physiologische Substrate wie das Monoterpen (+)- $\alpha$ -Pinen verbessert werden (Whitehouse *et al.* 2009). Mit dem Ziel, eine erhöhte Aktivität und verbesserte Kopplungseffizienz zu erreichen, wurde daher in dieser Arbeit die P450-BM3-Variante VVPF (A264V/A328V/I401P/L437F) erzeugt.

Beide P450-BM3-Varianten, BM3-VVF und BM3-VVPF, sowie P450-BM3 Wildtyp wurden zunächst in *E. coli* unter gleichen Bedingungen exprimiert (Abbildung 13). Über CO-Differenzspektroskopie wurde die Konzentration aktiver P450 im Zelllysats bestimmt. BM3-VVF und BM3-VVPF wiesen mit 1100 nmol/l bzw. 1400 nmol/l ein 2-3mal geringeres Expressionsniveau pro Kulturvolumen im Vergleich zum P450-BM3 Wildtyp auf (3000 nmol/l).



**Abbildung 13. Analyse der Expression von P450-BM3 und P450-BM3-Varianten in *E. coli* per SDS-PAGE.** Die Expression erfolgte bei 25°C über 20 h in 400 ml TB-Medium. Als Expressionswirt von P450-BM3 Wildtyp und BM3-VVF wurde *E. coli* BL21 (DE3) verwendet. Die Expression von BM3-VVPF erfolgte in *E. coli* JM109-Zellen. Protein-Größenstandard (M); aufgetragen wurden Ganzzellproben vor (1) und 20 h nach Induktion (2) sowie eine Probe (15 µg) der löslichen Proteinfraction nach Zellaufschluss (3). Der Pfeil weist auf die exprimierten P450-BM3-Varianten (121 kDa) hin.

In *in-vitro*-Experimenten zur Umsetzung von Limonen zeigte BM3-VVPF im Vergleich zu BM3-VVF eine 7-fach höhere NADPH-Umsatzrate sowie eine 3-fach höhere Kopplungseffizienz (Tabelle 6). Zum Vergleich der katalytischen Produktivität wurde die gebildete Stoffmenge an Perillaalkohol auf die vorliegende Stoffmenge an P450 bezogen (Umsatzzahl, engl. *total turnover number*: TTN).

**Tabelle 6. Kopplungseffizienz und NADPH-Umsatzrate der BM3-Varianten.**

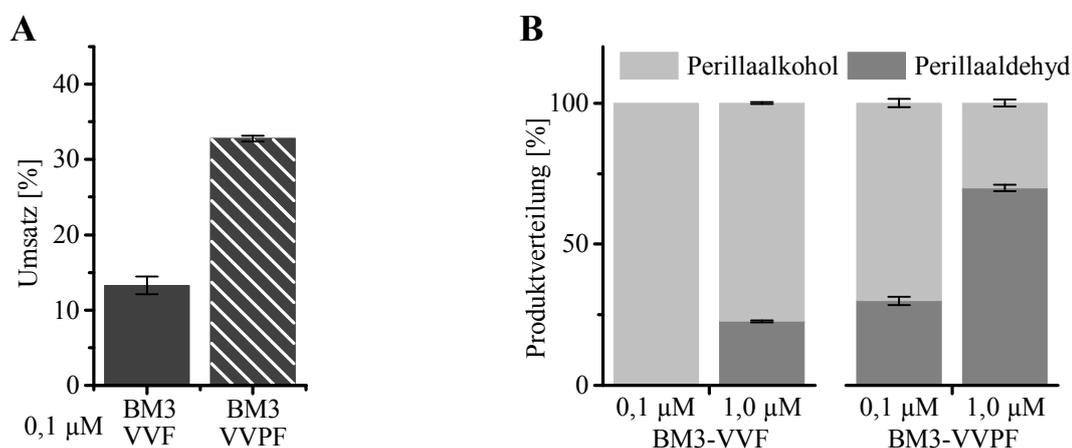
BM3-Variante	NADPH-Umsatzrate <sup>a</sup>	Kopplungseffizienz [%] <sup>b</sup>	TTN <sup>c</sup>
VVF	164 ± 1	13 ± 1	266
VVPF	1166 ± 10	43 ± 1	656

Reaktionsbedingungen (1 ml, 25°C): KPi-Puffer (50 mM, pH 7,5), DMSO (2% v/v), Limonen (200 µM), NADPH (200 µM), 0,1 µM P450 (BM3-VVF oder BM3-VVPF), Katalase (600 U). <sup>a</sup> angegeben in nmol NADPH pro min pro nmol P450; <sup>b</sup> berücksichtigt wurde, dass zwei NADPH Moleküle zur Bildung von Perillaaldehyd benötigt werden; <sup>c</sup> angegeben in nmol Produkt pro nmol P450.

Die höhere Kopplungseffizienz der BM3-VVPF im Vergleich zu BM3-VVF führte zu einem 2,5-fach höheren Substratumsatz (Abbildung 14 A). Der daraus resultierende höhere TTN der BM3-VVPF im Vergleich zur BM3-VVF (656 bzw. 266) zeigt die höhere katalytische Produktivität der BM3-VVPF (Tabelle 6).

Neben der Bildung von Perillaalkohol wurde durch beide Varianten die Weiteroxidation des gebildeten Perillaalkohols zu Perillaaldehyd beobachtet (Abbildung 14 B). Eine Bildung von Limonen-1,2-epoxid und Limonen-8,9-epoxid konnte nicht festgestellt werden.

Während durch BM3-VVF erst bei einer erhöhten Enzymkonzentration eine Weiteroxidation des gebildeten Perillaalkohols zu Perillaaldehyd (23%) beobachtet wurde, zeigten Umsetzungen mit BM3-VVPF bereits bei einer geringeren Enzymkonzentration die Bildung von Perillaaldehyd (30%). Bei erhöhter Enzymkonzentration wurde durch BM3-VVPF vermehrt Perillaaldehyd (70%) gebildet. (Abbildung 14 B).



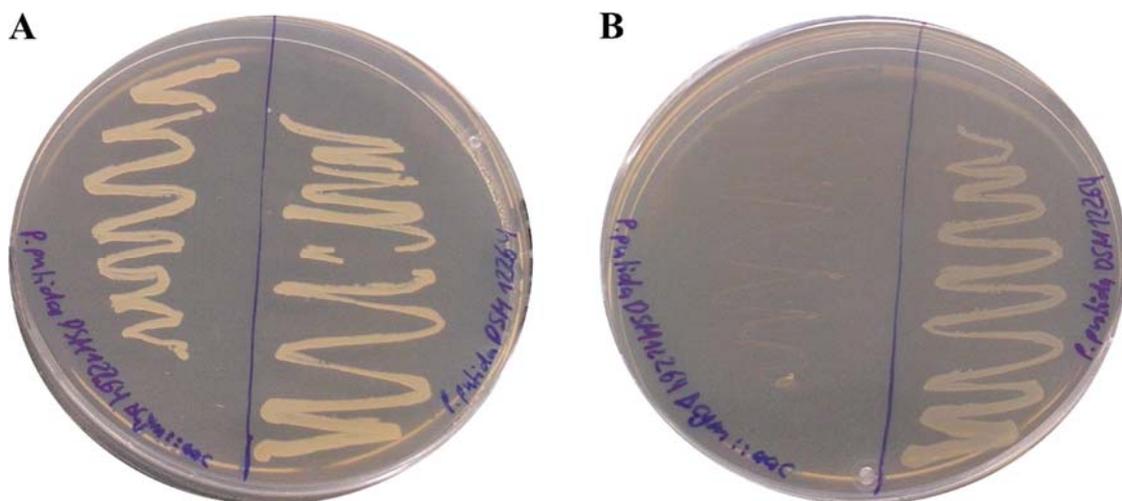
**Abbildung 14. Umsatz (A) und Produktverteilung (B) in der *in-vitro*-Umsetzung von Limonen durch BM3-VVF und BM3-VVPF.** Reaktionsbedingungen (1 ml, 25°C): KPi-Puffer (50 mM, pH 7,5), DMSO (2% v/v), (*R*)-Limonen (200 µM), NADPH (200 µM), 0,1 µM bzw. 1,0 µM P450 (BM3-VVF oder BM3-VVPF), Katalase (600 U).

Trotz der beobachteten Weiteroxidation des Perillaalkohols zu Perillaaldehyd handelt es sich bei den erzeugten BM3-VVF und BM3-VVPF um zwei hochselektive P450-BM3-Varianten, deren Verwendung im Folgenden in einem *P. putida*-Ganzzellsystem zur Produktion von Perillaalkohol untersucht wurde.

### 3.2.2. Herstellung des *P. putida*-Knockoutstamms *P. putida* DSM 12264 $\Delta cym::aac$

Die außergewöhnlich hohe Toleranz gegenüber dem zelltoxischen Monoterpen Limonen (Speelmans *et al.* 1998) macht *P. putida* DSM 12264 zu einem interessanten Stamm für die Produktion von Perillaalkohol, ausgehend von Limonen. *P. putida* DSM 12264 ist von Natur aus in der Lage Limonen zu Perillasäure zu oxidieren (Speelmans *et al.* 1998). Zur Produktion von Perillaalkohol in einem *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator durch heterolog exprimierte P450-BM3-Varianten wurde zunächst ein Knockoutstamm von *P. putida* DSM 12264 erzeugt, der einen vollständigen Aktivitätsverlust gegenüber Limonen aufweisen sollte. Analog zum *P. putida* F1-Stamm sind die an der Oxidation von Limonen beteiligte Enzyme durch Gene des *cym*-Operons codiert (s. Kapitel 1.3.5). Die Deletion des *cym*-Operons erfolgte über lambda-Red-Rekombination mit Hilfe des Helferplasmids pUCPK-18-RedS und einer Gentamycin-resistenzvermittelnden Insertionskassette (s. Kapitel 2.5.9).

Zur Überprüfung der erfolgten Deletion wurde zunächst der Knockoutstamm *P. putida* DSM 12264  $\Delta cym::aac$  (kurz *P. putida*  $\Delta cym$ ) hinsichtlich des Wachstums auf *p*-Cymol als einziger Kohlenstoffquelle untersucht. Als Kontrolle wurde ebenfalls der Wildtypstamm *P. putida* DSM 12264 eingesetzt. Während beide Stämme auf Glycerol-haltigen Agarplatten wuchsen, zeigte der Knockoutstamm im Vergleich zum Wildtypstamm auf *p*-Cymol-haltigen Agarplatten kein Wachstum (Abbildung 15).

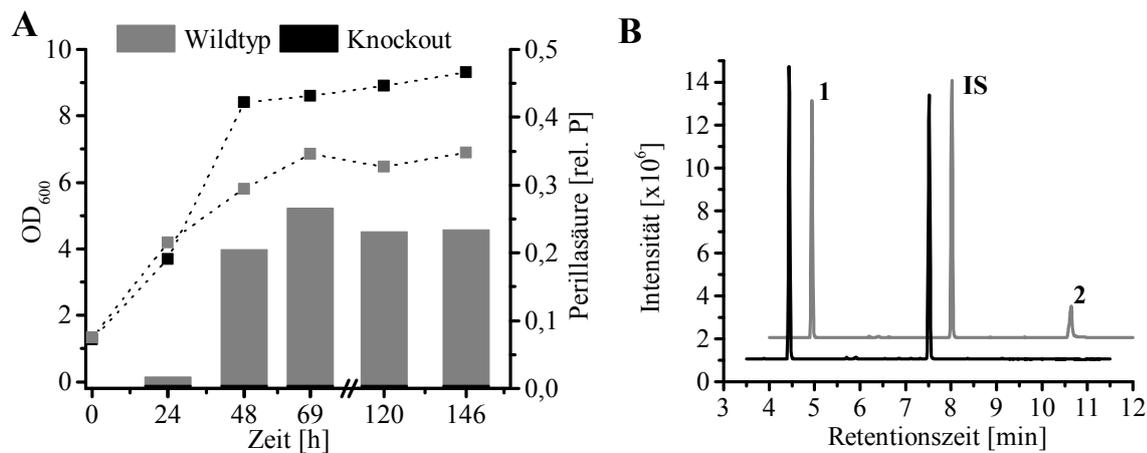


**Abbildung 15.** Wachstumstest von *P. putida*-Stämmen auf Agar mit Glycerol (A) oder *p*-Cymol (B) als einzige Kohlenstoffquelle. Auf den Agarplatten wurde jeweils links der Knockoutstamm *P. putida*  $\Delta cym$  bzw. rechts *P. putida* DSM 12264 (Wildtyp) ausgestrichen.

Zur weiteren Überprüfung wurden der Knockout- und Wildtypstamm unter gleichen Bedingungen zur Biotransformation von Limonen eingesetzt. Das Wachstumsverhalten beider Stämme unterschied sich im Zeitraum zwischen 0 h und 24 h zunächst nicht, wohingegen sich

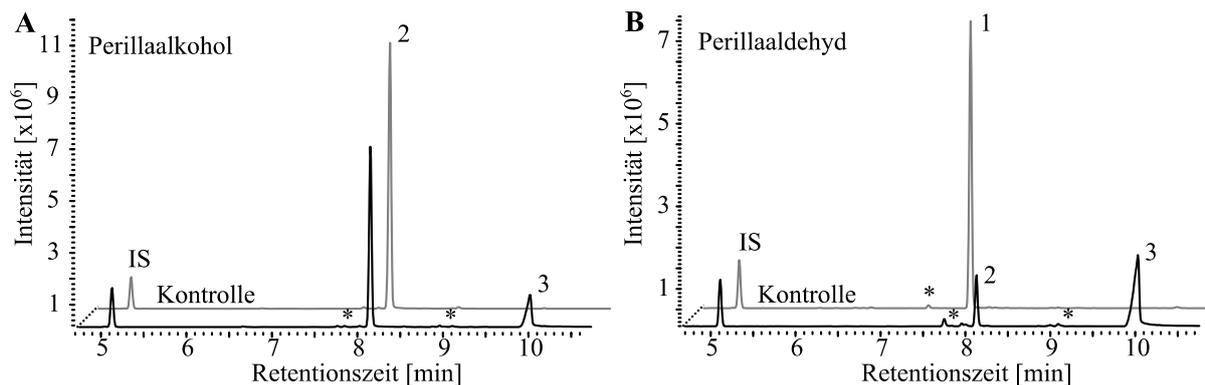
im Zeitraum zwischen 24 h und 48 h die Zelldichte des Knockoutstamms mehr als verdoppelte und der Wildtypstamm ein deutlich geringeres Wachstum zeigte (Abbildung 16 A).

Des Weiteren konnte durch den Wildtypstamm die Bildung von Perillasäure nachgewiesen werden (Abbildung 16 B). Nach 69 h konnte in beiden Stämmen keine deutliche Zunahme der Zelldichte beobachtet werden und auch durch den Wildtypstamm erfolgte keine weitere Bildung von Perillasäure. Durch den Knockoutstamm wurde zu keinem Zeitpunkt Perillasäure, Perillaaldehyd oder Perillaalkohol gebildet. Die Deletion des *cym*-Operons führte somit zu einem vollständigen Aktivitätsverlust des Knockoutstamms gegenüber Limonen.



**Abbildung 16. Biotransformation von Limonen durch *P. putida* DSM 12264  $\Delta cym::aac$  (schwarz) bzw. *P. putida* DSM 12264 (grau).** Verlauf der Biotransformation (A) mit optischer Zelldichte (Quadrat, OD<sub>600</sub>) und relativer Menge gebildeter Perillasäure (Säulen, rel. P.: Quotient aus Peakfläche der gebildeten Perillasäure und des internen Standards Carvon (75 mM)). GC-Chromatogramm nach Biotransformation von Limonen über 48 h (B): Limonen (1), Perillasäure (2), Carvon (IS). Bedingungen (30°C, 180 rpm, 146 h): 50 ml E2-Medium, 150 mM Limonen.

Neben der Bildung von Perillasäure ausgehend von Limonen ist *P. putida* DSM 12264 ebenfalls in der Lage Perillasäure ausgehend von Perillaalkohol oder Perillaaldehyd zu bilden (Speelmans *et al.* 1998). Pseudomonaden sind in der Lage eine Vielzahl von Terpenen über unterschiedliche Stoffwechselwege abzubauen (Molina *et al.* 2013). Um trotz der Deletion des *cym*-Operons dennoch vorhandene Aktivität weiterer Enzyme gegenüber Perillaalkohol bzw. Perillaaldehyd aufzudecken, wurde Perillaalkohol bzw. Perillaaldehyd in verschiedenen Konzentrationen (0,2-2,0 mM) zu ruhenden Zellen des Knockoutstamms *P. putida*  $\Delta cym$  gegeben. Perillaalkohol konnte durch *P. putida*  $\Delta cym$  zu Perillasäure oxidiert werden; der Umsatz lag zwischen 21% und 36% (Tabelle 7). Je höher die eingesetzte Konzentration an Perillaalkohol war, desto mehr Perillasäure wurde gebildet. Eine Bildung von Perillaaldehyd konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 17 A).



**Abbildung 17. Chromatogramme nach achiraler GC-Analyse der Umsetzung von 2 mM Perillaalkohol (A) und Perillaaldehyd (B) durch *P. putida*  $\Delta$ cym (schwarz).** Als Kontrolle (grau) wurde ein Ansatz ohne Zugabe von Zellen in gleicher Weise behandelt. Perillaaldehyd (1), Perillaalkohol (2), Perillasäure (3), Fenchon (IS, 250  $\mu$ M), \*Verunreinigungen aus dem Extraktionsmittel, eingesetzten Perillaalkohol bzw. Perillaaldehyd. Reaktionsbedingungen (1 ml, 20 rpm, 25°C, 2 h), 2% DMSO (v/v), 2% (m/v) Glycerol in 50 mM KPi-Puffer (pH 7,5), eingesetzt wurden 8,5 g/l ruhende *P. putida*  $\Delta$ cym-Zellen nach Kultivierung.

Perillaaldehyd wurde in allen Fällen vollständig zu Perillaalkohol und Perillasäure umgesetzt. Perillasäure stellte auch hier das Hauptprodukt dar (Abbildung 17 B). Bei Verwendung höherer Konzentration an Perillaaldehyd stieg der Anteil des in der Umsetzung gebildeten Perillaalkohols an (Tabelle 7).

**Tabelle 7. Untersuchung der Aktivität von *P. putida*  $\Delta$ cym gegenüber Perillaalkohol und Perillaaldehyd.**

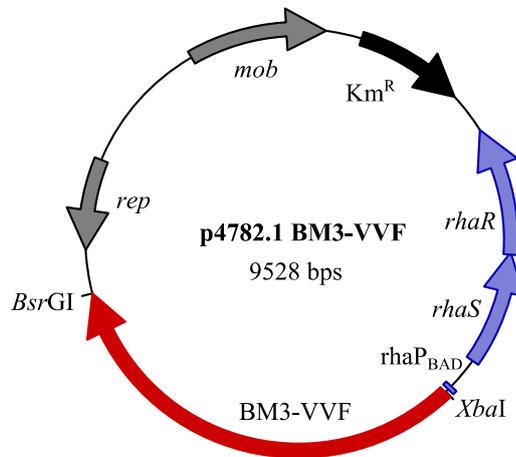
Substrat*	Perillaalkohol			Perillaaldehyd		
	Anteil nach Umsetzung [%]			Anteil nach Umsetzung [%]		
Konz. [ $\mu$ M]	Perilla-alkohol	Perilla-aldehyd	Perilla-säure	Perilla-alkohol	Perilla-aldehyd	Perilla-säure
200	78	-	22	8	-	92
500	79	-	21	12	-	88
1000	76	-	24	14	-	86
1500	64	-	36	17	-	83
2000	74	-	26	23	-	77

\* Werte erhalten in einer Einzelbestimmung, weitere Versuche zeigten dasselbe Ergebnis. Reaktionsbedingungen siehe Abbildung 17.

Obwohl in der Biotransformation von Limonen durch den Knockoutstamm keine Bildung von Perillasäure festgestellt werden konnte, führte die Deletion des *cym*-Operons nicht zu einem vollständigen Aktivitätsverlust gegenüber Perillaalkohol und Perillaaldehyd. Da in der Biotransformation Perillaalkohol durch *P. putida*  $\Delta$ cym nur teilweise zu Perillasäure oxidiert wurde, wurde der Knockoutstamm *P. putida*  $\Delta$ cym als Wirtstamm in Kombination mit den ausgewählten P450-BM3-Varianten eingesetzt.

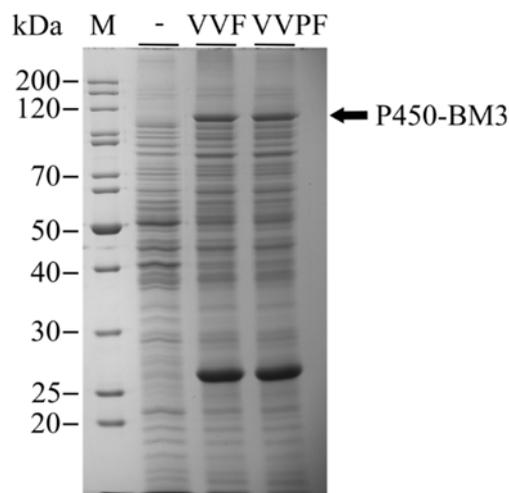
### 3.2.3. Erste Umsetzungen von Limonen durch *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren

Zur Expression in *P. putida*  $\Delta cym$  wurden die Gene von BM3-VVF und BM3-VVPF in das durch L-Rhamnose induzierbare Expressionsplasmid p4782.1 eingebracht (Abbildung 18).



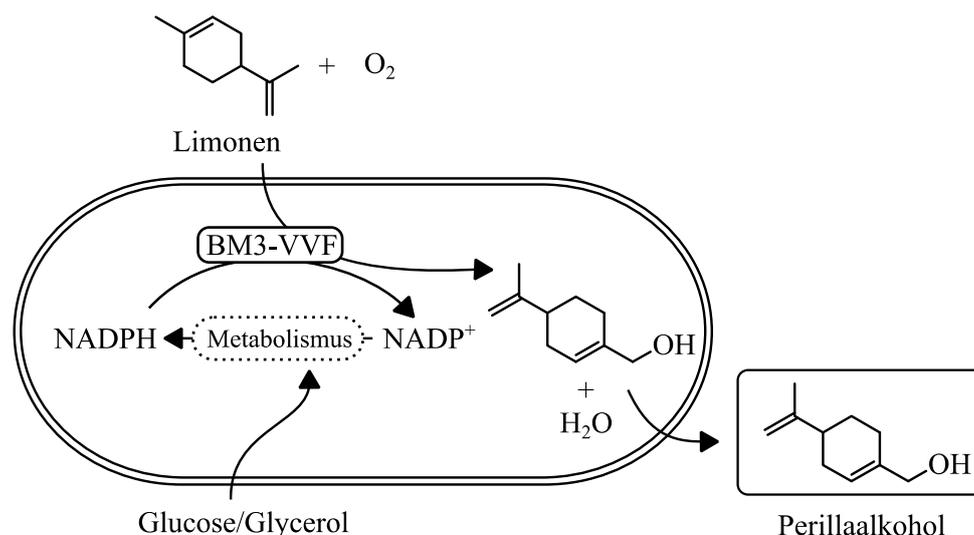
**Abbildung 18. Schematische Darstellung des Expressionsplasmids p4782.1 BM3-VVF.** BM3-VVF-Gen (rot), Selektionsmarker (schwarz): Kanamycinresistenzgen, L-Rhamnose-Promotor rhaP und Aktivator-Gene *rhaR* und *rhaS* (hellblau); weitere Plasmidelemente (grau). Die Klonierung erfolgte über die Restriktionsschnittstellen *BsrGI* und *XbaI* (s. Kapitel 2.4.11.3).

Eine Expressionsoptimierung von BM3-VVF in *P. putida* erfolgte im Rahmen einer Bachelorarbeit (Hilberath 2013). Durch eine längere Expressionszeit (40 h) im Vergleich zu *E. coli* konnte in *P. putida* ein höheres P450-Expressionsniveau erreicht werden. BM3-VVF und BM3-VVPF wurden unter optimierten Bedingungen heterolog in *P. putida*  $\Delta cym$  exprimiert. Sowohl BM3-VVF als auch BM3-VVPF konnten in *P. putida* erfolgreich exprimiert werden (Abbildung 19).



**Abbildung 19. Analyse der Expression von BM3-VVF und BM3-VVPF in *P. putida* per SDS-PAGE.** Die Expression erfolgte bei 25°C über 40 h in 50 ml TB-Medium. Protein-Größenstandard (M); aufgetragen wurden Ganzzellproben nach Expression von BM3-VVF (VVF) und BM3-VVPF (VVPF) in *P. putida*  $\Delta cym$  40 h nach Induktion; als Kontrolle wurde eine Ganzzellprobe von *P. putida*  $\Delta cym$  verwendet (-). Pfeil weist auf die exprimierten P450-BM3-Varianten (121 kDa) hin.

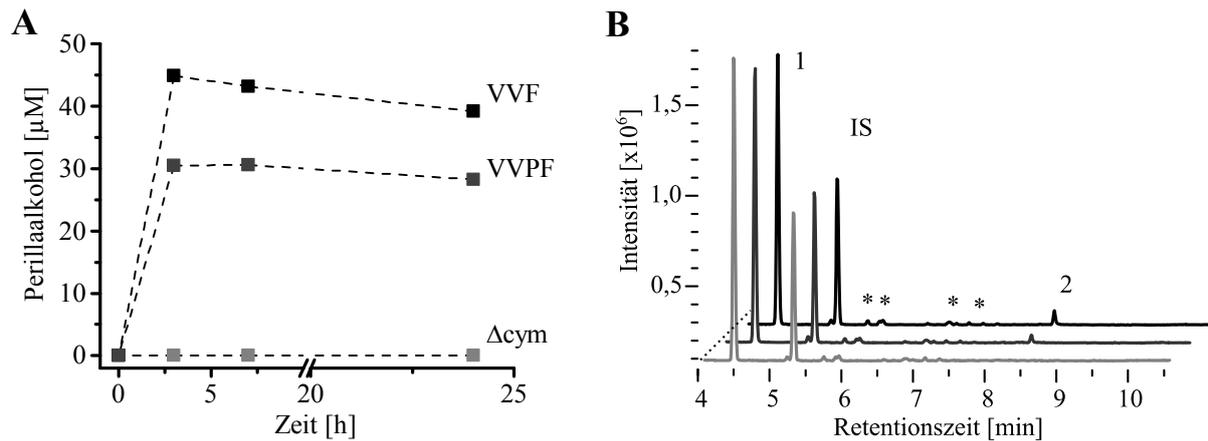
Im Vergleich zu der Expression in *E. coli* lag das Expressionslevel von BM3-VVF mit 1800 nmol/l (300 nmol/g<sub>cdw</sub>) pro Kulturvolumen in *P. putida* etwas höher. Bei der Expression von BM3-VVVF wurde hingegen mit 800 nmol/l (130 nmol/g<sub>cdw</sub>) in *P. putida* eine geringere P450-Konzentration erreicht. Im Anschluss an die Expression von BM3-VVF und BM3-VVVF in *P. putida*  $\Delta cym$  wurden entsprechende Zellen als Ganzzellbiokatalysatoren zur Umsetzung von Limonen eingesetzt (Abbildung 20). *P. putida*  $\Delta cym$ -Zellen, die keine rekombinante P450 exprimierten, wurden als Kontrolle verwendet.



**Abbildung 20.** *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator zur selektiven Oxidation von Limonen zu Perillaalkohol durch BM3-VVF. Die Bereitstellung und Regenerierung des für die P450-katalysierte Reaktion benötigten Kofaktors NADPH erfolgte über den Zellmetabolismus.

Während *P. putida*  $\Delta cym$ -Zellen, in denen BM3-VVF bzw. BM3-VVVF exprimiert wurde, in der Lage waren Perillaalkohol zu bilden, zeigten *P. putida*  $\Delta cym$ -Zellen, in denen keine P450 exprimiert worden war, keine Umsetzung von Limonen (Abbildung 21).

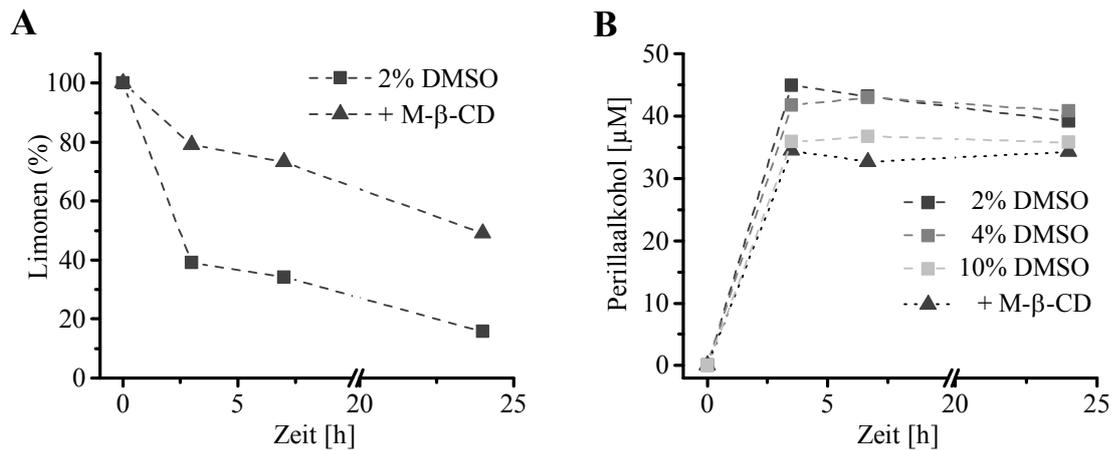
Trotz höherer Aktivität und Kopplungseffizienz von BM3-VVVF in den vorherigen *in-vitro*-Experimenten (s. Kapitel 3.2.1) konnte mit dem Ganzzellbiokatalysator BM3-VVF mit 45  $\mu$ M im Vergleich zu BM3-VVVF mit 30  $\mu$ M eine leicht höhere Konzentration an Perillaalkohol erzielt werden (Abbildung 21 A). Ursächlich hierfür sind möglicherweise die unterschiedlich hohen P450-Expressionsniveaus (300 nmol/g<sub>cdw</sub> vs. 130 nmol/g<sub>cdw</sub>). Nach 3 h Reaktionszeit wurde durch beide Ganzzellbiokatalysatoren kein weiterer Perillaalkohol produziert. Eine Weiteroxidation des gebildeten Perillaalkohols zu Perillaaldehyd oder Perillasäure konnte zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden (Abbildung 21 B). Für weitere Untersuchungen und die Optimierung des *P. putida*-Ganzzellbiokatalysators wurde die P450-BM3-Variante BM3-VVF ausgewählt.



