



HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Entwicklung eines P450-basierten Ganzzellkatalysators für die selektive Oxyfunktionalisierung von α -Pinen

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Sven Carsten Lehmann

aus Berlin

Düsseldorf, September 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

Referentin: Prof. Dr. Vlada B. Urlacher
Korreferent: Prof. Dr. Jörg Pietruszka

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Dezember 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 in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, 7. September 2016

Sven C. Lehmann

Danksagung

Während meiner Arbeit am Institut für Biochemie habe ich umfangreiche Unterstützung erfahren, für die ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken möchte.

Prof. Dr. Vlada B. Urlacher danke ich für die Überlassung des interessanten Promotions-themas, für die Übernahme des Gutachtens zur Dissertation und die hervorragenden Bedingungen, die ich am Institut während meiner Promotion vorgefunden habe.

Prof. Dr. Jörg Pietruszka danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Der AiF danke ich für die Finanzierung des Projekts, dessen Ergebnisse einen guten Teil dieser Dissertation ausmachen. Den Projektpartnern von der Arbeitsgruppe Bioverfahrenstechnik des Dechema Forschungsinstituts Jia Mi, Dr. Hendrik Schewe und Prof. Dr. Jens Schrader möchte ich für den kollegialen Austausch und gegenseitige Hilfestellungen danken.

Der Firma c-LEcta (Leipzig, GER) sowie Prof. Dr. Werner Hummel und Dalia Bulut vom Institut für Molekulare Enzymtechnik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf danke ich für die Bereitstellung von Alkoholdehydrogenase-Bibliotheken für unser Institut.

Meinen Institutskollegen danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft untereinander. Dr. Marco Girhard und Dr. Osama Mahmoud möchte ich für die Begleitung meines Projekts danken, sowie Florian Tieves für die kollegiale Zusammenarbeit als Projektpartner. Für die Einführung in die Geheimnisse des Doktorandendaseins am IBCII möchte ich den „alten Hasen“ des Instituts danken, die für meine Fragen immer ein offenes Ohr hatten. Da wären Dr. Katja Koschorreck (Fermentation), Dr. Clemens J. von Bühler (IT, FPLC, GC/MS und so ziemlich alles andere Denkbare) und Dr. Matthias Gunne (Software, FPLC und als Sitznachbar meiner Wissbegier schutzlos ausgeliefert). Dr. Sebastian Schulz und Dr. Priska Le-Huu danke ich für das Überlassen von P450-BM3-Varianten und jeder Menge Expertise auf dem Feld der ortsgerechten Mutagenese. Johannes Nolte und wiederum Dr. Sebastian Schulz gilt mein Dank für das Beschaffen und Überlassen von Alkoholdehydrogenase-Bibliotheken. Dr. Patrick J. Bakkes möchte ich herzlich für das über das übliche Maß hinausgehende Engagement bei der Erstellung von Publikationsmanuskripten danken. Allen Korrekturlesern sei hier zum Abschluss noch einmal herzlich gedankt.

Im Laufe meiner Arbeit haben mich einige Studenten in Form von Praktika oder Bachelorarbeiten unterstützt. Dafür danke ich Andreas Kreißl, Tim Kroll, Roland Stief, Patrick Schmal und Philipp Klever.

Meinen Eltern danke ich nicht nur für die finanzielle Unterstützung, die es mir ermöglichte, mich vollständig auf mein Studium zu konzentrieren, sondern auch für den in mich gesetzten Glauben und die Ermunterung nach meinen Zielen zu streben. Meinen Kindern danke ich für unverdrossenes Lächeln und die Antwort auf so manche Sinnkrise und, dass sie ihren Vater das ein oder andere Mal ohne Klage entbehrten. Meiner Frau Karin danke ich, dass sie mich trotz so mancher übler Launen so liebt und unterstützt, wie sie es tut, und mir in schlechten Zeiten immer eine starke Schulter bot, an der ich mich aufrichten konnte.

Publikationen und Konferenzbeiträge

Teile dieser Dissertation, die veröffentlicht werden sollen:

S. C. Lehmann, P. J. Bakkes, O. Mahmoud, V. B. Urlacher (2016) Process limitations in *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli* whole cells catalyzing the selective oxidation of α -pinene to verbenone. *In Vorbereitung*

Das Manuskript basiert auf den Inhalten aus Kapitel 3.3 und 3.4, sowie Teilen aus Kapitel 3.2.

Weitere Veröffentlichungen:

S. C. Lehmann, A. Maraite, M. Steinhagen, M. B. Ansorge-Schuhmacher (2014) Characterization of a Novel *Pseudomonas stutzeri* Lipase/Esterase with Potential Application in the Production of Chiral Secondary Alcohols. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 5, 1009-1017. doi: 10.4236/abb.2014.513115.

Poster:

F. Tieves, **S. C. Lehmann**, C. J. von Bühler, V. B. Urlacher (2014) Challenges of whole cell biocatalysts for the production of oxyfunctionalized molecules. 7th International Congress on Biocatalysis, Hamburg (GER)

S. C. Lehmann, R. Stief, V. B. Urlacher (2014) Enantioselective two-step conversion of α -pinene to verbenone by a P450-ADH cascade. 3rd Multistep Enzyme Catalyzed Processes Congress (MECP14), Madrid (ESP)

M. Girhard, S. Schulz, **S. C. Lehmann**, A. Vogel, V. B. Urlacher (2013) One-pot synthesis combining cytochrome P450 and alcohol dehydrogenases for synthesis of fine chemicals. BIOTRANS 2013, Manchester (UK)

S. C. Lehmann, M. Girhard, J. Schrader, V. B. Urlacher (2012) *Pseudomonas putida* as whole-cell catalyst for selective oxidation of α -pinene. BMBF-Workshop: Applied biotechnology and systems biology of *Pseudomonas*, Stuttgart (GER)

Zusammenfassung

Terpene sind eine vielseitige natürliche Quelle potentieller Vorstufen für Verbindungen mit chemischer oder pharmazeutischer Anwendung. Cytochrom-P450-Monooxygenasen (CYPs oder P450s) aktivieren molekularen Sauerstoff unter milden Bedingungen und bauen ein Sauerstoffatom in Kohlenstoffgerüste u.a. von Terpenen ein, häufig sogar selektiv. In dieser Arbeit wurden Biokatalysatoren etabliert für die selektive Hydroxylierung des Monoterpens α -Pinen zu Verbenol und die weitere Oxidation zum Keton Verbenon, welches den Geruch von Rosmarinöl prägt und eine gesuchte Verbindung für die Duft- und Aromaindustrie ist.

Zuerst wurde eine kleine Bibliothek von bisher noch nicht für die selektive Hydroxylierung von (-)- α -Pinen getesteten P450-BM3-Varianten auf erhöhte Stereoselektivität durchgemustert. Dabei wurde mit ALA-328 ein Rest mit großer Wichtigkeit für die Bildung von entweder (-)-*cis*- oder (-)-*trans*-Verbenol identifiziert, obwohl die ausschließliche Bildung nur eines Diastereomers unerreicht blieb. Für seine Anwendung als Pheromon bei der Bekämpfung des Borkenkäfers könnte die Reinheit jedoch von Bedeutung sein, da die Hydroxylierung von α -Pinen im Enddarm des Borkenkäfers stereoselektiv abläuft. Kombiniert mit einer höchst stereoselektiven Alkoholdehydrogenase (ADH) konnte (-)-*trans*-Verbenol in einer Eintopfreaktion mit hoher Reinheit (*de* >99 % mit kommerziellem Enzympräparat ADH-88 der Fa. c-LEcta) gebildet werden. Ein ebenso exzellenter Überschuss wurde durch Einsatz von P450-BM3 und PpdADH1 aus *Pichia pastoris* GS115 für (+)-*trans*-Verbenol bei der Oxidation von (+)- α -Pinen erreicht. Gleichzeitig bildete die Kaskade das Keton Verbenon und die ADH bewirkte zusätzlich eine Kofaktorregeneration. Durch Zugabe eines Kosubstrats für die ADH wie 3-Oktanol, Cyclohexanol oder 2-Nonanol wurde der Umsatz bis zu 2,7-fach verbessert.

Für die Ganzzellumsetzung wurde eine Variante der P450cam (CYP101A1) mit den Mutationen Y96F/L244A/V247L/C334A, die *in vitro* beide α -Pinenenantiomere gleichermaßen regioselektiv zu Verbenol umsetzte (78 % (+)-Verbenol, 80 % (-)-Verbenol), mit den dazugehörigen Redoxpartnern Pdx und PdR koexprimiert. Die *P. putida*-Stämme DSM12264 und KT2440 sowie die *E. coli*-Stämme JM109 und BL21 wurden als Biokatalysatoren getestet. Zellpermeabilisierung durch Behandlung mit Polymyxin B verbesserte die Bildung von Verbenol 2- bis 4,2-fach im Falle der *E. coli*-Stämme und fast 19-fach für *P. putida* KT2440. Anders als bei den *in vitro*-Experimenten produzierten die Biotransformationen einen erheblichen Anteil an Verbenon (50-100 % mit nicht permeabilisierten und 15-50 % mit permeabilisierten Zellen). Koexpression der Glycerindehydrogenase GldA für die Kofaktorregeneration führte zumeist zu erhöhter Produktivität in permeabilisierten Zellen. Ein Ersetzen der GldA durch 3 α -HSDH, welche Verbenol zu Verbenon oxidiert, ergab einen *E. coli* BL21-Ganzzellbiokatalysator, der entstehendes Verbenol fast gänzlich zu Verbenon weiter oxidiert (94 %) mit einer Produktivität von 18,7 mg/g_{cdw} bzw. 280 mg Verbenon in 3,2 Litern.

Abstract

Terpenes are a diverse natural source of molecules, which may serve as precursors of further functionalized, value-added compounds for chemical or pharmaceutical application. Cytochrome P450 monooxygenases (CYPs or P450s) activate molecular oxygen under mild reaction conditions and introduce one oxygen atom to the carbon backbone of molecules such as terpenes, often even in a selective manner. In this study, biocatalysts were established for the selective hydroxylation of the abundant monoterpene α -pinene to verbenol and further oxidation to the corresponding ketone verbenone, which is an impact compound of rosemary oil and a highly desired compound in the flavor and fragrance industry.

First, the poor stereoselectivity of P450-BM3 (CYP102A1) and variants thereof for hydroxylation of (-)- α -pinene to verbenol was addressed by screening a small library of not yet tested P450-BM3 variants. By this means, residue ALA-328 was identified to be of key importance for generation of either (-)-*cis*- or (-)-*trans*-verbenol, although the exclusive generation of either one of these diastereomers remained infeasible. However, for the application of verbenol as a pheromone in pest control of the bark beetle diastereomeric purity may matter as in the bark beetle's gut hydroxylation of α -pinene occurs stereoselectively. The combination of a P450-BM3 variant with a highly stereoselective alcohol dehydrogenase (ADH) in a one-pot reaction led to high purity of (-)-*trans*-verbenol (*de* of >99 % with the commercial enzyme ADH-88 by c-LEcta). The same excellent purity was achieved by applying P450-BM3 and PpdADH1 from *Pichia pastoris* GS115 on (+)- α -pinene yielding (+)-*trans*-verbenol. But most notably, this cascade produced the ketone verbenone. Moreover, the ADH provided concomitant cofactor regeneration for the reaction. Conversion was improved up to 2.7-fold by adding 3-octanol, cyclohexanol or 2-nonanol as cosubstrates for the ADH.

For whole cell conversion, P450cam (CYP101A1) variant Y96F/L244A/V247L/C334A, which *in vitro* converted both α -pinene enantiomers to verbenol with similar regioselectivity (78 % (+)-verbenol, 80 % (-)-verbenol), was co-expressed with the dedicated redox partners Pdx and Pdr. *P. putida* strains DSM12264 and KT2440 were tested as whole cell biocatalysts along with the *E. coli* strains JM109 and BL21. Cell permeabilization by polymyxin B treatment improved the conversion to verbenol by a factor of 2 and 4.2 in case of *E. coli* strains and even almost 19-fold for *P. putida* KT2440. Unlike the *in vitro* experiments, biotransformations produced a considerable proportion of verbenone (50-100 % with non-permeabilized cells, 15-50 % with permeabilized cells). Co-expression of the glycerol dehydrogenase GldA for cofactor regeneration in permeabilized cells in most cases led to a further increase in productivity. By replacing GldA with the 3 α -HSDH capable of converting verbenol to verbenone, an *E. coli* BL21 biocatalyst was created that almost entirely oxidized the intermediate verbenol to verbenone (94 %), yielding 18,7 mg/g_{cdw} and a total of 280 mg of verbenone in 3.2 liters.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	13
1.1	Biokatalyse - Eckpfeiler einer biobasierten Wirtschaft	13
1.2	Von den Anfängen der Biotechnologie bis zur modernen Biokatalyse	14
1.3	Cytochrom P450-Monooxygenasen	17
1.3.1	Allgemeine Anmerkungen, Nomenklatur	17
1.3.2	Katalytischer Zyklus	19
1.3.3	Redoxpartner	21
1.3.4	Kofaktorregeneration	22
1.3.5	P450-BM3	24
1.3.6	P450cam	25
1.3.7	Verbesserung der Enzymeigenschaften durch Mutagenese	25
1.4	Biokatalytische Kaskaden	28
1.4.1	Allgemeines und Kaskadentypen	28
1.4.2	Kaskaden aus P450 und Alkoholdehydrogenase	29
1.5	Terpene und Terpenoide	30
1.5.1	Allgemeines, Biosynthese und Klassifizierung	30
1.5.2	Chemische und biotechnologische Synthese von Terpenen	35
1.5.3	α -Pinen und seine oxyfunktionalisierten Derivate	37
1.6	Biokatalyse mit hydrophoben Substraten	39
1.6.1	Allgemeine Anmerkungen	39
1.6.2	<i>in vitro</i>	40
1.6.3	<i>in vivo</i>	40
1.7	Stand der Technik bei der Oxidation von α -Pinen	43
1.8	Ziel der Arbeit	45
2	Material und Methoden	48
2.1	Material	48
2.1.1	Chemikalien, Enzyme und Kits	48
2.1.2	Puffer und Medien	48
2.1.3	Stämme	51

2.1.4	Oligonukleotide	52
2.1.5	Plasmide	53
2.2	Analytik	55
2.2.1	Agarosegel-Elektrophorese	55
2.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	56
2.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	56
2.2.4	Bestimmung der P450-Konzentration	57
2.2.5	Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC/MS)	58
2.3	Bioinformatische Methoden	60
2.3.1	Modellierung des Substratzugangskanals von P450-BM3	60
2.3.2	Docking von (-)- α -Pinen in F87G-Varianten von P450-BM3	61
2.4	Molekularbiologische Methoden	61
2.4.1	Ortsgerichtete Mutagenese	61
2.4.2	Konstruktion von Plasmiden	62
2.4.3	Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	65
2.4.4	Herstellung und Transformation elektro-kompetenter <i>P. putida</i>	67
2.4.5	Plasmidisolation	67
2.5	Proteinbiochemische Methoden	68
2.5.1	Heterologe Expression von Enzymen in <i>E. coli</i> BL21(DE3)	68
2.5.2	Herstellung von geklärtem Rohlysat	68
2.5.3	Aufreinigung von His ₆ -tag tragenden Proteinen	68
2.5.4	Kultivierung, Expression und Präparation der Ganzzellkatalysatoren	69
2.5.5	Vorbereitung der Fermentation	70
2.6	Experimente zur <i>in vitro</i> -Umsetzung von α -Pinen	70
2.6.1	Charakterisierung von P450-BM3-Varianten	70
2.6.2	Screening von kommerziellen Alkoholdehydrogenasen	71
2.6.3	Screening von nicht-kommerziellen Alkoholdehydrogenasen	72
2.6.4	Charakterisierung aufgereinigter Alkoholdehydrogenasen	72
2.6.5	Kaskade aus P450 F87G und ausgewählten Alkoholdehydrogenasen	73
2.6.6	Screening von Kosubstraten für Alkoholdehydrogenasen	74
2.6.7	Kosubstratunterstützte <i>in vitro</i> -Kaskade	74
2.7	Experimente zur <i>in vivo</i> -Umsetzung von α -Pinen	75
2.7.1	Expression von P450-BM3 mit <i>broad host range</i> -Vektoren	75
2.7.2	Expression von P450cam ^{FALA} /Pdx/PdR sowie Koexpression von GldA und 3 α -HSDH	76
2.7.3	Viabilität von <i>P. putida</i> und <i>E. coli</i> in Gegenwart von α -Pinen	76
2.7.4	Durchführung der Biotransformation von α -Pinen	77

2.7.5	Bestimmung relevanter Parameter der Biotransformation	77
2.7.6	Fermentation von <i>E. coli</i> BL21 und Biotransformation von α -Pinen . . .	78
3	Ergebnisse	79
3.1	Erzeugung und Charakterisierung von selektiven P450-BM3-Varianten für die Oxidation von α -Pinen	79
3.1.1	Charakterisierung der P450-BM3-Varianten ATSCVG und AQCRG . . .	79
3.1.2	Charakterisierung von P450-BM3-Varianten mit I401P-Mutation	81
3.1.3	Modellierung des Substratzugangskanals von P450-BM3	82
3.1.4	Verbesserung der Selektivität von P450-BM3-Varianten durch rationales Proteindesign	84
3.1.5	Docking von (-)- α -Pinen in F87G-Varianten von P450-BM3	87
3.1.6	Selektive P450-BM3-Varianten für die (+)- α -Pinenhydroxylierung	89
3.2	Kaskade aus P450-BM3 und ADH zur Bildung von Verbenon aus α -Pinen <i>in vitro</i>	90
3.2.1	Screening von kommerziellen ADHs auf Verbenoloxidationsaktivität . .	90
3.2.2	Screening von nicht-kommerziellen ADHs auf Verbenoloxidationsaktivität	92
3.2.3	Expression und Reinigung von P450-BM3-Varianten und ADHs	92
3.2.4	Kaskade aus P450-BM3 F87G und ausgewählten Alkoholdehydrogenasen	96
3.2.5	Screening von ADHs nach Aktivität gegenüber (-)- <i>trans</i> -Verbenol	100
3.2.6	Screening von potentiellen Kosubstraten für verbenoloxidierende ADHs	102
3.2.7	Kosubstratunterstützte <i>in vitro</i> -Kaskade	104
3.3	P450-ADH-Kaskade in ganzen mikrobiellen Zellen	107
3.3.1	Expression von P450-BM3 mit <i>broad host range</i> -Vektoren	107
3.3.2	Expression von P450cam/Pdx/PdR in <i>E. coli</i> und <i>P. putida</i>	109
3.3.3	Charakterisierung von P450cam/Pdx/PdR bei der α -Pinenoxidation . .	110
3.3.4	Koexpression von Glyceroldehydrogenase oder ADH	111
3.4	Ganzzellumsetzungen von α -Pinen	114
3.4.1	Viabilität von <i>P. putida</i> und <i>E. coli</i> in Gegenwart von α -Pinen	114
3.4.2	Biotransformationen von α -Pinen	115
3.4.3	Biotransformation von α -Pinen mit P450-ADH-Kaskade	122
4	Diskussion	127
4.1	Umsetzung von α -Pinen durch P450-BM3-Varianten <i>in vitro</i>	127
4.2	Umsetzung von α -Pinen durch eine Kaskade aus P450-BM3 und ADH <i>in vitro</i>	131
4.3	Biotransformation von α -Pinen	135
5	Literaturverzeichnis	143

6	Appendix	158
6.1	GC/MS-Analyse des Medikaments GeloMyrtol® forte	158
6.2	Ausgabe der AutoDock Vina Software nach Docking von (-)- α -Pinen in P450-BM3-Variante F87G/A328I	159
6.3	Chromatogramme der GC mit chiraler stationärer Phase	159
6.4	Expression von P450cam ^{C334A} /Pdx/PdR und Umsatz von (+)-Kampher*	160
6.5	Permeabilisierung der Zellmembran von <i>P. putida</i> DSM12264*	162
6.6	Plasmidkarten	163
6.6.1	pEX-K4:: <i>gre2syn</i>	163
6.6.2	p4782.1:: <i>cyp102a1-atscvg</i>	165
6.6.3	pVLT33:: <i>cyp102a1-atscvg</i>	165
6.6.4	pJeM1a:: <i>cyp101a1-fala</i>	166
6.6.5	pSEVA42rha:: <i>gldA</i>	166
6.6.6	pSEVA46rha:: <i>gldA</i>	167
6.6.7	pSEVA4Xrha:: <i>3α-hsdh</i>	167
7	Abkürzungsverzeichnis	168

1 Einleitung

1.1 Biokatalyse - Eckpfeiler einer biobasierten Wirtschaft

Der aktuelle Bericht der Vereinten Nationen zur Entwicklung der Weltbevölkerung beschreibt einen Zuwachs in den Jahren 1980-2015 von 4,4 auf 7,3 Milliarden. Bei mittlerer Fertilität wird bis 2050 ein Zuwachs auf 9,7 Milliarden prognostiziert [1]. Dieser Bevölkerungszuwachs wurde über den gleichen Zeitraum durch einen Zuwachs der weltweiten Produktivität, repräsentiert durch das Bruttosozialprodukt, von 11 auf 75 Milliarden USD begleitet [2]. Gleichzeitig garantierte fortwährender Fortschritt auf dem Agrarsektor die ausreichende Versorgung mit Nahrungsmitteln. In den letzten Jahren entwickelte sich ein Bewusstsein, dass dieser Zuwachs an Produktivität auf Kosten von unwiederbringlichen Ressourcen wie fossilen Brennstoffen errungen wurde. Zugleich bedroht der fortschreitende Klimawandel die Versorgungssicherheit zukünftiger Generationen durch Dürre, Fluten und andere Naturkatastrophen [3]. All dies führte zu der Einsicht, dass in Zukunft Produktivität auf eine nachhaltigere Weise erreicht werden muss. So ist die ökologische Nachhaltigkeit eines der Millenniumsentwicklungsziele, zu denen sich 189 Staaten im Jahr 2000 schriftlich bekannten [4]. In diesem Zusammenhang wurde die Vermeidung von Umweltzerstörung durch das Ausbeuten von Lagerstätten oder die Einschränkung der Freisetzung von Treibhausgasen genannt [5]. Die nachhaltige Nutzung von Ressourcen hat jedoch nicht nur ökologische, sondern auch ökonomische und soziale Aspekte. Auch ökonomische und soziale Nachhaltigkeit bedingt die Beschränkung auf erneuerbare Ressourcen. Neben ihrer (theoretisch) unbeschränkten Verfügbarkeit und einem vergleichsweise leichten Zugang sind ökonomische und politische Unabhängigkeit nützliche Nebeneffekte [5].

Die nachhaltigste Energieressource, die uns zur Verfügung steht, ist die Sonne. Sie wird den Planeten auch noch mit Energie versorgen, wenn die Biosphäre bereits ausgelöscht sein wird [6]. Große Errungenschaften bei der Umwandlung der Sonnenenergie in Elektrizität in Form von Photovoltaikzellen und Windrädern sind bereits Realität und tragen einen großen Teil zu unserer Energieversorgung bei. Aber unsere moderne Wirtschaft ist nicht nur auf Energie, sondern auch auf Grundchemikalien und chemische Vorstufen für die Herstellung von Kunststoffen, Feinchemikalien, Arzneimitteln und vielen weiteren Gütern angewiesen. Solange diese Verbindungen nicht direkt von Sonnenenergie abgeleitet werden

können, muss der Umweg über die Biomasse genommen werden, die ja nichts anderes ist als chemisch gebundene Sonnenenergie. Basierend auf dieser Einsicht ist der Begriff der biobasierten Wirtschaft zu verstehen. Diese umfasst alle Vorgänge und Prozesse, die durch Verwendung von erneuerbarer Biomasse Mehrwert schaffen, wie zum Beispiel Nahrungsmittel, Energie oder erwähnte chemische Vorstufen [7]. Aufgrund der besonderen Bedeutung startete die Bundesregierung, vertreten durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), im Jahr 2010 die Nationale Forschungsstrategie BioÖkonomie 2030, die die Förderung und Koordination der Forschung auf diesem Feld vorantreiben soll. In ihrer Programmatik sieht sie neben Nahrungs- und Energieversorgung die Bereitstellung von Grundchemikalien als Hauptanforderung an eine biobasierte Wirtschaft. Die „weiße Biotechnologie“ mit Disziplinen wie Genomforschung, Systembiologie und auch die Biokatalyse wird hier als Katalysator für zukünftige Fortschritte genannt [8]. Obwohl zahlreiche Routen und Prozesse beschrieben und erste Pilotanlagen in Betrieb gesetzt wurden, sind diese Prozesse noch nicht ausreichend in das Netzwerk der Wertschöpfung implementiert. Als ein Grund wird die immer noch niedrige Effizienz der Prozesse angeführt. Ein Ansatzpunkt zur Erhöhung der Effizienz ist die restlose Nutzung aller Prozessprodukte. Dieser Ansatz wird durch das Schlagwort *zero waste* verkörpert.

Die vorliegende Dissertationsschrift beschreibt die Umsetzung von α -Pinen, einem in der Natur reichlich vorkommenden Monoterpen, in Produkte mit zahlreichen Anwendungsmöglichkeiten. α -Pinen fällt in großen Mengen als unerwünschtes Nebenprodukt bei der Wasserdampfdestillation in der Holzverarbeitenden Industrie an [9, 10]. Es ist also eben so ein Nebenprodukt eines biomassebasierten Prozesses. Mit seiner hohen Hydrophobizität und den vielen nicht-funktionalisierten C-H-Bindungen hat es Modellcharakter für die selektive Oxyfunktionalisierung von Monoterpenen und die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sollen über α -Pinen hinaus auch auf die Umsetzung anderer Terpene übertragbar sein. Auf diese Weise soll ein weiterer Baustein zur Schließung der Effizienzlücke vieler Prozesse hinzugefügt werden, um die biobasierte Wirtschaft ein großes Stück weit Wirklichkeit werden zu lassen.

1.2 Von den Anfängen der Biotechnologie bis zur modernen

Biokatalyse

Laut Definition der OECD ist die Biotechnologie eine Anwendung von Naturwissenschaften und Technologie auf lebende Organismen, ihre Bestandteile und Produkte sowie Modelle von Organismen, um lebendes oder nicht lebendes Material für die Schaffung von Wissen oder die Herstellung von Gütern und Dienstleistungen zu modifizieren [11]. Die Anfänge

der Biotechnologie liegen über 5000 Jahre zurück als erste Verfahren der alkoholischen Gärung zu Bier oder Wein sowie die Herstellung von Käse und Brot in den Hochkulturen tradiert wurden [12]. Weitere Entdeckungen wie die Entdeckung von Mikroorganismen durch Antonie von Leeuwenhoek, der Nachweis von Mikroorganismen als Ursache von Gärung durch Louis Pasteur und die Isolierung und Kultivierung von Bakterien durch Robert Koch waren Grundlage für die Biokatalyse [12]. Vor gut 100 Jahren markierte dann die erstmalige Anwendung von Biokatalysatoren natürlichen Ursprungs, d.h. wildtypischen Mikroorganismen und ihren Enzymen, in der synthetischen Chemie den Beginn und die erste Welle der Biokatalyse [12–14]. In ihrer weiteren Geschichte erhielt die Biokatalyse durch Innovationen ungleichmäßig Vortrieb, woraus die Unterscheidung von drei Wellen folgte [14]. Auf die erwähnte erste Welle folgte eine zweite in den Achtziger- und Neunzigerjahren des vergangenen Jahrhunderts nach Einführung von molekularbiologischen Methoden wie Polymerasekettenreaktion, Klonierung und die dadurch ermöglichte Strukturauflösung einer großen Anzahl zuvor schlecht zugänglicher Proteine. Strukturbasiertes Protein-Engineering führte in der Folge zur Erweiterung des Substratspektrums von Enzymen über natürliche Aktivitäten hinaus und eröffnete die Möglichkeit der Synthese neuartiger, ungewöhnlicher und nicht-natürlicher Moleküle. In der noch andauernden, dritten Welle der Biokatalyse wurde seit der Jahrtausendwende durch Fortschritte im Protein-Engineering, in der Gensynthese, der Hochdurchsatzsequenzierung und der Bioinformatik die Möglichkeiten geschaffen, in deutlich kürzeren Zeiträumen gewünschte enzymatische Aktivitäten zu kreieren. So eröffneten sich erstmalig Möglichkeiten, Enzyme den Prozessen anzupassen, anstatt wie zuvor den Prozess innerhalb der Grenzen zu betreiben, die durch die intrinsischen Limitationen der beteiligten Enzyme bedingt waren [14].

Die Eingliederung von biokatalytischen Schritten in die Synthesechemie verlief bisher nicht reibungslos, da Biokatalysatoren gegen einige Vorurteile anzukämpfen hatten [13]. Dabei gibt es handfeste Vorteile, aber auch Nachteile, die es zu bedenken gilt. So sind einige Enzyme auf sehr spezifische Kofaktoren angewiesen, die zum Teil sehr instabil und/oder kostspielig sind. Enzymatische Aktivität kann darüber hinaus durch hohe Substrat- oder Produktkonzentrationen inhibiert werden. Bei chemo-enzymatischen Eintopfsynthesen ist ein übliches Hindernis, dass Enzyme mehrheitlich in organischen Lösemitteln instabil oder wenig aktiv sind und ein recht enges Operationsfenster (Temperatur, pH) besitzen [15]. Die hohe Stereoselektivität, eigentlich eine Stärke von Enzymen, kann ein Problem darstellen, wenn die entgegengesetzte Selektivität benötigt wird. Mangels einer praktikablen Möglichkeit spiegelbildliche Enzyme herzustellen, ist eine einfache Umkehrung der Stereoselektivität, anders als bei chiralen Chemokatalysatoren, kaum möglich und erfordert ein Screening für die gewünschte Aktivität mit unklaren Erfolgsaussichten [13]. Die zeitnahe und erfolgreiche

Linderung der hier genannten Nachteile ist Gegenstand der beschriebenen dritten Welle und gibt noch immer Anlass zu mannigfaltiger Forschungsarbeit.

Daneben bieten Biokatalysatoren auch eine Reihe von Vorteilen. Enzyme akzeptieren eine große Anzahl komplexer Substrate und katalysieren ein großes Spektrum auch nicht-natürlicher Reaktionen mit hoher Stereo- und Regioselektivität, was aufwendige Schutzgruppenchemie weitestgehend entbehrlich macht und die Bildung von Nebenprodukten vermeidet. Ihre Herstellung ist nachhaltig, sie sind biologisch abbaubar und die typischen Prozessbedingungen (moderate Temperaturen, neutraler pH und Umgebungsdruck) bieten eine hohe Arbeitssicherheit [13, 14, 16]. Da die physiologischen Bedingungen vieler Enzyme (mit Ausnahme derer aus extremophilen Organismen) sich häufig ähneln, sind sie sehr kompatibel, d.h. in einem Eintopfprozess unter gleichbleibenden Bedingungen einsetzbar. Sie sind häufig sehr effizient und können in weit geringerer Konzentration (10^{-4} - 10^{-3} mol %) eingesetzt werden als herkömmliche Chemokatalysatoren (0,1 - 1 mol %) [13]. Das macht Biokatalysatoren zu einer sicheren und umweltfreundlichen Alternative, die zahlreiche industrielle Anwendungen hervorgebracht hat [17]. Ziel des Einsatzes von Biokatalysatoren ist in der Regel die Darstellung enantiomerenreiner Funktionalitäten, wie eines Alkohols (Lipasen, Ketoreduktasen), von Aminen und Amidinen (Transaminasen, Lipasen) oder die Knüpfung von C-C-Kopplungen (Aldolasen, Synthasen) [14, 16, 18, 19]. Als Folge des Contergan-Skandals und der daraus folgenden Erkenntnis, dass Enantiomere unterschiedliche pharmakologische Wirkungen haben können, wurde die Gesetzgebung dahingehend geändert, dass Enantiomere getrennt getestet werden müssen, bevor sie als racemisches Arzneimittel zugelassen werden [13]. Die annähernde Verdopplung der Kosten für aufwendige Studien erhöhte die Attraktivität für immer noch recht kostspielige biokatalytische Verfahren zur Herstellung von enantiomerenreinen Molekülen im großen Maßstab für die Anwendung als Wirkstoff [13].

In den ersten Jahren ihrer Etablierung wurde die industrielle Biokatalyse und -transformation von Hydrolasen wie zum Beispiel Lipasen (Abb. 1.1, A) dominiert [14, 19–21]. Jedoch gibt es in ihrer jüngeren Geschichte auch immer mehr Beispiele für die Anwendung von Oxidoreduktasen (Abb. 1.1, B). So können chirale Alkohole wie in (1S,3S)-3-Aminocyclohexanol durch Lipase aus *Thermomyces lanuginosus* (Novartis) oder wie in Atorvastatin (Cholesterinsenker Lipitor[®], Pfizer) durch Ketoreduktasen mit hohem Enantiomerenüberschuss hergestellt werden. Hydrolasen benötigen keine Kofaktoren und werden darum vermehrt als Enzympräparate oder Immobilisate eingesetzt [16]. Oxidoreduktasen wie Ketoreduktasen hingegen sind auf die Versorgung mit Reduktionsäquivalenten durch Kofaktoren angewiesen, weswegen sie häufig in Ganzzellkatalysatoren eingesetzt werden [22].

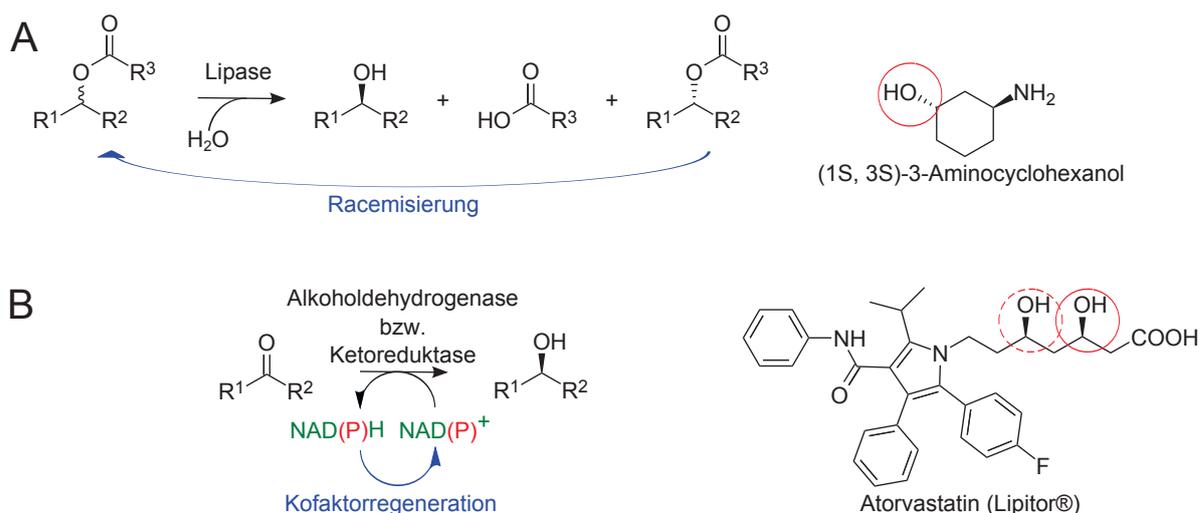


Abbildung 1.1: Auswahl industriell relevanter Aktivitäten zur Herstellung chiraler Alkohole nach [14] - Unterschiedliche biokatalytische Aktivitäten können zum selben erwünschten Ergebnis führen. Während früher aufgrund ihrer Kofaktorunabhängigkeit hydrolasebasierte Reaktionen wie die kinetische Racematspaltung durch Lipasen (A) dominierten, kommen oxidoreduktasebasierte Reaktionen wie die selektive Reduktion von Ketonen durch Ketoreduktasen (B) immer stärker in Anwendung. Rechts ist für jede Enzymklasse ein Beispiel für einen chiralen Alkohol mit industrieller Relevanz dargestellt (rote Kreise: chiraler Alkohol, gestrichelt: Gruppe auch durch Aktivität von Enzymen anderer Klassen darstellbar).

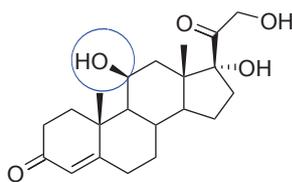
Um Oxidoreduktasen handelt es sich auch bei Cytochrom P450-Monooxygenasen. So wundert es nicht, dass alle industriell etablierten, P450-basierten Biotransformationen in Form einer Ganzzellbiotransformation durchgeführt werden [23]. Wie bei anderen Ganzzellbiotransformationen dominierten zu Beginn noch Wildtyp-Stämme, bevor zuletzt immer häufiger rekombinante Stämme zum Einsatz kamen, um die gewünschten Verbindungen auch durch *de novo*-Synthese von kostengünstigen Kohlenstoffquellen herzustellen [16, 22]. Obwohl häufig membrangebunden und weniger aktiv als bakterielle [24], basieren alle industriellen Prozesse aufgrund der interessanteren Aktivitäten auf eukaryotischen CYPs (Abb. 1.2).

1.3 Cytochrom P450-Monooxygenasen

1.3.1 Allgemeine Anmerkungen, Nomenklatur

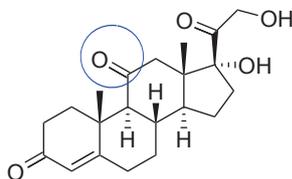
Cytochrom P450-Monooxygenasen, auch CYPs oder P450-Enzyme genannt, sind ubiquitäre Oxidoreduktasen (EC 1.14.-.-), die in allen Reichen von Lebewesen als auch in wenigen Viren zu finden sind [31]. Ihr Auftreten in Archaeen, wie *Sulfolobus solfataricus*, lässt auf eine lange Geschichte dieser Enzymklasse schließen [32]. In ihrer Eigenschaft als Cytochrome (altgr. κύτος: Rumpf, Zelle; χρώμα: Farbe) enthalten sie als prosthetische Gruppe ein Häm *b*, welches axial über ein Cysteinat an das Apoenzym gebunden ist und den Enzymen in der Regel eine rot-bräunliche Färbung verleiht. Das P in P450 steht für „Pigment“ und unter Bindung

Abbildung 1.2: Industrielle Anwendung von CYPs nach [23] - Alle Produkte industrieller, biokatalytischer Prozesse unter Beteiligung von CYPs sind hier dargestellt (in Klammern: ausführende Firma und Jahr der erstmaligen Erwähnung des zugrunde liegenden Prozesses). Bei Biotransformationen sind die Funktionalitäten, die selektiv eingebracht wurden, mit einem blauen Kreis dargestellt. Während bei der Biotransformation eine komplexe Vorstufe zumeist durch Wildtypstämme funktionalisiert wird, ermöglichen rekombinante Stämme die *de novo*-Synthese. Weitere genutzte Literatur: [25–30].



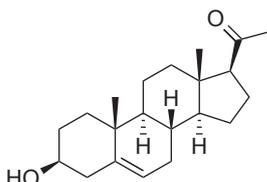
Hydrocortison

Biotransformation mit *Curvularia* sp.
(Schering, heute: Bayer Health Care, 1982)



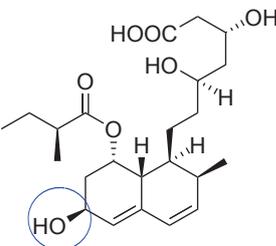
Cortison

Biotransformation mit *Rhizopus* sp.
von Progesteron zu 11 α -Hydroxyprogesteron,
Oxidierung zu Cortison chemisch mit CrO₈
(Upjohn, heute: Pfizer, 1952)



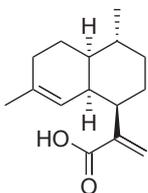
Pregnenolon

de novo-Synthese in *S. cerevisiae* durch
Säugetier - CYP11A1
(Sanofi, 1998)



Pravastatin

Biotransformation mit *Streptomyces carbophilus*
bzw. einer CYP aus *Mucor hiemalis*
(Daiichi Sankyo Inc. / Bristol-Myers Squibb, 1988)

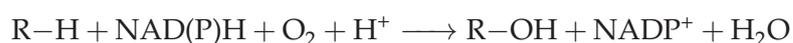


Artemisininsäure

de novo-Synthese in *S. cerevisiae* durch
CYP71AV1 aus *Artemisia annua*
(Sanofi, 2006)

von Kohlenstoffmonoxid an das reduzierte Häm bildet das Enzym ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 450 nm aus [33], womit der zweite Teil der Namensgebung zu erklären ist. Auf dem Stand der letzten umfassenden Aktualisierung vom August 2013 sind über 21.000 Sequenzen in der P450-Datenbank gelistet [31]. Im Zuge der Fortschritte im Bereich der DNA-Sequenzierung und des *Data Minings* ist davon auszugehen, dass seitdem viele weitere hinzugekommen sind. Die Nomenklatur der CYPs erfolgt aufgrund von Sequenzhomologie. Jedem Enzym wird ein eindeutiger Name zugeordnet, der mit der Abkürzung CYP beginnt, gefolgt von einer Zahl, die die Familie angibt, deren Mitglieder $\geq 40\%$ Aminosäuresequenzidentität teilen. Der Zahl folgt ein Buchstabe, der die Unterfamilie ($>55\%$ Aminosäuresequenzidentität) angibt und wieder eine Zahl, die einer spezifischen CYP zugeordnet ist [34, 35], wie beispielsweise CYP101A1 (Familie: 101, Unterfamilie: A, Laufende Unterfamilienmitgliedsnummer: 1). Neben den nomenklatorischen Bezeichnungen existieren außerdem Trivialnamen, wie z.B. P450cam für erwähnte CYP101A1.

Neben der Tatsache, dass die Natur eine große Sequenzdiversität unter P450-Enzymen hervorgebracht hat, erweckt auch die Vielfalt an katalysierten Reaktionen das Interesse für eine biokatalytische Anwendung. Unter diesen Reaktionen finden sich Epoxidierungen, Oxygenierungen, Dealkylierungen, Oxidationen, Deaminierungen, Dehalogenierungen, Dehydrogenierungen, Dehydratationen, Reduktionen, reduktive Spaltungen, Isomerisierungen, oxidative Spaltungen von C-C-Bindungen und Hydroxylierungen, auch von nichtaktivierten Kohlenwasserstoffen [36, 37], wie in folgender Reaktionsgleichung angegeben:



Da nur ein Atom des Sauerstoffmoleküls auf das Substrat übertragen wird, gehören CYPs zu den Monooxygenasen. Hierbei stellt die CYP den terminalen Akzeptor einer Elektronentransportkette dar. Bei CYPs handelt es sich um externe Monooxygenasen, die ihre Elektronen von einem Pyridin-Kofaktor, NADH oder NADPH, beziehen [23, 38]. Die Abstraktion der Elektronen und die Übertragung werden hierbei mit wenigen Ausnahmen, wie den Enzymen der CYP102-Familie mit ihren fusionierten P450- und Reduktasedomänen, durch zusätzliche Redoxproteine vermittelt [35]. Auf diese Weise bewerkstelligen CYPs in der Natur die Biotransformation von Xenobiotika und Karzinogenen, die Biosynthese von Steroiden, Fettsäuren, Eikosanoiden, Vitaminen und die Umsetzung von Alkanen, Terpenen und Aromaten wie auch den Abbau von Pestiziden [35].

1.3.2 Katalytischer Zyklus

Der katalytische Zyklus der CYPs besteht aus einer Vielzahl an Schritten, bis eine derart reaktive Spezies entsteht, dass selbst nahezu inerte Substrate oxidiert werden können (Abb. 1.3). Diese reaktive Spezies ist, genau wie wenige andere Zwischenstufen, sehr instabil und kurzlebig. So konnte der Mechanismus erst 2010 mit Beschreibung des *Compound I* vollständig aufgeklärt werden [40]. Den Beginn des Zyklus markiert die Positionierung des Substrats im katalytischen Zentrum und die dadurch induzierte Verdrängung von Wasser vom Eisen(III)-Atom des Häm *b* (in Abb. 1.3 mit dem Wort START verdeutlicht). Ein Elektron wird vom Kofaktor NAD(P)H abstrahiert und über die Redoxpartnerproteine auf das Häm übertragen, wo das Eisen(III) zu Eisen(II) reduziert wird. Daraufhin wird molekularer Sauerstoff gebunden und ein Eisen(III)-Superoxid gebildet, das durch ein weiteres Elektron zu einem Oxo-Eisen(III)-Komplex reduziert wird. Dieser wird protoniert und es wird ein Peroxo-Eisen(III)-Komplex gebildet. Eine weitere Protonierung führt zur Spaltung der Peroxo-Bindung und der Freisetzung von einem Wassermolekül, sowie der Ausbildung des für CYPs charakteristischen *Compound I*, welches die zu Beginn erwähnte

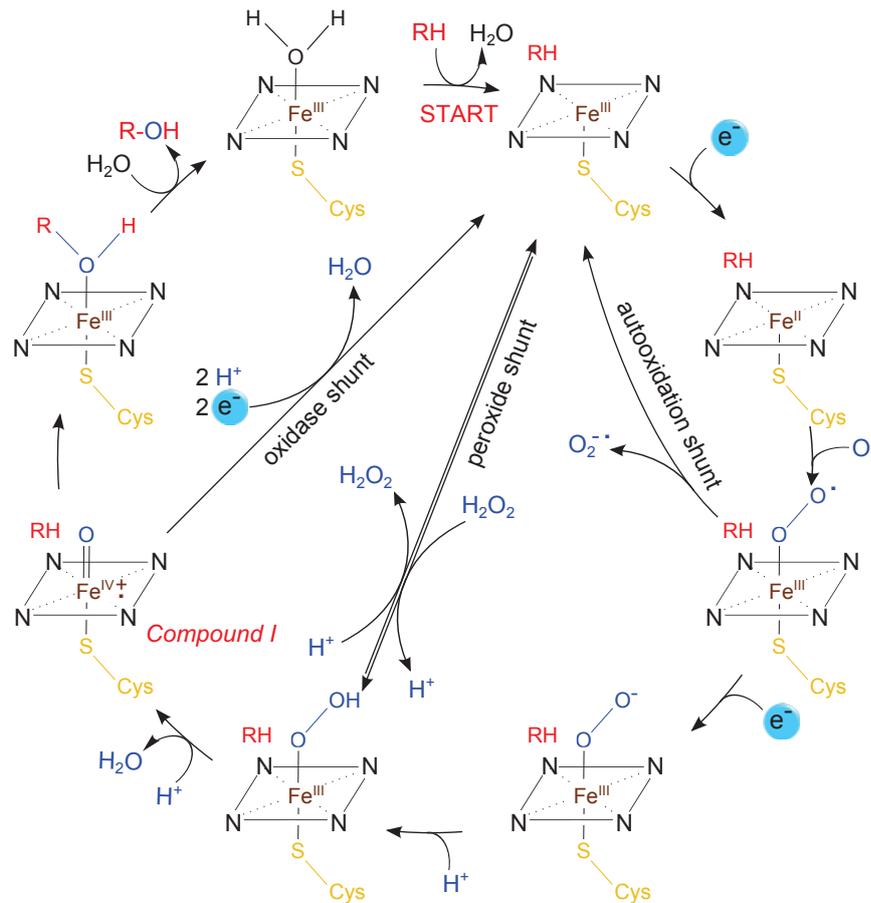


Abbildung 1.3: Katalytischer Zyklus der CYPs nach [39]

reaktive, aber instabile Spezies darstellt. Über den radikalischen Rebound-Mechanismus wird das zweite Sauerstoffatom in das Substrat eingebaut. Daraufhin wird das hydroxylierte Produkt freigesetzt und das Enzym kehrt in seinen Ursprungszustand zurück.

Die Oxidation des Kofaktors NAD(P)H kann auch durch sog. Kurzschlussreaktionen (*shunt reactions*) von der Oxidation des Substrats entkoppelt werden. Die Abspaltung der sehr reaktiven Superoxidgruppe von Eisen(III)-Superoxid führt wieder zum Eisen(III)-Atom (*autooxidation shunt*). Ebenso kann der aktivierte Sauerstoff des *Compound I* zu Wasser reagieren (*oxidase shunt*). Der *peroxide shunt* ist eine Gleichgewichtsreaktion, die zum Zerfall des Peroxo-Eisen(III)-Komplexes und zur Ausbildung von Wasserstoffperoxid führen kann. Zumindest theoretisch kann aber auch durch gezielte Bereitstellung von Wasserstoffperoxid die Bildung des Komplexes ohne Übertragung von Elektronen von der Reduktase(-domäne) auf die Monooxygenase(-domäne) erreicht werden. Jedoch ist zu bedenken, dass sowohl das Superoxid als auch Wasserstoffperoxid sehr reaktiv ist und die CYP oxidativ deaktivieren kann. So wird versucht, solch reaktive Nebenprodukte schnell abzubauen oder durch Protein-Engineering die Kopplung von Kofaktor- an die Substratoxidation zu erhöhen und das Auftreten dieser Produkte zu vermeiden.

1.3.3 Redoxpartner

Für den in Abschnitt 1.3.2 beschriebenen Zyklus (Abb. 1.3) werden zwei Elektronen benötigt, welche auf das Häm *b* als terminalen Akzeptor übertragen werden. Für den Transfer der Elektronen vom Kofaktor NAD(P)H zum Häm hat die Natur eine große Vielfalt geschaffen. Eine einfache Unterteilung unterscheidet die Systeme in Eins-, Zwei- oder Dreikomponentensysteme (Abb. 1.4).

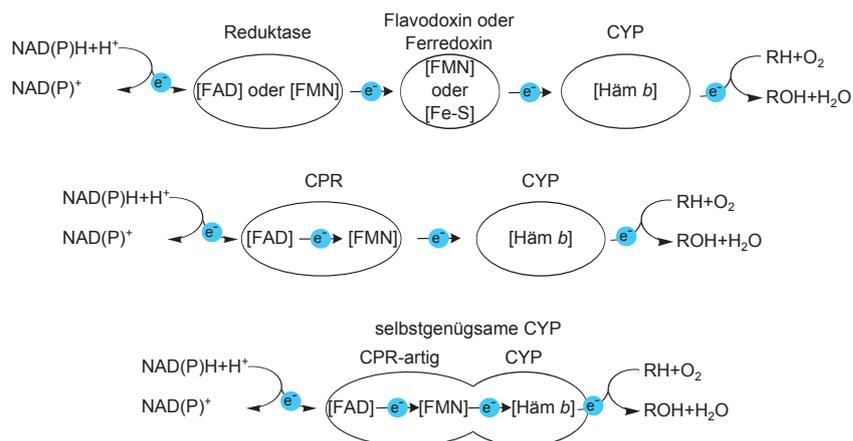


Abbildung 1.4: Klassifizierung der Redoxpartnersysteme von CYPs nach [38]

Dreikomponentensysteme bestehen aus einer Reduktase, die ein Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) oder ein Flavin-Mononukleotid (FMN) enthält und die Elektronen vom Kofaktor abstrahiert. Von dort werden die Elektronen auf die zweite Komponente übertragen, ein Protein, welches eine Flavin-Mononukleotid (FMN) oder ein Eisen-Schwefel-Cluster (Ferredoxin) enthält. Diese überträgt die Elektronen auf die P450, welche die dritte Komponente darstellt. In einem Zweikomponentensystem wird der Transfer der Elektronen zur CYP von einem Protein (CPR) übernommen, welches FAD und FMN enthält. Das Einkomponentensystem stellt eine natürliche Fusion der P450-Domäne an seinen Redoxpartner dar. Diese selbstgenügsamen Vertreter unter den CYPs erweckten das Interesse für biokatalytische Anwendungen, da sie, besonders für die Anwendung *in vitro*, nur die Aufreinigung eines Proteins benötigen, die Frage des optimalen Verhältnisses zwischen CYP und Redoxpartnern obsolet ist und es unter ihnen mit P450-BM3 einen Vertreter mit bisher durch andere CYPs unerreichter Aktivität gibt ([41], vgl. Abschnitt 1.3.5). Neben der hier vorgestellten Klassifizierung soll auch eine weiter verfeinerte Klassifizierung erwähnt werden, die zwischen membrangebundenen und cytosolischen Proteinen unterscheidet, sowie außergewöhnliche Fusionen und Elektronendonatoren außer NAD(P)H berücksichtigt (Klasse I bis X, [42]). Jedoch kommen in dieser Arbeit mit CYP101A1 und CYP102A1 ausschließlich bakterielle, lösliche Proteinsysteme zur Anwendung, so dass man sich für diese Arbeit auf die hier gezeigte Klassifizierung beschränken kann.

1.3.4 Kofaktorregeneration

Enzymatische Kofaktorregeneration *in vitro*

Hohe Kosten für eine stöchiometrische Bereitstellung des Kofaktors NAD(P)H machen ein Recycling durch unterschiedliche Regenerationssysteme aus ökonomischer Sicht unabdingbar. Für die Anwendung *in vitro* gibt es die Möglichkeiten der chemischen, der elektrochemischen und der enzymatischen Regeneration [43]. Bei der enzymatischen Regeneration reduziert ein Enzym unter Bereitstellung eines passenden Substrats NAD(P)⁺ zu NAD(P)H und gewährleistet so die Versorgung mit Elektronen für die CYP-katalysierte Reaktion über die stöchiometrische Menge an Kofaktor hinaus [44]. Geläufige Systeme sind zum Beispiel Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G-6P-DH), Glukosedehydrogenase (GDH), Glycerindehydrogenase (GLD), Alkoholdehydrogenasen (ADHs), Formiatdehydrogenase (FDH) und Phosphitdehydrogenase (PTDH) [44, 45]. Da nicht ein einziges dieser Enzyme alle gewünschten Eigenschaften auf sich vereinigen kann, haben alle genannten Systeme aufgrund ihrer intrinsischen Vor- und Nachteile je nach Anwendung ihre Berechtigung (Tab. 1.1).

Tabelle 1.1: Kofaktorregenerierende Enzyme

Enzym	Kofaktor	Substrat	Gleichgewicht	pH
G-6P-DH	NAD(P) ⁺	Glukose-6-Phosphat (teuer)	irreversibel	senkend
GDH	NAD(P) ⁺	Glukose (günstig)	irreversibel	senkend
GLD	NAD ⁺	Glycerin (günstig)	reversibel	neutral
ADHs	NAD(P) ⁺	diverse Alkohole (oft günstig)	reversibel	neutral
FDH	NAD ⁺	Formiat (günstig)	irreversibel	anhebend
PTDH	NAD ⁺	Phosphit (günstig)	reversibel	neutral

Um die Regeneration ökonomisch sinnvoll zu betreiben, ist ein günstiges Substrat von Vorteil. Je nach benötigter Kofaktorspezifität, denn nicht alle P450-Redoxpartner-Systeme sind hier flexibel, sind einzelne Enzyme von vornherein ausgeschlossen. Einige Reaktionen sind irreversibel, da das Produkt hydrolysiert oder in die Gasphase übergeht. So erreicht die Reaktion nie ihr Gleichgewicht gemäß dem Massenwirkungsgesetz, so dass sie erst mit vollständigem Verbrauch des Substrats zum Erliegen kommt. Reversible Reaktionen hingegen werden mit einem hohen Überschuss an Substrat in die gewünschte Richtung gezwungen. Die Tatsache, dass durch manche Reaktionen der pH beeinflusst wird, kann zur Instabilität der beteiligten Enzyme führen.

Kofaktorregeneration *in vivo*

Durch die Anwendung von CYPs im Ganzzellsystem kann der benötigte Kofaktor *in vivo* durch die Zellen bereitgestellt und durch den Zellmetabolismus regeneriert werden.

Diese Herangehensweise gilt als leichter und kostengünstiger und wird für die industrielle Anwendung bevorzugt [16, 22]. Hierbei werden die Zellen mit einer Kohlenstoffquelle versorgt, deren Katabolismus die benötigte Regeneration des Kofaktors bewirkt. Für die in dieser Arbeit getesteten Spezies *Escherichia coli* und *Pseudomonas putida* wurde Glycerin gewählt. Es ist ein Nebenprodukt der Biodieselproduktion und wird als kostengünstige Kohlenstoffquelle für den Einsatz in bakteriellen Prozessen, sowohl für *E. coli* als auch für *P. putida*, beschrieben [46]. Beiden Spezies stehen die Gene des *glp*-Regulons zur Verfügung, die die Verstoffwechslung von Glycerin ermöglichen [47, 48]. So kann durch die Verstoffwechslung von Glycerin Kofaktor effektiv regeneriert werden (Abb. 1.5).

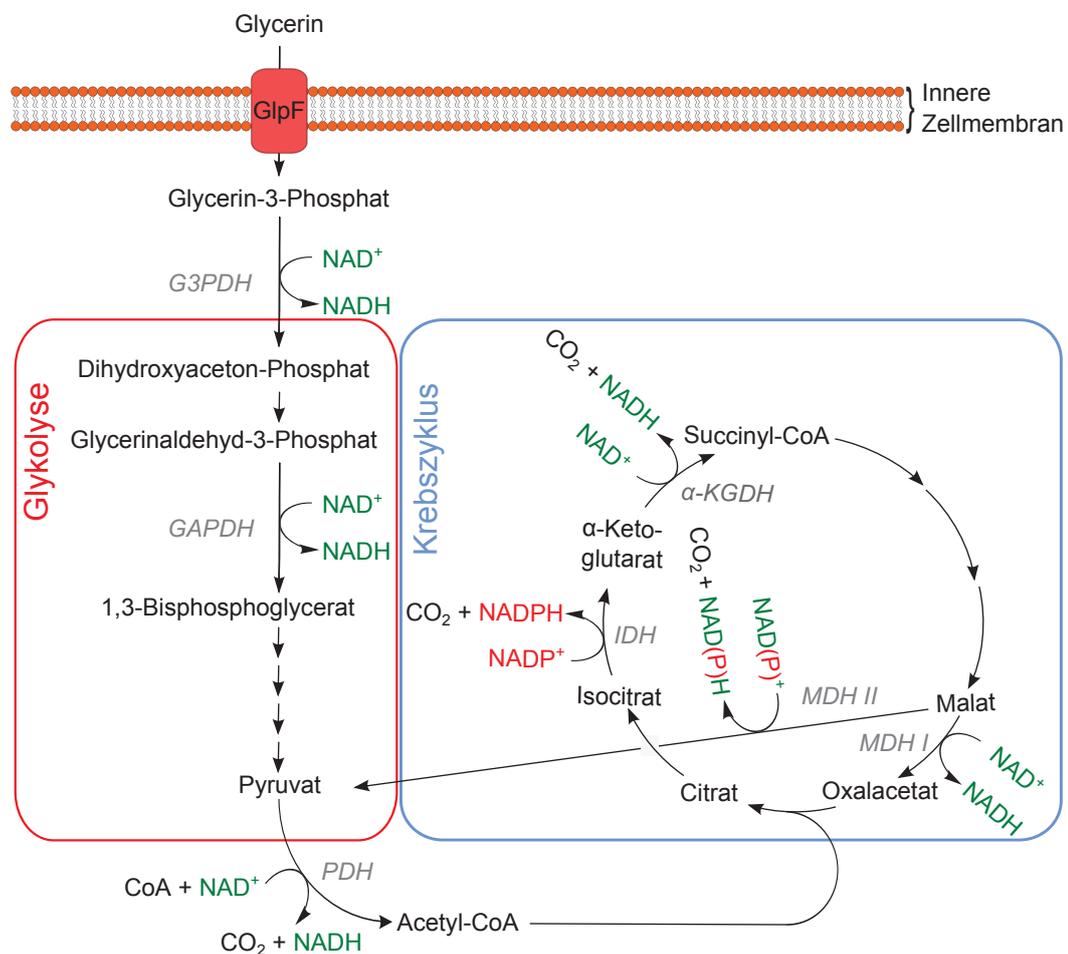


Abbildung 1.5: Kofaktorregeneration durch Metabolisierung von Glycerin - Glycerin passiert die innere Zellmembran (äußere Membran nicht dargestellt) und wird über verschiedene Zwischenstufen in den Stoffwechsel eingegliedert. Alle Schritte, die eine kofaktorregenerierende Wirkung haben, sind gezeigt und mit einem Kürzel für das verantwortliche Enzym versehen. Dabei handelt es sich um: G3PDH - Glycerin-3-Phosphatdehydrogenase (EC 1.1.1.8), GAPDH - Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (EC 1.2.1.12), PDH - Pyruvatdehydrogenase-E1-Komponente (EC 1.2.4.1), IDH - Isocitratdehydrogenase (EC 1.1.1.42), α-KGDH - α-Ketoglutaratdehydrogenase-E1-Komponente (EC 1.2.4.2), MDH I - Malatdehydrogenase (EC 1.1.1.37), MDH II - Malatdehydrogenase (EC 1.1.1.38). Die Abbildung ist abgeleitet von [49] und wurde unter Abgleich mit der *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG, <http://www.genome.jp/kegg>) ergänzt.