**Abbildung 21. Biotransformation von Limonen nach Expression von BM3-VVF (schwarz) oder BM3-VVPF (dunkel-grau) in *P. putida*  $\Delta\text{cym}$  (A). GC-Chromatogramme nach 3 h Umsetzung (B). Kontrolle: *P. putida*  $\Delta\text{cym}$ -Zellen (hell-grau). Limonen (1), Fenchon (IS, 250  $\mu\text{M}$ ), Perillaalkohol (2), \*Verunreinigungen aus dem Extraktionsmittel bzw. eingesetzten Limonen. Reaktionsbedingungen: (1 ml, 20 rpm, 25°C, 24 h), 2 mM Limonen, Glycerol, 2% DMSO (v/v) in 50 mM KPi-Puffer (pH 7,5); ruhende Zellen: BM3-VVF 5,1  $\text{g}_{\text{cdw}}/\text{l}$  (P450: 300  $\text{nmol}/\text{g}_{\text{cdw}}$ ), BM3-VVPF 5,0  $\text{g}_{\text{cdw}}/\text{l}$  (P450: 130  $\text{nmol}/\text{g}_{\text{cdw}}$ ) oder  $\Delta\text{cym}$  5,4  $\text{g}_{\text{cdw}}/\text{l}$ .**

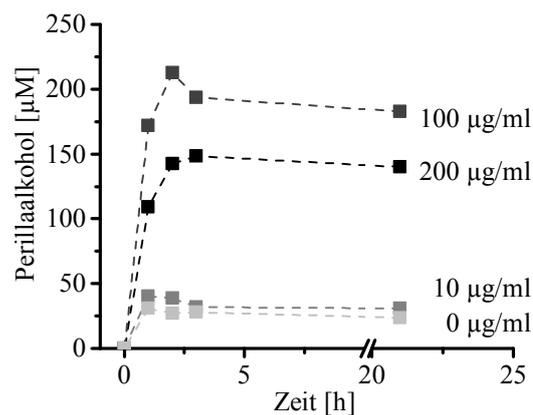
### 3.2.4. Einfluss des Stofftransfers im *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator

Limonen ist in Wasser nur schwer löslich (13,8 mg/l, logP 4,4) und leicht flüchtig (Massaldi und King 1973; Schmid *et al.* 1992). Beides beeinflusst die Substratkonzentration im wässrigen Medium, sodass durch eine geringe Substratverfügbarkeit die Aufnahme von Limonen in die Zelle beeinträchtigt werden kann. In Biotransformationen von Limonen wurde daher als Löslichkeitsvermittler 2-10% DMSO eingesetzt. Alternativ wurde die Zugabe von Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M- $\beta$ -CD) zusätzlich zu 2% DMSO getestet. Im Verlauf der Biotransformation ging ein Großteil des eingesetzten Limonens durch Evaporation verloren (Abbildung 22 A). In den Biotransformationen mit 2% DMSO wurden hierdurch der Reaktion nach 3 h fast 60% des eingesetzten Limonens entzogen. Im Vergleich dazu konnte in Biotransformationen nach Zugabe von M- $\beta$ -CD nach 3 h mit 20% eine deutlich geringere Abnahme des Limonens beobachtet werden (Abbildung 22 A). Dennoch führte die hierdurch verbesserte Substratverfügbarkeit nicht zu einem höheren Substratumsatz (Abbildung 22 B). Auch die Verwendung höherer DMSO-Konzentrationen (Abbildung 22 B) oder eine erneute Zugabe von 2 mM Limonen nach drei- und sechsständiger Biotransformation führte nicht zu einer verbesserten Umsetzung.



**Abbildung 22. Verfügbarkeit (%) von Limonen bezogen auf die Ausgangskonzentration (A) und Biotransformation von Limonen nach Expression von BM3-VVF in *P. putida*  $\Delta cym$  (B).** Getestet wurden verschiedene DMSO-Konzentrationen (Quadrate) sowie die Zugabe von Methyl- $\beta$ -cyclodextrin zu 2% DMSO (Dreieck). Reaktionsbedingungen (1 ml, 20 rpm, 25°C, 24 h), 2 mM Limonen, 2-10% DMSO (v/v), 10 mM Methyl- $\beta$ -cyclodextrin in 50 mM KPi-Puffer (pH 7,5); ruhende Zellen: 5,1 g<sub>cdw</sub>/l (P450: 300 nmol/g<sub>cdw</sub>). Werte erhalten aus unabhängigen Einzelreaktionen, weitere unabhängige Experimente bestätigten das Ergebnis.

Die Tatsache, dass nach 3 h keine weitere Bildung von Perillaalkohol erfolgte und mit maximal 45 μM nur eine geringe Konzentration an Perillaalkohol erzielt wurde, wies darauf hin, dass neben der Substratverfügbarkeit weitere Limitierungen vorlagen. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften von Limonen konnte nicht ausgeschlossen werden, dass auch eine eingeschränkte Substrataufnahme über die äußere Zellmembran *P. putidas* die Hydroxylierung von Limonen beeinträchtigte. Zur Untersuchung dieses Aspekts wurde Polymyxin B in vier verschiedenen Konzentrationen zur Permeabilisierung der Zellen eingesetzt und die Bildung von Perillaalkohol über 21 h analysiert (Abbildung 23).



**Abbildung 23. Biotransformation von Limonen nach Zugabe von Polymyxin B.** Eingesetzt wurden ruhende *P. putida*  $\Delta cym$ -Zellen nach Expression von BM3-VVF. Reaktionsbedingungen (1 ml, 20 rpm, 25°C, 21 h), 2 mM Limonen, 2% DMSO (v/v), 0-200 μg/ml Polymyxin B in 50 mM KPi-Puffer (pH 7,5); ruhende Zellen: 8,3 g<sub>cdw</sub>/l (P450: 297 nmol/g<sub>cdw</sub>). Werte erhalten aus unabhängigen Einzelreaktionen, weitere unabhängige Experimente bestätigten das Ergebnis.

Die Zugabe von 10 µg/ml führte zu keiner wesentlich erhöhten Produktbildung. Im Gegensatz dazu konnte durch die Zugabe von 100 µg/ml Polymyxin nach 3 h die Bildung von Perillaalkohol mit 213 µM fast um das 5-Fache im Vergleich zu Zellen, die nicht permeabilisiert wurden, gesteigert werden. Eine höhere Zugabe an Polymyxin (200 µg/ml) führte zu keiner zusätzlichen Verbesserung.

In weiteren Experimenten wurde zur unterstützten Aufnahme von Limonen die Koexpression der Membranproteine CymD und AlkL getestet. Zur Koexpression wurden *cymD* bzw. *alkL* in das Koexpressionsplasmid pSEVA42rha eingebracht (Anhang, Abbildung 48). Die Koexpression in *P. putida*  $\Delta cym$  erfolgte in Verbindung mit BM3-VVF, codiert auf p4782.1 (Abbildung 18). Die *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren BM3-VVF/CymD oder BM3-VVF/AlkL wiesen mit 200 nmol/g<sub>cdw</sub> im Vergleich zu BM3-VVF eine 30% geringere P450-Expression auf (Tabelle 8). Während die Koexpression von AlkL trotz niedriger P450-Konzentration in BM3-VVF/AlkL zu einer erhöhten Bildung von Perillaalkohol im Vergleich zu BM3-VVF führte, konnte durch Koexpression von CymD in BM3-VVF/CymD die Bildung von Perillaalkohol nicht verbessert werden. Zum Vergleich der katalytischen Produktivität wurde auch hier der TTN bestimmt. Durch Verwendung von Polymyxin B oder die Koexpression von AlkL konnte der erzielte TTN gesteigert werden (Tabelle 8). Nach dreistündiger Reaktion konnte auch hier keine weitere Produktbildung beobachtet werden.

**Tabelle 8. Umsetzung von Limonen durch die *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren BM3-VVF, BM3-VVF/CymD und BM3-VVF/AlkL sowie BM3-VVF nach Permeabilisierung durch Polymyxin B.**

<i>P. putida</i> $\Delta cym$	cdw [g/l]	P450 [nmol/g <sub>cdw</sub> ]	Perillaalkohol <sup>a</sup> [µM]	TTN <sup>b</sup>
BM3-VVF	5,1	301	45 <sup>c</sup>	29
BM3-VVF/CymD	5,6	196	35 ± 1 <sup>d</sup>	27
BM3-VVF	8,3	297	28 <sup>c</sup>	11
BM3-VVF/AlkL	8,7	193	93 ± 3 <sup>d</sup>	55
BM3-VVF + Polymyxin B	8,3	297	213 <sup>c</sup>	86

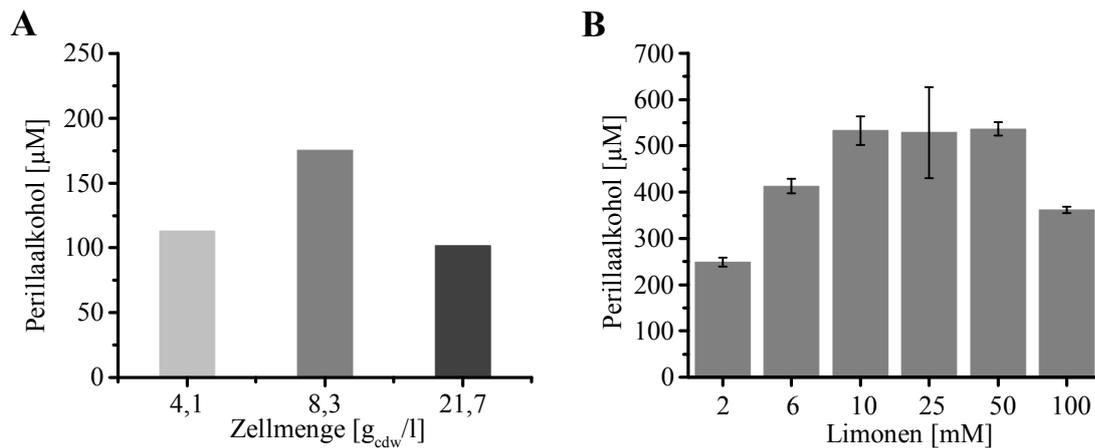
Eingesetzt wurden ruhende *P. putida*  $\Delta cym$ -Zellen nach Expression. Reaktionsbedingungen (1 ml, 20 rpm, 25°C, 3 h): 2 mM Limonen, 2% DMSO (v/v) in 50 mM KPi-Puffer (pH 7,5); Permeabilisierung mit 100 µg/ml Polymyxin B. <sup>a</sup>Maximal erzielte Konzentration nach 3 h, <sup>b</sup>angegeben in nmol Perillaalkohol pro nmol P450, <sup>c</sup>Werte erhalten in einer Einzelreaktion (siehe Abbildung 22 B bzw. Abbildung 23), weitere unabhängige Experimente bestätigten das Ergebnis, <sup>d</sup>Mittelwerte erhalten aus drei unabhängigen Reaktionen.

Die durch Koexpression von AlkL oder Verwendung von Polymyxin B erzielten Verbesserungen wiesen darauf hin, dass die Produktivität des verwendeten *P. putida*-Ganzzellbiokatalysators durch die geringe Membrangängigkeit für Limonen beeinflusst wurde. In weiteren Versuchen wurden durch Polymyxin B permeabilisierte Zellen eingesetzt.

### 3.2.5. Einfluss der Biokatalysator- und Substratkonzentration

Die eingesetzte Biokatalysatorkonzentration sowie eine unzureichende Sauerstoffversorgung bei der Verwendung hoher Biokatalysatorkonzentrationen können die Produktivität eines P450-Ganzzellbiokatalysators beeinflussen (Hernández-Martín *et al.* 2014; Janocha und Bernhardt 2013). Eine ausreichende Sauerstoffversorgung trägt neben der Bereitstellung an Sauerstoff für die P450-katalysierte Hydroxylierungsreaktion zur Aufrechterhaltung des Energiestoffwechsels und dadurch zur Bereitstellung der benötigten NAD(P)H-Kofaktoren bei. Bereits ohne Permeabilisierung der Zellen schien die eingesetzte Biokatalysatorkonzentration einen Einfluss auf die Produktivität des *P. putida*-Ganzzellbiokatalysators BM3-VVF zu haben (Tabelle 8). Für den permeabilisierten *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator BM3-VVF wurde der Einfluss der eingesetzten Biokatalysatorkonzentration mit einer Zellmenge von 4,1, 8,3 bzw. 21,7 g<sub>cdw</sub>/l getestet. Dabei wurde vermutet, dass bei ausreichender Sauerstoffversorgung eine Erhöhung der Zellmenge zu einem höheren Substratumsatz führen könnte. Mit einer Zellmenge von 8,3 g<sub>cdw</sub>/l konnte nach 3 h mit 175 µM die höchste Konzentration an Perillaalkohol erzielt werden. Eine weitere Erhöhung der Zellmenge auf 21,7 g<sub>cdw</sub>/l führte nicht zu einer höheren Produktkonzentration (Abbildung 24 A). Mit einer niedrigeren Zellmenge von 4,1 g<sub>cdw</sub>/l konnte sogar eine leicht höhere Produktkonzentration im Vergleich zu der höchsten getesteten Zellmenge erzielt werden. In weiteren Versuchen wurde als ein möglicher Kompromiss zwischen Biokatalysatorkonzentration und Sauerstoffversorgung eine Zellmenge von 8-10 g<sub>cdw</sub>/l eingesetzt.

Es wurde angenommen, dass durch eine maximierte Substratverfügbarkeit bei Einsatz höherer Substratkonzentrationen die Produktivität permeabilisierter Zellen gesteigert und der Einfluss einer vorzeitigen Evaporation minimiert werden könnte. Mit dem Ziel einer hierdurch verbesserten Ganzzellbiokatalyse wurden initiale Substratkonzentrationen zwischen 2 mM und 100 mM Limonen getestet. Die geringe Löslichkeit von Limonen führte hierbei zur Ausbildung eines Zweiphasensystems. Bei Verwendung von 2 mM Limonen wurden nach 3 h 250 µM Perillaalkohol gebildet (Abbildung 24 B). Dies ist vergleichbar mit dem vorherigen Ergebnis im Test verschiedener Polymyxin-Konzentrationen (Tabelle 8). Durch den Einsatz von 6 mM bzw. 10 mM Limonen konnte die Konzentration an Perillaalkohol auf 410 µM bzw. 530 µM gesteigert werden. Die Verwendung höherer Konzentrationen (>10 mM Limonen) bewirkte hingegen keine zusätzliche Verbesserung.

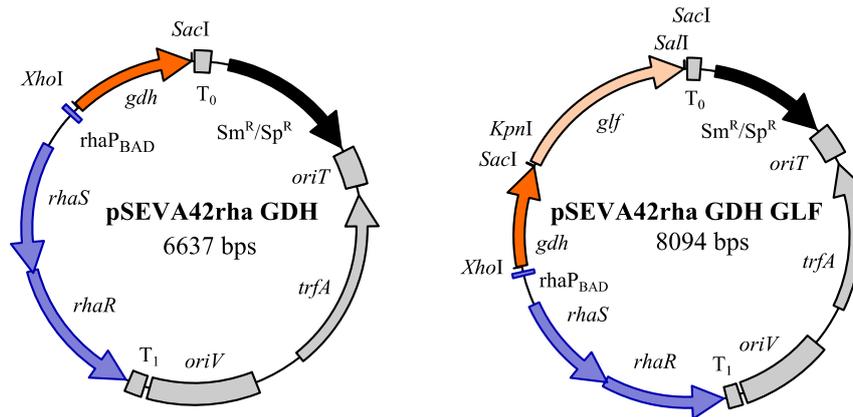


**Abbildung 24. Einfluss der eingesetzten Zellmenge (A) und Substratkonzentration (B) auf die Produktion von Perillaalkohol im permeabilisierten *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator BM3-VVF.** Eingesetzt wurden permeabilisierte ruhende *P. putida*  $\Delta cym$ -Zellen nach Expression von BM3-VVF. (A) Reaktionsbedingungen (1 ml, 20 rpm, 25°C, 3 h), 2 mM Limonen, 2% DMSO (v/v), 100  $\mu g/ml$  Polymyxin B in 50 mM KPi-Puffer (pH 7,5); ruhende Zellen: 4,1, 8,3 und 21,7  $g_{cdw}/l$  (P450: 297 nmol/ $g_{cdw}$ ). Werte erhalten aus unabhängigen Einzelreaktionen, weitere unabhängige Experimente bestätigen das Ergebnis. (B) Reaktionsbedingungen (1 ml, 20 rpm, 25°C, 3 h), 2-100 mM Limonen, 2% DMSO (v/v), 100  $\mu g/ml$  Polymyxin B in 50 mM KPi-Puffer (pH 7,5); ruhende Zellen: 8,6  $g_{cdw}/l$  (P450: 297 nmol/ $g_{cdw}$ ). Werte erhalten aus unabhängigen Dreifachbestimmungen.

Die Tatsache, dass trotz verbessertem Stofftransfer durch Permeabilisierung, einer optimierten Biokatalysatorkonzentration und einer maximierten Substratverfügbarkeit keine höheren Produkttiter erzielt werden konnten, deutete darauf hin, dass die katalytische Aktivität des Ganzzellbiokatalysators BM3-VVF eine höhere Produktivität verhinderte.

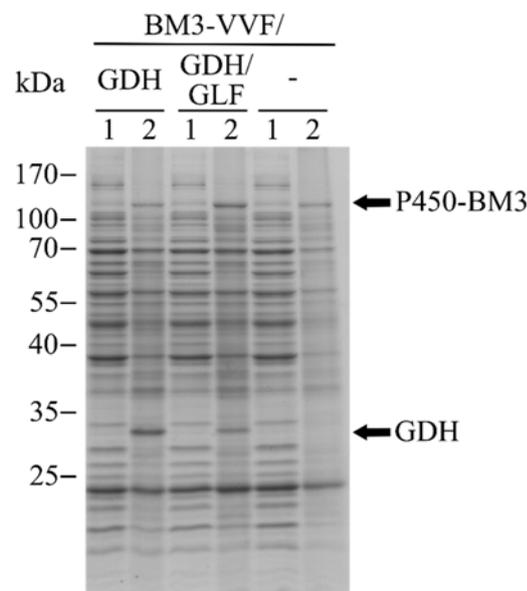
### 3.2.6. Effekt einer unterstützten Kofaktorregenerierung

Die Verfügbarkeit der benötigten NAD(P)H-Kofaktoren ist entscheidend für P450-katalysierte Reaktionen (Blank *et al.* 2008). In Ganzzellbiokatalysatoren erfolgt die kontinuierliche Bereitstellung der benötigten Kofaktoren durch den Zellmetabolismus (Blank *et al.* 2010). Dennoch kann eine unzureichende zelluläre Kofaktorversorgung die Produktivität des Ganzzellkatalysators beeinträchtigen (Bühler *et al.* 2008; Schewe *et al.* 2008). Um den Effekt einer unterstützten Kofaktorregenerierung in der Umsetzung von Limonen durch *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren zu untersuchen, wurde die Koexpression einer NADPH-regenerierenden GDH im *Pseudomonas*-Ganzzellbiokatalysator etabliert. Hierzu wurde das Gen der Glucosedehydrogenase IV aus *B. megaterium* (*gdh*) in das Koexpressionsplasmid pSEVA42rha eingebracht (Abbildung 25). Zur erleichterten Glucoseaufnahme wurde zusätzlich das Gen *glf* des Glucose-Facilitators aus *Zymomonas mobilis* (Weisser *et al.* 1995) in ein artifizielles bicistronisches Operon mit *gdh* in pSEVA42rha kloniert.



**Abbildung 25. Schematische Darstellung der Koexpressionsplasmide, pSEVA42rha GDH und pSEVA42rha GDH GLF.** Antibiotika-Selektionsmarker (*aadA*): Resistenz gegenüber Streptomycin und Spectinomycin (schwarz), L-Rhamnose-Promotorsystem (hell-blau) und RK2-Replikationsursprung sowie weitere Plasmidelemente (grau), *gdh* (orange), *glf* (rosa). Die Klonierung erfolgte über DNA-Assemblierung s. Kapitel 2.4.11.5.

Alle Proteine konnten in *P. putida* erfolgreich koexprimiert werden (Abbildung 26). In den Ganzzellbiokatalysatoren BM3-VVF/GDH und BM3-VVF/GDH/GLF führte die Koexpression der GDH zu einer verringerten Expression der BM3-VVF im Vergleich zu Zellen, in denen ausschließlich BM3VVF exprimiert wurde (Tabelle 9). Des Weiteren hatte die zusätzliche Koexpression von GLF in BM3-VVF/GDH/GLF eine geringere Expression der GDH und als Konsequenz eine verringerten GDH-Aktivität zur Folge (Tabelle 9).



**Abbildung 26. Analyse der Koexpression von BM3-VVF mit GDH (BM3-VVF/GDH) sowie BM3-VVF mit GDH und GLF (BM3-VVF/GDH/GLF) in *P. putida* per SDS-PAGE.** Die Expression erfolgte bei 25°C über 43 h in 50 ml TB-Medium. Aufgetragen wurden Ganzzellproben vor (1) und 43 h nach Induktion (2) der Expression. Pfeile weisen auf die in *P. putida*  $\Delta cym$  exprimierten BM3-VVF (121 kDa) und GDH (28 kDa) hin. GLF (50 kDa) war aufgrund der vermutlich schwachen Expression in der SDS-PAGE nicht sichtbar. Zellen, in denen ausschließlich BM3-VVF exprimiert wurde (BM3-VVF/-), trugen zusätzlich das pSEVA42rha Leerplasmid.

Neben den Ganzzellbiokatalysatoren BM3-VVF/GDH und BM3-VVF/GDH/GLF wurde als Kontrolle BM3-VVF zur Umsetzung von Limonen eingesetzt. Die höchste Konzentration an Perillaalkohol wurde durch BM3-VVF erreicht (Tabelle 9). Die Koexpression von GDH bzw. GDH und GLF bewirkte trotz der zu erwartenden verbesserten Kofaktorversorgung keinen höheren Substratumsatz. Durch BM3-VVF/GDH und BM3-VVF/GDH/GLF konnten mit 190  $\mu\text{M}$  bzw. 128  $\mu\text{M}$  sogar nur 2- bis 3-fach geringere Konzentrationen an Perillaalkohol im Vergleich zu BM3-VVF erzielt werden. Obwohl BM3-VVF/GDH eine 1,5-fach höhere TTN aufwies als BM3-VVF (Tabelle 9), wies die geringere Bildung von Perillaalkohol darauf hin, dass in den eingesetzten Ganzzellbiokatalysatoren nicht die Kofaktorversorgung limitierend wirkte, sondern womöglich die eingesetzte P450 und deren Konzentration die Bildung höherer Produktkonzentrationen verhinderte.

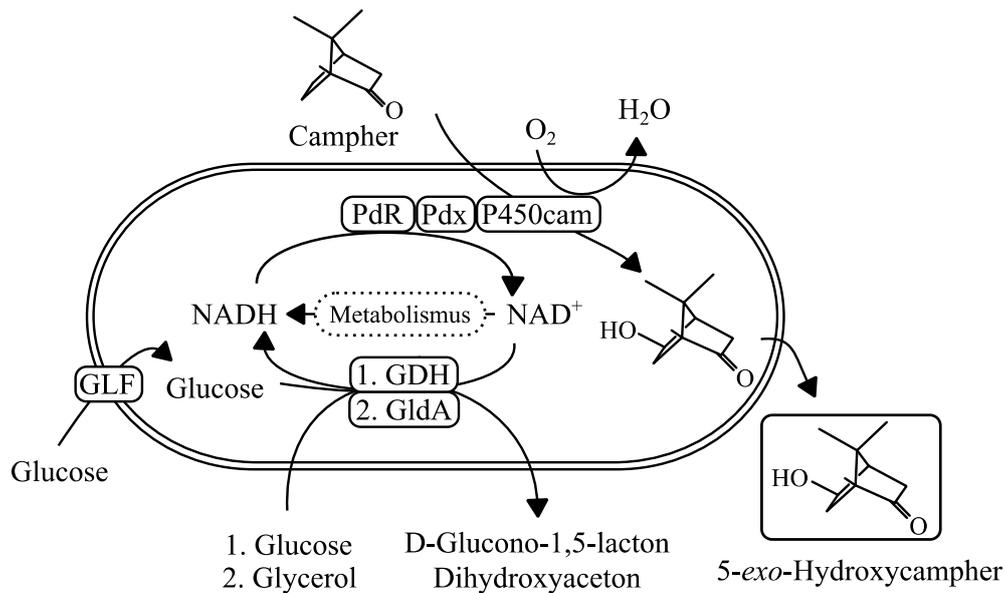
**Tabelle 9. Effekt einer unterstützten Kofaktorregenerierung in *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren zur Hydroxylierung von Limonen durch BM3-VVF.**

Energiequelle System <sup>a</sup>	Glucose		
	BM3-VVF	BM3-VVF/GDH	BM3-VVF/GDH/GLF
Zellmenge ( $\text{g}_{\text{cdw}}/\text{l}$ )	8,9	8,2	7,2
P450 ( $\text{nmol}/\text{g}_{\text{cdw}}$ )	198	77	135
GDH Aktivität ( $\text{U}/\text{g}_{\text{cdw}}$ ) <sup>b</sup>	-	281	131
Perillaalkohol ( $\mu\text{M}$ ) <sup>c</sup>	$349 \pm 10$	$190 \pm 4$	$128 \pm 27$
TTN ( $\text{nmol}_{\text{Perillaalkohol}}/\text{nmol}_{\text{P450}}$ ) <sup>c</sup>	199	300	132

<sup>a</sup> Eingesetzt wurden permeabilisierte ruhende Zellen nach Expression von BM3-VVF (BM3-VVF), Koexpression von BM3-VVF mit GDH (BM3-VVF/GDH) bzw. Koexpression von BM3-VVF mit GDH und GLF (BM3-VVF/GDH/GLF) in *P. putida*  $\Delta\text{cym}$ . Reaktionsbedingungen (1 ml, 20 rpm, 25°C, 4 h), 2 mM Limonen, 2% DMSO (v/v), 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Polymyxin B, 100 mM Glucose in 50 mM KPi-Puffer (pH 7,5); weitere Parameter siehe Tabelle; <sup>b</sup> Bestimmt für  $\text{NADP}^+$ , <sup>c</sup> Werte erhalten aus unabhängigen Dreifachbestimmungen.

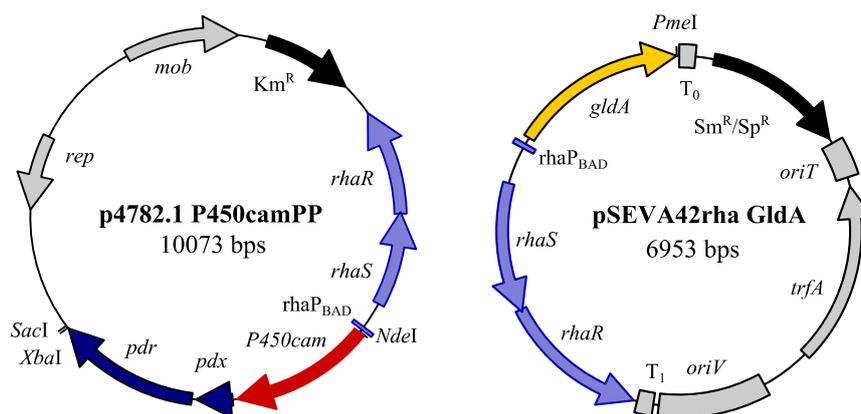
### 3.3. Entwicklung von *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren zur Umsetzung von (+)-Campher

Obwohl der eingeschränkte Stofftransfer durch Permeabilisierung der Zellen verbessert werden konnte, schien die Aktivität und Stabilität der verwendeten P450-BM3-Variante die Produktivität des *P. putida*-Ganzzellbiokatalysators einzuschränken. Um im *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator den Effekt einer unterstützenden Kofaktorregenerierung unabhängig von geringer Löslichkeit, eingeschränktem Substrattransfer, geringer Enzymaktivität und möglicherweise geringer Enzymstabilität zu studieren, wurde die P450cam-katalysierte Hydroxylierung des mit 1,6 g/l deutlich besser löslichen bicyclischen Monoterpenoids (+)-Campher zu 5-*exo*-Hydroxycampher untersucht (Abbildung 27).



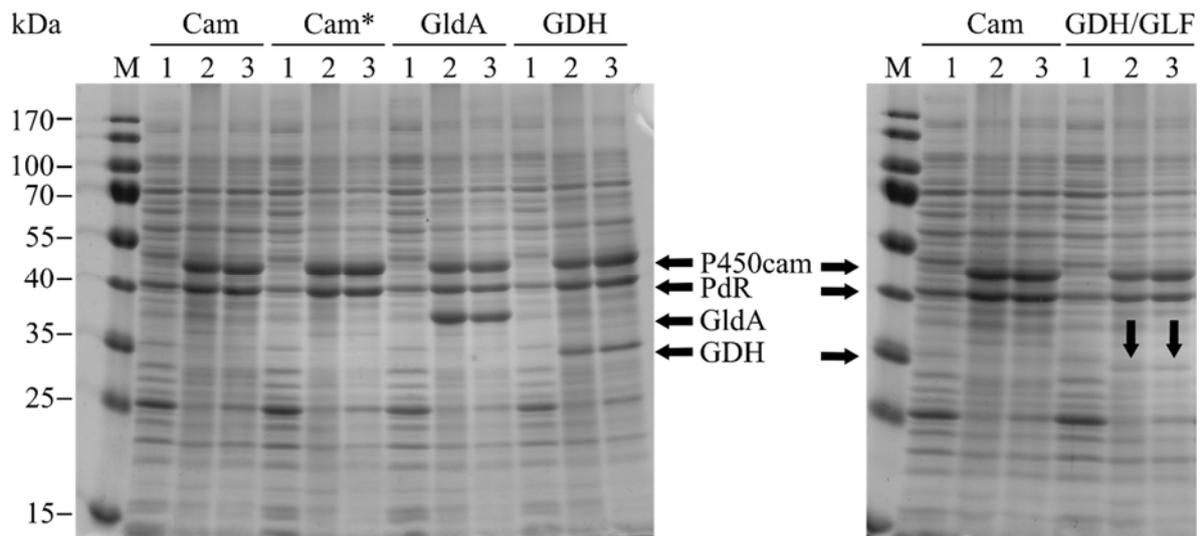
**Abbildung 27. *P. putida*-Ganzzellkatalysator zur Umsetzung von (+)-Campher zu 5-*exo*-Hydroxycampher.** Hierzu wurde P450cam mit Pdx/PdR und GDH oder GldA in *P. putida* DSM 12264 koexprimiert. Zur Kofaktorregenerierung wurde im Fall der GDH Glucose (1) und im Fall der GldA (Glycerol) zugesetzt. Zusätzlich zur GDH wurde die Koexpression von GLF mit dem Ziel einer erleichterten Glucoseaufnahme getestet.

Hierzu wurden die Gene der P450cam und der physiologischen Redoxpartner Putidaredoxin Pdx und Putidaredoxinreduktase PdR aus *P. putida* in einem artifiziellen tricistronischen Operon (P450camPP) in p4782.1 eingebracht (Abbildung 28). Mit dem Ziel einer unterstützenden Regenerierung von NADH wurde neben der Koexpression der GDH die Koexpression der Glyceroldehydrogenase (GldA) aus *E. coli* in *P. putida* etabliert. Hierzu wurde *gldA* in pSEVA42rha eingebracht (Abbildung 28).



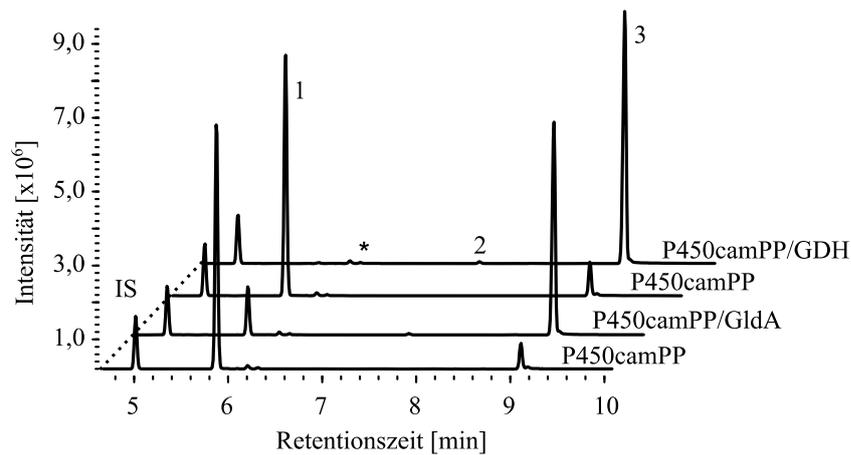
**Abbildung 28. Schematische Darstellung der Koexpressionsplasmide p4782.1 P450camPP und pSEVA42rha GldA.** *P450cam* (rot), *pdx* und *pdr* (dunkel-blau) bzw. *gldA* (gelb), Selektionsmarker (schwarz): Resistenzgen gegenüber Kanamycin bzw. Streptomycin und Spectinomycin, L-Rhamnose-Promotorsystem (hell-blau): Promotor *rhaP* und Aktivatoren *rhaR* und *rhaS*; weitere Plasmidelemente (grau). Die Klonierung von p4782.1 P450camPP erfolgte über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *SacI* (s. Kapitel 2.4.11.4); die Klonierung von pSEVA42rha GldA über DNA-Assemblierung (s. Kapitel 2.4.11.5).

Ausgehend von p4782.1 P450camPP und den Koexpressionsplasmiden pSEVA42rha GldA, pSEVA42rha GDH bzw. pSEVA42rha GDH GLF konnte P450camPP in Verbindung mit GldA, GDH bzw. GDH/GLF erfolgreich in *P. putida* DSM 12264 koexprimiert werden (Abbildung 29). Im Ganzzellbiokatalysator P450camPP/GldA schien GldA hierbei besser exprimiert worden zu sein als GDH in P450camPP/GDH.



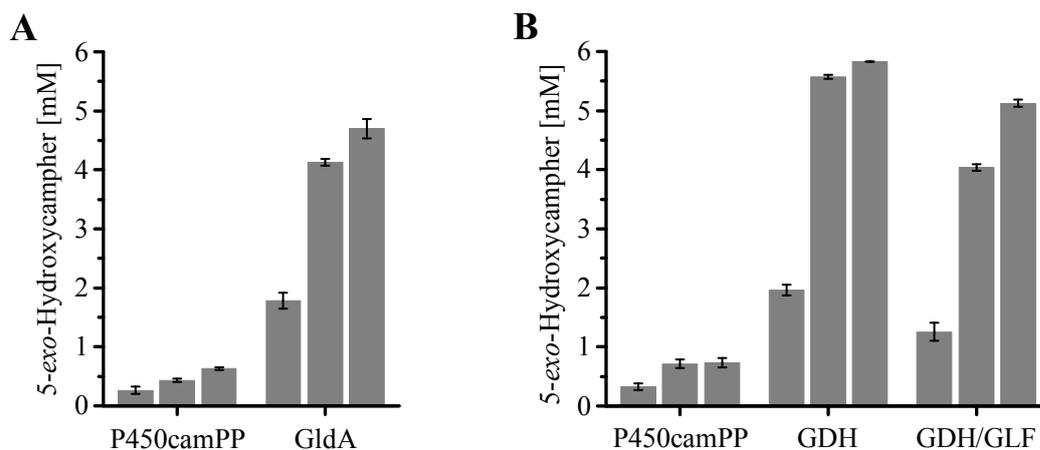
**Abbildung 29. Analyse der Koexpression von P450camPP mit GldA, GDH und GDH/GLF in *P. putida* per SDS-PAGE.** Die Expression erfolgte bei 25°C über 43 h in 50 ml TB-Medium. Protein-Größenstandard (M); aufgetragen wurden Ganzzellproben vor (1) und 43 h nach Induktion (2) der Expression sowie eine Probe (7,5 µg) der löslichen Proteinfraction nach Zellaufschluss (3). Pfeile weisen auf die in *P. putida* DSM 12264 exprimierten P450cam (47 kDa), PdR (46 kDa, hier ca. 40 kDa), GldA (39 kDa) und GDH (28 kDa) hin. Pdx (12 kDa) und GLF (50 kDa) waren aufgrund ihrer Größe bzw. schwachen Expression in der SDS-PAGE nicht sichtbar. Zellen, in denen P450cam (Cam) exprimiert wurde, trugen zusätzlich das pSEVA42rha Leerplasmid; Cam\*-Zellen trugen kein pSEVA42rha Leerplasmid.

Dies spiegelte sich ebenfalls in der höheren Dehydrogenaseaktivität wieder (Tabelle 10). Die zusätzliche Koexpression von GLF in P450camPP/GDH/GLF führte auch hier zu einer geringeren GDH-Expression (Abbildung 29 B) und infolgedessen zu einer niedrigeren GDH-Aktivität im Vergleich zu P450camPP/GDH (Tabelle 10). In allen Umsetzungen von (+)-Campher wurde neben Spuren von 5-Ketochampher ausschließlich 5-*exo*-Hydroxycampher als Produkt gebildet (Abbildung 30).



**Abbildung 30. Chromatogramm nach GC-Analyse der Umsetzung von (+)-Campher durch die *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren P450camPP, P450camPP/GldA und P450camPP/GDH mit Glycerol bzw. Glucose als Kohlenstoffquelle.** Verwendet wurden ruhende *P. putida* DSM 12264-Zellen nach Expression von P450camPP und Koexpression von P450camPP mit GldA bzw. GDH. Fenchon (IS, 1 mM), (+)-Campher (1), 5-Ketocampher (2), 5-*exo*-Hydroxycampher (3), \*Verunreinigungen aus dem Extraktionsmittel bzw. eingesetzten (+)-Campher. Reaktionsbedingungen siehe Abbildung 31.

In der Umsetzung von (+)-Campher durch den Ganzzellbiokatalysator P450camPP konnten sowohl mit Glucose als auch Glycerol als Energiequelle nach 3 h 0,7 mM 5-*exo*-Hydroxycampher erzielt werden (Abbildung 31). Die Koexpression von GDH oder GldA führte zu einer beschleunigten und verbesserten Umsetzung (Abbildung 31). Durch die Ganzzellbiokatalysatoren P450camPP/GldA und P450camPP/GDH konnten bereits nach 10 min mit 1,8-2,0 mM eine fast 3-fach höhere Konzentration an 5-*exo*-Hydroxycampher im Vergleich zu P450camPP erreicht werden. Nach 3 h wurde durch P450camPP/GldA mit 4,7 mM 5-*exo*-Hydroxycampher sogar eine fast 8-fach höhere Produktkonzentration im Vergleich zu P450camPP erzielt (Abbildung 31 A).



**Abbildung 31. Effekt einer unterstützten Kofaktorregenerierung in der Umsetzung von (+)-Campher durch *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren.** Produktkonzentrationen nach 10 min, 1 h bzw. 3 h. Eingesetzt wurden ruhende *P. putida* DSM 12264-Zellen nach Expression von P450camPP (Cam) und Koexpression von P450camPP mit GldA (A) bzw. mit GDH mit oder ohne GLF (B). Reaktionsbedingungen (1 ml, 20 rpm, 25°C, 3 h), 5,8 mM (+)-Campher, 2% DMSO (v/v), 2% Glycerol (220 mM) bzw. 100 mM Glucose in 50 mM KPi-Puffer (pH 7,5), Weitere Parameter siehe Tabelle 10. Werte erhalten aus unabhängigen Dreifachbestimmungen.

Durch P450camPP/GDH wurde mit 5,8 mM nach 3 h Reaktionszeit ein vollständiger Umsatz beobachtet. Die zusätzliche Koexpression des Glucosefacilitators im Ganzzellbiokatalysator P450camPP/GDH/GLF bewirkte keine zusätzliche Verbesserung (Abbildung 31 B).

In der Umsetzung von (+)-Campher durch P450camPP, in denen Glucose als Energiequelle eingesetzt wurde, konnte nach 3 h ein leicht verringerter pH-Wert (pH 7,2) beobachtet werden. Die Koexpression der GDH in den Ganzzellbiokatalysatoren P450camPP/GDH und P450camPP/GLF schien diesen Effekt zusätzlich zu verstärken (pH 6,0). Da die Ganzzellbiokatalysatoren unterschiedliche P450-Konzentrationen aufwiesen, wurde zum Vergleich der katalytischen Produktivität auch hier der TTN bestimmt (Tabelle 10). Durch Koexpression kofaktorregenerierender Enzyme konnte der TTN um das 6- bis 8-Fache gesteigert werden (GldA: 114 vs. 940 bzw. GDH: 133 vs. 748).

**Tabelle 10. Zusammenfassung der während der P450cam-katalysierten Ganzzellbiokatalyse von (+)-Campher ermittelten Parameter.**

Energiequelle System	Glycerol		Glucose		
	P450camPP	GldA	P450camPP	GDH	GDH/GLF
Zellmenge (g <sub>cdw</sub> /l)	6,5	7,2	6,5	6,7	5,8
P450 (nmol/g <sub>cdw</sub> )	809	694	809	1157	867
DH-Aktivität (U/g <sub>cdw</sub> ) <sup>a</sup>	-	940	-	159	27
Produktkonzentration (mM) <sup>b</sup>	0,6	4,7	0,7	5,8	5,1
TTN <sup>c</sup>	114	940	133	748	1014

<sup>a</sup> Dehydrogenase-Aktivität bestimmt für NAD<sup>+</sup>, <sup>b</sup> nach 3 h, <sup>c</sup> in nmol 5-*exo*-Hydroxycampher pro nmol P450.

In *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren konnte somit der positive Einfluss einer Koexpression kofaktorregenerierender Enzyme auf die P450cam-katalysierte Umsetzung von (+)-Campher gezeigt werden.

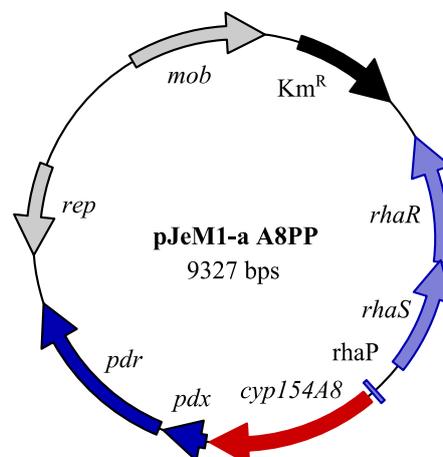
### 3.4. Entwicklung von Ganzzellbiokatalysatoren zur selektiven Oxidation von linearen Alkanen

Die Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln macht *P. putida* ebenfalls zu einem interessanten Wirt für die P450-katalysierter Oxidation von Alkanen (Soussan *et al.* 2016). Mit dem Ziel, eine effektive Kombination aus Wirtsstamm, Enzymen und Reaktionsbedingungen zur regio- und stereoselektiven Hydroxylierung von linearen Alkanen zu finden, wurden Ganzzellbiokatalysatoren auf der Basis des lösungsmittelsensitiven *E. coli* JM109-Stamms und des lösungsmitteltoleranten *P. putida* DSM 12264-Stamms entwickelt und evaluiert.

*Teile dieses Kapitels sind in ähnlicher Form in einem Originalartikel publiziert worden. Der Text des Originalartikels wurde übersetzt und um weitere Teile ergänzt. Abbildungen und Tabellen wurden in angepasster Form verwendet: Abgedruckt mit freundlicher Genehmigung von: Tieves F, Erenburg IN, Mahmoud O, Urlacher VB. 2016. Synthesis of chiral 2-alkanols from n-alkanes by a P. putida whole-cell biocatalyst. Biotechnol Bioeng Copyright © 2016 John Wiley and Sons.*

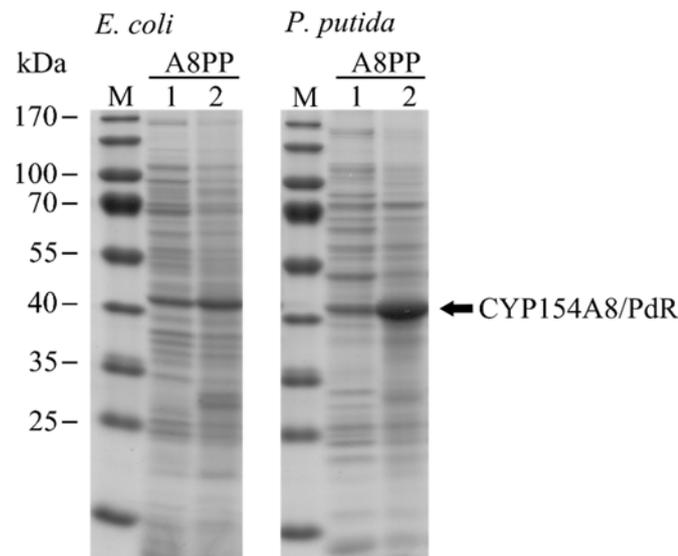
#### 3.4.1. Auswahl und Expression von P450 zur regio- und stereoselektiven Oxidation von linearen Alkanen

CYP154A8 aus *N. farcinica* ermöglicht die Herstellung von Alkoholen ausgehend von inerten linearen C7-C9 Alkanen mit hoher Regio- und Stereoselektivität (von Bühler und Urlacher 2014). Da die physiologischen Redoxpartner von CYP154A8 bisher nicht identifiziert wurden, werden heterologe Redoxpartner zur Elektronenübertragung auf CYP154A8 eingesetzt. Zur regio- und stereoselektiven Oxidation von linearen Alkanen durch einen Ganzzellbiokatalysator wurden zunächst die Gene der CYP154A8 und der Redoxpartner Pdx/PdR in einem artifiziellen tricistronischen Operon in pJeM1-a eingebracht (Abbildung 32) und in *P. putida* DSM 12264 (*P. putida*) und *E. coli* JM109 (*E. coli*) exprimiert.



**Abbildung 32. Schematische Darstellung von pJeM1-a A8PP.** *cyp154A8* (rot), *pdx* und *pdr* (blau), Selektionsmarker: Kanamycinresistenzgen (schwarz), L-Rhamnose-Promotorsystem: Promotor *rhaP* und Aktivatorgene *rhaR* und *rhaS* (hell-blau), *rep*, *mob* als weitere Plasmidelemente (grau). Die Klonierung erfolgte über DNA-Assemblierung (s. Kapitel 2.4.11.6).

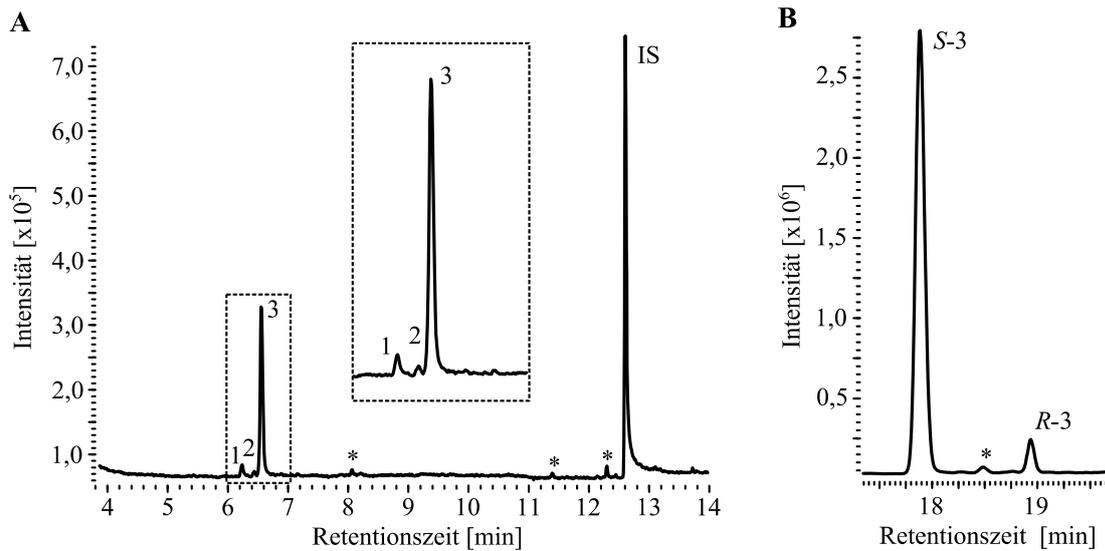
Sowohl in *E. coli* als auch in *P. putida* konnte CYP154A8 mit Pdx/PdR (A8PP) erfolgreich koexprimiert werden (Abbildung 33). Nach Expression in *P. putida* wurden im Vergleich zu *E. coli* deutlich höhere Konzentrationen an CYP154A8 erreicht (1224 nmol/g<sub>cdw</sub> vs. 53 nmol/g<sub>cdw</sub>), was darauf hindeutete, dass *P. putida* unter den verwendeten Bedingungen im Vergleich zu *E. coli* der geeignetere Expressionsstamm ist. Expressionsstudien im Rahmen einer Bachelorarbeit bestätigten dieses Ergebnis (Erenburg 2014).



**Abbildung 33. Analyse der Expression von CYP154A8 mit Pdx/PdR in *E. coli* und *P. putida* per SDS-PAGE.** Die Expression erfolgte bei 25°C über 39 h in 400 ml TB-Medium. Protein-Größenstandard (M); aufgetragen wurden Ganzzellproben vor (1) und 39 h nach Induktion (2) der Expression. Pfeil weist auf die in *E. coli* JM109 bzw. *P. putida* DSM 12264 exprimierte CYP154A8 (45 kDa), PdR (46 kDa) hin (Überlagerung). Pdx (12 kDa) war aufgrund der geringen Größe in der SDS-PAGE nicht sichtbar.

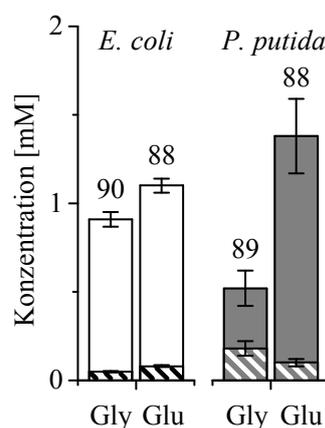
### 3.4.2. Umsetzung von Octan durch *E. coli*- und *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren

In ersten Versuchen wurde die Umsetzung von Octan durch *E. coli*- und *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren untersucht. Zur Gewährleistung einer ausreichenden Kofaktorversorgung durch den zelleigenen Metabolismus wurde Glucose oder Glycerol als Energiequelle zugegeben. Die Hydroxylierung von Octan erfolgte durch beide Ganzzellbiokatalysatoren mit einer Regioselektivität von 98% an der C2-Position und einer klaren Präferenz für die Bildung des *S*-Enantiomers (88-90% *ee*). Neben dem Hauptprodukt 2-Octanol wurde die Bildung von 2-Octanon und Spuren von 3-Octanol beobachtet (Abbildung 34 A). Eine ähnliche Produktverteilung und Präferenz für die Bildung des *S*-Enantiomers (Abbildung 34 B) konnte bereits im biphasischen System mit isolierten Enzymen beobachtet werden (von Bühler und Urlacher 2014).



**Abbildung 34. Chromatogramme nach achiraler (A) und chiraler (B) GC-Analyse der Umsetzung von Octan durch den *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator A8PP.** 2-Octanon (1), 3-Octanol (2), 2-Octanol (3) bzw. (*S*)-2-Octanol (*S*-3) und (*R*)-2-Octanol (*R*-3), 1-Decanol, interner Standard (IS). \*deuten auf Verunreinigungen aus dem Extraktionsmittel (Toluol) oder dem eingesetzten Octan hin. Reaktionsbedingungen siehe Abbildung 35.

Wurde Glycerol (200 mM) als Energiequelle zugegeben, konnten nach 4 h durch *E. coli* 0,9 mM (*S*)-2-Octanol mit 90% *ee* und durch *P. putida* 0,5 mM (*S*)-2-Octanol mit 89% *ee* erzielt werden. Höhere Produktkonzentrationen wurden, wenn auch im Fall von *E. coli* weniger signifikant, unter Verwendung von Glucose (100 mM) erreicht (Abbildung 35). Mit Glucose wurden nach 4 h durch *E. coli* 1,1 mM (*S*)-2-Octanol mit 88% *ee* und durch *P. putida* 1,4 mM (*S*)-2-Octanol mit 88% *ee* gebildet.

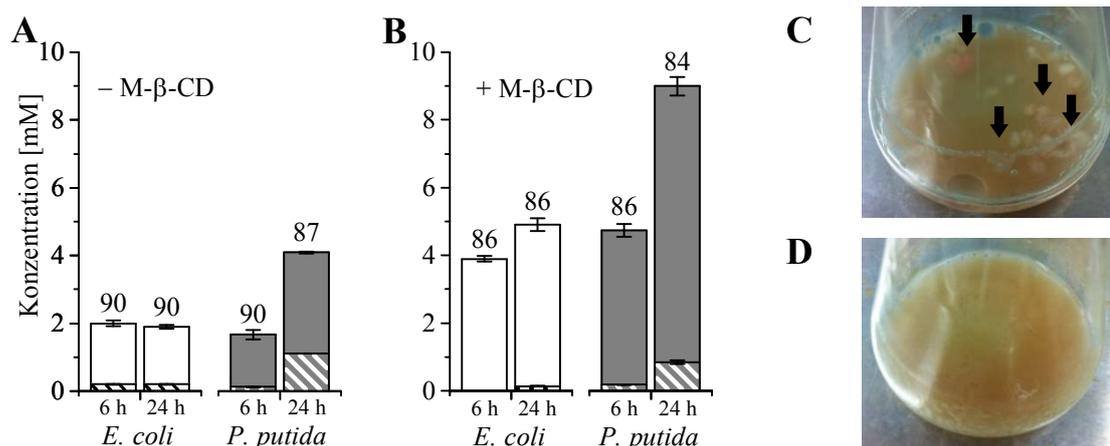


**Abbildung 35. Umsetzungen von Octan durch die *E. coli*- und *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren A8PP unter Verwendung von Glycerol (Gly) und Glucose (Glu).** Reaktionsbedingungen (200 rpm, 25°C, 4 h): Zellsuspensionen in 10 ml 100 mM KPi-Puffer (pH 7,5) mit 100 mM Glucose oder 200 mM Glycerol wurden mit 1 ml Octan versetzt. Zellsuspension: *E. coli* 10,2 g<sub>cdw</sub>/l (P450: 53 nmol/g<sub>cdw</sub>), *P. putida* 7,4 g<sub>cdw</sub>/l (P450: 1224 nmol/g<sub>cdw</sub>). Als Redoxpartner wurden Pdx/PdR koexprimiert. Gefüllte Balken: (*S*)-2-Octanol mit *ee*-Wert in %; gestrichelte Balken: 2-Octanon. Werte wurden aus unabhängigen Dreifachbestimmungen erhalten. Verändert nach Tieves *et al.* 2016; abgedruckt mit Genehmigung: Copyright © 2016 John Wiley and Sons.

### 3.4.3. *E. coli* versus *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator

Als nächstes wurde untersucht, ob die Verlängerung der Reaktionszeit eine erhöhte Produktkonzentration zur Folge hat. Da zuvor Glucose mit beiden Ganzzellbiokatalysatoren zu höheren Produktkonzentrationen führte, wurde Glucose als Energiequelle eingesetzt. Nach 6 h konnten sowohl mit *E. coli* als auch mit *P. putida* 2,0 mM (*S*)-2-Octanol (90% *ee*) erzielt werden. Während in *E. coli* nach 24 h keine Zunahme der Produktkonzentration beobachtet wurde, konnte sie in *P. putida* mit 4,7 mM (*S*)-2-Octanol (87% *ee*) mehr als verdoppelt werden (Abbildung 36 A).

Im Gegensatz zu *E. coli* konnte im Verlauf der Umsetzung von Octan durch *P. putida* bereits nach kurzer Zeit die Bildung von Zellaggregaten beobachtet werden (Abbildung 36 C). Neben anderen Mechanismen wurde Zellaggregation als eine Anpassung beschrieben, um in Anwesenheit zelltoxischer Substanzen zu überleben (Gaur und Khare 2009). Um die Biokompatibilität zu verbessern, wurde die Zugabe eines Cyclodextrins getestet. Cyclodextrine sind dafür bekannt, die Löslichkeit organischer Substanzen zu verbessern und gleichzeitig deren Toxizität zu verringern (Singh *et al.* 2002). Die Zugabe des Cyclodextrins, 4% Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M- $\beta$ -CD), führte mit beiden Ganzzellbiokatalysatoren zu einem verbesserten Umsatz (Abbildung 36 B) und verhinderte die zuvor in *P. putida* beobachtete Zellaggregation (Abbildung 36 C/D). Nach Zugabe von M- $\beta$ -CD erzielte *E. coli* mit 3,9 mM (86% *ee*) nach 6 h eine 2-fach höhere und *P. putida* mit 4,7 mM (86% *ee*) eine 3-fach höhere Konzentration an 2-Octanol im Vergleich zu den Umsetzungen ohne Cyclodextrin.

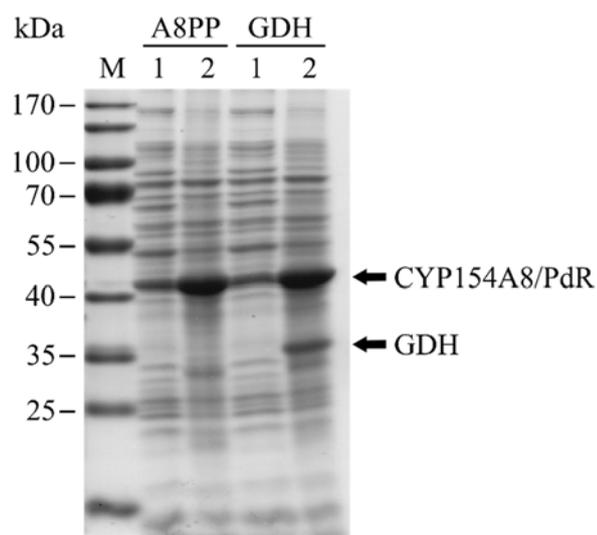


**Abbildung 36.** Umsetzung von Octan durch *E. coli*- und *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren nach 6 h und 24 h ohne (A) und mit (B) Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M- $\beta$ -CD). Reaktionsbedingungen (200 rpm, 25°C, 6 h/24 h): Zellsuspensionen in 10 ml 100 mM KPi-Puffer (pH 7,5) wurden mit 1 ml Octan versetzt. Zellsuspension: *E. coli* 8,9 g<sub>cdw</sub>/l (P450: 230 nmol/g<sub>cdw</sub>), *P. putida* 9,1 g<sub>cdw</sub>/l (P450: 1265 nmol/g<sub>cdw</sub>). Als Kohlenstoffquelle wurde 100 mM Glucose verwendet und als Redoxpartner Pdx/PdR koexprimiert. Gefüllte Balken: (*S*)-2-Octanol mit *ee*-Wert in %; gestrichelte Balken: 2-Octanon. Werte wurden erhalten aus unabhängigen Dreifachbestimmungen. Reaktionsansätze des *P. putida*-Ganzzellbiokatalysators ohne (C) und mit (D) M- $\beta$ -CD. Pfeile weisen auf Zellaggregate hin. Verändert nach Tieves *et al.* 2016; abgedruckt mit Genehmigung: Copyright © 2016 John Wiley and Sons.

Während mit *E. coli* nach 24 h nur eine geringe zusätzliche Bildung von 2-Octanol beobachtet werden konnte, 4,9 mM (86% ee), verdoppelte sich mit *P. putida* im gleichen Zeitraum die Konzentration an (*S*)-2-Octanol auf 9,0 mM (84% ee). Eine Verwendung niedriger M- $\beta$ -CD Konzentrationen (<4%) führte zu geringeren Produktkonzentrationen und einer leicht erhöhten Bildung von 2-Octanon. Bei Konzentration <1% M- $\beta$ -CD konnte erneut die Bildung von Zellaggregaten beobachtet werden. Mit *P. putida* konnten höhere Produktkonzentrationen und längere Prozesszeiten erreicht werden, sodass *P. putida* im Vergleich zu *E. coli* den geeigneteren Wirt zur Hydroxylierung von Octan darstellt. Aus diesem Grund wurde *P. putida* in allen folgenden Experimenten als Wirt zur Umsetzung von Octan und weiteren linearen Alkanen eingesetzt.

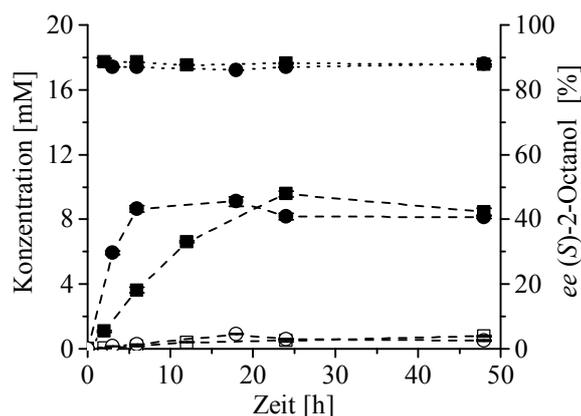
#### 3.4.4. Optimierung des *P. putida*-Ganzzellbiokatalysators zur Umsetzung von Alkanen

Die mit *P. putida* beobachtete Zellaggregation wies auf eine zelluläre Anpassung, ausgelöst durch die Anwesenheit des Octans bzw. die Bildung von 2-Octanol und 2-Octanon, hin. Einige dieser zellulären Anpassungsmechanismen können zu einem gesteigerten Energiebedarf führen. Bei gleichzeitig hoher Umsatzrate könnte dies zu einer Limitierung der zellulären Kofaktorverfügbarkeit führen. Um zu untersuchen, ob die Anwesenheit hoher Substrat- bzw. Produktkonzentrationen oder eine hohe Umsatzrate zu einer Überlastung der zellulären Kofaktorregenerierung führt, wurde zur unterstützenden Kofaktorregenerierung die GDH ausgehend von pSEVA42rha GDH koexprimiert (Abbildung 37).



**Abbildung 37. Analyse der Koexpression von CYP154A8 mit Pdx/PdR (A8PP) und CYP154A8 mit Pdx/PdR und GDH (GDH) in *P. putida* per SDS-PAGE.** Die Expression erfolgte bei 25°C über 40 h in 400 ml TB-Medium. Protein-Größenstandard (M); aufgetragen wurden Ganzzellproben vor (1) und 40 h nach Induktion (2) der Expression. Pfeile weisen auf die in *P. putida* DSM 12264 exprimierte CYP154A8 (45 kDa), PdR (46 kDa) und GDH (28 kDa, hier ca. 35 kDa) hin. Pdx (12 kDa) war aufgrund der geringen Größe in der SDS-PAGE nicht sichtbar. Zellen in denen die GDH nicht koexprimiert wurde, trugen zusätzlich das pSEVA42rha Leerplasmid.

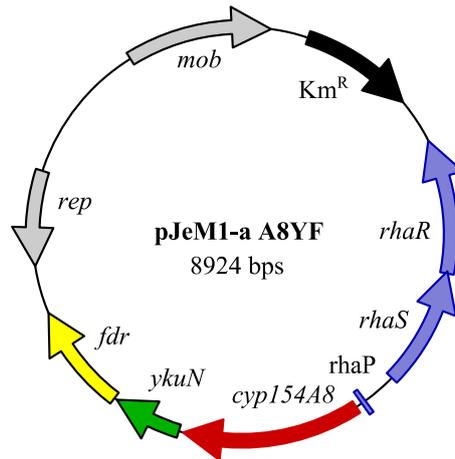
Das *P. putida*-Ganzzellsystem A8PP/GDH zeigte im Vergleich zu A8PP eine leicht erhöhte P450-Konzentration (1007 nmol/g<sub>cdw</sub> vs. 786 nmol/g<sub>cdw</sub>). Durch Koexpression der GDH konnte die Produktbildung innerhalb der ersten 6 h beschleunigt werden (Abbildung 38). Trotz der daraus resultierenden 3- bis 4,5-fach erhöhten initialen zell- bzw. P450-spezifischen Produktbildungsrate (28,7 mg/g<sub>cdw</sub>/h bzw. 3,6 nmol/min/nmol) wurde nach 24 h keine höhere Produktkonzentration erreicht.



**Abbildung 38. Umsetzung von Octan durch die *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren A8PP (Rechtecke) und A8PP/GDH (Kreise).** Gestrichelte Linien: Konzentration [mM] von 2-Octanol (gefüllte Symbole) und 2-Octanon (offene Symbole), gepunktete Linien: *ee*-Wert von (*S*)-Octanol. Reaktionsbedingungen (200 rpm, 25°C, 48 h): Zellsuspensionen in 10 ml 100 mM KPi-Puffer (pH 7,5) wurden mit 1 ml Octan versetzt. Zellsuspension: A8PP 11,1 g<sub>cdw</sub>/l (P450: 786 nmol/g<sub>cdw</sub>), GDH 9,0 g<sub>cdw</sub>/l (P450: 1007 nmol/g<sub>cdw</sub>). Verändert nach Tieves *et al.* 2016; abgedruckt mit Genehmigung: Copyright © 2016 John Wiley and Sons.