Ein Teil des *glp*-Regulons ist das *glpFK*-Operon. Das darin enthaltene *glpF*-Gen kodiert für den Glycerin-Faszilitator GlpF, der den Eintritt von Glycerin und anderen linearen Polyalkoholen durch die innere Zellmembran ermöglicht [50]. Der andere Teil des Operons kodiert für die cytosolische Kinase GlpK, die das Glycerin terminal phosphoryliert. Der nächste Schritt ist die Oxidation durch die Glycerin-3-Phosphatdehydrogenase (ebenfalls Teil des Regulons als *glpD*-Gen) weiter zu Dihydroxyacetonphosphat und damit zu einer Zwischenstufe der Glykolyse. Von hier an wird durch den bekannten Energiemetabolismus, bestehend aus Glykolyse und Krebszyklus, weitere Kofaktorregeneration ermöglicht.

Auch wenn nur eine der Kofaktorspezies, NADH oder NADPH, aufgrund einer hohen Spezifität der Reduktase(-domäne) der CYP für die Reaktion genutzt werden kann, ist der gesamte Pool an NADH und NADPH durch die Aktivität von Transhydrogenasen zugänglich. In *E. coli* und in vielen Stämmen der Spezies *P. putida* sind zwei unterschiedliche Transhydrogenasen (EC 1.6.1.1 und EC 1.6.1.2) bekannt, die den Ausgleich zwischen den beiden Kofaktoren gemäß folgender Reaktion vermitteln [51]:



Um die durch den Metabolismus angetriebene Kofaktorregeneration weiter zu verstärken, wurden Enzyme parallel zur CYP koexprimiert, die für die Regeneration *in vitro* beschrieben wurden [52–56].

1.3.5 P450-BM3

P450-BM3, nomenklatorische Bezeichnung CYP102A1, wurde erstmalig 1974 als ein löslich im zellfreien Lysat des Bakteriums *Bacillus megaterium* vorkommendes, recht aktives und stabiles Enzymsystem beschrieben [57]. Es hydroxyliert gesättigte und noch mehr ungesättigte Fettsäuren der Kettenlänge C_{14} bis C_{18} ausschließlich subterminal unter Verwendung von NADPH und molekularem Sauerstoff [57]. Die erste erfolgreiche Isolierung ergab eine Masse des Enzyms von etwa 119 kDa und es wurde festgestellt, dass keine weiteren Proteine zur Aufrechterhaltung der Aktivität benötigt wurden, das Enzym also selbstgenügsam ist [58]. Die nähere Untersuchung ergab, dass P450-BM3 N-terminal eine *Häm*-haltige, substratbindende Komponente, auch als BMO oder BMP bezeichnet, mit einer Größe von etwa 55 kDa besitzt. Diese ist C-terminal mit einer Reduktase, BMR genannt, von etwa 65 kDa fusioniert. Die BMR enthält im äquimolaren Verhältnis die Kofaktoren FAD und FMN und teilt große Sequenzhomologie mit den CPR-Enzymen aus Säugetieren, besitzt jedoch nicht deren N-terminale Region, die CPRs an die mikrosomale Membran bindet [59]. Es handelt sich also um ein P450-Enzym fusioniert an eine eukaryotenartige

Diflavin-Reduktase und nach der in Abschnitt 1.3.3 eingeführten Klassifizierung ist sie ein Einproteinsystem. Durch Sedimentation und Größenausschlusschromatographie konnte ermittelt werden, dass P450-BM3 in seiner nativen Form als Dimer vorliegt [60]. Es ergaben sich Hinweise sowohl für einen intermolekularen als auch für einen intramolekularen Mechanismus des Elektronentransfers innerhalb des dimerisierten Enzyms [32]. Die hohe Aktivität von P450-BM3 mit k_{cat} von >15.000 für das Substrat Arachidonsäure [41] ist durch andere CYPs bisher unübertroffen. Aus diesem Grunde wird die Anwendung der P450-BM3 und ihrer Varianten auch für nicht-natürliche Substrate in einer Vielzahl von Publikationen behandelt [61–64]. Whitehouse *et al.* [32] fassten die relevante Literatur über die Eigenschaften und Anwendungspotentiale dieses Enzyms zusammen.

1.3.6 P450cam

P450cam, nomenklatorisch CYP101A1, gilt als Modellsystem für die strukturelle und mechanistische Untersuchung von bakteriellen P450-Systemen und gilt neben P450-BM3 als eine der am besten beschriebenen CYPs [65]. Nach der Anreicherung von Stämmen des Bodenbakteriums *Pseudomonas putida*, die in der Lage sind auf dem Monoterpenoid Kampher als Kohlenstoffquelle zu wachsen [66], wurde die Anwesenheit einer löslichen, kofaktorabhängigen Methylenhydroxylase nachgewiesen, die den ersten Schritt des Abbaus von Kampher zu 5-*exo*-Hydroxykampher katalysiert [67]. Durch Fraktionierung des löslichen Proteins und spektrometrische Untersuchung wurde die Hydroxylase als CYP mit einer Molekülmasse von etwa 40 kDa identifiziert, die aufgrund ihrer Funktion den Namen P450cam erhielt (cam von engl.: *camphor*). Ebenso wurde die Notwendigkeit von zwei Redoxpartnerproteinen zur Elektronenübertragung festgestellt, einer FAD-haltigen Reduktase (Putidaredoxin-Reduktase, PdR) mit etwas kleinerer Masse als P450cam und einem Eisen-Schwefel-Protein, einem Ferredoxin (Putidaredoxin, Pdx), mit einer Masse von etwa 11 kDa [68]. Durch Isolierung der Enzyme und *in vitro* Rekonstituierung konnte die Funktionsweise des Systems bewiesen werden und ist inzwischen bis auf die molekulare Ebene entschlüsselt [69, 70]. Nach der in Abschnitt 1.3.3 eingeführten Klassifizierung handelt es sich, wie die meisten bakteriellen CYPs, um ein Dreiproteinsystem.

1.3.7 Verbesserung der Enzymeigenschaften durch Mutagenese

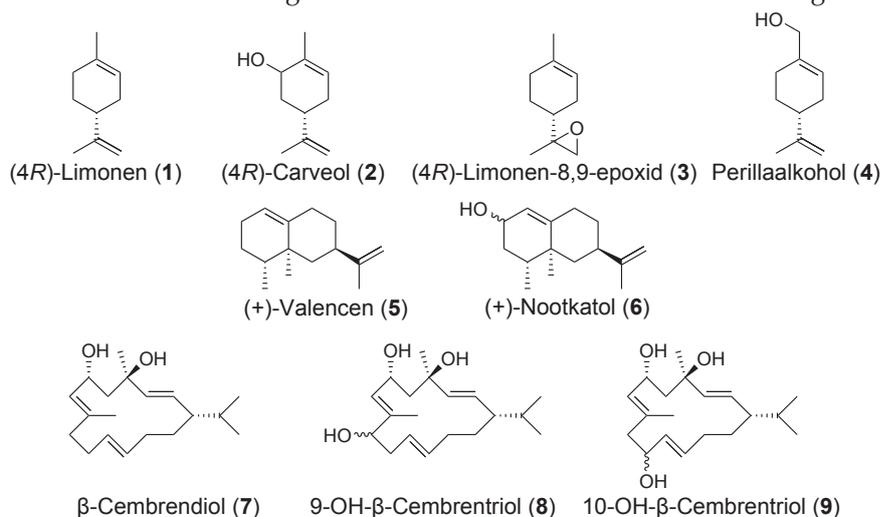
Auch bei CYPs wurde mit Aufkommen der molekularbiologischen Werkzeuge in den Achtziger- und Neunzigerjahren des vergangenen Jahrhunderts nicht mehr nur ausschließlich nach natürlichen Quellen von gewünschter enzymatischer Aktivitäten gesucht. Stattdessen wurde begonnen, Enzyme mit natürlicher Aktivität bzgl. ihrer Aktivität oder Selektivität weiter zu verbessern oder das Substratspektrum von Modellenzymen mit

vorteilhaften Eigenschaften wie hoher Aktivität oder katalytischer Selbstgenügsamkeit durch Mutagenese zu erweitern. So wurden entweder anhand von Kristallstrukturen gepaart mit fundierten Kenntnissen des Reaktionsmechanismus Positionen identifiziert und Mutationen ortsgerichtet eingefügt (rationales Proteindesign, engl. *rational design*) oder mit zunehmender Verfügbarkeit von Automatisierungsverfahren ganze Mutationsbibliotheken für umfangreiche Screenings erstellt, deren beste Kandidaten wiederum Ausgangspunkt für weitere Mutationsbibliotheken waren (gerichtete Evolution, engl. *directed evolution*) [71, 72]. Zu Beginn steht immer die Definition des Ziels eines Protein-Engineerings, zum Beispiel die Verbesserung von Stabilität, Selektivität, Löslichkeit oder Expression, sowie der Toleranz gegenüber organischen Lösemitteln, extremen Temperaturen oder ungewöhnlichen pH-Werten, die Erweiterung des Substratspektrums oder eine Kombination davon [14, 73]. Ein Hindernis für den Durchbruch der gerichteten Evolution bei der Verbesserung von CYPs ist die geringe Verfügbarkeit von geeigneten Assays für das Hochdurchsatzscreening. Indirekte Methoden, wie die Bestimmung des Kofaktorverbrauchs sind leicht photometrisch durchführbar, liefern aber auch positive Ergebnisse, wenn nicht die Aktivität gegenüber dem Substrat, sondern lediglich die Entkopplung ansteigt (siehe dazu Abschnitt 1.3.2). Direkte Assays wie der auf *para*-Nitrophenoxycarboxylsäure (*p*NCA) basierende Assay für die Bestimmung der Fettsäurehydroxylierungsaktivität durch P450-BM3 [74] sind hoch spezialisiert, so dass für jedes andere zu testende Substrat eine Synthese des entsprechenden *para*-Nitrophenoxy-Derivats durchgeführt werden müsste. Abgesehen davon, dass die sterischen Eigenschaften dieser Derivate vom eigentlichen Substrat abweichen, ist die Bewertung weiterer wichtiger Parameter, wie zum Beispiel von Regio- und Stereoselektivität nicht möglich. Mangels geeigneter Assays für das Hochdurchsatzscreening wurde zuletzt eine Mischform dieser beiden Strategien bevorzugt, in der wie beim rationalen Proteindesign bestimmte Positionen ausgesucht werden, um diese dann einer Mutagenese zu unterziehen [75]. So entstehen sogenannte „smarte“ oder „angereicherte“ Bibliotheken, die eine größere Erfolgsquote aufweisen und den analytischen Aufwand soweit einschränken sollen, dass auch bei Methoden mit mittlerem oder niedrigeren Durchsatz der Zeitaufwand im Rahmen bleibt. Auch für die Erstellung dieser Bibliotheken existieren unterschiedliche Ansätze, unter denen sich noch keiner als in jeder Hinsicht überlegen herauskristallisiert hat [72].

Die große Vielfalt der CYPs hinsichtlich ihrer Sequenz erschwert in ihrem Fall eine systematische Herangehensweise. So gibt es nur wenige konservierte Aminosäuren wie der das Häm *b* koordinierende Cysteinrest, ein sieben Reste in N-terminaler Richtung gelegenes Phenylalanin mit unbekannter Funktion, ein Threonin in der I-Helix für den Protontransfer zum Häm *b* und ein Glutamat/Arginin-Paar in der K-Helix, auch bekannt als ExxR-Motiv, welches indirekt die Tertiärstruktur des Enzyms und die Bindung zum Häm *b* stabilisiert [62].

Diesem Umstand zum Trotz kann von den Kristallstrukturen der Enzyme eine über alle CYPs stark konservierte Faltung festgestellt werden. Durch Strukturvergleiche konnte für sehr viele CYPs eine Position vorgeschlagen werden, die innerhalb der Substraterkennungssequenz 5 (SRS-5 von engl. *substrate recognition site*) liegt und deren Aminosäurerest großen Einfluss auf Spezifität und Selektivität hat [62]. Je nach zu lösender Problemstellung kann sich die Suche nach geeigneten Positionen für die Mutation unterschiedlich kompliziert gestalten. Bei Verbesserungen von Selektivität leuchtet ein, dass Aminosäurereste in kurzer Distanz zum katalytischen Zentrum den entscheidenden Einfluss haben dürften [62, 64, 76]. Zur Erhöhung von Aktivität und zur Erweiterung des Substratspektrums kommen zusätzlich alle weiteren Aminosäurereste infrage, die den Substratzugangskanal von der Enzymoberfläche zum katalytischen Zentrum bilden. Bei der Stabilität kann sich die Zahl der infrage kommenden Aminosäurereste über die gesamte Sequenz erstrecken. Im Falle von P450-BM3 (siehe Abschnitt 1.3.5) ist eine unter den CYPs unerreichte Tiefe an Erfahrungen mit Mutationen vorhanden [32]. Zahlreiche Studien führten zur Erweiterung des Substratspektrums oder zur Lenkung der Selektivität durch gezielte Mutagenese (Tab. 1.2).

Tabelle 1.2: Verbesserung der Selektivität von P450-BM3 durch Mutagenese



Substrat	BM3-Variante	Umsatz	Hauptprodukt	Referenz
1	Wildtyp	48,7 %	53 % 2	[63, 77]
	A328V/L437A	-	78 % 3	
	A264V/A328V/L437F	37 %	97 % 4	
5	Wildtyp	22,9 %	29,3 % 6	[77]
	F87A/A328I	50,3 %	67,4 % 6	
7	Wildtyp	2 %	-	[64]
	F87A/I263L	17 %	100 % 8	
	V78A/F87G	67 %	79 % 9	

1.4 Biokatalytische Kaskaden

1.4.1 Allgemeines und Kaskadentypen

Die Natur hat eine Vielfalt an metabolischen Netzwerken hervorgebracht, die nichts anderes als kaskadentypische Reaktionen darstellen und mit ihrer hohen Selektivität und Effizienz als Vorbild für multi-enzymatische Prozesse in der Biokatalyse dienen [79]. Neben den linearen Kaskaden der metabolischen Netzwerke gibt es in der Biokatalyse noch weitere Typen von Kaskaden, die die Kopplung an Nebenreaktionen nutzen, um das Gleichgewicht auf die Produktseite zu zwingen (Abb. 1.6). Dabei reicht ihre Komplexität von der Einfachheit der Kofaktorgeneration *in vitro* (Abb. 1.6, C; siehe auch Abschnitt 1.3.4) bis hin zu linearen Multienzymkaskaden (Abb. 1.6, A) wie in *de novo*-Synthesen komplexer Produkte, z.B. bei der Bildung von Artemisininsäure (siehe auch Abb. 1.2). Enzyme teilen aufgrund der weitgehenden Ähnlichkeit ihrer Ursprungsumgebung (moderate Temperatur, mittlerer pH, wässriges Milieu) ähnliche Vorlieben, was die Kombinierbarkeit einer großen Anzahl unterschiedlicher Katalysatoren ermöglicht [13]. Da die Aufarbeitung von Zwischenstufen hier überflüssig wird, werden Zeit und Kosten gespart, Abfall reduziert und sowohl

Atomökonomie als auch Ausbeute verbessert [15, 45]. Können mehrere Biokatalysatoren dasselbe Substrat nutzen, sind Spezifitäten und Aktivitäten der einzelnen Teilnehmer zu beachten, um nicht die Effizienz des Prozesses durch Akkumulation von Nebenprodukten zu schmälern. So können nicht alle Biokatalysatoren simultan eingesetzt werden, sondern manche müssen sequentiell angewandt werden [15], wie für einige Beispiele in Abb. 1.7 dargestellt.

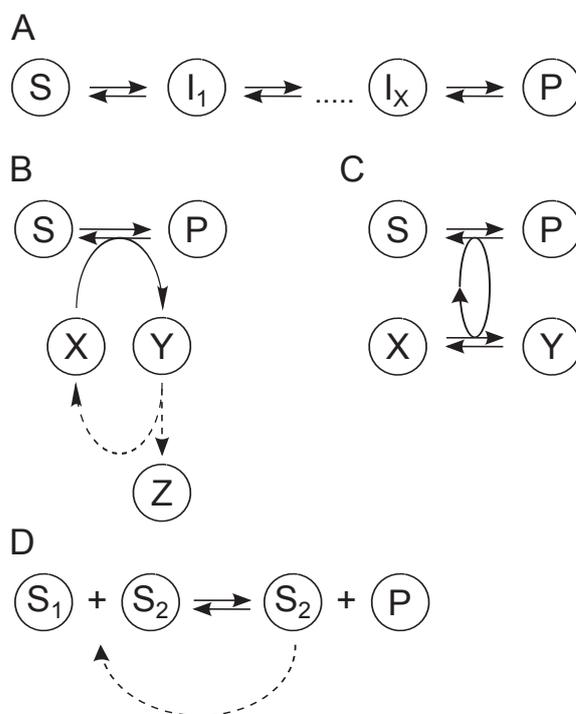
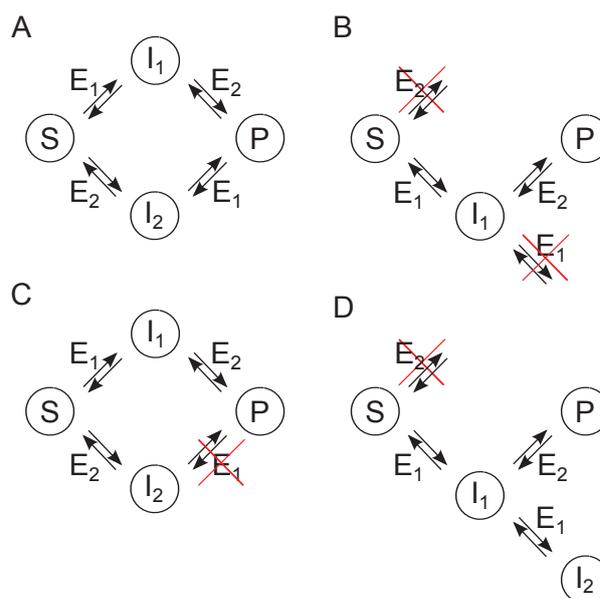


Abbildung 1.6: Kaskadentypen nach [78]

A: Lineare Kaskade - Ein Substrat wird über ein oder mehrere Zwischenschritte in ein Produkt umgesetzt; B: Orthogonale Kaskade - Produktbildung ist mit einem sich regenerierenden Kofaktor bzw. Kosubstrat gekoppelt; C: Parallele Kaskade - Die Bildung zweier unterschiedlicher Produkte aus zwei unterschiedlichen Substraten ist über einen Kofaktor oder ein Kosubstrat gekoppelt; D: Zyklische Kaskade - Eine Mischung mehrerer Substrate wird selektiv zu einem Produkt und einem oder mehreren Substraten umgesetzt, die Substrate reagieren wieder zurück in das ursprüngliche Verhältnis der Substrate. So wird das Produkt über die Zeit angereichert, so zum Beispiel bei der dynamischen kinetischen Racematspaltung.

Abbildung 1.7: Anwendungsbeispiele für simultane bzw. sequentielle Kaskaden

A: Beide Enzyme akzeptieren das Substrat sowie das durch das andere Enzym gebildete Intermediat (simultan); B: Nur ein Enzym akzeptiert das Substrat und das andere Enzym nur das Intermediat (simultan); C: Beide Enzyme akzeptieren das Substrat, aber nur E₂ das Intermediat von E₁ (sequentielle Zugabe von E₂ nach vollständiger Reaktion durch E₁, um Akkumulation von Nebenprodukt I₂ zu vermeiden); D: Das Substrat wird nur durch E₁ akzeptiert, jedoch reagiert das durch E₁ gebildete Intermediat I₁ weiter zu I₂, welches durch E₂ nicht akzeptiert wird (simultan mit E₂ im Überschuss oder Deaktivierung von E₁ vor sequentieller Zugabe von E₂).

**1.4.2 Kaskaden aus P450 und Alkoholdehydrogenase**

Die Kombination mit kofaktorregenerierenden Enzymen (Abschnitt 1.3.4) bildet den einfachsten Fall einer parallelen Kaskade (Abb. 1.6, C). Für die Synthese jedoch sind lineare Kaskaden von größerem Interesse. Hier wurde sich die Natur als Vorbild für die biokatalytische Anwendung linearer Kaskaden genommen und bisher physiologische Kaskaden zur Prozessreife gebracht, darunter multiple Oxidationen durch eine CYP wie bei der dreistufigen Oxidation von Pregnenolon aus Cholesterin durch CYP11A1 [28], aber auch multiple Oxidationen durch mehrere CYPs wie zum Beispiel die Bildung von Hydrocortison aus Cholesterin durch CYP11A1, CYP17A1, CYP21A und CYP11B1 [25]. Für artifizielle Kaskaden *in vitro* ist die Oxidation der durch die CYP eingebrachten Hydroxygruppe zum Keton durch Alkoholdehydrogenasen (ADHs) die einzig bekannte Anschlussreaktion, wie erst kürzlich zusammenfassend beschrieben wurde [45]. ADHs sind sehr stabil und regenerieren während der Oxidationsreaktion den Kofaktor, ein wichtiger ökonomischer Aspekt, der vor allem für die Reaktion *in vitro* Bedeutung hat [15]. Im gleichem Zusammenhang ist die Regeneration von reduziertem Kofaktor durch Oxidaseaktivität der P450-BM3 für die kinetische Spaltung von racemischen Alkoholen durch ADHs zu nennen [80]. Die durch ADH-Aktivität entstehende Carbonylgruppe bietet darüber hinaus die Möglichkeit weiterer Modifikationen wie die Sättigung α -ständiger C-C-Doppelbindungen durch Enoatreduktasen, wie *Old Yellow Enzyme* [81], die Bildung von Lactonen durch Baeyer-Villiger-Monooxygenasen [82–84] oder von optisch reinen Aminen durch Transaminasen [85]. *In vivo* wurde mittels metabolischen Engineerings der Fluss in bestimmte Stoffwechselwege wie der Terpenbiosynthese erhöht, um *de novo* Vorstufen für die Hydroxylierung durch CYPs zu bilden, zum Beispiel für die Bildung von Artemisininsäure oder Taxol [45].

1.5 Terpene und Terpenoide

1.5.1 Allgemeines, Biosynthese und Klassifizierung

Terpene und ihre funktionalisierten Derivate, die Terpenoide, bilden eine Naturstoffklasse von großer Diversität in Struktur und Funktion mit mehr als 55.000 isolierten Substanzen [87]. Der Begriff „Terpen“ kommt vom Terpentin, einer Flüssigkeit, gewonnen von harzhaltigen Hölzern wie Balsam oder Pinie. Terpentin stellte bereits in der Zeit vor der rohölbasierten Industrie eine gängige Quelle von Vorstufen für die organische Synthese dar und erlangte in jüngster Zeit wieder Aufmerksamkeit im Bestreben, eine nachhaltigere Quelle zu erschließen [88]. Die Mehrzahl der Terpene ist pflanzlichen Ursprungs und wird den sekundären Metaboliten zugeordnet. Sie erfüllen eine Bandbreite von Funktionen als Duftstoffe, Antibiotika, Hormone, Insektenlockstoffe oder zur Insektenabwehr [88, 89]. Neben ihren olfaktorischen Eigenschaften, die sie für die Geschmacks- und Geruchstoffindustrie interessant machen, sind ihre pharmakologischen Wirkungen, zum Beispiel gegen Krebs oder Malaria, von starkem Interesse. Sie verfügen über ausgedehnte π -Elektronensysteme, die ihnen eine Färbung verleihen und eine Anwendung als natürliche Farbstoffe ermöglichen, zum Beispiel mit der Beimengung von β -Carotin in Butter oder Zufütterung von Astaxanthin bei der Aquakultur von Lachs [10, 87, 88]. Über den Mevalonatweg (Abb. 1.8) werden in Eukaryoten sowie Archaeen und wenigen Bakterien alle Terpene und Terpenoide von einer einfachen Untereinheit,

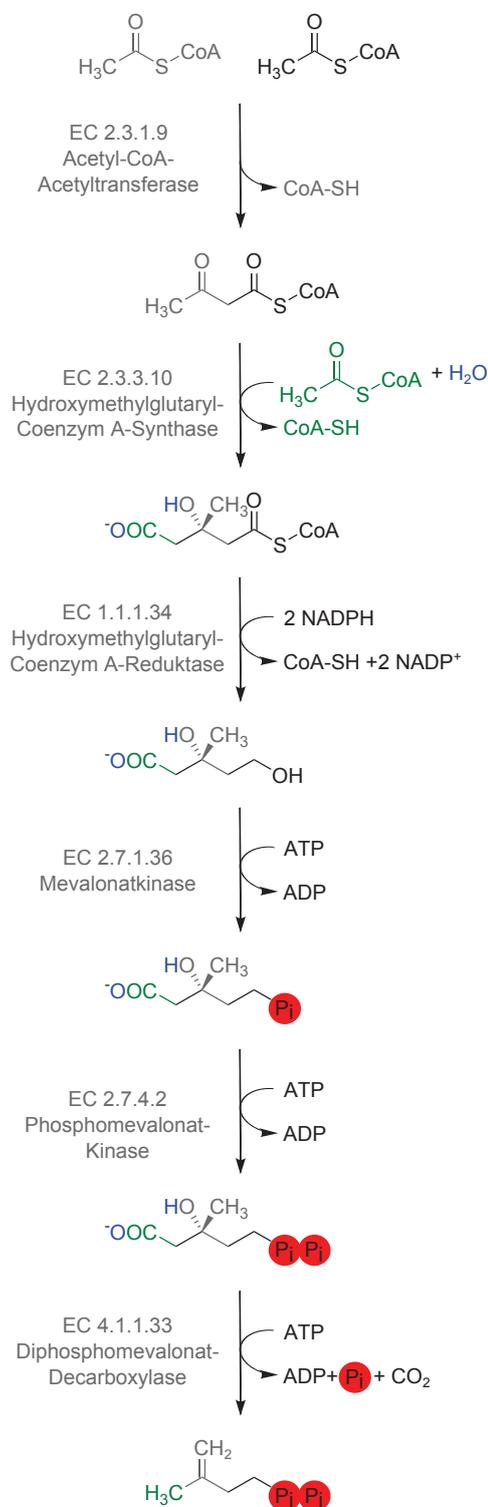


Abbildung 1.8: Mevalonatweg nach [86] - unter Abgleich mit der *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG, <http://www.genome.jp/kegg>)

dem Isopren bzw. von dessen biogenetischem Äquivalent, ausgehend von Acetyl-CoA gebildet. Acetyl-CoA, ein Intermediat des Energiemetabolismus (vgl. Abb. 1.5), wird im Cytosol schrittweise zu Hydroxymethylglutaryl-CoA kondensiert und dann durch die HMG-CoA-Reduktase, einem Membranprotein des endoplasmatischen Retikulums, irreversibel zu Mevalonat reduziert, dem charakteristischen Intermediat, welches dieser Biosynthese seinen Namen gibt. Diese Reaktion ist die kritische, geschwindigkeitsbestimmende innerhalb dieses Stoffwechselwegs. Mevalonat wird in drei ATP-verbrauchenden Schritten, darunter zuletzt durch eine Decarboxylierung, zu Isopentenylpyrophosphat umgewandelt, dem Baustein, der auf so vielfältige Weise zum Aufbau verschiedener Terpene und Terpenoide verwendet wird [86]. Während der Mevalonatweg für Hefen und Tiere der einzige Weg für die Bildung von Isopentenylpyrophosphat darstellt, gibt es für andere Organismen einen weiteren, in Pflanzen und Algen in den Plastiden verorteten Weg, den Methylerythritolphosphat (MEP)-Weg, auch nach dem initialen Intermediat DOXP-Weg genannt (Abb. 1.9). Vielen Bakterien steht sogar ausschließlich der MEP-Weg zur Verfügung. Statt mit Acetyl-CoA beginnt der Weg mit Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat, die ebenfalls prominente Intermediate des Energiemetabolismus darstellen (vgl. Abb. 1.5).

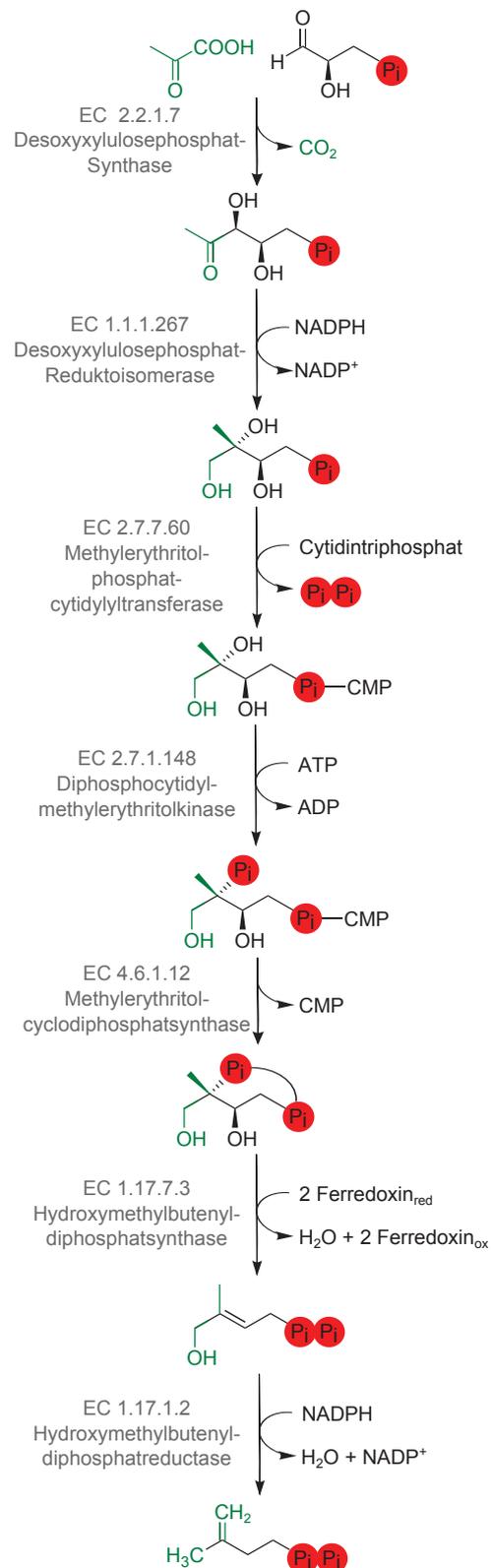


Abbildung 1.9: MEP-Weg - unter Abgleich mit der *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG, <http://www.genome.jp/kegg>)

Den Beginn der wiederholten Kondensation von C₅-Körpern markiert die Bildung von Dimethylallylpyrophosphat (*priming molecule*, [88]) einem Regioisomer des Isopentenylpyrophosphats, welches durch die Isopentenylpyrophosphat-Delta-Isomerase (EC 5.3.3.2) aus eben diesem gebildet wird (Abb. 1.10, grüner Bereich). Wie bereits erwähnt, ist Dimethylallylpyrophosphat das biogenetische Äquivalent des Isoprens. Obwohl dem Isopren strukturell nicht sehr ähnlich, teilen die biologische Prenylierung und die säurekatalysierte Dimerisierung des Isoprens (Abb. 1.10, gelber Bereich) ein gemeinsames Intermediat, ein Carbeniumion, das auch Prenyl genannt wird. Isopentenylpyrophosphat, genauso wie das Isopren bei der säurekatalysierten Dimerisierung, besitzt eine Doppelbindung. Diese kann mit dem allylischen Carbeniumion, welches durch Abspaltung des Pyrophosphations aus Dimethylallylpyrophosphat entsteht, eine Bindung knüpfen. Eine wiederholte Abspaltung des Pyrophosphations und die darauffolgende Bildung eines allylischen Carbeniumions ermöglicht die erneute Kondensation mit einer weiteren C₅-Einheit. Biologisch wird diese Reaktion durch Prenyltransferasen katalysiert, welche auf diese Weise in einer sogenannten Kopf-Schwanz-Kondensation C₅-Einheiten zu immer längeren Ketten kondensieren (Abb. 1.10, grauer Bereich), deren Länge Grundlage einer ersten Klassifizierung sind (Tab. 1.3).

Tabelle 1.3: Klassifizierung der Terpene nach [90]

Terpen-Klasse	Anzahl C-Atome	wichtige Vertreter
Monoterpene	10	Geraniol, Limonen, Pinen
Sesquiterpene	15	Farnesol, Nootkaton, Artemisininsäure
Diterpene	20	Geranylgeraniol, Phytol, Taxol
Sesterterpene	25	Geranylarnesol
Triterpene	30	Squalen, Steroide
Tetraterpene	40	Phytoen, Astaxanthin, Carotinoide
Polyterpene	100 - 30.000	Guttapercha, Kautschuk

Durch Spaltung von C-C-Bindungen kann es zu Molekülen mit nicht durch fünf teilbarer C-Atomzahl kommen, zum Beispiel C₁₁ oder C₁₆, die aufgrund ihrer Herkunft dennoch als Terpene klassifiziert werden [88]. Die Tatsache, dass die Einheiten von *cis*- oder *trans*-Prenyltransferasen in Z- oder E- Konfiguration zusammengefügt werden können, führt zu einer ersten Diversifikation. So ist das Nerylpyrophosphat aus Abb. 1.11 ein Z-Isomer des Geranylpyrophosphats aus Abb. 1.10 und ein Produkt der Aktivität einer *cis*-Prenyltransferase, Dimethylallyl-*cis*-transferase, auch Nerylpyrophosphattransferase (EC 2.5.1.28) genannt. Neben der Kopf-Schwanz-Kondensation kann auch mit Hilfe von Terpensynthasen eine zweifache Abspaltung des Pyrophosphations zu einer reduktiven

Schwanz-Schwanz-Kondensation katalysiert werden, zum Beispiel die Kondensation zweier Farnesylpyrophosphate (C_{15}) zu Squalen (C_{30} , Abb. 1.10, roter Bereich, [86]). Aber auch eine Kopf-Mitte-Kondensation wie beim Chrysanthemol ist selten, aber möglich [88]. Auf diese Weise werden Ketten unterschiedlicher Länge aus C_5 -Einheiten aufgebaut, die den Ausgangspunkt bilden, aus dem durch Zyklisierung, Oxidation und weiterer Funktionalisierung die eingangs erwähnte große Vielfalt entsteht. Terpenzyklen beispielsweise wandeln die bisher beschriebenen linearen Strukturen in komplexe Carbozyklen, teilweise mit Stereozentren, um (Abb. 1.11).

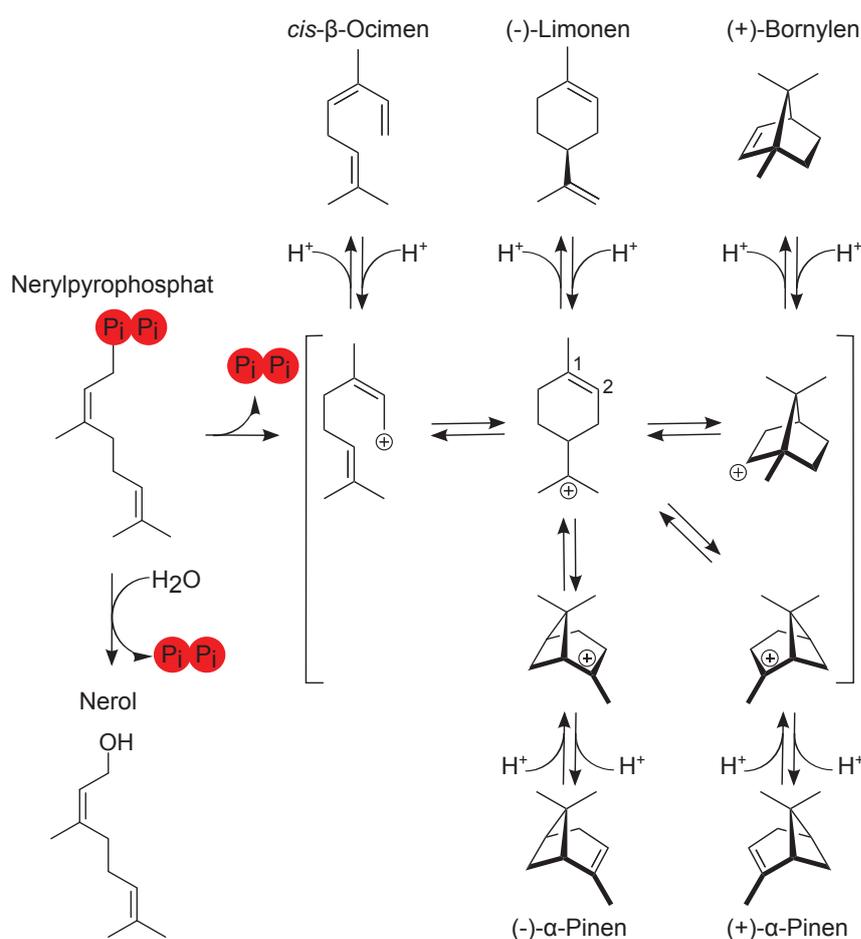


Abbildung 1.11: Diversifizierung durch Zyklisierung linearer Terpene nach [90]

Allein vom Nerylpyrophosphat kann, neben der Hydrolyse zu Nerol, durch Zyklisierung eine große Vielfalt an weiteren Produkten entstehen. Durch Abspaltung des Pyrophosphations entsteht, wie bei der Prenylierung (Abb. 1.10), ein Carbeniumion, welches hydriert werden kann, um beispielsweise *cis*- β -Ocimen zu bilden [90]. Durch Wagner-Meerwein-Umlagerungen kann das Carbenium wandern, an anderer Stelle stabilisiert werden und weitere Produkte wie Myrcen bilden [91]. Ebenso kann aber auch die Doppelbindung mit Carbeniumion eine C-C-Bindung knüpfen, die zu einer Ringbildung führt. Eine Hydrierung

kann zu den beiden Enantiomeren des Limonens führen, aber auch hier führt die Wagner-Meerwein-Umlagerung zu Produkten wie α - oder β -Phellandren, α - oder γ -Terpinen, Sabinen, Thujen oder Terpinolen [91]. Darüber hinaus besitzt das Molekül noch eine weitere Doppelbindung, die wiederum mit dem Carbeniumion eine C-C-Bindung knüpfen kann. Hier werden durch erneute Knüpfung einer C-C-Bindung unterschiedliche Bizeklen gebildet. Wird eine Bindung mit dem C₁-Atom geknüpft, entsteht Bornylen. Bei Verknüpfung mit dem C₂-Atom entsteht α -Pinen. Je nachdem in welcher Orientierung sich Doppelbindung und Carbeniumion nähern, entstehen zwei Enantiomere, (+)- und (-)- α -Pinen. Auf diese Weise entsteht aus einem Ausgangsmolekül eine kaum überschaubare Anzahl an unterschiedlichen Strukturen, die es dem Synthesechemiker unmöglich machen, systematisch an die Bildung und Funktionalisierung dieser Moleküle heranzugehen [87]. Gerade die Wagner-Meerwein-Umlagerungen sind chemisch schwer zu beherrschen und deswegen nicht von Bedeutung für die organische Synthese, sondern vielmehr Grund unerwünschter Nebenreaktionen bei Alkensynthese und Eliminierungsreaktionen [92]. Die Natur stellt dieser Menge an möglichen Strukturen eine große Anzahl an hochspezialisierten Enzymen zur Seite, die Zwischenstufen stabilisieren und zielgerichtete Molekülfaltungen unterstützen. So wurden aus *Salvia officinalis* zwei unterschiedliche Zyklasen (EC 4.2.3.119 und 4.2.3.121) fraktioniert, die entweder stereospezifisch (+)- oder (-)- α -Pinen aus Nerylpyrophosphat bilden [93]. Die teilweise sehr ausgedehnten Kohlenwasserstoffgerüste bilden ein typisches Substrat für die Aktivität von Monooxygenasen. So ist der erste Schritt der Synthese von Vitaminen wie Vitamin D₂ und D₃ und lebenswichtigen Plasmamembranbestandteilen wie Cholesterin und Stigmasterin die Epoxidierung des Squalens durch die Squalenmonooxygenase (EC 1.14.13.132) [94]. Aufgrund der großen Anzahl der zur Verfügung stehenden Doppelbindungen im Squalen (Abb. 1.10) ist dies eine Reaktion, die einer hohen Regioselektivität bedarf. Die Squalenmonooxygenase selbst gehört zwar nicht zu den CYPs, jedoch sind CYPs bei der Funktionalisierung von Terpenen weit verbreitet. Für die Bildung des Calcitriols, der physiologisch aktiven Form von Vitamin D₃, wird aus Squalenepoxid durch Demethylierungsaktivität von CYP51A1 und weiteren Schritten Cholecalciferol (Vitamin D₃) gebildet. Zwei weitere CYPs, CYP2R1 und CYP27B, hydroxylieren das Substrat weiter zu Calcitriol (unter Abgleich mit der *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, KEGG, <http://www.genome.jp/kegg>).

1.5.2 Chemische und biotechnologische Synthese von Terpenen

Die große Bandbreite an pharmakologischen Wirkungen und das Potential ihrer strukturellen Diversität machen Terpene und Terpenoide zu Molekülen von wissenschaftlichem, aber auch wirtschaftlichem Interesse [87, 88]. Allerdings müssen sie, genauso wie ihre Vorstufen

für die semi-synthetische Herstellung, noch immer mit traditionellen Methoden aus Biomasse extrahiert werden, was sich ökonomisch nur selten rechtfertigen lässt [10]. Aus diesem Grund wurden bereits einige Bemühungen investiert, um diese Moleküle mittels organischer Synthese herzustellen, in manchen Fällen bereits mit beachtlichem Erfolg, wie zusammenfassend von Maimone und Baran [87] dargestellt. Chemische Oxidationsprozesse benötigen häufig extreme Bedingungen (Temperatur, Druck, pH) oder den Einsatz von giftigen Reagenzien wie toxischen Schwermetallen [19]. Besonders herausfordernd jedoch ist für den Synthesechemiker bei der Funktionalisierung komplexer Moleküle die gewünschte Regio- und Stereochemie zu erhalten. Allein die vielen Optionen innerhalb der komplexen Kohlenwasserstoffgerüste der Terpene führen zu geringer Selektivität [10]. Zum Teil sind aus diesem Grund Synthesen nur aus komplexen Vorstufen möglich, die zum Teil auch schon chirale Zentren besitzen und enantiomerenrein vorliegen müssen, wie zum Beispiel bei der Synthese von (+)-Phomactin A [95].

In der Biosynthese von Terpenoiden werden Monooxyfunktionalisierungen häufig durch CYPs sehr selektiv und unter milden Reaktionsbedingungen katalysiert, zum Teil auch an wenig reaktiven C-H-Bindungen [10, 23, 29]. Zahlreiche Beispiele ihrer biotechnologischen Anwendung, insbesondere auch für Terpenhydroxylierungen, sind veröffentlicht und wurden von Schulz *et al.* zusammenfassend dargestellt [29]. So katalysieren CYP102A7 aus *Bacillus licheniformis* [96], CYP109B1 aus *Bacillus subtilis* [97] sowie CYP109D1 [98] und CYP264B1 [99] aus *Sorangium cellulosum* So ce56 unterschiedliche regioselektive Hydroxylierungen an einem oder beiden Regioisomeren des Ionons, α - und β -Ionon. Die regioselektive Hydroxylierung von Limonen zu Perillaalkohol ermöglicht CYP153A6 aus *Mycobacterium* sp. strain HXN-1500 [100]. CYP106A2 aus *Bacillus megaterium* unternimmt nicht nur die regioselektive Hydroxylierung der Abietinsäure, sondern ist eine vielseitige Steroidhydroxylase [29]. Neben der Nutzung von wildtypischen CYPs wurden auch CYPs, die ursprünglich kaum oder gar keine Aktivität aufwiesen jedoch hohes katalytisches Potential besitzen, wie z. B. P450-BM3 (Abschnitt 1.3.5), durch Protein-Engineering für die Hydroxylierung von Terpenen wie Valencen und Limonen nutzbar gemacht [63, 101]. Einige dieser biotechnologischen Ansätze haben es schon zu industrieller Reife gebracht, so zum Beispiel die Herstellung von Cortison (Pfizer), Hydrocortison (Bayer Health Care) und Pregnenolon (Sanofi), die als Steroide alle Terpenderivate darstellen, sowie von Artemisininsäure (Sanofi), einem Sesquiterpenoid (vgl. Abb. 1.2). Dass es nicht noch mehr Prozesse dieser Art gibt, liegt neben den beschriebenen Schwächen vieler CYPs, wie geringe Stabilität und niedrige Aktivität, auch an den physiko-chemischen Eigenschaften der Terpene, wie geringe Wasserlöslichkeit, hohe Flüchtigkeit und Zytotoxizität, die die biokatalytische Umsetzung stark behindern [10].

1.5.3 α -Pinen und seine oxyfunktionalisierten Derivate

α -Pinen, mit der Summenformel $C_{10}H_{16}$, ist ein bicyklisches Monoterpen, dessen Name von seiner Herkunft, dem ätherischen Öl von Nadelhölzern (lat. *pinus*: Kiefer), herrührt. Es ist Hauptbestandteil (60-65 %) des Terpentinöls [90], welches ursprünglich durch Destillation von Harz gewonnen wurde, das aus den Stämmen lebender Nadelbäume stammt. In Zeiten der industrialisierten Holzverarbeitung fällt es mit bis zu 160.000 Tonnen pro Jahr in großen Mengen als Bestandteil des Sulfatterpentins, einem Nebenprodukt der Dampfdestillation von frischen Weichhölzern (Kiefer, Tanne und Fichte), an und gilt darum als günstiges Ausgangssubstrat [9, 10]. Als Monoterpen ist es ein Produkt der Zyklisierung von Nerylpyrophosphat, einem Z-Isomer des Geranylpyrophosphats, durch zwei unterschiedliche Zyklastasen (EC 4.2.3.119 und 4.2.3.121), die entweder stereospezifisch (+)- oder (-)- α -Pinen bilden (vgl. Abb. 1.11). Die Biosynthese kann anhand der Abbildungen der Abschnitte 1.3.4 und 1.5 von der Kohlenstoffquelle Glycerin bis zum Pinen nachvollzogen werden. Der Reinstoff ist ein ätherisches Öl, welches bei Raumtemperatur flüssig ist und einen holzig-harzigen Geruch verströmt. Mit dieser Eigenschaft eignet es sich als schleimlösendes Medikament und ist zusammen mit Terpenoiden wie Cineol und Limonen der Wirkstoff z.B. von GeloMyrtol® forte (Pohl-Boskamp), einer Mischung von Eukalyptusöl, Süßorangenöl, Myrtenöl und Zitronenöl (siehe auch Appendix 6.1). Das Kohlenwasserstoffgerüst des α -Pinenmoleküls besitzt mehrere potentielle Positionen für die regio- und stereoselektive Oxyfunktionalisierung. So kommt es bei der Hydroxylierung von α -Pinen durch CYPs zu mehreren Produkten (Abb. 1.12). Jedoch werden einige

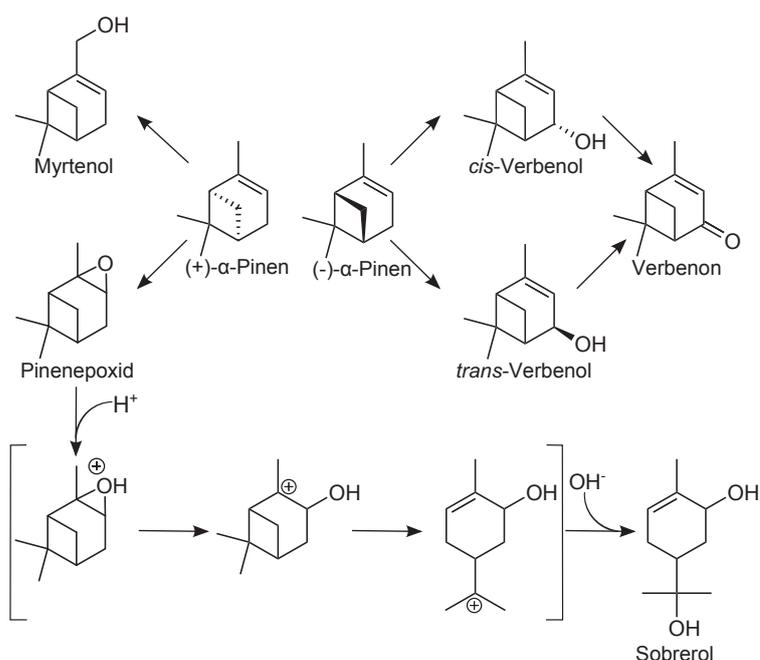


Abbildung 1.12: Produkte der Oxyfunktionalisierung von α -Pinen durch CYPs

Positionen für die Oxyfunktionalisierung bevorzugt. Dabei spielt die Doppelbindung des zentralen Bicyclo[3.1.1]heptenringes eine wesentliche Rolle. So ist die Epoxidierung der Doppelbindung ein häufig auftretendes Phänomen; ebenso geläufig ist die Hydroxylierung eines allylischen Kohlenstoffatoms [102]. Entsprechende Produkte fanden sich bei der CYP-katalysierten Biotransformation [9, 54] bzw. Biokatalyse [103, 104] von α -Pinen. Die Regioselektivität kommt durch die geringe Dissoziationsenergie der entsprechenden Bindungen zustande, die durch die Doppelbindung verursacht wird [105]. Alle gezeigten Produkte können sowohl als (+)- und als (-)-Enantiomer vorliegen, je nachdem, ob die Hydroxylierung an (+)- oder (-)- α -Pinen durchgeführt wurde. Durch die Oxidation zu Pinenepoxid oder Verbenol wird ein weiteres Stereozentrum eingefügt, so dass ein Spektrum unterschiedlicher, chiraler Produkte entsteht. In wässrigem Milieu ist Pinenepoxid instabil und lagert sich mit der Zeit zu Sobrerol um [104].

Einige dieser oxyfunktionalisierten Derivate des Pinens haben interessante biologische Eigenschaften. Beispielsweise werden *cis*-Verbenol, *trans*-Verbenol und Verbenon im Dickdarm verschiedener Borkenkäfer gebildet [106–111]. Sie wirken als Pheromon, was sie für den Einsatz in der Schädlingsbekämpfung interessant macht [112–114]. Durch den immensen ökonomischen Schaden, den der Befall durch den Borkenkäfer in der Forstwirtschaft anrichtet, besteht ein großes wirtschaftliches Interesse [115]. So sind einige Patente gelistet [116–121] und Chemieunternehmen betätigen sich schon seit geraumer Zeit auf diesem Feld. BASF zum Beispiel vertreibt eine Lockstofffalle mit der Produktbezeichnung Trinet[®] P [122]. Da das hier zum Einsatz kommende Insektizid Cypermethrin unspezifisch gegen jegliche Art von Insekten wirkt, wird es in Kombination mit Aggregationspheromonen eingesetzt, die nach Möglichkeit nur die unerwünschte Spezies zur Kontaktfalle lockt, während andere Arten verschont bleiben. Solche Pheromonpräparate enthalten unter anderem (-)-*cis*-Verbenol und sind für die Bekämpfung des Buchdruckers (lat. *Ips typographus*) zugelassen. Die Handelsnamen solcher Präparate lauten Pheroprax (BASF), Langlock (Sintagro) oder Typosan (Pheronova) [123]. Neben der Schädlingsbekämpfung besitzt Verbenon noch weitere Anwendungsmöglichkeiten. So ist es ein *impact compound* des Rosmarinöls [10] und besitzt anders als Verbenol antifungale Eigenschaften [124]. Außerdem bietet der eingebrachte Sauerstoff eine aktivierte Gruppe, die das reaktionsträge Molekül zugänglich für weitere Modifikationen wie Veresterungen, Oxidationen oder Aminierungen macht (siehe Abschnitt 1.4.2) und so den Zugang zu verschiedenen Verbindungen mit charakteristischen sensorischen Eigenschaften oder Arzneimitteln schafft [125]. So wurden hydroxylierte Pinenderivate genutzt, um die bityklische Struktur in komplexere Moleküle einzubauen, in einem Falle zur Herstellung eines wirksamen Strukturanalogons von Thromboxan A₂ [126].

1.6 Biokatalyse mit hydrophoben Substraten

1.6.1 Allgemeine Anmerkungen

Bei der Etablierung von biokatalytischen Prozessen ist die grundlegende Entscheidung zu treffen, ob die Reaktion *in vivo* oder *in vitro* durchgeführt werden soll. Beide Varianten besitzen nach wie vor ihre Existenzberechtigung, da sie jeweils Vor- und Nachteile aufweisen, die bisher noch nicht zu vereinen sind und die es gegeneinander abzuwägen gilt. *In vitro*-Systeme besitzen eine geringere Komplexität und sind darum leichter zu modellieren, zu optimieren und zu steuern. Es sind keine Nebenreaktionen zu erwarten und das Produkt besitzt eine höhere Reinheit. *In vivo*-Prozesse bieten jedoch den Vorteil, dass eine aufwendige (Teil-)Aufreinigung der Enzyme entfällt und kofaktorabhängige Enzyme durch den zelleigenen Metabolismus mit Kofaktoren versorgt werden, zum Beispiel mit NAD(P)H (vgl. Abb. 1.5). Bei Empfindlichkeit der Enzyme gegenüber Sauerstoff oder Lösemitteln bleiben sie in Zellen vor schädlichen Einflüssen geschützt und länger aktiv [13, 79, 127]. Viele attraktive Substrate für die Biokatalyse, insbesondere für die Funktionalisierung durch CYPs, bestehen aus ausgedehnten Kohlenwasserstoffgerüsten wie bei aliphatischen, aromatischen und heterocyclischen Verbindungen oder den soeben beschriebenen Terpenen. Solche Verbindungen sind nicht nur schlecht wasserlöslich (hydrophob), sondern wirken auch toxisch auf den Ganzzellkatalysator bzw. denaturierend auf das Enzym [16, 128]. Die populärste Klassifizierung ihrer Lösemitteleigenschaft ist ihr Verteilungskoeffizient in einer Mischung aus 1-Oktanol und Wasser bei einer Temperatur von 25 °C, auch als $\log P_{O/W}$ bekannt [10]. Sowohl bei der Anwendung *in vivo* als auch *in vitro* konnte gezeigt werden, dass zwischen Toxizität des Substrats und seinem $\log P_{O/W}$ ein sigmoidaler Zusammenhang besteht. So erfahren Biokatalysatoren in relativ polaren Lösemitteln mit einem $\log P_{O/W}$ von unter 2 eine starke oder vollständige Deaktivierung, eine moderate in Lösemitteln mit einem $\log P_{O/W}$ zwischen 2 und 4, und kaum eine Deaktivierung in Lösemitteln mit einem $\log P_{O/W}$ von über 4. Lösemittel mit einem $\log P_{O/W}$ von über 4 gelten darum als besonders biokompatibel [10, 129, 130]. Allerdings ist diese Tatsache unter anderem darauf zurückzuführen, dass diese Verbindungen sich nur sehr schlecht in der den Biokatalysator enthaltenden wässrigen Phase lösen ($\log P_{O/W} \geq 4$, Massen-% $< 0,04$ [129]). Ist das Lösemittel jedoch das Substrat, kann der Massentransfer in die wässrige Phase der geschwindigkeitsbestimmende Schritt sein. Die aktuelle Sicht im Falle der Ganzzellkatalyse ist, dass das Substrat erst in der wässrigen Phase gelöst sein muss, bevor es durch die Zelle aufgenommen werden kann. Aus diesem Grund wurden Tenside und Kosolventien eingesetzt, um die Massentransferlimitation zu überwinden [128]. Obwohl diese Stoffe die Löslichkeit hydrophober Verbindungen in der wässrigen Phase erhöhen, können sie die Zellen schädigen oder von ihnen abgebaut werden [128]. Wenn kaum wasserlösliche

Verbindungen durch Zugabe von Kosolventien verstärkt in Lösung gebracht werden, verstärken sich ihre toxischen Effekte und ihre Biokompatibilität nimmt ab [128]. Aus diesem Grund treten bei beiden Systemen, *in vivo* und *in vitro*, Hindernisse bei der Kompatibilität von hydrophoben Substraten und hydrophilen Biokatalysatoren auf, die es zu überwinden gilt.