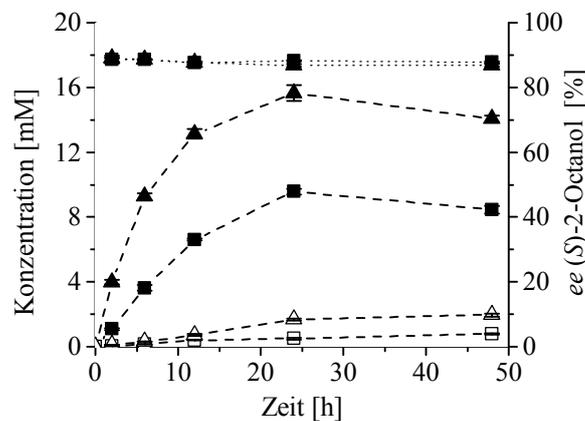
Ursächlich hierfür könnte sein, dass in beiden Ganzzellbiokatalysatoren im Reaktionsverlauf ein Absinken des pH-Werts von pH 7,5 auf pH 5,0 beobachtet werden konnte, welches nach Koexpression der GDH verstärkt auftrat. Die Verwendung höherer Puffermolaritäten führte zu einem verlangsamteten Absinken des pH-Werts, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Produktbildung und erreichte Produktkonzentration.

Neben Pdx/PdR wurde ein Redoxpartnerpaar bestehend aus dem Flavodoxin YkuN aus *Bacillus subtilis* und der NADPH-abhängigen Flavodoxin-Reduktase FdR aus *E. coli* (YkuN/FdR) als ein geeignetes Redoxpartnersystem für CYP154A8 beschrieben (Choi *et al.* 2010; von Bühler und Urlacher 2014). Der Einfluss beider Redoxpartnersysteme auf die Umsetzung von Octan mit *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator wurde untersucht. Hierzu wurden *ykuN* und *fdr* in Verbindung mit dem Gen der CYP154A8 ebenfalls in ein artifizielles tricistronisches Operon (A8YF) in pJeM1-a eingebracht (Abbildung 39) und in *P. putida* DSM 12264 koexprimiert (Abbildung 42).



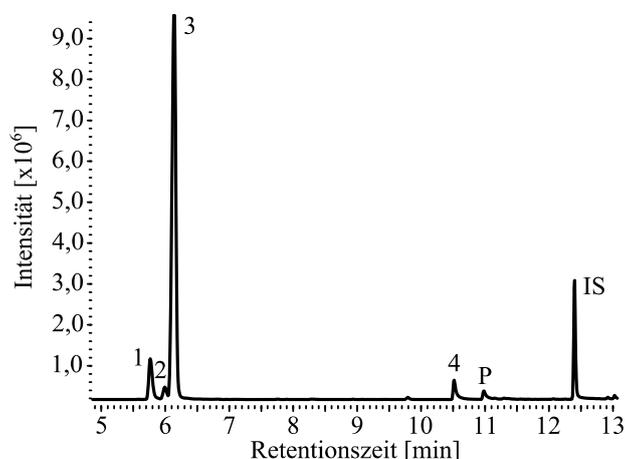
**Abbildung 39. Schematische Darstellung von pJeM1-a A8YF.** *cyp154A8* (rot), *ykuN* (grün) und *fdr* (gelb), Selektionsmarker: Kanamycinresistenzgen (schwarz), L-Rhamnose-Promotorsystem: Promotor *rhaP* und Aktivatorgene *rhaR* und *rhaS* (hell-blau), *rep*, *mob* als weitere Plasmidelemente (grau). Die Klonierung erfolgte über DNA-Assemblierung (s. Kapitel 2.4.11.6).

Unter identischen Wachstums- und Expressionsbedingungen wies der Ganzzellbiokatalysator A8YF eine 2,5-fach geringere P450-Konzentration im Vergleich zu A8PP auf (Tabelle 11). Trotzdem wurde durch A8YF eine höhere Konzentration an 2-Octanol erzielt. Beide Ganzzellsysteme wiesen über die Reaktionszeit einen konstanten *ee*-Wert von 89% auf. Durch A8YF konnte eine leicht verstärkte Bildung von 2-Octanon beobachtet werden (Abbildung 40).



**Abbildung 40. Umsetzung von Octan durch die *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren A8PP (Rechtecke) und A8YF (Dreiecke).** Gestrichelte Linien: Konzentration [mM] von 2-Octanol (gefüllte Symbole) und 2-Octanon (offene Symbole), gepunktete Linien; *ee*-Wert von (S)-2-Octanol. Reaktionsbedingungen (200 rpm, 25°C, 48 h): Zellsuspensionen in 10 ml 100 mM KPi-Puffer (pH 7,5) mit M- $\beta$ -CD (4%) wurden mit 1 ml Octan versetzt. Zellsuspension: A8PP 11,1 g<sub>cdw</sub>/l (P450: 786 nmol/g<sub>cdw</sub>), A8YF 11,9 g<sub>cdw</sub>/l (P450: 298 nmol/g<sub>cdw</sub>), Zellen trugen zusätzlich das pSEVA44rha Leerplasmid. Verändert nach Tieves *et al.* 2016; abgedruckt mit Genehmigung: Copyright © 2016 John Wiley and Sons.

Neben 2-Octanon konnten zwei weitere Überoxidationsprodukte beobachtet werden, von denen eines über einen Datenbankvergleich des charakteristischen MS-Fragmentierungsmusters als Octan-2,7-dion identifiziert werden konnte (Abbildung 41).



**Abbildung 41. Chromatogramm nach achiraler GC-Analyse der Umsetzung von Octan durch den *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator A8YF (nach 24 h).** 2-Octanon (1), 3-Octanol (2), 2-Octanol (3), Octan-2,7-dion (4), nicht identifiziertes Produkt (P), 1-Decanol (IS). Reaktionsbedingungen siehe Abbildung 40. Verändert nach Tieves *et al.* 2016; abgedruckt mit Genehmigung: Copyright © 2016 John Wiley and Sons.

A8YF zeigte im Vergleich zu A8PP eine 3- bis 4-fach höhere initiale Produktbildungsrate und TTN (Tabelle 11). Dies deutete darauf hin, dass das NADPH-abhängige Redoxpartnersystem mit YkuN/FdR besser geeignet ist, um die CYP154A8-katalysierte Hydroxylierung zu unterstützen als Pdx/PdR. Infolge dessen konnte mit dem *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator A8YF bis zu 15,7 mM (*S*)-2-Octanol (87% *ee*) produziert werden.

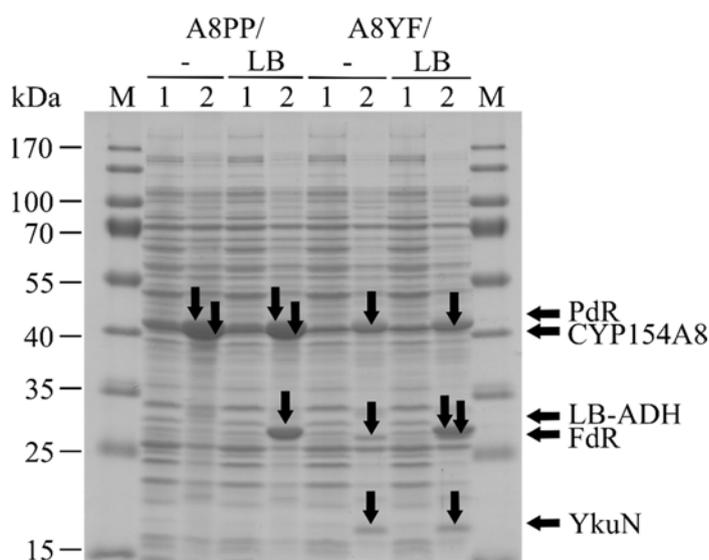
**Tabelle 11. Zusammenfassung der CYP154A8-katalysierten Ganzzellbiokatalyse von Octan unter Verwendung der *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren A8PP und A8YF.** Verändert nach Tieves *et al.* 2016; abgedruckt mit Genehmigung: Copyright © 2016 John Wiley and Sons.

System	A8PP	A8YF
Energiequelle	Glucose	Glucose
Zellmenge (g <sub>cdw</sub> /l)	11,1	11,9
P450-Konzentration (nmol/g <sub>cdw</sub> )	786 ± 22	298 ± 23
2-Octanol Konzentration (mM) <sup>a</sup>	9,6	15,7
2-Octanol Konzentration (g/l) <sup>a</sup>	1,2	2,0
<i>ee</i> ( <i>S</i> )-2-Octanol (%)	88	87
TTN (nmol <sub>2-Octanol</sub> /nmol <sub>P450</sub> ) <sup>b</sup>	1100	4400
2-Octanol per Biokatalysator (mg/g <sub>cdw</sub> )	110	170
Zell-spez. Produktbildungsrate (mg/g <sub>cdw</sub> /h) <sup>c</sup>	6,7	22,4
P450-spez. Produktbildungsrate (nmol <sub>2-Octanol</sub> /min/nmol <sub>P450</sub> ) <sup>c</sup>	1,1	9,6

<sup>a</sup> maximal erzielte Konzentration; <sup>b</sup> bestimmt für die maximale 2-Octanol Konzentration, <sup>c</sup> initiale Produktbildungsrate von 2-Octanol bestimmt nach 2 h Umsetzung.

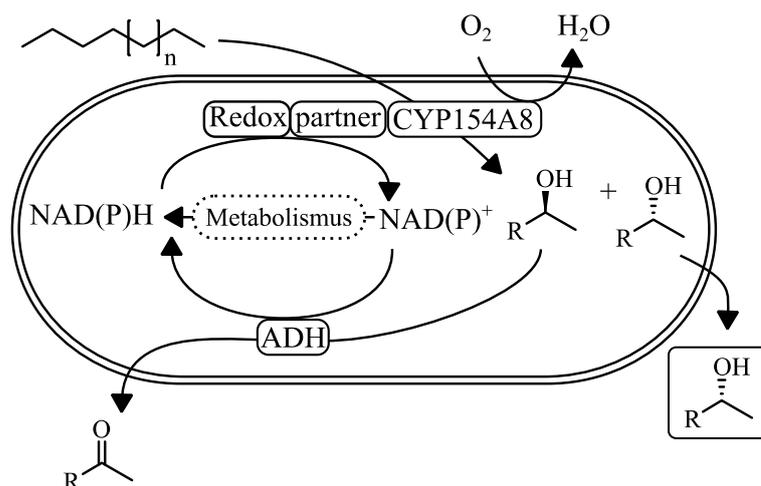
### 3.4.5. Erhöhung der Enantiomerenreinheit in Alkan-hydroxylierenden *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren

Obwohl in den *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren A8YF und A8PP eine hohe Regio- und Stereoselektivität während der CYP154A8-katalysierten Oxidation von Octan erzielt werden konnte, wurden weiterhin geringe Mengen (*R*)-2-Octanol gebildet. Zur Erhöhung der Enantiomerenreinheit wurden P450-ADH-Systeme in *P. putida* getestet. Hierzu wurde das Gen der ADH aus *Lactobacillus brevis* in das Koexpressionsplasmid pSEVA44rha eingebracht (Anhang, Abbildung 49) und in *P. putida* koexprimiert (Abbildung 42).



**Abbildung 42.** Analyse der Koexpression von CYP154A8 mit Pdx/PdR (A8PP) oder YkuN/FdR (A8YF) ohne (-) und mit LB-ADH (LB) in *P. putida* per SDS-PAGE. Die Expression erfolgte bei 25°C über 36 h in 400 ml TB-Medium. Protein-Größenstandard (M); aufgetragen wurden Ganzzellproben vor (1) und 36 h nach Induktion (2) der Expression. Pfeile weisen auf die in *P. putida* DSM 12264 exprimierte CYP154A8 (45 kDa), PdR (46 kDa, hier bei ca. 40kDa), FdR (28 kDa), YkuN (18 kDa) und LB-ADH (27 kDa,) hin. Pdx (12 kDa) war aufgrund der geringen Größe in der SDS-PAGE nicht sichtbar. Zellen, in denen die LB-ADH nicht exprimiert wurde, trugen zusätzlich das pSEVA44rha Leerplasmid. Verändert nach Tieves *et al.* 2016; abgedruckt mit Genehmigung: Copyright © 2016 John Wiley and Sons.

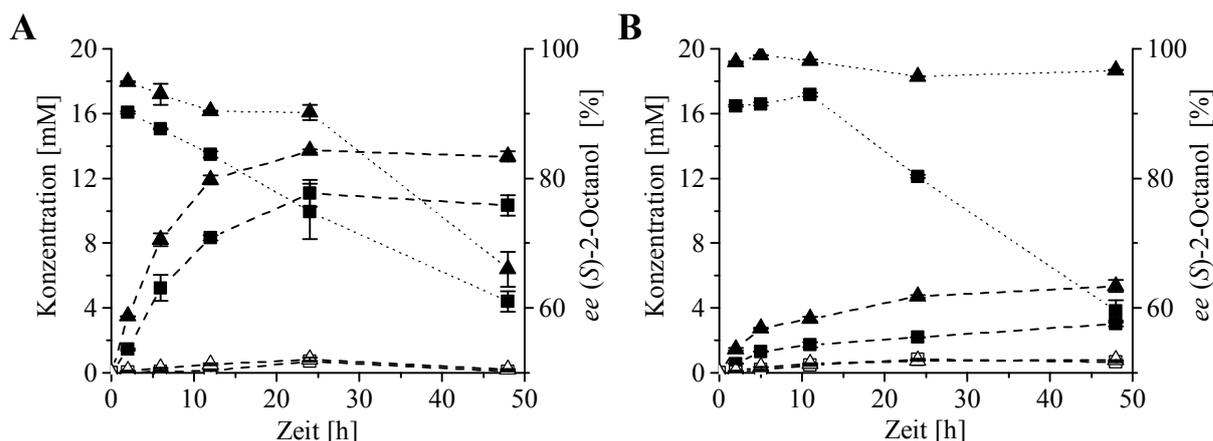
Im Idealfall sollte durch die koexprimierte LB-ADH das unerwünschte (*R*)-2-Octanol zu 2-Octanon umgesetzt und hierdurch gleichzeitig NADPH regeneriert werden (Abbildung 43). Hohe ADH-Aktivitäten mit bis zu 2500 U/g<sub>cdw</sub> wiesen auf eine erfolgreiche Koexpression der LB-ADH hin. Obwohl die ADH-Aktivität und folglich auch die Expression der ADH in den verschiedenen Ganzzellbiokatalysatoren ähnlich hoch war, wurden auch hier je nach koexprimiertem Redoxpartnersystem deutlich unterschiedliche P450-Expressionslevel erreicht (Tabelle 12).



**Abbildung 43.** *P. putida*-Ganzzellbiokatalyse von linearen Alkanen zu chiralen 2-Alkoholen. CYP154A8 katalysierte die regio- und stereoselektive Hydroxylierung von Alkanen. Eine Verbesserung der Enantiomerenreinheit wurde durch den Einsatz der LB-ADH erreicht, die den ungewünschten (*R*)-2-Octanol zum 2-Keton oxidiert und hierdurch gleichzeitig den Kofaktor NADPH regeneriert. Verändert nach Tieves *et al.* 2016; abgedruckt mit Genehmigung: Copyright © 2016 John Wiley and Sons.

Neben den *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren A8YF und A8PP (s. Kapitel 3.4.4) wurden A8YF/LB und A8PP/LB in die Umsetzung von Octan eingesetzt. Als Energiequellen wurden auch hier Glucose und Glycerol verglichen. Beide Redoxpartnersysteme sind von unterschiedlichen Kofaktoren abhängig. Während das Redoxpartnerpaar YkuN/FdR Elektronen ausgehend von NADPH bereitstellt, überträgt das Redoxpartnerpaar Pdx/PdR Elektronen ausgehend von NADH. Dies führt dazu, dass die CYP154A8-katalysierte Reaktion im Fall von A8YF/LB gekoppelt und im Fall von A8PP/LB entkoppelt von der NADP<sup>+</sup>-abhängigen ADH-Reaktion vorlag. In allen Umsetzungen wurden erneut mit Glucose im Vergleich zu Glycerol höhere 2-Octanol Konzentrationen erreicht (Abbildung 44). Jedoch konnte nur zu Beginn der Umsetzung im Kofaktor-gekoppelten System (A8YF/LB) mit Glucose mit bis zu 95% ein erhöhter *ee*-Wert beobachtet werden (Abbildung 44 A).

Sowohl im Kofaktor-gekoppelten System A8YF/LB als auch im Kofaktor-entkoppelten System A8PP/LB sank der *ee*-Wert mit Glucose als Energiequelle nach 48 h Umsetzung auf 60-65% (Abbildung 44 A). Dies steht im klaren Gegensatz zu den Umsetzungen durch A8YF und A8PP in denen die LB-ADH nicht koexprimiert wurde (s. Kapitel 3.4.4), da dort während der gesamten Reaktionszeit einen *ee*-Wert von 87% erzielt werden konnte. In Gegenwart von Glycerol zeigten das Kofaktor-gekoppelte und das Kofaktor-entkoppelte System ein deutlich unterschiedliches Verhalten (Abbildung 44 B). Während im Kofaktor-entkoppelten System A8PP/LB nach 48 h der *ee*-Wert auf 60% absank, konnte im Kofaktor-gekoppelten System A8YF/LB mit bis zu 99% *ee* eine höhere Enantiomerenreinheit erzielt werden. In Gegenwart von Glycerol als Kohlestoffquelle konnten im Kofaktor-gekoppelten System A8YF/LB in 48 h schließlich 5,4 mM (*S*)-2-Octanol mit 97% *ee* produziert werden.



**Abbildung 44.** Umsetzung von Octan durch die *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren A8PP/LB (Rechtecke) und A8YF/LB (Dreiecke) unter Verwendung von Glucose (A) und Glycerol (B) als Energiequelle. Gestrichelte Linien: Konzentration [mM] von 2-Octanol (gefüllte Symbole) und 2-Octanon (offene Symbole), gepunktete Linien: *ee*-Wert von (*S*)-Octanol. Reaktionsbedingungen (200 rpm, 25°C, 48 h): Zellsuspensionen in 10 ml 100 mM KPi-Puffer (pH 7,5) mit M- $\beta$ -CD (4%) wurden mit 1 ml Octan versetzt. Weitere Parameter siehe Tabelle 12. Verändert nach Tieves *et al.* 2016; abgedruckt mit Genehmigung: Copyright © 2016 John Wiley and Sons.

Im Ganzzellbiokatalysator A8YF/LB konnte eine bis zu 8-fach geringere P450-Konzentration im Vergleich zu A8PP/LB festgestellt werden. Dennoch wurden unabhängig von der eingesetzten Energiequelle mit den Redoxpartnern YkuN/FdR auch hier zu jedem Zeitpunkt höhere Produktkonzentrationen im Vergleich zu Pdx/PdR erreicht. Dies führte zu höheren TTN und einer höheren zell- und P450-spezifischen Produktbildungsrate in A8YF/LB im Vergleich zu A8PP/LB (Tabelle 12).

**Tabelle 12.** Zusammenfassung der Umsetzung von Octan unter Verwendung der *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren A8PP/LB und A8YF/LB. Verändert nach Tieves *et al.* 2016; abgedruckt mit Genehmigung: Copyright © 2016 John Wiley and Sons.

System	A8PP/LB		A8YF/LB	
	Glucose	Glycerol	Glucose	Glycerol
Energiequelle				
Zellmenge (g <sub>cdw</sub> /l)	11,9	9,3	11,9	11,1
P450-Konzentration (nmol/g <sub>cdw</sub> )	925 ± 102	823 ± 6	112 ± 16	176 ± 12
ADH Aktivität (U/g <sub>cdw</sub> ) <sup>a</sup>	1670 ± 44	1794 ± 34	2477 ± 66	1834 ± 25
2-Octanol Konzentration (mM) <sup>b</sup>	11,1	3,0	13,7	5,4
2-Octanol Konzentration (g/l) <sup>b</sup>	1,4	0,4	1,8	0,7
<i>ee</i> ( <i>S</i> )-2-Octanol (%) <sup>c</sup>	61	60	66	97
TTN (nmol <sub>2-Octanol</sub> /nmol <sub>P450</sub> ) <sup>d</sup>	1000	400	10300	2750
2-Octanol per Biokatalysator (mg/g <sub>cdw</sub> ) <sup>d</sup>	120	40	150	60
Zell-spez. Produktbildungsrate (mg/g <sub>cdw</sub> /h) <sup>e</sup>	8,1	4,3	19,8	9,3
P450-spez. Produktbildungsrate (nmol <sub>2-Octanol</sub> /min/nmol <sub>P450</sub> ) <sup>e</sup>	1,1	0,7	22,6	6,8

<sup>a</sup> bestimmt über die NADPH-Bildung während der Oxidation von (*R*)-2-Octanol zu 2-Octanon mit Zellysaten (U =  $\mu$ mol/min), <sup>b</sup> maximal erzielte Konzentration, <sup>c</sup> nach 48 h Umsetzung, <sup>d</sup> bestimmt für die höchste 2-Octanol Konzentration, <sup>e</sup> initiale Bildungsrate von 2-Octanol bestimmt nach 2 h Umsatz.

Zur Demonstration eines weiteren Anwendungsbereichs des *P. putida*-Ganzzellbiokatalysators A8YF/LB für die Oxidation von linearen Alkanen wurden ebenfalls Umsetzungen von Heptan und Nonan durchgeführt. In allen Umsetzungen konnte der *ee*-Wert der gebildeten (*S*)-2-Alkohole durch das kombinierte P450-ADH-System gesteigert werden (Tabelle 13). Bei nur leicht geringerer Produktbildung konnte aufgrund der 2-fach niedrigeren P450-Konzentration mit A8YF/LB eine 1,7-fach höhere katalytische Produktivität (TTN) im Vergleich zu A8YF erzielt werden.

**Tabelle 13. Umsetzung von Heptan, Octan und Nonan durch die *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren A8YF und A8YF/LB.** Verändert nach Tieves *et al.* 2016; abgedruckt mit Genehmigung: Copyright © 2016 John Wiley and Sons.

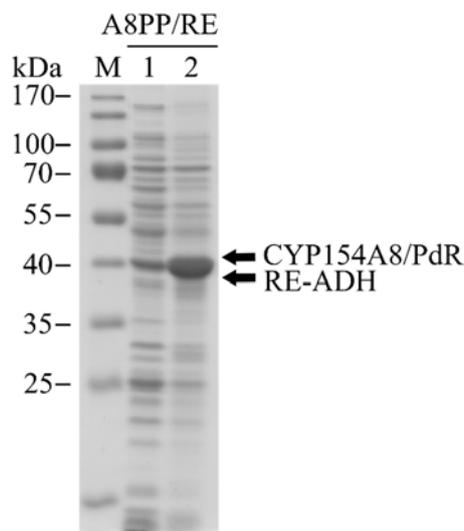
Substrat	System <sup>a</sup>	2-Alkohol [mM] <sup>b</sup>	2-Keton [mM] <sup>b</sup>	TTN CYP154A8 <sup>c</sup>	( <i>S</i> )-2-Alkohol (% <i>ee</i> )
Heptan	A8YF	3,3	0,4	900	87
	A8YF/LB	2,6	0,3	1600	91
Octan	A8YF	6,1	0,6	1900	88
	A8YF/LB	4,4	0,6	3000	97
Nonan	A8YF	6,7	0,5	1900	83
	A8YF/LB	5,5	0,5	3400	97

<sup>a</sup> eingesetzt wurden ruhende Zellen (11,9 g<sub>cdw</sub>/l) nach Koexpression von CYP154A8 mit YkuN/FdR (A8YF, P450: 295 ± 8 nmol/g<sub>cdw</sub>) oder CYP154A8 mit YkuN/FdR und LB-ADH (A8YF/LB, P450: 137 ± 7 nmol/g<sub>cdw</sub>, ADH: 1650 ± 69 U/g<sub>cdw</sub>). Zellen, in denen die LB-ADH nicht exprimiert wurde, trugen zusätzlich das pSEVA44rha Leerplasmid, <sup>b</sup> Konzentration nach 24 h im biphasischen System mit M-β-CD (4%) und Glycerol (200 mM), Standardabweichung der Dreifachbestimmung ≤ 2% hier nicht angegeben, <sup>c</sup> berechnet als (nmol<sub>2-Octanol</sub> pro nmol<sub>P450</sub>).

Durch den *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator A8YF/LB konnte binnen 24 h 2,6 mM (*S*)-2-Heptanol (91% *ee*), 4,4 mM (*S*)-2-Octanol (97% *ee*) und 5,5 mM (*S*)-2-Nonanol (97% *ee*) produziert werden.

### 3.4.6. Herstellung von Ketonen durch *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren

Ketone werden als Bausteine in der pharmazeutischen und chemischen Industrie, beispielsweise zur Herstellung chiraler Amine, eingesetzt. In weiteren Umsetzungen wurde untersucht, ob ein kofaktorgekoppeltes P450-ADH-System bestehend aus CYP154A8/Pdx/PdR und RE-ADH aus *Rhodococcus erythropolis*, eine selektive Oxidation von Octan zum Keton oder Diketon ermöglicht. Hierzu wurde das Gen der RE-ADH in pSEVA44rha eingebracht (Anhang, Abbildung 49) und mit CYP154A8 und Pdx/PdR in *P. putida* koexprimiert (Abbildung 45). Nach Expression konnten im *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator A8PP/RE mit 1200 nmol/g<sub>cdw</sub> bzw. 5730 U/g<sub>cdw</sub> eine hohe P450-Konzentration bzw. ADH-Aktivität erzielt werden.

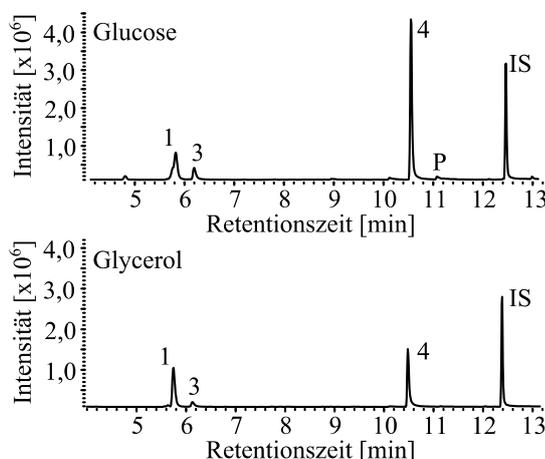


**Abbildung 45. Analyse der Koexpression von CYP154A8 mit Pdx/PdR und RE-ADH (RE) in *P. putida* per SDS-PAGE.** Die Expression erfolgte bei 25°C über 36 h in 400 ml TB-Medium. Protein-Größenstandard (M); aufgetragen wurden Ganzzellproben vor (1) und 36 h nach Induktion (2) der Expression. Pfeile weisen auf die in *P. putida* DSM 12264 exprimierte CYP154A8 (45 kDa), PdR (46 kDa, hier bei ca. 40 kDa) und RE-ADH (36 kDa, hier bei ca. 39 kDa) hin, Überlagerung der Banden. Pdx (12 kDa) war aufgrund der geringen Größe in der SDS-PAGE nicht sichtbar.

Das Redoxpartnerpaar Pdx/PdR überträgt die Elektronen ausgehend von NADH, sodass im Ganzzellbiokatalysator A8PP/RE die CYP154A8-katalysierte Hydroxylierung gekoppelt zu der NAD<sup>+</sup>-abhängigen ADH-Reaktion vorlag. Idealerweise sollte in den Umsetzungen nach Hydroxylierung des Octans das gebildete 2-Octanol bzw. Octan-2,7-diol durch die *S*-spezifische RE-ADH zu 2-Octanon bzw. Octan-2,7-dion oxidiert und gleichzeitig NADH regeneriert werden.

Nach 48 h stellten 2-Octanon und Octan-2,7-dion die gebildeten Hauptprodukte dar (Abbildung 46). Während des Weiteren geringe Mengen an 2-Octanol beobachtet werden konnten, konnte die Bildung von Octan-2,7-diol zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden.

Unter Verwendung von Glucose wurden ebenfalls geringe Menge eines weiteren nicht identifizierten Produkts beobachtet, dessen Bildung bereits durch von Bühler und Kollegen beschrieben wurde (von Bühler *et al.* 2013).



**Abbildung 46.** Chromatogramm nach GC-Analyse der Umsetzung (48 h) von Octan durch den *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator A8PP/RE. 2-Octanon (1), 3-Octanol (2, nur Spuren nachweisbar, in der Abbildung nicht dargestellt), 2-Octanol (3), Octan-2,7-dion (4), nicht eindeutig identifiziertes Produkt (P), 1-Decanol (IS). Reaktionsbedingungen siehe Abbildung 47.

Eine Quantifizierung erfolgte für 2-Octanol und 2-Octanon (Tabelle 14).

**Tabelle 14.** Konzentrationen von 2-Octanol und 2-Octanon während Umsetzung durch A8PP/RE

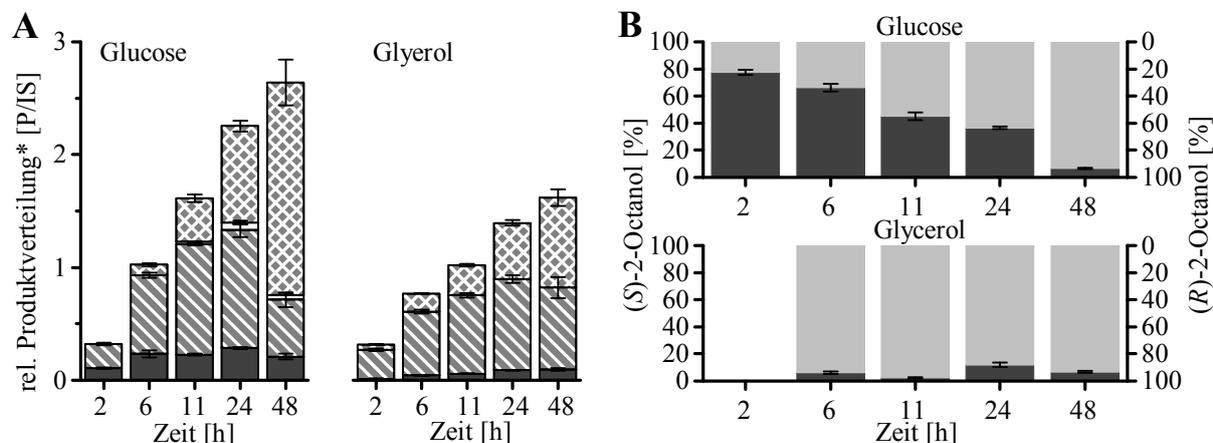
Zeit [h]	Glucose / Glycerol*	
	2-Octanol [mM]	2-Octanon [mM]
2	0,18 ± 0,01 / -	0,53 ± 0,03 / 0,57 ± 0,03
6	0,47 ± 0,06 / 0,03 ± 0	1,65 ± 0,06 / 1,33 ± 0,05
11	0,46 ± 0,01 / 0,07 ± 0,01	2,43 ± 0,15 / 1,66 ± 0,06
24	0,60 ± 0,02 / 0,14 ± 0,01	2,50 ± 0,15 / 1,94 ± 0,07
48	0,40 ± 0,06 / 0,15 ± 0,02	1,55 ± 0,21 / 1,74 ± 0,21

\*verwendete Energiequelle, weitere Reaktionsbedingungen siehe Abbildung 47.

In Umsetzungen mit Glucose konnten auch hier im Vergleich zu Glycerol höhere Produktmengen erzielt werden (Abbildung 47 A). Während im Reaktionsverlauf fortlaufend steigende Mengen an 2-Octanon und Octan-2,7-dion gebildet wurden (Abbildung 47 A), konnten nur geringe Konzentrationen an 2-Octanol festgestellt werden (Tabelle 14).

Chirale GC-Analysen zeigten in Umsetzungen mit Glucose eine kontinuierliche Verringerung des Anteils an (*S*)-2-Octanol durch die RE-ADH-katalysierte Oxidation, sodass innerhalb von 48 h der gebildete (*S*)-2-Octanol nahezu vollständig zu 2-Octanon und in der Folge zu Octan-2,7-dion umgesetzt wurde (Abbildung 47 A). Infolgedessen handelte es sich bei dem zurückbleibenden 2-Octanol nahezu ausschließlich um das durch die RE-ADH nicht weiteroxidierte (*R*)-2-Octanol (Abbildung 47 B).