1.6.2 *in vitro*

Obwohl durch ihre Herkunft an das wässrige Milieu angepasst, ist inzwischen bekannt, dass Enzyme anders als ganze Zellen auch in reinen Lösemitteln und superkritischen Flüssigkeiten ihre Funktion behalten, neue Spezifitäten aufweisen oder sogar, wie im Falle von Lipase-katalysierter Hydrolyse, ihre Funktion umkehren können; jedoch zeigen Enzyme hier fast ausschließlich geringere Aktivität als in wässriger Lösung [13, 131]. Die Linderung u.a. dieses Nachteils war Ziel von Protein-Engineering [16]. Der Mechanismus der Inaktivierung von weniger lösemitteltoleranten Enzymen an wässrig-organischen Grenzflächen besteht aus einer Entfaltung der Enzymstruktur und Präsentation von vormals innenliegenden, hydrophoben Resten in Richtung der organischen Phase, worauf die Enzyme aggregieren und letztlich ausfallen [10]. Während Enzyme wie Lipasen *qua functione* und aufgrund ihrer Sekretion an solch wässrig-organische Grenzflächen auch außerhalb der Zelle angepasst sind, sind CYPs ausschließlich wasserlösliche Enzyme, die in isolierter Form recht instabil sind [21, 127]. Durch gerichtete Evolution wurden jedoch Varianten von P450-BM3 hergestellt, die in Gegenwart von Lösemitteln eine größere Resistenz gegen hohe Lösemittelkonzentrationen und verbesserte Aktivitäten aufwiesen, und dabei einige dafür maßgebliche Positionen identifiziert [132]. Durch Immobilisierung von P450-BM3 konnte überdies eine verbesserte Stabilität und Aufrechterhaltung von Aktivität auch bei Konzentrationen von DMSO von bis zu 20 % erreicht werden [133].

1.6.3 *in vivo*

Als Hauptprobleme, die es bei der Biotransformation mit hydrophoben Substraten zu lösen gilt, werden die Bildung von Nebenprodukten und die Toxizität von Substrat und Produkten genannt. So können sich hydrophobe Moleküle in die Zellmembran einlagern und sie destabilisieren, was die strukturelle und funktionelle Integrität der Zelle negativ beeinflusst [10, 129]. Zyklische Kohlenwasserstoffe, wie zum Beispiel Monoterpene, werden aufgrund ihrer antibakteriellen und fungiziden Wirkung in Reinigern eingesetzt und stellen für die Biotransformation ein herausforderndes Substrat dar [128, 134]. Dabei korreliert der Verteilungskoeffizient im System 1-Oktanol/Wasser ($\log P_{O/W}$) positiv linear zu dem im System Membran/Puffer, d.h. je höher der $\log P_{O/W}$ einer Verbindung ist, desto stärker

die Neigung, in der Membran zu akkumulieren [128]. Dennoch sind zahlreiche Beispiele für die Biotransformation und Fermentation von C-O-funktionalisierten Produkten in der ganzen Zelle vorhanden [127]. Während bei der Biotransformation die Substrate der Reaktion aufgenommen und in einem oder mehreren Schritten in ein Produkt umgewandelt werden, wird bei der Fermentation das Produkt innerhalb des metabolischen Netzwerks aus der Kohlenstoffquelle hergestellt. Unter den von Schrewe *et al.* [127] in diesem Zusammenhang vorgestellten Organismen befinden sich neben Pilzen wie *Beauveria bassina* und Hefen wie *Candida tropicalis*, mehrheitlich bakterielle Stämme, besonders wenn nicht wildtypische, sondern rekombinante Organismen eingesetzt wurden.

Die äußere Beschaffenheit der Zelle könnte einen Einfluss auf die Toleranz der Zellen gegenüber hydrophoben Lösemitteln haben. So gelten Gram-negative Bakterien aufgrund ihrer äußeren Zellmembran im Allgemeinen als lösemitteltoleranter im Vergleich zu Gram-positiven Bakterien [10, 128, 135]. Trotz ihrer Toxizität werden einige organische Substanzen von Bakterien komplett zu Wasser und Kohlendioxid verstoffwechselt [134]. Dafür wird ihre Löslichkeit durch oberflächenaktive Substanzen erhöht, die durch die Bakterien selbst produziert und ausgeschieden werden [128]. Der Weg aus der kontinuierlichen Phase in die Zelle gilt gemeinhin als passiver Prozess, der durch Verteilung zwischen kontinuierlicher Phase und Membran sowie Verteilung zwischen Membran und Cytosol stattfindet [128]. Ein weiterer Aufnahmeprozess, der für einen Stamm von *Acinetobacter* gezeigt wurde, ist die Inklusion der hydrophoben Verbindung in Mizellen, die durch zelleigene Phospholipide gebildet werden. Die Mizellen können sich mit der Zellmembran vereinen und die hydrophoben Verbindungen in die Zelle entlassen [128]. Für die kommerzielle Anwendung von CYPs wurde bisher *S. cerevisiae* als rekombinanter Produktionsstamm eingesetzt (vgl. Abb. 1.2). Dieser mag für die Expression eukaryotischer CYPs gut geeignet sein und die für die rentable Herstellung benötigten Konzentrationen der recht biokompatiblen Steroide ausreichend tolerieren [136]. Für die Arbeit mit Monoterpenen sind Hefen wie *S. cerevisiae* aufgrund der hohen Toxizität von Substrat und Produkten kaum geeignet [135, 137]. In der Folge werden einige Vor- und Nachteile sowie Anwendungsbeispiele von Gram-negativen Bakterien bei der Umsetzung hydrophober Substanzen dargestellt.

E. coli

Obwohl nicht ausgesprochen lösemitteltolerant [16], wurde *E. coli* intensiv in Bezug auf seine Lösemitteltoleranz studiert [138–142]. Darüber hinaus ist er ein weit verbreiteter Expressionsstamm, der sehr gut genetisch charakterisiert ist und schnell mit relativ geringen Kosten bis zur Hochzelldichte kultiviert werden kann [143]. Zahlreiche Studien belegen die Anwendbarkeit von *E. coli*-Stämmen für die heterologe Expression von CYPs und

den erfolgreichen Einsatz als Biokatalysator in der Biotransformation [53, 55, 56, 144–148]. Da *E. coli* keine endogenen CYPs besitzt, vermindert dies die Wahrscheinlichkeit von unerwünschten Oxyfunktionalisierungen [22, 32]. Bei einem Vergleich zeigte *E. coli* W3110 nach Expression von CYP153A6 bei der Umsetzung von (*S*)-Limonen zu (*S*)-Perillaalkohol eine höhere Produktbildung (180 mg/g_{cdw}) als der entsprechende rekombinante *P. putida* KT2440 (161 mg/g_{cdw}) und bildete zudem weniger Nebenprodukte [147].

P. putida

Trotz der antibiotischen Wirkung von Monoterpenen auf Mikroorganismen gibt es Bodenbakterien, darunter Pseudomonaden, die die Fähigkeit besitzen, solche Verbindungen initial zu oxidieren, um sie abschließend zu verstoffwechseln. Eine Auflistung von Studien, in denen sich natürliche Oxyfunktionalisierungsaktivitäten von *Pseudomonas* sp. gegenüber α -Pinen als Substrat zu finden, zeigt Mikami [134]. Ein Beleg für die Lösemitteltoleranz von Pseudomonaden ist u. a. der Bericht über einen Stamm, der eine organische Phase von α -Pinen mit einem Volumenanteil von bis zu 90 % toleriert [128]. Die Zellen bedienen sich unterschiedlicher Mechanismen, um sich vor dem inaktivierenden Einfluss hydrophober Moleküle zu schützen. Darunter sind die sofortige Metabolisierung toxischer Zwischenprodukte, *cis/trans*-Isomerisierung der Phospholipide in der Zellmembran, Anpassung der Lipopolysaccharidschicht, die Bildung und Ausschleusung von Vesikeln und die Expression von Pumpen [142]. Die dadurch vermittelte Lösemitteltoleranz war Anlass für die Anwendung in einer Anzahl von Ganzzellbiotransformationen [149–151]. Obwohl die erwähnten Mechanismen darauf abzielen hydrophobe Moleküle auszuschleusen oder am Passieren der Membran zu hindern, können einige Stämme, wie eingangs erwähnt, genau solche Moleküle in die Zelle aufnehmen und verstoffwechseln. Solch eine endogene Oxidationsaktivität von *P. putida* DSM12264, ursprünglich für die Oxidation von *p*-Cymen, wurde für die Biotransformation des strukturell verwandten Limonen zu Perillasäure genutzt [152]. Doch auch Biotransformationen durch rekombinante Stämme sind beschrieben, zum Beispiel die Oxidation von Oktan zu 1-Oktanol durch *P. putida* KT2440 nach Expression von CYP153A16 aus *Mycobacterium marinum* und seinen natürlichen Redoxpartnern [153]. Erst kürzlich wurde mit *P. putida* DSM12264 nach Expression von CYP154A8 aus *Nocardia farnica* zusammen mit den Redoxpartnern YkuN/FdR ein Ganzzellbiokatalysator geschaffen, der Oktan zu 2-Oktanol oxidiert [154]. Für *P. putida* KT2440 wurde außerdem gezeigt, dass die Störung des Gleichgewichts von Reduktionsäquivalenten, wie es bei oxygenasebasierten Reaktionen auftreten kann, in großem Maße toleriert wird [155]. Darüber hinaus ist *P. putida* ein Stamm, der bereits für zahlreiche industrielle Prozesse etabliert wurde [156] und für die Oxyfunktionalisierungen von Terpenen bzw. Biosynthese von Terpenoiden Anwendung gefunden hat [100, 147, 152–154, 157–160]. Diese vorteilhaften Eigenschaften machen *P.*

putida zu einem attraktiven Stamm für die Oxidation von hydrophoben Substraten durch Oxygenaseaktivität.

Bemerkenswert in Bezug auf die Biotransformation hydrophober Substrate ist der Bericht über die Gene des *alk*-Operons aus *P. putida* GPO1 [161], die nicht nur zur Verstoffwechslung des Oktans benötigt werden, sondern auch für die Biotransformation des Limonens eine große Rolle spielen [130]. Für das im Operon enthaltene Membranprotein AlkL konnte eine Schlüsselrolle nicht nur beim Abbau von Alkanen, sondern auch bei der Umsetzung von Limonen nachgewiesen werden [146, 147]. Auch für *P. putida* F1, welches wie *P. putida* DSM12264 auf *p*-Cymen als einziger Kohlenstoffquelle wachsen kann, wurde ein Operon identifiziert, welches unter anderem ein Protein für die Außenmembran (*cymD*) kodiert [162]. Somit gibt es Hinweise, dass Transportproteine für die Einschleusung hydrophober Substrate in die Zelle unter *Pseudomonas*-Stämmen Verbreitung haben könnten.

1.7 Stand der Technik bei der Oxidation von α -Pinen

Die Oxidation von C-H-Bindungen ist eine für den Synthesechemiker schwierige, wenn auch nicht unlösbare Aufgabe. Durch Einsatz von Bleiacetat wird die Hydroxylierung von Olefinen in allylischer Stellung katalysiert [102, 163]. So kann auch Verbenol unter Anwendung von Bleiacetat bei 50-60 °C aus α -Pinen hergestellt werden. Für die Trennung der beiden entstehenden Diastereomere *cis*- und *trans*-Verbenol muss jedoch eine Veresterung mit α -Methoxy- α -trifluoromethylphenylacetat (Mosher-Säure, engl. *Mosher's acid*) mit darauffolgender Trennung und abschließender Verseifung durchgeführt werden [164]. Neben der aufwendigen Trennung der Diastereomere ist die Anwendung von giftigem Blei ein Nachteil dieser Technologie und eröffnet so die Möglichkeit für die Biokatalyse mit einer (stereo-) selektiven Aktivität unter milden Bedingungen, eine nachhaltige Alternative anzubieten.

Wie auch die Biokatalyse selbst begannen die ersten Versuche zur selektiven Oxyfunktionalisierung von α -Pinen zu Verbenol bzw. Verbenon mit der Suche nach Aktivität aus natürlichen Quellen. In submerser Zellkultur von *Picea abies*, der Gemeinen Fichte, wird α -Pinen in eine Zahl oxyfunktionalisierter Produkte, insbesondere Verbenol und Verbenon, umgewandelt [165]. Auch in der Umgebung von Nadelbäumen findet sich natürliche Aktivität. Durch Bereitstellung von α -Pinen in der Gasphase als einzige Kohlenstoffquelle konnten aus der Bodenprobe eines Nadelwaldes über 20 verschiedene Gram-positive Bakterienstämme isoliert werden. Besonders aktiv zeigte sich ein Stamm der Spezies *Nocardia*. Jedoch reagierten diese Zellen anders als Gram-negative Pseudomonaden empfindlich auf in der wässrigen Phase gelöstes α -Pinen [166]. Weitere Quellen natürlicher Aktivität sind Pilze wie *Pleurotus*

flabellatus [167], *Ganoderma applanatum* und *Pleurotus sabidus* [168], sowie *Hormonema* sp. [169], *Aspergillus niger* [170] oder *Chrysosporium pannorum* [171].

Obwohl die gesuchte Aktivität in allen Domänen des Lebens weit verbreitet scheint, ist in keiner der erwähnten Arbeiten ihre Herkunft, d.h. das für die Reaktion verantwortliche Enzym, identifiziert worden. Jedoch wurde durch Protein-Engineering bakterieller CYPs den Enzymen die Fähigkeit verliehen, α -Pinen selektiv zu hydroxylieren. Das natürliche Substrat von P450cam ist das mit dem (+)- α -Pinen strukturell verwandte Monoterpen (+)-Kampher. Durch rationales Proteindesign wurden Varianten des Enzyms erstellt, die (+)- α -Pinen selektiv zu (+)-*cis*-Verbenol hydroxylieren, aber auch wie im Falle der Variante Y96F L244A V247L das entstehende Verbenol weiter zu Verbenon (32 % Anteil im Produktspektrum) oxidieren [103].

Im Falle von P450-BM3 spielt das zentral über dem katalytischen Häm *b* gelegene Phenylalanin an Position 87 eine wichtige Rolle für die Erweiterung des Substratspektrums [32], da es das Eisen des katalytischen Häms für sperrige Moleküle verdeckt. Durch Einführen von kleineren Aminosäureresten an dieser Position konnte das Substratspektrum um α -Pinen erweitert werden [104]. Welcher Rest eingefügt wird, entscheidet auch über die Regioselektivität der Reaktion, da der dort eingefügte Rest einen Verankerungseffekt für das Substrat in der insgesamt recht großgeschnittenen Bindetasche übernimmt [105]. Erste Hinweise auf einen Einfluss der Position 87 auf die Stereoselektivität bei der Bildung von *cis*- bzw. *trans*-Verbenol sind ersichtlich, wurden jedoch nicht genauer untersucht [104]. Auch der Einfluss anderer Reste auf die Selektivität ist noch nicht ausreichend bekannt. Durch Sättigungsmutagenese einer A74G-Variante an den Positionen TYR-51, PHE-87 und LEU-188 wurde eine Bibliothek erstellt, deren erfolgversprechenster Kandidat (Y51V/A74G/F87A/A111T/L188S) eine gute Verbindung aus Aktivität und Regioselektivität (59 % Verbenol im Falle von (+)- α -Pinen, 88 % bei (-)- α -Pinen) darstellt. Weiterhin wurde die durch rationales Proteindesign hergestellte Variante K69R/A74G/F87A/L188Q als vielversprechend eingestuft (62 % Verbenol im Falle von (+)- α -Pinen, 89 % bei (-)- α -Pinen), die hohe Aktivität bzgl. des Kofaktorverbrauchs aber unter den Vorbehalt der mangelbehafteten Bestimmung der Enzymkonzentration gestellt [104].

Eine weitere effektvolle Mutation ist der Austausch von ILE-401, das direkt neben dem Häm-Liganden CYS-400 liegt, durch ein Prolin. Als Konsequenz der Mutation wird die Struktur der P450-BM3 durch die geringe Flexibilität des Prolins insoweit beeinflusst, dass dadurch die Aktivität erhöht wird. Auf diese Weise wurde bereits der ansonsten inaktive P450-BM3-Wildtyp durch diese eine Mutation aktiviert, die Oxidation von (+)- α -Pinen zu katalysieren [172]. Die Mutation bewirkte, dass bis zu 50 % des vorhandenen Enzyms bereits im *high spin*-

Zustand vorlag, ohne dass Substrat gebunden war. Hier wurde vermutet, dass die I401P-Mutation die Struktur von vornherein in eine Konformation bringt, die sonst erst durch Bindung des Substrats erreicht wird und so die Produktbildungsrate steigt. Gleichzeitig wurde dadurch auch die NADPH-Verbrauchsrate in Abwesenheit von Substrat erhöht.

Um das Problem der Kofaktorbereitstellung und der Enzymstabilität zu adressieren, wurde die Übertragung des Systems in einen Ganzzellkatalysator angestrebt. Dabei sind eine konstante, hohe und selektive Aktivität der Enzyme sowie der Massentransfer über die Zellmembran Schlüsselparameter für eine erfolgreiche Umsetzung [173]. Neben den bereits erwähnten Transportproteinen ist die Permeabilisierung der Zellmembran eine Strategie für eine Erhöhung des Massentransfers. Zu diesen Zweck wurden für *E. coli* Lösemittel wie Toluol oder Hexan, Tenside wie Triton X-100, CTAB oder Tween 20 sowie der Chelatbildner EDTA erfolgreich eingesetzt [148, 174, 175]. In einer Studie zur Permeabilisierung der Zellmembran von *P. putida* wurde versucht, diese Erkenntnisse zu übertragen, jedoch verursachte lediglich die Zugabe von EDTA eine geringfügige Verbesserung des Umsatzes [176]. Neben den erwähnten Stoffklassen wurde zuletzt auch ein Peptid-Antibiotikum namens Polymyxin B sehr erfolgreich zur Permeabilisierung von *E. coli* getestet [148].

Als Bezugspunkt für diese Arbeit dient eine Biotransformation von α -Pinen mit rekombinantem *E. coli* BL21(DE3). Als katalysierendes Enzym wurde die Variante V26T/R47F/A74G/F87V/L188K von P450-BM3 über das pET-System in *E. coli* BL21(DE3) eingebracht und exprimiert. Für die Kofaktorregeneration wurde eine Glukosedehydrogenase in Kombination mit einem Faszillitator für die Einschleusung von unphosphorylierter Glukose in die Zelle koexprimiert. Der Prozess basierte auf einem Zweiphasensystem aus wässriger Phase und Substratphase und erzielte im Wesentlichen Pinenepoxid mit 20 mg/g_{cdw} bei einer Zellkonzentration von 4,5 g_{cdw} L⁻¹ [54].

1.8 Ziel der Arbeit

Die Etablierung eines biokatalytischen Prozesses ist eine wiederkehrende Folge von Schritten und Fragestellungen (*biocatalysis cycle*), welche die beteiligten Enzyme, im Falle der Ganzzellumsetzung die Zellen des eingesetzten Stammes und den Prozess selbst umfassen [16]. Durch systematische Bearbeitung dieser drei Themengebiete sollen am Beispiel der selektiven Oxyfunktionalisierung des Monoterpens α -Pinen durch einen Ganzzellkatalysator Fragestellungen bei der Etablierung einer Biotransformation zur Hydroxylierung hydrophober Moleküle durch CYPs adressiert und Lösungen erarbeitet werden, die sich zum Teil auch auf andere hydrophobe Substrate übertragen lassen.

Bei der Suche nach einem geeigneten Enzym wurden schon einige Vorleistungen erbracht.

Im Falle von P450-BM3 ist jedoch trotz umfassender Arbeit noch Raum für weitere Studien zur Verbesserung der Selektivität. Vor allem die Stereoselektivität bei der Bildung von *cis*- bzw. *trans*-Verbenol soll durch die Herstellung neuer Varianten und deren Charakterisierung deutlicher beleuchtet und die Leistungsfähigkeit der Varianten mit bereits bekannten Varianten verglichen werden. Um katalytische Schwächen der P450-BM3 bei der selektiven Herstellung von Verbenon bzw. diastereomerenreinem Verbenol zu beseitigen, sollen Alkoholdehydrogenasen auf Aktivität und Selektivität (*S*- oder *R*-selektiv) getestet werden. Auf diese Weise soll eine Kaskade aus P450-BM3 und Alkoholdehydrogenase etabliert werden, in die modular Kombinationen von Enzymen mit den benötigten Selektivitäten eingefügt werden, um das gewünschte Produkt zu erhalten (Abb. 1.13).

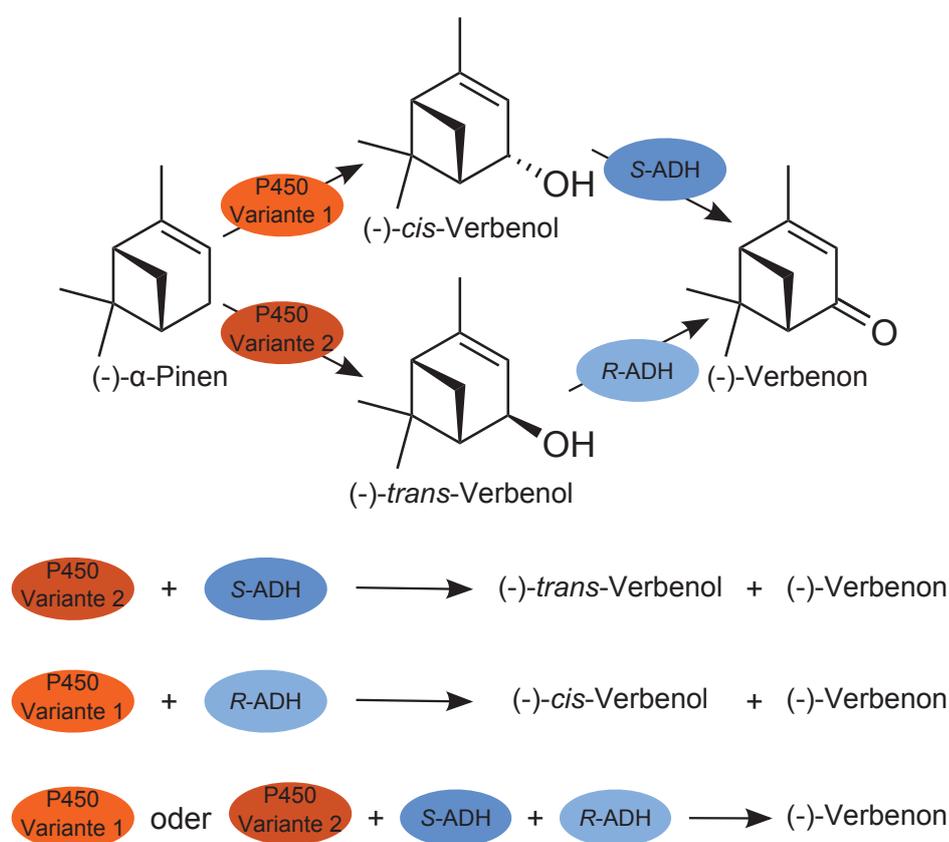


Abbildung 1.13: Modulare Anwendung von P450-Varianten und selektiven ADHs - Je nach gewünschtem Produkt sollen Kombinationen von P450-BM3-Varianten und selektiven Alkoholdehydrogenasen zu diastereomerenreinem Verbenol oder zu Verbenon führen.

Nach Screening, Protein-Engineering und Charakterisierung *in vitro* soll die Übertragung in das Ganzellsystem bewerkstelligt werden. Dafür sollen unterschiedliche *broad host range*-Expressionssysteme eingesetzt und ihre Leistung verglichen werden. Exemplarisch werden je zwei Stämme der Spezies *E. coli* und zwei der Spezies *P. putida* auf Expression und Umsetzungsleistung getestet. Durch Koexpression von kofaktorregenerierenden Enzymen

soll nachgeprüft werden, ob neben der zelleigenen Regenerationsleistung weitere Regeneration benötigt wird. Das vielversprechendste System soll schließlich im Kolben auf seine quantitative Umsatzleistung überprüft und eine Übertragung in den Fermentationsmaßstab durchgeführt werden. Da nach bisherigem Wissensstand ausschließlich eukaryotische Biokatalysatoren für die Oxidation von α -Pinen zu Verbenol und Verbenon beschrieben wurden, soll damit erstmalig ein bakterieller Biokatalysator geschaffen werden und so die gut charakterisierten Expressions- und Kultivierungseigenschaften bekannter Prokaryoten für die Biotransformation von α -Pinen zugänglich gemacht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Enzyme und Kits

Die authentischen Standards (-)- α -Pinenepoxid, (1S)-*cis*-Verbenol, (1S)-(-)-Verbenon, (1R)-(-)-Myrtenol und (1R)-(-)-Carvon (interner Standard) sowie die Substrate (-)- α -Pinen, (+)- α -Pinen und racemisches α -Pinen wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, GER) bezogen und besaßen alle eine Reinheit von ≥ 95 %.

NADPH stammte von Carbosynth (Compton/Berkshire, UK). NADP⁺, NAD⁺ und NADH wurde von GERBU Biotechnik (Heidelberg, GER) bezogen. Die Kosubstrate für die Alkoholdehydrogenasen kamen von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, GER), VWR (Darmstadt, GER), Merck (Darmstadt, GER), Alfa Aesar (Karlsruhe, GER), TCI (Eschborn, GER) oder Grüssing (Filsum, GER) und besaßen alle eine Reinheit von ≥ 97 %. Die Bestandteile von Medien und Puffern, Antibiotika, Polymyxin B-Sulfat und Rhamnose-Monohydrat wurden von Carl Roth (Karlsruhe, GER) bezogen.

Die im Minimalmedium nach Wilms *et al.* [177] enthaltenen Bestandteile stammen von Carl Roth (Karlsruhe, GER), Sigma-Aldrich (Taufkirchen, GER), Alfa Aesar (Karlsruhe, GER), AppliChem (Darmstadt, GER), Grüssing (Filsum, GER), Fisher Scientific (Schwerte, GER) oder SERVA (Heidelberg, GER).

Enzyme, Puffer und Kits für molekularbiologische Arbeiten, d.h. Polymerasekettenreaktion (PCR), Restriktion und Ligation kamen von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA). Die Plasmidpräparation wurde mit dem Kit ZR Plasmid MiniprepTM - Classic von Zymo Research (Irvine, USA), die Elution von DNA aus Agarosegelen mit dem GeneJETTM Gel Extraction Kit von Thermo Fischer Scientific durchgeführt.

2.1.2 Puffer und Medien

50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5)

- Zwei Puffer mit den folgenden Konzentrationen wurden getrennt angesetzt (ergibt 100 mM Lösung): 13,6 g L⁻¹ KH₂PO₄, sowie 22,8 g L⁻¹ K₂HPO₄ · 3 H₂O

- Beide Puffer wurden bis zu einem pH von 7,5 gemischt (nach Henderson-Hasselbalch im Verhältnis von K_2HPO_4 zu KH_2PO_4 von 84:16)
- Der Puffer wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert
- Zur Benutzung wurde der Puffer mit ddH_2O im Verhältnis 1:2 verdünnt

Puffer für die Agarosegelelektrophorese

Tabelle 2.1: 5x DNA-Probenpuffer		Tabelle 2.2: 50x TAE-Puffer	
2 g	Saccharose	242 g	TRIS
10 mg	Orange G	7 mL	Essigsäure
100 mL	EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8)	100 mL	EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8)
ad 5 mL	ddH_2O	ad 1 L	ddH_2O

Puffer für kompetente *E. coli*

Tabelle 2.3: TfbI-Puffer		Tabelle 2.4: TfbII-Puffer	
0,59 g	KOAc	0,21 g	MOPS
2,42 g	RbCl	0,12 g	RbCl
0,29 g	$CaCl_2$	1,1 g	$CaCl_2$
2 g	$MnCl_2 \cdot 4 H_2O$	15 mL	87 % Glycerin
30 mL	87 % Glycerin	ad 100 mL	ddH_2O
ad 200 mL	ddH_2O	mit NaOH auf pH 6,5 eingestellt, steril filtriert	
mit Essigsäure auf pH 5.8 eingestellt, steril filtriert			

Puffer für elektrokompetente *P. putida*

Tabelle 2.5: 300 mM Saccharoselösung	
10,27 g	D-(+)-Saccharose
ad 100 mL	ddH_2O
steril filtriert	

Puffer für die Proteinreinigung auf einer Nickel-Nitrilotriessigsäure-Matrix (Ni-NTA)**Tabelle 2.6:** Bindepuffer

29 g	NaCl
ad 1 L	50 mM KP_i (pH 7,5)
filtriert, durch Unterdruck entgast	

Tabelle 2.7: Elutionspuffer

29 g	NaCl
34 g	Imidazol ($c_{\text{end}} = 500$ mM)
ad 1 L	50 mM KP_i (pH 7,5)
mit konz. HCl auf pH 7,5 eingestellt, filtriert, durch Unterdruck entgast	

Puffer für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**Tabelle 2.8:** Lower Tris Puffer

36,34 g	TRIS
0,8 g	SDS
ad 200 mL	ddH ₂ O
mit 37 %-iger HCl auf pH 8,8 eingestellt	

Tabelle 2.9: Upper Tris Puffer

6,06 g	TRIS
0,4 g	SDS
ad 100 mL	ddH ₂ O
mit 37 %-iger HCl auf pH 6,8 eingestellt	

Tabelle 2.10: 5x SDS-PAGE-Laufpuffer

30 g	TRIS
144 g	Glycin
10 g	SDS
ad 2 L	ddH ₂ O

Tabelle 2.11: 2x SDS-Probenpuffer

2 mL	TRIS-HCl (1 M, pH 6,8)
190 mg	MgCl ₂
0,8 g	SDS
2 mg	Bromphenolblau
0,6 g	Dithiothreitol
2 mL	87 % Glycerin
ad 20 mL	ddH ₂ O

Tabelle 2.12: SDS-Gel-Färbelösung

300 mL	Methanol
100 mL	Essigsäure
2,5 g	Coomassie Brilliant Blue
ad 1 L	ddH ₂ O

Tabelle 2.13: SDS-Gel-Entfärbelösung

300 mL	Methanol
100 mL	Essigsäure
ad 1 L	ddH ₂ O

Medien

Tabelle 2.14: Lysogenic broth (LB) Medium		Tabelle 2.15: Terrific broth (TB) Medium	
Hefeextrakt	5 g L ⁻¹	Hefeextrakt	24 g
Pepton	10 g L ⁻¹	Pepton	12 g
NaCl	5 g L ⁻¹	Glycerin	4 mL
ddH ₂ O	ad 1 L	ddH ₂ O	ad 900 mL
für die Herstellung von Agar:		autoklaviert und vor Benutzung 100 mL	
Agar	16 g L ⁻¹	10x KP _i -Puffer (Tab. 2.17) steril hinzugefügt	
vor Benutzung autoklaviert			
Tabelle 2.16: CV2-Medium		Tabelle 2.17: 10x KP_i-Puffer für TB-Medium	
50 mM KP _i -Puffer (pH 7,5)		0,17 M KH ₂ PO ₄	
2 % (v/v) Glycerin		0,72 M K ₂ HPO ₄	
0,2 % (w/v) Rhamnose		vor Benutzung autoklaviert	
30 µg mL ⁻¹ Kanamycin-Sulfat			
bei Koexpression von pSEVA-Plasmiden:			
50 µg mL ⁻¹ Streptomycin für <i>E. coli</i>			
100 µg mL ⁻¹ Streptomycin für <i>P. putida</i>			
vor Benutzung steril filtriert			

2.1.3 Stämme

Für die vorliegende Arbeit wurden die in Tab. 2.18 aufgelisteten Stämme verwendet.

Tabelle 2.18: Für die vorliegende Arbeit genutzte Stämme		
Stamm	Anbieter	Genotyp
<i>E. coli</i> DH5α	Invitrogen (Carlsbad, USA)	F- Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ-
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Invitrogen	F-ompT hsdSB (rB-, mB-) gal dcm (DE3)
<i>E. coli</i> BL21	Amersham Biosciences (Chalfont St. Giles, UK)	F- ompT hsdS (rB -, mB -) gal dcm
<i>E. coli</i> JM109	Promega (Madison, USA)	endA1 recA1 gyrA96 thi relA1 hsdR17(rk-, mk+) supE44 Δ(lac-proAB) [F' traD36, proAB, laqIqZΔM15]
<i>P. putida</i> KT2440	DSMZ (Nr.6125)	rmo- mod+
<i>P. putida</i> DSM12264	DSMZ (Nr.12264)	Wildtyp

2.1.4 Oligonukleotide

Primer für die ortsgerichtete Mutagenese von P450-BM3

Für die ortsgerichtete Mutagenese innerhalb der für P450-BM3 kodierenden Sequenzen (Abschnitt 2.4.1) wurden einander komplementäre, die gewünschte Mutation tragende Primer durch PCR in das Plasmid eingebaut (Tab. 2.19)

Tabelle 2.19: Primer für die ortsgerichtete Mutagenese von P450-BM3

Primer	Sequenz
BM3-A328I-fw	5' -GCGCTTATGGCCA ACTATT CCTGCGTTTTCCCTATATGC-3'
BM3-A328I-rv	5' -GCATATAGGGAAAACGCAGGA AAT AGTTGGCCATAAGCGC-3'
BM3-A328V-fw	5' -GCTTATGGCCA ACTGTT CCTGCGTTTTCCC-3'
BM3-A328V-rv	5' -GGGAAAACGCAGGA AAC AGTTGGCCATAAGC-3'
BM3-A264V-fw	5' -CAAATTATTACATTCTTAATT GTG GGACACGAAACAACAAG-3'
BM3-A264V-rv	5' -CTTGTTGTTTCGTGTCC CACA ATTAAGAATGTAATAATTTG-3'

Das für die einzubringende Mutation verantwortliche Kodon ist in **fett** dargestellt.

Primer für die Klonierung

Für die Klonierung wurden Primer mit geeigneten Schnittstellen (Tab. 2.20) genutzt, um die zu klonierenden Gene vom Originalmaterial durch PCR zu vermehren. Die Schnittstellen sind im jeweiligen Namen der Primer enthalten. Die Sequenz der Schnittstelle ist innerhalb der Primersequenz in fett gedruckt.

Tabelle 2.20: Primer für die Klonierung

Primer	Sequenz
<i>gre2syn</i> -NdeI-fw	5' -AATT CATATG TCCGTGTTTGTAGCG-3'
<i>gre2syn</i> -SallI-rv	5' -TTTT GTCGAC TAAATCCGTCCTTCGAATTTTC-3'
<i>cyp102a1</i> -KpnI-fw	5' -CGCATAT GGTACC ATGACAATTAAAG-3'
<i>cyp102a1</i> -XbaI-rv	5' -CAGTG TCTAGA TTACCCAGCCCACAC-3'
<i>cyp102a1</i> -XbaI-fw	5' -CCAG TCTAGA AATGACAATTAAAGAAATGC-3'
<i>cyp102a1</i> -BsrGI-rv	5' -CAGTG TGTACA TTACCCAGCCCACAC-3'

Primer für die Sequenzierung

Sequenzierungen von Plasmiden aus fremden Quellen, nach Klonierung oder ortsgerichteter Mutagenese wurden bei den Firmen GATC Biotech (Konstanz, GER) oder MWG Operon (Ebersberg, GER) in Auftrag gegeben und dafür folgende Primer verwendet (Tab. 2.21).

Tabelle 2.21: Primer für die Sequenzierung

Primer	Sequenz
Primer für die Sequenzierung aus pET28-a(+) in die MCS	
T7	5' -TAATACGACTCACTATAGGG-3'
T7 term bzw. pET-RP	5' -CTAGTTATTGCTCAGCGG-3'
Primer für die Sequenzierung innerhalb des <i>cyp102a1</i>-Gens	
R2	5' -GGAAAAGATCCAGAAACGG-3'
R4	5' -ATTTGCACCGCAGGTCGCAA-3'
R6	5' -TCGCGCAATGGCTGCTAAA-3'
Primer für die Sequenzierung aus dem <i>cyp102a1</i>-Gen in den Vektor	
L0	5' -CGTGATTCATCGCATGCTTC-3'
R8	5' -GATTGAACTTCTTGATCAAGG-3'

2.1.5 Plasmide

P450-BM3-Varianten (Abschnitt 3.1)

Für eine große Zahl von P450-BM3-Varianten konnte auf Plasmide aus der Institutsbibliothek zurückgegriffen werden, andere Varianten wurden jedoch durch ortsgerichtete Mutagenese (Abschnitt 2.4.1) hergestellt (Tab. 2.22).

Tabelle 2.22: pET-28a(+)-Expressionsplasmide der Varianten von P450-BM3

Plasmid	P450-BM3-Variante	Erwähnung in Abschnitt	Referenz/ Abschnitt
pET-28a(+>:: <i>cyp102a1-a</i>	F87A	3.1.1, 3.1.4	[64]
pET-28a(+>:: <i>cyp102a1-aqcrqg</i>	K69R/A74G/F87A/L188Q/R471C	3.1.1	[104]
pET-28a(+>:: <i>cyp102a1-atscvg</i>	Y51V/A74G/F87A/A111T/L188S/R471C	3.1.1	[104]
pET-28a(+>:: <i>cyp102a1-ai</i>	F87A/A328I	3.1.2	[77]
pET-28a(+>:: <i>cyp102a1-aip</i>	F87A/A328I/I401P	3.1.2	[49]
pET-28a(+>:: <i>cyp102a1-aiplf</i>	R47L/Y51F/F87A/A328I/I401P	3.1.2	[49]
pET-28a(+>:: <i>cyp102a1-g</i>	F87G	3.1.4	[64]
pET-28a(+>:: <i>cyp102a1-g-v</i>	F87G/A328V	3.1.4	2.4.1
pET-28a(+>:: <i>cyp102a1-a-v</i>	F87A/A328V	3.1.4	2.4.1
pET-28a(+>:: <i>cyp102a1-v-v</i>	F87V/A328V	3.1.4	[77]
pET-28a(+>:: <i>cyp102a1-g-i</i>	F87G/A328I	3.1.4	2.4.1
pET-28a(+>:: <i>cyp102a1-av</i>	F87A/A264V	3.1.4	2.4.1
pET-28a(+>:: <i>cyp102a1-avi</i>	F87A/A264V/A328I	3.1.4	2.4.1
pET-28a(+>:: <i>cyp102a1-gv</i>	F87G/A264V	3.1.4	2.4.1

Die Sequenz des *cyp102a1*-Gens sowie die korrekte Insertion von Mutationen wurde durch Sequenzierung mit den Primern T7, T7 term, R2, R4 und R6 (Tab. 2.21) überprüft. Für die Expression in *E. coli* BL21(DE3) wurde der pET-28a(+)-Vektor (Tab. 2.23) der Fa. Merck (Darmstadt, GER) verwendet. Das *cyp102a1*-Gen war in allen Fällen zwischen den Schnittstellen BamHI und EcoRI in das Plasmid eingefügt. Die Wahl der BamHI-Schnittstelle führte zur N-terminalen Expression eines His₆-tags. Die Plasmide, die aus der Arbeit von Michael Budde [104] stammten und die Gene für die Varianten *cyp102a1-atscvg* oder *cyp102a1-aqcrq* trugen, besaßen als Besonderheit eine Deletion am Ende ihrer Sequenz, wie in einem Sequenzvergleich mit der Sequenz des wildtypischen *cyp102a1*-Gens (GenBank: J04832.1) gezeigt (siehe unten). Diese vermutlich über Primer eingebrachte Deletion führte zur Überbrückung des Stopp-Codons, so dass zusätzlich zu den oben beschriebenen N-terminalen Tags auch ein C-terminaler His₆-tag exprimiert wurde.

```
pET-28a (+) ::bm3-atscvg      . . . . AAAGACGTGTGGGCTGG-TAA . . . .
                               | | | | | | | | | | | | | | | | | |
GenBank : J04832                4670 AAAGACGTGTGGGCTGGGTAA 4690
```

Alkoholdehydrogenasen (Abschnitt 3.2)

Plasmide für die Expression der Alkoholdehydrogenasen wurden durch Kooperationspartner bereitgestellt oder in Abschlussarbeiten bzw. in dieser Arbeit hergestellt (Tab. 2.23).

Tabelle 2.23: Plasmide für die Expression von Alkoholdehydrogenasen

Plasmid	Eigenschaften	Resistenz	Herkunft/Referenz
pET-28a(+)	pBR322 ori, PT7 <i>lac</i> , rbs, T7 _{term} , lacI, optional His ₆	Kan ^R	Merck
pET-28a(+): <i>ppdadh1</i>	kloniert mit NdeI/XhoI	Kan ^R	} Prof. Hummel (HHU Düsseldorf) [178]
pET-28a(+): <i>3α-hsdh</i>	kloniert mit NdeI/XhoI	Kan ^R	
pET-28a(+): <i>adh88</i>	<i>vertraulich</i>	Kan ^R	
pEX-K4:: <i>gre2syn</i>	pUC ori, <i>Plac</i> , lacI, <i>gre2syn</i>	Kan ^R	eurofins Genomics
pET-28a(+): <i>gre2syn</i>	kloniert mit NdeI/Sall	Kan ^R	Abschnitt 2.4.2

Die Plasmide wurden auf korrekte Insertion des Gens und Sequenzidentität über die gesamte Länge des Gens mit den Primern T7 und T7 term (pET-28a(+):*ppdadh1*) bzw. dem Primer T7 (alle anderen) überprüft. Durch die gewählten Schnittstellen wurden alle Enzyme mit N-terminalem His₆-tag exprimiert. In der in dieser Arbeit genutzten Sequenz des *3α-hsdh*-Gens wurde im Vergleich zu der in der GenBank hinterlegten Sequenz eine Punktmutation gefunden. Diese ist jedoch still und hat keine Auswirkung auf die Aminosäuresequenz.

```

pET28-a (+) :: 3ahsdh  .. CACCGGCATTGGTGCGGCTACGCGCAAGGTC  ..
                |||
GenBank:AF092031    20 CACCGGCATTGGTGCCGCTACGCGCAAGGTC  60

```

broad host range-Vektoren (Abschnitt 3.3 & 3.4)

Die Expression von Enzymen in *E. coli* und *P. putida* für die Biotransformation wurde mit Vektoren durchgeführt (Tab. 2.24), deren Promotoren (*lacI^q/Ptac* bzw. *rhaR rhaS rhaP_{BAD}*) in allen zu testenden Stämmen gleichermaßen funktionell sind.

Tabelle 2.24: *broad host range*-Vektoren für die Expression in Ganzzellbiokatalysatoren

Plasmid	Eigenschaften	Resistenz	Referenz
p4782.1::cyp102a1	pBR322, <i>rhaR rhaS rhaP_{BAD}</i> , <i>mob</i>	Kan ^R	[179]
p4782.1::cyp102a1-atscvg	Karte siehe Appendix 6.6.2	Kan ^R	Abschnitt 2.4.2
pVLT33	IncQ, <i>lacI^q/Ptac</i> , <i>mob</i>	Kan ^R	[180]
pVLT33::cyp102a1-atscvg	Karte siehe Appendix 6.6.3	Kan ^R	Abschnitt 2.4.2
pJeM1a	pBR322, <i>rhaR rhaS rhaP_{BAD}</i> , <i>mob</i>	Kan ^R	[154]
pJeM1a::cyp101a1-fala	Karte siehe Appendix 6.6.4	Kan ^R	[181]
pSEVA42rha	RK2, <i>rhaR rhaS rhaP_{BAD}</i>	Sm ^R /Sp ^R	[154]
pSEVA42rha::gldA	Karte siehe Appendix 6.6.5	Sm ^R /Sp ^R	[181]
pSEVA46rha	p15A, <i>rhaR rhaS rhaP_{BAD}</i>	Sm ^R /Sp ^R	[181]
pSEVA46rha::gldA	Karte siehe Appendix 6.6.6	Sm ^R /Sp ^R	[181]
pSEVA4Xrha	CDF, <i>rhaR rhaS rhaP_{BAD}</i>	Sm ^R /Sp ^R	[181]
pSEVA4Xrha::3α-hsdh	Karte siehe Appendix 6.6.7	Sm ^R /Sp ^R	[181]

2.2 Analytik

2.2.1 Agarosegel-Elektrophorese

Konzentrationsbestimmung von DNA

1-2 µL DNA wurden mit 1 µL 5x DNA-Probenpuffer (Tab.2.1) versetzt und auf 5 µL mit ddH₂O aufgefüllt. Als Größenstandard wurden 3 µL GeneRuler™ 1kb DNA Ladder Plus der Fa. Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) parallel zu den Proben aufgetragen. Durch Anlegen einer Spannung von 120 Volt für 35 Minuten wurde die DNA der Größe nach aufgetrennt. Die DNA wurde durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht. Für die Dokumentation wurde eine G:BOX der Fa. Syngene (Cambridge, UK) verwendet. Hier

wurde die DNA mit UV-Licht bestrahlt, die Lumineszenz durch eine Kamera dokumentiert und durch die GeneTools-Software die Intensität der Lumineszenz und die Größe der zu bestimmenden DNA-Bande mit denen der Banden des DNA-Größenstandards verglichen.

Präparative Aufreinigung von DNA

Für die präparative Aufreinigung wurde die DNA in einem 0,8 %-igem Agarosegel, wie oben beschrieben, der Größe nach aufgetrennt. Der 5x DNA-Probenpuffer wurde in der aufzureinigenden DNA-Lösung fünffach verdünnt und der Ansatz auf das Gel neben 6 μL GeneRuler™ 1kb DNA Ladder Plus als Standard aufgetragen. Für die Trennung wurden auch hier 120 Volt angelegt, jedoch die Zeit auf 45 Minuten verlängert. Die Reinigung aus dem Gel wurde gemäß den Herstelleranweisungen mit dem GeneJET™ Gel Extraction Kit der Fa. Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) durchgeführt, die DNA final allerdings mit ddH₂O eluiert.

2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der unspezifischen Proteinkonzentration wurde nach den Prinzipien von Bradford [182] durchgeführt. Dazu wurden in einer Mikrotiterplatte Verdünnungen von den zu bestimmenden Proteinlösungen hergestellt und gemäß den Herstellerangaben mit RotiQuant®-Lösung der Fa. Carl Roth (Karlsruhe, GER) gemischt und inkubiert. Dann wurde die Absorption bei 595 nm mit einem Infinite M200 Plattenreader der Fa. Tecan (Männedorf, CH) gemessen. Die Konzentrationen wurden rechnerisch durch Vergleich mit einem Standard von Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen (0-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) von BSA bestimmt. Die Messungen wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt.

2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde nach den Prinzipien von Laemmli [183] durchgeführt. Das im Probenpuffer vorhandene SDS denaturierte die in der Probe enthaltenen Proteine und belud sie proportional zu ihrer Größe mit negativen Ladungen. In den Gelen wurden die Proben durch ein elektrisches Feld in Richtung der Anode bewegend zuerst durch ein Sammelgel (Tab. 2.25) aufkonzentriert und im Anschluss in einem Trenngel (Tab. 2.26) nach Größe getrennt. Die Konzentration proteinhaltiger Lösungen wurde, wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, bestimmt und auf 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ eingestellt. Dann wurde des gleiche Volumen 2x SDS-Probenpuffer (erhalten aus Verdünnung des 5x SDS-Probenpuffers aus Tab. 2.11 mit ddH₂O) hinzugegeben, so dass eine finale Konzentration von 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ bestand.

Tabelle 2.25: SDS-Sammelgel (4 %)		Tabelle 2.26: SDS-Trenngel (12,5 %)	
1 mL	Upper Tris Puffer (Tab. 2.9)	2 mL	Lower Tris Puffer (Tab. 2.8)
2,47 mL	ddH ₂ O	2,67 mL	ddH ₂ O
0,52 mL	Rotiphorese [®] Gel 30*	3,33 mL	Rotiphorese [®] Gel 30*
40 µL	APS (10 %)	40 µL	APS (10 %)
4 µL	TEMED*	4 µL	TEMED*

*bezogen von Carl Roth (Karlsruhe, GER)

Um ganze Zellen zu beproben, wurde die OD_{600nm} der Kultur bestimmt, und dann ein Probevolumen nach Formel 2.1 bestimmt und abgenommen:

$$Volumen = \frac{0,25}{OD_{600nm}} \cdot 1 \text{ mL} \quad (2.1)$$

Das Probevolumen wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt und zentrifugiert (2 Minuten, Raumtemperatur). Das Pellet wurde in 50 µL 1x SDS-Probenpuffer (erhalten aus Verdünnung des 5x SDS-Probenpuffers, Tab. 2.11) aufgenommen. Die Proben wurden 10 Minuten bei 95 °C inkubiert und im Anschluss auftretendes Kondenswasser kurz herunter zentrifugiert. Dann wurden 5-10 µg Protein auf das Sammelgel geladen. Als Größenstandard wurden 8 µL PageRuler Unstained Protein Ladder der Fa. Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) benutzt. Die Elektrophorese wurde in 1x SDS-PAGE-Laufpuffer (Tab. 2.10) für 15 Minuten bei 10 mA pro Gel durchgeführt, so dass die Proben in das Sammelgel eingewandert waren. Im Anschluss wurde auf 25 mA pro Gel erhöht und die Proben für 45 Minuten im Trenngel aufgetrennt. Die Gele wurden mindestens für 2 Stunden mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt (Tab. 2.12), bevor über Nacht entfärbt wurde (Tab. 2.13).

2.2.4 Bestimmung der P450-Konzentration

Für die Bestimmung der Konzentration von P450 in Lösung wurde ein CO-Differenzspektrum nach Omura und Sato [33, 184] aufgenommen. Dafür wurden die Lösungen ggf. mit 50 mM KP_i-Puffer (pH 7,5) verdünnt. Zwei Proben á 990 µL wurden in Küvetten gefüllt und die beiden Küvetten in den beiden Strahlengänge des Zweistrahlphotometers Lambda 35 der Fa. PerkinElmer (Waltham, USA) plaziert. Um ein Nullspektrum zu erhalten, wurden die Spektren der beiden bisher identischen Proben zwischen 400 und 500 nm vermessen und durch Subtraktion eine Nulllinie erstellt. Dann wurde eine Probe etwa 30 Sekunden mit Kohlenmonoxid (bezogen von Air Liquide, FRA) in einer Frequenz von 1-2 Blasen pro Sekunde begast. Im Anschluss wurden beide, Probe und unbegaste Referenz, mit 10 µL 1 mM Natriumdithionit reduziert und minütlich, fünf Mal in Folge wurde ein Differenzspektrum zwischen 400 und 500 nm aufgenommen. Die Proben

wurden als Dreifachbestimmung gemessen. Mit der Absorptionsdifferenz zwischen 450 und 490 nm ($\Delta_{450-490}$) und dem molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{450-490}$ wurde die Konzentration nach Formel 2.2 berechnet:

$$c_{P450} = \frac{\Delta_{450-490}}{\epsilon_{450-490} \cdot d} \cdot VF \quad (2.2)$$

c_{P450} : Konzentration von P450-Monooxygenasen

$\Delta_{450-490}$: Absorptionsdifferenz zwischen 450 und 490 nm

VF: Verdünnungsfaktor

$\epsilon_{450-490}$: molaren Extinktionskoeffizienten ($91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

d: optische Länge des Strahlenganges in der Küvette (1 cm)

2.2.5 Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC/MS)

Zur Analyse von Umsetzungen durch GC/MS wurde eine 1 mL Probe mit 10 μL einer 10 mM Lösung von (-)-Carvon in DMSO als internen Standard versetzt und dann mit 400 μL Ethylacetat durch Schütteln über mindestens eine Minute extrahiert und ggf. über Magnesiumsulfat getrocknet. Die Ethylacetatextraktionen wurden auf das Gerät GC/MS-QP2010 der Fa. Shimadzu (Tokyo, JPN) eingespritzt, ein Gaschromatograph, der zur Detektion mit einem Quadrupolmassenspektrometer gekoppelt ist. Für die chromatographische Trennung standen zwei unterschiedliche Säulen zur Verfügung. Die Quantifizierung der Produkte und Bestimmung der Regioselektivität wurde mit einer achiralen stationären Phase durchgeführt, für die Bestimmung der Stereoselektivität, insbesondere zur Berechnung von Diastereomerenüberschüssen, wurde eine chirale stationäre Phase genutzt.

GC/MS mit achiraler stationärer Phase

Für die gaschromatographische Trennung mittels einer achiralen stationären Phase wurde die Säule FS-Supreme-5ms der Fa. Chromatographie Service GmbH (Langerwehe, GER) mit den Dimensionen $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \mu\text{m}$ und mit 5 % Phenylpolysilphenylen als Trennphase eingesetzt. Die Proben wurden bei $250 \text{ }^\circ\text{C}$ verdampft und durch einen Heliumgasstrom mit 30 cm sec^{-1} auf die Säule gebracht. Das Temperaturprogramm begann bei $90 \text{ }^\circ\text{C}$ für 5 Minuten, wurde dann mit $15 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ auf $145 \text{ }^\circ\text{C}$ gebracht, wo die Temperatur für 2 Minuten gehalten wurde. Danach wurde die Temperatur weiter mit $50 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ auf $300 \text{ }^\circ\text{C}$ erhöht und wieder für eine Minute gehalten. Substrat- und Produktpeaks der (-)- α -Pinenoxidation konnten durch Vergleich mit chemischen Standards identifiziert werden. (-)-*trans*-Verbenol wurde durch Vergleich der Massenfragmentierungsmuster mit dem Muster von (-)-*cis*-Verbenol, welches als Standard erhältlich war, identifiziert (Abb. 2.1).

NIST-Eintrag Verbenol

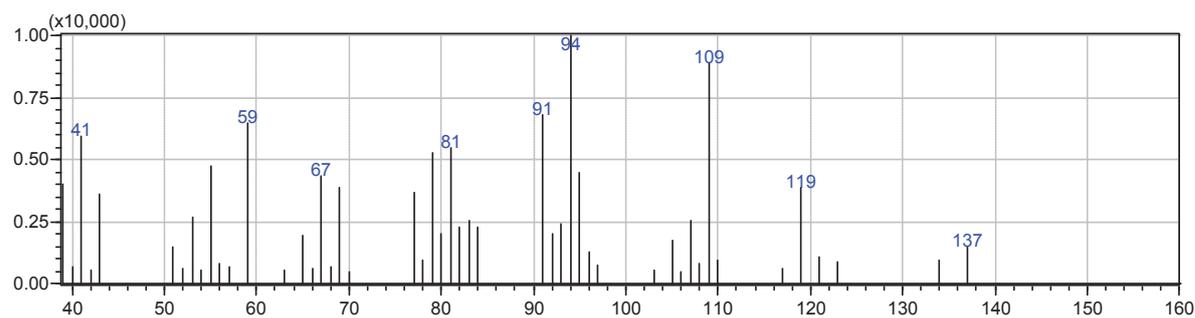
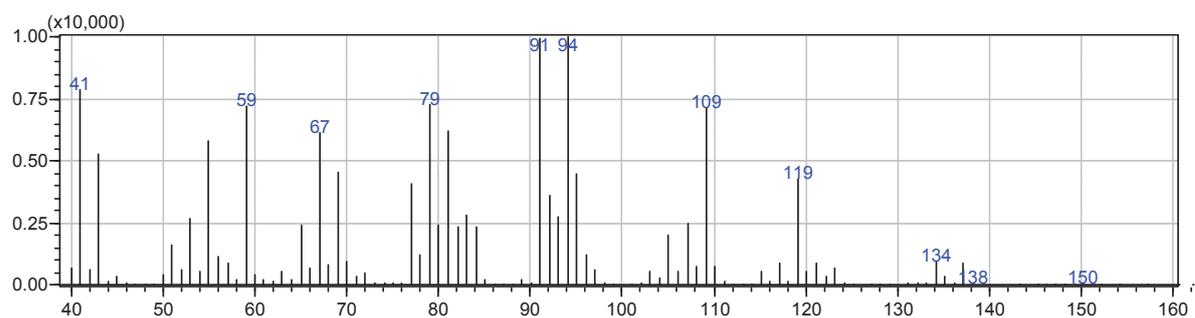
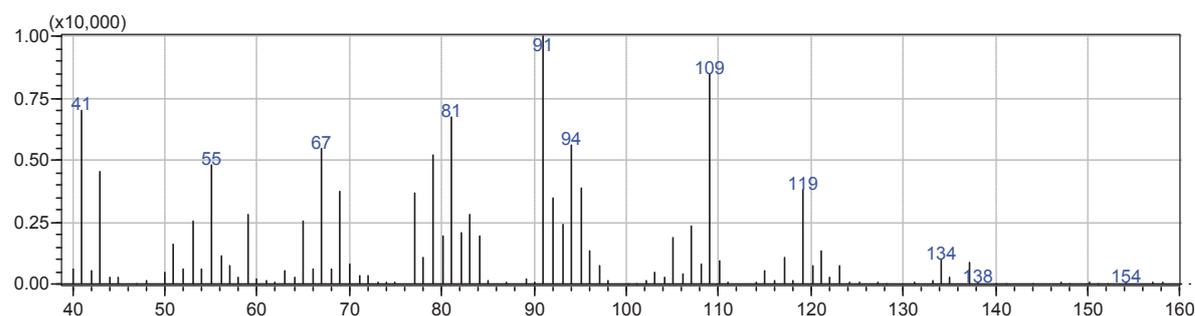
Fragmentierungsmuster *cis*-VerbenolFragmentierungsmuster *trans*-Verbenol

Abbildung 2.1: Fragmentierungsmuster von Verbenol - Die Fragmentierungsmuster (hier nur der m/z -Bereich zwischen 40 und 160 dargestellt) beider Verbenoldiastereomere konnten von der NIST-Datenbank durch Vergleich mit einem Muster aus der Bibliothek als Verbenol identifiziert werden. Während die Fragmentierungsmuster der Enantiomere (z.B. (-)-*cis*- und (+)-*cis*-Verbenol) hohe Ähnlichkeit aufweisen (hier nur ein Enantiomer gezeigt), sind beim Vergleich zweier Diastereomere (z.B. (-)-*cis*- und (-)-*trans*-Verbenol) Unterschiede zu erkennen.

Da die Produkte der (+)- α -Pinenoxidation nicht als Standards erhältlich waren, wurden sie durch Vergleich ihrer Verweilzeiten mit denen ihrer Enantiomere identifiziert. Die Quantifizierung wurde anhand einer Kalibrierung durchgeführt, die durch Vermessung definierter Konzentrationen der chemischen Standards erstellt wurde. Dafür wurden, zusätzlich zum Scan über den m/z -Bereich von 40-250, die m/z -Werte charakteristischer Produktfragmente im SIM Modus vermessen (*fast automated scan/sim mode*), die Peakflächen dieser Fragmente bestimmt und für die Kalibrierung die ermittelten Peakflächen im Verhältnis zu Peakflächen von charakteristischen Fragmenten des internen Standards gesetzt.

GC/MS mit chiraler stationärer Phase

Obwohl Diastereomere theoretisch auch mittels achiraler stationärer Phase gaschromatographisch getrennt werden, wurde der hohe Aufwand zur Basislinientrennung von *cis*- und *trans*-Verbenol vermieden, indem die Proben zusätzlich mittels chiraler stationärer Phase analysiert wurden. Hierfür wurde zur Trennung eine FS-CYCLODEX beta-I/P-Säule der Fa. Chromatographie Service GmbH (Langerwehe, GER; Länge: 50 m, Innerer Durchmesser: 0,25 mm, äußerer Durchmesser: 0,36 mm) und mit Permethy- β -Cyclodextrin als Trennphase eingesetzt. Die Proben wurden bei 200 °C verdampft und durch einen Heliumgasstrom mit 30 cm sec⁻¹ auf die Säule gebracht. Das Temperaturprogramm begann bei 120 °C für 5 Minuten, wurde dann mit 2 °C min⁻¹ auf 150 °C gebracht und im Anschluss weiter mit 10 °C min⁻¹ bis auf 200 °C. Die Peaks wurden durch Vergleich ihrer Massenfragmentierungsmuster mit der NIST 08-Massenspektrenbibliothek (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, USA) identifiziert. Diastereomere konnten durch Vergleich ihrer Peakfläche mit den Peaks aus der zuvor durchgeführten gaschromatographischen Trennung mittels der achiralen stationären Phase zweifelsfrei identifiziert werden (s. Appendix 6.3). Zur Bestimmung von Diastereomerenüberschüssen wurden die Peakflächen ermittelt und nach Formel 2.3 berechnet.

$$de = \frac{|A_1 - A_2|}{A_1 + A_2} \quad (2.3)$$

de: Diastereomerenüberschuss

A_1 : Peakfläche von einem Diastereomer

A_2 : Peakfläche von anderem Diastereomer

2.3 Bioinformatische Methoden

2.3.1 Modellierung des Substratzugangskanals von P450-BM3

Für die Bestimmung der für die Formung des Substratzugangskanals relevanten Aminosäuren wurde eine Struktur der BMO von P450-BM3 mit hoher Auflösung (pdb-identifiziert 2IJ2 [185], Auflösung von 1,2 Å) aus der RCSB Protein Data Bank (www.rcsb.org) in die PyMOL Software (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.4.1-3) der Fa. Schrödinger LLC (New York, USA) importiert. Da die Struktur als Dimer vorliegt, wurde eine Monomer entfernt. Für das verbliebene Monomer wurde das Plugin CAVER (Version 3.0.1) [186] genutzt, um fünf optionale Tunnel vom Bereich oberhalb des im katalytischen Häm gelegenen Eisens (Koordinaten: $x=47,862$, $y=25,813$, $z=34,889$) an die Oberfläche zu berechnen. Die an der Formung dieser Tunnel beteiligten Aminosäuren wurden durch die Software in Form einer Liste ausgegeben (*analysis/residues.txt*). Um den tatsächlichen

Substratzugangskanal aus diesen fünf Optionen zu wählen, wurden literaturbasierte Kenntnisse bei der Entscheidungsfindung angewandt. So wurde durch Kristallisation von P450-BM3 mit gebundener Palmitoleinsäure gezeigt, dass zwei polare Aminosäurereste, welche am Eingang des Substratzugangskanals liegen, die Carboxygruppe der Fettsäure koordinieren [32]. Diese beiden Aminosäurereste, ARG-47 und TYR-51, markierten also den Eingang und ermöglichten die Wahl des korrekten Kanals. Der Tunnel wurde an die PyMOL Software zurückgegeben und dort visualisiert.

2.3.2 Docking von (-)- α -Pinen in F87G-Varianten von P450-BM3

Die Struktur aus Abschnitt 2.3.1 wurde durch das Mutationstool der PyMOL-Software (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.4.1) der Fa. Schrödinger LLC (New York, USA) mit den gewünschten Mutationen versehen. Die pdbqt-Datei von (-)- α -Pinen wurde mit ChemBioDraw Ultra (Version 14.0.0.117) der Fa. PerkinElmer (Waltham, USA) erstellt. Das Docking des Substrats in die Struktur wurde mit der AutoDock Vina Software (Version 1.1.2, [187]) durchgeführt. Folgende Parameter wurden der Software übergeben:

```
receptor = receptor_name.pdbqt
ligand = ligand_name.pdbqt
center_x = 41.86
center_y = 25.81
center_z = 35.9
size_x = 18.00
size_y = 18.00
size_z = 18.38
out = output_name.docked.pdbqt
log = logfile_name.vina.log
num_modes = 10
```

Die Visualisierung und die Messung von Abständen wurde wiederum mit der PyMOL Software durchgeführt.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerechte Mutagenese des *cyp102A1*-Gens (GenBank-Nr. J04832.1) wurde durchgeführt, wie im QuikChange®-Protokoll der Fa. Stratagene (inzw. Agilent Technologies, Santa Clara, USA) beschrieben. Hierzu wurden Ausgangsplasmide, in dieser Arbeit die Plasmide

pET-28a(+):*bm3-g* und pET-28a(+):*bm3-a* (Tab. 2.22), mit einander komplementären, die gewünschte Mutation tragenden Primern (Tab. 2.19) durch PCR vermehrt. Die Reaktion wurde durch Phusion® High-Fidelity-DNA-Polymerase katalysiert (Tab. 2.27 und 2.28).

Tabelle 2.27: Zusammensetzung der PCR für die ortsgerichtete Mutagenese

Bestandteil	Konzentration
Ausgangsplasmid	etwa 100 ng
<i>forward</i> -Primer	0,2 pM
<i>reverse</i> -Primer	0,2 pM
dNTP-Mix (10 mM mit 2,5 mM jedes Nukleotids)	1 mM
5x Phusion®-HF-Puffer	1x
Phusion® High-Fidelity-DNA-Polymerase	1 U
ddH ₂ O	ad 50 µL

Tabelle 2.28: Temperaturprogramm der PCR für die ortsgerichtete Mutagenese

Schritt	Temperatur	Zeit (Min:Sek)	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	98 °C	02:00	} 16x
Denaturierung	98 °C	00:30	
Anlagerung	60 °C	01:00	
Elongation	72 °C	04:20	
Finale Elongation	72 °C	10:00	
Halten	18 °C	∞	

Um das Ausgangsplasmid aus dem Ansatz zu eliminieren, wurde dem Ansatz 2 µL FastDigest DpnI (Thermo Fisher Scientific) hinzugefügt und bei 37 °C für 1 Stunde verdaut. Anschließend wurde DpnI bei 80 °C für 20 Minuten inaktiviert. RbCl-kompetente *E. coli* DH5α wurden mit 4 µL des Ansatzes transformiert, wie in Abschnitt 2.4.3 beschrieben.

2.4.2 Konstruktion von Plasmiden

pET-28a(+):*gre2syn*

Für die Expression mit N-terminalem His₆-tag wurde das *gre2syn*-Gen (Sequenz: Appendix 6.6.1) in einen pET-28a(+)-Vektor eingefügt. Dafür wurde zuerst eine PCR mit dem Ausgangsplasmid pEX-K4:*gre2syn* (Karte: Appendix 6.6.1) durchgeführt, um das Gen mit den benötigten Schnittstellen auszustatten. Dazu wurde ein Ansatz, wie in Tab. 2.27 beschrieben, mit den Primern *gre2syn*-NdeI-fw und *gre2syn*-Sall-rv (Tab. 2.20) angefertigt und ein Temperaturprogramm gemäß Tab. 2.29 durchgeführt.

Tabelle 2.29: Temperaturprogramm für die Amplifikation des *gre2syn*-Gens

Schritt	Temperatur	Zeit (Min:Sek)	Wiederholungen
Initiales Denaturierung	98 °C	00:30	
Denaturierung	98 °C	00:10	} 35x
Anlagerung	60 °C	00:30	
Elongation	72 °C	00:45	
Finale Elongation	72 °C	05:00	
Halten	10 °C	∞	

Das PCR-Produkt wurde im Anschluss durch Agarosegel-Elektrophorese präparativ aufgereinigt und aus dem Gel eluiert (vgl. Abschnitt 2.2.1). Das PCR-Produkt und der pET-28a(+)-Leervektor wurden jeweils für 1 Stunde bei 37 °C in Gegenwart von Restriktionsenzymen (Tab. 2.30) inkubiert.

Tabelle 2.30: Zusammensetzung der Restriktion von *gre2syn* und pET-28a(+)

Bestandteil	PCR-Produkt	pET-28a(+)
	Konzentration	
pET-28a(+) Plasmid		1 µg
PCR-Produkt	200 ng	
FastDigest NdeI		1 µL
FastDigest SalI		1 µL
10x FastDigest-Puffer		1x
ddH ₂ O		ad 20 µL

Beide Restriktionsprodukte wurden durch präparative Agarosegel-Elektrophorese aufgereinigt, aus dem Gel extrahiert und die Konzentration der DNA in den Präparationen bestimmt (vgl. Abschnitt 2.2.1). Ein Ansatz für die Ligation der beiden Fragmente wurde angefertigt (Tab. 2.31) und für 1 Stunde bei 22 °C inkubiert.

Tabelle 2.31: Ligation des *gre2syn*-Gens in den pET-28a(+)-Vektor

Bestandteil	Konzentration
geschnittener pET-28a(+)	etwa 100 ng
geschnittenes <i>gre2syn</i> -Gen	etwa 100 ng
10x T4-DNA-Ligase-Puffer	1x
T4-DNA-Ligase	1 U
ddH ₂ O	ad 20 µL

Anschließend wurden RbCl-kompetente *E. coli* DH5 α mit dem kompletten Ansatz transformiert, wie in Abschnitt 2.4.3 beschrieben.

p4782.1::*cyp102a1-atscvg* bzw. pVLT33::*cyp102a1-atscvg*

Das Gen der P450-BM3-Variante ATSCVG (*cyp102a1-atscvg*) lag in einem pET-28a(+)-Vektor vor (Tab. 2.22), der die Expression ausschließlich in Stämmen ermöglicht, die eine T7-RNA-Polymerase exprimieren. Da die Biotransformation in unterschiedlichen Hosts getestet werden sollte, wurde das Gen in einen *broad host range*-Vektor eingebracht. *broad host range*-Vektoren ermöglichen die Expression, ohne dass der Expressionsstamm dazu, von der Transformation mit dem Plasmid abgesehen, genetisch modifiziert werden muss. Zu diesem Zweck wurde eine PCR mit dem Ausgangsplasmid pET-28a(+>::*cyp102a1-atscvg* durchgeführt, um das Gen mit den benötigten Schnittstellen auszustatten. Dazu wurde ein Ansatz (Tab. 2.32) mit den Primern *cyp102a1*-KpnI-fw und *cyp102a1*-XbaI-rv (Tab. 2.20) für die Klonierung in pVLT33 angefertigt. Für die Klonierung in p4782.1 enthielt der ansonsten gleiche Ansatz die Primer *cyp102a1*-XbaI-fw und *cyp102a1*-BsrGI-rv (Tab. 2.20).

Tabelle 2.32: Zusammensetzung der PCR für die Klonierung von *cyp102a1-atscvg*

Bestandteil	Konzentration
Ausgangsplasmid	etwa 200 ng
<i>forward</i> -Primer	0,5 pM
<i>reverse</i> -Primer	0,5 pM
dNTP-Mix (10 mM mit 2,5 mM jedes Nukleotids)	200 μ M
5x Phusion®-HF-Puffer	1x
Phusion® High-Fidelity-DNA-Polymerase	1 U
ddH ₂ O	ad 100 μ L

Mit diesem Ansatz wurde eine PCR mit folgendem Temperaturprogramm (Tab. 2.33) durchgeführt.

Tabelle 2.33: Temperaturprogramm für die Amplifikation des *cyp102a1-atscvg*-Gens

Schritt	Temperatur	Zeit (Min:Sek)	Wiederholungen
Initiales Denaturierung	98 °C	00:30	
Denaturierung	98 °C	00:10	} 35x
Anlagerung	53 °C	01:00	
Elongation	72 °C	02:00	
Finale Elongation	72 °C	10:00	
Halten	18 °C	∞	

Das PCR-Produkt wurde im Anschluss durch Agarosegel-Elektrophorese präparativ aufgereinigt und aus dem Gel eluiert (vgl. Abschnitt 2.2.1). Das PCR-Produkt und das pVLT33-Plasmid wurden jeweils über Nacht bei 37 °C in Gegenwart von Restriktionsenzymen (Tab. 2.34) inkubiert. Das Ausschneiden des *cyp102a1*-Gens (Wildtyp-BM3) aus dem p4782.1::*cyp102a1*-Plasmid und die Restriktion des PCR-Produktes mit den Primern *cyp102a1*-XbaI-fw und *cyp102a1*-BsrGI-rv erfolgte wie in Tab. 2.34, jedoch mit 2 µL XbaI und BsrGI.

Tabelle 2.34: Restriktion von *cyp102a1-atscvg* und pVLT33

Bestandteil	PCR-Produkt pVLT33	
	Konzentration	
Plasmid DNA		6 µg
PCR-Produkt	400 ng	
Kpn	2 µL	4 µL
XbaI	0,5 µL	1 µL
10x Tango-Puffer	1x	
ddH ₂ O	ad 40 µL	

Beide Restriktionsprodukte wurden durch präparative Agarosegel-Elektrophorese aufgereinigt, aus dem Gel extrahiert und die Konzentration der DNA in den Präparationen bestimmt (vgl. Abschnitt 2.2.1). Ein Ansatz für die Ligation der beiden Fragmente wurde angefertigt (Tab. 2.31), jedoch nur 60 ng des geschnittenen *cyp102a1-atscvg*-Gens eingesetzt und der Ansatz für 2 (pVLT33) bzw. 8 Stunden (p4782.1) bei 22 °C inkubiert. Anschließend wurde RbCl-kompetenter *E. coli* DH5α mit dem kompletten Ansatz transformiert, wie in Abschnitt 2.4.3 beschrieben.

2.4.3 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

Die Herstellung erfolgte nach den Prinzipien von Hanahan [188]. 5 mL LB-Medium (Tab. 2.14) wurden steril mit Zellen des gewünschten *E. coli*-Stammes inokuliert und über Nacht auf einem Orbitalschüttler ($\varnothing=25$ mm) bei 37 °C inkubiert. Aus dieser Kultur wurden Zellen in einen 500 mL Erlenmeyerkolben mit 50 mL LB-Medium überführt und die Zellen bei 37 °C und 180 UpM bis zu einer OD_{600nm} von etwa 0,6 herangezogen. Die Kultur wurde daraufhin für 15 Minuten auf Eis heruntergekühlt und durch Zentrifugation (3200 xg, 10 Minuten, 4 °C) geerntet. Das Zellpellet wurde in 20 mL eisgekühltem TfbI-Puffer (Tab. 2.3) aufgenommen und wiederum für 15 Minuten auf Eis gelagert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 2 mL TfbII-Puffer (Tab. 2.4) aufgenommen und wieder 15 Minuten auf Eis gekühlt. Die chemisch kompetenten Zellen wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Transformation von *E. coli* DH5 α

200 μ L chemisch kompetenter *E. coli* DH5 α -Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit DNA aus Ligation oder ortsgerichteter Mutagenese versehen. Die Zellen wurden mit der DNA für 30 Minuten auf Eis inkubiert und für 45 Sekunden in einem Wasserbad mit einer Temperatur von 42 °C per Hitzeschock transformiert. Danach wurden die Zellen wieder für 2 Minuten auf Eis gelagert und dann mit 900 μ L LB-Medium (Tab. 2.14) versetzt. Für die Regeneration der Zellen und Ausprägung der Resistenz wurden die Zellen für 2 Stunden bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Dann wurden 200 μ L des Ansatzes auf einer LB-Agarplatte mit einem selektierenden Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Der restliche Ansatz wurde zentrifugiert (1 Minute, Raumtemperatur) und in 200 μ L des Überstandes resuspendiert und das Konzentrat ausplattiert.

Transformation anderer *E. coli*-Stämme

Da andere *E. coli*-Stämme mit vollständig doppelsträngiger DNA transformiert wurden, konnte aufgrund der höheren Transformationseffizienz ein schnelleres, ressourcensparendes Verfahren eingesetzt werden. 10 μ L chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 20-100 ng DNA versehen. Die Zellen wurden mit der DNA für 30 Minuten auf Eis inkubiert und für 30 Sekunden in einem Wasserbad mit einer Temperatur von 42 °C per Hitzeschock transformiert. Danach wurden die Zellen wieder für 2 Minuten auf Eis gelagert und dann mit 90 μ L LB-Medium versetzt. Für die Regeneration der Zellen und Ausprägung der Resistenz wurden die Zellen für 1 Stunden bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Dann wurde der gesamte Ansatz auf einer LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Für den Fall, dass mehr als ein Plasmid in einen Stamm eingebracht werden sollte, musste erst das eine Plasmid durch Hitzeschocktransformation eingebracht werden und aus dem entstandenen rekombinanten Stamm wiederum chemisch kompetente Zellen hergestellt werden. Dies konnte, wie zu Beginn des Abschnitts beschrieben, durchgeführt werden, jedoch ist eine Zugabe von Antibiotikum bei der Anzucht nötig, um die Stabilität des zuerst eingebrachten Plasmids zu gewährleisten. In die chemisch kompetenten Zellen dieses Stammes konnte durch Hitzeschocktransformation das zweite Plasmid eingebracht werden. Die Selektion erfolgte dann auf LB-Agarplatten mit zwei Antibiotika.

2.4.4 Herstellung und Transformation elektro-kompetenter *P. putida*

Herstellung elektro-kompetenter *P. putida*

Die Herstellung erfolgte nach den Prinzipien von Smith und Iglewski [189]. 5 mL LB-Medium (Tab. 2.14) wurden steril mit Zellen des gewünschten *P. putida*-Stammes inokuliert und über Nacht auf einem Orbitalschüttler ($\varnothing=25$ mm) bei 30 °C inkubiert. Aus dieser Kultur wurden Zellen in einen 500 mL Erlenmeyerkolben mit 50 mL LB-Medium überführt und die Zellen wiederum über Nacht bei 30 °C und 140 UpM auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Dann wurden die Zellen durch Zentrifugation (3200 xg, 10 Minuten, 4 °C) geerntet und in 3 mL 300 mM Saccharoselösung und 2 mL 40 % Glycerin aufgenommen, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Transformation elektro-kompetenter *P. putida*

170 μ L elektro-kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und abzentrifugiert. Daraufhin wurde das Zellpellet in 100 μ L 300 mM Saccharoselösung aufgenommen und 40 ng Plasmid hinzugegeben und in einer Elektroporationsküvette vermischt. Dann erfolgte die Poration bei einer Spannung von 2,5 kV in einem MicroPulser der Fa. BioRad (Hercules, USA). Danach wurden die Zellen in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 700 μ L LB-Medium (Tab. 2.14) versetzt. Für die Regeneration der Zellen und Ausprägung der Resistenz wurden die Zellen für 1-2 Stunden bei 30 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Dann wurde der gesamte Ansatz auf einer LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und bei 30 °C über Nacht inkubiert. Durch die hohe Transformationseffizienz konnte mit dieser Methode die Transformation zweier Plasmide gleichzeitig erfolgen. Die Selektion erfolgte in diesem Fall auf LB-Agarplatten mit zwei Antibiotika.

2.4.5 Plasmidisolation

Für die Vermehrung und Isolation von Plasmiden wurden *E. coli* DH5 α -Zellen, die das entsprechende Plasmid enthalten, in 5 mL LB-Medium, welches mit dem geeigneten Antibiotikum versetzt wurde, transferiert und die Kultur über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Isolierung wurde nach Herstellerangaben mit dem Kit ZR Plasmid MiniprepTM - Classic durchgeführt. Lediglich wurde die DNA final mit 30 μ L ddH₂O eluiert. Zur Kontrolle der Präparation und zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt, wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Heterologe Expression von Enzymen in *E. coli* BL21(DE3)

Für die *in vitro*-Charakterisierung von Enzymen wurden pET-28a(+)-Plasmide mit den entsprechenden Genen (vgl. Tab. 2.22 und 2.23) durch Hitzeschocktransformation (vgl. Abschnitt 2.4.3) in *E. coli* BL21(DE3) eingebracht. 5 mL LB-Medium (Tab. 2.14), welches mit 30 µg/mL Kanamycin versetzt wurde, wurden von der Agarplatte mit einer Kolonie des transformierten Stamms angeimpft und die Kultur bei 37 °C über Nacht geschüttelt. Aus dieser Vorkultur wurden Zellen in einen 1 L-Erlenmeyerkolben ohne Schikanen mit 200 mL TB-Medium (Tab. 2.15), versetzt mit 30 µg/mL Kanamycin, überführt und eine OD_{600nm} von 0,01 - 0,02 eingestellt. Diese Kultur wurde dann bei 37 °C mit 180 UpM auf einem Orbitalschüttler (∅=25 mm) geschüttelt bis die exponentielle Wachstumsphase erreicht wurde (OD_{600nm} von 0,7 - 1). Dann wurde die Expression mit 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert, die Temperatur auf 25 °C gesenkt, die Schüttelfrequenz auf 160 UpM herabgesetzt und so für weitere 19 Stunden inkubiert. Da die hier beschriebenen Expressionsbedingungen im Falle von PpdADH1 nur zu geringer Aktivität führten, wurde hier auch eine Expression bei 37 °C und 180 UpM durchgeführt. Diese wurde dann für die Aufreinigung und Charakterisierung von PpdADH1 verwendet.

2.5.2 Herstellung von geklärtem Rohlysat

Für die Bestimmung von P450-Konzentration und Aktivitäten sowie Aufarbeitung von His₆-tag tragenden Enzymen wurden Zellen nach der Expression gekühlt bei 4 °C durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 3500 xg geerntet und die Pellets bei -20 °C mindestens über Nacht eingefroren. Die gefrorenen Pellets wurden auf Eis aufgetaut und in 20 mL 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7.5, Abschnitt 2.1.2) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte auf Eis durch Ultraschall (3 x 2 Minuten, mit einer Minute Unterbrechung) mit einem Sonifier 250 Ultraschalldisruptor der Fa. Branson Ultrasonics (Danbury, USA). Dann wurde die unlösliche Proteinfraction und die Zelltrümmer durch Zentrifugation (30 kxg, 20 Minuten, 4 °C) von der löslichen Fraction (Rohlysat) getrennt. Das so geklärte Rohlysat wurde aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

2.5.3 Aufreinigung von His₆-tag tragenden Proteinen

Enzyme, die fusioniert zu einem His₆-tag exprimiert wurden, wurden durch Immobilisierung auf einer Ni-NTA-Säule (5 mL HisTrap FF crude) der Fa. GE Healthcare (Chalfont St. Giles, UK) aus geklärtem Rohlysat angereichert, welches wie in Abschnitt 2.5.2 beschrieben hergestellt wurde. Die Pufferzusammensetzung, die Volumenströme und die Dokumentation

der Reinigung wurden durch Nutzung eines ÄKTApurifier-Systems der Fa. GE Healthcare gewährleistet. Die Säule wurde mit 5 Säulenvolumen (SV) Bindepuffer (Tab. 2.6) equilibriert und dann das Rohlysat (15-20 mL) aufgetragen. Um unspezifisch gebundenes Protein von der Säule zu lösen, wurde diese mit einem Volumen von 5 SV gespült, wobei ein Verhältnis von Bindepuffer zu Elutionspuffer von 96:4 (finale Konzentration Imidazol: 20 mM) genutzt wurde. Danach wurde das Enzym mit einem Volumen von 5 SV eluiert, wobei entweder 20 % (100 mM Imidazol) oder 40 % Elutionspuffer (200 mM Imidazol) angewandt wurde. Reste wurden mit 5 SV 100 % Elutionspuffer gespült. Die Elutionsfraktionen, die das aufgereicherte Enzym enthielten, wurden mittels spektrometrischer Aufnahme eines Chromatogramms bei 280 nm (bei CYPs zusätzlich 420 nm) bestimmt und diese Fraktionen für die Entsalzung vereint. Das Enzym wurde daraufhin über eine HiPrep 26/10 Desalting-Säule (GE Healthcare) entsalzt (1,5 SV) und dabei in 50 mM KP_i -Puffer (pH 7,5) aufgenommen. Das so präparierte Enzym wurde aliquotiert und bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.5.4 Kultivierung, Expression und Präparation der Ganzzellkatalysatoren

Für die Kultivierung und Gen-Expression von *broad host range*-Plasmiden (Tab. 2.24) wurden 5 mL LB-Medium mit 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kanamycin für die stabile Propagation von pJeM-, p4782.1- bzw. pVLT33-Plasmiden versetzt. Bei Koexpression von einem pSEVA-Plasmid wurde dem Medium zusätzlich Streptomycin hinzugegeben (für *E. coli* 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, für *P. putida* 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Dann wurde das Medium mit dem rekombinanten Stamm inokuliert und die Kultur über Nacht auf einem Orbitalschüttler ($\varnothing=25\text{ mm}$) geschüttelt (*E. coli* bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ mit 180 UpM, *P. putida* bei $30\text{ }^\circ\text{C}$ mit 140 UpM). Wenn nicht anders angegeben, wurden für die Hauptkultur 200 mL TB-Medium mit Antibiotika versetzt, wie für die Vorkultur beschrieben, und mit Vorkultur inokuliert, so dass eine $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0,02 vorlag. Weiterhin wurde die Kultur in einem 1 L-Erlenmeyerkolben ohne Schikane unter identischen Bedingungen wie die Vorkultur inkubiert. Bei einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0,7 - 1 wurde die Expression durch Zugabe von Rhamnose mit einer finalen Konzentration von 0,2 % (w/v) induziert. Für alle Stämme waren die Expressionsbedingungen $25\text{ }^\circ\text{C}$ mit 160 UpM für 40 Stunden, wenn nicht anders angegeben. Dann wurden die Zellen durch Zentrifugation (3500 xg, 20 min, $4\text{ }^\circ\text{C}$) geerntet und mit 20 mL 50 mM KP_i -Puffer (pH 7,5) gewaschen, wieder zentrifugiert und in CV2-Medium aufgenommen. Hierbei wurden *P. putida*-Biokatalysatoren etwa auf eine Konzentration von 40 $\text{mg}_{\text{cww}}/\text{mL}$ und *E. coli*-Zellen auf 60 $\text{mg}_{\text{cww}}/\text{mL}$ eingestellt (jeweils Zellfeuchtmasse). Im Falle von *E. coli* BL21 nach Expression von P450cam^{FALA}/Pd_x/Pd_R und 3 α -HSDH wurden die Zellen in CV2-Medium für eine Konzentration von 37 $\text{mg}_{\text{cww}}/\text{mL}$ aufgenommen. Die Zellen lagen daraufhin für mindestens eine Stunde auf Eis, um sie in den ruhenden Zustand zu versetzen.

2.5.5 Vorbereitung der Fermentation

5 mL LB-Medium mit 30 µg/mL Kanamycin und 50 µg/mL Streptomycin wurden mit einer Kolonie von *E. coli* BL21, der die beiden Plasmide pJem1a::cyp101a1-fala und pSEVA4Xrha::3α-hsdh enthielt, beimpft und bei 37 °C und 180 UpM über Nacht geschüttelt. Mit je 1 mL dieser Vorkultur wurden zwei 400 mL-TB-Hauptkulturen mit Antibiotika, wie für die Vorkultur beschrieben, in je einem 2 L-Erlenmeyerkolben ohne Schikane beimpft und bei 37 °C und 180 Upm etwa 4 Stunden geschüttelt. Dann wurden die Zellen geerntet (3500 xg, 20 Minuten, 4 °C) und in 40 mL 0,9 %-iger Kochsalzlösung aufgenommen. Mit dieser Lösung wurde ein Rührreaktor beimpft. Die Kultivierung wurde in einem Labfors 4-Tischbioreaktor mit einem 5 L-Glasbehälter der Fa. Infors HT (Bottmingen, CH) bei 37 °C durchgeführt und mit 3,2 L min⁻¹ (1 VVM) Luft begast. Zu Beginn stand eine Batch-Phase in 3,2 L Minimalmedium nach Wilms *et al.* [177], jedoch mit 5 % (v/v) Glycerin als Kohlenstoffquelle anstatt Glukose. Für die Plasmidstabilität waren auch hier 30 µg/mL Kanamycin und 50 µg/mL Streptomycin enthalten.

2.6 Experimente zur *in vitro*-Umsetzung von α-Pinen

2.6.1 Charakterisierung von P450-BM3-Varianten

Für die Charakterisierung wurden Expressionsplasmide in *E. coli* BL21(DE3) eingebracht (vgl. Abschnitt 2.4.3) und exprimiert (vgl. Abschnitt 2.5.1). Die Zellen wurden aufgeschlossen und Lysate wie in Abschnitt 2.5.2 hergestellt. Darin wurde die P450-Konzentration bestimmt, wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Dann wurde ein photometrischer Assay durchgeführt, um enzymkinetische Parameter aufzunehmen (Tab. 2.35).

Tabelle 2.35: Photometrischer Assay für die P450-BM3-Enzymkinetik

Lysat für eine Endkonzentration von 0,5 µM P450 in 1 mL	
20 µL	10 mM (-)-α-Pinen in DMSO
ad 800 µL	50 mM KP _i (pH 7,5)
um die Reaktion zu starten:	
200 µL	1 mM NADPH in 50 mM KP _i (pH 7,5)

Die Abnahme der Absorption bei 340 nm wurde photometrisch verfolgt und nach 30 Sekunden oder 1 Minute die Reaktion extrahiert und mittels achiraler stationärer Phase gaschromatographisch getrennt, wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben. Die Substratoxidationsrate (SOXR) wurde wie in Formel 2.4 berechnet. Da die Bildung von Verbenon über zwei Oxidationsstufen verläuft, geht die Verbenonkonzentration zweifach ein.

$$SOXR = \frac{c_{\text{Pinenepoxid}} + c_{\text{Verbenol}} + c_{\text{Myrtenol}} + 2 \cdot c_{\text{Verbenon}}}{t_{\text{Reaktion}}} \quad (2.4)$$

SOXR: Substratoxidationsrate

c_i : Konzentration des Produktes i nach Ablauf der Reaktion

t_{Reaktion} : Reaktionszeit

Über die Abnahme der Absorption bei 340nm in den ersten 30 Sekunden und den molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{340\text{nm}, \text{NAD(P)H}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ wurde die Rate der Kofaktoroxidation TOF_{NADPH} nach dem Lambert-Beerschen Gesetz bestimmt.

$$TOF_{\text{Kofaktor}} = \frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta A}{\Delta t \cdot \epsilon_{340\text{nm}, \text{NAD(P)H}} \cdot d} \quad (2.5)$$

TOF_{Kofaktor} : Aktivität bzgl. des Kofaktors NAD(P)H bzw. NAD(P)⁺

Δc : Veränderung der Kofaktorkonzentration

Δt : Reaktionszeit

ΔA : Absorptionsänderung

$\epsilon_{340\text{nm}, \text{NAD(P)H}}$: $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

d : Länge des Strahlenganges (1 cm)

Für die Bestimmung von Selektivitäten wurden 0,5-2 μM P450 in den Assay aus Tab. 2.35 eingesetzt und der Ansatz nach Verbrauch des Kofaktors, d.h. bei Erreichen eines stationären Verlaufs der Absorptionskurve extrahiert. Die Produktanalyse erfolgte wie in Abschnitt 2.2.5.

2.6.2 Screening von kommerziellen Alkoholdehydrogenasen

Die Lyophilisate der Alkoholdehydrogenasen (ADHs) wurden durch die Fa. c-LEcta GmbH (Leipzig, GER) zur Verfügung gestellt. Gemäß den Angaben des Herstellers wurden die Massen des Lyophilisats eingewogen und mit dem Probenpuffer auf eine definierte Aktivität (>400 mU) gegenüber einem Standardsubstrat gelöst. Anders als bei den NADP⁺-abhängigen Enzymen wurden bei den NAD⁺-abhängigen dem Puffer gemäß den Herstellerempfehlungen 10 mM MgCl₂ hinzugegeben (Tab. 2.36 und 2.37).

Tabelle 2.36: Reaktionsansatz für das Screening kommerzieller, NADP⁺-abhängiger ADHs

Lyophilisat von ADH mit 50 mU Aktivität ggü. Standardsubstrat	
20 μL	10 mM (-)- <i>cis</i> -Verbenol in DMSO
ad 980 μL	50 mM KP _i (pH 7,5)
um die Reaktion zu starten:	
20 μL	10 mM NADP ⁺ in 50 mM KP _i (pH 7,5)

Tabelle 2.37: Reaktionsansatz für das Screening kommerzieller, NAD⁺-abhängiger ADHs

Lyophilisat von ADH mit 50 mU Aktivität ggü. Standardsubstrat	
20 µL	10 mM (-)- <i>cis</i> -Verbenol in DMSO
ad 980 µL	50mM KP _i + 10mM MgCl ₂ (pH 7,5)
um die Reaktion zu starten:	
20 µL	10 mM NAD ⁺ in 50mM KP _i (pH 7,5)

Das Experiment wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt, wenn nicht anders beschrieben. Nach 2 und 5 Stunden wurden Ansätze extrahiert und mittels achiraler stationärer Phase gaschromatographisch analysiert (vgl. Abschnitt 2.2.5).

2.6.3 Screening von nicht-kommerziellen Alkoholdehydrogenasen

Die Lysate mit den Enzymen aus Tab. 3.5 wurden durch die Arbeitsgruppe Prof. Hummel (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, GER) zur Verfügung gestellt und in einer 96-Well-Mikrotiterplatte durch einen Aktivitätsassay (Tab. 2.38) getestet.

Tabelle 2.38: Reaktionsansatz für das Screening nicht-kommerzieller ADHs

4 µL	Rohlysat mit ADH
7 µL	100 mM (-)- <i>cis</i> -Verbenol in DMSO
ad 378 µL	50 mM KP _i + 10 mM MgCl ₂ (pH 7,5)
um die Reaktion zu starten:	
7 µL	10 mM NAD(P) ⁺ in 50 mM KP _i (pH 7,5)

Die Enzyme wurden nach den Empfehlungen der AG Prof. Hummel entweder mit NAD⁺ und/oder NADP⁺ getestet. Die Absorption wurde bei 340 nm mit einem Tecan Infinite[®] M200 Mikrotiterplattenleser der Tecan Group (Männedorf, CH) verfolgt.

2.6.4 Charakterisierung aufgereinigter Alkoholdehydrogenasen

Für die Charakterisierung wurden Expressionsplasmide in *E. coli* BL21(DE3) eingebracht (vgl. Abschnitt 2.4.3) und exprimiert (vgl. Abschnitt 2.5.1). Die Zellen wurden aufgeschlossen und das Enzym aufgereinigt (vgl. Abschnitt 2.5.2 und 2.5.3).

Verdünnungen der geklärten Lysate wurden in den zuvor erwähnten Assay (Tab. 2.38) eingesetzt, um Expressionstiter zu bestimmen. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (vgl. Abschnitt 2.2.2) wurden Verdünnungen der aufgereinigten Enzyme vermessen, um spezifische Aktivität und Kofaktorpromiskuität (NADP⁺ bzw. NAD⁺) zu bestimmen. Die Aktivität bzgl. des Kofaktors ($TOF_{NAD(P)^+}$) wurde nach Formel 2.5 berechnet.

2.6.5 Kaskade aus P450 F87G und ausgewählten Alkoholdehydrogenasen

Kaskade aus P450-BM3 F87G und ausgewählten Alkoholdehydrogenasen

Für die Umsetzung von (-)- bzw. (+)- α -Pinen zu Verbenon wurde folgender Assay durchgeführt (Tab. 2.39).

Tabelle 2.39: Reaktionsansatz für die Kaskade zur Herstellung von Verbenon

Rohlysat mit P450-BM3-Variante F87G für Endkonzentration in 1 mL von 1 μ M	
aufgereinigte ADH mit einer finalen Kofaktorreduktionsaktivität von 2 U	
20 μ L	10 mM (-)- bzw. (+)- α -Pinen in DMSO
ad 980 μ L	50 mM KP_i (pH 7,5)
um die Reaktion zu starten:	
20 μ L	10 mM NAD(P)H in 50 mM KP_i (pH 7,5)

Die Reaktion wurde für 20 Minuten in einer Küvette durchgeführt und die Abnahme der Absorption bei 340 nm mit einem LAMBDA 35 UV/Vis-Photometer der Fa. PerkinElmer (Waltham, USA) aufgezeichnet. Anschließend wurde der Reaktionsansatz extrahiert und die entstandenen Produkte sowohl mittels achiraler als auch chiraler stationärer Phase gaschromatographisch analysiert (vgl. Abschnitt 2.2.5).

Screening von ADHs nach Aktivität gegenüber (-)-*trans*-Verbenol

Die für die Umsetzung von (-)-*cis*-Verbenol zu (-)-Verbenon getesteten ADHs aus Abschnitt 2.6.2 und 2.6.3 wurden auf ihre Aktivität gegenüber (-)-*trans*-Verbenol getestet. Da (-)-*trans*-Verbenol kommerziell nicht erhältlich ist, wurde für die Herstellung gemäß den Erkenntnissen aus Abschnitt 3.1.4 die P450-BM3-Variante F87G/A328V eingesetzt (Tab. 2.40). Für das Screening der ADHs wurden ausschließlich die $NADP^+$ -abhängigen Kandidaten berücksichtigt, da sie sich durch ihre Kofaktorspezifität optimal mit der NADPH-abhängigen P450-BM3 kombinieren ließen. Unter den kommerziellen Lyophilisaten waren dies: ADH-74, ADH-75, ADH-83, ADH-94, ADH-98 und ADH-99. Die ADH-87 von c-LEcta stand für diesen Test nicht mehr zur Verfügung. Von den nicht-kommerziellen Lysaten wurden PpADH1, PpADH2, PpADH3, PpADH5, PpADH8, PpdADH1 und 7 β -HSDH getestet. Als Positivkontrolle wurde ADH-88 ebenfalls noch einmal getestet.

Tabelle 2.40: Reaktionsansatz für die Herstellung von (-)-*trans*-Verbenol

1,17 mL	geklärtes Rohlysat mit P450-BM3 F87G/A328V ($C_{P450} = 1 \mu$ M)
360 μ L	2,5 mM (-)- α -Pinen in DMSO
15,7 mL	50 mM KP_i (pH 7,5)
um die Reaktion zu starten:	
360 μ L	10 mM NADPH in 50 mM KP_i (pH 7,5)

Die Reaktion lief jeweils für etwa 20 Minuten. Für den Versuch wurden dann 980 μL des Ansatzes mit 20 μL ADH-Lysat bzw. Lyophilisat gemischt und der Verlauf für weitere 10 Minuten photometrisch bei 340 nm gemessen. Dann wurde der Ansatz extrahiert und gaschromatographisch analysiert (vgl. Abschnitt 2.2.5).

2.6.6 Screening von Kosubstraten für Alkoholdehydrogenasen

Für die Bestimmung relativer Aktivitäten gegenüber diverser Alkohole wurde folgender Assay durchgeführt (Tab. 2.41). Die Absorption wurde bei 340 nm mit einem Tecan Infinite[®] M200 Mikrotiterplattenleser der Tecan Group (Männedorf, CH) verfolgt und die Bildung von NAD(P)H über die Absorptionsänderung bestimmt. Die Messung erfolgte in Dreifachbestimmung. Die gemessene Aktivität wurde ins Verhältnis zur Aktivität gegenüber (-)-*cis*-Verbenol gesetzt.

Tabelle 2.41: Reaktionsansatz für das Screening nach Kosubstraten

10 μL	Verdünnung aufgereinigter ADH
4 μL	50 mM Alkohol in DMSO
166 μL	50 mM KP_i (pH 7,5)
um die Reaktion zu starten:	
20 μL	1 mM NAD(P) ⁺ in 50 mM KP_i (pH 7,5)

2.6.7 Kosubstratunterstützte *in vitro*-Kaskade

Um eine fortdauernde Kofaktorregeneration zu ermöglichen, wurde das Verhältnis zwischen P450-BM3 und ADH so gewählt, dass bezüglich des Kofaktors ein Überschuss an ADH-Aktivität besteht. Die Umsetzung in Verbindung mit ADH-88 wurde als Dreifachbestimmung folgendermaßen durchgeführt (Tab. 2.42).

Tabelle 2.42: Kosubstratunterstützte *in vitro*-Kaskade mit ADH-88

6,4 μM	P450-BM3 F87G oder
9,6 μM	P450-BM3 F87G/A328V (entspricht 50 mU NADPH-Verbrauch) ¹
27 μg	ADH-88 (entspricht 1 U NADPH-Regeneration) ¹
10 μL	100 mM α -Pinen in DMSO
10 μL	500 mM Kosubstrat in DMSO bzw. nur DMSO
ad 992 μL	50 mM KP_i (pH 7,5)
um die Reaktion zu starten:	
8 μL	10 mM NADPH in 50 mM KP_i (pH 7,5)

¹ Die Aktivitäten gelten jeweils gegenüber den Kofaktoren NADPH (100 μM in Anwesenheit von 1 mM α -Pinen) für P450-BM3 bzw. NADP⁺ (100 μM in Anwesenheit von 1 mM (-)-*cis*-Verbenol) für ADH-88.

Die Reaktion wurde in einer Küvette durchgeführt und die Veränderung der Absorption bei 340 nm photometrisch verfolgt (anschließende Berechnung der dazugehörigen Kofaktorkonzentrationen nach Formel 2.5). Nach 40 Minuten wurden die Ansätze extrahiert und die Produkte gaschromatographisch quantifiziert (vgl. Abschnitt 2.2.5).

Neben der ADH-88 wurde auch Gre2p für die kosubstratunterstützte *in vitro*-Kaskade aus P450-BM3 und ADH getestet. Das Experiment wurde als Dreifachbestimmung mit folgendem Ansatz durchgeführt (Tab. 2.43). Nach 180 Minuten wurden die Ansätze extrahiert und die Produkte gaschromatographisch quantifiziert (vgl. Abschnitt 2.2.5).

Tabelle 2.43: Kosubstratunterstützte *in vitro*-Kaskade mit Gre2p

2,5 µM	P450-BM3 F87G oder
3,75 µM	P450-BM3 F87G/A328V (entspricht 20 mU NADPH-Verbrauch) ¹
71 µg	Gre2p (entspricht 1 U NADPH-Regeneration) ¹
10 µL	100 mM α -Pinen in DMSO
10 µL	500 mM Kosubstrat in DMSO bzw. nur DMSO
ad 980 µL	50 mM KP _i (pH 7,5)
um die Reaktion zu starten:	
20 µL	10 mM NADPH in 50 mM KP _i (pH 7,5)

¹ Die Aktivitäten gelten jeweils gegenüber den Kofaktoren NADPH (100 µM in Anwesenheit von 1 mM α -Pinen) für P450-BM3 bzw. NADP⁺ (100 µM in Anwesenheit von 1 mM (-)-*cis*-Verbenol) für ADH-88.

2.7 Experimente zur *in vivo*-Umsetzung von α -Pinen

2.7.1 Expression von P450-BM3 mit *broad host range*-Vektoren

Die beiden Plasmide p4782.1::*cyp102a1-atscvg* und pVLT33::*cyp102a1-atscvg* (vgl. Abschnitt 2.4.2) wurden in *P. putida* DSM12264 eingebracht, wie Abschnitt 2.4.4 beschrieben. Mit den rekombinanten Stämmen wurde eine Expression (vgl. Abschnitt 2.5.4) in einem Volumen von 50 mL TB-Medium mit 30 µg/mL Kanamycin in einem 300 mL-Erlenmeyerkolben ohne Schikane bei 30 °C für 24 Stunden durchgeführt. Die Hauptkultur von Zellen mit p4782.1::*cyp102a1-atscvg* wurden mit 0,2 % (w/v) Rhamnose induziert und die Expression als Einfachbestimmung durchgeführt. Von Zellen mit pVLT33::*cyp102a1-atscvg* wurden sechs Hauptkulturen von einer Vorkultur inokuliert und je drei mit 0,1 bzw. 1 mM IPTG induziert und dann parallel inkubiert. Proben ganzer Zellen für die SDS-PAGE-Analyse (vgl. Abschnitt 2.2.3) wurden vor Induktion sowie 6 Stunden und 24 Stunden nach Induktion genommen. Für die Bestimmung der P450-Konzentration wurden nach 24 Stunden Expression die Zellen durch Zentrifugation geerntet, eingefroren, in 5 mL Kaliumphosphatpuffer aufgenommen und aufgeschlossen, wie in Abschnitt 2.5.2 beschrieben. Dann wurde die P450-Konzentration

durch CO-Differenzspektrometrie (vgl. Abschnitt 2.2.4) bestimmt. *E. coli* JM109 wurde mit p4782.1::cyp102a1-atscvg transformiert, wie in Abschnitt 2.4.3 beschrieben. Die Expression unter optimierten Bedingungen und Bestimmung der P450-Konzentration wurde für *E. coli* JM109 und *P. putida* DSM12264, jeweils mit p4782.1::cyp102a1-atscvg wie in den Abschnitten 2.5.4 und 2.7.5 durchgeführt. Die P450-Konzentration wurde für jeden Stamm in Dreifachbestimmung (drei unterschiedliche Kolonien sowie Expression zu unterschiedlichen Zeitpunkten) ermittelt.

2.7.2 Expression von P450cam^{FALA}/Pdx/PdR sowie Koexpression von GldA und 3 α -HSDH

Für die Expression und Charakterisierung von P450cam^{FALA}/Pdx/PdR (Abschnitt 3.3.2 und 3.3.3) wurden das benötigte Plasmid pJeM1a::cyp101a1-fala in *P. putida* und *E. coli* eingebracht, wie jeweils in den Abschnitten 2.4.4 und 2.4.3 beschrieben. Für die Koexpression von GldA und 3 α -HSDH (Abschnitt 3.3.4) wurden zusätzlich pSEVA-Plasmide mit kompatiblen Replikationsursprüngen und den entsprechenden Genen eingebracht, pSEVA42rha::gldA in *P. putida*, pSEVA46rha::gldA bzw. pSEVA4Xrha::3 α -hsdh in *E. coli*. Die Expression und Präparation der Zellen wurde durchgeführt wie in Abschnitt 2.5.4. Die Bestimmung der Aktivitäten (TOF_{NAD+}) wurde gemäß Abschnitt 2.7.5 durchgeführt. Von der Expressionskultur wurden Proben ganzer Zellen vor Induktion und typischerweise nach 24 und 40 Stunden Expression für eine SDS-PAGE-Analyse (vgl. Abschnitt 2.2.3) genommen.

2.7.3 Viabilität von *P. putida* und *E. coli* in Gegenwart von α -Pinen

Von den beiden Stämmen *P. putida* DSM12264 und *E. coli* JM109 wurden jeweils von einer LB-Agarplatte (30 μ g/mL Kanamycin) zwei Kolonien des rekombinanten Stammes (Leervektor) genutzt, um insgesamt vier Kulturen herzustellen, wie in Abschnitt 2.5.4 beschrieben. Dann wurden die Zellen geerntet (3500 xg, 20 Minuten, 4 °C), in 20 mL 50 mM KP_i (pH 7,5) gewaschen und das Zellpellet in einer Menge CV2-Medium (Tab. 2.16) aufgenommen, dass eine Zellfeuchtmasskonzentration von 100 mg_{cww}/mL eingestellt war. Hiervon wurden Aliquots von 1 mL in 2 mL-Eppendorftubes überführt und diese mit α -Pinen mit finaler Konzentration (v/v) von (0, 5, 10 und 15 %) versehen. Für jede der vier Kolonien wurde jede Konzentration als Duplikat durchgeführt. Dann wurde bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler mit 20 UpM inkubiert. Nach 6 und 24 Stunden wurden zwei Proben aus der wässrigen Phase entnommen, bis zu einem Faktor von 10⁶ und 10⁸ verdünnt und jeweils 100 μ L von beiden Verdünnungsstufen auf LB-Agar (mit 30 μ g/mL Kanamycin) ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 30 °C (*P. putida*) oder 37 °C (*E. coli*) inkubiert und die Zahl der colony forming units (CFU) bestimmt. Da die Experimente

für jeden Stamm mit Zellen von zwei unabhängigen Kolonien durchgeführt wurden, die jeweils bei jeder α -Pinenkonzentration zweimal zu jedem Zeitpunkt beprobt wurden, wurde für jeden Stamm bei jeder Konzentration ein Mittelwert aus vier Bestimmungen ermittelt.

2.7.4 Durchführung der Biotransformation von α -Pinen

19,6 mL ruhende Zellen (Präparation wie in Abschnitt 2.5.4) oder CV2-Medium als Negativkontrolle wurden in einen 100 mL-Erlenmeyerkolben überführt. Die übrige Zellpräparation wurde für die Bestimmung der finalen Biomassekonzentration, der Konzentration von P450 und der relevanten Enzymaktivitäten (vgl. Abschnitt 2.7.5) genutzt. Die Biotransformation wurde durch die Zugabe von 400 μ L α -Pinen in DMSO (Endkonzentration α -Pinen 20 mM, DMSO 2 %) und im Falle einer Permeabilisierung mit gleichzeitiger Zugabe von 2 mg Polymyxin B-Sulfat gestartet. Die Kolben wurden mit 160 UpM bei 25 °C auf einem Orbitalschüttler ($\varnothing=25$ mm) geschüttelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben für die GC/MS-Analyse (vgl. Abschnitt 2.2.5) genommen.

2.7.5 Bestimmung relevanter Parameter der Biotransformation

Eine Probe von etwa 5 mL der ruhenden Zellen (Abschnitt 2.5.4) wurde aufgeschlossen, wie in Abschnitt 2.5.2 beschrieben. Von der so gewonnenen löslichen Proteinfraction wurde ein CO-Differenzspektrum (vgl. Abschnitt 2.2.4) aufgenommen und die P450-Konzentration bestimmt. Für die Bestimmung der Zellfeucht- und Zelltrockenmassekonzentration wurden drei Proben der Zellpräparation in ausgewogenen Eppendorfgläsern abzentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt. Nun wurde die Zellfeuchtmasse bestimmt. Dann wurden die Gefäße mindestens 24 Stunden bei 70 °C getrocknet und dann die Zelltrockenmasse bestimmt.

Die Aktivitäten in den geklärten Rohlysaten wurden durch spektrometrische Messung von NADH-Bildung (GldA, 3 α -HSDH) oder -Verbrauch (P450cam^{FALA}) bei 340 nm in einem Lambda 35 UV/Vis System der Fa. PerkinElmer (Waltham, USA) bestimmt. Das Reaktionsvolumen betrug 1 mL und bestand aus 50 mM KP_i-Puffer (pH 7,5), 2 % (v/v) DMSO, 1 mM Substrat und einer geeigneten Verdünnung des Rohlysats. Für die Aktivitätsbestimmung von P450cam^{FALA}/Pdx/PdR wurde das Rohlysate auf eine Konzentration der P450cam^{FALA} von 0,5 μ M verdünnt, das Substrat war (-) oder (+)- α -Pinen. Für die 3 α -HSDH wurde (-)-*cis*-Verbenol als Substrat eingesetzt. Da das CV2-Medium bereits 2 % (v/v) Glycerin enthält (Tab. 2.16), wurde bei der Aktivitätsbestimmung der GldA kein Substrat zugefügt und es war kein DMSO vorhanden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μ M NADH bzw. NAD⁺ gestartet und die Anfangssteigung aufgenommen. Anhand der ersten 30 Sekunden der Steigung wurde die Aktivität bzgl. des Kofaktors (TOF_{NADH})

nach Formel 2.5 in Abschnitt 2.6.1 berechnet. Für die Bestimmung der Substratoxidationsrate (SOXR) von P450cam^{FALA} wurde das Experiment wiederholt und nach 30 Sekunden durch Zugabe von 10 µL 10mM Carvon in DMSO als internen Standard und 400 µL Ethylacetat gestoppt. Die Extraktion und die GC/MS-Analyse wurden durchgeführt, wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben. Die SOXR wurde nach Formel 2.4 in Abschnitt 2.6.1 berechnet.

2.7.6 Fermentation von *E. coli* BL21 und Biotransformation von α -Pinen

Von Inokulation bis zum Beginn der Biotransformation wurden Proben genommen und die optische Dichte bei 600 nm bestimmt. Dafür wurde die Probe, auf eine OD_{600nm} von unter 0,1 in ddH₂O (gleiche OD_{600nm} wie Minimalmedium) verdünnt. Beginnend mit einer Rührerdrehzahl von 300 UpM wurde die Drehzahl stufenweise (500, 750, 1000 UpM) erhöht, wenn der pO₂ abfiel. Als nach 13 Stunden der pO₂ sprunghaft anstieg, wurde die Fed-Batch-Phase mit der Fütterung von 50 %-iger (v/v) Glycerinlösung eingeleitet und bei erneutem Ansteigen des pO₂ der Fluss erhöht. Nach 18 Stunden wurde die Temperatur auf 25 °C gesenkt und die Expression mit 0,1 % (w/v) Rhamnose induziert. Für die Expression von P450 wurden 0,1 mM Eisensulfat und 40 µg/mL 5'-Aminolävulinsäure hinzugegeben. Vor und während der Expression wurden Proben genommen, um die P450-Konzentration (vgl. Abschnitt 2.2.4) und die Aktivität der 3 α -HSDH (vgl. Abschnitt 2.7.5) zu bestimmen. In den ersten vier Stunden der Expression wurde der Feed von Glycerin schrittweise um 40 % zurückgefahren, ohne dass der pO₂ anstieg. Vor Beginn der Biotransformation wurden zusätzlich eine Zellfeuchtmasse- und -trockenmassebestimmung (vgl. Abschnitt 2.7.5) durchgeführt. Nach etwa 41 Stunden wurde die Temperatur auf 20 °C gesenkt und die Zellen durch Zugabe von 200 mg Polymyxin B-Sulfat (Endkonzentration: 60 µg/mL) permeabilisiert. Dann wurde die Biotransformation durch Zugabe von 80 mL DMSO (2 % (v/v) Endkonzentration) und 12,7 mL α -Pinen (etwa 20 mM Endkonzentration) gestartet. Zu den genannten Zeitpunkten wurden wiederholt 12,7 mL α -Pinen hinzugegeben oder Proben genommen und mittels GC/MS analysiert (vgl. Abschnitt 2.2.5).

3 Ergebnisse

3.1 Erzeugung und Charakterisierung von selektiven P450-BM3-Varianten für die Oxidation von α -Pinen

Aufbauend auf dem in Abschnitt 1.7 dargelegten Stand des Wissens bzgl. der Oxidation von α -Pinen u.a. durch P450-BM3 sollten geeignete Positionen für die ortsgerichtete Mutagenese identifiziert und neue Varianten der P450-BM3 erstellt und getestet werden. Ziel war die Optimierung der Regio- und Stereoselektivität bei der Bildung von *cis*- bzw. *trans*-Verbenol im Vergleich zu bereits beschriebenen Varianten.

3.1.1 Charakterisierung der P450-BM3-Varianten ATSCVG und AQCRG

Die beiden Varianten der P450-BM3 Y51V/A74G/F87A/A111T/L188S/R471C, in dieser Arbeit beginnend mit der Mutation F87A kurz ATSCVG genannt, bzw. K69R/A74G/F87A/L188Q/R471C, kurz AQCRG, wurden bereits als sehr selektiv, aktiv und mit hoher Kopplung bei der Hydroxylierung von (-)- α -Pinen (ATSCVG) bzw. (+)- α -Pinen (AQCRG) beschrieben [104] und dienten für die Arbeit als Ausgangspunkt. Bei beiden Varianten wurde nach Sequenzierung des Originalmaterials neben den ursprünglich beschriebenen Mutationen mit R471C eine

weitere gefunden und abweichend zur Originalpublikation in die Benennung der Varianten eingefügt. Für die Charakterisierung der beiden Varianten wurde *E. coli* BL21(DE3) mit den Originalplasmiden, pET-28a(+) mit jeweils der Variante ATSCVG oder AQCRG (Tab. 2.22), transformiert und eine Expression durchgeführt (Abb. 3.1). Von der löslichen Fraktion wurde ein CO-Differenzspektrum aufgenommen (Abb. 3.2).

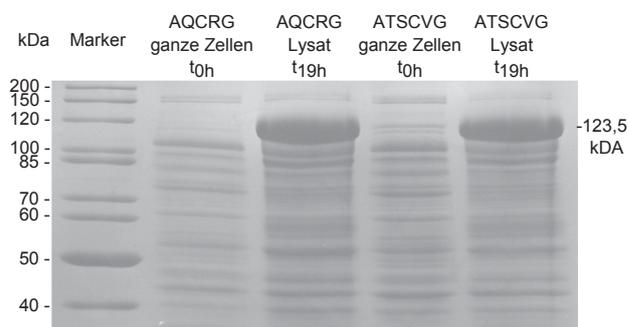


Abbildung 3.1: Analyse der Expression von P450-BM3-Varianten AQCRG und ATSCVG in *E. coli* BL21(DE3) durch SDS-PAGE - Vor Induktion der Zellen wurde von beiden Expressionskulturen eine Probe für eine 12,5 %-ige SDS-PAGE (ganze Zellen, t_{0h}) genommen. Nach 19 Stunden wurden die Zellen geerntet und die lösliche Proteinfraction (Lysat, t_{19h}) gewonnen. Nach der Expression ist bei etwa 123,5 kDa eine deutliche Bande zu erkennen.

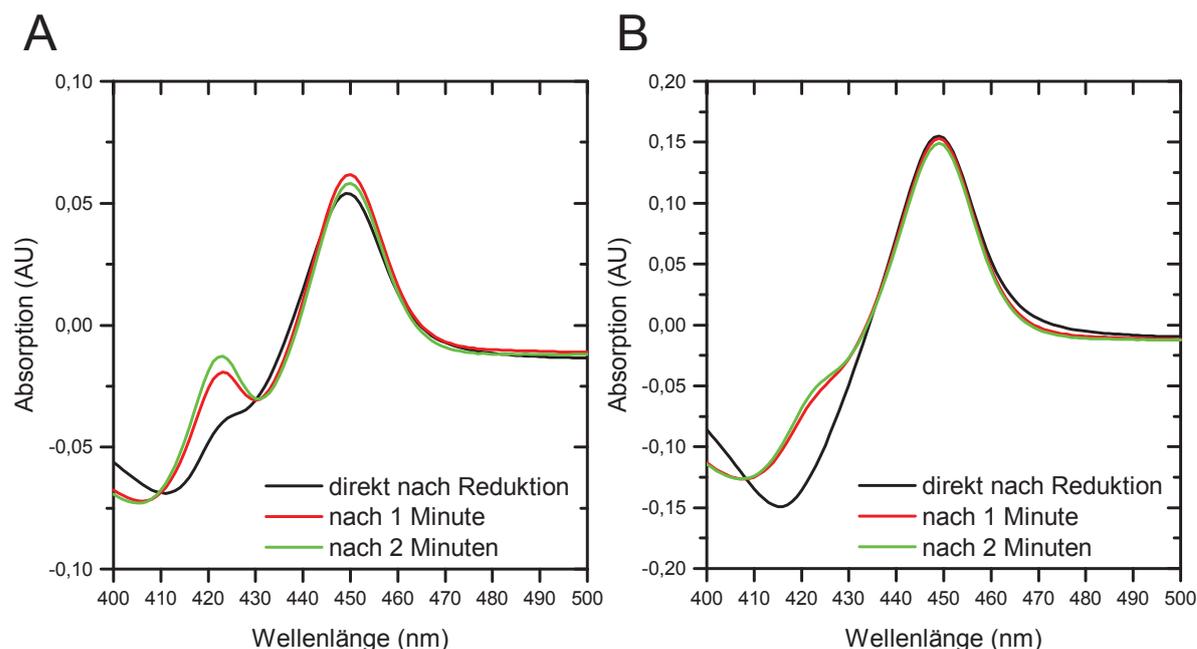


Abbildung 3.2: CO-Differenzspektren der P450-BM3-Varianten AQCRG und ATSCVG - A: Spektren der Variante AQCRG. Schon zu Beginn der Messung war eine Schulter bei 420 nm zu erkennen. Zugleich war noch nicht das gesamte Enzym reduziert. Erst nach einer Minute war die Differenz zwischen 449 nm und 490 nm maximal und nahm dann bei der Messung nach 2 Minuten wieder ab. **B:** Spektren der Variante ATSCVG. Direkt zu Beginn konnte ein Spektrum ohne Schulter bei 420 nm und kompletter Reduktion des Enzyms, d.h. maximaler Differenz zwischen 449 nm und 490 nm aufgenommen werden.