Unter Verwendung von Glycerol als Energiequelle wurde (*S*)-2-Octanol zu allen Zeitpunkten nahezu vollständig weiteroxidiert (Abbildung 47 B), sodass auch hier neben 2-Octanon und Octan-2,7-dion ausschließlich geringe Mengen an (*R*)-2-Octanol vorlagen (Abbildung 47 B).



**Abbildung 47. Relative Produktverteilung\* (A) und Massenanteil (*S/R*)-2-Octanol (B) zu verschiedenen Zeitpunkten der Umsetzung von Octan durch den *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator A8PP/RE.** 2-Octanol (grau; in B dunkel-grau (*S*)-2-Octanol, hell-grau (*R*)-2-Octanol), 2-Octanon (grau-weiß gestreift), Octan-2,7-dion (grau-weiß kariert), nicht identifiziertes Produkt (P, weiß). \*relative Produktverteilung: Quotient aus den Peakflächen der gebildeten Produkte bezogen auf den internen Standard (1-Decanol, 2 mM), Konzentrationen 2-Octanol und 2-Octanon siehe Tabelle 14. Die CYP154A8- und RE-ADH-katalysierte Umsetzung erfolgte unter Verwendung von Pdx/PdR als Redoxpartner. Reaktionsbedingungen (200 rpm, 25°C, 48 h): Zellsuspensionen 9,4 g<sub>cdw</sub>/l A8PP/RE (P450: 1200 ± 30 nmol/g<sub>cdw</sub>, ADH: 5730 ± 32 U/g<sub>cdw</sub>) in 10 ml 100 mM KPi-Puffer (pH 7,5) wurden mit 1 ml Octan versetzt. Als Energiequelle wurden 100 mM Glucose oder 200 mM Glycerol eingesetzt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das ausgewählte P450-ADH-System im *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator A8PP/RE erfolgreich zur selektiven Synthese von 2-Octanon und Octan-2,7-dion, ausgehend von Octan, eingesetzt werden kann.

## 4. Diskussion

P450-Monooxygenasen besitzen aufgrund ihrer Fähigkeit, eine Vielzahl von Molekülen chemo-, regio- und stereoselektiv zu oxidieren, ein hohes Potential für die Entwicklung biokatalytischer Prozesse. Ihre Abhängigkeit von teuren Kofaktoren und vergleichsweise geringe Stabilität führen dazu, dass P450 in industrierelevanten Prozessen derzeit vor allem in Ganzzellbiokatalysatoren eingesetzt werden (Bernhardt und Urlacher 2014; Urlacher und Girhard 2012). Ein häufiges Problem in der Ganzzellbiokatalyse ist die Toxizität des eingesetzten Substrats und/oder der gebildeten Produkte (Schrewe *et al.* 2013). Der Einsatz von Wirtstämmen mit einer höheren Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln, wie einige Pseudomonaden, rückte daher immer mehr in den Fokus der Entwicklung von P450-Ganzzellbiokatalysatoren (Bernhardt und Urlacher 2014; Lundemo und Woodley 2015, 2015; Schrewe *et al.* 2013).

Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit Ganzzellbiokatalysatoren unter Verwendung des lösungsmitteltoleranten *P. putida* DSM 12264-Stamms entwickelt und zur Synthese oxyfunktionalisierter Verbindungen eingesetzt. Als P450 wurden Varianten der CYP102A1 (P450-BM3) sowie CYP101A1 (P450cam) und CYP154A8 mit den Redoxpartnern Putidaredoxin-Reduktase PdR und Putidaredoxin Pdx oder Flavodoxin-Reduktase FdR und Flavodoxin YkuN eingesetzt. Als Substrate wurden das monozyklische Monoterpen *R*-(+)-Limonen und bicyclische Monoterpenoid (+)-Campher sowie die linearen Alkane Heptan, Octan und Nonan eingesetzt. Über die Diversität der verwendeten Substrate und P450-Systeme sollte dabei die Vielseitigkeit des *P. putida*-Ganzzellbiokatalysators untersucht werden.

### 4.1. Entwicklung und Anwendung eines modularen Baukastens zur Koexpression rekombinanter Proteine in *P. putida*

Während der Entwicklung und Optimierung von P450-Ganzzellbiokatalysatoren können unterschiedlichste Faktoren dazu führen, dass neben der Expression der P450 und den dazugehörigen Redoxpartnern die Koexpression weiterer rekombinanter Proteine von Vorteil sein kann. Die Verwendung eines modularen Baukastens, der eine gezielte und flexible Koexpression weiterer rekombinanter Enzyme erlaubt, ohne dabei eine vollständig neue Expressionsstrategie entwickeln zu müssen, ermöglicht hierbei die rasche und gezielte Weiterentwicklung des Ganzzellbiokatalysators. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit zur Proteinexpression in *P. putida* zunächst ein modularer Baukasten entwickelt, der auf der Basis

von zwei kompatiblen Expressionsplasmiden beruht und bei Bedarf die Koexpression weiterer rekombinanter Proteine ermöglichen sollte.

Für die Expression in *P. putida* stehen mittlerweile einige induzierbare Expressionssysteme zur Verfügung (Loeschke und Thies 2015). Zum Aufbau einer Plattform von modular einsetzbaren Expressionsplasmiden wurde in dieser Arbeit das in der Arbeitsgruppe von Altenbuchner entwickelte rha<sub>P<sub>BAD</sub></sub>-Promotorsystem ausgewählt, das auch in *P. putida* bereits erfolgreich zur Expression rekombinanter Proteine eingesetzt werden konnte (Beuttler *et al.* 2011; Jeske und Altenbuchner 2010; Mi *et al.* 2014; Stumpp *et al.* 2000).

Während die Expression von P450-Systemen ausgehend von dem Expressionsplasmid p4782.1 bzw. pJeM1-a erfolgte, wurden weitere rekombinante Proteine, die unterstützend auf die Ganzzellbiokatalyse einwirken sollten, ausgehend von den kompatiblen Koexpressionsplasmiden pSEVA42rha und pSEVA44rha koexprimiert. Um möglichst universell einsetzbare Koexpressionsplasmide zu generieren, erfolgte die Konstruktion von pSEVA42rha und pSEVA44rha gemäß der *Standard European Vector Architecture* (SEVA) (Martínez-García *et al.* 2015; Silva-Rocha *et al.* 2013). Die Kompatibilität des erzeugten rha<sub>P<sub>BAD</sub></sub>-Promotormoduls mit weiteren Modulen der SEVA-Datenbank ermöglichte den Zugang zu einer Plattform unterschiedlichster Plasmidelemente, die auch zukünftig zur Konstruktion weiterer Koexpressionsplasmide eingesetzt werden können. Durch die erstmalige Verwendung des rha<sub>P<sub>BAD</sub></sub>-Promotors in Verbindung mit SEVA-Modulen konnte die SEVA-Datenbank um ein zusätzliches Promotorsystem erweitert werden. Die während der Konstruktion des rha<sub>P<sub>BAD</sub></sub>-Promotormoduls geschaffene Möglichkeit der Klonierung über DNA-Assemblierung ermöglichte dabei eine fortschrittliche, schnelle und von Restriktionsenzymen unabhängige Klonierung einzelner Gene oder artifizierender Operons.

Bemerkenswert ist, dass in dem eingesetzten *P. putida*-Stamm alle bakteriellen P450-Systeme trotz ihrer Herkunft aus unterschiedlichen Organismen in löslicher und aktiver Form exprimiert werden konnten, obwohl dieser bisher nicht als Wirt für die Expression von P450-Systemen eingesetzt wurde. Des Weiteren zeigte die erfolgreiche Koexpression zusätzlicher rekombinanter Proteine die flexible und universelle Einsetzbarkeit des in dieser Arbeit entwickelten modularen Baukastens zur Proteinexpression in *P. putida*. Eine längere Expressionszeit von 40 h erwies sich dabei als vorteilhaft für eine hohe P450-Konzentration. Ursächlich für die langsame Expression der rekombinanten Proteine ist vermutlich das Fehlen eines speziellen Transportsystems für L-Rhamnose in *P. putida*, wodurch die Induktion verzögert wird (Jeske und Altenbuchner 2010).

Im Vergleich zu *E. coli* wurden in *P. putida* vergleichbare oder sogar höhere P450-Expressionstiter erzielt. Das Expressionsniveau von P450-BM3-Varianten liegt in *E. coli* meist zwischen 100-800 nmol/g<sub>cdw</sub> (Müller *et al.* 2014; Pennec *et al.* 2015; Schewe *et al.* 2008; Schulz 2015). In *P. putida* konnten in dieser Arbeit Expressionstiter der BM3-VVF von 200-300 nmol/g<sub>cdw</sub> erzielt werden. Die Koexpression weiterer Proteine resultierte in einer etwas niedrigeren Expression der BM3-VVF. Im Fall der Koexpression von BM3-VVF mit membranständigen Proteinen könnte hierfür eine Beeinträchtigung der Membranintegrität verantwortlich gewesen sein, die sich im Verlauf der Kultivierung negativ auf die P450-Expression auswirkte (Freigassner *et al.* 2009).

P450cam und CYP154A8, deren Gene einen hohen GC-Gehalt aufweisen, zeigten mit 800-1100 nmol/g<sub>cdw</sub> bzw. 300-800 nmol/g<sub>cdw</sub> in *P. putida* im Vergleich zu literaturbeschriebenen Expressionen in *E. coli* deutlich höhere P450-Expressionstiter (Mouri *et al.* 2006; von Bühler *et al.* 2013). Neben dem Expressionssystem scheint möglicherweise der höhere GC-Gehalt in *P. putida* im Vergleich zu *E. coli* die Expression von P450cam und CYP154A8 zu begünstigen (Loeschke und Thies 2015). Obwohl die Wahl der koexprimierten Redoxpartnerproteine einen Einfluss auf die P450-Expression hatte, beeinflusste eine Koexpression weiterer Proteine mit P450cam oder CYP154A8, ausgehend von den modular einsetzbaren Koexpressionsplasmiden pSEVA42rha und pSEVA44rha, die P450-Expression in der Regel nicht signifikant.

## **4.2. Entwicklung von *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren zur Umsetzung von *R*-(+)-Limonen zu *R*-(+)-Perillaalkohol**

Terpenoide stellen unter den Naturstoffen eine sehr vielfältige Gruppe dar, die unter anderem als Arzneimittel, Duft- oder Geschmackstoff eingesetzt werden (Schrader und Bohlmann 2015). Das Monoterpenoid Perillaalkohol ist für die pharmazeutische Industrie aufgrund seiner antikanzerogene Wirkung von Interesse (Chen *et al.* 2015). Perillaalkohol kann durch P450-katalysierte, selektive allylische Hydroxylierung ausgehend von dem Monoterpen Limonen hergestellt werden. Trotz der Zytotoxizität von Limonen wurden hierzu in P450-Ganzzellbiokatalysatoren bislang meist lösungsmittelsensitive Wirtsstämme eingesetzt und nur wenige Anstrengungen unternommen, neue P450-Ganzzellbiokatalysatoren auf der Basis lösungsmitteltoleranter Stämme zu entwickeln. In dieser Arbeit wurde die Verwendung eines rekombinanten lösungsmitteltoleranten *P. putida*-Stamms zur selektiven Oxidation von *R*-(+)-Limonen zu *R*-(+)-Perillaalkohol untersucht. Als Wirtstamm wurde *P. putida* DSM 12264 ausgewählt, der auch noch in Gegenwart von 500 mM *R*-(+)-Limonen in der Lage ist *R*-(+)-Perillasäure zu bilden (Speelmans *et al.* 1998).

#### 4.2.1. Auswahl einer P450 zur selektiven Oxidation von *R*-(+)-Limonen

Für die selektive Oxidation von *R*-(+)-Limonen zu *R*-(+)-Perillaalkohol wurde auf Basis einer Literaturrecherche die hochselektive P450-BM3-Variante A264V/A328V/L437F (BM3-VVF) ausgewählt (Seifert *et al.* 2011). Ein entscheidender Faktor in P450-katalysierten Reaktionen ist die Kopplung von NAD(P)H-Verbrauch und Produktbildung (sog. Kopplungseffizienz). Entkopplungsreaktionen führen insbesondere bei nicht-physiologischen Substraten häufig zu einer ineffizienten Nutzung der Kofaktoren. In Ganzzellbiokatalysatoren kann der dadurch erhöhte Bedarf an Kofaktoren (NADH oder NADPH) die Effizienz der Biotransformation beeinträchtigen (Bernhardt und Urlacher 2014; Lundemo und Woodley 2015).

In früheren Studien konnte durch das Einfügen der Mutation I401P in P450-BM3 Wildtyp bei unverändertem Produktspektrum eine erhöhte Kopplungseffizienz und Aktivität gegenüber den nicht-physiologischen Substraten (+)- $\alpha$ -Pinen und Verbenol beobachtet werden (Whitehouse *et al.* 2009). Auch in der Umsetzung von Propylbenzol konnte durch das Einfügen der Mutation I401P in P450-BM3 Wildtyp die NADPH-Umsatzrate 5-fach erhöht und die Kopplungseffizienz von 71% auf 80% gesteigert werden (Whitehouse *et al.* 2009).

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde mit dem Ziel, die Kopplungseffizienz der BM3-VVF-Variante (13%) zu erhöhen, die Mutation I401P in BM3-VVF eingebracht. Die in dieser Arbeit erstmals erzeugte P450-BM3-Variante A264V/A328V/I401P/L437F (BM3-VVPF) wies bei unveränderter Selektivität in der Umsetzung von *R*-(+)-Limonen im Vergleich zur BM3-VVF deutlich verbesserte katalytische Eigenschaften auf. Neben der 7-fach höheren NADPH-Umsatzrate konnte die Kopplungseffizienz auf 43% gesteigert werden, sodass in den angewendeten *in-vitro*-Systemen mit BM3-VVPF ein höherer Substratumsatz und eine verbesserte katalytische Produktivität im Vergleich zu BM3-VVF erzielt werden konnte. I401 liegt in direkter Nachbarschaft zu dem Hämeisen-gebundenen Cysteinthiolat-Liganden (C400). Ursächlich für die verbesserte Aktivität der I401P-Variante scheint eine Strukturänderung zu sein, die dazu führt, dass bereits ohne Bindung des Substrats Eisen<sup>III</sup> im *high-spin* Zustand vorliegt, sodass die Reduktion des Hämeisens zu Eisen<sup>II</sup> erleichtert wird (Whitehouse *et al.* 2010).

Das zusätzliche Einfügen der I401P-Mutation in eine bereits optimierte P450-BM3-Variante wurde kürzlich erstmals für die selektive Oxidation von (+)-Valencen zu (+)-Nootkaton beschrieben. Die erzeugte BM3-AIP (F87A/A328I/I401P) wies eine 10-fach höhere Aktivität im Vergleich zu BM3-AI auf, jedoch bewirkte die höhere Aktivität eine vermehrte Überoxidation von (+)-Nootkaton zu Nootkaton-13,14-epoxid (Schulz 2015). Auch in der Umsetzung von *R*-(+)-Limonen durch BM3-VVPF konnte eine erhöhte Überoxidation von

Perillaalkohol zu Perillaaldehyd beobachtet werden. Die Tatsache, dass die Aktivität der P450-BM3-Variante in den *in-vitro*-Systemen einen Einfluss auf die Überoxidation hatte, deutet darauf hin, dass die Überoxidation von Perillaalkohol zu Perillaaldehyd ebenfalls durch BM3-VVF bzw. BM3-VVPF und nicht durch andere Enzyme des eingesetzten *E. coli*-Zellsystems, wie beispielsweise einer Alkoholdehydrogenase, katalysiert wurde (Schulz *et al.* 2015; Seifert *et al.* 2009).

#### **4.2.2. Entwicklung eines *P. putida*-Ganzzellbiokatalysators zur Umsetzung von *R*-(+)-Limonen zu *R*-(+)-Perillaalkohol**

Vor dem Hintergrund der Oxidation von *R*-(+)-Limonen zu *R*-(+)-Perillasäure in *P. putida* DSM 12264 durch Proteine des *cym*-Operons wurde zur Entwicklung eines *P. putida*-Ganzzellbiokatalysators für die selektive Oxidation von *R*-(+)-Limonen zu *R*-(+)-Perillaalkohol durch eine heterolog exprimierte P450-BM3-Variante das *cym*-Operon zunächst vollständig deletiert. Der erzeugte Knockoutstamm *P. putida* DSM 12264  $\Delta cym::aac$  (*P. putida*  $\Delta cym$ ) war weder in der Lage *p*-Cymol als Kohlenstoffquelle zu verwenden noch *R*-(+)-Limonen zu *R*-(+)-Perillasäure umzusetzen; allerdings konnte trotz vollständiger Deletion des *cym*-Operons weiterhin eine Oxidation von *R*-(+)-Perillaalkohol und *R*-(+)-Perillaaldehyd festgestellt werden.

Unlängst wurde *P. putida* DSM 12264 in der *de-novo*-Synthese von Geransäure eingesetzt (Mi *et al.* 2014). Mi und Kollegen schlussfolgerten, dass in *P. putida* DSM 12264 die Oxidation von Geraniol zu Geransäure durch spezifische oder unspezifische Oxidoreduktasen katalysiert wird. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass auch im Knockoutstamm *P. putida*  $\Delta cym$  Geraniol zu Geransäure umgesetzt wurde (unveröffentlichte Daten, Prof. Jens Schrader, DECHEMA Forschungsinstitut DFI, Frankfurt). Des Weiteren wurde in der Literatur beschrieben, dass Dehydrogenasen aus *Castellaniella defragrans*, welche die Oxidation von Geraniol und Geranial ermöglichen, ebenfalls in der Lage sind Perillaalkohol und Perillaaldehyd zu oxidieren (Lüddeke *et al.* 2012; Petasch *et al.* 2014). Dies legt die Vermutung nahe, dass in *P. putida* DSM 12264 neben den im *cym*-Operon kodierten Dehydrogenasen weitere Oxidoreduktasen vorhanden sind, welche die Oxidation von *R*-(+)-Perillaalkohol und *R*-(+)-Perillaaldehyd katalysieren können. Bislang wurden in *P. putida* DSM 12264 jedoch keine weiteren Enzyme oder Stoffwechselwege identifiziert, die nachweislich an der Oxidation von *R*-(+)-Perillaalkohol und *R*-(+)-Perillaaldehyd beteiligt sind. Zusätzliche Untersuchungen des Terpen-Stoffwechsels in *P. putida* DSM 12264 könnten zu weiteren Erkenntnissen über die beteiligten Enzyme beitragen und einer Einordnung der hier beobachteten Ergebnisse ermöglichen.

Beide P450-BM3-Varianten, BM3-VVF und BM3VVPF, konnten im Knockoutstamm *P. putida*  $\Delta$ cym in löslicher und aktiver Form exprimiert werden. Ganzzellbiokatalysatoren, in denen BM3-VVF oder BM3-VVPF exprimiert wurde, waren in der Lage *R*-(+)-Limonen selektiv zu *R*-(+)-Perillaalkohol zu oxidieren. Eine Überoxidation des gebildeten Perillaalkohols durch zelluläre Oxidoreduktasen konnte in den P450-Ganzzellbiokatalysatoren nicht festgestellt werden.

Ein Maß, das die Einordnung der katalytischen Produktivität eines Biokatalysators ermöglicht, ist die Umsatzzahl (engl. *total turnover number*, TTN). Sie gibt das Verhältnis zwischen der hergestellten Produktmenge und der eingesetzten Enzymmenge an und wurde hier zum Vergleich der Ganzzellbiokatalysatoren eingesetzt. Während die höhere TTN mit dem Ganzzellbiokatalysator BM3-VVPF gegenüber BM3-VVF der erhöhten Kopplungseffizienz von BM3-VVPF zugeschrieben werden kann, deutet die höhere Konzentration an *R*-(+)-Perillaalkohol mit BM3-VVF darauf hin, dass das P450-Expressionsniveau (BM3-VVF: 300 nmol/g<sub>cdw</sub> bzw. BM3-VVPF: 130 nmol/g<sub>cdw</sub>) und verschiedene Enzymstabilitäten ebenfalls einen Einfluss auf die Produktivität des Ganzzellbiokatalysators hatte. Die geringere Expression von BM3-VVPF im Vergleich zu BM3-VVF könnte in der zusätzlichen I401P-Mutation liegen. Wie bereits erwähnt, liegt I401 in einer sehr sensiblen Region des aktiven Zentrums (Whitehouse *et al.* 2010), sodass die zusätzliche I401P-Mutation möglicherweise zu einer geringeren Expression aktiver BM3-VVPF führte.

Die Tatsache, dass die katalytische Produktivität des *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator deutlich unter der im zellfreien System lag (TTN 26 vs. 266 mit BM3-VVF) und nur geringe Produktkonzentrationen erzielt wurden, führte zu dem Schluss, dass für den *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator weitere nicht enzymbedingte Limitierungen vorlagen.

#### **4.2.3. Optimierung des *P. putida*-Ganzzellbiokatalysators zur Umsetzung von *R*-(+)-Limonen zu *R*-(+)-Perillaalkohol**

Der hydrophobe Charakter einiger Substrate von P450-Monooxygenasen führt zu einer meist nur sehr geringen Löslichkeit in Wasser. Die hierdurch eingeschränkte Substratverfügbarkeit kann in Ganzzellbiokatalysatoren die Substrataufnahme erschweren (Bernhardt und Urlacher 2014; Schrewe *et al.* 2013). Mit dem Ziel eine verbesserte Substratverfügbarkeit zu erreichen, wurde in der Umsetzung von *R*-(+)-Limonen zu *R*-(+)-Perillaalkohol durch *P. putida*-Ganzzellkatalysatoren die Verwendung unterschiedlicher DMSO-Konzentrationen als Kosolvent und die Zugabe eines Cyclodextrins als Löslichkeitsvermittler getestet. Beides führte nicht zu einer verbesserten Umsetzung; gleichzeitig führte eine Erhöhung der DMSO- bzw. Substratkonzentration allerdings auch nicht zu einem vorzeitigen

Aktivitätsverlust des *P. putida*-Ganzzellbiokatalysators. Ein negativer Einfluss hoher DMSO-Konzentrationen konnte beispielsweise in der Umsetzung von Methyllaurat oder dem Grundmanns Keton durch *E. coli*-Ganzzellbiokatalysatoren beobachtet werden. Ursache hierfür war eine vorzeitige Permeabilisierung der Zellen bzw. eine erhöhte Zelltoxizität, ausgelöst durch die gestiegene Substratverfügbarkeit in der wässrigen Phase (Hernández-Martín *et al.* 2014; Julsing *et al.* 2012). In Umsetzungen von *R*-(+)-Limonen zu (+)-*trans*-Carveol durch eine Cumol-Dioxygenase mit ruhenden *P. putida* S12-Zellen bzw. *S*-(-)-Limonen zu *S*-(-)-Perillaalkohol mit ruhenden *P. putida* KT2440-Zellen hatte vor allem die starke Evaporation des Limonens zur Folge, dass nach kurzer Zeit keine weitere Produktbildung erfolgte (Cornelissen *et al.* 2013; Groeneveld *et al.* 2015). In dieser Arbeit konnte die Evaporation von *R*-(+)-Limonen durch die Zugabe von Methyl- $\beta$ -cyclodextrin deutlich verringert werden. Dennoch führte die hierdurch verbesserte Substratverfügbarkeit alleine nicht zu einer erhöhten Produktivität oder verlängerten Reaktionszeit. Auch durch die erneute Zugabe von *R*-(+)-Limonen im Laufe der Reaktion konnte die Bildung von *R*-(+)-Perillaalkohol nicht verbessert werden.

Die äußere Zellmembran Gram-negativer Bakterien stellt für hydrophobe Substrate eine natürliche Barriere dar (Schrewe *et al.* 2013). In *E. coli*-Ganzzellbiokatalysatoren stellte sich der eingeschränkte Stofftransfer über die Zellmembranen als eine entscheidende Limitierung für die Biotransformation von Limonen heraus (Carter *et al.* 2003; Cornelissen *et al.* 2013). Strategien zur Verbesserung des Stofftransfers beinhalten häufig eine physikalische oder chemische Behandlung oder die Modifikation der äußeren Zellmembran durch Expression universeller oder spezieller Membranproteine (Chen 2007). Mit dem Ziel einen verbesserten Stofftransfer zu ermöglichen, wurde in dieser Arbeit einerseits der Effekt einer Koexpression der Membranproteine CymD und AlkL und andererseits eine Permeabilisierung der Zellen durch Polymyxin B untersucht. CymD aus *P. putida* besitzt Ähnlichkeit zu anderen Proteinen der äußeren Zellmembran, wie TodX (Eaton 1997), die den Transfer von monozyklischen Kohlenwasserstoffen in die Zelle ermöglichen. Neben TodX unterstützt auch CymD in *P. putida* F1 den Transfer von Toluol (van den Berg 2015). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von Toluol zu *p*-Cymol und Limonen wurde in dieser Arbeit angenommen, dass CymD auch den Transfer von *p*-Cymol oder Limonen in die Zelle unterstützt. Allerdings konnte trotz der strukturellen Ähnlichkeit zu Toluol bzw. *p*-Cymol die Umsetzung von *R*-(+)-Limonen durch die Koexpression von CymD nicht gesteigert werden. Das Membranprotein AlkL konnte als Bestandteil des am Alkan-Metabolismus beteiligten Enzym-Clusters in *P. putida* GPo1 und möglicherweise erster bakterieller Alkan-Importer identifiziert werden (Grant *et al.* 2014;

Julsing *et al.* 2012). Cornelissen und Kollegen zeigten, dass in der Umsetzung von *S*-(-)-Limonen zu *S*-(-)-Perillaalkohol die Koexpression von AlkL in *E. coli*, jedoch nicht in *P. putida* KT2440 eine verbesserte Aktivität des Ganzzellbiokatalysators zur Folge hatte (Cornelissen *et al.* 2013). In dieser Arbeit konnte mit dem *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator BM3-VVF/AlkL zum ersten Mal gezeigt werden, dass im Stamm *P. putida* DSM 12264 die Koexpression von AlkL zu einer verbesserten Umsetzung von *R*-(+)-Limonen führt. Auch durch die Permeabilisierung des *P. putida*-Ganzzellbiokatalysators BM3-VVF mit Polymyxin B konnten höhere Konzentrationen an *R*-(+)-Perillaalkohol erzielt werden. Polymyxin B lagert sich in die äußere Membran Gram-negativer Bakterien ein und verändert dadurch die Membranintegrität (Daugelavicius *et al.* 2000; Nikaido 2003). Ein ähnlich positiver Effekt von Polymyxin B auf den Substrattransfer und die Produktivität konnte für *E. coli*-Ganzzellbiokatalysatoren beobachtet werden, die zur Hydroxylierung des tricyclischen Diterpenoids Abietinsäure durch die Monooxygenase CYP105A1 eingesetzt wurden (Janocha und Bernhardt 2013). Dies legte nahe, dass auch in *P. putida* DSM 12264 der Transfer von Limonen über die äußere Zellmembran einen limitierenden Faktor darstellt. Um die Limitierung des eingeschränkten Transfers von Limonen zu umgehen, verfolgten Alonso-Gutierrez und Kollegen das Konzept einer *de-novo*-Synthese von *S*-(-)-Limonen in *E. coli* mit anschließender Hydroxylierung zu *S*-(-)-Perillaalkohol durch CYP153A6 (Alonso-Gutierrez *et al.* 2013). Zur verstärkten Herstellung von Terpenoidbausteinen und Limonen wurden Gene unterschiedlicher Herkunft zur Einführung eines synthetischen Mevalonatstoffwechselwegs sowie die Gene einer Geranyldiphosphatsynthase und Limonensynthase in *E. coli* eingebracht. Ausgehend von 1% Glucose als Kohlenstoffquelle konnten 435 mg/l *S*-(-)-Limonen und 105 mg/l *S*-(-)-Perillaalkohol produziert werden. Die nicht vollständige Hydroxylierung des *S*-(-)-Limonens zu *S*-(-)-Perillaalkohol zeigte jedoch, dass eine direkte Kopplung zwischen *de-novo*-Synthese und Hydroxylierung von Limonen problematisch sein kann. Gründe hierfür könnten beispielsweise die Toxizität oder ineffiziente Umsetzung der gebildeten Intermediate oder deren Export sein. Eine Lösung für mehrstufige Reaktionen mit unterschiedlichen Herausforderungen könnte die Verwendung eines Gemischs unterschiedlicher ruhender Zellen sein (Willrodt *et al.* 2015a). Insbesondere die leichte Verfügbarkeit von *R*-(+)-Limonen als Hauptbestandteil der Schale vieler Zitrusfrüchte (Tranchida *et al.* 2012) macht eine *de-novo*-Synthese bislang jedoch unattraktiv.

Neben dem positiven Effekt eines verbesserten Stofftransfers ist die Permeabilisierung der Zellen in P450-Ganzzellbiokatalysatoren kritisch zu sehen, da die Destabilisierung der Membran zu einem Verlust von Kofaktoren und einer Beeinträchtigung der metabolischen

Kofaktorregenerierung führen kann (Julsing *et al.* 2012). Hinzu kommt, dass durch die geringe Kopplungseffizienz der eingesetzten BM3-VVF (13%) das zellulär vorliegende NADPH nur ineffizient genutzt wurde. Neben der Deregulierung von Stoffwechselwegen zur gesteigerten metabolischen Produktion von NAD(P)H, konnten in Ganzzellbiokatalysatoren kofaktorregenerierende Enzyme zur Erhöhung der Kofaktorverfügbarkeit eingesetzt werden (Fasan *et al.* 2011; Kratzer *et al.* 2015; Lee *et al.* 2013; Siedler *et al.* 2011). Mit dem Ziel, eine maximale NADPH-Versorgung zu gewährleisten, wurden die Glucosedehydrogenase IV aus *B. megaterium* (GDH) mit und ohne dem Glucose-Facilitator aus *Z. mobilis* (GLF) und BM3-VVF in *P. putida* koexprimiert. Durch die Koexpression von GLF sollte die Glucoseaufnahme gesteigert und hierdurch die GDH-katalysierte Kofaktorregeneration zusätzlich unterstützt werden. Beides führte jedoch nicht zu einer erhöhten Bildung von Perillaalkohol. Die sogar geringere Bildung von Perillaalkohol durch BM3-VVF/GDH und BM3-VVF/GDH/GLF im Vergleich zu BM3-VVF wies daraufhin, dass in den permeabilisierten Zellen durch eine verbesserte Kofaktorversorgung alleine die Umsetzung nicht gesteigert werden kann.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde in weiteren Versuchen der Schwerpunkt auf die Optimierung der Reaktionsbedingungen gelegt. Durch eine Erhöhung der initialen Konzentration von *R*-(+)-Limonen auf 10 mM und die Verwendung einer angepassten Biokatalysatorkonzentration von 8 g<sub>cdw</sub>/l konnte die Bildung von *R*-(+)-Perillaalkohol unter Verwendung des permeabilisierten *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator BM3-VVF innerhalb von 3 h von anfangs 45 µM auf 530 µM (73 mg/l) gesteigert werden. Entscheidend für die geringe Produktivität des *P. putida*-Ganzzellbiokatalysators scheint neben der schlechten Membrangängigkeit des *R*-(+)-Limonens die geringe Aktivität und Stabilität der verwendeten BM3-VVF-Variante zu sein. Im Vergleich zu literaturbeschriebenen Biotransformationen von *S*-(-)-Limonen mit *E. coli*-, *P. putida* KT2440 bzw. *P. putida* GPo23-Ganzzellbiokatalysatoren (Cornelissen *et al.* 2011; Cornelissen *et al.* 2013; van Beilen *et al.* 2005), in denen zur Hydroxylierung CYP153A6 eingesetzt wurde, konnten mit den in dieser Arbeit entwickelten *P. putida*  $\Delta$ *cym*-Ganzzellbiokatalysatoren nur geringe Konzentration an *R*-(+)-Perillaalkohol produziert werden (Anhang, Tabelle 15). Sowohl Cornelissen als auch van Beilen und Kollegen setzten wachsende Zellen und ein Zweiphasensystem mit Bis-2-ethylhexyl-phthalat (BEHP) zur Produktabtrennung und Vermeidung zelltoxischer Effekte des Limonens oder der gebildeten Produkte ein (Cornelissen *et al.* 2011; Cornelissen *et al.* 2013; van Beilen *et al.* 2005). Die Verwendung eines Prozesses, ähnlich der Fed-Batch-Kultivierung von *P. putida* DSM 12264 zur Produktion von *R*-(+)-Perillasäure (Mirata *et al.* 2010; Mirata *et al.*

2009), könnten Aufschluss über das weitere Potential des in dieser Arbeit entwickelten *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren zur Produktion von *R*-(+)-Perillaalkohol geben. Es ist anzunehmen, dass durch eine geeignete Kombination aus Biokatalysator und Prozessbedingungen auch mit Ganzzellbiokatalysatoren des *P. putida* DSM 12264-Stamms unter Verwendung eines heterolog exprimierten P450-Systems eine Produktion von Perillaalkohol im höheren Maßstab (g/l) möglich sein könnte.