Wie bereits zuvor bei Budde *et al.* [104] beschrieben, ist bei der Variante AQCRG neben dem Peak bei etwa 450 nm das Erscheinen einer Schulter bei 420 nm festzustellen. Bei Reduktion mit geringeren Konzentrationen Natriumdithionits im Anschluss an die CO-Begasung und sofortiger, repetitiver Aufnahme des Spektrums konnte jedoch ein Spektrum aufgenommen werden, bei dem fast ausschließlich der gewünschte Peak, hier mit einem Maximum bei 449 nm, zu sehen ist und die Schulter bei 420 nm nur minimal ausgeprägt ist. So konnte eine verlässlichere Quantifizierung über die Absorption bei 449 und 490 nm erreicht werden. Die Ausprägung einer Schulter bei 420 nm war auch für die Variante ATSCVG erkennbar, allerdings in viel geringerem Ausmaß. Die löslichen Proteinfractionen der Expression beider P450-BM3-Varianten wurden für die Oxidation von (-)- α -Pinen getestet und die Aktivitäten gegenüber dem Kofaktor und (-)- α -Pinen, sowie die Produktverteilung bestimmt (Tab. 3.1). Dabei konnten die in Abbildung 1.12 beschriebenen Produkte von Epoxidierung und allylischer Hydroxylierung des (-)- α -Pinsens, d.h. *cis*- und *trans*-Verbenol, Verbenon, Myrtenol und Pinenepoxid identifiziert werden. Um den Einfluss der hier eingefügten und teilweise noch recht wenig charakterisierten Mutationen beurteilen zu können, wurden die Ergebnisse mit denen einer parallel getesteten F87A-Einzelmutationsvariante verglichen.

Tabelle 3.1: Bestimmung von Aktivitäten und der Produktverteilung verschiedener F87A-Varianten von P450-BM3 für die Oxyfunktionalisierung von (-)- α -Pinen

P450-BM3 Variante	TOF _{NADPH} ¹ (min ⁻¹)	SOXR ² (min ⁻¹)	Verbenol ³ (%)	Verbenon (%)	Myrtenol (%)	Pinenepoxid (%)
F87A	43±5	36±5	28	4	2	66
AQCRG	178±2	33±0	46	6	1	47
ATSCVG	91±2	69±3	48	4	3	44

¹: Rate der Kofaktoroxidation (NADPH); die TOF_{NADPH} von gleichen Konzentrationen an Leervektorlysate betrug maximal 9 min⁻¹.

²: Substratoxidationsrate in Sinne von mol_{Produkt} pro mol_{P450} (für die Bildung von Verbenon wurde für die Berechnung eine zweifache Oxidation angenommen); bei parallel gemessenem Leervektorlysate wurde keine Produktbildung festgestellt.

³: Summe aus (-)-*cis*- und (-)-*trans*-Verbenol

Die zusätzlichen Mutationen in den beiden Varianten AQCRG und ATSCVG verbesserten die Regioselektivität gegenüber der Einzelmutationsvariante F87A (28 % Verbenolanteil), so dass Anteile an Verbenol am Produktspektrum von 46 % (AQCRG) bzw. 48 % (ATSCVG) erreicht wurden. Die ATSCVG-Variante wies mit 69±3 min⁻¹ eine etwa doppelt so hohe Substratoxidationsrate im Vergleich zur AQCRG-Variante (33±0 min⁻¹) bzw. der F87A-Variante auf (36±5 min⁻¹) auf. Während sich das Verhältnis zwischen Kofaktorverbrauch und Substratoxidation, in diesem Zusammenhang auch Kopplung genannt, bei der ATSCVG-Variante bei gleichzeitig erhöhter Geschwindigkeit und verbesserter Selektivität gegenüber der F87A-Variante nicht verschlechterte, war bei der AQCRG-Variante diesbezüglich ein Missverhältnis festzustellen.

3.1.2 Charakterisierung von P450-BM3-Varianten mit I401P-Mutation

Neben der Mutation von Positionen im Substratzugangskanal bzw. dessen Eingang, wie zum Beispiel dem Austausch von TYR-51 durch apolare Aminosäuren [104], gibt es mit ILE-401 eine weitere Position mit Einfluss vor allem auf die Substratoxidationsrate. ILE-401 liegt C-terminal vom distal zum Häm liegenden CYS-400 und formt unter dem Häm liegend nicht den Substratzugangskanal. Gleichwohl wurde eine durch die Mutation dieser Position induzierte Delokalisierung des Häms und ein daraus resultierender Einfluss auf die Aktivität bei der Terpenhydroxylierung nachgewiesen [172, 190]. So wurde zum Beispiel festgestellt, dass bei der Oxidation von (+)-Valencen zu Nootkatol und (+)-Nootkaton die Variante P450-BM3 F87A/A328I, kurz AI genannt, durch eine zusätzliche Mutation von Position ILE401 zu Prolin (I401P, Variante kurz AIP genannt) eine höhere Aktivität erreichte [49]. In dieser Arbeit wurde getestet, ob sich dieser Effekt gleichermaßen für die Oxidation von (-)- α -Pinen nachweisen lässt. Mit Variante R47L/Y51F/F87A/A328I/I401P, kurz AIPLF, war zudem eine weitere Variante verfügbar, die sowohl die I401P-Mutation als auch Mutationen

im Substratzugangskanal in sich vereinte. Hier sollte ermittelt werden, ob sich additive Effekte aus der I401P-Mutation und den anderen Mutation ergeben. Die erwähnten Varianten wurden exprimiert und die Umsetzung von (-)- α -Pinen charakterisiert (Tab. 3.2).

Tabelle 3.2: Bestimmung von Aktivitäten und der Produktverteilung verschiedener F87A/A328I-Varianten von P450-BM3 für die Oxyfunktionalisierung von (-)- α -Pinen

P450-BM3 Variante	TOF _{NADPH} ¹ (min ⁻¹)	SOXR ² (min ⁻¹)	Verbenol ³ (%)	Verbenon (%)	Myrtenol (%)	Pinenepoxid (%)
AI	51±3	54±2	13	4	6	78
AIP	278±23	140±5	34	1	3	62
AIPLF	571±30	213±8	32	1	3	64

¹: Rate der Kofaktoroxidation (NADPH); die TOF_{NADPH} von gleichen Konzentrationen an Leervektorlysat betrug maximal 9 min⁻¹.

²: Substratoxidationsrate in Sinne von mol_{Produkt} pro mol_{P450} (für die Bildung von Verbenon wurde für die Berechnung eine zweifache Oxidation angenommen); bei parallel gemessenem Leervektorlysat wurde keine Produktbildung festgestellt.

³: Summe aus (-)-*cis*- und (-)-*trans*-Verbenol

Im Vergleich zur Variante AI konnte durch die I401P-Mutation die Selektivität zugunsten von Verbenol verschoben werden (34 statt 13 % Produktanteil). Die Verbrauchsrate von Kofaktor NADPH nahm durch die I401P-Mutation um einen Faktor von über 5 zu, während die Substratoxidationsrate nur um den Faktor von etwa 2,5 zunahm. Bei der zuvor in dieser Arbeit charakterisierten Variante ATSCVG wurde, wie zuvor bereits bei Budde *et al.* [104] beschrieben, u.a. durch die Mutation Y51V eine verbesserte Aktivität erzielt (vgl. Tab. 3.1). Auch in der Variante AIPLF war das Tyrosin an Position 51 durch eine apolare Aminosäure, hier Phenylalanin, ausgetauscht und zeigte nicht nur wie die AIP-Variante eine verbesserte Selektivität zugunsten der Bildung von Verbenol gegenüber der Variante AI (32 statt 13 % Produktanteil), sondern auch Kofaktorverbrauchsrate sowie Substratoxidationsrate waren gegenüber der Variante AIP nochmals erhöht. Wie bei AIP stieg jedoch der NADPH-Verbrauch überproportional im Vergleich zum Zuwachs an Substratoxidationsrate.

3.1.3 Modellierung des Substratzugangskanals von P450-BM3

Während bei der Hydroxylierung von (-)- α -Pinen bisherige Mutationsstudien lediglich auf die Verbesserung der Regioselektivität abzielten [104, 105], sollte in der vorliegenden Arbeit auch die Stereoselektivität bei der Bildung von *cis*- und *trans*-Verbenol untersucht werden. Hierfür wurde ein auf rationalem Proteindesign basierender Ansatz gewählt. Damit eine eingebrachte Mutation einen Einfluss auf die Selektivität von P450-BM3 haben kann, ist die Mindestvoraussetzung, dass die mutierte Position, wie im Abschnitt 1.3.7 einleitend beschrieben, an der Formgebung des Substratzugangskanals beteiligt

ist. Anhand von Kristallstrukturen substratbindender P450-BM3, wie bei der Bindung von Palmitoleinsäure durch P450-BM3 [191], wurde der Substratzugangskanal lokalisiert. Einzelne Aminosäurereste mit möglicher Beteiligung an der Formung des Substratzugangskanals wurden hiervon abgeleitet und sind seit geraumer Zeit prominentes Ziel ortsgerichteter Mutagenese [32]. In dieser Arbeit wurde der Substratzugangskanal der P450-BM3 modelliert, um die Menge aller Aminosäuren zu identifizieren, die an der Formung des Substratzugangskanals beteiligt sind. Das Ergebnis dieser Modellierung wurde im Folgenden als Argumentationsgrundlage herangezogen sowohl für die Bewertung des Einflusses von Mutationen bereits veröffentlichter Varianten der P450-BM3 als auch für die Einschätzung des Potentials möglicher Kandidaten für neu einzubringende Mutationen. Das Ergebnis der Modellierung sind Trajektorien (*Trajektorie*: Bewegungsbahn), die vom aktiven Zentrum zur Enzymoberfläche führen (Abb. 3.3, A).

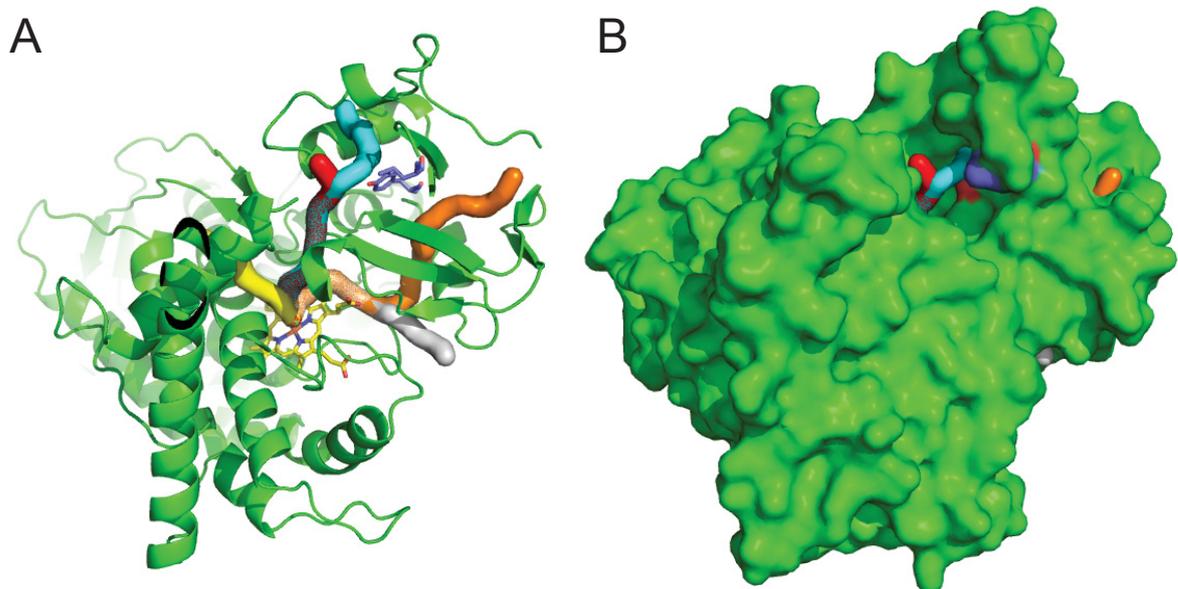


Abbildung 3.3: Modellierung des Substratzugangskanals der BMO - A: Struktur der BMO (pdb-identifiziert 2IJ2 [185]) mit fünf Trajektorien vom katalytischen Häm (gelb-blau) an die Oberfläche des Enzyms. Die beiden gemäß der Literatur den Eingang markierenden Aminosäuren ARG-47 und TYR-51 sind in blau dargestellt. B: Oberfläche der BMO mit den Endpunkten dreier Trajektorien (rot, türkis und orange), ARG-47 und TYR-51 in blau dargestellt.

Nur zwei (rot und türkis) der berechneten fünf Trajektorien führen an die Oberfläche des Enzyms an der Stelle, wo die beiden Aminosäuren ARG-47 und TYR-51 liegen. Aufgrund der eingangs erwähnten Kristallstrukturen ist bekannt, dass jene den Eingang des Substratzugangskanals markieren [32]. Beide Trajektorien teilen über eine große Distanz dieselbe räumliche Ausdehnung. Die Visualisierung der Enzymoberfläche (Abb. 3.3, B) zeigt, dass auch die kürzere Trajektorie (rot) die Oberfläche des Enzyms erreicht. Die andere (türkis) taucht von dort wieder ins Innere der Struktur ein. Somit konnten drei Trajektorien

aufgrund ihres Verlaufs und eine vierte aufgrund von Redundanz ausgeschlossen werden. Die Aminosäuren, die den einzig verbliebenen Kanal (rot) formen, sind in Tabelle 3.3 aufgeführt.

Tabelle 3.3: Substratzugangskanalformende Aminosäuren

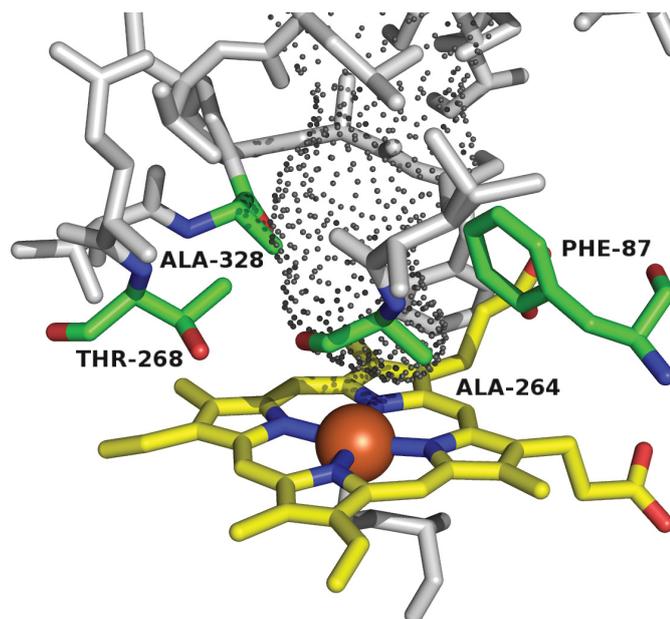
LEU-17	LEU-20	ASN-21	THR-22	ASP-23	LYS-24
PRO-25	VAL-26	LEU-29	PHE-42	ALA-44	ARG-47
THR-49	TYR-51	SER-72	GLN-73	ALA-74	LEU-75
PHE-87	MET-185	LEU-188	ILE-263	ALA-264	GLY-265
THR-268	THR-327	ALA-328	PRO-329	ALA-330	PHE-331
MET-354	CYS-400	GLU-435	THR-436	LEU-437	THR-438

3.1.4 Verbesserung der Selektivität von P450-BM3-Varianten durch rationales Proteindesign

Die Ziele der Mutagenese von P450-BM3 umfassten neben Varianten mit erhöhter Substratoxidationsrate und Kopplung vor allem solche mit verbesserter Regio- und Stereoselektivität. Hierzu sollte nun die Rolle von Aminosäureresten in unmittelbarer Nähe zum Häm und ihre Wirkung auf die Selektivität der P450-BM3 bei der Hydroxylierung von (-)- α -Pinen untersucht werden. So wurde bereits berichtet, dass Aminosäurereste in kurzer Distanz zum katalytischen Zentrum entscheidenden Einfluss auf die Selektivität haben dürften [62, 64, 76]. Als Abstand wurde vorläufig eine Distanz von 7Å gewählt, um diesen bei ausbleibendem Erfolg sukzessive zu vergrößern. Die in Tab. 3.3 gelisteten Aminosäuren, welche den Substratzugangskanal formen, wurden auf ihre Entfernung zum Eisen des katalytischen Häms untersucht. Die Schnittmenge der Aminosäuren aus Tab. 3.3 und der Menge der Aminosäuren mit einem Abstand von $\leq 7\text{\AA}$ zum zentralen Eisenatom sind in Abb. 3.4 dargestellt.

Die vier auf diese Weise ausgewählten Aminosäurereste PHE-87, ALA-264, THR-268 und ALA-328 wurden auch schon in vergangenen Veröffentlichungen als Teil des Substratzugangskanals beschrieben [32]. Da THR-268 einen in der Struktur von CYPs hoch konservierten Rest darstellt, der für die Protonenabgabe, Aktivierung von Sauerstoff und Stabilisierung von Intermediaten zuständig ist [32, 192], wurde dieser Rest von der Mutagenese ausgenommen. Das rechtwinklig direkt über dem katalytischen Häm liegende PHE-87 hingegen ist eine Schlüsselposition für die Aktivität und Selektivität von P450-BM3, was durch die hohe Anzahl an Publikationen die Mutagenese dieser Position betreffend belegt wird [32]. ALA-328 wurde durch Sequenzvergleiche mit anderen CYPs als eine

Abbildung 3.4: Lage der ausgewählten Positionen für die Verbesserung der Regio- und Stereoselektivität von P450-BM3 - Aus den Aminosäuren, die den Substratzugangskanal formen (grau), wurden diejenigen ausgewählt, die sich oberhalb des Häms und in einem Abstand von maximal 7 Å vom Eisenatom des Häms (gelb-blau) befinden. Die sich daraus ergebenden Kandidaten für die Mutation sind die Aminosäuren PHE-87, ALA-264, THR-268 und ALA-328.



Schlüsselposition für die Selektivität der P450-BM3 identifiziert [62] und war darum, genauso wie ALA-264, ebenfalls bereits Gegenstand von Mutationsstudien zur Verbesserung der Selektivität (vgl. Abschnitt 1.3.7). Anhand der Kristallstruktur und Vorschlägen aus der Literatur wurden Mutationen an den Positionen PHE-87, ALA-264 und ALA-328 eingefügt und die Varianten bzgl. ihrer Kofaktorverbrauchs- und Substratoxidationsraten, vor allem aber bzgl. ihrer Regio- und Stereoselektivität charakterisiert.

An der Position ALA-264 wurden analog zu Seifert *et al.* [63] ein Valin eingefügt. Die Kopplung wurde dadurch sehr gering (F87G/A264V: 9 %, F87A/A264V: 7 %, F87A/A264V/A328I: 3 %). Während die Varianten F87A/A264V und F87A/A264V/A328I hauptsächlich (-)-Verbenol bildeten (jeweils 46 % bzw. 43 % Anteil im Produktspektrum), bildete Variante F87G/A264V ungewöhnlich viel (-)-Myrtenol (44 % Anteil im Produktspektrum). Statt ALA-328 wurden größere aliphatische Aminosäurereste eingefügt, da die Bindetasche des Enzyms für das betreffende Substrat als weiträumig eingeschätzt wird [105]. Der Effekt des Aminosäureaustauschs an Position 328 und der Einfluss der Größe des eingefügten Restes auf die Regioselektivität von P450-BM3 ist im Folgenden bildlich dargestellt (Abb. 3.5). Ähnlich wie für die Variante F74G/F87V/L188Q von Branco *et al.* [105] beschrieben, bildete auch die F87V/A328V-Variante hauptsächlich Pinenepoxid (Abb. 3.5). Die Variante F87A/A328V hingegen bildete schon 49 % Verbenol. Durch die Variante F87G/A328V wurde ein mit 78 % Verbenolanteil im Produktspektrum ein zu Variante A74G/F87G/L188Q vergleichbarer Anteil von Verbenol (77 %) gebildet. Durch die A328V-Mutation konnte der Anteil an gebildetem Verbenol im Produktspektrum gegenüber den Varianten mit dem wildtypischen Alanin an Position 328 erhöht werden.

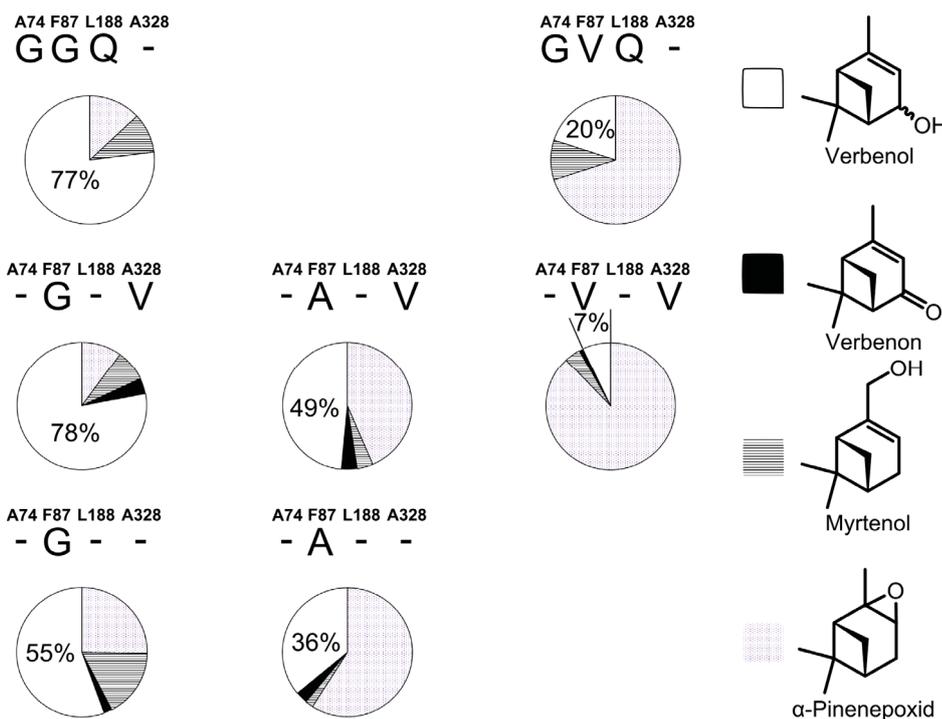


Abbildung 3.5: Regioselektivität ausgewählter P450-BM3-Varianten - Regioselektivitäten der Varianten F87G/A328V, F87A/A328V und F87V/A328V, aufgeteilt nach den vier Hauptprodukten (siehe rechts in der Abbildung). Um die Rolle der Mutationen an Position ALA-328 für die Regioselektivität des Enzyms zu beurteilen, wurden außerdem die Einzelmutationsvarianten F87G und F87A getestet. Als Referenz zu den in dieser Arbeit ermittelten Werten werden Werte aus der Literatur [105] für die dort beschriebenen P450-BM3-Varianten A74G/F87G/L188Q und A74G/F87V/L188Q gezeigt. Verbenon wurde in der erwähnten Arbeit nicht als Produkt quantifiziert.

Neben dem Einfluss auf die Regioselektivität konnte bei verschiedenen Varianten ein Unterschied bei der Stereoselektivität der Hydroxylierung wahrgenommen werden. Um den Einfluss der Mutationen F87A/G und der A328V-Mutation auf die Stereoselektivität zu beurteilen, wurden für ausgewählte Varianten neben der Aktivität gegenüber Kofaktor ($\text{TOF}_{\text{NADPH}}$) und (-)- α -Pinen (SOXR) auch die Stereoselektivität bestimmt (Tab. 3.4).

Tabelle 3.4: Bestimmung von Aktivitäten und des Diastereomerenüberschusses verschiedener P450-BM3-Varianten für die Oxyfunktionalisierung von (-)- α -Pinen

P450-BM3 Variante	$\text{TOF}_{\text{NADPH}}^1$ (min^{-1})	SOXR ² (min^{-1})	Diastereomerenüberschuss (%)	Bevorzugtes Diastereomer
F87A	43 ± 5	36 ± 5	36	(-)- <i>trans</i> -Verbenol
F87G	39 ± 2	31 ± 0	67	(-)- <i>cis</i> -Verbenol
F87G/A328V	32 ± 1	21 ± 0	40	(-)- <i>trans</i> -Verbenol
F87G/A328I	13 ± 1	11 ± 0	78	(-)- <i>trans</i> -Verbenol

¹: Rate der Kofaktoroxidation (NADPH); die $\text{TOF}_{\text{NADPH}}$ von gleichen Konzentrationen an Leervektorlysat betrug maximal 9 min^{-1} .

²: Substratoxidationsrate in Sinne von $\text{mol}_{\text{Produkt}} \text{ pro mol}_{\text{P450}}$ (für die Bildung von Verbenon wurde für die Berechnung eine zweifache Oxidation angenommen); bei parallel gemessenem Leervektorlysat wurde keine Produktbildung festgestellt.

Durch die Mutation F87G wurde im Vergleich zur Variante F87A der Diastereomenüberschuss zugunsten von (-)-*cis*-Verbenol umgekehrt. Für die Bildung von (-)-*trans*-Verbenol zeigten F87G-Varianten in Kombination mit der A328V/I-Mutation im Vergleich zur Variante F87A nicht nur eine höhere Regioselektivität bzgl. der Bildung von Verbenol (F87G/A328V: 78 %, F87G/A328I: 70 % vs. F87A: 36 %), sondern auch einen höhere Diastereomenüberschuss (F87G/A328V: 40 %, F87G/A328I: 78 % vs. F87A: 36 %). Durch Vergrößerung des Aminosäurerestes an der Position 328 zu Isoleucin konnte der Diastereomenüberschuss gegenüber der Variante F87G/A328V nochmals gesteigert werden. Zwar sank dadurch die Substratoxidationsrate, jedoch verringerte sich die Kofaktorverbrauchsrate annähernd proportional.

3.1.5 Docking von (-)- α -Pinen in F87G-Varianten von P450-BM3

Um auf molekularer Ebene begründen zu können, wie es zu dieser Umkehrung der Regioselektivität durch Einbringen von Mutationen an Position 328 kommt, wurde ein Docking des Substrats (-)- α -Pinen in das Gerüst der P450-BM3-Varianten mit der Mutation F87G durchgeführt und mit bereits veröffentlichten Ergebnissen einer MD-Simulation verglichen (Abb. 3.6).

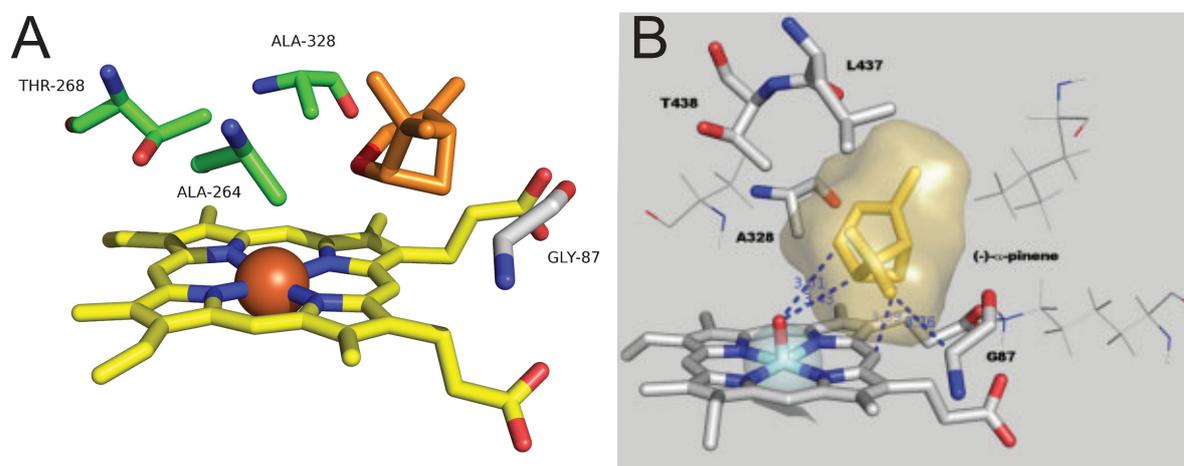


Abbildung 3.6: Vergleich des Docking in ein starres Gerüst durch AutoDock Vina mit dem Ergebnis einer MD-Simulation - A: Für ein Docking wurde die Struktur einer P450-BM3 (pdb-Datei: 2IJ2, [185]) mithilfe des Mutationswerkzeugs von PyMOL mit der F87G-Mutation versehen. In dieses starre Gerüst wurde durch die AutoDock Vina Software (-)- α -Pinen (orange) als Ligand gedockt. Nach zweifachem Docking wurde jeweils die dargestellte Pose als energiegünstigste eingestuft (vgl. Appendix 6.2). Der für die Hydroxylierung zu Verbenol benötigte allylische Kohlenstoff des (-)- α -Pinsens (rot markiert) zeigt in Richtung des Eisens im katalytischen Häm (braune Sphäre). Als Aminosäurereste (grün: wildtypische, grau: mutierte) sind die Kandidaten für die Mutagenese aus Abbildung 3.4 dargestellt. B: MD-Simulation durch Branco *et al.* [105]. Die Reproduktion der Abbildung wurde durch die freundliche Genehmigung von Wiley-Blackwell (Hoboken, USA) ermöglicht.

Die Dockings durch AutoDock Vina und MD-Simulation [105] lieferten sehr gut vergleichbare Ergebnisse. Das (-)- α -Pinen liegt in einer ähnlichen Orientierung und in beiden Fällen weist der für die Hydroxylierung zu Verbenol benötigte allylische Kohlenstoff des (-)- α -Pinsens in Richtung des Eisenatoms im Häm, was die auftretende Regioselektivität gut erklärt. Um die unterschiedliche Stereoselektivität der F87G-Varianten mit Mutationen an der Position ALA-328 zu ergründen, wurde ein Docking mit den Varianten F87G und F87G/A328I durchgeführt (Abb. 3.7), da diese laut den in Tab. 3.4 gezeigten Diastereomerenüberschüssen in Bezug auf die Stereoselektivität den größten Unterschied aufwiesen.

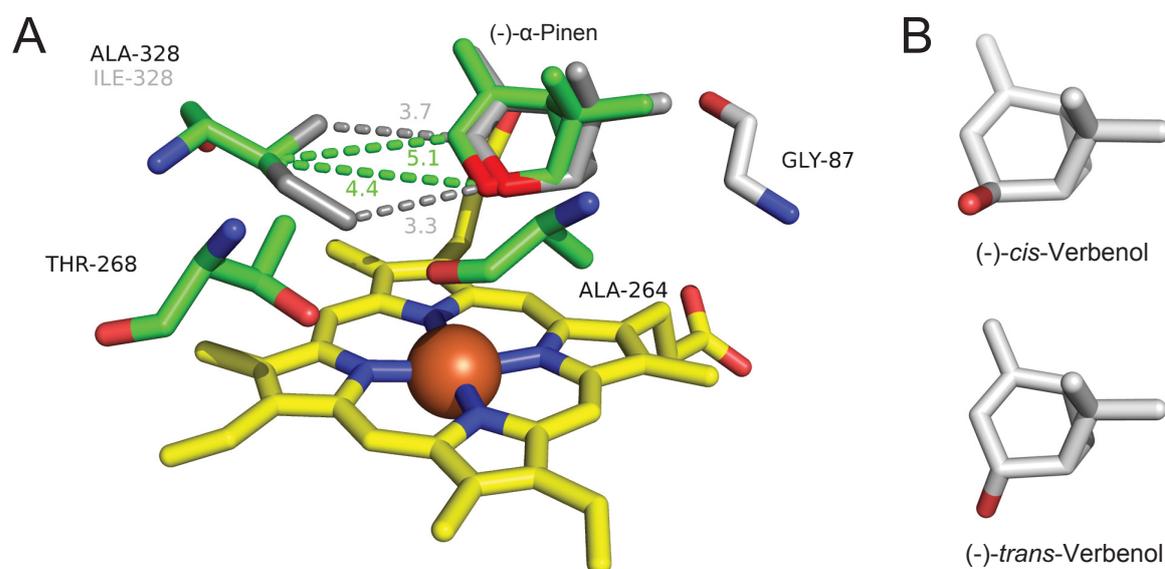


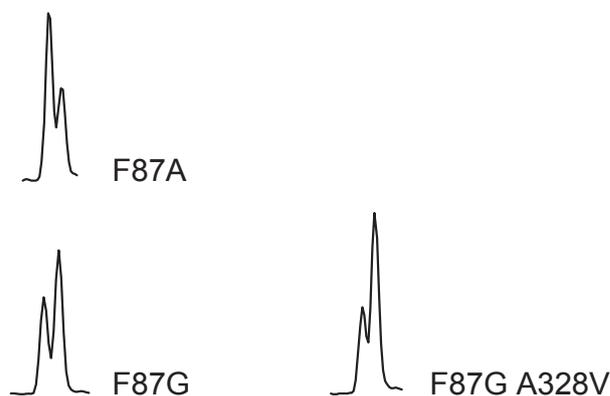
Abbildung 3.7: Übereinanderlegen der Ergebnisse des Dockings von (-)- α -Pinen in die P450-BM3-Varianten F87G und F87G/A328I - A: Die Strukturen der Varianten F87G und F87G/A328I wurden übereinander gelegt. In der linken oberen Ecke befindet sich die Position 328, die den Unterschied zwischen beiden Varianten ausmacht. Das wildtypische Alanin ist in grün dargestellt, die Substitution durch Isoleucin in grau, genau wie die zu Glycin mutierte Position 87 in der rechten oberen Ecke des Bildes. Die gedockten Moleküle des (-)- α -Pinsens sind ebenfalls übereinandergelegt (grün für Docking in F87G, grau für F87G/A328I). Ebenfalls in grün sind die Abstände (in Å) zwischen dem (-)- α -Pinen und dem Alanin, wogegen die Abstände zwischen dem (-)- α -Pinen und dem Isoleucin in grau zu sehen sind. B: Räumliche Orientierung der Hydroxygruppe bei der selektiven Hydroxylierung zu (-)-*cis*- oder (-)-*trans*-Verbenol.

Durch Substitution des Alanins an Position 328 durch Isoleucin werden die Abstände vom Aminosäurerest zum (-)- α -Pinenmolekül verkürzt und der Bewegungsspielraum im katalytischen Zentrum eingeschränkt. Auch im Docking in die Variante F87G/A328I befindet sich das (-)- α -Pinenmolekül in einer Lage, dass ein über dem Eisen des katalytischen Häm gelegenes Sauerstoffatom nahezu äquatorial zum Ring des Pinsens läge. Ein Kippen des Pinsens in eine Richtung, mit dem die Änderung der Stereoselektivität zu erklären wäre, ist nicht festzustellen. Vielmehr ist das (-)- α -Pinen in der P450-BM3-Variante F87G/A328I leicht in Richtung der Position 87 verschoben. Die Unterschiede zur Variante F87G sind insgesamt so gering, dass keine Erklärung aus den Dockings abgeleitet werden konnte.

3.1.6 Selektive P450-BM3-Varianten für die (+)- α -Pinenhydroxylierung

Parallel zur Charakterisierung der (-)- α -Pinenhydroxylierung durch P450-BM3-Varianten wurde die Bibliothek aus vorhandenen und neu geschaffenen Varianten auch zur selektiven Hydroxylierung von (+)- α -Pinen getestet. Dabei sollte zunächst beurteilt werden, ob sich die zuvor gewonnenen Erkenntnisse hinsichtlich der Regioselektivität auf das Enantiomer übertragen lassen. Die Stereoselektivität wurde lediglich qualitativ anhand von Chromatogrammen beurteilt und auf eine Bestimmung von Aktivitäten und Quantifizierung eines Diastereomerenüberschusses verzichtet. Wie bei der Hydroxylierung von (-)- α -Pinen (vgl. Abschnitt 3.1.1) bewirkten die Mutationen der Varianten ATSCVG und AQCRG eine Veränderung der Regioselektivität zugunsten von Verbenol (75 % und 66 % (+)-Verbenolanteil im Produktspektrum jeweils) im Vergleich zur F87A-Einzelmutationsvariante (nur 50 % (+)-Verbenolanteil). Dies geschah in beiden Fällen auf Kosten des Anteils von Pinenepoxid. Wie zuvor bei (-)- α -Pinen wurde auch im Falle von (+)- α -Pinen eine Steigerung des Anteils von Pinenepoxid durch Mutation der Position 87 zu Valin erreicht (Variante F87V/A328V: 70 % (+)-Pinenepoxidanteil). Im Gegensatz zur Umsetzung von (-)- α -Pinen kann im Falle von (+)- α -Pinen die Bildung von Pinenepoxid nicht durch Mutation der Position 87 zu Glycin im gleichen Maße verringert werden. So betrug der Anteil an (+)-Pinenepoxid immerhin noch 40 %. Hierzu ist im Falle von (+)- α -Pinen zusätzlich eine Mutation an der ALA-328-Position, z. B. zu Valin, nötig (nur noch 3 % (+)-Pinenepoxid). Auch ohne Quantifizierung des Diastereomerenüberschusses lassen sich qualitative Aussagen anhand der Chromatogramme machen (Abb. 3.8).

Abbildung 3.8: GC-Chromatogramm beider Verbenoldiastereomere nach Umsetzung von (+)- α -Pinen durch BM3-Varianten - Für die Umsetzung von (+)- α -Pinen durch die BM3-Varianten F87A, F87G und F87G/A328V werden Ausschnitte des Chromatogramms gezeigt, die den Doppelpeak der beiden Diastereomere (+)-*cis*- und (+)-*trans*-Verbenol zeigen. Während nach Umsetzung durch F87A der linke Peak des (+)-*cis*-Verbenols stärker ausgeprägt ist, ist bei F87G und vor allem bei F87G/A328V der rechte Peak des (+)-*trans*-Verbenols dominierend.



Lediglich für Variante F87G wurde der Diastereomerenüberschuss auch quantitativ bestimmt (Tab. 3.7). Mit 27 % zugunsten von (+)-*trans*-Verbenol wurde hier ein geringer Überschuss erzielt als bei der (-)- α -Pinenhydroxylierung. Der vielversprechendste Kandidat für die selektive Bildung von (+)-*cis*-Verbenol scheint die F87A-Variante zu sein, für (+)-*trans*-Verbenol scheint die Variante F87G/A328V am besten geeignet. Die geringe

Ausbeute an Produkt lässt hier jedoch eine geringe Kopplung von Produktbildung und Kofaktorverbrauch vermuten.

3.2 Kaskade aus P450-BM3 und ADH zur Bildung von Verbenon aus α -Pinen *in vitro*

Wie einleitend in Abschnitt 1.5.3 beschrieben, ist neben Verbenol auch Verbenon ein interessantes Produkt mit Anwendungen sowohl in der Schädlingsbekämpfung als auch als Duftstoff. In den bisher in dieser Arbeit gezeigten Umsetzungen wurde durch bloße P450-BM3-Aktivität jedoch kaum Verbenon gebildet. Diesbezüglich wies die P450-BM3-Variante AQCRG mit 6 % Verbenon im Produktspektrum den höchsten Anteil auf (vgl. Tab. 3.1). Als eine mögliche Strategie zur Anreicherung von Verbenon als Hauptprodukt wurde die Kombination der P450-BM3-Aktivität mit der Aktivität einer Alkoholdehydrogenase (ADH), die das durch die P450-BM3 gebildete Verbenol weiter zu Verbenon oxidiert, getestet (wie in Abb. 1.13 im Detail dargestellt). Hierfür wurden Bibliotheken von ADHs nach Oxidationsaktivität gegenüber Verbenol durchsucht. Da (-)-*cis*-Verbenol als einzige Konfiguration des Verbenols käuflich zu erwerben ist, wurde es als Testsubstrat für erste Screenings eingesetzt.

3.2.1 Screening von kommerziellen ADHs auf Verbenoloxidationsaktivität

Für das Screening wurden Lyophilisate von ADHs, darunter mehrheitlich Wildtypen, aber auch Varianten derselben, durch die Fa. c-Lecta (Leipzig, GER) bereitgestellt. Die Lyophilisate wurden nach Herstellerangaben gelöst und (-)-*cis*-Verbenol in Gegenwart des durch den Hersteller empfohlenen Kofaktors NAD⁺ oder NADP⁺ umgesetzt (Abb. 3.9).

Die NAD⁺-abhängigen ADHs waren ausnahmslos aktiv gegenüber (-)-*cis*-Verbenol. Da viele ADHs im Sinne eines Gleichgewichts auch die Rückreaktion von (-)-Verbenon zu (-)-Verbenol katalysieren, ist es möglich, dass ab einer gewissen Produktkonzentration gemäß dem Massenwirkungsgesetz die gewünschte Oxidation zu Verbenon und die Rückreaktion sich aufheben. Der Umsatz durch ADH-13 nahm zwischen den beiden Messpunkten nur noch wenig zu. Neben der Möglichkeit eines Aktivitätsverlustes könnte die Reaktion auch in ein solches Gleichgewicht gelaufen sein. Noch deutlicher ist es für die ADH-17, die zwar schon nach 2 Stunden fast das gesamte Substrat oxidierte (Umsatz von 97 %), aber danach nicht das gesamte Substrat aufbrauchte. Ähnlich ist es im Falle der ADH-21, die allerdings einen etwas höheren Umsatz erreichte (98 %). Anders als bei den NAD⁺-abhängigen ADHs waren unter NADP⁺-abhängigen auch Kandidaten mit keiner oder geringfügiger Aktivität.

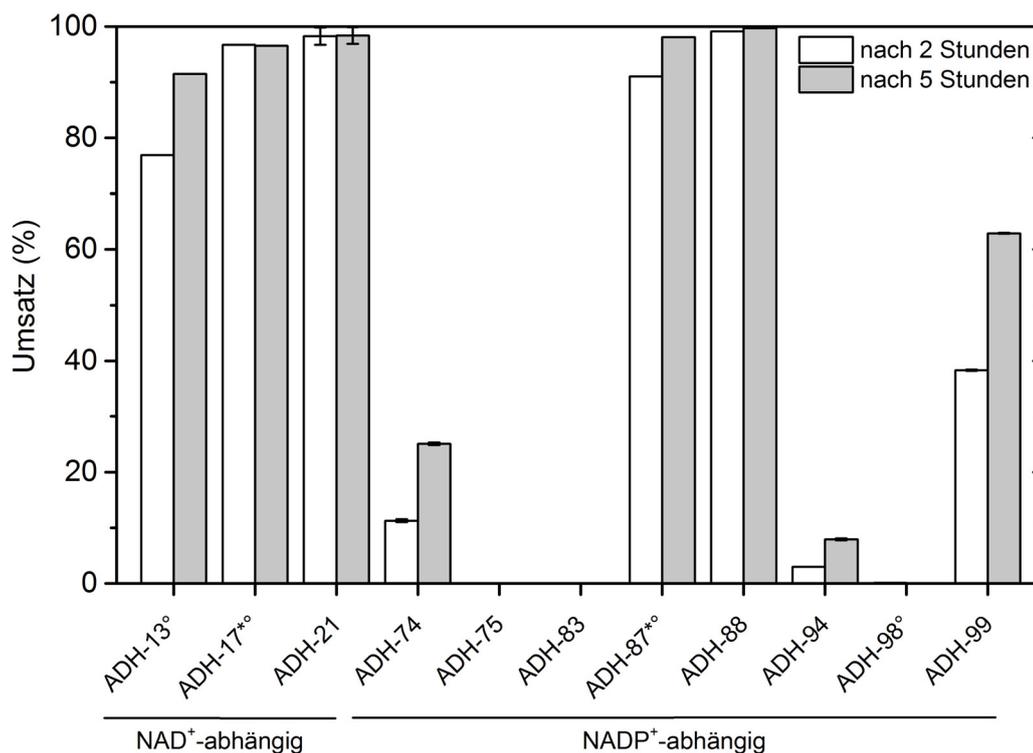


Abbildung 3.9: Verbenoloxidation durch ADHs der Fa. c-Lecta - (-)-*cis*-Verbenol wurde durch Enzymlyophilisate mit einer Aktivität von 50 mU/mL (ggü. dem jeweiligen Standardsubstrat) in Gegenwart des empfohlenen Kofaktors umgesetzt. Nach 2 und 5 Stunden wurde eine Probe genommen, die Konzentration des Substrats (-)-*cis*-Verbenol sowie des Produkts (-)-Verbenon bestimmt und ein prozentualer Umsatz errechnet.

* Enzyme wurden mit einer Standardaktivität von weniger als 50 mU/mL eingesetzt

° Messung wurde nur als Einzelbestimmung durchgeführt

Einzig ADH-87 und ADH-88 konnten ähnlich hohe Umsätze wie die NAD⁺-abhängigen ADHs vorweisen. ADH-88 konnte schon nach 2 Stunden einen Umsatz von 99 % vorweisen und bis zur fünften Stunde den Umsatz auf ≥ 99 % steigern. Somit liegt das Gleichgewicht sehr stark auf der Seite des gewünschten Produkts (-)-Verbenon. Dieser Umstand gepaart mit der NADP⁺-Abhängigkeit, die sich optimal mit der Kofaktorabhängigkeit der P450-BM3 deckt, macht die ADH-88 zum interessantesten Kandidaten dieses Screenings. Durch eine Kooperation des Instituts mit der Fa. c-Lecta wurde die Gensequenz der ADH-88 unter dem Vorbehalt der Geheimhaltung zur Verfügung gestellt. Im Rahmen der Bachelorarbeit von Roland Stief [178] wurde das Gen der ADH-88 in einen pET28-a(+)-Expressionsvektor kloniert und versehen mit einem N-terminalen His₆-tag exprimiert. So wurde die hier für das kommerzielle Lyophilisat beschriebene Aktivität für das aufgereinigte Enzym bestätigt.

3.2.2 Screening von nicht-kommerziellen ADHs auf Verbenoloxidationsaktivität

Eine Auswahl an ADHs wurde als Rohlysat durch die Arbeitsgruppe von Prof. Hummel (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, GER) zur Verfügung gestellt und je nach Empfehlung durch die bereitstellende Gruppe mit NAD⁺ und/oder NADP⁺ getestet (Tab. 3.5). Für beide aus Hefen stammenden ADHs, namentlich PpdADH1 von *Pichia pastoris* GS115 sowie Gre2p von *Saccharomyces cerevisiae*, konnte Aktivität gegenüber (-)-*cis*-Verbenol gemessen werden. Passend zur Kofaktorspezifität von P450-BM3 akzeptieren beide ADHs NADP⁺. Einzig 3 α -HSDH von *Pseudomonas testosteroni* zeigte unter den bakteriellen ADHs Aktivität gegenüber (-)-*cis*-Verbenol.

Tabelle 3.5: Liste auf Verbenoloxidation getesteter ADHs mit bekannter Aminosäuresequenz

Enzym	Ursprungsorganismus	UniProt-Code	mit NAD ⁺	mit NADP ⁺
PpADH1	<i>P. putida</i> KT2440	Q88QK2	nicht aktiv	nicht aktiv
PpADH2	<i>P. putida</i> KT2440	Q88IW8	nicht aktiv	nicht aktiv
PpADH3	<i>P. putida</i> KT2440	Q88DG3	nicht aktiv	nicht aktiv
PpADH5	<i>P. putida</i> KT2440	Q88J22	nicht aktiv	nicht aktiv
PpADH8	<i>P. putida</i> KT2440	Q88IN7	nicht aktiv	nicht aktiv
TADH	<i>Thermus sp.</i> ATN1	B2ZRE	nicht aktiv	nicht getestet
3 α -HSDH	<i>Pseudomonas testosteroni</i>	Q9ZFY9	aktiv	nicht getestet
7 α -HSDH	<i>Escherichia coli</i> K12	P0AET8	nicht aktiv	nicht getestet
7 β -HSDH	<i>Collinsela aerofaciens</i>	A4ECA9	nicht getestet	nicht aktiv
PpdADH1	<i>P. pastoris</i> GS115	nicht vorh.	nicht getestet	aktiv
Gre2p	<i>S. cerevisiae</i>	Q12068	nicht getestet	aktiv
HL-ADH S	<i>Equus caballus</i>	P00328	nicht aktiv	nicht getestet
HL-ADH E	<i>Equus caballus</i>	P00327	nicht aktiv	nicht getestet

nicht vorh. - UniProt-Code nicht verfügbar, da Enzym noch nicht hinterlegt.

3.2.3 Expression und Reinigung von P450-BM3-Varianten und ADHs

Für die Charakterisierung der beschriebenen Enzyme wurden diese versehen mit einem N-terminalen His₆-tag in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. Um die Verfälschung der Werte durch Hintergrundaktivitäten des bakteriellen Proteoms auszuschließen, wurde eine Reinigung der Enzyme über eine Ni-NTA-Matrix durchgeführt.

Expression und Reinigung von ADHs

Der Erfolg von Expression und Reinigung der ADHs wurde durch SDS-PAGE (12,5 %) überprüft (Abb. 3.10).

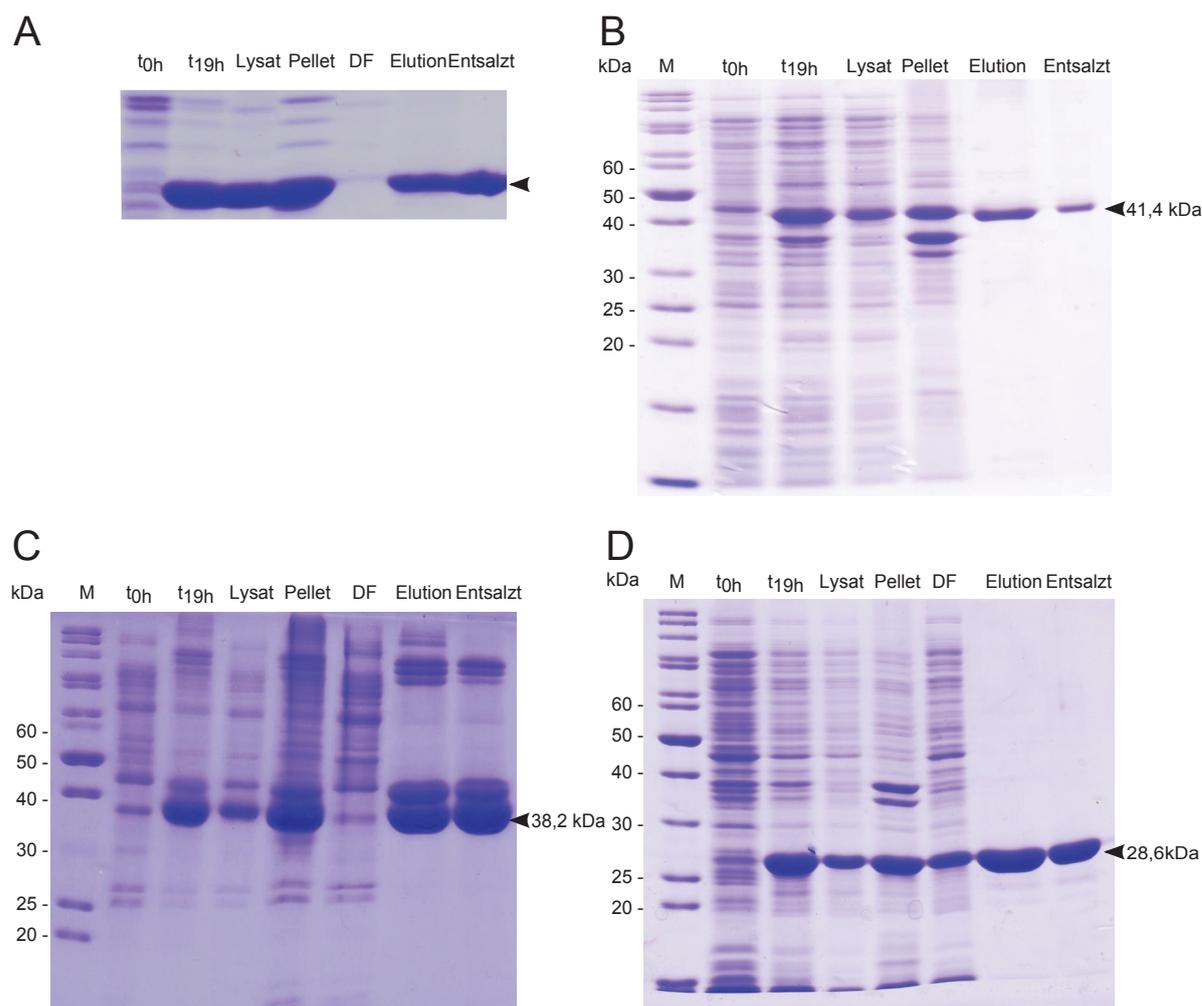


Abbildung 3.10: SDS-PAGE-Analyse der Expression und Aufreinigung aktiver ADHs -

M - Marker, t_{0h} - ganze Zellen vor Induktion, t_{19h} - ganze Zellen nach 19 Stunden Expression, Lysat - lösliche Proteinfraction nach Aufschluss, Pellet - unlösliche Proteinfraction nach Aufschluss, DF - Durchfluss bei Auftrag der löslichen Proteinfraction auf Ni-NTA-Matrix, Elution - Fraction bei Spülung mit Imidazol (100 bzw. 200 mM), Entsalzt - finale Enzympräparation nach Entsalzung; A: Proteinfractionen der Expression und Aufreinigung von ADH-88; aufgrund der Verpflichtung zur Geheimhaltung wurde für dieses Enzym nur ein Ausschnitt des Gels gezeigt und keine Molekülmasse angegeben. B: SDS-PAGE (12,5 %) der Proben für PpdADH1, C: Gre2p, D: 3α -HSDH.

Bei allen vier ADHs konnte nach 19 Stunden Expression eine Bande mit der entsprechenden Molekülmasse nachgewiesen werden. Bei allen Zellaufschlüssen verblieb ein Teil des Enzyms in der unlöslichen Fraction, jedoch wurde ein für die Charakterisierung und die anschließenden Experimente ausreichender Anteil löslich exprimiert und durch den Aufschluss in Lösung gebracht. Abgesehen von Gre2p (Abb. 3.10, C) zeigten alle Enzympräparate nach Reinigung und Entsalzung, wie durch die SDS-PAGE erkennbar, eine sehr hohe Anreicherung vom gewünschten Enzym gegenüber dem bakteriellen Proteom. Bei Gre2p waren aufgrund der großen Gesamtmenge an aufgetragenem Protein neben dem Zielenzym auch noch weitere Banden zu erkennen. Mit den gereinigten Enzympräparaten

wurden weitere spezifische Eigenschaften ermittelt. Die volumetrische Aktivität der gereinigten Enzympräparation einer jeden ADH wurde gegenüber den Kofaktoren NAD⁺ und NADP⁺ bestimmt und die resultierenden Aktivitäten ins Verhältnis gesetzt (Tab. 3.6). Hierdurch wurde demonstriert, welcher Kofaktor jeweils von den untersuchten ADHs bevorzugt wird und wie stark die Spezifität ausgeprägt ist.

Tabelle 3.6: Bestimmung der Kofaktorreduktionsaktivitäten der aufgereinigten ADHs bei der Oxidation von (-)-*cis*-Verbenol

Enzym	Verhältnis der Aktivitäten NADP ⁺ :NAD ⁺	vol. Aktivität ¹ (U/L _{TB})	spez. Aktivität ¹ (U/mg _{Protein})
ADH-88	28:1	9,31	37
PpdADH1	6,6:1	0,87	3,2
Gre2p	7,2:1	2,37	14
3 α -HSDH	1:9300	1,94	0,6

¹ Aktivität wurde mit dem jeweils bevorzugten Kofaktor gemessen.

Im Einklang mit den Vorgaben von c-LEcta bzgl. der ADH-88 (vgl. Abschnitt 3.2.1) und denen der Arbeitsgruppe Prof. Hummel für PpdADH1, Gre2p und 3 α -HSDH (vgl. Tab. 3.5) sind die Enzyme mit Ausnahme von 3 α -HSDH NADP⁺-spezifisch. Hierbei wiesen PpdADH1 und Gre2p im Vergleich die höchste Kofaktorpromiskuität auf, während 3 α -HSDH näherungsweise keine Aktivität mit dem Kofaktor NADP⁺ zeigte. Mit dem jeweils bevorzugten Kofaktor wurde die volumetrische Aktivität im Rohlysate bestimmt, mit den aufgereinigten Enzympräparaten hingegen wurden spezifische Aktivitäten gemessen (Tab. 3.6). Die höchste volumetrische Aktivität wurde mit 9,31 U/L_{TB} bei der Expression von ADH-88 erreicht, was vor allem an der hohen spezifischen Aktivität dieses Enzyms (37 U/mg_{Protein}) liegen dürfte. Die geringste volumetrische Aktivität war mit 0,87 U/L_{TB} bei PpdADH1 zu finden. Anders als bei den anderen ADHs musste die Expression bei 37 °C durchgeführt werden, da bei der für die anderen gewählte Temperatur von 30 °C keinerlei Aktivität generiert werden konnte. Die niedrigste spezifische Aktivität wurde für 3 α -HSDH gemessen (0,6 U/mg_{Protein}).

Expression und Reinigung von P450-BM3-Varianten

Für die Bestimmung einiger enzymspezifischer Parameter wurden die beiden P450-BM3-Varianten F87G und F87G/A328V ausgewählt, da diese im Vergleich die beste Regioselektivität (vgl. Abb. 3.5) für die Bildung von (-)-Verbenol aus (-)- α -Pinen aufwiesen. Zudem zeigten beide hohe Substratoxidationsraten, zugleich aber entgegengesetzte Stereoselektivität bei der Bildung von (-)-*cis*- bzw. (-)-*trans*-Verbenol (vgl. Tab. 3.4), so dass die beiden Kandidaten gut

für die stereoselektive Bildung jeweils eines der beiden Diastereomere geeignet waren. Bei der Expression der beiden P450-BM3-Varianten in *E. coli* BL21(DE3) wurden nach 19 Stunden Expressionstiter von $2 \mu\text{mol}_{\text{P450}}/\text{L}_{\text{TB}}$ (F87G) bzw. $1,5 \mu\text{mol}_{\text{P450}}/\text{L}_{\text{TB}}$ (F87G/A328V) erreicht. Das Auftreten der entsprechenden Bande auf Höhe der errechneten Molekülmasse von 121,3 kDa konnte bei einer SDS-PAGE (12,5 %) einer Probe von ganzen Zellen nach Expression festgestellt werden (Abb. 3.11).

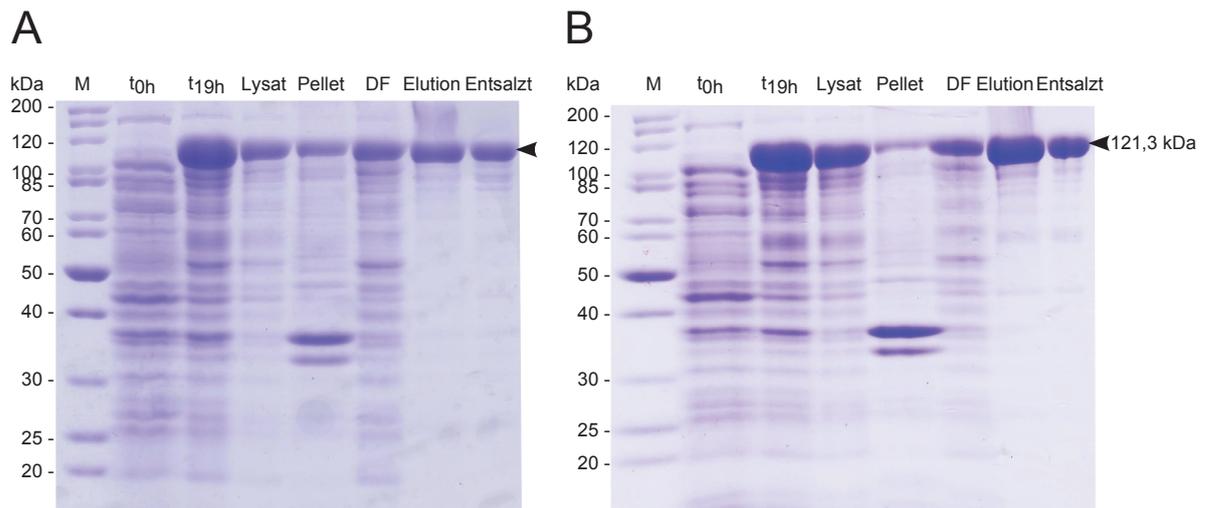


Abbildung 3.11: SDS-PAGE-Analyse von Expression und Aufreinigung der P450-BM3-Varianten F87G und F87G/A328V - A: Proteinfraktionen der Expression und Aufreinigung von P450-BM3 F87G. M - Marker, t_{0h} - ganze Zellen vor Induktion, t_{19h} - ganze Zellen nach 19 Stunden Expression, Lysat - lösliche Proteinfraktion nach Aufschluss, Pellet - unlösliche Proteinfraktion nach Aufschluss, DF - Durchfluss bei Auftrag der löslichen Proteinfraktion auf Ni-NTA-Matrix, Elution - Fraktion bei Spülung mit Imidazol (200 mM), Entsalzt - finale Enzympräparation nach Entsalzung. B: 12,5 %-ige SDS-PAGE der gleichen Proben wie bei A, lediglich für P450-BM3 F87G/A328V.

Durch Aufschluss und Zentrifugation wurden lösliche und unlösliche Proteinbestandteile getrennt. Besonders bei P450-BM3 F87G/A328V (Abb. 3.11, B) wurde das vorhandene Enzym nahezu vollständig in die lösliche Phase überführt. Bei der Reinigung aus der löslichen Phase konnte jeweils nicht die gesamte Menge des Enzyms gebunden werden und endete zum Teil im Durchfluss. In der Elutionsfraktion und im entsalzten Enzympräparat ist zu sehen, dass zwar noch weitere Banden vorhanden sind, aber eine erhebliche Anreicherung des Zielproteins gegenüber dem bakteriellen Proteom stattgefunden hat. Da zuvor die Aktivität der P450-BM3-Varianten gegenüber dem Kofaktor ($\text{TOF}_{\text{NADPH}}$) mit Lysaten bestimmt wurde (Tab. 3.4), konnte $k_{\text{cat,NADPH}}$ aufgrund der Hintergrundaktivität der im Lysat enthaltenen Enzyme nicht zweifelsfrei ermittelt werden. Nach Reinigung der beiden Varianten konnte dies nun für diese durchgeführt werden. Dabei wurden Werte von $51 \pm 4 \text{ min}^{-1}$ für die Variante F87G und $38 \pm 1 \text{ min}^{-1}$ für die Variante F87G/A328V ermittelt. Beide Werte liegen etwas höher als die im Rohlysat bestimmten Werte (F87G: $39 \pm 2 \text{ min}^{-1}$, F87G/A328V: $32 \pm 1 \text{ min}^{-1}$), jedoch ist auch hier die Variante F87G aktiver als F87G/A328V.

3.2.4 Kaskade aus P450-BM3 F87G und ausgewählten Alkoholdehydrogenasen

Im Abschnitt 3.1 wurde dargestellt, wie in einem rationalen Ansatz durch ortsgerichtete Mutagenese Regio- und Stereoselektivität der P450-BM3 bei der Oxidation von α -Pinen gelenkt werden kann. Durch die Aktivität von ADHs sollten nun die bereits vorhandenen Diastereomerenüberschüsse bei der Bildung von Verbenol weiter erhöht und durch die Bildung von Verbenon ein weiteres Produkt selektiv zugänglich gemacht werden. Hierfür wurde eine Kaskade aus zwei Enzymen für die Bildung von Verbenon aus α -Pinen etabliert (vgl. mit Abb. 1.13). Für den ersten Schritt der zu etablierenden Kaskade wurde die P450-BM3-Variante F87G eingesetzt. Die Variante F87G zeigte beim Umsetzen von (-)- α -Pinen eine hohe Substratoxidationsrate und oxidierte einen beträchtlichen Teil des Substrats zu (-)-*cis*-Verbenol (vgl. Tab. 3.4). Da (-)-*cis*-Verbenol im Screening der ADHs eingesetzt wurde (Abschnitt 3.2.1 und 3.2.2), würde der Einsatz dieser Variante somit gewährleisten, dass große Mengen des entstehenden Verbenols durch die ADHs zu Verbenon umgesetzt werden. Für die Kaskade wurde die F87G-Variante in einer Eintopfreaktion simultan mit jeweils einer der als aktiv getesteten ADHs in gereinigter Form eingesetzt (Abschnitt 3.2.3) und die Umsetzung von (-)- und (+)- α -Pinen getestet (Abb. 3.12 und 3.13).

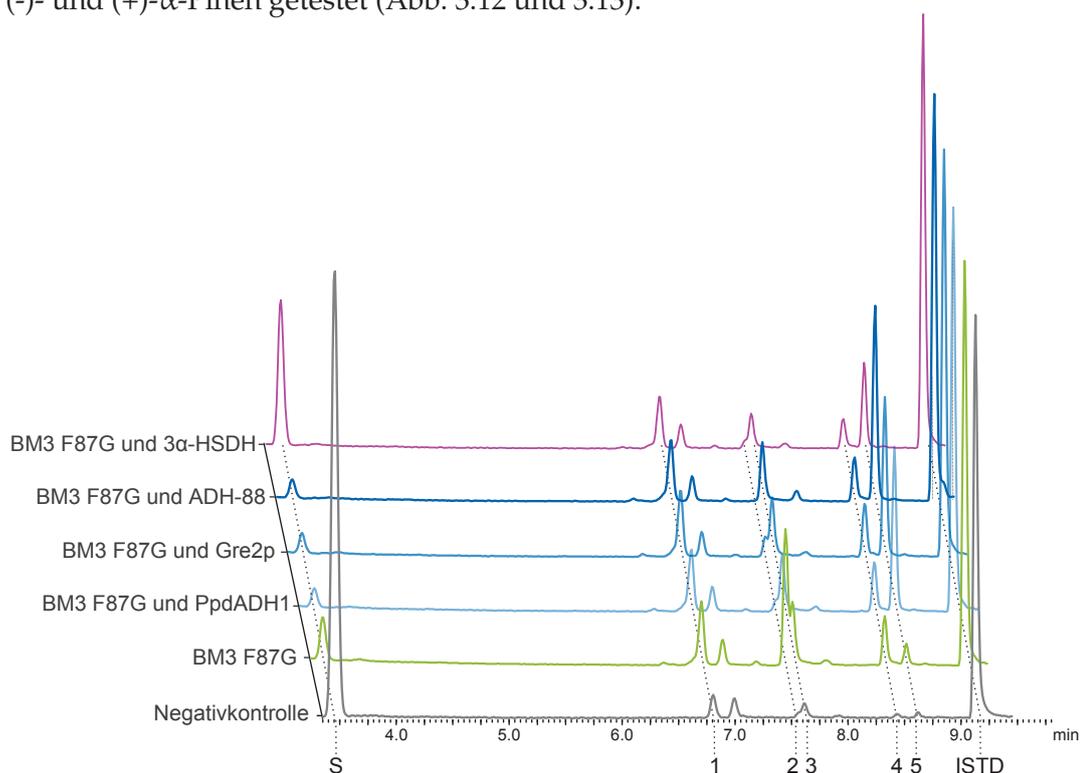


Abbildung 3.12: GC/MS-Analyse der Umsetzung von (-)- α -Pinen durch eine Kaskade aus P450-BM3 F87G und ADHs - Durch gezielten Einsatz einer stereoselektiven Variante der P450-BM3 wurde vornehmlich (-)-*cis*-Verbenol hergestellt (grün). Für die Oxidation von Verbenol zu Verbenon wurden NADP⁺-abhängige (blaue Linien) und eine NAD⁺-abhängige ADH (pink) getestet. S: (-)- α -Pinen, 1: (-)- α -Pinenepoxid, 2: (-)-*cis*-Verbenol, 3: (-)-*trans*-Verbenol, 4: (-)-Myrtenol, 5: (-)-Verbenon. Substrat ohne Enzym (Negativkontrolle) in grau.

Wie im Abschnitt 3.1.4 für die Oxidation von (-)- α -Pinen durch die F87G-Variante gezeigt (vgl. Abb. 3.5), wurde auch hier vor allem (-)-*cis*-, aber auch (-)-*trans*-Verbenol sowie (-)-Pinenepoxid, (-)-Myrtenol und (-)-Verbenon gebildet (Abb. 3.12). Die Kombination der F87G-Variante mit ADHs führte dabei zu einer vermehrten Bildung von (-)-Verbenon. Bemerkenswerterweise wurden die beiden Diastereomere (-)-*cis*- und (-)-*trans*-Verbenol nicht gleichermaßen zu (-)-Verbenon oxidiert, es konnte eine stereoselektive Präferenz der ADHs für das bereits beim Screening genutzte (-)-*cis*-Verbenol festgestellt werden.

Das Substrat (+)- α -Pinen (Abb. 3.13) wurde durch P450-BM3 F87G zu (+)-*trans*-Verbenol im Überschuss gegenüber (+)-*cis*-Verbenol umgesetzt (vgl. Abb. 3.8), neben anderen Produkten wie zwei Diastereomeren des (+)-Pinenepoxids, (+)-Myrtenol und (+)-Verbenon und weiteren nicht identifizierten Produkten. Auch bei (+)- α -Pinen wurde, wie zuvor bei (-)- α -Pinen, durch alle getesteten ADHs vornehmlich das *cis*-Diastereomer vom Verbenol zu Verbenon oxidiert, so dass in diesem Falle (+)-*trans*-Verbenol in recht hohem Diastereomerenüberschuss übrig zu bleiben schien.

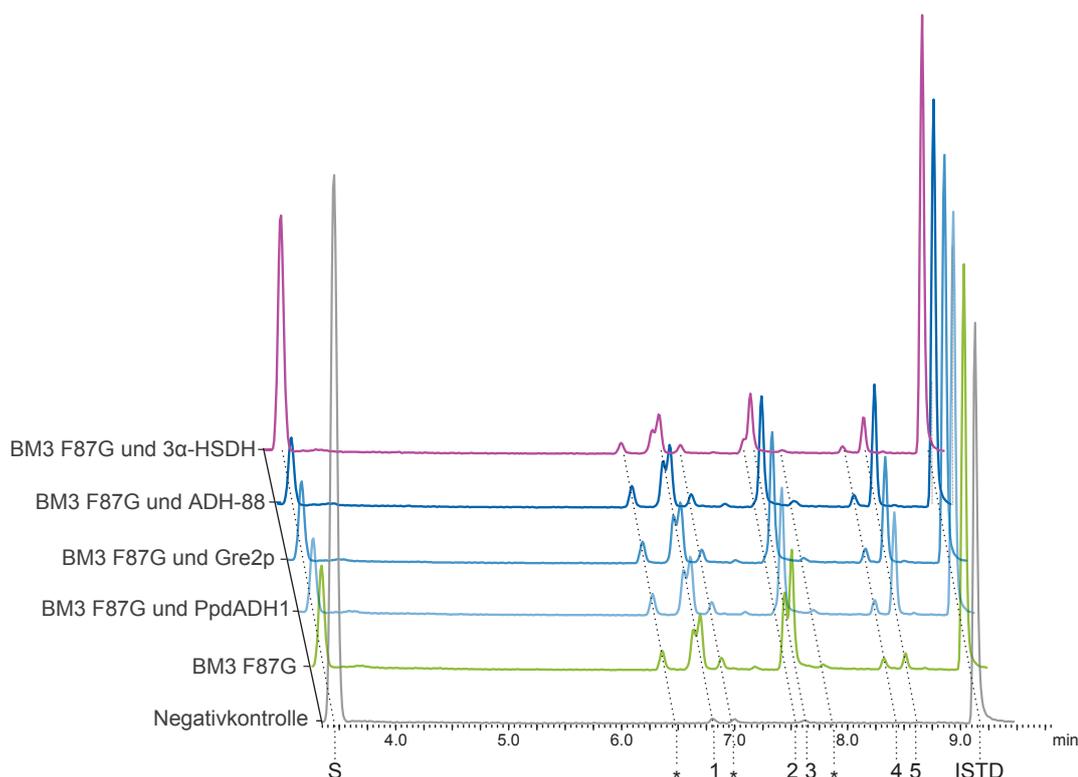


Abbildung 3.13: GC/MS-Analyse der Umsetzung von (+)- α -Pinen durch eine Kaskade aus P450-BM3 F87G und ADHs - Wie im Abschnitt 3.1.6 beschrieben, wird durch die P450-BM3-Variante F87G vorwiegend das (+)-*trans*-Diastereomer des Verbenols gebildet (grün). Für die Oxidation von Verbenol zu Verbenon wurden NADP⁺-abhängige (blaue Linien) und eine NAD⁺-abhängige ADH (pink) getestet. S: (+)- α -Pinen, 1: Zwei Diastereomere des (+)- α -Pinenepoxids, 2: (+)-*cis*-Verbenol, 3: (+)-*trans*-Verbenol, 4: (+)-Myrtenol, 5: (+)-Verbenon; * -nicht identifiziertes Produkt. Substrat ohne Enzym (Negativkontrolle) in grau.

Um die Stereoselektivität der ADHs zu bewerten, wurden die Proben anschließend auch mittels einer chiralen stationären Phase gaschromatographisch aufgetrennt. Durch die bessere Auftrennung der Diastereomerenpeaks auf dieser Phase wurden die Peaks der Diastereomere vollständig getrennt (Appendix 6.3) und durch Peakflächenvergleich zum Teil hohe Diastereomerenüberschüsse (*de*) errechnet (Tab. 3.7).

Tabelle 3.7: Bestimmung des Diastereomerenüberschusses nach Umsetzung von (-)- und (+)- α -Pinen mit einer Kaskade aus P450-BM3-Variante F87G und ausgewählten ADHs

Substrat	Alkohol-dehydrogenase	Kofaktor	Diastereomerenüberschuss (%)	Diastereomer im Überschuss
(-)- α -Pinen	ohne	NADPH	36	(-)- <i>cis</i> -Verbenol
	ADH-88	NADPH	99	(-)- <i>trans</i> -Verbenol
	Gre2p	NADPH	60	(-)- <i>trans</i> -Verbenol
	PpdADH1	NADPH	75	(-)- <i>trans</i> -Verbenol
	3 α -HSDH	NADH	28	(-)- <i>trans</i> -Verbenol
(+) - α -Pinen	ohne	NADPH	36	(+)- <i>trans</i> -Verbenol
	ADH-88	NADPH	94	(+)- <i>trans</i> -Verbenol
	Gre2p	NADPH	98	(+)- <i>trans</i> -Verbenol
	PpdADH1	NADPH	99	(+)- <i>trans</i> -Verbenol
	3 α -HSDH	NADH	71	(+)- <i>trans</i> -Verbenol

Durch ADH-88 wurde selbst bei der Umsetzung von (-)- α -Pinen, bei der (-)-*cis*-Verbenol das Hauptprodukt der P450-katalysierten Reaktion war, das (-)-*cis*-Verbenol annähernd restlos mit hoher Stereoselektivität (*de*: 99 %) zu (-)-Verbenon umgesetzt. Die Umsetzung von (+)- α -Pinen zeigte, dass neben der Möglichkeit Verbenon zu bilden, die Kaskade auch das Potential besitzt, eine kinetische Diastereomerentrennung durchzuführen und *trans*-Verbenol in hohem Diastereomerenüberschuss herzustellen. Hierbei zeigen sich Gre2p und PpdADH1 als besonders geeignet einen exzellenten Diastereomerenüberschuss (jeweils 98 bzw. 99 % *de* von (+)-*trans*-Verbenol) zu erzielen. Beim Vergleich der Substratpeaks war festzustellen, dass in der Kaskade mit der ADH mehr Substrat umgesetzt wurde als durch die alleinige Anwendung von P450-BM3 F87G. Um zu ergründen, ob dies im Zusammenhang mit der Kofaktorregeneration durch die ADH stand, wurde die Konzentration des zugesetzten Kofaktors während des Versuchsverlaufs durch photometrische Messung verfolgt (Abb. 3.14).

Bei der Oxidation von (-)- α -Pinen (Abb. 3.14, A) war die Aktivität der P450-BM3 dominierend. Der Kofaktor wurde innerhalb weniger Minuten verbraucht und im Falle der Kombination mit PpdADH1 und Gre2p war auch keine große Abweichung im Vergleich

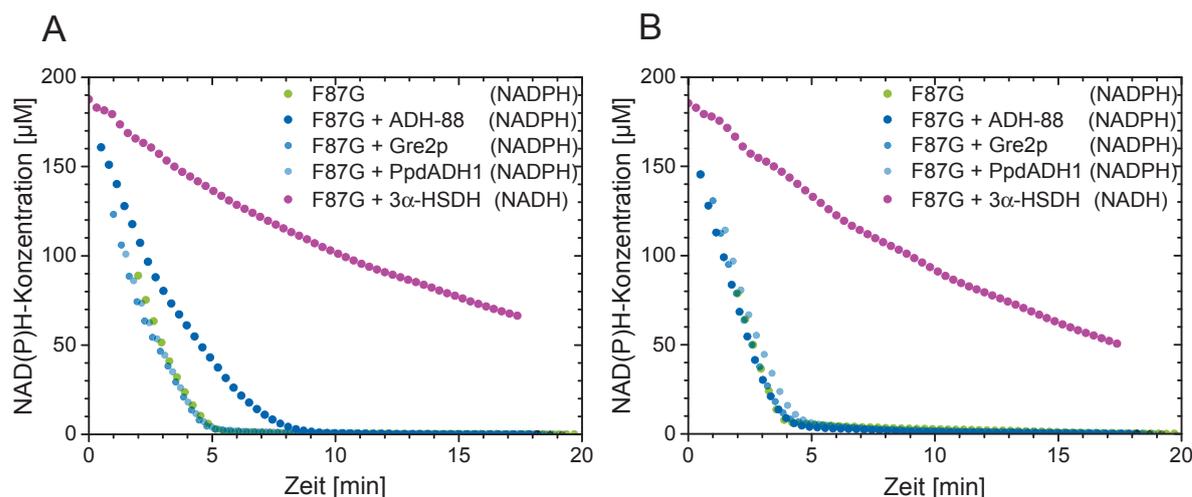


Abbildung 3.14: NAD(P)H-Konzentration im Verlauf der Pinenoxidation durch eine Kaskade aus P450-BM3 F87G und ausgewählter ADHs - A: Der dargestellte Verlauf der NAD(P)H-Konzentration während der Oxidation von (-)- α -Pinen wurde photometrisch bei 340 nm bestimmt und mittels des Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{340\text{nm}}=6,22 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ umgerechnet. Gemessen wurden P450-BM3 F87G allein oder in Kombination mit einer der jeweiligen ADHs. B: Im Unterschied zu A ist hier der Verlauf der NAD(P)H-Konzentration während der Oxidation von (+)- α -Pinen dargestellt.

zur Umsetzung ohne ADH zu erkennen. Die Aktivität der Oxidationsreaktion von (-)-*cis*-Verbenol zu (-)-Verbenon durch die beiden ADHs sowie die daran gekoppelte Regeneration von NADP^+ war im Vergleich zur Aktivität der P450-BM3 so gering, dass die Konzentration des reduzierten Kofaktors nicht nennenswert erhöht werden konnte. Einzig im Falle der Kombination mit ADH-88 schien der Kofaktorverbrauch durch die Oxidationsreaktion von (-)-*cis*-Verbenol zu (-)-Verbenon und die daran gekoppelte Regeneration von NADP^+ gedrosselt zu verlaufen.

Obwohl NADPH durch die Reduktasedomäne der P450-BM3 als Kofaktor bevorzugt wird, wird NADH ebenfalls, jedoch mit niedriger Effizienz, akzeptiert [49, 101, 193, 194]. So beträgt die Michaelis-Konstante K_m für NADPH 2,5 μM , für NADH hingegen 1430 μM . Ebenso wurden mit 7930 min^{-1} höhere Wechselzahlen (k_{cat}) für NADPH gemessen als für NADH mit lediglich 2810 min^{-1} in der gleichen Reaktion [194]. Auch im hier gezeigten Falle wird NADH verbraucht und steht der NAD^+ -abhängigen 3α -HSDH für die Oxidation von Verbenol zu Verbenon zur Verfügung. Die niedrigere Steigung dürfte wie im beschriebenen Falle für eine verminderte Aktivität der P450-BM3 F87G mit NADH im Vergleich zu NADPH als Kofaktor sprechen. Auch bei der Oxidation von (+)- α -Pinen (Abb. 3.14, B) verläuft die Reaktion mit NAD^+ -abhängiger ADH langsamer ab als mit NADP^+ -abhängiger. Unter den Reaktionen mit NADPH sind kaum Unterschiede im Verlauf festzustellen, auch zur Reaktion ohne ADH. Anders als noch bei der Oxidation von (-)- α -Pinen ist im Falle der Kombination aus P450-BM3 F87G und ADH-88 keine Verzögerung des Kofaktorverbrauchs zu erkennen.

Aufgrund nur geringer Konzentration eines für die ADH als Substrat geeigneten Produkts der P450-Reaktion oder nur geringer Aktivität diesem Substrat gegenüber, dürfte die ADH-88 nicht oder geringfügig dem Verbrauch des Kofaktors durch Regeneration von NADP⁺ entgegengewirkt haben.

3.2.5 Screening von ADHs nach Aktivität gegenüber (-)-*trans*-Verbenol

Da (-)-*cis*-Verbenol als einzige Konfiguration des Verbenols käuflich zu erwerben ist, wurde es in einem Assay zur Prüfung auf Aktivität von Enzymen eingesetzt (Abschnitt 3.2.1 und 3.2.2). Erste Versuche mit Kaskaden aus P450-BM3 und den als aktiv getesteten ADHs offenbarten, dass alle eine Stereoselektivität zugunsten der Oxidierung von *cis*-Verbenol aufwiesen (Abschnitt 3.2.4). Ist jedoch Verbenon das Zielprodukt wird hier durch die fehlende Oxidation von *trans*-Verbenol das zur Verfügung stehende Verbenol nicht vollständig genutzt. Durch Ergänzung der beschriebenen Kaskaden mit einer weiteren *trans*-selektiven ADH könnte dieses Potential voll ausgeschöpft werden. Durch alleinige Anwendung der *trans*-selektiven ADH könnte darüber hinaus auch (+)-*cis*-Verbenol, wie für die beiden *trans*-Enantiomere im Abschnitt 3.2.4 gezeigt, selektiv mit hohem Diastereomerenüberschuss gebildet werden.

Für die dafür notwendigen Screenings der ADHs musste (-)-*trans*-Verbenol zunächst gebildet werden. Im Abschnitt 3.1.4 wurde mit P450-BM3 F87G/A328V eine durch ortsspezifische Mutagenese erzeugte Variante vorgestellt, die (-)- α -Pinen mit einer Substratoxidationsrate von 21 min⁻¹ und der gewünschten Regio- und Stereoselektivität (78 % Verbenolanteil im Produktspektrum, *de*: 40 %_{*trans*}) zu (-)-*trans*-Verbenol umsetzt. Um eine *trans*-selektive ADH optimal in ein modulares System aus P450-BM3 und NADP⁺-abhängigen ADHs wie ADH-88 und Gre2p zu integrieren, wurden alle in den bisherigen Screenings mit (-)-*cis*-Verbenol als inaktiv beurteilten, NADP⁺-abhängigen ADHs nochmals, aber auf Aktivität gegenüber (-)-*trans*-Verbenol, getestet. So wurde bestimmt, ob unter den ADHs Kandidaten stereospezifisch (-)-*trans*-Verbenol umsetzen und damit das System, analog zu Abb. 1.13, für eine vollständige Umsetzung zu Verbenon ergänzen können.

Im ersten Schritt der Reaktion wurde (-)- α -Pinen durch die P450-BM3-Variante F87G/A328V unter Verbrauch von NADPH hauptsächlich zu (-)-*trans*-Verbenol umgesetzt. Durch Zugabe der entsprechenden ADH sollte nun in einem zweiten Schritt (-)-*trans*-Verbenol zu (-)-Verbenon oxidiert werden. Der Verlauf der Absorption bei 340nm zeigte keine Regeneration von NADP⁺ durch die ADHs (Daten nicht gezeigt). Ein möglicher Grund dafür könnte neben mangelnder Aktivität der ADHs auch sein, dass das NADPH sofort wieder durch die noch enthaltene P450-BM3 oxidiert wurde. Darum wurde jeder Assay extrahiert und die entstandenen Produkte auf der GC/MS analysiert (Abb. 3.15).

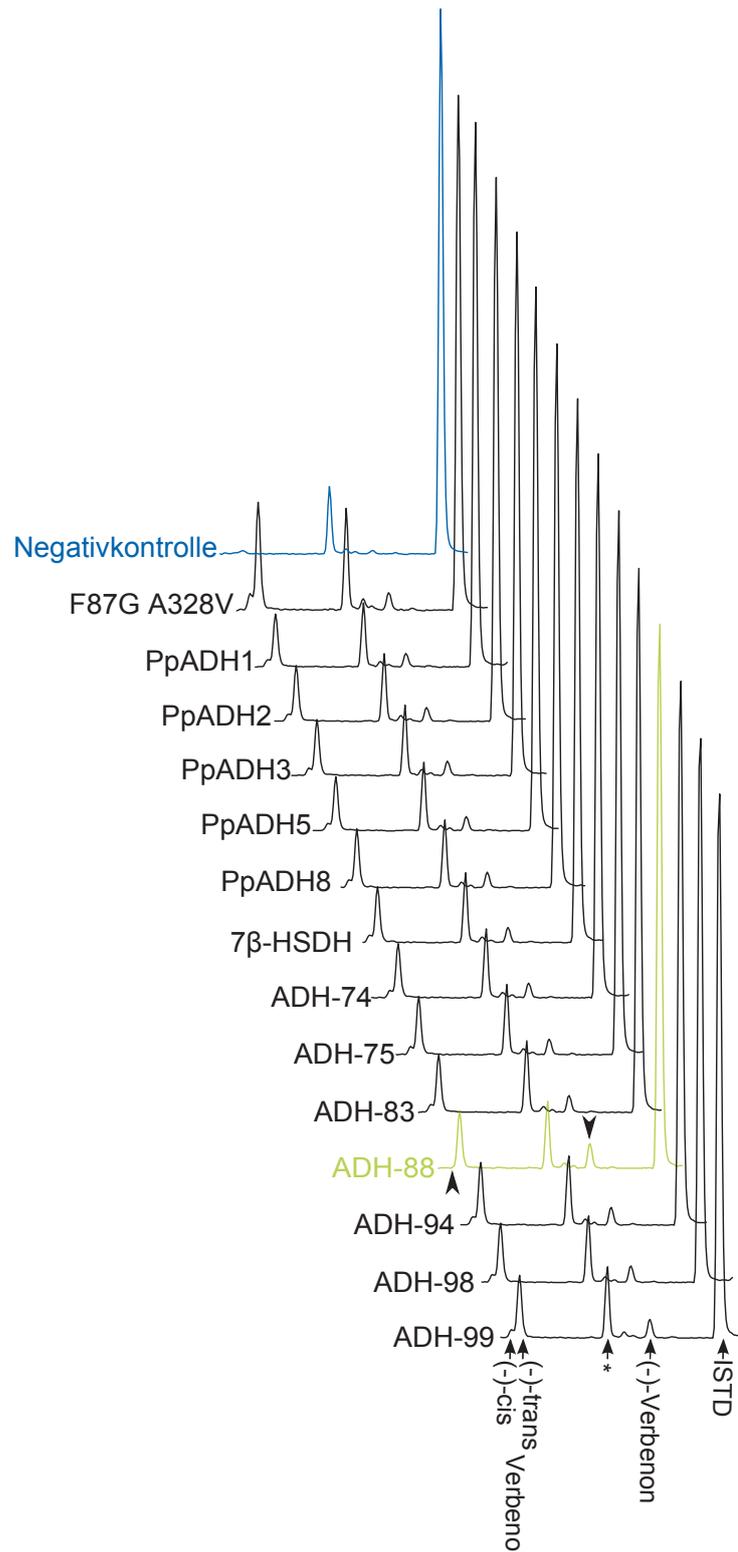


Abbildung 3.15: GC/MS-Analyse nach Umsetzung von (-)- α -Pinen durch eine Kaskade aus P450-BM3 F87G/A328V und NADP⁺-abhängigen ADHs - Durch den gezielten Einsatz der stereoselektiven P450-BM3-Variante F87G/A328V konnte aus (-)- α -Pinen vornehmlich (-)-*trans*-Verbenol (rechte Schulter im Doppelpeak links) hergestellt werden, um die Aktivität der ADH-Bibliothek gegenüber (-)-*trans*-Verbenol zu testen. Die Aktivität sollte durch eine Abreicherung des *trans*-Diastereomers und eine Anreicherung des (-)-Verbenons gezeigt werden. Als Positivkontrolle wurde auch ADH-88 (in grün) getestet. Hier konnte eine Anreicherung von (-)-Verbenon (Pfeil rechts) festgestellt werden, jedoch einzig durch Verbrauch von (-)-*cis*-Verbenol (Pfeil links). * - Verunreinigung durch Tetradecen (siehe Negativkontrolle in blau mit Substrat, aber ohne Enzyme).

Die Umsetzung von (-)-*trans*-Verbenol verblieb erfolglos. Keine der getesteten ADHs vermochte im verwendeten Reaktionssystem das Substrat in relevanten Mengen umzusetzen.

3.2.6 Screening von potentiellen Kosubstraten für verbenoxidierende ADHs

Obwohl die BMR der P450-BM3 den Kofaktor NADPH oxidiert und die ADH ihn wieder reduziert, ist diese Kaskade, auch wenn das Reaktionsschema (vgl. Abb. 1.13) es suggeriert, nicht redoxneutral. Denn es können neben der Hydroxylierung von α -Pinen zu *cis*-Verbenol noch weitere Nebenprodukte entstehen, die nicht von der ADH akzeptiert werden, wie z.B. Pinenepoxid. Zudem gehen bereits auf die CYP übertragende Elektronen in Kurzschlussreaktionen verloren, wodurch die Kofaktoroxidation von der Substratoxidation entkoppelt ist (vgl. Abb. 1.3). Die Zeit bis zum Auslaufen der Reaktion in Folge vollständiger Oxidation des Kofaktors wurde verlängert, wie im Falle der ADH-88 ersichtlich (vgl. Abb. 3.14), ohne dass jedoch vollständige Umsätze erreicht wurden (vgl. Abb. 3.12 und 3.13). Eine mögliche Option wäre die Zugabe eines weiteren Enzyms, welches den Kofaktor regeneriert (Tab. 1.1). Jedoch führte dies in ähnlichen Kaskaden zu unvollständigen Umsätzen durch die ADH [49, 101], vermutlich in Folge von vollständiger Reduktion des Kofaktors durch das zugegebene Enzym und daraus folgend einem Mangel an oxidiertem Kofaktor für die ADH-Reaktion. Durch die Bereitstellung eines Kosubstrats, d.h. eines weiteren Substrats für die ADH, mit im Vergleich zum eigentlichen Substrat niedriger relativer Aktivität kann die Regeneration des Kofaktors durch die ADH unterstützt und die Produktausbeute erhöht werden [101]. Für diese Arbeit wurden deswegen die gereinigten ADHs, die in Abschnitt 3.2.4 getestet wurden, bezüglich ihrer Aktivität gegenüber anderen, preiswerten Alkoholen durchgemustert. Diese Aktivität wurde in Verhältnis zur Aktivität gegenüber dem Substrat (-)-*cis*-Verbenol gesetzt (Abb. 3.16) und wird im Folgenden relative Aktivität genannt.

Im Bereich der kurzkettigen, sekundären Alkanole (erste Zeile der Abb. 3.16) zeigten alle ADHs nur eine geringfügige Aktivität. Darunter war die Aktivität von PpdADH1 gegenüber 2-Pentanol die höchste mit einer relativen Aktivität von 2,7 %. Stereo- und Regioselektivität waren bei allen ADHs ausgeprägt. Während der primäre Alkohol 1-Oktanol kein gutes Substrat darstellte (<0,3 %), nahm die Aktivität beim sekundären Alkohol 2-Oktanol zu (um mehr als Faktor 10). Alle ADHs besaßen eine Stereoselektivität, wie durch die Umsetzung von enantiomerenreinem 2-Oktanol gezeigt werden konnte. ADH-88, PpdADH1 und Gre2p zeigten eine höhere Aktivität gegenüber (S)-2-Oktanol, welches genauso (S)-konfiguriert ist wie (-)-*cis*-Verbenol. 3 α -HSDH hingegen zeigte eine leicht höhere Aktivität gegenüber (R)-2-Oktanol. Bemerkenswert war, dass die Aktivität gegenüber dem racemischen 2-Oktanol im Falle von ADH-88 und Gre2p nicht dem Mittelwert der beiden Aktivitäten gegenüber den

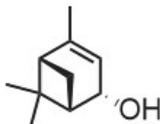
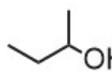
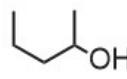
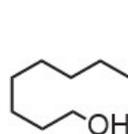
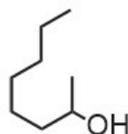
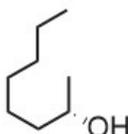
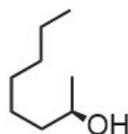
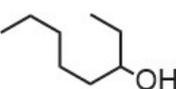
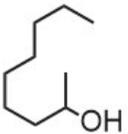
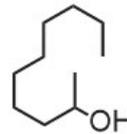
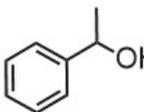
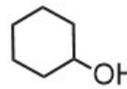
					
	(-)- <i>cis</i> -Verbenol	2-Propanol	2-Butanol	2-Pentanol	
ADH-88:	100%	0,0±0,0%	0,2±0,0%	0,8±0,0%	
PpdADH1:	100%	0,1±0,0%	0,2±0,0%	2,7±0,0%	
Gre2p:	100%	0,0±0,0%	0,0±0,0%	0,2±0,0%	
3 α -HSDH:	100%	0,01±0,00%	0,01±0,00%	0,01±0,00%	
					
	1-Oktanol	2-Oktanol	(S)-2-Oktanol	(R)-2-Oktanol	3-Oktanol
ADH-88:	0,3±0,0%	4,7±0,5%	18,2±0,8%	0,3±0,1%	9,3±0,9%
PpdADH1:	0,2±0,0%	4,8±0,4%	7,5±0,2%	0,4±0,0%	0,4±0,0%
Gre2p:	0,1±0,0%	1,2±0,0%	11,9±1,8%	0,1±0,0%	0,4±0,0%
3 α -HSDH:	0,02±0,00%	0,21±0,00%	0,13±0,00%	0,27±0,00%	0,50±0,00%
					
	2-Nonanol	2-Dekanol	1-Phenylethanol	Cyclohexanol	
ADH-88:	8,7±0,4%	5,2±0,2%	1,4±0,1%	3,1±0,1%	
PpdADH1:	4,7±0,2%	6,6±0,6%	0,6±0,0%	0,2±0,0%	
Gre2p:	1,4±0,0%	1,0±0,0%	0,1±0,1%	0,0±0,0%	
3 α -HSDH:	0,36±0,00%	0,39±0,00%	0,18±0,00%	0,08±0,00%	

Abbildung 3.16: Relative Aktivitäten der ADHs gegenüber ausgewählten Alkoholen im Vergleich zu (-)-*cis*-Verbenol - Gereinigte Präparate der in Abschnitt 3.2.4 in der Kaskade mit P450-BM3 getesteten ADHs wurden in ihrer Aktivität gegenüber ausgewählten Alkoholen getestet und ihre Aktivität in Verhältnis zur Aktivität gegenüber (-)-*cis*-Verbenol gestellt. Die Aktivität gegenüber (-)-*cis*-Verbenol wurde dementsprechend für alle ADHs gleich 100 % gesetzt.

Enantiomeren entsprach, sondern deutlich unter dem Mittelwert lag. Das (R)-Enantiomer könnte hier als kompetitiver Inhibitor gewirkt haben. Der Einsatz von enantiomerenreinem Kosubstrat wäre indes aus ökonomischer Sicht nicht sinnvoll. Im Falle von ADH-88 und 3 α -HSDH nahm die Aktivität für 3-Oktanol im Vergleich zu 2-Oktanol nochmals zu (jeweils 9,3 statt 4,7 % und 0,5 statt 0,21 %), für PpdADH1 und Gre2p hingegen wieder ab (jeweils 0,4 statt 4,8 % und 0,4 statt 1,2 %). Für 2-Nonanol nahm die Aktivität für ADH-88 und 3 α -HSDH gegenüber 2-Oktanol zu (jeweils 8,7 und 0,36 %), während für die anderen beiden kein Zuwachs zu verzeichnen war. Bei 2-Dekanol war nur noch für PpdADH1 ein Zuwachs zu erreichen (6,6 % statt 4,7 % für 2-Nonanol). Die Trübung des Assays sprach hier allerdings dafür, dass 2-Dekanol nicht mehr ausreichend löslich unter den Bedingungen der Umsetzung (2 % DMSO) war. Neben Alkanolen wurden 1-Phenylethanol und Cyclohexanol als Kosubstrat getestet. Beide sind recht preisgünstig und weisen strukturelle Ähnlichkeiten

zu (-)-*cis*-Verbenol auf. Lediglich ADH-88 zeigte brauchbare Aktivität, vor allem gegenüber Cyclohexanol (3,1 %). Insgesamt wurden für die drei NADP⁺-abhängigen ADHs gut anwendbare relative Aktivitäten teilweise im hohen einstelligen Prozentbereich gefunden. Für die 3 α -HSDH waren die relativen Aktivitäten sehr niedrig, im besten Falle gerade 0,5 % gegenüber 3-Oktanol. Für die Strategie der Zugabe von Kosubstrat ist dieses Enzym das am wenigsten geeignete.

3.2.7 Kosubstratunterstützte *in vitro*-Kaskade

Wie in Abschnitt 3.2.4 beschrieben, kann die kofaktorregenerierende Aktivität der ADHs die Zeit bis zur Erschöpfung des reduzierten Kofaktors verlängern (Abb. 3.14) und damit unter Umständen den Umsatz erhöhen. Die in Abschnitt 3.2.6 getesteten Kosubstrate wurden dafür eingesetzt, diesen Effekt weiter zu verstärken und mit gleichem Einsatz an Kofaktor höheren Umsatz zu generieren. Die Auftaktreaktion der Kaskade wurde durch zwei verschiedene P450-BM3-Varianten durchgeführt. Zum einen wurde die Variante F87G gewählt (Tab. 3.8), da sie in großem Maße (-)- α -Pinen zu (-)-*cis*-Verbenol umsetzt (vgl. Tab. 3.4), welches wiederum ein Substrat für die ADH-88 darstellt. In dieser Kombination lag der Fokus auf der Bildung von (-)-Verbenon. Es wurde getestet, ob die zusätzliche Anwesenheit von Kosubstrat die Umsätze noch steigern kann. Die P450-BM3-Variante F87G/A328V (Tab. 3.9) hingegen bildet vornehmlich (-)-*trans*-Verbenol. Da dies kein Substrat für die ADH-88 ist (vgl. Abb. 3.15), konnte sie durch Verbenoloxidation nur wenig Kofaktorregeneration betreiben. Sie sollte aber im Gegenzug durch Oxidation von (-)-*cis*-Verbenol die kinetische Spaltung der beiden (-)-Verbenoldiastereomere bewerkstelligen. Für die ADH-88 wurden als Kosubstrate 3-Oktanol und Cyclohexanol eingesetzt. Um dem kommerziellen Präparat der ADH-88 eine Alternative mit veröffentlichter DNA-Sequenz gegenüberzustellen, wurden die beiden P450-BM3-Varianten auch in Kombination mit Gre2p aus *S. cerevisiae* getestet. Als Kosubstrat diente hier 2-Nonanol.

Tabelle 3.8: Wirkung von Kosubstraten (5 mM) auf die Umsetzung von 1mM (-)- α -Pinen durch eine Kaskade aus P450-BM3 F87G und einer ADH

Ansatz	I	II	III	IV	V
eingesetzte ADH	ADH-88	ADH-88	ADH-88	Gre2p	Gre2p
Kosubstrat	keines	3-Oktanol	Cyclohexanol	keines	2-Nonanol
Reaktionsdauer (min)	40	40	40	180	180
NADPH (μ M)	80	80	80	200	200
(-)-Verbenon (μ M)	29,5 \pm 0,6	52,0 \pm 1,0	53,3 \pm 2,8	34,7 \pm 1,7	69,7 \pm 2,2
Verbenon : Verbenol	6,9 : 1	5,4 : 1	5,8 : 1	6,6 : 1	5,2 : 1

Bei den Kaskaden mit der F87G-Variante der P450-BM3 wurden durch Zugabe von Kosubstraten jeweils höhere Produktkonzentrationen erreicht (Tab. 3.8). Für die Kaskaden mit ADH-88 betrug der Faktor für die Steigerung 1,8 und im Falle der Kaskade mit Gre2p erhöhte sich die Verbenonkonzentration um Faktor 2. Das Verhältnis von (-)-Verbenon, im Prinzip ja durch die ADH weiter oxidiertes (-)-*cis*-Verbenol, zu (-)-*trans*-Verbenol lag im Bereich zwischen 5,2 und 6,9 (Tab. 3.8). Die auf die Weise indirekt über das Verhältnis (-)-Verbenon : (-)-*trans*-Verbenol berechneten Diastereomenüberschüsse bei der Bildung von (-)-Verbenol durch die F87G-Variante ergaben Werte von 68 bis 75 % zugunsten von (-)-*cis*-Verbenol. Dies entsprach in etwa den zuvor ermittelten Werten für den Diastereomenüberschuss von 67 % (Tab. 3.4).

Tabelle 3.9: Wirkung von Kosubstraten (5 mM) auf die Umsetzung von 1mM (-)- α -Pinen durch eine Kaskade aus P450-BM3 F87G/A328V und einer ADH

Ansatz	I	II	III	IV	V
eingesetzte ADH	ADH-88	ADH-88	ADH-88	Gre2p	Gre2p
Kosubstrat	keines	3-Oktanol	Cyclohexanol	keines	2-Nonanol
Reaktionsdauer (min)	40	40	40	180	180
NADPH (μ M)	80	80	80	200	200
(-)- <i>trans</i> -Verbenol (μ M) ¹	13,7 \pm 4,2	30,0 \pm 1,8	24,3 \pm 2,6	24,0 \pm 0,5	67,3 \pm 8,5
Verbenol : Verbenon	1,3 : 1	2,4 : 1	1,8 : 1	2,5 : 1	2,7 : 1

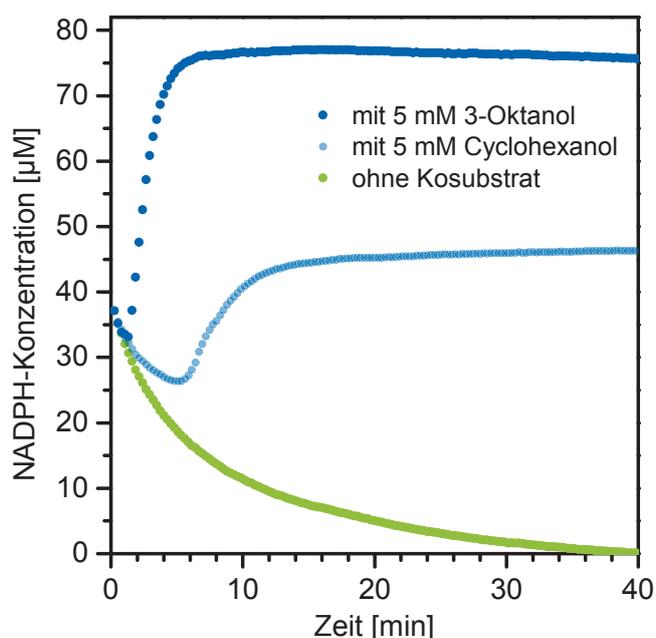
¹ (-)-*cis*-Verbenol nicht detektierbar

Für die Umsetzung mit der P450-BM3-Variante F87G/A328V (Tab. 3.9) wurde gemäß der zuvor beschriebenen Selektivität (vgl. Tab. 3.4) ein Diastereomenüberschuss an (-)-*trans*-Verbenol gebildet. Im Verhältnis zu (-)-*cis*-Verbenol, welches durch die ADH zu (-)-Verbenon oxidiert wurde, wurde im besten Falle ein Verhältnis (-)-*trans*-Verbenol zu (-)-Verbenon von 2,7 zu 1 festgestellt (Tab. 3.9). Die indirekt über das Verhältnis (-)-*trans*-Verbenol : (-)-Verbenon berechneten Diastereomenüberschüsse (41 bis 46 %) entsprechen zumindest im Falle von Ansatz II, IV und V in etwa dem zuvor ermittelten Wert von 40 % (vgl. Tab. 3.4). Die Produktbildung wurde durch die Zugabe von Kosubstraten erhöht, im Falle der Gre2p auf nahezu das Dreifache durch Zugabe von 2-Nonanol. Die Mehrbildung von Produkt in Ansatz IV verglichen mit Ansatz I (beide ohne Kosubstrat) war, abgesehen vom Einsatz unterschiedlicher ADHs, nahezu proportional zur eingesetzten Kofaktorkonzentration (Tab. 3.9).

Insgesamt war festzustellen, dass in allen Ansätzen mit Kosubstrat höhere Produkttiter erreicht wurden als in den entsprechenden Reaktionen ohne Kosubstrat (vgl. Tab. 3.8 und 3.9). Die Produktbildung schien bei der Umsetzung mit P450-BM3 F87G/A328V

aufgrund der geringen Kofaktorregeneration durch die Verbenoxidationsaktivität der ADH in stärkerem Maße von der Zugabe von Kosubstrat abhängig zu sein, als dies bei der (-)-*cis*-Verbenol bildenden Variante F87G der Fall war. So wurde durch die Zugabe von 2-Nonanol zur Reaktion mit P450-BM3 F87G/A328V und Gre2p nahezu eine Verdreifachung der Produktkonzentration erreicht, wogegen der entsprechende Ansatz aus P450-BM3 F87G und Gre2p durch Zugabe von Kosubstrat lediglich eine Verdopplung der Produktkonzentration im Vergleich zur Reaktion ohne Kosubstrat erfuhr (vgl. Tab. 3.8 und 3.9, jeweils Ansatz IV und V). Jedoch erreichten alle Ansätze mit P450-BM3 F87G jeweils höhere Produktkonzentration als die entsprechenden Reaktionen mit Variante F87G/A328V (vgl. Tab. 3.8 mit Tab. 3.9), was durch die stärkere Bildung des Intermediats (-)-*cis*-Verbenol und die daraus resultierende Kofaktorregeneration durch die ADH begründet sein mag. Der Zuwachs an Produkt durch vermehrte Zugabe von Kofaktor ist im Falle der Kaskade mit Variante F87G weniger stark als bei den entsprechenden Ansätzen mit Variante F87G/A328V (vgl. Tab. 3.8 mit Tab. 3.9, jeweils Ansatz I und IV). Die Reaktionen mit Variante F87G könnten also durch fortlaufende Kofaktorregeneration weniger abhängig von der initialen NADPH-Konzentration gewesen sein. Der Einfluss der Kosubstratsupplementierung auf die Kofaktorkonzentration während der Umsetzung ist exemplarisch für die Kaskade aus P450-BM3 F87G/A328V und ADH-88 dargestellt (Abb. 3.17). Wie schon zuvor für die Kaskade aus Variante F87G und ADH-88 gezeigt wurde (Abb. 3.14), wurde auch in dieser Umsetzung mit P450-BM3 F87G/A328V und ADH-88 der Kofaktor trotz der regenerierenden Wirkung der ADH letztendlich vollständig oxidiert.

Abbildung 3.17: NADPH-Konzentration während der Umsetzung von (-)- α -Pinen durch eine Kaskade von P450-BM3-Variante F87G/A328V und ADH-88 mit oder ohne Zusatz eines Kosubstrats - Während der Umsetzung wurde der Verlauf der NAD(P)H-Konzentration bei 340nm photometrisch bestimmt und mittels des Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{340\text{nm}}=6,22 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ umgerechnet. Ohne Kosubstrat wurde der Kofaktor innerhalb von 40 Minuten vollständig aufgebraucht (grün). In Gegenwart eines Kosubstrats stieg die Konzentration nach kurzer Zeit wieder an und verharrte in einem Gleichgewichtszustand (blaue Kurven).



Trotz der geringen relativen Aktivität der ADH gegenüber den Kosubstraten, wurde die Kofaktorkonzentration nach einem kurzen Abfall auf ein Gleichgewicht geführt, welches ausreichend Kofaktor für die P450-Reaktion zur Verfügung stellte. Dabei stellte sich das Gleichgewicht bei dem Kosubstrat mit der höheren relativen Aktivität (3-Oktanol: 9,3 %, vgl. Abb. 3.16) bei einer höheren Kofaktorkonzentration ein als bei dem Kosubstrat mit der geringeren relativen Aktivität (Cyclohexanol: 3,1 %).

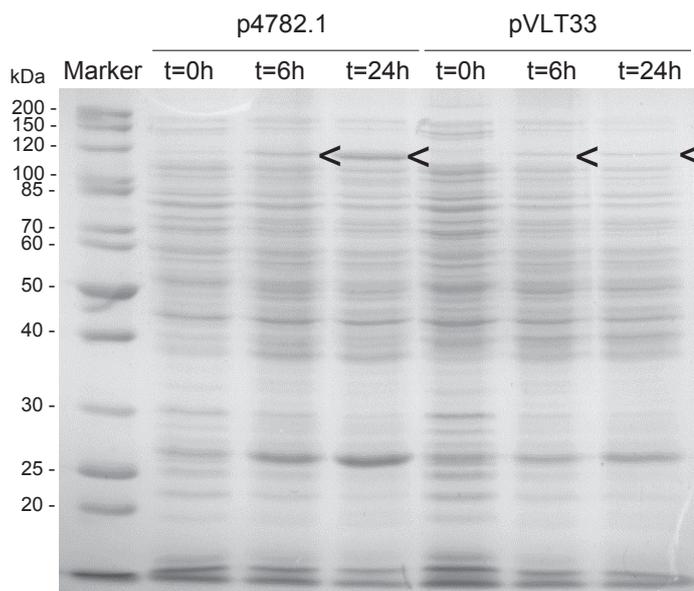
3.3 P450-ADH-Kaskade in ganzen mikrobiellen Zellen

3.3.1 Expression von P450-BM3 mit *broad host range*-Vektoren

Aufgrund der biologischen Eigenschaften von CYPs wie Abhängigkeit von Kofaktoren und geringe Stabilität wird für die Etablierung von Prozessen eine Implementierung in Ganzzellsysteme angestrebt [22]. Für den Transfer der in Abschnitt 3.2 vorgestellten Kaskade in die Zelle wurden Plasmide mit Promotorsystemen untersucht, die in einer Vielzahl unterschiedlicher bakterieller Stämme eingesetzt werden können, sogenannte *broad host range*-Vektoren. Diese sollten die Prüfung unterschiedlicher Stämme für Expression und anschließende Biotransformation ermöglichen. Bedingung für eine schnelle und unkomplizierte Prüfung ist, dass diese Vektoren keine genetischen Modifikation des Zielstammes benötigen, wie zum Beispiel das Einbringen des Genes für die T7-RNA-Polymerase [195]. Zwei beschriebene Systeme wurden zu diesem Zweck in dieser Arbeit für die Expression einer CYP in *P. putida* DSM12264 getestet.

Zum einen wurde ein Vektor mit dem rhamnoseinduzierbaren *rhaP*_{BAD}-Promotor aus *E. coli* getestet [196], dessen Funktionalität in *E. coli* JM109 und in *P. putida* KT2440 durch die Expression von Reporterproteinen bereits beschrieben wurde [197]. Im Rahmen einer Diplomarbeit an unserem Institut wurde durch ortsgerichtete Mutagenese eine XbaI-Schnittstelle eingefügt, um den Vektor (Derivat nun p4782.1 genannt) für die Klonierung des *cyp102a1*-Gens zugänglich zu machen. Die Expression von P450-BM3 (CYP102A1) mit diesem Konstrukt in *P. putida* KT2440 war erfolgreich [179]. Zum anderen wurde ein auf dem *tac*-Promotor basierendes System getestet, welches durch IPTG induziert wird und dessen Einsatz für die Expression in *E. coli* und in ausgewählten *Pseudomonas*-Stämmen beschrieben wurde [180]. Das Gen der P450-BM3-Variante Y51V/A74G/F87A/A111T/L188S/R471C wurde in beide Vektoren kloniert (Karten in Appendix 6.6.2 bzw. 6.6.3) und Zellen des Stammes *P. putida* DSM12264 mit den Vektoren transformiert. Dann wurde mit den rekombinanten Stämmen eine Expression durchgeführt und Proben ganzer Zellen mit einer SDS-PAGE auf erfolgreiche Expression untersucht (Abb. 3.18).

Abbildung 3.18: Analyse ganzer Zellen von *P. putida* DSM12264 bei Expression einer Variante der P450-BM3 von p4782.1 bzw. pVLT33 - Vor Induktion (0 h) und 6 bzw. 24 Stunden nach Induktion wurde eine Probe ganzer Zellen genommen und mittels SDS-PAGE (12,5 %) analysiert. So sind neben dem Marker, drei Proben der Expression vom p4782.1-Vektor (links) und drei der Expression vom pVLT33-Vektor (rechts) abgebildet. Die Bande der P450-BM3 ist durch Pfeile markiert.



Bei beiden Expressionen konnte bereits nach 6 Stunden das Auftreten einer Bande auf Höhe von etwa 120 kDa festgestellt werden, deren Intensität sich nach 24 Stunden noch weiter verstärkt hat. Die Masse entspricht in etwa der theoretisch errechneten Molekülmasse von 118 kDa und liegt in etwa gleicher Höhe, wie die N- und C-terminal mit einem His₆-tag versehene Variante (vgl. Abb. 3.1). Um die funktionelle Expression zu überprüfen, wurden die Zellen nach 24 Stunden Expression aufgeschlossen und die P450-Konzentration über ein CO-Differenzspektrum der löslichen Fraktion bestimmt. Die Bestimmung ergab, dass bei der Expression von pVLT33::*cyp102a1-atscvg* eine Abweichung von der empfohlenen Induktorkonzentration von 1 mM IPTG [198] zugunsten geringerer Konzentrationen eine verringerte P450-Expression zur Folge hat (Tab. 3.10). Letztendlich konnte jedoch bei Induktion mit 1 mM IPTG eine ähnliche P450-Konzentration erreicht werden wie für die Expression mit p4782.1::*cyp102a1-atscvg* (Tab. 3.10).

Tabelle 3.10: P450-Konzentration nach Expression in *P. putida* DSM12264 von p4782.1 bzw. pVLT33

Plasmid	Induktor	P450-Konzentration
p4782.1	0,2 % (w/v) Rhamnose	229 nmol/L _{TB}
pVLT33	0,1 mM IPTG	129 ± 15 nmol/L _{TB}
pVLT33	1 mM IPTG	212 ± 8 nmol/L _{TB}

Expression für 24 Stunden bei 30 °C und 140 UpM

Im Rahmen einer Bachelorarbeit wurden die Expressionsbedingungen der P450-BM3 in *P. putida* DSM12264 für den Vektor p4782.1 optimiert [199]. Unter den optimierten Bedingungen wurden Expressionen der P450-BM3 vom p4782.1::*cyp102a1-atscvg*-Plasmid mit *P. putida* DSM12264 und *E. coli* JM109 durchgeführt und die volumetrischen Expressionstiter bestimmt (Tab. 3.11).

Tabelle 3.11: Vergleich der Expression von P450-BM3 in *P. putida* DSM12264 und *E. coli* JM109

Stamm	P450-Konzentration
<i>P. putida</i> DSM12264	648 ±125 nmol/L _{TB}
<i>E. coli</i> JM109	2590 ±691 nmol/L _{TB}

Expression für 40 Stunden bei 25 °C und 160 UpM

Gegenüber den nicht optimierten Expressionsbedingungen konnte für *P. putida* DSM12264 ein nahezu dreifach höherer volumetrischer Expressionstiter erreicht werden (648 statt 229 nmol/L_{TB}). Jedoch lag die Expression in *E. coli* JM109 bei gleichen Bedingungen etwa um den Faktor vier höher als in *P. putida* DSM12264. Bei Expressionsstudien mit beiden Stämmen, jedoch mit einem Leervektor, konnte keine Anwesenheit endogener CYPs durch Aufnahme eines CO-Differenzspektrums nachgewiesen werden.