### **4.3. Umsetzung von (+)-Campher durch *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren**

Als weiteres Modellsystem wurde die Umsetzung von (+)-Campher zu 5-*exo*-Hydroxycampher durch P450cam im *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator untersucht. Mit über 2300 min<sup>-1</sup> besitzt P450cam aus *P. putida* im Vergleich zu anderen P450-Monooxygenasen eine sehr hohe katalytische Aktivität gegenüber dem natürlichen Substrat (+)-Campher (Kadkhodayan *et al.* 1995). In der untersuchten Biotransformation von Limonen führte die geringe Aktivität der BM3-VVF und die schlechte Membrangängigkeit des Limonens dazu, dass sich die zelleigene Kofaktorregenerierung nicht limitierend auf den *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator auswirkte. Anders als das natürliche Fusionsprotein P450-BM3 ist P450cam von der Expression der Redoxpartnerproteine Pdx und PdR abhängig. Aufgrund der zu erwartenden guten Expression, der hohen Kopplungseffizienz (96%) und der hohen katalytischen Aktivität von P450cam wurde die Oxidation von (+)-Campher im *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator betrachtet, um den Einfluss der Kofaktorkonzentration in der Zelle zu untersuchen.

Zur verbesserten Kofaktorregenerierung wurde die Glyceroldehydrogenase (GldA) aus *E. coli* oder die GDH aus *B. megaterium* in *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren mit P450cam und Pdx/PdR koexprimiert. In den *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren P450camPP/GDH und P450camPP/GldA konnte durch die zusätzliche Kofaktorregenerierung die Bildung von 5-*exo*-Hydroxycampher um mehr als das 7-Fache gesteigert werden. Die deutlich höheren TTNs bestätigen, dass ähnlich wie in *E. coli*-Ganzzellbiokatalysatoren auch in *P. putida* die metabolische Kofaktorverfügbarkeit die Produktivität von P450cam limitierte (Mouri *et al.* 2006). Eine weitere Verbesserung der Produktivität im *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator P450camPP/GDH/GLF durch eine gesteigerte Glucoseaufnahme nach zusätzlicher Koexpression des Glucose-Facilitators (GLF) aus *Z. mobilis* konnte nicht festgestellt werden. Die deutlich verbesserte Produktivität in der Umsetzung von (+)-Campher nach Koexpression von GDH oder GldA zeigen, dass im Fall eines hohen Bedarfs an Kofaktoren auch in den *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren die Biotransformation durch eine unterstützende Kofaktorregenerierung verbessert werden kann.

Ganzzellsysteme sind generell in der Lage ihren cytosolischen pH-Wert neutral zu halten. Das Absinken des pH-Werts durch die GDH-katalysierte Umsetzung von Glucose zu D-Glucono-1,5-lacton, welches *in situ* zu Gluconsäure hydrolysiert, sollte dennoch kritisch gesehen werden, da eine Beeinträchtigung der cytosolisch vorliegenden Enzyme und der Prozessstabilität nicht ausgeschlossen werden können (Booth 1985). Bei der Kofaktorregenerierung durch GldA wird Dihydroxyaceton gebildet, welches in höheren Konzentrationen zelltoxisch wirken kann (Subedi *et al.* 2008). Zudem besitzt GldA eine höhere Affinität und spezifische Aktivität gegenüber Dihydroxyaceton, sodass eine Akkumulation von Dihydroxyaceton möglicherweise eine kontinuierliche Kofaktorregenerierung durch GldA unterbinden könnte (Subedi *et al.* 2008). In weiteren Untersuchungen könnte gezeigt werden, ob und in welchem Maß die durch GldA bzw. GDH gebildeten Nebenprodukte die Stabilität und Produktivität des *P. putida*-Ganzzellbiokatalysators beeinflussen.

#### **4.4. Entwicklung von Ganzzellbiokatalysatoren zur selektiven Oxidation von linearen Alkanen**

*Teile dieses Kapitels sind in ähnlicher Form in einem Originalartikel publiziert worden. Der Text des Originalartikels wurde übersetzt und um weitere Teile ergänzt.*

*Abgedruckt mit freundlicher Genehmigung von Tieves F, Erenburg IN, Mahmoud O, Urlacher VB. 2016. Synthesis of chiral 2-alkanols from n-alkanes by a P. putida whole-cell biocatalyst. Biotechnol Bioeng Copyright © 2016 John Wiley and Sons.*

Eine in der organischen Synthese häufig problematische Reaktion ist die durch P450 katalysierte regio- und stereoselektive Hydroxylierung von (linearen) Alkanen zu chiralen Alkoholen (Roduner *et al.* 2013), die als Grundbaustein in der chemischen und pharmazeutischen Industrie eingesetzt werden können (Nolte und Urlacher 2015; van Beilen und Funhoff 2005, 2007). In dieser Arbeit sollte eine möglichst effektive Kombination aus Wirtstamm, Enzymen und Reaktionsbedingungen zur regio- und stereoselektiven Hydroxylierung linearer Alkane gefunden werden. Einige *P. putida*-Stämme sind in der Lage, auch lineare Alkane als Kohlenstoff- bzw. Energiequelle zu verwerten (Rojo 2009; van Beilen *et al.* 2001), sodass ursprünglich davon ausgegangen wurde, dass *P. putida* nicht als Wirtstamm zur Entwicklung von Ganzzellbiokatalysatoren zur selektiven Hydroxylierung von linearen Alkanen eingesetzt werden kann (Gudimichi *et al.* 2012). Trotz seiner Empfindlichkeit gegenüber organischen Lösungsmitteln, wurde daher häufig *E. coli* als Wirtstamm für die CYP153-katalysierte Produktion von 1-Octanol verwendet (Fujii *et al.* 2006; Fujita *et al.* 2009; Grant *et al.* 2011; Gudimichi *et al.* 2012; Nodate *et al.* 2006).

Während Monooxygenasen der CYP153-Familie die terminale Oxidation von linearen Alkanen katalysieren, ist CYP154A8 aus *N. farcinica* momentan die einzige bekannte wildtypische P450, die eine subterminale Hydroxylierung von linearen Alkanen mittlerer Kettenlänge mit hoher Regio- und Stereoselektivität ermöglicht (von Bühler *et al.* 2013; von Bühler und Urlacher 2014). Um die Eignung eines lösungsmitteltoleranten *P. putida*-Stamms für die Entwicklung von Ganzzellbiokatalysatoren zur selektiven Hydroxylierung von linearen Alkanen zu untersuchen, wurde CYP154A8 ausgewählt und mit Redoxpartnerproteinen im lösungsmittelsensitiven *E. coli* JM109-Stamm oder im lösungsmitteltoleranten *P. putida* DSM 12264-Stamm koexprimiert.

#### 4.4.1. Umsetzung von Octan durch *E. coli*- und *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren

Bei der Koexpression von CYP154A8 mit Pdx/PdR in *P. putida* wurden in dem Ganzzellbiokatalysator (A8PP) deutlich höhere P450-Konzentrationen im Vergleich zur Koexpression in *E. coli* erzielt. Sowohl zur Expression in *E. coli* als auch in *P. putida* wurden die durch L-Rhamnose induzierbaren Expressionsplasmide eingesetzt. L-Rhamnose kann in *E. coli* als Kohlenstoffquelle genutzt werden (Jeske und Altenbuchner 2010; Wegerer *et al.* 2008), sodass der Abbau des Induktors möglicherweise zu der geringeren Expression in *E. coli* im Vergleich zu *P. putida* beigetragen hat. Obwohl die P450-Konzentration in *E. coli* im Vergleich zu *P. putida* deutlich niedriger lag, deutete der anfangs durch beide Ganzzellbiokatalysatoren nahezu gleich hohe Umsatz von Octan darauf hin, dass eine Limitierung allein durch die geringere P450-Expression ausgeschlossen werden kann und die physiologischen Eigenschaften beider Wirtsstämme einen größeren Einfluss auf die Produktivität der Ganzzellbiokatalysatoren haben.

Die mit Glucose im Vergleich zu Glycerol erzielten höheren Produktkonzentrationen wiesen darauf hin, dass sowohl in *E. coli* als auch in *P. putida* Glucose als Energiequelle besser geeignet ist. Eine ähnliche Beobachtung konnte bereits in der Produktion von 1-Octanol durch *E. coli*-Ganzzellbiokatalysatoren gemacht werden; nur die Verwendung von Glucose als Energiequelle führte aufgrund einer effizienteren Bereitstellung des benötigten NADH-Kofaktors zu einer signifikanten Produktion von 1-Octanol (Gudimichi *et al.* 2012).

Wie bereits im biphasischen System mit isolierten Enzymen beobachtet (von Bühler und Urlacher 2014), erfolgte die CYP154A8-katalysierte Hydroxylierung von Octan durch die *E. coli*- und *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren A8PP mit hoher Regio- und Stereoselektivität, wodurch unter Verwendung von Glucose nach 4 h mit *E. coli* 1,1 mM und mit *P. putida* 1,4 mM (*S*)-2-Octanol (88% *ee*) gebildet werden konnten. Trotz der zu erwartenden höheren

Lösungsmitteltoleranz von *P. putida*, zeigte sich initial somit kein großer Unterschied zwischen dem *E. coli*- und *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator.

Dennoch kann auf Dauer die Aktivität und Stabilität eines Ganzzellbiokatalysators in Anwesenheit organischer Lösungsmittel durch einen höheren Energiebedarf und die Anpassung zellulärer Prozesse beeinflusst werden (Heipieper *et al.* 2007; Segura *et al.* 2012). Des Weiteren wirken organische Lösungsmittel häufig destabilisierend auf Proteine, sodass eine dauerhafte Exposition zu einer Inaktivierung von Enzymen führen kann. Mit zunehmender Reaktionszeit stellte sich im biphasischen Ganzzellsystem die geringe Lösungsmitteltoleranz des *E. coli*-Ganzzellbiokatalysators als ein entscheidendes Problem in der Umsetzung von Octan heraus, infolgedessen nach wenigen Stunden keine weitere biokatalytische Aktivität beobachtet werden konnte. Ursache hierfür scheint eine sich verringemde Vitalität der lösungsmittelsensitiven *E. coli*-Zellen durch die steigende Konzentration an 2-Octanol und die kontinuierliche Exposition gegenüber Octan gewesen zu sein. Die länger anhaltende biokatalytische Aktivität und die mit 4,7 mM (87% *ee*) erzielte mehr als doppelt so hohe Konzentration an (*S*)-2-Octanol veranschaulicht das bessere Vermögen des *P. putida*-Ganzzellbiokatalysators, die im Reaktionsverlauf steigende Toxizität zu kompensieren. In Studien zur Epoxidierung von Styrol wurden diesbezüglich ebenfalls grundlegende Unterschiede zwischen rekombinanten *P. putida*- und *E. coli*-Ganzzellbiokatalysatoren beobachtet: Während *P. putida* in der Lage war, den in Anwesenheit einer zelltoxischen zweiten Phase von Octanol gestiegenen Energiebedarf durch eine beschleunigte Glucoseaufnahme und NAD(P)H-Regenerierung zu kompensieren und hierbei ausreichend Kofaktoren für die Oxidation von Styrol lieferte (Blank *et al.* 2008), war dies *E. coli* nicht möglich (Bühler *et al.* 2008). Eine ähnliche Überlegenheit eines *P. putida*-Ganzzellbiokatalysators aufgrund seiner höheren Toleranz gegenüber zelltoxischen Monoterpenoiden im Vergleich zu *E. coli* und *S. cerevisia* konnte auch in der Produktion von Geransäure gezeigt werden (Mi *et al.* 2014).

Als ein direkter zellulärer Anpassungsmechanismus kann die beobachtete Aggregation von *P. putida*-Zellen während der Umsetzung von Octan betrachtet werden, die in der Literatur in Anwesenheit von organischen Lösungsmitteln bereits u.a. für *P. putida* beschrieben wurde (de Carvalho *et al.* 2004; Gaur und Khare 2009). Die durch Aggregation reduzierte Kontaktfläche zwischen den *P. putida*-Zellen und dem Octan könnte zu einer verbesserten Vitalität und infolgedessen zu der höheren Produktbildung im Vergleich zu *E. coli* beigetragen haben.

Eine entscheidende Rolle für die Substrataufnahme spielt die Substratverfügbarkeit. Zu ihrer Maximierung wurde hier die Zugabe von Methyl- $\beta$ -cyclodextrin als Löslichkeitsvermittler

untersucht. Sowohl in *E. coli* als auch in *P. putida* konnte hierdurch die Bildung von 2-Octanol verbessert werden. Das Ausbleiben der Zellaggregation im *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator sprach dabei dafür, dass neben einer erhöhten Substratverfügbarkeit durch Solubilisierung des Octans, die gesteigerte biokatalytische Aktivität auf eine verbesserte Zellvitalität durch „Maskierung“ des toxischen Octans und 2-Octanols zurückzuführen war. Infolgedessen konnte die Produktivität in beiden Ganzzellbiokatalysatoren gesteigert werden. Die mit *P. putida* dennoch längere Reaktionszeit und final doppelt so hohe Produktkonzentration im Vergleich zu *E. coli* verdeutlichten den Vorteil der Anwendung des lösungsmitteltoleranten Wirtsstamms zur selektiven Hydroxylierung von linearen Alkanen.

#### **4.4.2. Optimierung der Umsetzung von linearen Alkanen durch *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren**

Nach schrittweiser Optimierung des *P. putida*-Ganzzellbiokatalysators konnten, ausgehend von Octan, 15,7 mM (*S*)-2-Octanol mit 87% *ee* produziert werden. Dies ist nach aktuellem Wissensstand die bisher höchste beschriebene Produktion von 2-Octanol durch ein P450-System (Anhang, Tabelle 15). Um dieses Ergebnis zu erzielen, wurden verschiedene Möglichkeiten zur Optimierung des *P. putida*-Ganzzellbiokatalysators untersucht: die Bereitstellung einer hohen Konzentration an Energiequelle, die Koexpression eines kofaktorregenerierenden Enzyms und die Koexpression unterschiedlicher Redoxpartnerproteine.

Um eine ausreichende Bereitstellung von Kofaktoren über den zelleigenen Metabolismus zu gewährleisten, wurde durch Zugabe von Glucose eine hohe Verfügbarkeit an Energiequelle sichergestellt. Wie bereits erwähnt, verfügen lösungsmitteltolerante *P. putida*-Stämme über die Fähigkeit, den erhöhten Energiebedarf in Gegenwart organischer Lösungsmittel durch eine gesteigerte Glucoseaufnahme und NAD(P)H-Regenerierungsrate auszugleichen (Blank *et al.* 2008; Ebert *et al.* 2011). Blank und Kollegen beobachteten dabei, dass der lösungsmitteltolerante Stamm *P. putida* DOT-T1E in Anwesenheit einer zweiten Phase von Octanol vor allem durch eine erhöhte Aktivität des Zitratzyklus in der Lage war, die NAD(P)H-Regenerierungsrate zu steigern (Blank *et al.* 2008). Anders als bei Blank und Kollegen, die in *P. putida* auch bei gesteigerter Glucoseaufnahme und NAD(P)H-Regenerierungsrate keine Säurebildung beobachteten, verursachte die Verwendung hoher Glucosekonzentrationen in der in dieser Arbeit durchgeführten Umsetzung von Octan eine verstärkte Säurebildung durch den *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator. In Studien mit *E. coli* konnte dies auf eine verstärkte Bildung von Essigsäure, unter anderem aufgrund eines überlasteten Zitratzyklus, zurückgeführt werden (Vemuri *et al.* 2006), sodass davon

ausgegangen werden musste, dass die metabolische Bereitstellung von Kofaktoren im hier eingesetzten *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator ausgelastet war.

Der wichtigste Mechanismus zur Toleranz gegenüber Lösungsmittel in *P. putida* ist der durch die protonenmotorische Kraft getriebene Export von Lösungsmittel über Effluxpumpen (Ramos *et al.* 2015). Das bei Verwendung von Glucose als Energiequelle mit der Zeit aufgetretene Absinken des pH-Werts könnte den Export über Effluxpumpen erschwert und damit die Stabilität des Ganzzellbiokatalysators beeinflusst haben. Ähnlich wie bereits für *E. coli*-Ganzzellbiokatalysatoren gezeigt (Olaofe *et al.* 2013), könnte daher auch in *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren die Verwendung eines Glucose-Fed-Batch-Prozesses zu einer höheren Effizienz zwischen Glucoseverbrauch und Kofaktorbereitstellung bei gleichzeitig minimierter Säurebildung beitragen.

In dieser Arbeit konnte in der Umsetzung von (+)-Campher durch die hochaktive P450cam bereits festgestellt werden, dass die Regenerierung von NADH durch den zelleigenen Metabolismus in *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren limitierend auf die Reaktion wirken kann. Darüber hinaus musste davon ausgegangen werden, dass der Export von Octan oder Octanol über Effluxpumpen zusätzlich den Energiebedarf erhöht, sodass im *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator eine Konkurrenz zwischen Lösungsmitteltoleranz auf der einen Seite und Oxidation des Octans auf der anderen Seite zu einer Einschränkung der biokatalytischen Aktivität hätte führen können. Um die Bereitstellung von Kofaktoren zu unterstützen, wurde auch hier die GDH aus *B. megaterium* koexprimiert. Eine initiale beschleunigte Produktbildung im *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator A8PP/GDH wies darauf hin, dass zumindest zu Beginn der Umsetzung auch im *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator A8PP die Kofaktorverfügbarkeit aufgrund der hohen Reaktionsgeschwindigkeit und möglicherweise konkurrierender zellulärer Prozesse limitierend wirkte. Dennoch deuteten die durch A8PP und A8PP/GDH erzielten gleich hohen finalen Konzentrationen daraufhin, dass neben einem höheren Kofaktorbedarf zu Beginn der Umsetzung auf Dauer zusätzliche Faktoren die Umsetzung von Octan beeinflussten. Anders als in der Umsetzung von (+)-Campher wurde in der Umsetzung von Octan eine deutlich längere Reaktionszeit gewählt. In der Umsetzung von Octan schien die längere Exposition unter zelltoxischen Bedingungen für eine sinkende Stabilität der exprimierten Enzyme oder der eingesetzten Zellen verantwortlich zu sein, sodass sich die Produktbildung im Reaktionsverlauf auch in *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren verringerte.

Ein hohes P450-Expressionslevel gilt häufig als Voraussetzung für eine gute Leistungsfähigkeit in P450-Ganzzellbiokatalysatoren. Deutlich weniger Aufmerksamkeit wird hingegen meist den eingesetzten Redoxpartnerproteinen geschenkt, obwohl in *in-vitro*-Systemen bereits gezeigt werden konnte, dass die Wahl der Redoxpartner und deren Stöchiometrie einen wesentlichen Einfluss auf die Elektronentransfereffizienz und infolgedessen auf die Produktbildung haben kann (Bernhardt und Urlacher 2014; Girhard *et al.* 2010). Erfolgt die zweite Elektronenübertragung auf das Hämeisen nicht oder verzögert, kann dies zu Nebenreaktionen führen, sodass das Substrat nicht hydroxyliert wird. Neben den sterischen Eigenschaften des Substrats spielen hierbei ebenfalls das Redoxpotential der eingesetzten Redoxpartner und die Proteininteraktionen zwischen den Redoxpartnern und der P450 eine entscheidende Rolle. Infolge der ineffizienten Elektronenübertragung kommt es zu einem erhöhten NAD(P)H-Bedarf, der schließlich zu einer weiteren Limitierung der katalysierten Reaktion beitragen kann (Bühler *et al.* 2008).

Aufgrund der Verwendung eines *P. putida*-Ganzzellbiokatalysators wurden in dieser Arbeit CYP154A8 zunächst in Verbindung mit den Redoxpartnern Pdx und PdR aus *P. putida* eingesetzt und davon ausgegangen, dass ihr hohes Expressionslevel in *P. putida* zu einer hohen Produktivität beitragen würde. Weitere Studien mit den Redoxpartnern YkuN aus *B. subtilis* und FdR aus *E. coli* zeigten jedoch, dass auch im CYP154A8-basierten *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator die Wahl der Redoxpartner einen Einfluss auf die biokatalytische Aktivität hatte. Wurde CYP154A8 in *P. putida* mit den Redoxpartnern YkuN/FdR anstelle von Pdx/PdR koexprimiert, zeigte der entsprechende Ganzzellbiokatalysator A8YF, obwohl er eine geringere P450-Konzentration im Vergleich zu A8PP aufwies, eine beschleunigte Produktbildung und höhere finale Produktkonzentrationen. Eine ähnliche Beobachtung konnte auch in *E. coli*-Ganzzellbiokatalysatoren gemacht werden, die zur selektiven Oxidation des Grundmanns Ketons eingesetzt wurden (Hernández-Martín *et al.* 2014). Sehr wahrscheinlich beruht dieser Effekt auf der höheren Elektronentransfereffizienz durch YkuN/FdR im Vergleich zu Pdx/PdR (von Bühler *et al.* 2013). Jedoch ist zu beachten, dass auch unterschiedliche Expressionslevel der Redoxpartnerproteine oder eine unterschiedliche Verfügbarkeit und Bereitstellung der Kofaktoren NADPH (im Fall von YkuN/FdR) bzw. NADH (im Fall von Pdx/PdR) einen zusätzlichen Effekt auf die Produktivität des *P. putida*-Ganzzellbiokatalysators haben könnten (Blank *et al.* 2010; Borrero-de Acuña *et al.* 2014; Matin und Gottschal 1976; Nikel *et al.* 2014a).

#### 4.4.3. Erhöhung der Enantiomerenreinheit in Alkan-hydroxylierenden *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren

Eine entscheidende Bedeutung bei der Herstellung chiraler Alkohole spielt die Enantioselektivität der Reaktion. In dieser Arbeit wurde in CYP154A8-basierten *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren die Verwendung der NADP(H)-abhängigen LB-ADH aus *L. brevis*, die sekundäre (*R*)-Alkohole und 2-Ketone als Substrat akzeptiert (Hummel 1997; Leuchs und Greiner 2011), zur Entfernung des ungewünschten Produkts (*R*)-2-Octanol untersucht. Unter Verwendung der erzeugten kompatiblen Expressionsplasmide wurde hierzu die Koexpression von P450-ADH-Systemen im *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator etabliert. Die entwickelten Ganzzellbiokatalysatoren A8YF/LB und A8PP/LB wurden zur Umsetzung von Octan eingesetzt. Als Energiequellen wurden Glucose und Glycerol verglichen. Nur durch den Ganzzellbiokatalysator A8YF/LB mit Glycerol als Energiequelle konnte eine verbesserte Enantiomerenreinheit von bis zu 99% *ee* erzielt werden. In allen anderen Ganzzellumsetzungen verschlechterte sich die Enantiomerenreinheit deutlich.

In den *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren scheinen drei Effekte ursächlich für dieses Ergebnis zu sein: Erstens wird im Kofaktor-entkoppelten Redoxsystem mit PdR/Pdx (in A8PP/LB) das in der Zelle vorhandene NADPH durch die PdR nicht genutzt und bleibt für die LB-ADH verfügbar. Infolgedessen wird das als Nebenprodukt der P450-Reaktion gebildete 2-Keton durch die ADH zum ungewünschten (*R*)-2-Alkohol reduziert und der *ee*-Wert sinkt. Zweitens wird im Kofaktor-gekoppelten Redoxsystem mit YkuN/FdR (in A8YF/LB) NADPH durch die FdR verbraucht und NADP<sup>+</sup> gebildet, welches die gewünschte Oxidation des (*R*)-2-Alkohols zum 2-Keton durch die LB-ADH begünstigt. Das Vermögen NADPH zu regenerieren ist dabei unter Verwendung von Glucose als Energiequelle höher als unter Verwendung von Glycerol (Chavarría *et al.* 2013; Nickel *et al.* 2014a). In Kombination mit einer über die Zeit sinkenden P450/Reduktase-Aktivität führte die mit Glucose höhere NADPH-Verfügbarkeit dazu, dass die LB-ADH erneut die unerwünschte Reduktion des Ketons katalysiert, sodass eine dauerhaft verbesserte Enantiomerenreinheit nicht erreicht werden konnte. Drittens führt die geringere Verfügbarkeit und Regenerierung von NADPH unter Verwendung von Glycerol im Vergleich zu Glucose im Kofaktor-gekoppelten Redoxsystem (in A8YF/LB) dazu, dass einerseits die Aktivität der P450 auf einem konstanten aber eher niedrigen Niveau liegt, andererseits jedoch der stetige Verbrauch von NADPH und die kontinuierliche Bildung von NADP<sup>+</sup> auch bei sinkender P450/Reduktase-Aktivität dafür sorgte, dass durch die LB-ADH die gewünschte Oxidation katalysiert wird. Demzufolge zeigte nur der Ganzzellbiokatalysator, in dem das gekoppelte FdR-YkuN-P450-ADH-System unter Verwendung von Glycerol als Energiequelle

eingesetzt wurde, eine eindeutig und dauerhaft erhöhte Enantiomerenreinheit. Nach aktuellem Kenntnisstand sind die durch den *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator A8YF/LB mit Glycerol erzielten 5,4 mM (*S*)-2-Octanol (97% *ee*) die höchste Konzentration, die durch regio- und stereoselektive Oxidation von Octan durch einen P450-Ganzzellbiokatalysator erzielt werden konnte (s. Anhang, Tabelle 15).

In weiteren Experimenten wurde der Ganzzellbiokatalysator A8YF/LB erfolgreich zur Hydroxylierung von Heptan und Nonan eingesetzt. Auch hier führte die Verwendung des gekoppelten P450-ADH-Systems zu einer Verbesserung der Enantiomerenreinheit, sodass 2,6 mM (*S*)-2-Heptanol (91% *ee*) bzw. 5,5 mM (*S*)-2-Nonanol (97% *ee*) produziert werden konnten. Die geringere Produktkonzentration und Enantiomerenreinheit in der Ganzzellumsetzung von Heptan ist möglicherweise auf die bereits in *in-vitro*-Systemen beobachtete geringere Aktivität von CYP154A8 gegenüber Heptan zurückzuführen (von Bühler und Urlacher 2014). Die höhere Produktkonzentration, die erhöhte Enantiomerenreinheit und die verlängerte Reaktionszeit verdeutlichen die Überlegenheit des in dieser Arbeit entwickelten *P. putida*-Ganzzellbiokatalysators gegenüber dem biphasischen System mit isolierten Enzymen (von Bühler und Urlacher 2014).

#### 4.4.4. Herstellung von Ketonen durch *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren

Neben chiralen Alkoholen werden auch Ketone als Bausteine in der pharmazeutischen und chemischen Industrie, beispielsweise zur Herstellung chiraler Amine, eingesetzt. Die stereoselektive C-H-Aminierung ist eine vielversprechende Synthesestrategie, die eine Umsetzung von einfachen Ausgangsverbindungen zu hochwertigen chiralen Aminobausteinen ermöglicht (Both *et al.* 2016). Ein wichtiger Schritt hierbei ist die initiale Funktionalisierung von C-H-Bindungen durch regioselektive Oxidation.

Am Beispiel der Oxidation von Octan wurde in dieser Arbeit untersucht, ob ein Kofaktor-gekoppeltes P450-ADH-System im Kontext eines *P. putida*-Ganzzellbiokatalysators auch zur selektiven Herstellung von Ketonen ausgehend von inerten linearen Alkanen eingesetzt werden kann. Hierzu wurde CYP154A8 mit dem Redoxpartner Pdx/PdR und der NAD(H)-abhängigen, *S*-selektiven RE-ADH aus *R. erythropolis* koexprimiert. Die RE-ADH sollte die Weiteroxidation des durch die CYP154A8 bevorzugt gebildeten (*S*)-2-Octanols zum Keton katalysieren. Während mit den CYP154A8-basierten Systemen zuvor hauptsächlich eine subterminale Oxidation des  $\alpha$ -1-C-Atoms beobachtet werden konnte, wurde im P450-ADH-System eine subterminale Oxidation beider  $\alpha$ -1- und  $\omega$ -1-C-Atome festgestellt. Die Tatsache, dass dabei kein Octan-2,7-diol identifiziert wurde, deutet darauf hin, dass die zweite Hydroxylierung erst nach der RE-ADH-katalysierten Oxidation des (*S*)-2-Octanols zum

2-Octanon erfolgt und somit die Weiteroxidation des Alkohols zum Keton erst die zweite Hydroxylierung durch CYP154A8 begünstigt. Ursache hierfür könnte eine höhere Affinität der CYP154A8 gegenüber dem sekundären Keton im Vergleich zum sekundären Alkohol sein. Die Funktionalität des  $\alpha$ -1-C-Atoms lenkt somit die Hydroxylierungsaktivität der CYP154A8, sodass der *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator A8PP/RE neben der Herstellung von 2-Octanon ebenfalls zur Herstellung von 2,7-Octandion eingesetzt werden konnte. Dies ist nach aktuellem Kenntnisstand das erste Mal, dass ausgehend von einem linearen Alkan ein gekoppeltes P450-ADH-System in einem Ganzzellbiokatalysator zur selektiven Produktion von  $\alpha$ -1, $\omega$ -1-Alkandionen eingesetzt werden konnte. Ein ähnliches Konzept konnte ebenfalls in *E. coli*-Ganzzellbiokatalysatoren zur Herstellung von diversen Heptanonen ausgehend von Heptan eingesetzt werden (Müller *et al.* 2013; Müller *et al.* 2014). Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse verdeutlichen, dass neben *E. coli*- auch *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren zur Herstellung von Ketonen und Diketonen durch P450-ADH-Systeme eingesetzt werden können. Dies macht *P. putida* zu einem interessanten Wirtstamm für die Entwicklung weiterer multienzymatischer Prozesse, wie beispielsweise der selektiven C-H-Aminierung.

## 5. Schlussfolgerung

Die Eignung eines Ganzzellbiokatalysators hängt von verschiedenen system-, enzym- oder zellspezifischen Faktoren ab, die im Rahmen der Entwicklung eines biokatalytischen Prozesses berücksichtigt werden müssen (Bernhardt und Urlacher 2014; Schrewe *et al.* 2013; Willrodt *et al.* 2015b). Die Effizienz des biokatalytischen Prozesses kann dabei durch einen einzelnen dieser Faktoren oder gleichzeitig durch verschiedene Faktoren limitiert werden, sodass es meist keine universell einsetzbare Lösung für die Optimierung von Biokatalysatoren gibt. In dieser Arbeit wurde die Anwendung von rekombinanten *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren zur Synthese oxyfunktionalisierter Moleküle untersucht. Dabei zeigte sich, dass die unterschiedlichen Eigenschaften der eingesetzten Substrate und P450-Systeme jeweils zu verschiedenen Herausforderungen und Limitierungen führten.

In der Reaktion von *R*-(+)-Limonen zu *R*-(+)-Perillaalkohol lag das Szenario mit den ungünstigsten Ausgangsbedingungen in den untersuchten Ganzzellumsetzungen vor: ein leicht flüchtiges, in Wasser nahezu unlösliches und schwer membrangängiges Substrat sowie eine P450 mit geringer Aktivität. Eine entscheidende Verbesserung konnte durch Modifikationen in der äußeren Membran erzielt werden. Durch Permeabilisierung der Zellen oder Koexpression des Membrantransporters AlkL konnte die Bildung von *R*-(+)-Perillaalkohol gesteigert werden. Die Problematik des Stofftransfers sollte daher bei der Entwicklung von Ganzzellsystemen stets berücksichtigt werden.