3.3.2 Expression von P450cam/Pdx/PdR in *E. coli* und *P. putida*

Die Mehrzahl der bekannten bakteriellen CYPs bilden mit ihren Redoxpartnern ein Mehrkomponentensystem [42]. Die separate Expression und Reinigung dieser Komponenten erzeugt ein erhöhten Aufwand, so dass die simultane Expression in einem Ganzzellsystem als vergleichsweise kostengünstig gilt [22]. P450cam (CYP101A1) sowie die Redoxpartner Putidaredoxin (Pdx) und Putidaredoxinreduktase (PdR) wurden bereits in *E. coli* DH5α vom einem Plasmid als tricistronisches Konstrukt transkribiert und die drei Enzyme exprimiert [200]. Im Rahmen einer Bachelorarbeit [201] wurde dieses tricistronische Konstrukt in den p4782.1-Vektor kloniert, in *P. putida* DSM12264 exprimiert und eine Umsetzung von (+)-Kampher, dem natürlichen Substrat der Wildtyp-P450cam, zu 5-*exo*-Hydroxykampher durchgeführt (Appendix 6.4). Ein gleichgeartetes Plasmid mit einem tricistronischen Konstrukt, jedoch bestehend aus der P450cam-Variante Y96F/L244A/V247L/C334A und den Redoxpartnern Pdx und PdR unter Kontrolle des rhamnoseinduzierbaren *rha*P_{BAD}-Promotors (Karte in Appendix 6.6.4) wurde in *P. putida* DSM12264 sowie in *E. coli* JM109 eingebracht und die Expression unter den in Abschnitt 3.3.1 getesteten Bedingungen durchgeführt (Tab. 3.12).

Tabelle 3.12: Konzentration von P450cam^{FALA} nach Expression in *P. putida* DSM12264 und *E. coli* JM109

	<i>P. putida</i> DSM12264	<i>E. coli</i> JM109
Gebildete Biomasse (g _{cdw} /L _{TB})	2,49 ±0,05	3,61 ±0,02
Spez. P450-Konzentration (nmol/g _{cdw})	230 ±10	160 ±3
Vol. P450-Konzentration (µmol/L _{TB})	0,57 ±0,02	0,58 ±0,01

Expression für 40 Stunden bei 25 °C und 160 UpM

Die durch Auswertung des CO-Differenzspektrums festgestellten spezifischen P450-Konzentrationen waren in *P. putida* DSM12264 höher als in *E. coli* JM109. Die höhere gebildete Biomasse von *E. coli* JM109 nach 40 Stunden Expression führte letztendlich zu vergleichbaren volumetrischen P450-Konzentrationen (Tab. 3.12).

3.3.3 Charakterisierung von P450cam/Pdx/PdR bei der α -Pinenoxidation

Die P450cam-Variante Y96F/L244A/V247L zeichnet sich dadurch aus, dass sie (+)- α -Pinen regioselektiv zu Verbenol und weiter zu Verbenon mit einem Anteil von 32 % im Produktspektrum oxidiert [103]. Die in dieser Arbeit bisher charakterisierten P450-BM3-Varianten wiesen nur einen sehr geringen Anteil an Verbenon im Produktspektrum auf (6 % bei P450-BM3-Variante AQCRG, vgl. Tab. 3.1). Nur durch Koexpression einer ADH konnten höhere Anteile erreicht werden. Mit P450cam-Variante Y96F/L244A/V247L/C334A (P450cam^{FALA}) stand eine neuartige Variante zur Verfügung, welche die drei für die Oxidation von (+)- α -Pinen zu (+)-Verbenon notwendigen Mutationen enthielt. Zusätzlich enthielt sie die C334A-Mutation. Diese unterbindet die Dimerbildung und ermöglicht eine gegenüber dem Wildtyp leicht erhöhte Aktivität [65]. Zellen der Expression von P450cam^{FALA}/Pdx/PdR in *E. coli* JM109 (Abschnitt 3.3.2) wurden aufgeschlossen und mit der löslichen Proteinfraction eine *in vitro*-Charakterisierung der Umsetzung von (+)- α -Pinen und dem Enantiomer (-)- α -Pinen durchgeführt. Hierbei wurde die Bildung unterschiedlicher Oxidationsprodukte festgestellt (Tab. 3.13). Kontrollen mit Leervektorlysat zeigten Kofaktorverbrauch, aber keine Substratoxidation. Beide Enantiomere, (+)- α -Pinen und (-)- α -Pinen, wurden durch P450cam^{FALA} als Substrat akzeptiert.

Tabelle 3.13: *in vitro*-Charakterisierung des Lysats von *E. coli* JM109 mit P450cam^{FALA}/Pdx/PdR

Substrat	TOF _{NADH} ¹ (min ⁻¹)	SOXR ² (min ⁻¹)	Produkte			
			Verbenol ³	Myrtenol	Verbenon	Pinenepoxid
(+)- α -Pinen	214	64	78 %	10 %	1 %	11 %
(-)- α -Pinen	162	79	80 %	0 %	3 %	17 %

¹: Rate der Kofaktoroxidation (NADH) durch P450cam^{FALA}/Pdx/PdR enthaltendes Lysat nach Abzug der Kofaktoroxidation durch Leervektorlysat desselben Stammes mit gleicher Zelltrockenmassekonzentration.

²: Substratoxidationsrate in Sinne von mol_{Produkt} pro mol_{P450} (für die Bildung von Verbenon wurde für die Berechnung eine zweifache Oxidation angenommen); bei parallel gemessenem Leervektorlysat wurde keine Produktbildung festgestellt.

³: Summe aus *cis*- und *trans*-Verbenol

Die Regioselektivität bei der Hydroxylierung von (+)- α -Pinen durch P450cam^{FALA} zu Verbenol bzw. Verbenon lag mit 78 % in einer ähnlichen Größenordnung wie die für die Ursprungsvariante Y96F/L244A/V247L bestimmte von 87 % [103]. Während jedoch Bell *et al.* von einem Anteil an Verbenon von 32 % berichten [103], wurde in unserem Falle nur

1 % gebildet. P450cam^{FALA} zeichnet sich durch eine gleichermaßen hohe Regioselektivität für die Hydroxylierung beider Pinenenantiomere aus (78 % (+)-Verbenol, 80 % (-)-Verbenol) und eignet sich so für die selektive Oxyfunktionalisierung von racemischem α -Pinen zu Verbenol.

3.3.4 Koexpression von Glyceroldehydrogenase oder ADH

Bei den meisten CYPs handelt es sich um externe Monooxygenasen, die ihre Elektronen von NAD(P)H beziehen [23, 38]. Daher bietet der Einsatz in einem Ganzzellkatalysator den Vorteil der Bereitstellung von NAD(P)⁺ durch die Zelle und die fortdauernde Reduktion zu NAD(P)H durch den Zellmetabolismus. Jedoch kann die Koexpression eines weiteren Enzyms zur Kofaktorregeneration zu einer Verbesserung der Produktivität führen [54]. Zu diesem Zweck wurden in der vorliegenden Arbeit Stämme, die bereits das Plasmid pJeM1a::cyp101a1-fala für die Expression von P450cam^{FALA}, Pdx und PdR enthielten mit einem zweiten Plasmid transformiert, welches das Gen für ein kofaktorregenerierendes Enzym enthielt.

Der für die Biotransformation mit ruhenden Zellen genutzte Puffer enthielt u.a. 2 % (v/v) Glycerin (vgl. Tab 2.16), um den Zellen zum Zweck der Kofaktorregeneration durch den Zellmetabolismus eine Kohlenstoffquelle zur Verfügung zu stellen. Die zusätzliche Expression der Glycerindehydrogenase GldA sollte über die Regenerationsleistung des zellulären Metabolismus hinaus eine zusätzliche Kofaktorregeneration bewirken und damit die Produktivität der Zellen erhöhen. Für diesen Zweck standen am Institut Plasmide des pSEVA-Systems [202] mit dem Gen der GldA zur Verfügung. Für eine stabile Weitergabe bei der Kultivierung der Zellen wurde für *E. coli*-Stämme das Plasmid pSEVA46rha::gldA mit dem p15A-Replikationsursprung und für *P. putida* das Plasmid pSEVA42rha::gldA mit dem RK2-Replikationsursprung für die Koexpression der GldA genutzt. Die Plasmide wurden in *E. coli* BL21 und JM109 sowie in *P. putida* DSM12264 und KT2440 eingebracht und eine Expression unter den zuvor beschriebenen optimierten Bedingungen durchgeführt. Die Expression wurde durch SDS-PAGE-Analyse überprüft (Abb. 3.19). Nach Expression erschien eine Bande etwas unterhalb von 50 kDa. Vermutlich handelt es sich dabei um eine nicht aufgelöste Doppelbande von P450cam^{FALA} und PdR. Eine weitere Bande war bei knapp 40 kDa festzustellen, deutlich sichtbar bei den *P. putida*-Stämmen und etwas verdeckt durch endogenes Protein im Falle der *E. coli*-Stämme. Diese gehört vermutlich zur GldA, die eine Masse von 38,7 kDa aufweist. Ähnlich wie in der dem tricistronischen Konstrukt für die Expression von P450cam/Pdx/PdR zugrunde liegenden Originalpublikation war Pdx (11,5 kDa) nicht auf dem Gel zu erkennen, obwohl die gemessene Aktivität (vgl. Tab. 3.13) erfolgreiche Versorgung der P450cam mit Elektronen bedeutet.

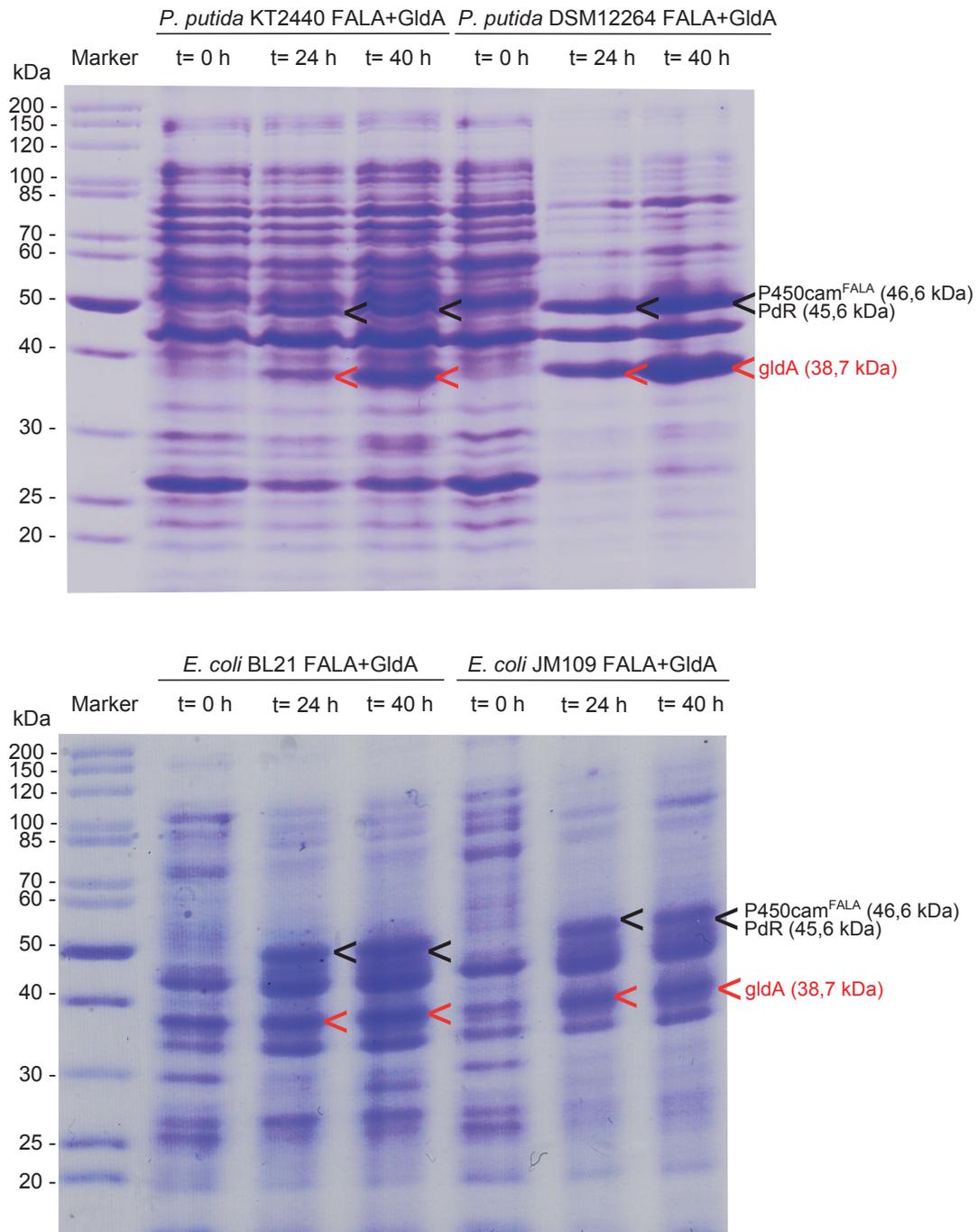


Abbildung 3.19: SDS-PAGE-Analyse ganzer Zellen bei Koexpression von P450cam^{FALA}/Pdx/PdR sowie GldA - Von Kulturen von *P. putida* KT2440 bzw. DSM12264 sowie *E. coli* BL21 bzw. JM109 wurden vor Induktion (0 h) und 24 bzw. 40 Stunden nach Induktion eine Probe ganzer Zellen genommen und mittels SDS-PAGE (12,5 %) analysiert. Die Banden von P450cam^{FALA}/ PdR und GldA sind durch Pfeile markiert.

Außerdem wurden die Zellen aufgeschlossen und die Aktivität der GldA in der löslichen Proteinfraction gemessen. In allen Stämmen konnte Aktivität festgestellt werden, die weit über die Hintergrundaktivität des Leervektorlysats der Stämme hinaus ging (Tab. 3.14).

Tabelle 3.14: *in vitro*-Bestimmung der GldA-Aktivität nach Expression in verschiedenen Stämmen

	<i>P. putida</i> DSM12264	<i>P. putida</i> KT2440	<i>E. coli</i> BL21	<i>E. coli</i> JM109
GldA (U/g _{cdw})	452	1420	369	321
PdR (U/g _{cdw})	-	-	-	7,33

Die GldA-Aktivität wurde als Nettobildung von NADH durch das GldA enthaltende Lysat berechnet, indem die NADH-Bildung von Leervektorlysats desselben Stammes mit gleicher Zelltrockenmassekonzentration abgezogen wurde; die Aktivität der exprimierten PdR wurde mit der TOF_{NADH} für die Oxidation von (+)- α -Pinen (s. Tab. 3.13) und der Zelltrockenmassekonzentration der dafür benutzten Zellpräparation (29,6 g_{cdw}/L) berechnet.

Ein anderes, ebenfalls kofaktorregenerierendes Enzym ist die Steroiddehydrogenase 3α -HSDH. Sie akzeptiert *cis*-Verbenol als Substrat (vgl. Abschnitt 3.2.2) und ist strikt NAD^+ -abhängig (vgl. Tab 3.6). Da Putidaredoxin Reduktase (PdR) $NADH$ -abhängig ist, sollte 3α -HSDH zusammen mit $P450cam^{FALA}/Pdx/PdR$ eine Kaskade zur Oxidation von α -Pinen zu Verbenon unter gleichzeitiger Regeneration des Kofaktors bilden. Für die Koexpression der 3α -HSDH stand am Institut das pSEVA4Xrha-Plasmid mit dem 3α -*hsdh*-Gen zur Verfügung. Es besitzt einen CDF-Replikationsursprung für eine stabile Weitergabe des Plasmids bei der Kultivierung von *E. coli*-Stämmen.

Das Plasmid wurde in *E. coli* BL21 eingebracht und eine Expression, abgesehen von der Erhöhung des Volumens der Hauptkultur (400 mL TB-Medium in einem 2 L-Erlenmeyerkolben), unter den zuvor beschriebenen optimierten Bedingungen durchgeführt. Die Expression wurde durch SDS-PAGE-Analyse überprüft (Abb. 3.20). Nach Expression erscheint neben der Bande etwas unterhalb der 50 kDa, die vermutlich eine nicht aufgelöste Doppelbande von $P450cam^{FALA}$ und PdR darstellt, eine weitere Bande bei etwa 25 kDa. Diese gehört vermutlich zur 3α -HSDH, die eine Masse von 26,4 kDa aufweist. Außerdem wurden die Zellen

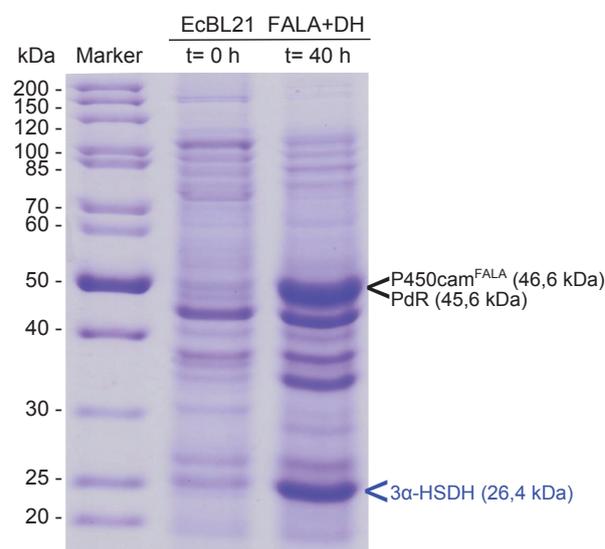


Abbildung 3.20: Analyse ganzer Zellen von *E. coli* BL21 bei Koexpression von $P450cam^{FALA}/Pdx/PdR$ sowie 3α -HSDH - Vor Induktion (0 h) und 24 bzw. 40 Stunden nach Induktion wurde eine Probe ganzer Zellen genommen und mittels SDS-PAGE (12,5 %) analysiert. Die Banden von $P450cam^{FALA}$, PdR und 3α -HSDH sind durch Pfeile markiert.

aufgeschlossen und die Aktivität der 3α -HSDH in der löslichen Proteinfraction gemessen. Hierbei wurde eine Aktivität ($\text{TOF}_{\text{NAD}^+}$) von $2,3 \text{ U/g}_{\text{cdw}}$ gemessen, während keine Aktivität im Leervektorlysate des Stammes festgestellt wurde.

3.4 Ganzzellumsetzungen von α -Pinen

3.4.1 Viabilität von *P. putida* und *E. coli* in Gegenwart von α -Pinen

Bei Kontakt mit Zellen hat ein organisches Lösemittel aufgrund seiner hohen Hydrophobizität einen toxischen Einfluss auf die Viabilität der Zellen (vgl. Abschnitt 1.6). Einerseits weist α -Pinen einen $\log P_{\text{O/W}}$ von 4,46 auf [128], so dass es trotz seiner Hydrophobizität aufgrund seiner geringen Löslichkeit als biokompatibel gilt. Auf der anderen Seite können wasserunlösliche Verbindungen durch Stoffe zellulärer Herkunft mit beispielsweise tensidähnlichen Eigenschaften besser in Lösung gebracht werden, wodurch sich toxische Effekte verstärken und die Biokompatibilität abnimmt. Um den Einfluss des Substrats α -Pinen auf die Viabilität der Spezies *P. putida* und *E. coli* zu beurteilen, wurden ruhende Zellen einer zweiten Phase α -Pinen von unterschiedlicher Ausdehnung ausgesetzt und die Überlebensrate mit der von Zellen verglichen, die nicht α -Pinen ausgesetzt wurden. Als Vertreter der beiden Spezies wurden der als besonders lösemitteltolerant geltende Stamm *P. putida* DSM 12264 und zum Vergleich *E. coli* JM109 ausgewählt (Abb. 3.21).

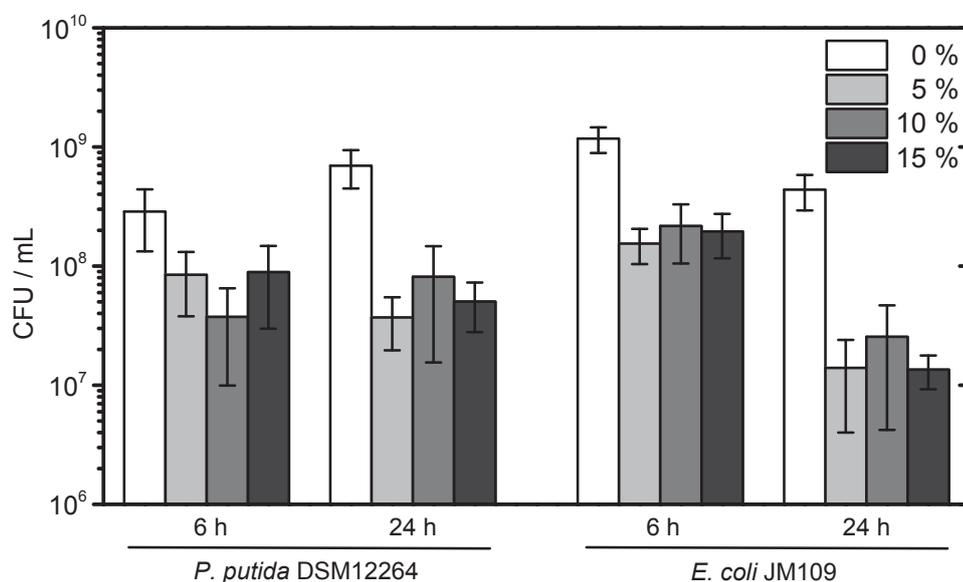


Abbildung 3.21: Viabilität von *P. putida* DSM12264 und *E. coli* JM109 in Gegenwart von α -Pinen - Kulturen ruhender Zellen der Stämme *P. putida* DSM12264 (links) und *E. coli* JM109 (rechts) wurden wie für eine Biotransformation vorbereitet und in Gegenwart einer α -Pinenphase mit unterschiedlicher Ausdehnung von 5, 10 oder 15 % (v/v) inkubiert. Nach 6 und 24 Stunden wurden Zellen aus der wässrigen Phase entnommen, verdünnt und ausplattiert, um die Anzahl lebensfähiger Zellen in der Kultur zu bestimmen. Die Experimente wurden in Vierfachbestimmung durchgeführt.

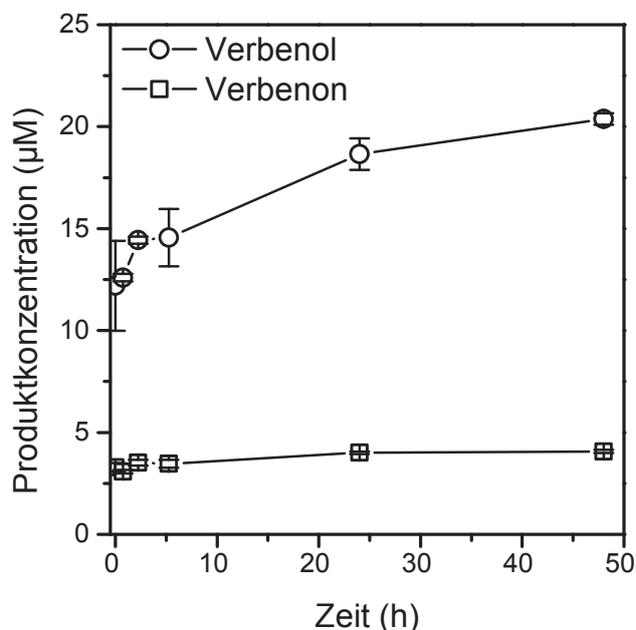
Die Kulturen beider Stämme erhielten sich in Gegenwart von α -Pinen eine gewisse Viabilität, auch über einen Zeitraum von 24 Stunden. Dabei war die Ausdehnung der organischen Phase unerheblich für die Zahl der lebensfähigen Zellen. Jedoch war eine deutliche Reduzierung der Lebensfähigkeit bei den Kulturen mit α -Pinenphase im Vergleich zur Negativkontrolle ohne Pinen festzustellen. Mit Ausnahme der Kultur von *P. putida* DSM12264 mit 15 % (v/v) α -Pinenphase konnten schon nach 6 Stunden bei beiden Stämmen eine reduzierte Viabilität nachgewiesen werden. Während die Abnahme bei *P. putida* DSM12264 im Schnitt bei einem Faktor von unter 5 lag, lag er bei den Kulturen von *E. coli* JM109 bei über 6. Noch stärker war dieser Effekt nach 24 Stunden zu erkennen. Während die Lebendzellzahl von *E. coli* JM109 nochmals eine in etwa zehnfache Reduktion erfuhr, blieb die Anzahl lebensfähiger Zellen bei *P. putida* DSM12264 in etwa unverändert.

3.4.2 Biotransformationen von α -Pinen

Autooxidation

α -Pinen kann durch Autooxidation u.a. zu Verbenol und Verbenon oxidieren [203]. Um die Rolle der Autooxidation in den gezeigten Biotransformationen einzuschätzen, wurden 20 mL CV2-Medium mit 2 % (v/v) DMSO und einer α -Pinenkonzentration von 20 mM in einem 100 mL-Erlenmeyerkolben, wie für die Biotransformation beschrieben, geschüttelt und zu den gezeigten Zeitpunkten auf Produktbildung untersucht (Abb. 3.22).

Abbildung 3.22: Autooxidation von α -Pinen - Parallel zu den folgenden Biotransformationen wurde ein Kolben mit CV2-Medium mitgeführt, um die Reproduzierbarkeit bei Probenahme und GC/MS-Analyse zu gewährleisten. Hier ist die Bildung von Verbenol und Verbenon aus drei Experimenten dargestellt, die unabhängig zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt wurden.



Bereits zu Beginn des Experiments sind Verbenol und Verbenon nachzuweisen. Sie sind im Substrat bereits als Verunreinigung (<1 %) vorhanden. Während der Inkubation steigt die Verbenolkonzentration. Zugleich bleibt die Konzentration an Verbenon annähernd konstant.

Unter den getesteten Bedingungen konnte also eine Autooxidation von α -Pinen zu Verbenol festgestellt werden. Für Verbenol und Verbenon gemeinsam wurde jedoch lediglich eine Bildung von weniger als 10 μM in 48 Stunden gemessen.

Umsetzung von α -Pinen mit Ganzzellkatalysatoren

Für eine Ganzzellumsetzung wurde eine Expression von P450cam^{FALA}/Pdx/PdR in *P. putida* DSM12264 und *E. coli* JM109 durchgeführt und die Zellen für die Biotransformation von α -Pinen eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten Leervektorzellen, die in gleicher Weise behandelt wurden. So wurden die Produktivität der Stämme als gebildetes Produkt (Verbenol und Verbenon) pro Biokatalysator ($Y_{P/X}$, [127]) und der Anteil des Verbenons am Produkt untersucht (Abb. 3.23).

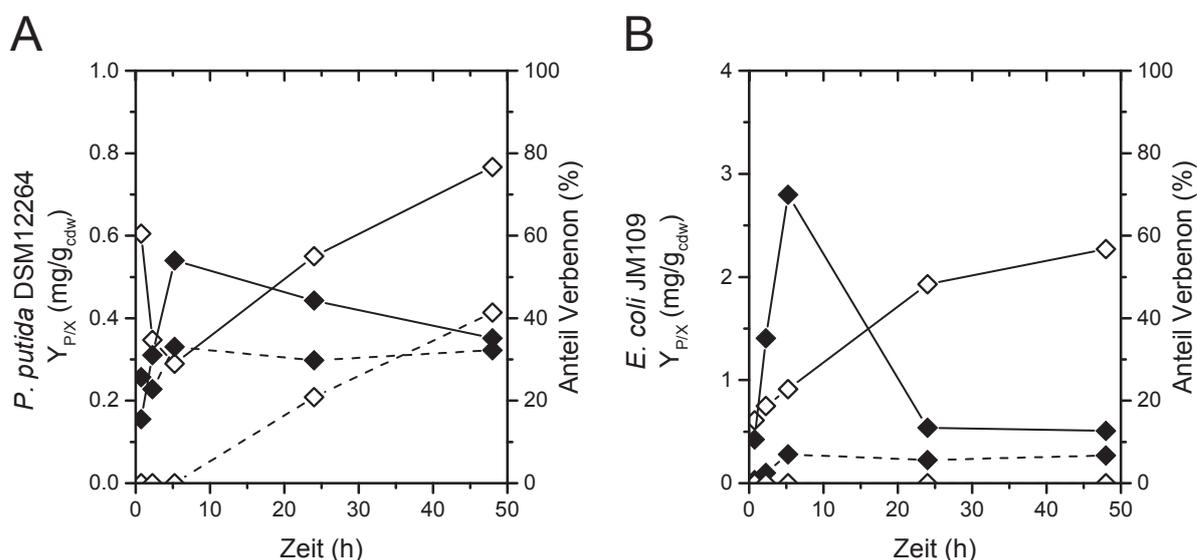


Abbildung 3.23: Produktivität $Y_{P/X}$ bakterieller Stämme mit und ohne P450cam^{FALA}/Pdx/PdR - Produktivität $Y_{P/X}$ nach Schrewe *et al.* [127] in mg/g_{cdw} (gefüllte Symbole) und Verbenonanteil (offene Symbole) wurden ausschließlich unter Berücksichtigung der Produkte Verbenol und Verbenon bestimmt. Die Ergebnisse sind für *P. putida* DSM12264 (A) und *E. coli* JM109 (B) jeweils für Zellen mit Leervektor (gestrichelte Linie) und Zellen mit exprimiertem P450cam^{FALA}/Pdx/PdR (durchgezogene Linie) gezeigt.

Die Zellen von *P. putida* und *E. coli* mit P450cam^{FALA}/Pdx/PdR wiesen eine höhere Produktivität auf als die Negativkontrolle und erreichten das Maximum an gebildetem Produkt typischerweise nach 5 Stunden, bevor die Produktivität wieder absank, u.a. durch weitere Oxidationen am Produkt zu einer Vielzahl unterschiedlicher Überoxidationsprodukte. Während *P. putida* DSM12264 nicht mehr als 0,6 mg/g_{cdw} erreichte, war die Produktivität von *E. coli* JM109 mit ungefähr 3 mg/g_{cdw} höher. In *E. coli* JM109 wurde ein Verbenonanteil von beinahe 60 % erreicht, in *P. putida* DSM12264 war er mit beinahe 80 % sogar noch höher.

Insgesamt ist die Produktivität der Biokatalysatoren geringer als es sich durch die P450-Konzentration des Lysats (Tab. 3.12), die für P450cam^{FALA} gemessene SOXR (Tab. 3.13) und die Reaktionszeit herleiten ließe. Möglicherweise sind bekannte Engpässe wie geringe Substratzugänglichkeit durch Membranundurchlässigkeit oder Kofaktorlimitierung Ursache für die niedrigen Ausbeuten.

Permeabilisierung

Geringer Massentransfer des Substrats in die Zelle ist eine weithin bekannte Limitierung von Biotransformationen [22, 127]. Permeabilisierung der bakteriellen Membran durch Chemikalien böte hier eine einfache Lösung. Die deutliche Erhöhung des Umsatzes in einer Biotransformation hydrophober Substrate nach Permeabilisierung mit Polymyxin B wird in der Literatur für *E. coli* beschrieben [148]. Außerdem wurde in einer am Institut durchgeführten Bachelorarbeit [204] bei der Durchmusterung von Permeabilisierungsmitteln ein ähnlicher Effekt gezeigt, nämlich eine Verbesserung der Biotransformation von α -Pinen durch einen rekombinanten *P. putida* DSM12264-Stamm nach Expression der P450-BM3-Variante Y51V/A74G/F87A/A111T/L188S/R471C. Hier zeigte Polymyxin B die größte Verbesserung beim Umsatz von α -Pinen zu Verbenol und Verbenon (Appendix 6.5). Aus diesen Gründen wurde der Einfluss von Polymyxin B auf die Leistung der P450cam^{FALA}-Biokatalysatoren getestet (Abb. 3.24 und Tab. 3.15).

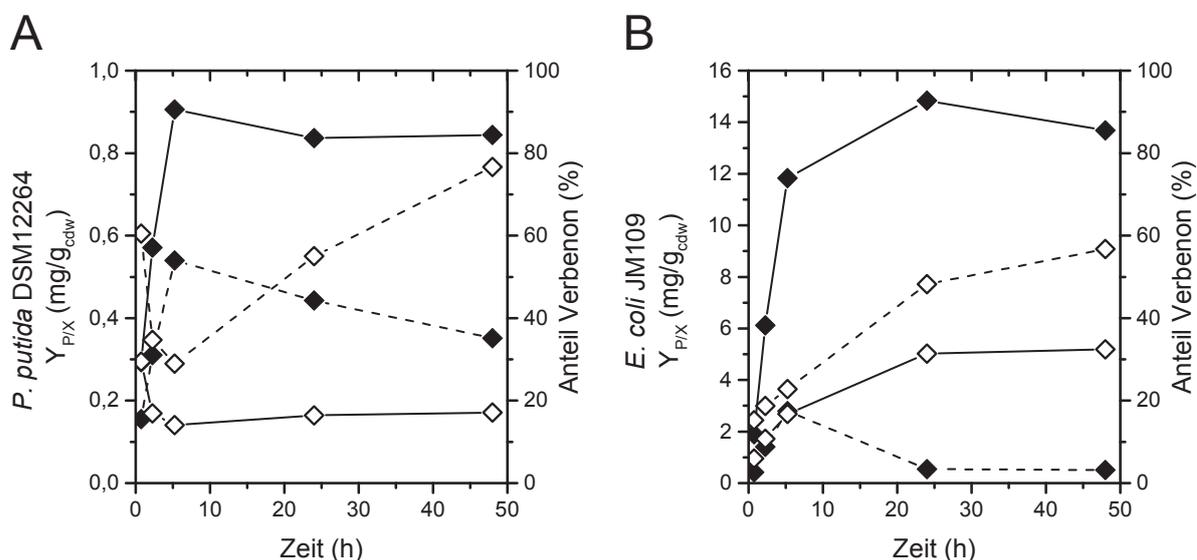


Abbildung 3.24: Einfluss von Polymyxin B-Behandlung auf die Produktausbeute und den Verbenonbildungsanteil der eingesetzten Biokatalysatoren - Die Produktivität $Y_{P/X}$ in mg/g_{cdw} (gefüllte Symbole) und der Anteil von Verbenon an gebildetem Produkt (offene Symbole) wurden ausschließlich unter Berücksichtigung von Verbenol und Verbenon als Produkt ermittelt und sind für *P. putida* DSM12264 (A) und *E. coli* JM109 (B) jeweils nach Expression von P450cam^{FALA}/PdX/PdR und Behandlung mit Polymyxin B (durchgezogene Linien) gezeigt. Zum Vergleich sind die Daten der Umsetzung mit nicht-permeabilisierten Zellen aus Abb. 3.23 (gestrichelte Linien) zu sehen.

Die Permeabilisierung durch Polymyxin B führte sowohl bei *P. putida* DSM12264 als auch bei *E. coli* JM109 zu erhöhter Produktivität ($Y_{P/X}$, Abb. 3.24). Dennoch blieb die Produktivität von *P. putida* DSM12264 bei $<1 \text{ mg/g}_{\text{cdw}}$. Anders bei *E. coli* JM109, wo durch Permeabilisierung $>14 \text{ mg/g}_{\text{cdw}}$ erreicht wurden (Abb. 3.24). Im Falle von *E. coli* JM109 wurde ein Produkttiter von mehr als 1 mM (Verbenol und Verbenon zusammen) nach 24 Stunden erreicht, was bezogen auf exprimierte P450cam^{FALA} einer Wechselzahl (TTN) von 566 entspricht (Tab. 3.15).

Tabelle 3.15: Parameter der Umsetzung von α -Pinen durch Biokatalysatoren in An- bzw. Abwesenheit von Polymyxin B

	<i>P. putida</i> DSM12264		<i>E. coli</i> JM109	
	-	+	-	+
Polymyxin B	-	+	-	+
Verbenol (μM) ^a	19,1	38,7	186	841
Verbenon (μM) ^a	7,9	6,4	55,4	172
Eingesetzte P450 (μM)	1,7		2,1	
TTN ($\mu\text{mol}_{\text{Oxid.}} \mu\text{mol}_{\text{P450}}^{-1}$) ^{a,b}	20,0	29,6	142	566
Q nach 45 min/5 h ($\mu\text{mol}_{\text{Oxid.}} \mu\text{mol}_{\text{P450}}^{-1} \text{h}^{-1}$) ^b	9,58/3,80	14,5/5,6	26,9/27,0	110/108
Zellkonzentration ($\text{g}_{\text{cdw}} \text{L}^{-1}$)	7,6		13,0	
$Y_{P/X}$ ($\text{mg g}_{\text{cdw}}^{-1}$) ^a	0,54	0,91	2,81	11,8

^a bestimmt nach 5 Stunden Umsetzung

^b unter Berücksichtigung von Verbenol und Verbenon als Produkt, für die Bildung von Verbenon wurden zwei Oxidationsschritte angerechnet

TTN: Wechselzahl (Anzahl Oxidationen pro CYP)

Q: P450-spez. Produktbildungsrate (Anzahl Oxidationen pro CYP und Stunde)

$Y_{P/X}$: Produktivität (Masse Produkt pro Trockenmasse Biokatalysator)

Bezüglich der geringen Produktivität von *P. putida* DSM12264 sei bemerkt, dass die Zellen von *P. putida* DSM12264 unabhängig von Polymyxin B-Behandlung während der Umsetzung klumpen und schleimige Aggregate bilden. Ein ähnlicher Phänotyp wurde bereits bei der Umsetzung von Oktan durch *P. putida* DSM12264 beobachtet [154]. Und auch für andere als lösemitteltolerant beschriebene *P. putida*-Stämme wurden nach Induktion mit Oktan instabile, schleimige Zellpellets beschrieben, während *P. putida* KT2440 keinen solchen Phänotyp aufwies und eine den lösemitteltoleranten Stämmen überlegene Produktivität als Biokatalysator erreichte [130]. Anscheinend gibt es hier intrinsische Unterschiede zwischen den Stämmen derselben bakteriellen Spezies, die Einfluss auf die Produktivität des Biokatalysators ausüben. Um solche stammabhängigen Effekte zu untersuchen, wurden *P. putida* KT2440 und *E. coli* BL21, dessen Abkömmling *E. coli* BL21(DE3) bereits zuvor für die Biotransformation von α -Pinen zu α -Pinenepoxid angewandt wurde [54], in die Studie einbezogen. Der Effekt von Polymyxin B-Behandlung auf die Produktivität der

vier Ganzzellbiokatalysatoren und der Verbenonanteil am Ende der Umsetzung (nach 48 Stunden) sind in Abb. 3.25 gezeigt.

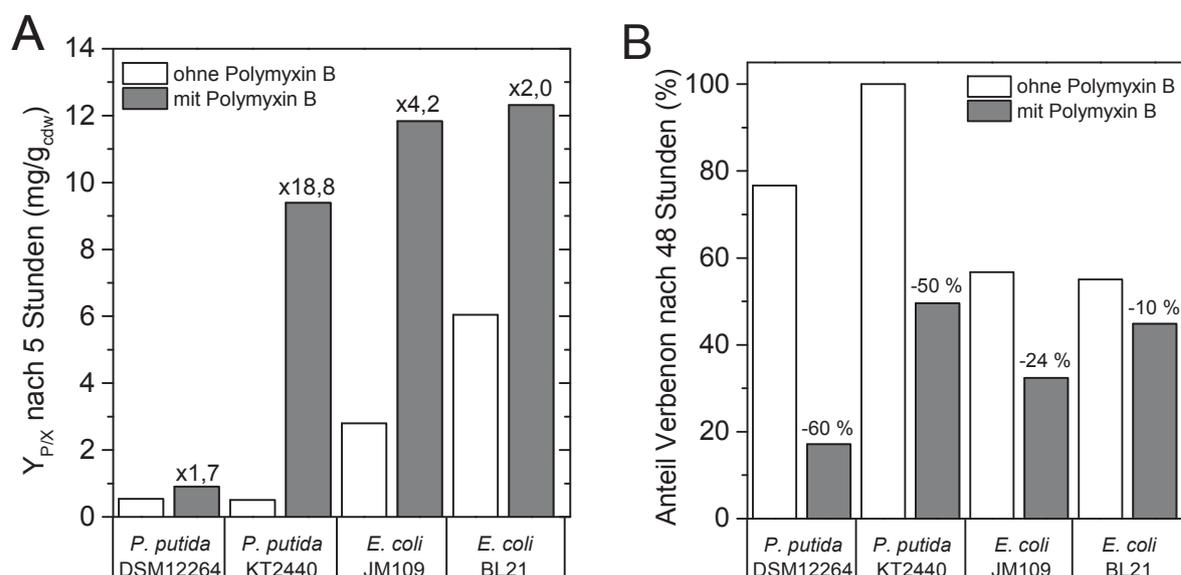


Abbildung 3.25: Produktivität und Verbenonanteil nach Umsetzung von α -Pinen durch unterschiedliche Stämme als Biokatalysator - Produktivität nach 5 Stunden (A) und der Anteil an Verbenon nach 48 Stunden (B) in der Umsetzung von α -Pinen durch vier unterschiedliche bakterielle Stämme nach Expression von P450cam^{FALA}/Pdx/PdR, entweder ohne oder mit Polymyxin B-Behandlung.

In Abwesenheit von Polymyxin B ist die Produktivität von *P. putida* KT2440 vergleichbar mit der von *P. putida* DSM12264 (etwa 0,5 mg/g_{cdw}). Dagegen ist die Produktivität von *E. coli* BL21 ungefähr doppelt so hoch wie die von *E. coli* JM109. Wie zuvor bei *P. putida* DSM12264 und *E. coli* JM109 konnte auch für *P. putida* KT2440 und *E. coli* BL21 eine höhere Produktivität durch Behandlung mit Polymyxin B erreicht werden (Abb. 3.25, A). Während die Produktivität von *P. putida* DSM12264, *E. coli* BL21 und *E. coli* JM109 jeweils um einen Faktor von 1,7 bzw. 2 und 4,2 erhöht wurde, wurde die größte Verbesserung für *P. putida* KT2440 beobachtet, der durch Permeabilisierung eine 19-fache Erhöhung der Produktivität $Y_{P/X}$ erfuhr (Abb. 3.25, A). Hierbei zeigten weder *P. putida* KT2440 noch die beiden *E. coli*-Stämme einen Phänotyp mit verklumpten Zellen wie für *P. putida* DSM12264 beobachtet wurde. Daher scheint es insbesondere bei *P. putida* intrinsische Stammunterschiede zu geben, die einen großen Einfluss auf die Produktivität des Biokatalysators ausüben.

Die Behandlung mit Polymyxin B führte bei allen vier getesteten Stämmen zu einem verringerten Verbenonanteil (Abb. 3.25, B). Dieser Effekt war bereits nach 5 Stunden Umsetzung zu bemerken und war am deutlichsten nach 48 Stunden (Abb. 3.24). Insgesamt zeigte sich Polymyxin B als effektiver Permeabilisator von Membranen unterschiedlicher, bakterieller Stämme, der die Umsetzung von α -Pinen durch *P. putida* und *E. coli* fördert.

Kofaktorregeneration

E. coli JM109 zeigte stabil über 5 Stunden der Umsetzung hohe P450-spezifische Bildungsraten (Tab. 3.15). Dagegen konnte für *P. putida* DSM12264 ein Einbrechen der Bildungsrate nach 5 Stunden beobachtet werden, mit etwa 2,5-facher Verringerung gegenüber der Rate nach 45 Minuten und unabhängig von der Behandlung mit Polymyxin B (Tab. 3.15). Ein möglicher Grund für die beobachtete Reduktion ist ein Scheitern der metabolischen Maschinerie von *P. putida* DSM12264 exprimiertes P450cam^{FALA}/Pdx/PdR über die Zeit ausreichend mit reduziertem Kofaktor zu versorgen. Um zu untersuchen, ob Kofaktorregeneration die Biotransformation limitiert, wurde die Glycerinaldehyddehydrogenase GldA koexprimiert (Abb. 3.19 und Tab. 3.14). Mit den die GldA exprimierenden Zellen wurden Biotransformationen durchgeführt, die vergleichbar zu denen mit Zellen ohne GldA-Koexpression waren, und gemeinsam mit diesen abgebildet (Abb. 3.26). Außer *E. coli* BL21 schienen alle Biokatalysatoren von der Koexpression von GldA hinsichtlich ihrer Produktivität ($Y_{P/X}$) zu profitieren (Abb. 3.26). Die größte Verbesserung wurde mit einer Verzehnfachung der Produktivität und einem maximalen $Y_{P/X}$ von bis zu 12 mg/g_{cdw} für *P. putida* DSM12264 beobachtet (Abb. 3.26, A). Bezüglich der Produktivität zeigten die *P. putida*-Stämme DSM12264 und KT2440 eine vergleichbare Leistung (Tab. 3.16 und Abb. 3.26, A und B). Im Falle von *P. putida* DSM12264 wurde niedrige Kofaktorregeneration durch den Metabolismus als ein limitierender Faktor für die Ganzzellumsetzung von α -Pinen identifiziert.

Tabelle 3.16: Parameter der Umsetzung von α -Pinen durch Polymyxin B-permeabilisierte Biokatalysatoren mit koexprimierter GldA

	<i>P. putida</i> DSM12264	<i>P. putida</i> KT2440	<i>E. coli</i> BL21	<i>E. coli</i> JM109
Verbenol (μM) ^a	217	209	751	1020
Verbenon (μM) ^a	116	208	205	431
Eingesetzte P450 (μM)	0,8	2,3	3,3	2,6
TTN ($\mu\text{mol}_{\text{Oxid.}} \mu\text{mol}_{\text{P450}}^{-1}$) ^{a,b}	536	275	348	726
Q nach 45 min/5 h ($\mu\text{mol}_{\text{Oxid.}} \mu\text{mol}_{\text{P450}}^{-1} \text{h}^{-1}$) ^b	238/102	184/52,5	88,6/66,3	128/138
Zellkonzentration (g _{cdw} L ⁻¹)	5,3	6,4	15,0	13,2
$Y_{P/X}$ (mg g _{cdw} ⁻¹) ^a	9,46	9,95	9,70	16,7

^a bestimmt nach 5 Stunden Umsetzung

^b unter Berücksichtigung von Verbenol und Verbenon als Produkt, für die Bildung von Verbenon wurden zwei Oxidationsschritte angerechnet

TTN: Wechselzahl (Anzahl Oxidationen pro CYP)

Q: P450-spez. Produktbildungsrate (Anzahl Oxidationen pro CYP und Stunde)

$Y_{P/X}$: Produktivität (Masse Produkt pro Trockenmasse Biokatalysator)

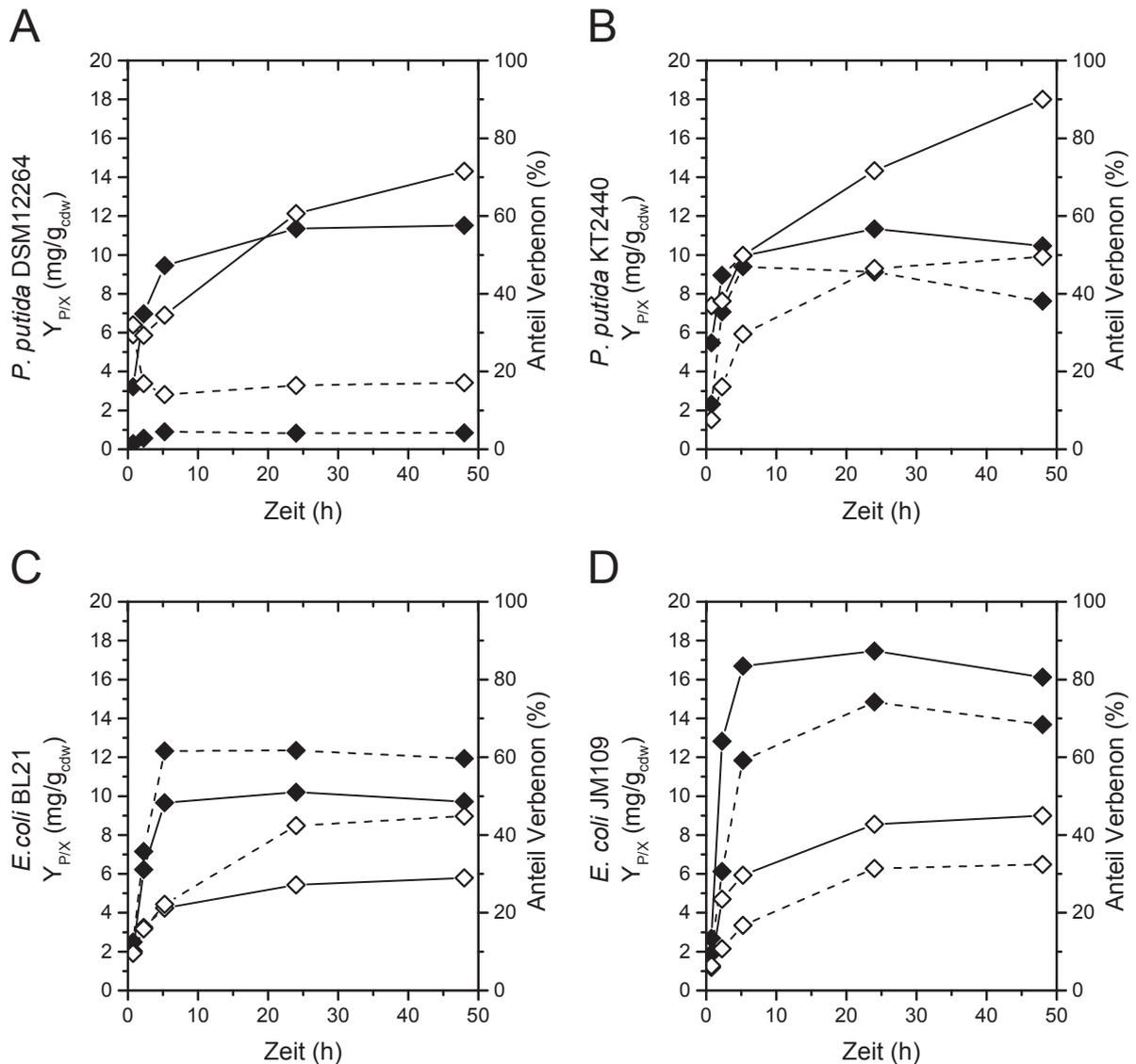


Abbildung 3.26: Einfluss der GldA-Koexpression auf $Y_{P/X}$ und Verbenonbildungsanteil der etablierten Biokatalysatoren - Die Produktivität der permeabilisierten Zellen $Y_{P/X}$ in mg/g_{cdw} (gefüllte Symbole) und der Anteil von Verbenon am Produkt (offene Symbole) wurden ausschließlich unter Berücksichtigung von Verbenol und Verbenon als Produkt bestimmt. Gezeigt sind die Werte von *P. putida* DSM12264 (A), *P. putida* KT2440 (B), *E. coli* BL21 (C) und *E. coli* JM109 (D) nach Expression von P450cam^{FALA}/Pdx/PdR ohne (gestrichelte Linie) und mit Koexpression von GldA (durchgezogene Linie). Im Falle von *P. putida* DSM12264 und *E. coli* JM109 ohne GldA-Koexpression stimmen die Daten mit den in Abb. 3.24, A und B (durchgezogene Linie) überein.

Während Umsetzungen mit *P. putida*-Stämmen ohne Koexpression von GldA niedrigere P450-spezifische Bildungsraten (Q) als die mit *E. coli*-Stämmen aufwiesen (Tab. 3.15), wurden die Raten durch Koexpression von GldA deutlich erhöht, höher sogar als die der entsprechenden *E. coli*-Stämme mit koexprimierter GldA (Tab. 3.16). *P. putida* DSM12264 mit koexprimierter GldA zeigte beispielweise nach 5 Stunden Umsetzung eine etwa 18-fach höhere P450-spezifische Bildungsrate (102 statt 5,6) und Wechselzahl TTN (536 statt 29,6) als Zellen des Stammes ohne koexprimierte GldA (Tab. 3.16). Auch für die *E. coli*-

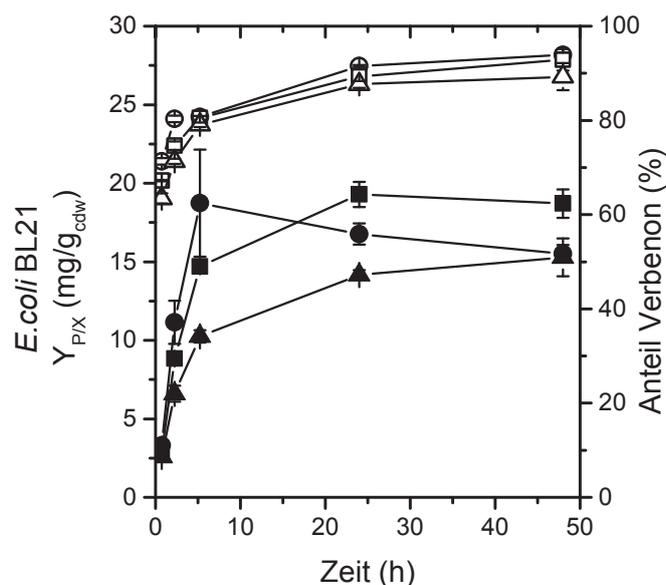
Stämme wurden höhere P450-spezifische Bildungsraten (Q) und Wechselzahlen (TTN) durch GldA-unterstützte Kofaktorregeneration erreicht (vgl. Tab. 3.15 und 3.16). Im Falle von *E. coli* JM109 mit koexprimierter GldA stiegen die P450-spezifische Bildungsrate auf $138 \mu\text{mol}_{\text{Oxidation}} \mu\text{mol}_{\text{P450}}^{-1} \text{h}^{-1}$ und die Wechselzahl auf $726 \mu\text{mol}_{\text{Oxidation}} \mu\text{mol}_{\text{P450}}^{-1}$ (Tab. 3.16). Als produktivster Biokatalysator stellte sich *E. coli* JM109 mit einem $Y_{\text{P/X}}$ von etwa $17 \text{ mg/g}_{\text{cdw}}$ und einem kombinierten Produkttiter (Verbenol und Verbenon) von über $1,4 \text{ mM}$ heraus (Tab. 3.16).

Biokatalysatoren, die von der Koexpression von GldA in Hinblick auf ihre Produktivität ($Y_{\text{P/X}}$) profitierten, produzierten auch mit einem höheren Verbenonanteil (Tab. 3.16, A, B und D). Am stärksten ausgeprägt war dies für die Umsetzungen mit den *P. putida*-Stämmen. Im Falle von *P. putida* KT2440 wurde nach 48 Stunden Umsetzung eine fast vollständige Oxidation von Verbenol zu Verbenon (90 %) erreicht. Anscheinend fördert die unterstützende Kofaktorregeneration durch GldA die verstärkte Oxidation des Intermediats Verbenol zu Verbenon. *E. coli* BL21 profitierte allerdings nicht als Biokatalysator von der Koexpression von GldA. Im Gegenteil wurde eine etwas geringere Produktivität erreicht (Tab. 3.16, C). SDS-PAGE-Analyse (Abb. 3.19) und Aktivitätsmessung (Tab. 3.14) untermauerten, dass GldA in *E. coli* BL21 funktional exprimiert wurde. Darum schien Kofaktorversorgung in *E. coli* BL21 kein limitierender Faktor für die Ganzzellumsetzung von α -Pinen zu sein.

3.4.3 Biotransformation von α -Pinen mit P450-ADH-Kaskade

Neben CYPs sind ADHs dafür bekannt, Oxidationen von Alkoholen zu den entsprechenden Ketonen durchzuführen. In diesem Abschnitt wurde die Etablierung einer Kaskade aus P450cam^{FALA} und einer ADH für die Umsetzung von α -Pinen zu Verbenon in einem Ganzzellbiokatalysator angestrebt. Zu diesem Zweck wurde die NAD⁺-abhängige ADH 3 α -HSDH aus *Pseudomonas testosteroni* koexprimiert, damit sie *cis*-Verbenol zu Verbenon oxidiert und gleichzeitig Kofaktor regeneriert (vgl. Abschnitt 3.2). Bei der Umsetzung mit unterstützender Kofaktorregeneration durch koexprimierte GldA erzielte *E. coli* BL21 den geringsten Verbenonanteil unter den angewandten Biokatalysatoren (Abb. 3.26, C). Um den Effekt der Koexpression von 3 α -HSDH auf den Verbenonanteil zu untersuchen, wurde GldA durch 3 α -HSDH ersetzt und in *E. coli* BL21 von einem zweiten Plasmid neben P450cam^{FALA}/Pdx/PdR koexprimiert (Abb. 3.20). Mit diesem Ganzzellbiokatalysator wurden Umsetzungen im Schüttelkolben und abschließend auch im Fermenter durchgeführt. Im Schüttelkolben wurden Biotransformationen mit Polymyxin B-permeabilisierten Zellen unter den gleichen Bedingungen wie zuvor jedoch mit unterschiedlichen α -Pinenkonzentrationen (20, 50 und 100 mM) durchgeführt (Abb. 3.27).

Abbildung 3.27: Einfluss der Koexpression von 3 α -HSDH auf $Y_{P/X}$ und Verbenonbildungsanteil des *E. coli* BL21-Biokatalysators - Verbenonbildung durch permeabilisierte *E. coli* BL21-Zellen nach Expression von P450cam^{FALA}/Pdx/PdR und der ADH 3 α -HSDH aus *P. testosteronei*. $Y_{P/X}$ in mg/g_{cdw} (gefüllte Symbole) und der Verbenonanteil (offene Symbole) sind für unterschiedliche Anfangskonzentrationen von α -Pinen zu sehen (20 mM: Kreise, 50 mM: Quadrate, 100 mM: Dreiecke). Die Umsetzungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.