Des Weiteren wurden *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren zur Umsetzung von linearen Alkanen und (+)-Campher entwickelt. Für die Umsetzung von (+)-Campher lagen hierbei günstige Ausgangsbedingungen vor. (+)-Campher ist im Vergleich zu *R*-(+)-Limonen ein löslicheres sowie membrangängigeres Substrat, das durch P450cam mit hoher Geschwindigkeit und Effizienz umgesetzt wird. Die hohe Aktivität führte dazu, dass in der Umsetzung von (+)-Campher die metabolische Kofaktorversorgung die Produktivität des Ganzzellbiokatalysators einschränkte. Die Manipulation der Kofaktorverfügbarkeit durch Koexpression kofaktorregenerierender Enzyme führte in diesem Fall zu einer deutlich höheren Produktivität. Bei der Entwicklung von P450-Ganzzellbiokatalysatoren sollten daher stets die Möglichkeit bestehen, einem erhöhten Kofaktorbedarf durch Manipulation der Kofaktorversorgung entgegenzuwirken.

Lineare Alkane sind schwer lösliche Substrate, jedoch im Vergleich zu Limonen besser membrangängig. Zur Maximierung der Substratverfügbarkeit wurde in dieser Arbeit ein Zweiphasensystem verwendet, in dem das Substrat als organische Phase eingesetzt wurde. Eine weiter verbesserte Umsetzung wurde durch die Zugabe eines Cyclodextrins erreicht. Darüber

hinaus zeigte sich, dass in mehrkomponentigen, nicht-physiologischen P450-Systemen (hier mit CYP154A8) die Wahl der Redoxpartnerproteine einen großen Einfluss auf die Produktivität des *P. putida*-Ganzzellbiokatalysators hat. Aufgrund unterschiedlicher Kofaktorspezifitäten, Elektronentransfereffizienzen und Aktivitäten der Redoxpartner führt in diesem Fall eine hohe P450-Expression alleine nicht zwangsläufig zu hohen Produktkonzentrationen. Das Verständnis der Interaktionen zwischen den eingesetzten Enzymen im Zusammenspiel mit den zellphysiologischen Besonderheiten hat somit eine sehr entscheidende Bedeutung für die Produktivität des Ganzzellbiokatalysators.

Bei der Entwicklung von P450-ADH-Ganzzellbiokatalysatoren zur Synthese von chiralen Alkoholen und Ketonen mussten neben den bereits beschriebenen Herausforderungen auch direkte und indirekte Zusammenhänge zwischen den eingesetzten Enzymen und den physiologischen Bedingungen im *P. putida*-Ganzzellbiokatalysator berücksichtigt werden. Dabei wurde festgestellt, dass die Reversibilität der ADH-Reaktion zu dynamischen P450-ADH-Ganzzellbiokatalysatoren führte. Durch Kopplung des Redoxsystems, d.h. die verwendete P450 und ADH nutzen den gleichen Kofaktor, konnten P450-ADH-Systeme erfolgreich zur Synthese von chiralen Alkoholen und Ketonen ausgehend von linearen Alkanen eingesetzt werden.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass *P. putida*-Ganzzellbiokatalysatoren erfolgreich zur Synthese hochwertiger oxyfunktionalisierter Verbindungen ausgehend von günstigen Ausgangssubstanzen eingesetzt werden können. Dabei zeichneten sich die erzeugten Ganzzellbiokatalysatoren durch eine gute Expression rekombinanter Proteine sowie eine hohe Produktivität und Robustheit aus. Mit dieser Arbeit konnte ein Beitrag dazu geleistet werden, dass neben *E. coli*-Stämmen zukünftig auch häufiger lösungsmitteltolerante *P. putida*-Stämme als Kandidaten für die Entwicklung und Anwendung von Ganzzellbiokatalysatoren in Betracht gezogen werden. Ein besonderes Augenmerk sollte dabei auf die Untersuchung und Berücksichtigung der physiologischen Besonderheiten von lösungsmitteltolerante *P. putida*-Stämmen gelegt werden. Ihr besseres Verständnis wird schrittweise auch zur Anwendung von *P. putida*-Stämmen in weiteren P450-katalysierten oder multi-enzymatischen Prozessen beitragen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abokitse K, Hummel W. 2003. Cloning, sequence analysis, and heterologous expression of the gene encoding a (S)-specific alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* DSM 43297. *Appl Microbiol Biotechnol* 62:380-386.
- Alonso-Gutierrez J, Chan R, Batth TS, Adams PD, Keasling JD, Petzold CJ, Lee TS. 2013. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for limonene and perillyl alcohol production. *Metab Eng* 19:33-41.
- Antoine R, Loch C. 1992. Isolation and molecular characterization of a novel broad-host-range plasmid from *Bordetella bronchiseptica* with sequence similarities to plasmids from gram-positive organisms. *Mol Microbiol* 6:1785-1799.
- Balasubramanian D, Schneper L, Kumari H, Mathee K. 2012. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Nucleic Acids Res* 41:1-20.
- Bayer T, Milker S, Wiesinger T, Rudroff F, Mihovilovic MD. 2015. Designer microorganisms for optimized redox cascade reactions - challenges and future perspectives. *Adv Synth Catal* 357:1587-1618.
- Bernhardt R, Urlacher VB. 2014. Cytochromes P450 as promising catalysts for biotechnological application: chances and limitations. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:6185-6203.
- Bertani G. 1951. Studies on lysogenesis: I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 62:293-300.
- Bertea CM, Freije JR, van der Woude H, Verstappen FW, Perk L, Marquez V, de Kraker J-W, Posthumus MA, Jansen BJ, de Groot A, Franssen MC, Bouwmeester HJ. 2005. Identification of intermediates and enzymes involved in the early steps of Artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua*. *Planta med* 71:40-47.
- Beuttler H, Hoffmann J, Jeske M, Hauer B, Schmid RD, Altenbuchner J, Urlacher VB. 2011. Biosynthesis of zeaxanthin in recombinant *Pseudomonas putida*. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:1137-1147.
- Bisogno FR, Lavandera I, Kroutil W, Gotor V. 2009. Tandem concurrent processes: one-pot single-catalyst biohydrogen transfer for the simultaneous preparation of enantiopure secondary alcohols. *J Org Chem* 74:1730-1732.
- Blank LM, Ebert BE, Buehler K, Bühler B. 2010. Redox biocatalysis and metabolism: molecular mechanisms and metabolic network analysis. *Antioxid Redox Signal* 13:349-394.
- Blank LM, Ionidis G, Ebert BE, Bühler B, Schmid A. 2008. Metabolic response of *Pseudomonas putida* during redox biocatalysis in the presence of a second octanol phase. *FEBS J* 275:5173-5190.
- Booth IR. 1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol Rev* 49:359-378.
- Bordeaux M, Galarneau A, Drone J. 2012. Catalytic, mild, and selective oxyfunctionalization of linear alkanes: current challenges. *Angew Chem Int Ed Engl* 51:10712-10723.
- Bornscheuer UT, Huisman GW, Kazlauskas RJ, Lutz S, Moore JC, Robins K. 2012. Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* 485:185-194.
- Borrero-de Acuña JM, Bielecka A, Häussler S, Schobert M, Jahn M, Wittmann C, Jahn D, Poblete-Castro I. 2014. Production of medium chain length polyhydroxyalkanoate in metabolic flux optimized *Pseudomonas putida*. *Microb Cell Fact* 13:88-102.
- Both P, Busch H, Kelly PP, Mutti FG, Turner NJ, Flitsch SL. 2016. Whole-cell biocatalysts for stereoselective C-H amination reactions. *Angew Chem Int Ed Engl* 55:1511-1513.

- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Bühler B, Park J-B, Blank LM, Schmid A. 2008. NADH availability limits asymmetric biocatalytic epoxidation in a growing recombinant *Escherichia coli* strain. *Appl Environ Microbiol* 74:1436-1446.
- Carter OA, Peters RJ, Croteau R. 2003. Monoterpene biosynthesis pathway construction in *Escherichia coli*. *Phytochemistry* 64:425-433.
- Chavarría M, Nikel PI, Pérez-Pantoja D, de Lorenzo V. 2013. The Entner-Doudoroff pathway empowers *Pseudomonas putida* KT2440 with a high tolerance to oxidative stress. *Environ Microbiol* 15:1772-1785.
- Chen RR. 2007. Permeability issues in whole-cell bioprocesses and cellular membrane engineering. *Appl Microbiol Biotechnol* 74:730-738.
- Chen TC, Da Fonseca CO, Schönthal AH. 2015. Preclinical development and clinical use of perillyl alcohol for chemoprevention and cancer therapy. *Am J Cancer Res* 5:1580-1593.
- Choi K-Y, Park H-Y, Kim B-G. 2010. Characterization of bi-functional CYP154 from *Nocardia farcinica* IFM10152 in the O-dealkylation and *ortho*-hydroxylation of formononetin. *Enzyme Microb Technol* 47:327-334.
- Cornelissen S, Julsing MK, Volmer J, Riechert O, Schmid A, Bühler B. 2013. Whole-cell-based CYP153A6-catalyzed (*S*)-limonene hydroxylation efficiency depends on host background and profits from monoterpene uptake via AlkL. *Biotechnol Bioeng* 110:1282-1292.
- Cornelissen S, Liu S, Deshmukh AT, Schmid A, Bühler B. 2011. Cell physiology rather than enzyme kinetics can determine the efficiency of cytochrome P450-catalyzed C-H-oxygenation. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38:1359-1370.
- Daugelavicius R, Bakiene E, Bamford DH. 2000. Stages of polymyxin B interaction with the *Escherichia coli* cell envelope. *Antimicrob Agents Chemother* 44:2969-2978.
- Davison J. 2002. Genetic tools for Pseudomonads, Rhizobia, and other gram-negative bacteria. *BioTechniques* 32:386-401.
- de Carvalho CCCR, Da Cruz AARL, Pons M-N, Pinheiro HMRV, Cabral JMS, Da Fonseca MMR, Ferreira BS, Fernandes P. 2004. *Mycobacterium* sp., *Rhodococcus erythropolis*, and *Pseudomonas putida* behavior in the presence of organic solvents. *Microsc Res Tech* 64:215-222.
- del Castillo T, Ramos JL, Rodríguez-Herva JJ, Fuhrer T, Sauer U, Duque E. 2007. Convergent peripheral pathways catalyze initial glucose catabolism in *Pseudomonas putida*: genomic and flux analysis. *J Bacteriol* 189:5142-5152.
- Denisov IG, Makris TM, Sligar SG, Schlichting I. 2005. Structure and Chemistry of Cytochrome P450. *Chem Rev* 105:2253-2278.
- Drepper T. 2003. Role of GlnB and GlnK in ammonium control of both nitrogenase systems in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Microbiology* 149:2203-2212.
- Eaton RW. 1996. *p*-Cumate catabolic pathway in *Pseudomonas putida* F1: cloning and characterization of DNA carrying the *cmt* operon. *J Bacteriol* 178:1351-1362.
- Eaton RW. 1997. *p*-Cymene catabolic pathway in *Pseudomonas putida* F1: cloning and characterization of DNA encoding conversion of *p*-Cymene to *p*-Cumate. *J Bacteriol* 179:3171-3180.
- Ebert BE, Kurth F, Grund M, Blank LM, Schmid A. 2011. Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to increased NADH and ATP demand. *Appl Environ Microbiol* 77:6597-6605.
- Erenburg IN. 2014. Selektive Oxidation von Oktan zu 2-(*S*)-Oktanol im Ganzzellsystem. Bachelorarbeit. Heinrich-Heine-Universität. Düsseldorf.

- Faber K. 2011. Biotransformations in organic chemistry. Springer-Verlag.
- Farinha MA, Kropinski AM. 1989. Construction of broad-host-range vectors for general cloning and promoter selection in *Pseudomonas* and *Escherichia coli*. *Gene* 77:205-210.
- Fasan R, Crook NC, Peters MW, Meinhold P, Buelter T, Landwehr M, Cirino PC, Arnold FH. 2011. Improved product-per-glucose yields in P450-dependent propane biotransformations using engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 108:500-510.
- Förster-Fromme K, Jendrossek D. 2006. Identification and characterization of the acyclic terpene utilization gene cluster of *Pseudomonas citronellolis*. *FEMS Microbiol Lett* 264:220-225.
- Freigassner M, Pichler H, Glieder A. 2009. Tuning microbial hosts for membrane protein production. *Microb Cell Fact* 8:69.
- Fuchs G, Boll M, Heider J. 2011. Microbial degradation of aromatic compounds - from one strategy to four. *Nat Rev Micro* 9:803-816.
- Fujii T, Narikawa T, Sumisa F, Arisawa A, Takeda K, Kato J. 2006. Production of  $\alpha,\omega$ -alkanediols using *Escherichia coli* expressing a cytochrome P450 from *Acinetobacter* sp. OC4. *Biosci Biotechnol Biochem* 70:1379-1385.
- Fujita N, Sumisa F, Shindo K, Kabumoto H, Arisawa A, Ikenaga H, Misawa N. 2009. Comparison of two vectors for functional expression of a bacterial cytochrome P450 gene in *Escherichia coli* using CYP153 genes. *Biosci Biotechnol Biochem* 73:1825-1830.
- Funhoff EG, Bauer U, García-Rubio I, Witholt B, van Beilen JB. 2006. CYP153A6, a soluble P450 oxygenase catalyzing terminal-alkane hydroxylation. *J Bacteriol* 188:5220-5227.
- Gargouri B, Karray F, Mhiri N, Aloui F, Sayadi S. 2011. Application of a continuously stirred tank bioreactor (CSTR) for bioremediation of hydrocarbon-rich industrial wastewater effluents. *J Hazard Mater* 189:427-434.
- Gaur R, Khare SK. 2009. Cellular response mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* PseA during growth in organic solvents. *Lett Appl Microbiol* 49:372-377.
- Gibson DG, Young L, Chuang R-Y, Venter JC, Hutchison CA, Smith HO. 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* 6:343-345.
- Girhard M, Klaus T, Khatri Y, Bernhardt R, Urlacher VB. 2010. Characterization of the versatile monooxygenase CYP109B1 from *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:595-607.
- Girhard M, Machida K, Itoh M, Schmid RD, Arisawa A, Urlacher VB. 2009. Regioselective biooxidation of (+)-Valencene by recombinant *E. coli* expressing CYP109B1 from *Bacillus subtilis* in a two-liquid-phase system. *Microb Cell Fact* 8:36-47.
- Goldberg K, Schroer K, Lütz S, Liese A. 2007. Biocatalytic ketone reduction - a powerful tool for the production of chiral alcohols - part I: processes with isolated enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol* 76:237-248.
- Grant C, Deszcz D, Wei Y-C, Martinez-Torres RJ, Morris P, Folliard T, Sreenivasan R, Ward J, Dalby P, Woodley JM, Baganz F. 2014. Identification and use of an alkane transporter plug-in for applications in biocatalysis and whole-cell biosensing of alkanes. *Sci Rep* 4:5844-5852.
- Grant C, Woodley JM, Baganz F. 2011. Whole-cell bio-oxidation of *n*-dodecane using the alkane hydroxylase system of *P. putida* GPo1 expressed in *E. coli*. *Enzyme Microb Technol* 48:480-486.
- Groeneveld M, van Beek HL, Duetz WA, Fraaije MW. 2015. Identification of a novel oxygenase capable of regiospecific hydroxylation of D-Limonene into (+)-*trans*-Carveol. *Tetrahedron*.

- Groves JT. 1985. Key elements of the chemistry of cytochrome P-450: the oxygen rebound mechanism. *J Chem Educ* 62:928-931.
- Gudimochi RK, Randall C, Opperman DJ, Olaofe OA, Harrison STL, Albertyn J, Smit MS. 2012. Whole-cell hydroxylation of *n*-octane by *Escherichia coli* strains expressing the CYP153A6 operon. *Appl Microbiol Biotechnol* 96:1507-1516.
- Guengerich FP, Munro AW. 2013. Unusual cytochrome P450 enzymes and reactions. *J Biol Chem* 288:17065-17073.
- Hannemann F, Bichet A, Ewen KM, Bernhardt R. 2007. Cytochrome P450 systems - biological variations of electron transport chains. *Biochim Biophys Acta* 1770:330-344.
- Heipieper HJ, Neumann G, Cornelissen S, Meinhardt F. 2007. Solvent-tolerant bacteria for biotransformations in two-phase fermentation systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 74:961-973.
- Hemmerlin A, Harwood JL, Bach TJ. 2012. A *raison d'être* for two distinct pathways in the early steps of plant isoprenoid biosynthesis? *Prog Lipid Res* 51:95-148.
- Hernández-Martín A, von Bühler CJ, Tieves F, Fernández S, Ferrero M, Urlacher VB. 2014. Whole-cell biotransformation with recombinant cytochrome P450 for the selective oxidation of Grundmann's ketone. *Bioorg Med Chem* 22:5586-5592.
- Hilberath T. 2013. Optimierung der Expression von P450 BM3 aus *Bacillus megaterium* in *Pseudomonas putida*. Bachelorarbeit. Heinrich-Heine-Universität. Düsseldorf.
- Hildebrandt P, Musidłowska A, Bornscheuer UT, Altenbuchner J. 2002. Cloning, functional expression and biochemical characterization of a stereoselective alcohol dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens* DSM50106. *Appl Microbiol Biotechnol* 59:483-487.
- Hill RE, Eaton-Rye JJ. 2014. Plasmid Construction by SLIC or Sequence and Ligation-Independent Cloning. In: Valla S, Lale R, Herausgeber. *DNA Cloning and Assembly Methods*. Humana Press. p 25-36.
- Hollmann F, Arends IWCE, Buehler K, Schallmeyer A, Bühler B. 2011a. Enzyme-mediated oxidations for the chemist. *Green Chem* 13:226-265.
- Hollmann F, Arends IWCE, Holtmann D. 2011b. Enzymatic reductions for the chemist. *Green Chem* 13:2285-2313.
- Höschle B, Jendrossek D. 2005. Utilization of Geraniol is dependent on molybdenum in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for different metabolic routes for oxidation of geraniol and citronellol. *Microbiology* 151:2277-2283.
- Hu G, Li J, Zeng G. 2013. Recent development in the treatment of oily sludge from petroleum industry: A review. *J Hazard Mater* 261:470-490.
- Hummel W. 1997. New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 58:145-184.
- Hummel W, Abokitse K, Drauz K, Rollmann C, Gröger H. 2003. Towards a large-scale asymmetric reduction process with isolated enzymes: expression of an (*S*)-alcohol dehydrogenase in *E. coli* and studies on the synthetic potential of this biocatalyst. *Adv Synth Catal* 345:153-159.
- Iida T, Sumita T, Ohta A, Takagi M. 2000. The cytochrome P450ALK multigene family of an *n*-alkane-assimilating yeast, *Yarrowia lipolytica*: cloning and characterization of genes coding for new CYP52 family members. *Yeast* 16:1077-1087.
- Inoue K, Makino Y, Itoh N. 2005. Production of (*R*)-chiral alcohols by a hydrogen-transfer bioreduction with NADH-dependent *Leifsonia* alcohol dehydrogenase (LSADH). *Tetrahedron Asymmetry* 16:2539-2549.

- Itoh N, Isotani K, Nakamura M, Inoue K, Isogai Y, Makino Y. 2012. Efficient synthesis of optically pure alcohols by asymmetric hydrogen-transfer biocatalysis. Application of engineered enzymes in a 2-propanol-water medium. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:1075-1085.
- Janocha S, Bernhardt R. 2013. Design and characterization of an efficient CYP105A1-based whole-cell biocatalyst for the conversion of resin acid diterpenoids in permeabilized *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:7639-7649.
- Janocha S, Schmitz D, Bernhardt R. 2015. Terpene hydroxylation with microbial cytochrome P450 monooxygenases. In: Schrader J, Bohlmann J, Herausgeber. *Biotechnology of isoprenoids*. Springer International Publishing. p 215-250.
- Jeske M, Altenbuchner J. 2010. The *Escherichia coli* rhamnose promoter *rhaPBAD* is in *Pseudomonas putida* KT2440 independent of Crp-cAMP activation. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:1923-1933.
- Julsing MK, Schrewe M, Cornelissen S, Hermann I, Schmid A, Bühler B. 2012. Outer membrane protein AlkL boosts biocatalytic oxyfunctionalization of hydrophobic substrates in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 78:5724-5733.
- Kadkhodayan S, Coulter ED, Maryniak DM, Bryson TA, Dawson JH. 1995. Uncoupling oxygen transfer and electron transfer in the oxygenation of camphor analogues by cytochrome P450cam. *J Biol Chem* 270:28042-28048.
- Karande R, Debor L, Salamanca D, Bogdahn F, Engesser K-H, Buehler K, Schmid A. 2016. Continuous cyclohexane oxidation to cyclohexanol using a novel cytochrome P450 monooxygenase from *Acidovorax* sp. CHX100 in recombinant *P. taiwanensis* VLB120 biofilms. *Biotechnol Bioeng* 113:52-61.
- Katagiri M, Ganguli BN, Gunsalus IC. 1968. A soluble cytochrome P-450 functional in methylene hydroxylation. *J Biol Chem* 243:3543-3546.
- Kim D, Ortiz de Montellano PR. 2009. Tricistronic overexpression of cytochrome P450cam, putidaredoxin, and putidaredoxin reductase provides a useful cell-based catalytic system. *Biotechnol Lett* 31:1427-1431.
- Köhler V, Turner NJ. 2015. Artificial concurrent catalytic processes involving enzymes. *Chem Commun (Camb)* 51:450-464.
- Kohlmann C, Leuchs S, Greiner L, Leitner W. 2011. Continuous biocatalytic synthesis of (*R*)-2-octanol with integrated product separation. *Green Chem* 13:1430-1436.
- Kratzer R, Woodley JM, Nidetzky B. 2015. Rules for biocatalyst and reaction engineering to implement effective, NAD(P)H-dependent, whole cell bioreductions. *Biotechnol Adv* 33:1641-1652.
- Krest CM, Onderko EL, Yosca TH, Calixto JC, Karp RF, Livada J, Rittle J, Green MT. 2013. reactive intermediates in cytochrome P450 catalysis. *J Biol Chem* 288:17074-17081.
- Ladkau N, Schmid A, Bühler B. 2014. The microbial cell-functional unit for energy dependent multistep biocatalysis. *Curr Opin Biotechnol* 30:178-189.
- Landaeta VR, Rodríguez-Lugo RE. 2015. Catalytic oxygenation of organic substrates. Toward greener ways for incorporating oxygen. *Inorganica Chim Acta* 431:21-47.
- Lange BM. 2015. Biosynthesis and biotechnology of high-value *p*-menthane monoterpenes, including menthol, carvone, and limonene. In: Schrader J, Bohlmann J, Herausgeber. *Biotechnology of isoprenoids*. Springer International Publishing. p 319-353.
- Lee W-H, Kim M-D, Jin Y-S, Seo J-H. 2013. Engineering of NADPH regenerators in *Escherichia coli* for enhanced biotransformation. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:2761-2772.

- Lentz O, Feenstra A, Habicher T, Hauer B, Schmid RD, Urlacher VB. 2006. Altering the regioselectivity of cytochrome P450 CYP102A3 of *Bacillus subtilis* by using a new versatile assay system. *Chembiochem* 7:345-350.
- Lesic B, Rahme LG. 2008. Use of the lambda Red recombinase system to rapidly generate mutants in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Mol Biol* 9:20-28.
- Leuchs S, Greiner L. 2011. Alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis*: a versatile robust catalyst for enantioselective transformations. *Chem Biochem Eng Q* 2:267-281.
- Lewis JC, Coelho PS, Arnold FH. 2011. Enzymatic functionalization of carbon-hydrogen bonds. *Chem Soc Rev* 40:2003-2021.
- Li MZ, Elledge SJ. 2012. SLIC: a method for sequence- and ligation-independent cloning. In: Peccoud J, Herausgeber. *Gene Synthesis*. Humana Press. p 51-59.
- Lima-Ramos J, Neto W, Woodley JM. 2014. Engineering of biocatalysts and biocatalytic processes. *Top Catal* 57:301-320.
- Loeschcke A, Thies S. 2015. *Pseudomonas putida* - a versatile host for the production of natural products. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:6197-6214.
- Lüddecke F, Wülfing A, Timke M, Germer F, Weber J, Dikfidan A, Rahnfeld T, Linder D, Meyerdierks A, Harder J. 2012. Geraniol and geranial dehydrogenases induced in anaerobic monoterpene degradation by *Castellaniella defragrans*. *Appl Environ Microbiol* 78:2128-2136.
- Lundemo MT, Woodley JM. 2015. Guidelines for development and implementation of biocatalytic P450 processes. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:2465-2483.
- Margesin R, Schinner F. 2001. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:650-663.
- Marmulla R, Harder J. 2014. Microbial monoterpene transformations - a review. *Front Microbiol* 5:346-359.
- Mars AE, Gorissen JPL, van den Beld I, Eggink G. 2001. Bioconversion of limonene to increased concentrations of perillic acid by *Pseudomonas putida* GS1 in a fed-batch reactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:101-107.
- Martínez-García E, Aparicio T, Goñi-Moreno A, Fraile S, de Lorenzo V. 2015. SEVA 2.0: an update of the Standard European Vector Architecture for de-/re-construction of bacterial functionalities. *Nucleic Acids Res* 43:1183-1189.
- Massaldi HA, King CJ. 1973. Simple technique to determine solubilities of sparingly soluble organics. Solubility and activity coefficients of D-limonene, butylbenzene, and *n*-hexyl acetate in water and sucrose solutions. *J Chem Eng Data* 18:393-397.
- Matin A, Gottschal JC. 1976. Influence of dilution rate on NAD(P) and NAD(P)H concentrations and ratios in a *Pseudomonas* sp. grown in continuous culture. *J Gen Microbiol* 94:333-341.
- McIntosh JA, Coelho PS, Farwell CC, Wang ZJ, Lewis JC, Brown TR, Arnold FH. 2013. Enantioselective intramolecular C-H amination catalyzed by engineered cytochrome P450 enzymes *in vitro* and *in vivo*. *Angew Chem Int Ed Engl* 52:9309-9312.
- Meinhold P, Peters MW, Hartwick A, Hernandez AR, Arnold FH. 2006. Engineering cytochrome P450 BM3 for terminal alkane hydroxylation. *Adv Synth Catal* 348:763-772.
- Mi J, Becher D, Lubuta P, Dany S, Tusch K, Schewe H, Buchhaupt M, Schrader J. 2014. De novo production of the monoterpene geranic acid by metabolically engineered *Pseudomonas putida*. *Microb Cell Fact* 13:170-180.
- Mirata MA, Heerd D, Schrader J. 2009. Integrated bioprocess for the oxidation of limonene to perillic acid with *Pseudomonas putida* DSM 12264. *Process Biochem* 44:764-771.

- Mirata MA, Schewe H, Holtmann D, Schrader J. 2010. Integrierte Bioproduktion und selektive Aufreinigung von Perillasäure. *Chem Ing Tech* 82:101-109.
- Miura Y, Fulco AJ. 1975.  $\omega$ -1,  $\omega$ -2 and  $\omega$ -3 hydroxylation of long-chain fatty acids, amides and alcohols by a soluble enzyme system from *Bacillus megaterium*. *Biochim Biophys Acta* 388:305-317.
- Molina G, Pimentel MR, Pastore GM. 2013. *Pseudomonas*. A promising biocatalyst for the bioconversion of terpenes. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:1851-1864.
- Montie TC. 1998. *Pseudomonas*. Plenum Press.
- Mouri T, Michizoe J, Ichinose H, Kamiya N, Goto M. 2006. A recombinant *Escherichia coli* whole cell biocatalyst harboring a cytochrome P450cam monooxygenase system coupled with enzymatic cofactor regeneration. *Appl Microbiol Biotechnol* 72:514-520.
- Müller CA, Akkapurathu B, Winkler T, Staudt S, Hummel W, Gröger H, Schwaneberg U. 2013. *In vitro* double oxidation of *n*-heptane with direct cofactor regeneration. *Adv Synth Catal* 355:1787-1798.
- Müller CA, Dennig A, Welters T, Winkler T, Ruff AJ, Hummel W, Gröger H, Schwaneberg U. 2014. Whole-cell double oxidation of *n*-heptane. *J Biotechnol* 191:196-204.
- Muschiol J, Peters C, Oberleitner N, Mihovilovic MD, Bornscheuer UT, Rudroff F. 2015. Cascade catalysis - strategies and challenges en route to preparative synthetic biology. *Chem Commun (Camb)* 51:5798-5811.
- Nestl BM, Hammer SC, Nebel BA, Hauer B. 2014. New generation of biocatalysts for organic synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl* 53:3070-3095.
- Niefind K, Müller J, Riebel B, Hummel W, Schomburg D. 2003. The crystal structure of *R*-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* suggests the structural basis of its metal dependency. *J Mol Biol* 327:317-328.
- Nikaido H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:593-656.
- Nikel PI, Chavarría M, Fuhrer T, Sauer U, de Lorenzo V. 2015. *Pseudomonas putida* KT2440 strain metabolizes glucose through a cycle formed by enzymes of the Entner-Doudoroff, Embden-Meyerhof-Parnas, and Pentose Phosphate Pathways. *J Biol Chem* 290:25920-25932.
- Nikel PI, Kim J, de Lorenzo V. 2014a. Metabolic and regulatory rearrangements underlying glycerol metabolism in *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* 16:239-254.
- Nikel PI, Martínez-García E, de Lorenzo V. 2014b. Biotechnological domestication of pseudomonads using synthetic biology. *Nat Rev Micro* 12:368-379.
- Nodate M, Kubota M, Misawa N. 2006. Functional expression system for cytochrome P450 genes using the reductase domain of self-sufficient P450RhF from *Rhodococcus* sp. NCIMB 9784. *Appl Microbiol Biotechnol* 71:455-462.
- Nolte JC, Urlacher VB. 2015. Oxidation via C-H activation. Cytochrome P450 in the oxidation of alkanes. In: Faber K, Fessner W-D, Turner N, Herausgeber. *Science of synthesis: biocatalysis in organic synthesis* Vol. 3. Georg Thieme. p 21-64.
- Ogliaro F, Harris N, Cohen S, Filatov M, de Visser SP, Shaik S. 2000. A model "rebound" mechanism of hydroxylation by cytochrome P450: stepwise and effectively concerted pathways, and their reactivity patterns. *J Am Chem Soc* 122:8977-8989.
- Olaofe OA, Fenner CJ, Gudimanchi RK, Smit MS, Harrison STL. 2013. The influence of microbial physiology on biocatalyst activity and efficiency in the terminal hydroxylation of *n*-octane using *Escherichia coli* expressing the alkane hydroxylase, CYP153A6. *Microb Cell Fact* 12:8-19.

- Olsen RH, DeBusscher G, McCombie WR. 1982. Development of broad-host-range vectors and gene banks: self-cloning of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO chromosome. *J Bacteriol* 150:60-69.
- Omura T, Sato R. 1964a. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 239:2370-2378.
- Omura T, Sato R. 1964b. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. solubilization, purification and properties. *J Biol Chem* 239:2379-2385.
- Ortiz de Montellano PR. 2015. Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry. Springer International Publishing.
- Paddon CJ, Westfall PJ, Pitera DJ, Benjamin K, Fisher K, McPhee D, Leavell MD, Tai A, Main A, Eng D, Polichuk DR, Teoh KH, Reed DW, Treynor T, Lenihan J, Fleck M, Bajad S, Dang G, Dengrove D, Diola D, Dorin G, Ellens KW, Fickes S, Galazzo J, Gaucher SP, Geistlinger T, Henry R, Hepp M, Horning T, Iqbal T, Jiang H, Kizer L, Lieu B, Melis D, Moss N, Regentin R, Secrest S, Tsuruta H, Vazquez R, Westblade LF, Xu L, Yu M, Zhang Y, Zhao L, Lievens J, Covello PS, Keasling JD, Reiling KK, Renninger NS, Newman JD. 2013. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature* 496:528-532.
- Pansegrau W, Lanka E, Barth PT, Figurski DH, Guiney DG, Haas D, Helinski DR, Schwab H, Stanisich VA, Thomas CM. 1994. Complete nucleotide sequence of Birmingham IncP $\alpha$  plasmids. Compilation and comparative analysis. *J Mol Biol* 239:623-663.
- Paul CE, Lavandera I, Gotor-Fernández V, Kroutil W, Gotor V. 2013. *Escherichia coli* /ADH-A: an all-inclusive catalyst for the selective biooxidation and deracemisation of secondary alcohols. *ChemCatChem* 5:3875-3881.
- Pennec A, Jacobs CL, Opperman DJ, Smit MS. 2015. Revisiting Cytochrome P450-mediated oxyfunctionalization of linear and cyclic alkanes. *Adv Synth Catal* 357:118-130.
- Peplow M. 2013. Sanofi launches malaria drug production. <http://www.rsc.org/chemistryworld/2013/04/sanofi-launches-malaria-drug-production>.
- Petasch J, Disch E-M, Markert S, Becher D, Schweder T, Hüttel B, Reinhardt R, Harder J. 2014. The oxygen-independent metabolism of cyclic monoterpenes in *Castellaniella defragrans* 65Phen. *BMC Microbiol* 14:164-177.
- Peters MW, Meinhold P, Glieder A, Arnold FH. 2003. Regio- and enantioselective alkane hydroxylation with engineered cytochromes P450 BM-3. *J Am Chem Soc* 125:13442-13450.
- Poblete-Castro I, Becker J, Dohnt K, Martins dos Santos V, Wittmann C. 2012. Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida* and related species. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:2279-2290.
- Ramos J-L, Sol Cuenca M, Molina-Santiago C, Segura A, Duque E, Gómez-García MR, Udaondo Z, Roca A. 2015. Mechanisms of solvent resistance mediated by interplay of cellular factors in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol Rev* 39:555-566.
- Rittle J, Green MT. 2010. Cytochrome P450 compound I: capture, characterization, and C-H bond activation kinetics. *Science* 330:933-937.
- Ro D-K, Paradise EM, Ouellet M, Fisher KJ, Newman KL, Ndungu JM, Ho KA, Eachus RA, Ham TS, Kirby J, Chang MCY, Withers ST, Shiba Y, Sarpong R, Keasling JD. 2006. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* 440:940-943.
- Roduner E, Kaim W, Sarkar B, Urlacher VB, Pleiss J, Gläser R, Einicke W-D, Sprenger GA, Beifuß U, Klemm E, Liebner C, Hieronymus H, Hsu S-F, Plietker B, Laschat S. 2013. Selective catalytic oxidation of C-H bonds with molecular oxygen. *ChemCatChem* 5:82-112.

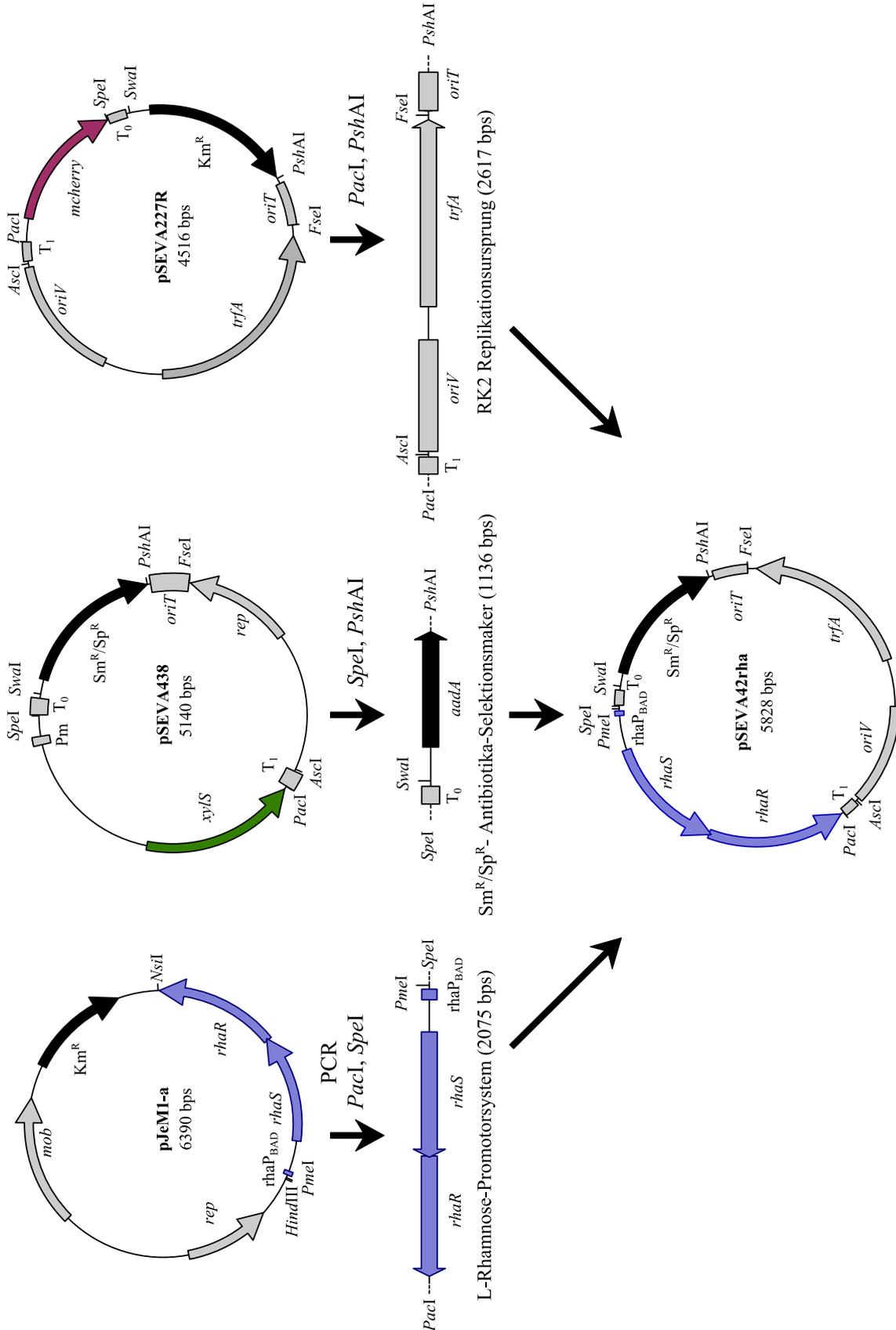
- Rojo F. 2009. Degradation of alkanes by bacteria. *Environ Microbiol* 11:2477-2490.
- Scheps D, Malca SH, Hoffmann H, Nestl BM, Hauer B. 2011. Regioselective  $\omega$ -hydroxylation of medium-chain *n*-alkanes and primary alcohols by CYP153 enzymes from *Mycobacterium marinum* and *Polaromonas* sp. strain JS666. *Org Biomol Chem* 9:6727-6733.
- Schewe H, Kaup B-A, Schrader J. 2008. Improvement of P450 BM-3 whole-cell biocatalysis by integrating heterologous cofactor regeneration combining glucose facilitator and dehydrogenase in *E. coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 78:55-65.
- Schewe H, Mirata MA, Holtmann D, Schrader J. 2011. Biooxidation of monoterpenes with bacterial monooxygenases. *Process Biochem* 46:1885-1899.
- Schmid C, Steinbrecher R, Ziegler H. 1992. Partition coefficients of plant cuticles for monoterpenes. *Trees (Berl West)* 6:32-36.
- Schneider S, Wubbolts MG, Sanglard D, Witholt B. 1998. Biocatalyst engineering by assembly of fatty acid transport and oxidation activities for *in vivo* application of cytochrome P-450 BM-3 monooxygenase. *Appl Environ Microbiol* 64:3784-3790.
- Schrader J, Bohlmann J. 2015. *Biotechnology of isoprenoids*. Springer International Publishing.
- Schrewe M, Julsing MK, Bühler B, Schmid A. 2013. Whole-cell biocatalysis for selective and productive C-O functional group introduction and modification. *Chem Soc Rev* 42:6346-6377.
- Schulz S. 2015. Cascade reactions combining a cytochrome P450 monooxygenase and an alcohol dehydrogenase for the synthesis of (+)-Nootkatone. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität. Düsseldorf.
- Schulz S, Girhard M, Gaßmeyer SK, Jäger VD, Schwarze D, Vogel A, Urlacher VB. 2015. Selective enzymatic synthesis of the grapefruit flavor (+)-Nootkatone. *ChemCatChem* 7:601-604.
- Schulz S, Girhard M, Urlacher VB. 2012. Biocatalysis. Key to selective oxidations. *ChemCatChem* 4:1889-1895.
- Segura A, Molina L, Fillet S, Krell T, Bernal P, Muñoz-Rojas J, Ramos J-L. 2012. Solvent tolerance in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Biotechnol* 23:415-421.
- Seifert A, Antonovici M, Hauer B, Pleiss J. 2011. An efficient route to selective bio-oxidation catalysts: an iterative approach comprising modeling, diversification, and screening, based on CYP102A1. *Chembiochem* 12:1346-1351.
- Seifert A, Vomund S, Grohmann K, Kriening S, Urlacher VB, Laschat S, Pleiss J. 2009. Rational design of a minimal and highly enriched CYP102A1 mutant library with improved regio-, stereo- and chemoselectivity. *Chembiochem* 10:853-861.
- Siedler S, Bringer S, Bott M. 2011. Increased NADPH availability in *Escherichia coli*: improvement of the product per glucose ratio in reductive whole-cell biotransformation. *Appl Microbiol Biotechnol* 92:929-937.
- Sikkema J, de Bont JAM, Poolman B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev* 59:201-222.
- Silva-Rocha R, Martínez-García E, Calles B, Chavarría M, Arce-Rodríguez A, de Las Heras A, Páez-Espino AD, Durante-Rodríguez G, Kim J, Nikel PI, Platero R, de Lorenzo V. 2013. The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acids Res* 41:666-675.
- Simon R, Prierer U, Pühler A. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Nat Biotechnol* 1:784-791.
- Singh M, Sharma R, Banerjee U. 2002. Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnol Adv* 20:341-359.

- Sligar SG. 1976. Coupling of spin, substrate, and redox equilibria in cytochrome P450. *Biochemistry* 15:5399-5406.
- Sono M, Roach MP, Coulter ED, Dawson JH. 1996. Heme-containing oxygenases. *Chem Rev* 96:2841-2888.
- Soussan L, Pen N, Belleville M-P, Marcano Sanchez J, Paolucci-Jeanjean D. 2016. Alkane biohydroxylation. Interests, constraints and future developments. *J Biotechnol* 222:117-142.
- Spaans SK, Weusthuis RA, van der Oost J, Kengen SWM. 2015. NADPH-generating systems in bacteria and archaea. *Front Microbiol* 6:159-185.
- Speelmans G, Bijlsma A, Eggink G. 1998. Limonene bioconversion to high concentrations of a single and stable product, perillic acid, by a solvent-resistant *Pseudomonas putida* strain. *Appl Microbiol Biotechnol* 50:538-544.
- Stumpp T, Wilms B, Altenbuchner J. 2000. Ein neues L-Rhamnose-induzierbares Expressionssystem für *Escherichia coli*. *BIOSpektrum* 6:33-36.
- Subedi KP, Kim I, Kim J, Min B, Park C. 2008. Role of GldA in dihydroxyacetone and methylglyoxal metabolism of *Escherichia coli* K12. *FEMS Microbiol Lett* 279:180-187.
- Tholl D. 2015. Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. In: Schrader J, Bohlmann J, Herausgeber. *Biotechnology of isoprenoids*. Springer International Publishing. p 63-106.
- Tieves F, Erenburg IN, Mahmoud O, Urlacher VB. 2016. Synthesis of chiral 2-alkanols from *n*-alkanes by a *P. putida* whole-cell biocatalyst. *Biotechnol Bioeng*.
- Tolia NH, Joshua-Tor L. 2006. Strategies for protein coexpression in *Escherichia coli*. *Nat Methods* 3:55-64.
- Tranchida PQ, Bonaccorsi I, Dugo P, Mondello L, Dugo G. 2012. Analysis of *Citrus* essential oils: state of the art and future perspectives. A review. *Flavour Fragr J* 27:98-123.
- Tufvesson P, Lima-Ramos J, Nordblad M, Woodley JM. 2011. Guidelines and cost analysis for catalyst production in biocatalytic processes. *Org Process Res Dev* 15:266-274.
- Turner NJ, O'Reilly E. 2013. Biocatalytic retrosynthesis. *Nat Chem Biol* 9:285-288.
- Urlacher VB, Girhard M. 2012. Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application. *Trends Biotechnol* 30:26-36.
- Urlacher VB, Schulz S. 2014. Multi-enzyme systems and cascade reactions involving cytochrome P450 monooxygenases. In: Riva S, Fessner W-D, Herausgeber. *Cascade Biocatalysis*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p 87-132.
- van Beilen JB, Eggink G, Enequist H, Bos R, Witholt B. 1992. DNA sequence determination and functional characterization of the OCT-plasmid-encoded *alkJKL* genes of *Pseudomonas oleovorans*. *Mol Microbiol* 6:3121-3136.
- van Beilen JB, Funhoff EG. 2005. Expanding the alkane oxygenase toolbox: new enzymes and applications. *Curr Opin Biotechnol* 16:308-314.
- van Beilen JB, Funhoff EG. 2007. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 74:13-21.
- van Beilen JB, Holtackers R, Lüscher D, Bauer U, Witholt B, Duetz WA. 2005. Biocatalytic production of perillyl alcohol from limonene by using a novel *Mycobacterium sp.* cytochrome P450 alkane hydroxylase expressed in *Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol* 71:1737-1744.
- van Beilen JB, Panke S, Lucchini S, Franchini AG, Röthlisberger M, Witholt B. 2001. Analysis of *Pseudomonas putida* alkane-degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the *alk* genes. *Microbiology* 147:1621-1630.

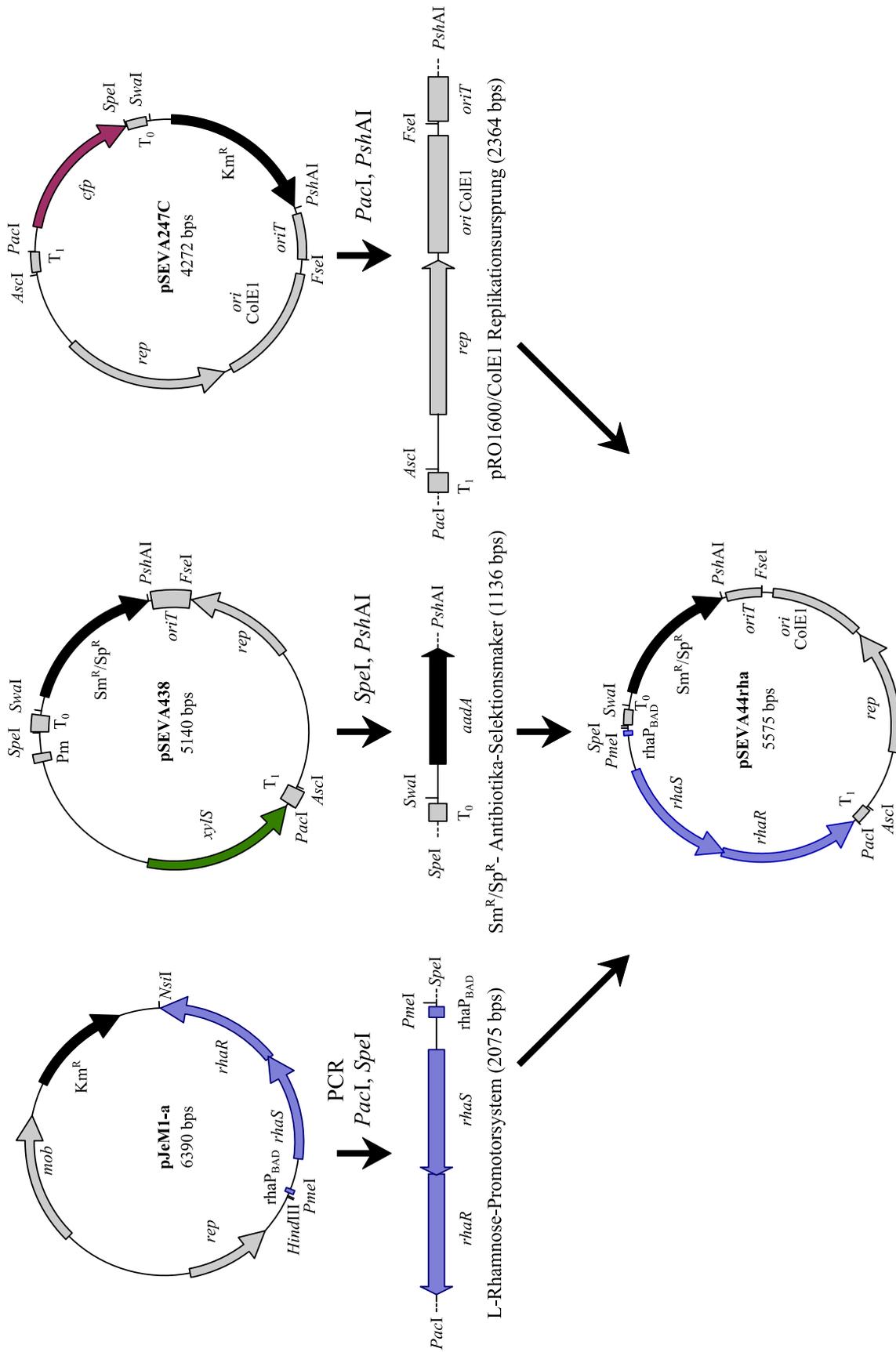
- van den Berg B. 2015. Bert van den Berg's research interests: transport of hydrophobic molecules. [http://sbl.ncl.ac.uk/people/bert\\_research.shtml](http://sbl.ncl.ac.uk/people/bert_research.shtml) (zuletzt geprüft am 15. August 2016).
- Vemuri GN, Altman E, Sangurdekar DP, Khodursky AB, Eiteman MA. 2006. Overflow metabolism in *Escherichia coli* during steady-state growth: transcriptional regulation and effect of the redox ratio. *Appl Environ Microbiol* 72:3653-3661.
- von Bühler C, Le-Huu P, Urlacher VB. 2013. Cluster screening: an effective approach for probing the substrate space of uncharacterized cytochrome P450s. *Chembiochem* 14:2189-2198.
- von Bühler CJ, Urlacher VB. 2014. A novel P450-based biocatalyst for the selective production of chiral 2-alkanols. *Chem Commun (Camb)* 50:4089-4091.
- Voss CV, Gruber CC, Kroutil W. 2008. Deracemization of secondary alcohols through a concurrent tandem biocatalytic oxidation and reduction. *Angew Chem Int Ed Engl* 47:741-745.
- Weber E, Seifert A, Antonovici M, Geinitz C, Pleiss J, Urlacher VB. 2011. Screening of a minimal enriched P450 BM3 mutant library for hydroxylation of cyclic and acyclic alkanes. *Chem Commun (Camb)* 47:944-946.
- Weckbecker A, Hummel W. 2006. Cloning, expression, and characterization of an (*R*)-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus kefir*. *Biocatal Biotransformation* 24:380-389.
- Wegerer A, Sun T, Altenbuchner J. 2008. Optimization of an *E. coli* L-rhamnose-inducible expression vector: test of various genetic module combinations. *BMC Biotechnol* 8:2-13.
- Weisser P, Krämer R, Sahm H, Sprenger GA. 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. *J Bacteriol* 177:3351-3354.
- Whitehouse CJ, Bell SG, Yang W, Yorke JA, Blanford CF, Strong AJF, Morse EJ, Bartlam M, Rao Z, Wong L-L. 2009. A highly active single-mutation variant of P450 BM-3 (CYP102A1). *Chembiochem* 10:1654-1656.
- Whitehouse CJC, Bell SG, Wong L-L. 2012. P450 BM3 (CYP102A1): connecting the dots. *Chem Soc Rev* 41:1218-1260.
- Whitehouse CJC, Yang W, Yorke JA, Rowlatt BC, Strong AJF, Blanford CF, Bell SG, Bartlam M, Wong L-L, Rao Z. 2010. Structural basis for the properties of two single-site proline mutants of CYP102A1 (P450 BM3). *Chembiochem* 11:2549-2556.
- WHO. 2015. Guidelines for the treatment of malaria. World Health Organization.
- Willrodt C, David C, Cornelissen S, Bühler B, Julsing MK, Schmid A. 2014. Engineering the productivity of recombinant *Escherichia coli* for limonene formation from glycerol in minimal media. *Biotechnol J* 9:1000-1012.
- Willrodt C, Hoschek A, Bühler B, Schmid A, Julsing MK. 2015a. Coupling limonene formation and oxyfunctionalization by mixed-culture resting cell fermentation. *Biotechnol Bioeng* 112:1738-1750.
- Willrodt C, Karande R, Schmid A, Julsing MK. 2015b. Guiding efficient microbial synthesis of non-natural chemicals by physicochemical properties of reactants. *Curr Opin Biotechnol* 35:52-62.
- Yang Y, Liu J, Li Z. 2014. Engineering of P450<sub>pyr</sub> hydroxylase for the highly regio- and enantioselective subterminal hydroxylation of alkanes. *Angew Chem Int Ed Engl* 126:3184-3188.

## 7. Anhang

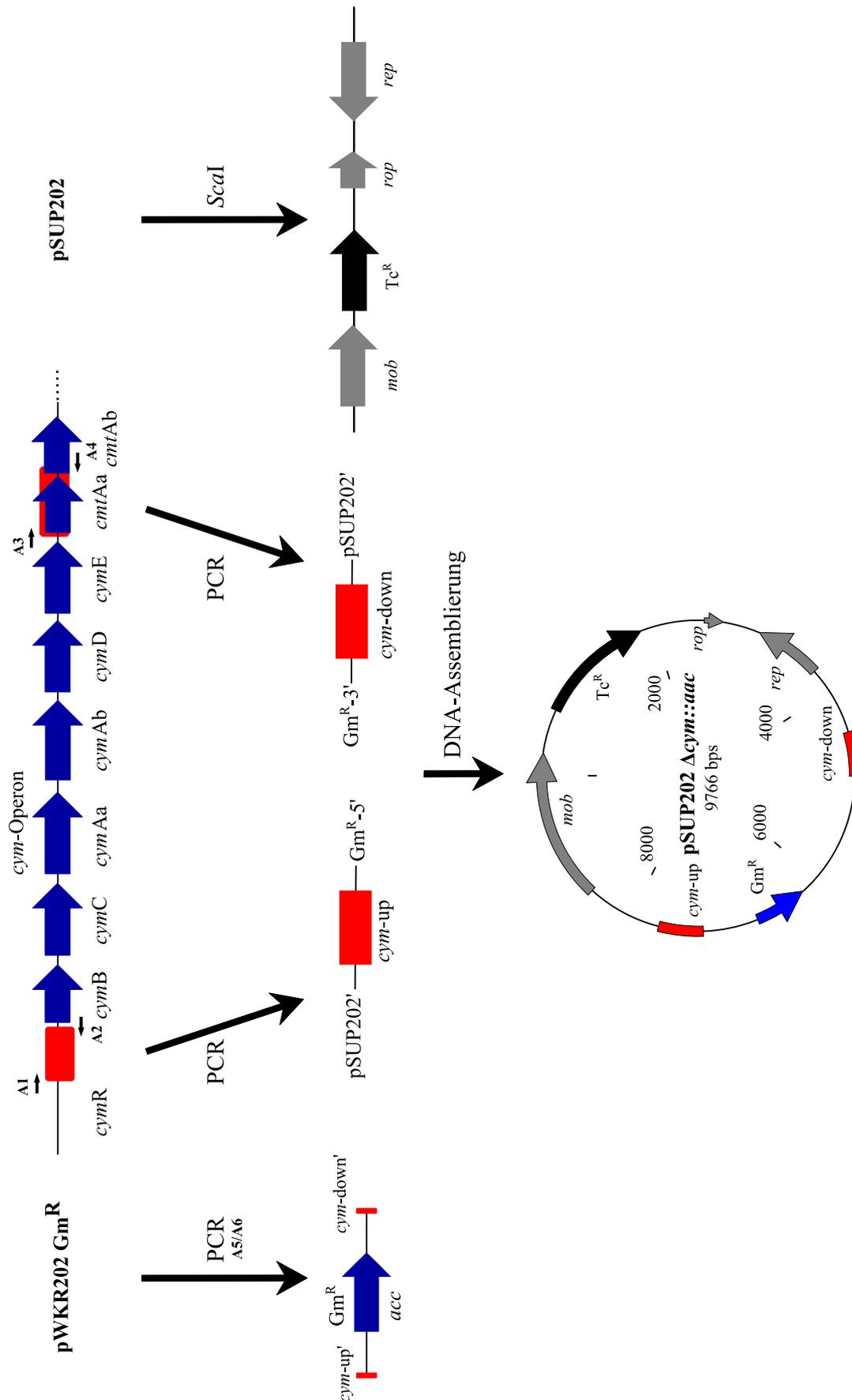
Konstruktion der Koexpressionsplasmide pSEVA42rha und pSEVA44rha.



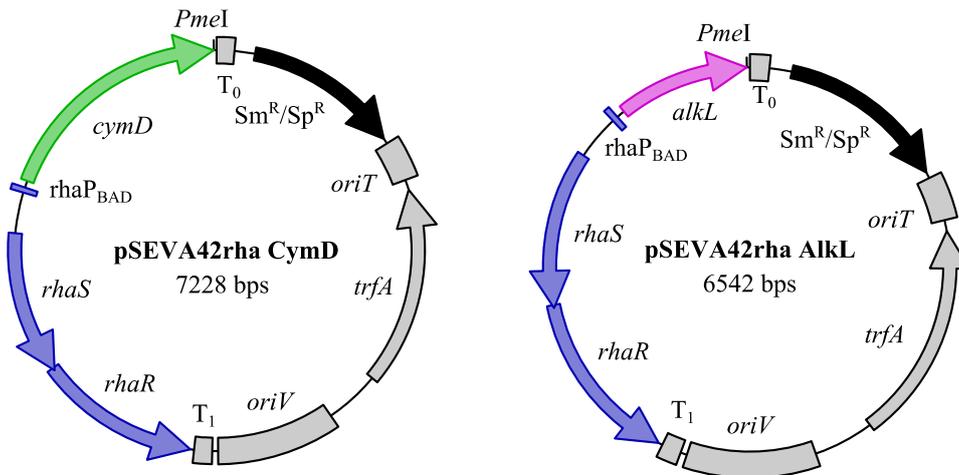
Schema 3. Konstruktion von pSEVA42rha.



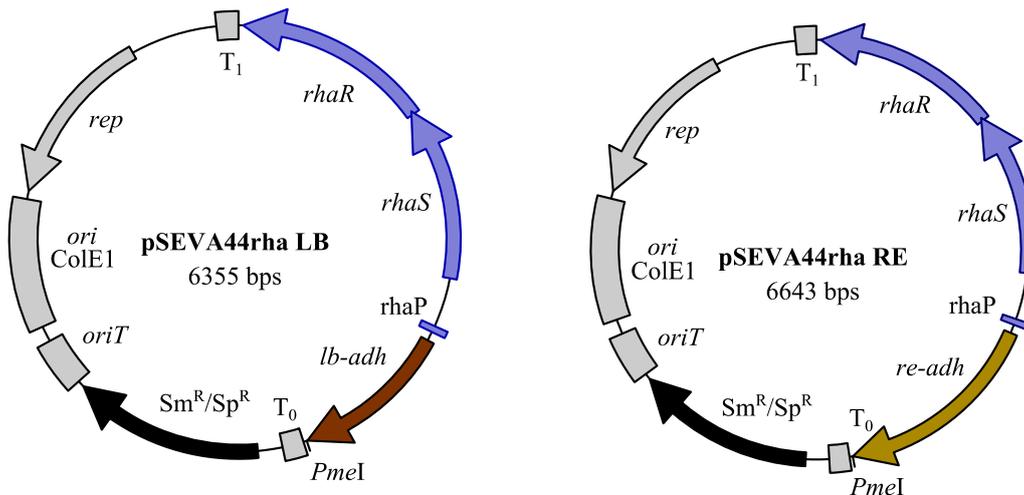
Schema 4. Konstruktion von pSEVA44rha.

Konstruktion des Deletionsplasmids pSUP202  $\Delta cym::aac$ .Schema 5. Konstruktion von pSUP202  $\Delta cym::aac$ .

## Schematische Darstellung verwendeter Koexpressionsplasmide



**Abbildung 48. Schematische Darstellung der Koexpressionsplasmide pSEVA42rha AlkL und pSEVA42rha CymD.** Die Klonierung erfolgte über DNA-Assemblierung (s. Kapitel 2.4.11.5). Durch die eingesetzten PCR-Primer wurde die *PmeI*-Schnittstelle hinter *cymD* bzw. *alkL* rekonstruiert. Antibiotika-Selektionsmarker (*aadA*) zur Resistenz gegenüber Streptomycin und Spectinomycin (schwarz), L-Rhamnose-Promotorsystem (hell-blau) und RK2-Replikationsursprung sowie weitere Plasmidelemente (grau).



**Abbildung 49. Schematische Darstellung der Koexpressionsplasmide pSEVA44rha RE und pSEVA44rha LB.** Die Klonierung erfolgte über DNA-Assemblierung (s. Kapitel 2.4.11.5). Durch die eingesetzten PCR-Primer wurde die *PmeI*-Schnittstelle hinter *re-adh* (hell-braun) bzw. *lb-adh* (braun) rekonstruiert. Antibiotika-Selektionsmarker (*aadA*) zur Resistenz gegenüber Streptomycin und Spectinomycin (schwarz), L-Rhamnose-Promotorsystem (hell-blau) und Replikationsursprung pRO1600/ ColE1 sowie weitere Plasmidelemente (grau).

**Tabelle 15. Auszug literaturbeschriebener Ganzzellsysteme zur Umsetzung von Limonen und Octan.**

<b>Ganzzellsystem<sup>a</sup></b>	<b>P450</b>	<b>Konzentration (g/l)</b>	<b>Referenz</b>
<i>Umsetzung von Limonen zu S/R-Perillaalkohol</i>			
<i>P. putida</i> GPo23 (w, B mit BEHP)	CYP153A6	2,3 (S)	(van Beilen <i>et al.</i> 2005)
<i>P. putida</i> KT2440 (w, B mit BEHP)	CYP153A6	4,3 (S)	(Cornelissen <i>et al.</i> 2011)
<i>E. coli</i> W3110 (w, B mit BEHP)	CYP153A6	6,0 (S)	(Cornelissen <i>et al.</i> 2013)
<i>P. putida</i> $\Delta$ cym (r, L)	P450-BM3-VVF	0,073 (R)	diese Arbeit
<i>Umsetzung von Octan zu (S)-2-Octanol</i>			
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) (r, L)	CYPpyrSM1	0,4 (98% ee)	(Yang <i>et al.</i> 2014)
<i>P. putida</i> DSM 12264 (r, L)	CYP154A8	2,0 (87% ee)	diese Arbeit <sup>b</sup>
<i>P. putida</i> DSM 12264 (r, L)	CYP154A8	0,7 (97% ee)	diese Arbeit <sup>b</sup>
<i>Umsetzung von Octan zu 1-Octanol</i>			
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) (r, L)	CYP153A13a	0,8	(Nodate <i>et al.</i> 2006)
<i>E. coli</i> BL21 (r, L)	CYP153Aci	2,3	(Fujii <i>et al.</i> 2006)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) (r, L)	CYP153Aci	0,7	(Fujita <i>et al.</i> 2009)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) (r, L)	CYP153A6	8,8	(Gudiminchi <i>et al.</i> 2012)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) (r, L mit BEHP)	CYP153A6	6,5	(Olaofe <i>et al.</i> 2013)

<sup>a</sup> Ganzzellsystem mit ruhenden (r) bzw. wachsenden Zellen (w), im Bioreaktor (B) oder 1-10 ml Labormassstab (L) mit BEHP als Zweiphasensystem, <sup>b</sup> beschrieben in (Tieves *et al.* 2016).