Im Vergleich zum GldA koexprimierenden Biokatalysator wurde mit dem 3 α -HSDH koexprimierenden *E. coli* BL21 höhere Verbenonanteile mit zugleich erhöhter Produktivität $Y_{P/X}$ erreicht (vgl. Abb. 3.27 und Abb. 3.26, C). Unabhängig von der anfänglichen α -Pinenkonzentration wurde eine beinahe vollständige Oxidation von Verbenol zu Verbenon nach 48 Stunden (bis zu 94 %) beobachtet. Anders als beim GldA koexprimierenden Biokatalysator lag der Anteil an Verbenon bereits nach kurzer Zeit (5h) bei 70 bis 80 %. Biokatalysatoren mit koexprimierter GldA bildeten zum gleichen Zeitpunkt einen Verbenonanteil von 20 bis 50 % (vgl. Abb. 3.26). Die zu Beginn eingesetzte Konzentration an α -Pinen hatte keinen Einfluss auf den Anteil an gebildetem Verbenon (Abb. 3.27). Jedoch führte eine hohe Anfangskonzentration zu geringerer Produktivität $Y_{P/X}$, insbesondere in den ersten Stunden der Umsetzung. Bei 100 mM α -Pinen zeigte der Biokatalysator den geringsten Umsatz. Bei 50 mM α -Pinen wurde mit 18,7 mg g_{cdw}⁻¹ und einem maximalen Verbenontiter von fast 1 mM die höchste Produktivität erreicht (Tab. 3.17).

Tabelle 3.17: Parameter der Umsetzung von α -Pinen durch permeabilisierten *E. coli* BL21 mit P450cam^{FALA}/Pdx/PdR und koexprimierter 3 α -HSDH

Verbenon (μ M) ^a	956
NAD ⁺ -Reduktionsaktivität der ADH (U mL ⁻¹)	19,0
Eingesetzte P450 (μ M)	1,4
Zellkonzentration (g _{cdw} L ⁻¹)	8,3
$Y_{P/X}$ (mg g _{cdw} ⁻¹) ^a	18,7

^a nach 48 Stunden Umsetzung von 50 mM α -Pinen

$Y_{P/X}$: Produktivität (Masse Produkt pro Trockenmasse Biokatalysator)

Neben der nicht ausreichenden Versorgung mit Kofaktor und mangelnden Massentransfer von Substrat in die Zelle könnte auch die Unterversorgung der P450cam^{FALA} mit molekularem Sauerstoff ein Grund für die nicht optimale Ausnutzung des Reaktionspotentials sein. Da die in dieser Arbeit eingesetzten Zellkonzentrationen zu einer Abreicherung des Gelöstsauerstoffs geführt haben könnten, wurde das zuvor im Schüttelkolben untersuchte System in den Fermenter übertragen, wo die Sauerstoffsättigung ständig kontrolliert und geregelt wurde.

Der Bioreaktor wurde mit Zellen in einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0,35 beimpft und über Nacht bei 37 °C gerührt (Abb. 3.28). Bis zum nächsten Mittag hatte sich die OD_{600nm} bis auf 22,4 erhöht. Dann wurde die Temperatur auf 25 °C gesenkt und die Expression induziert. Bis zum Beginn der Biotransformation erhöhte sich die OD_{600nm} weiter bis auf einen Wert von 52. Dies entsprach einer Zellfeuchtmasskonzentration von 123 g_{cww}/L bzw. einer Zelltrockenmasskonzentration von 27,2 g_{cdw}/L . Somit war die erreichte Zelltrockenmasskonzentration um Faktor drei höher als in der Umsetzung im Schüttelkolben (vgl. Tab. 3.17). Vor Induktion und während der Expression wurde die P450-Konzentration und die Aktivität der 3 α -HSDH bestimmt (Abb 3.29). Zu

Beginn der Expression wurde im Rohlysate keine P450-Konzentration festgestellt. Nach 10 Stunden war im Medium eine P450-Konzentration von $3,4 \pm 0,2 \mu M$ erreicht. Obwohl die Zelldichte danach noch deutlich zunahm (vgl. Abb. 3.28), konnte die P450-Konzentration nicht weiter erhöht werden. Es wurde sogar ein Rückgang auf $2,8 \pm 0,2 \mu M$ nach 23 Stunden festgestellt. Bei Bestimmung der TOF_{NAD^+} von 3 α -HSDH wurde schon vor Induktion eine Aktivität von $9,3 \pm 1,0 U/mL$ gemessen. Bei Zugabe von NAD^+ in eine Negativkontrolle ohne *cis*-Verbenol wurde keine Aktivität gemessen ($0,0 \pm 0,7 U/mL$). Im Laufe der Expression stieg die Aktivität auf $10,7 \pm 0,3 U/mL$ (10 h) bzw. $13,9 \pm 1,1 U/mL$ (23 h).

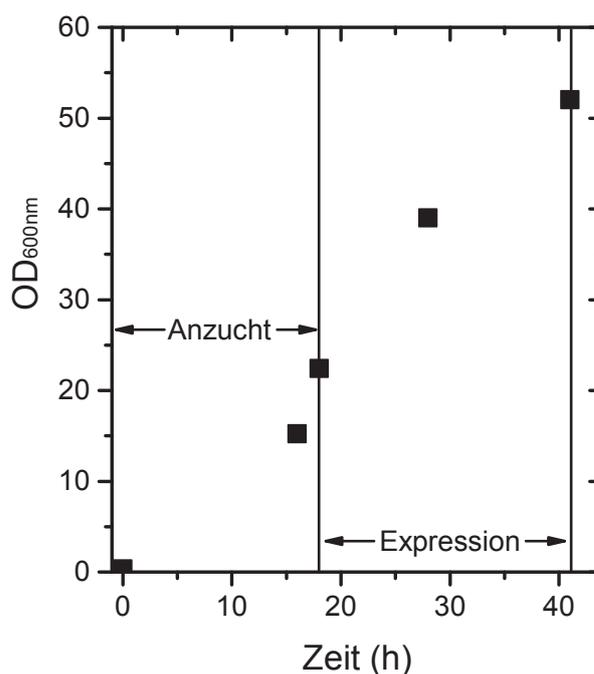
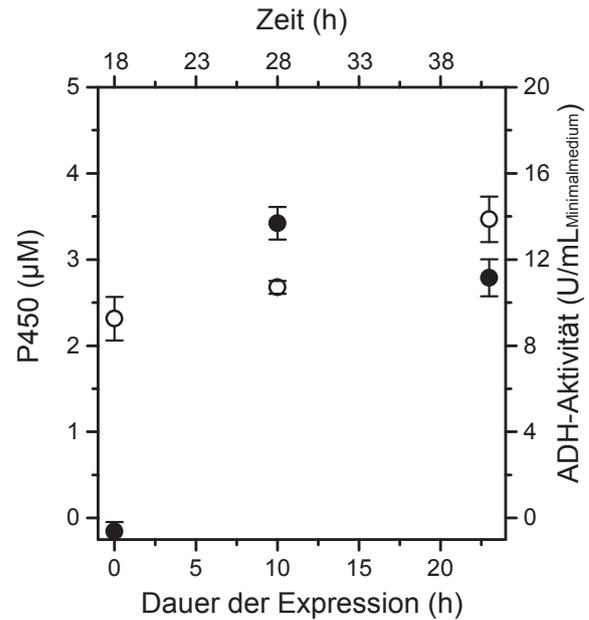


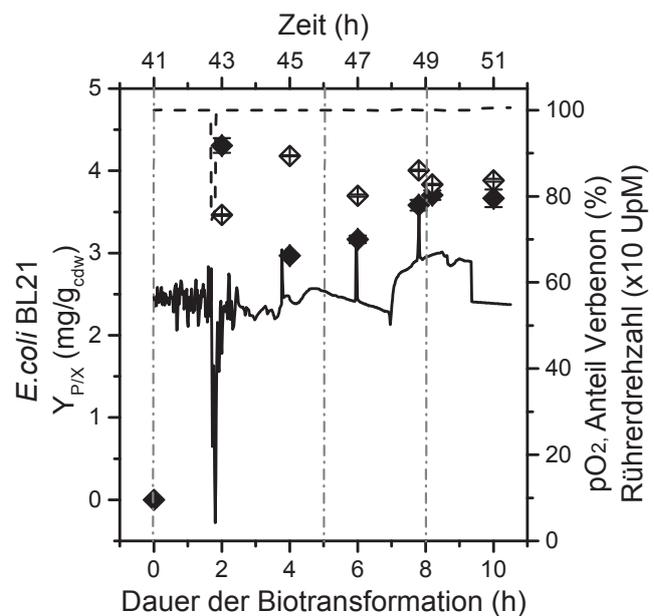
Abbildung 3.28: Entwicklung der Zelldichte ab Inokulation bis zum Beginn der Biotransformation - In einer 18-stündigen Anzuchtphase wurde bei 37 °C Biomasse produziert. Dann wurde die Temperatur auf 25 °C gesenkt und die Expression induziert. Nach 41 Stunden wurde permeabilisiert und die Biotransformation durch Zugabe von DMSO mit c_{end} von 2 % (v/v) und α -Pinen (c_{end} : 20 mM) gestartet.

Abbildung 3.29: Koexpression von P450cam^{FALA} und 3 α -HSDH in *E. coli* BL21 - Vor Induktion (t=18h) sowie nach 10 und 23 Stunden Expression wurde eine Probe der Zellen aufgeschlossen und die P450-Konzentration (gefüllte Kreise) sowie die Aktivität von 3 α -HSDH (offene Kreise) bestimmt. Während die obere x-Achse die Zeit seit der Inokulation des Rührreaktors angibt (vgl. Abb. 3.28), zeigt die untere x-Achse die Dauer der Expression. Die Werte wurden in Dreifachbestimmung ermittelt.



Durch die Permeabilisierung mit Polymyxin B und in Anwesenheit von α -Pinen schien der Bedarf der Zellen an Sauerstoff unverändert (Abb. 3.30). Nach anderthalb Stunden der Biotransformation wurde die Rührerdrehzahl kurzzeitig von 1000 auf 750 UpM gedrosselt, was ein schlagartiges Absinken der Gelöstsauerstoffkonzentration zur Folge hatte. Im Laufe der Biotransformation wurde die Gelöstsauerstoffkonzentration bei 50-60 % gehalten. Regelmäßig wurden Proben gezogen und gaschromatographisch analysiert.

Abbildung 3.30: Rührerdrehzahl, pO₂, sowie Y_{P/X} und Verbenonbildungsanteil des etablierten *E. coli* BL21-Biokatalysators - Rührerdrehzahl (als gestrichelte Linie und um Faktor 10 verringert dargestellt) und pO₂ (durchgezogene Linie) während der Biotransformation. Die Produktivität der permeabilisierten Zellen Y_{P/X} in mg/g_{cdw} (gefüllte Symbole) und der Anteil von Verbenon am Produkt (offene Symbole) wurde ausschließlich unter Berücksichtigung von Verbenol und Verbenon als Produkt bestimmt. Während die obere x-Achse die Zeit seit der Inokulation des Rührreaktors angibt, zeigt die untere x-Achse die Dauer der Biotransformation. Die grauen Strichpunktlinien markieren den Zeitpunkt einer Substratzugabe. Die Werte wurden in Dreifachbestimmung ermittelt.



Bereits nach 2 Stunden war die maximale Produktivität von $4,3 \text{ mg/g}_{\text{cdw}}$ erreicht. Da die Möglichkeit bestand, dass das flüchtige α -Pinen durch den Gasstrom ausgetragen wird, wurde nach 5 Stunden nochmals Substrat hinzugegeben, ohne dass dadurch ein wesentlicher Zugewinn an Produkt erreicht wurde. Nach 8 Stunden wurde nochmals Substrat hinzugegeben und kurz zuvor sowie kurz danach eine Probe genommen. Die Zugabe von Substrat zeigte keinen Einfluss auf die ermittelten Werte. Der Verbenonanteil war wie bei der Biotransformation im Schüttelkolben bereits nach 4 Stunden recht hoch (89 %), jedoch konnte der maximale Wert von 94 % nicht erreicht werden. Obwohl die ausreichende Versorgung von Zellen und CYPs durch Sauerstoff gewährleistet zu sein schien, konnte die Reaktionszeit im Vergleich zum Schüttelkolben nicht verlängert werden. Während der Produkttiter an Verbenon mit $582 \pm 13 \text{ } \mu\text{M}$ etwa 40 % geringer ausfiel als im Schüttelkolben, konnte durch die Maßstabsvergrößerung von 20 mL auf 3,2 L eine Produktmenge von etwa 280 mg hergestellt werden.

4 Diskussion

4.1 Umsetzung von α -Pinen durch P450-BM3-Varianten *in vitro*

Charakterisierung der P450-BM3-Varianten ATSCVG und AQCRG

Bei der Sequenzierung des Genmaterials der P450-BM3-Varianten von Budde [104] stellte sich heraus, dass mit R471C eine zusätzliche Mutation enthalten war. Diese Mutation befindet sich am C-terminalen Ende der Monooxygenasedomäne (BMO) in direkter Nachbarschaft zur Linkerregion, die die Verbindung zwischen BMO und Reduktasedomäne (BMR) herstellt [205]. Durch die beschriebene Randlage der Mutation wurde kein Effekt auf die Selektivität oder Substratoxidationsrate erwartet. Jedoch wird dieser Mutation zugeschrieben, dass sie die Lösemitteltoleranz des Enzyms, d.h. seine Stabilität in Anwesenheit auch hoher Lösemittelkonzentrationen, verbessert [132]. Weil es sich bei α -Pinen um ein apolares Substrat ($\log P_{O/W}=4,46$ laut Sikkema *et al.* [128]) mit Lösemittelcharakter handelt, wurde dies als eher nützlich bewertet und die unerwartete Mutation beibehalten. So wurde darüber hinaus die Vergleichbarkeit mit den von Budde erhobenen Daten [104] erhalten.

Die von Budde beschriebene hohe Regioselektivität der ATSCVG-Variante von 88 % Verbenolanteil im Produktspektrum bei der Oxidation von (-)- α -Pinen konnte in dieser Arbeit nicht erreicht werden (48 %, vgl. Tab. 3.1). Eine Erklärung für die Unterschiede könnten die abweichenden Reaktionsbedingungen sein. Während in dieser Arbeit 200 μM (-)- α -Pinen mit 2 % (v/v) DMSO durch 0,5 μM P450 mit 200 μM Kofaktor umgesetzt wurde, wurden bei Budde 200 bis 400 μM (-)- α -Pinen, 2 % (v/v) DMSO und 0,1 bis 0,5 μM P450 eingesetzt und die Reaktion durch Zugabe von 120 μM Kofaktor gestartet. Bemerkenswert ist, dass in Buddes Arbeit die Regioselektivität in der später durchgeführten Umsetzung einer zweiten Phase von (-)- α -Pinen mit einer Konzentration von 50 % (v/v) durch die ATSCVG-Variante mit einem Verhältnis von Verbenol zu Pinenepoxid von etwa 1:1 [104, S.96] nicht reproduziert wurde, sondern dem in dieser Arbeit für die (-)- α -Pinenoxidierung erhaltenen Wert von 48 % Verbenol- und 44 % Pinenepoxidanteil ähnelt.

Durch Vergleich der Varianten ATSCVG und AQCRG mit der F87A-Einzelmutationsvariante bei der Oxidation von (-)- α -Pinen wurde in dieser Arbeit gleichwohl eine verbesserte Regioselektivität gegenüber der F87A-Einzelmutationsvariante festgestellt. Beide

Varianten, ATSCVG und AQCRG, besitzen Gemeinsamkeiten, die sie von der F87A-Einzelmutationsvariante unterscheiden. Neben der R471C-Mutation, für die ein Einfluss auf die Selektivität sehr unwahrscheinlich ist, haben beide Varianten eine Mutation an der Position LEU-188, die am Eingang des Substratzugangskanals gelegen ist, und die A74G-Mutation im Substratzugangskanal oberhalb des katalytischen Zentrums. Für die letzteren beiden Positionen wurde bereits ein Einfluss auf die Aktivität des Enzyms von Budde vermutet [104, S.96], was ähnliche Erkenntnisse bei der Hydroxylierung von Indol [206] und der Umsetzung von Paranitrophenoxycarbonsäuren [207] untermauern. Obwohl beide Positionen in so großer Entfernung zum katalytischen Zentrum liegen, dass sie für die in dieser Arbeit hergestellte Bibliothek keine Berücksichtigung fanden, und ihr Einfluss bisher nur auf die Aktivität begrenzt beschrieben wurde, zeigt ihre Mutation im Rahmen dieser Arbeit Potential, die Regioselektivität bei der Oxidation von (-)- α -Pinen zugunsten der Bildung von Verbenol zu verbessern. So zeigte die AQCRG-Variante trotz der Mutationen A74G und L188Q keine höhere Substratoxidationsrate als die F87A-Variante, aber wies eine verbesserte Regioselektivität auf (vgl. Tab. 3.1). Die Mutation der beiden Positionen hatte also im Falle der Variante AQCRG keinen positiven Einfluss auf die Substratoxidationsrate oder dieser Einfluss wurde durch die K69R-Mutation wieder aufgehoben. Das wildtypische Lysin an Position 69 dient vornehmlich der Stabilisierung einer der Propionylseitenketten des Porphyrinrings [208]. Des Weiteren wird eine mögliche Interaktion mit dem Substrat vermutet [104, S. 78-81]. Die Schulter bei 420 nm im CO-Differenzspektrum dieser Variante begann sich nach Reduktion erst mit der Zeit auszuprägen (vgl. Abb. 3.2), so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Variante empfindlich auf einen Bestandteil des Assays wie zum Beispiel das Reduktionsmittel reagiert, aber im Lysat in seiner aktiven Form vorliegt. Bei Bestimmung der Aktivitäten wurde im Vergleich zur F87A-Variante lediglich ein Anstieg der Kofaktorverbrauchsrate beobachtet, während kein Effekt auf die Substratoxidationsrate festzustellen war (vgl. Tab. 3.1). Somit wurde für die Variante AQCRG eine geringere Kopplung erreicht.

Anders war es bei der Variante ATSCVG, deren Anstieg bei Kofaktorverbrauchsrate und Substratoxidationsrate proportional war. Mit der A111T-Mutation ist dieser Effekt nur schwer direkt in Verbindung zu bringen. Sie liegt, wie die R471C-Mutation, abseits von katalytischem Zentrum und Substratzugangskanal (vgl. Tab 3.3). Auch in der Literatur wurde sie noch nicht beschrieben, so dass weitere detaillierte Untersuchungen zur Mutation nötig wären, um eine mögliche Funktion zu identifizieren. Neben der voneinander abweichenden Mutation an Position LEU-188, bleibt noch die Mutation Y51V am Eingang des Substratzugangskanals als Alleinstellungsmerkmal und Erklärung für die erhöhte Aktivität. So scheint die Mutation Y51V ein vielversprechender Ansatzpunkt, um das Problem von zu geringer Aktivität

zu lindern, da sie die Substratoxidations- und Kofaktorverbrauchsrate gleichermaßen ansteigen ließ. Diese Beobachtung ist im Einklang mit den zuvor von Budde durchgeführten Experimenten zur Oxyfunktionalisierung von (+)- α -Pinen durch die ATSCVG-Variante [104]. Dieser vermutet, dass die Mutation des TYR-51 zu einer apolaren Aminosäure die Bindung des apolaren Substrats Pinen verbessert [104]. Um den Einfluss aller in dieser Arbeit vorgestellten Mutationen zu ergründen, wäre die Herstellung und Charakterisierung von Einzelmutationsvarianten und Varianten mit unterschiedlichen Kombinationen dieser Mutationen aufschlussreich.

Charakterisierung von P450-BM3-Varianten mit der I401P-Mutation

Auch die I401P-Mutation hatte einen Einfluss auf die Regioselektivität des Enzyms, obwohl die Aminosäure selbst nicht an der Formung des Substratzugangskanals beteiligt ist (Tab. 3.3). Jedoch hat die Mutation einen Einfluss auf die Positionierung des Häms [172], welches wiederum das katalytische Zentrum nach unten begrenzt. In der Tatsache, dass die Mutation das Enzym auch ohne Bindung von Substrat in den *high spin*-Zustand versetzt [172], liegt ein möglicher Grund, warum die Kofaktorverbrauchsrate überproportional zur Substratoxidationsrate ansteigt. Ähnliches wurde auch schon für die Oxidation von (+)-Valencen durch die P450-BM3-Variante F87A/A328I/I401P im Vergleich zur Variante F87A/A328I beobachtet [49]. Die zusätzlichen Mutationen R47L und Y51F am Eingang des Substratzugangskanals führten wie bei der Variante ATSCVG zu höherer Aktivität, allerdings in diesem Falle überproportional zu Lasten einer hohen Kofaktorverbrauchsrate. Diese Kombination aus einer Mutation an der Position TYR-51 zum apolaren Phenylalanin und der I401P-Mutation (Variante AIPLF) führte zur höchsten in diesem Bibliotheksscreening für die Oxidation von (-)- α -Pinen gemessenen Substratoxidationsrate von $213 \pm 8 \text{ min}^{-1}$, was ähnlich hoch ist wie die durch Whitehouse *et al.* beschriebene Substratoxidationsrate von 238 min^{-1} , jedoch für die Oxidation von (+)- α -Pinen und durch eine I401P-Einzelmutationsvariante. Da die Raten für (-)- α -Pinen für Varianten mit I401P-Mutation in dieser Arbeit erstmalig bestimmt wurden, ist hier kein Vergleich mit den Daten anderer Autoren möglich. Jedoch blieb in dieser Arbeit die Variante AIPLF im direkten Vergleich mit anderen in Bezug auf die Oxidation von (-)- α -Pinen bereits beschriebenen P450-BM3-Varianten *in puncto* Substratoxidationsrate unerreicht.

Verbesserung der Selektivität von P450-BM3-Varianten durch rationales Proteindesign

Bei der Erzeugung von P450-BM3-Varianten wurde ein auf rationalem Proteindesign basierter Ansatz der gerichteten Evolution vorgezogen, um bereits vorhandenes Verständnis zu katalytischem Zentrum und Enzym/Substrat-Interaktion einzubringen und auf diesem

Wege eine kleine Bibliothek mit erhöhter Wahrscheinlichkeit für das Auffinden selektiverer Varianten herzustellen. Auf diese Weise konnte auf einen Hochdurchsatzassay verzichtet und auf die gaschromatische Messung der Produktbildung zurückgegriffen werden. Ein Hochdurchsatzassay, wie er bei der Anwendung von gerichteter Evolution üblich ist [209], stand nicht in ausreichend spezifischer Form zur Verfügung. Ein Assay basierend auf Vanillinschwefelsäure, mit dem Verbenol photometrisch detektiert werden kann, wurde von Budde beschrieben [104]. Allerdings ist die Nachweisgrenze mit 1 mM hoch und das Verhalten des Assays bei Produktmischungen wie Verbenol, Pinenepoxid, Myrtenol und Verbenon nicht charakterisiert. Auch eine Unterscheidung nach *cis*- und *trans*-Verbenol ist nicht möglich. Ein unspezifisch für CYPs anwendbares Hochdurchsatzassay ist, Bibliotheken nach dem Kofaktorverbrauch durchzumustern. Durch Kurzschlussreaktionen (engl. *shunt reactions*) kann es jedoch bei CYPs dazu kommen, dass am Ende einer auf diese Weise durchgeführten gerichteten Evolution Varianten angereichert werden, die zwar viel NADPH verbrauchen, aber nicht das gewünschte Produkt bilden.

Bei Austausch der Position ALA-264 durch Valin wurde eine Variante erzeugt, die, wie von Seifert *et al.* [63] für die Oxidation des Monoterpens (+)-Limonen beschrieben, das Substrat primär allylisch hydroxyliert. So entsteht aus (-)- α -Pinen vornehmlich (-)-Myrtenol (44 % Anteil im Produktspektrum). Eine Vertiefung der Mutationsstudien wie bei Seifert *et al.* unter Einschluss der Positionen PHE-87, ALA-328 und LEU-437 könnte hier noch selektivere und aktivere Varianten hervorbringen. Da (-)-Myrtenol nicht das Zielprodukt war, wurde der Ansatz jedoch nicht weiter verfolgt.

Neben der von Branco *et al.* [105] beschriebenen Wichtigkeit der Position 87 für die Regioselektivität zugunsten der Bildung von (-)-Verbenol aus (-)- α -Pinen konnte in dieser Arbeit mit ALA-328 eine weitere Position, diesmal mit Bedeutung für die Stereoselektivität der Reaktion (also der Bildung von (-)-*cis*- oder (-)-*trans*-Verbenol), identifiziert werden. Beim Vergleich des in dieser Arbeit mit AutoDock Vina durchgeführten Dockings von (-)- α -Pinen in die P450-BM3-Variante F87G mit der entsprechenden MD-Simulation von Branco *et al.* [105] war festzustellen, dass das (-)- α -Pinen im Falle der MD-Simulation leicht um seine Längsachse gedreht war, sodass der Bimethylrest in Richtung des Glycins an Position 87 wies (vgl. Abb. 3.6, B). Diese Positionierung des Substrats prädestiniert eine Hydroxylierung zu (-)-*trans*-Verbenol. Dies steht allerdings im Widerspruch zu den Erkenntnissen, die Budde durch Bestimmung des Produktspektrums der F87G-Varianten gemacht hatte [104, S.75] und die in dieser Arbeit bestätigt wurden (vgl. Tab. 3.4). Obwohl das Docking durch MD-Simulation aufgrund des flexiblen Gerüsts im Vergleich zu AutoDock Vina als die verlässlichere Methode gilt, liefert das durch AutoDock Vina erhaltene Docking ein Modell, dass die Erklärung der Stereoselektivitätseffekte erheblich erleichtert. Hier liegt das (-)-

α -Pinen nahezu äquatorial zum Eisen des Häms (vgl. Abb. 3.6, A) bzw. einem darüber befindlichen Sauerstoffatoms. Nur geringfügiges Kippen um die Längsachse des Moleküls kann so zu einer Umkehrung der Stereoselektivität führen. Die vermutete Geringfügigkeit dieser Positionsveränderung ist insofern wahrscheinlich, dass der Vergleich des Dockings in eine F87G-Variante mit dem Docking in eine F87G/A328I-Variante keine Erklärung für den Wechsel im Diastereomerenüberschuss ergab (vgl. Abb. 3.7), obwohl bei Bestimmung des Produktspektrums der entsprechenden Varianten ein starker Einfluss der A328I-Mutation auf die Stereoselektivität festgestellt werden konnte (vgl. Tab. 3.4).

Auf diese Weise wurde ein Katalysator geschaffen, der sich in einem Ansatz exprimieren und in einem Schritt reinigen lässt, sowie die gewünschten Hydroxylierungsprodukte mit erhöhter Selektivität (z. B. für Oxidation von (-)- α -Pinen zu Verbenol: F87G mit einem *de* von 67 %_{cis} bzw. F87G/A328I mit einem *de* von 78 %_{trans}) zugänglich macht (vgl. Tab. 3.4). Auch für die selektive Hydroxylierung von (+)- α -Pinen konnten Unterschiede in der Stereoselektivität, also bei der Bildung von (+)-*cis*- bzw. (+)-*trans*-Verbenol festgestellt werden (vgl. Abb. 3.8, ohne Bestimmung von Diastereomerenüberschüssen). So wurde die Voraussetzung geschaffen, *in vitro* nach stereoselektiven (oder je nach Anwendung auch nach nicht-stereoselektiven) Alkoholdehydrogenasen für eine Kaskade zu suchen.

4.2 Umsetzung von α -Pinen durch eine Kaskade aus P450-BM3 und ADH *in vitro*

Screening von Alkoholdehydrogenasen auf Verbenoloxidationsaktivität

In einer von der Fa. c-LEcta (Leipzig, GER) zur Verfügung gestellten Bibliothek von elf kommerziellen Alkoholdehydrogenasen (ADHs) wurde unter den acht aktiven Enzymen (Abschnitt 3.2.1) die ADH-88 ausgewählt, da sie (-)-*cis*-Verbenol beinahe vollständig (≥ 99 %) zu Verbenon umsetzte. Unter den 13 nicht-kommerziellen ADHs wurden drei aktive Exemplare (PpdADH1, Gre2p und 3 α -HSDH) gefunden (Abschnitt 3.2.2) und wie die ADH-88 in *E. coli* exprimiert.

Die ADH-88 erreichte hier eine auf das Expressionsmedium bezogene volumetrische Aktivität, die von nicht-kommerziellen ADHs unerreicht blieb. Diese hohe volumetrische Aktivität ist durch die hohe spezifische Aktivität des Enzyms begründet (vgl. beides mit Tab. 3.6). Denn normiert man auf die spezifische Aktivität, stellt man fest, dass PpdADH1 ähnlich gut exprimiert wurde wie ADH-88. Bezüglich der spezifischen Aktivität und der Expression fiel Gre2p gegenüber ADH-88 und PpdADH1 etwas ab. Jedoch war bei Gre2p die Verunreinigung mit unspezifisch bindendem Protein aus dem Rohlysat nach der

Reinigung am höchsten (vgl. Abb. 3.10, C) und darum der Wert der spezifischen Aktivität wahrscheinlich zu niedrig errechnet worden. 3α -HSDH besitzt nur eine vergleichsweise geringe spezifische Aktivität. Dieses Enzym wurde bisher als Steroiddehydrogenase beschrieben [210], weswegen Verbenol ein für dieses Enzym ungewöhnlich kleines Substrat darstellt. Sie ist die einzig nicht-kommerzielle aktive ADH bakterieller Herkunft (Herkunft der kommerziellen ADH-88 nicht bekannt), welche in dieser Arbeit für die Oxidation von Verbenol identifiziert wurde. Gemessen an der niedrigen spezifischen Aktivität ist der Expressionstiter recht hoch, was für eine gute Expression im Vergleich zu den anderen nicht-kommerziellen ADHs spricht, die aus Hefen stammen. Unter den nicht-kommerziellen ADHs waren mit PpADH1, 2, 3, 5 und 8 aus *P. putida* KT2440, sowie mit 7α -HSDH aus *E. coli* K12 auch Enzyme, die aus Stämmen bzw. Spezies stammen, die im Verlauf dieser Arbeit auf ihre Anwendbarkeit als Ganzzellkatalysator getestet wurden (s. Abschnitt 3.4). Jedoch wurde keine dieser ADHs als aktiv identifiziert. Somit wurde hier keine unterstützende Aktivität für die Bildung von (-)-Verbenon aus (-)-Verbenol erwartet. Andererseits musste auch kein Abbau von Verbenol befürchtet werden, wenn Verbenol das gewünschte Produkt darstellte.

Kaskade aus P450-BM3 F87G bzw. F87G/A328V und ausgewählten ADHs

Der Vergleich der chromatographischen Analyse von Umsetzungen von (-)- und (+)- α -Pinen entweder durch P450-BM3 F87G allein oder in Kombination mit einer ADH wies eine Aktivität aller getesteten ADHs innerhalb der Kaskade nach (vgl. Abb. 3.12 und 3.13). So ist für alle Reaktionen ein Zuwachs an Verbenon durch Oxidation von *cis*-Verbenol festzustellen, sowohl bei (-)- als auch bei (+)- α -Pinen als Substrat. Im Falle der ADH-88 schien die Aktivität auch bei niedrigen Substratkonzentrationen hoch, so dass in den Chromatogrammen der Doppelpeak der beiden Verbenoldiastereomere aufgelöst und ein schulterfreier Peak von *trans*-Verbenol übrig zu bleiben schien (vgl. Abb. 3.12 und 3.13). Die gaschromatographische Trennung mittels chiraler stationärer Phase bestätigte diesen Eindruck und wies zum Teil exzellente Diastereomerenüberschüsse von 99 % für (-)-*trans*-Verbenol und 94 % für (+)-*trans*-Verbenol aus (vgl. Tab. 3.4). ADH-88 ist also für die Umsetzung beider Pinenenantiomere gleichermaßen gut geeignet. Bei den nicht-kommerziellen ADHs konnte kein ähnlich vielseitiger Kandidat gefunden werden. Bei der Umsetzung von (+)- α -Pinen konnten durch PpdADH1 und Gre2p hohe Diastereomerenüberschüsse an (+)-*trans*-Verbenol gebildet werden (jeweils 99 % bzw. 98 %). Bei der Umsetzung von (-)- α -Pinen wurden jedoch nur jeweils 75 % bzw. 60 % Diastereomerenüberschüsse an (-)-*trans*-Verbenol gebildet. Wenn das Interesse auf diastereomerenreinem (-)-*trans*-Verbenol liegt, wäre es sinnvoll, eine P450-BM3-Variante zu wählen, die vornehmlich (-)-*trans*-Verbenol bildet (z.B. F87G/A328V, vgl. Tab. 3.4). Neben der Maximierung der Ausbeute dürfte wohl ein höherer Diastereomerenüberschuss erreicht werden.

Bei den Umsetzungen dominierte in Hinblick auf die Verteilung von reduziertem zu oxidiertem Kofaktor die oxidierende Aktivität der BMR deutlich über die reduzierende der ADH (Abb. 3.14). So war außer bei Verwendung der ADH-88 bei der Oxidation von (-)- α -Pinen kein Unterschied beim Kofaktorverbrauch zwischen der P450-BM3/ADH-Kaskade und der Reaktion nur mit P450-BM3 festzustellen, obwohl ein Überschuss an kofaktorreduzierender Aktivität (ADH) gegenüber kofaktoroxidierender Aktivität (BMR) eingesetzt wurde. Aufgrund der geringen Verbenolkonzentration konnten viele ADHs ihr Aktivitätspotential nicht voll entfalten. Eine Bestimmung der K_m -Werte der ADHs gegenüber Verbenol könnte zukünftig hier weitere Erklärung liefern. Lediglich die ADH-88 konnte bei der Oxidation von (-)- α -Pinen die Abnahme der Kofaktorkonzentration durch Regeneration des Kofaktors verringern, sodass der reduzierte Kofaktor später aufgebraucht war. So konnte anhand des Verlaufs der Kofaktorkonzentration nur für diese Kombination eine Kofaktorregeneration durch die ADH nachgewiesen werden. Bei der Oxidation von (+)- α -Pinen hingegen trat nicht einmal für die Kombination mit ADH-88 dieses Phänomen auf, entweder weil die Aktivität der CYP gegenüber (+)- α -Pinen höher oder die Aktivität der ADH-88 gegenüber (+)-*cis*-Verbenol geringer war. Eine weitere Möglichkeit wäre auch hier, dass ein hoher K_m -Wert gegenüber (+)-*cis*-Verbenol zu niedriger Aktivität der ADH führte. Eine Bestimmung der K_m -Werte wird hier alleine dadurch erschwert, dass (+)-*cis*-Verbenol nicht kommerziell erhältlich ist.

Schlussfolgerung

Gemäß der Zielsetzung dieser Arbeit sollte ein Enzymsystem entwickelt werden, welches modular zusammengesetzt eine Reihe von Produkten zugänglich macht (vgl. Abb. 1.13). Mangels einer ADH mit Selektivität gegenüber *trans*-Verbenol ist neben (-)-*cis*-Verbenol, welches sich aus Terpentin isolieren lässt und kommerziell erhältlich ist, auch das (+)-*cis*-Verbenol nicht mit hohem Diastereomerenüberschuss darstellbar. Außerdem konnte das volle Potential bei der Herstellung von Verbenon nicht ausgeschöpft werden, da Restkonzentrationen von *trans*-Verbenol im Reaktionsgemisch verblieben. Da die Umkehrung von Stereoselektivität der ADH durch Mutation ein schwieriges Unterfangen darstellt [13], sollte ein Screening weiterer ADHs in Betracht gezogen werden. Sowohl (-)- als auch (+)-*cis*-Verbenol besitzen nach der Cahn-Ingold-Prelog-Konvention [211] eine (S)-Konfiguration. Um das modulare Enzymsystem um eine *trans*- bzw. (R)-verbenolselektive ADH zu ergänzen, sollten verstärkt Enzyme durchmustert werden, die das Hydridion bei der Reduktion von Ketonen von der *si*-Seite transferieren und (R)-Alkohole bilden. Diese sind zwar gegenüber den (S)-alkoholbildenden ADHs in der Unterzahl, wurden aber erst kürzlich in einem Übersichtsartikel zusammenfassend vorgestellt [212]. Durch Verschiebung des Gleichgewichts könnten solche ADHs die Oxidationen von *trans*-Verbenol katalysieren.

Durch die Nutzung eines Kosubstrats für die ADH wurden Kofaktor effektiv regeneriert (vgl. Abb. 3.17) und die Produktkonzentrationen erhöht (vgl. Tab. 3.8 und 3.9). Die Hypothese, dass höhere Umsätze am Mangel von geeignetem Substrat für die ADH scheiterten, konnte somit durch Zugabe von geeigneten Kosubstraten, wie 3-Oktanol oder Cyclohexanol im Falle der ADH-88 bzw. 2-Nonanol für die Gre2p, bestätigt werden. Je nach eingesetzter Variante der P450-BM3 konnte entweder (-)-Verbenon oder (-)-*trans*-Verbenol als Hauptprodukt gebildet werden (vgl. Tab. 3.8 und 3.9). Die Höhe der Produkttiter mit bis zu 70 μM bei 1 mM Substratkonzentration bei einer P450-Konzentration von 2,5 - 3,75 μM liegen unter denen, die zum Beispiel für die Bildung des Terpenoids (+)-Nootkaton aus dem Terpen (+)-Valencen durch eine Kaskade aus 5 μM P450-BM3 und ADH unter ähnlichen Bedingungen (2 % DMSO) erreicht wurden (>1 mM bei 10 mM Substratkonzentration, [101]). Eine Prozessoptimierung, wie zum Beispiel eine Optimierung von Substrat- und Kosubstratkonzentrationen, sowie andere Lösungsvermittler wie Methyl- β -Cyclodextrin führten in der erwähnten Arbeit zu höheren Produktkonzentrationen (>1,5 mM) und könnten auch bei der in dieser Arbeit gezeigten Kaskade zur weiteren Steigerung der Produktausbeute führen. Im Vergleich zur Kaskade für die Bildung von (+)-Nootkaton könnte das in dieser Arbeit umgesetzte Substrat und vor allem das entstehende Produkt eine deutlich stärkere Deaktivierung der Enzyme bewirken, da Sesquiterpene und -terpenoide wie (+)-Valencen und (+)-Nootkaton im Vergleich zu Monoterpenen und -terpenoiden aufgrund ihrer hohen Hydrophobizität als biokompatibler gelten [10, 129, 130]. Statt einer Optimierung der *in vitro*-Kaskade wurde eine Überführung des Systems in einen Ganzzellkatalysator angestrebt, um die Enzyme vor dem deaktivierenden Einfluss der beteiligten Substanzen zu schützen.

Doch neben der präparativen Komponente ist die gezeigte Kaskade auch von analytischem Interesse. Durch Umsatz von *cis*-Verbenol zu Verbenon durch die ADH, wurden die Peaks der beiden Verbenoldiastereomere ohne großen Aufwand auch auf der achiralen stationären Phase gaschromatographisch getrennt und durch Vergleich der Verbenon- und der *trans*-Verbenolkonzentration konnte auf indirekte Weise ein Diastereomerenüberschuss errechnet werden. Die selektive Umsetzung durch ADHs wurde bereits für die Bestimmung der Regio- und Stereoselektivität bei der Hydroxylierung von Oktan durch P450pyr eingeführt [213]. Auch in der hier gezeigten Arbeit lieferte diese Vorgehensweise Werte für den Diastereomerenüberschuss, die mit der Bestimmung durch gaschromatographische Trennung auf der chiralen stationären Phase vergleichbar waren. Somit eröffnet die selektive Oxidation von (-)- bzw. (+)-*cis*-Verbenol durch die ADHs eine Möglichkeit gekoppelt an eine Reduktion von Nitroblautetrazolium zum di-Formazanfarbstoff ein photometrisches Hochdurchsatzscreening nach Bildung von (-)- bzw. (+)-Verbenol durchzuführen, welches

sogar das Screening von CYPs und ihren Varianten in ganzen Zellen zulässt [213] und im Vergleich zu der von Budde [104] gezeigten Reaktion als deutlich sensitiver beschrieben wird (zuverlässige Bestimmung von Enantiomerenüberschuss bei 50 μM von 2-Oktanolmischungen aus den zwei Enantiomeren, [213]). Um jedoch nicht nur die Entstehung von (-)- bzw. (+)-*cis*-Verbenol in einem Hochdurchsatzscreening zu erfassen, sondern auch den Diastereomerenüberschuss, fehlt eine *trans*-selektive ADH. Ihre darüber hinausreichende Wichtigkeit für die Ausbeute bei der Herstellung von Verbenon und die Darstellung von diastereomerenreinem *cis*-Verbenol sowie die Strategie für weitere Screenings von ADHs wurde zuvor bereits erläutert.

4.3 Biotransformation von α -Pinen

(Ko-) Expression unterschiedlicher Enzyme in *E. coli* und *P. putida* mit *broad host range*-Vektoren

Die heterologe Expression in *P. putida* unter der Kontrolle des *rha*P_{BAD}-Promotors ist bereits gut etabliert und einige Biotransformationen mit den so geschaffenen Biokatalysatoren beschrieben [153, 154, 157, 158]. Auch in dieser Arbeit zeigte sich das System bei der Expression einer Variante der P450-BM3 in *P. putida* DSM12264 mit einer finalen Konzentration von 229 nmol/L_{TB} nach 24 h einem *Ptac*-Promotor-basierten Vektorsystem mit 212 nmol/L_{TB} mehr als ebenbürtig (Tab. 3.10). Wie durch Jeske und Altenbuchner [197] für *P. putida* KT2440 und *E. coli* JM109 gezeigt, wurde das System auch in dieser Arbeit gleichermaßen erfolgreich für die Expression in *P. putida* und *E. coli* angewandt. Dabei wurden sowohl bei der Konzentration von P450cam^{FALA} als auch bei der Aktivität von GldA bei *P. putida* bezogen auf die Trockenmasse höhere Werte erreicht als in *E. coli* (vgl. Tab. 3.12 und 3.14). Die guten Expressionseigenschaften und die Übertragbarkeit auf unterschiedliche bakterielle Stämme ohne vorherige genetische Modifizierung qualifizierten das Vektorsystem für die weiterführenden Studien.

Charakterisierung von P450cam/Pdx/PdR bei der α -Pinenoxidation

Für die neue P450cam-Variante Y96F/L244A/V247L/C334A (P450cam^{FALA}) wurde Aktivität gegenüber (+)- α -Pinen und zusätzlich auch gegenüber (-)- α -Pinen festgestellt (vgl. Tab. 3.13). Letztere Aktivität wurde nach bestem Wissen noch nicht für P450cam oder seine Varianten beschrieben. Bei der Oxidation von (+)- α -Pinen bildete P450cam^{FALA} 78 % Verbenol und 1 % Verbenon, die Ursprungsvariante Y96F/L244A/V247L hingegen 55 % Verbenol und 32 % Verbenon [103]. Während also die Regioselektivität vergleichbar war, war der Anteil an gebildetem Verbenon bei P450cam^{FALA} niedriger. Bell *et al.* [103] setzten für

die Charakterisierung der Ursprungsvariante ein festes Verhältnis CYP:Pdx:PdR von 1:4:1 ein. Auch für den Elektronentransfer des Pdx/PdR-Systems auf andere CYPs wurden Überschüsse von Pdx eingesetzt, z. B. für die Oxidation von (+)-Valencen durch CYP109B1 mit einem Verhältnis von CYP:Pdx:PdR von 1:10:1 [214]. In unseren Versuchen hingegen wurde ein Vektor genutzt, der die Expression der Gene eines tricistronischen Konstrukts ermöglichte. Darum kann ein Einfluss von Menge und Verhältnis der vorhandenen Redoxpartner hier nicht ausgeschlossen werden. Ein Überschuss an Pdx könnte zu einem effizienteren Elektronentransfer zu P450cam führen, was wiederum eine weitere Oxidation des Substratmoleküls ermöglicht. Im Einklang mit dieser Annahme zeigte P450cam^{FALA} mit 64 min^{-1} eine niedrigere Substratoxidationsrate bei der Oxidation von (+)- α -Pinen (vgl. Tab. 3.13) als P450cam Y96F/L244A/V247L mit 129 min^{-1} [103]. Jedoch ist auch ein Einfluss der zusätzlichen C334A-Mutation nicht gänzlich auszuschließen.

Viabilität von *P. putida* und *E. coli* in Gegenwart von α -Pinen

Substrattoxizität ist eine typische Limitierung bei der Biotransformation von Terpenen [22, 127, 138]. *P. putida*-Stämme wurden aus dem Boden und aus Abwasser isoliert und sind bekannt für ihre Toleranz gegenüber der Toxizität hydrophober Substanzen wie organischen Lösungsmitteln [138, 157, 215]. Als Mechanismen, die diese Toleranz in *P. putida* vermitteln, wurden das aktive Ausschleusen durch Efflux-Pumpen beschrieben sowie die Änderung der Zellhüllenzusammensetzung durch *cis*- zu *trans*-Isomerisierung von ungesättigten Fettsäuren [142, 215–218]. Ähnliche Resistenzmechanismen sind auch in *E. coli* aktiv, vor allem ist hier die Effluxpumpe AcrAB-TolC zu nennen [219–221]. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass AcrAB von *E. coli* Toleranz gegenüber dem Monoterpen Limonen vermittelt, welches strukturell eng mit α -Pinen verwandt ist [222]. Der Vergleich der Toxizität von α -Pinenphasen mit einer Ausdehnung von 0, 5, 10 oder 15 % (v/v) auf ruhende Zellen der Stämme *P. putida* DSM12264 und *E. coli* JM109 zeigte, dass die Anzahl der CFUs durch die Anwesenheit des α -Pinen verringert wurde. Die Ausdehnung der organischen Phase jedoch hatte keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen in der wässrigen Phase. Hier dürfte lediglich das in der wässrigen Phase gelöste α -Pinen von Bedeutung sein, dessen Konzentration aufgrund der Sättigung der wässrigen Phase mit α -Pinen bei allen Umsetzungen näherungsweise identisch gewesen sein dürfte. Im Einklang mit dieser Feststellung ist der Bericht von einem Stamm der Spezies *Pseudomonas*, der noch bei einer Pinenkonzentration von bis zu 90 % Wachstum aufwies [128]. Die in dieser Arbeit getesteten Stämme zeigten Viabilität über einen Zeitraum von 24 h; eine Zeitspanne, die ausreicht, um industrielle Prozesse zur Biotransformation toxischer Substrate durchzuführen (10 -20 h) [16]. Dies dürfte auch insofern genügen, als eine konstante Aktivität über 24 h für CYPs in einer Ganzzellbiotransformation als unrealistisch eingeschätzt wird [22]. Somit müssten auch

längere Reaktionszeiten möglich sein als anderthalb Stunden, wie für die Biotransformation von α -Pinen zu α -Pinenepoxid durch rekombinante *E. coli* BL21(DE3) gezeigt [54].

Biotransformation von α -Pinen

Jedoch hat die hohe Toleranz des Ganzzellbiokatalysators gegenüber toxischen Substraten wie α -Pinen auch eine Kehrseite. Während die Viabilität des Biokatalysators über einen verlängerten Zeitraum erhalten bleibt, könnte die Biotransformation dadurch beeinträchtigt werden, dass das Substrat nicht in die Zelle eindringen kann. Tatsächlich schien Massentransfer ein limitierender Faktor für alle in den in dieser Studie gezeigten Biokatalysatoren zu sein (Abb. 3.23 bis 3.25). Um der Limitierung durch geringen Massentransfer des Substrats in die Zelle entgegenzuwirken, wurden die Biokatalysatoren mit Polymyxin B behandelt. Dieses Polypeptid-Antibiotikum lagert sich in die äußere Zellmembran Gram-negativer Bakterien ein und erhöht die Membranpermeabilität, indem es die Packungsdichte von Lipid A herabsetzt [223]. Die Behandlung mit Polymyxin B führte bei allen gezeigten Biokatalysatoren zu einer Erhöhung der Produktivität (Abb. 3.25, A), ein Hinweis auf verstärkten Massentransfer von α -Pinen in die permeabilisierten Zellen. Die *E. coli*-Stämme BL21 und JM109 zeigten mit etwa 12 mg/g_{cdw} eine vergleichbare Produktivität nach der Polymyxin B-Behandlung. Gegenüber dem unbehandelten Biokatalysator ist dies jeweils eine Verbesserung um den Faktor 2 bzw. 4,2 (Abb. 3.25, A). Letzteres Ergebnis zeigt große Parallelen zu den Ergebnissen von Janocha und Bernhardt [148], die ebenfalls nach Behandlung eines CYP105A1 exprimierenden *E. coli* JM109-Biokatalysators mit Polymyxin B (100 μ g/ml) etwa eine Vervierfachung der Produktbildung bei der Hydroxylierung von Abietinsäure feststellten. Auf der anderen Seite blieb die Produktivität des *P. putida* DSM12264-Biokatalysators trotz Behandlung mit Polymyxin B niedrig, während für *P. putida* KT2440 eine beinahe 19-fache Verbesserung der Produktivität erreicht wurde (Abb. 3.25, A). Limitierung durch geringen Massentransfer des Substrats in die Zelle war im Fall von *P. putida* KT2440 eine Hauptursache für die anfänglich geringe Produktivität. Im Einklang mit dieser Erkenntnis wurde auch schon durch Cornelissen *et al.* der Massentransfer in die Zellen als limitierender Faktor für die Biotransformation des mit dem α -Pinen strukturell verwandten Limonen durch einen rekombinanten *P. putida* KT2440-Biokatalysator identifiziert [147]. Insgesamt bewies die Permeabilisierung durch Polymyxin B seine Nützlichkeit für die Biotransformation von α -Pinen zu Verbenon nicht nur für *E. coli*-, sondern auch für *P. putida*-Biokatalysatoren. Jedoch war festzustellen, dass mit erhöhter Produktivität der Anteil des Verbenons im Produktspektrum absank (Abb. 3.25, B). Möglicherweise beschleunigt die Permeabilisierung nicht nur den Transfer von α -Pinen in die Zelle, sondern ermöglicht auch dem Zwischenprodukt Verbenol die Zelle leichter wieder zu verlassen und sich einer weiteren Oxidation zu entziehen.

Als weitere mögliche Limitierung der Biokatalysatoren muss eine mangelnde Versorgung des exprimierten P450cam^{FALA}/Pdx/PdR-Systems mit Elektronen aus reduziertem Kofaktor NAD(P)H in Betracht gezogen werden [22, 23]. In dieser Arbeit wurden ruhende Zellen (engl. *resting cells*) genutzt, die nur vermindert oder keinen Kofaktor für Zellwachstum benötigen. Darum wird diese Herangehensweise als weniger kompetitiv zur CYP-katalysierten Reaktion eingeschätzt, die ebenfalls Elektronen von reduzierten Kofaktoren bezieht [22]. Jedoch ist auch die endogene Kofaktorregeneration durch ruhende Zellen mit typischerweise <1 U/g_{cdw} niedriger als von wachsenden Zellen, die eine Regenerationsaktivität zwischen 500 und 1000 U/g_{cdw} aufweisen [22]. Die heterologe Koexpression von kofaktorregenerierenden Enzymen wie Glukosedehydrogenase oder Glycerindehydrogenase neben P450-Systemen bewirkte hier eine Verbesserung der Produktivität von ruhenden Zellen [53, 54]. Um eine mögliche Kofaktorlimitierung zu untersuchen, wurden in den Biokatalysatoren neben dem P450cam^{FALA}/Pdx/PdR-System die NAD⁺-abhängige Glycerindehydrogenase GldA aus *E. coli* JM109 für die Kofaktorregeneration koexprimiert. Die Koexpression von GldA führte in den meisten Fällen zu höherer Produktivität der permeabilisierten Zellen (Abb. 3.26 und Tab. 3.16). Der Effekt war am stärksten bei *P. putida* DSM12264 ausgeprägt, der eine 11-fache Steigerung der Produktivität aufwies. Im Fall von *P. putida* KT2440 wurde die Produktivität der permeabilisierten Zellen durch die koexprimierte GldA lediglich leicht erhöht, jedoch konnte der finale Anteil an Verbenon beinahe verdoppelt werden (Abb. 3.26). Auf diese Weise wurde ein *P. putida*-Biokatalysator geschaffen, der Verbenol beinahe vollständig zu Verbenon oxidiert (90 %). Allem Anschein nach führte die unterstützende Kofaktorregeneration durch GldA zu weiterer Oxidation des Zwischenprodukts Verbenol zu Verbenon. Dabei wurde eine Produktivität von 11 mg/g_{cdw} erreicht.

Für die *E. coli*-Biokatalysatoren auf der anderen Seite schien die Versorgung mit reduziertem Kofaktor unter den getesteten Bedingungen keine starke Limitierung darzustellen. Die Produktivität wurde durch Koexpression von GldA nur mäßig beeinflusst (Abb. 3.26, C und D). Diese Sicht wird durch den Umstand gestützt, dass die P450-spezifischen Bildungsraten der *E. coli*-Biokatalysatoren während der ersten 5 Stunden annähernd konstant blieben, während sich die der *P. putida*-Biokatalysatoren im Vergleich zu den anfänglichen Raten mindestens halbierten (Tab. 3.15 und 3.16). Abweichend von den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen wurde bei Schewe *et al.* durch die Koexpression einer Glukosedehydrogenase neben einer P450-BM3-Variante in *E. coli* BL21(DE3) eine sechsfach höhere Bildung von vornehmlich α -Pinenepoxid aus α -Pinen durch den Biokatalysator erreicht [54]. Zwingend notwendig war hierzu jedoch die Koexpression eines Glukosefaszilitators, der die passive Aufnahme von unphosphorylierter Glukose in die Zelle ermöglichte. Eine mögliche Rolle des Glukosefaszilitators bei der

Erleichterung der Diffusion des α -Pinen durch die bakterielle Zellmembran kann hier nicht ausgeschlossen werden. Es wäre darum interessant zu untersuchen, ob die Expression des Glukosefaszilitators, ähnlich wie für das Membranprotein AlkL bereits gezeigt [146], den Eintritt hydrophober Substrate wie Monoterpenen erleichtert und dadurch die Produktivität P450-basierter Ganzzellbiokatalysatoren erhöht. Eine weitere Möglichkeit der geringen Membrangängigkeit von Monoterpenen zu begegnen, ist die vollständige fermentative Bildung innerhalb der Zelle. Für die Bildung von Amorpha-4,11-diene, einer Vorstufe eines Antimalariamedikaments, wurde der MEP-Weg (Abb. 1.9) in *E. coli* implementiert [224]. An anderer Stelle wurde das Einbringen von vier Enzymen in *E. coli* beschrieben, die aus Isopentenylpyrophosphat bzw. Dimethylallylpyrophosphat (Abb. 1.10) das Monoterpenoid (-)-Carvon bildeten [225]. Die Implementierung des MEP-Wegs, das Einbringen der Enzyme zur Bildung von α -Pinen aus Isopentenylpyrophosphat bzw. Dimethylallylpyrophosphat (Abb. 1.10 und 1.11) sowie der in dieser Arbeit vorgestellten Kaskade könnte so eine selektive Bildung von (+)- oder (-)-Verbenon aus günstigen Kohlenstoffquellen ermöglichen.

Biotransformation von α -Pinen mit P450-ADH-Kaskade

Ein Nachteil der Permeabilisierung der Zellen durch Polymyxin B war die erhöhte Akkumulation des Zwischenprodukts Verbenol (Abb. 3.25, B). Dieser Akkumulation wurde zumindest in *P. putida* KT2440 durch Koexpression von GldA entgegengewirkt (Abb. 3.26, B). Alternativ sollte die Koexpression einer Alkoholdehydrogenase mit der Fähigkeit Verbenol zu Verbenon zu oxidieren die Akkumulation von Verbenol verringern und die Bildung von Verbenon erhöhen. Tatsächlich konnte der Austausch von GldA zugunsten der Alkoholdehydrogenase 3α -HSDH, die bevorzugt *cis*-Verbenol als Substrat akzeptiert (Tab. 3.4), die Verbenonbildung in einem *E. coli* BL21-Biokatalysator erhöhen (Abb. 3.26, C und 3.27). Mit einem Verbenonanteil von 70 bis 80 % war bereits in den ersten 5 Stunden der Umsetzung der Effekt der 3α -HSDH feststellbar (Abb. 3.27), betrachtet man den Verbenonanteil von 20 bis 50 % des entsprechenden Biokatalysators mit koexprimierter GldA (Abb. 3.26, C). Somit konnte die Funktionalität der 3α -HSDH durch Bildung von Verbenon aus Verbenol nachgewiesen werden. In Anbetracht der verbesserten Verbenonbildung wäre es darum interessant, 3α -HSDH auch in den anderen Biokatalysatoren zu testen.

Im Vergleich zu eukaryotischen Systemen bietet der hier vorgestellte bakterielle Biokatalysator neben Vorteilen wie etabliertem Handling, schnellem Wachstum und der Möglichkeit der problemlosen Einbringung weiterer genetischer Modifikationen hohe Produktkonzentrationen und hohe Umsätze in vergleichsweise kurzen Zeiträumen (Tab. 4.1). Die Biotransformationen von α -Pinen durch *Hormonema* sp. und *Chrysosporium pannorum* erreichten eine etwas höhere Produktkonzentration (jeweils 2 und 1,6 mM). Letztere zeigte

jedoch nur einen geringen Gesamtumsatz (1,7 %) und beide benötigten lange Zeiträume für die Reaktion (>84 h). Eine Biotransformation durch *Aspergillus niger* verlief zwar in nur 6 Stunden, erzielte mit nur 0,22 mM jedoch eine geringe Konzentration an Verbenon. Die Umsetzung durch *Pleurotus sapidus* bedurfte aufwendiger Aufarbeitungsschritte (Tab. 4.1).

Tabelle 4.1: Vergleich mit beschriebenen Systemen

Stamm	Verbenon (mM)	Dauer (h)	Umsatz (%)	Referenz
<i>E. coli (in vivo)</i>	0,96	48	5 %	diese Arbeit
<i>Hormonema sp. (in vivo)</i>	2	96	4 %	[169]
<i>Aspergillus niger (in vivo)</i>	0,22	6	15 %	[170]
<i>Pleurotus sapidus</i> (lyoph.)	0,41	20	0,62 %	[168]
<i>Pleurotus sapidus</i> (mikrosom. F.)	1	20	1,5 %	[168]
<i>Chrysosporium pannorum (in vivo)</i>	1,6	84	1,7 %	[171]

lyoph. - lyophilisiert, mikrosom. F. - mikrosomale Fraktion

Gegenüber der im Schüttelkolben durchgeführten Biotransformation (Tab. 3.17) wurde bei der Biotransformation im Rührreaktor mit 27 g_{cdw}/L eine mehr als dreifach höhere Zellkonzentration erreicht. Gleichzeitig war die Produktivität um den Faktor 4 geringer (vgl. Tab. 3.17 mit Abb. 3.30). Die Zellkonzentration schien hier keine Limitierung darzustellen. Um das katalytische Potential der eingesetzten Zellen auszuschöpfen, müssten also erst andere Limitierungen beseitigt werden. Alternativ wären auch kürzere Anzucht- und Expressionszeiten möglich. Zu Beginn der Expression wurde bereits eine recht hohe Aktivität der 3 α -HSDH gemessen, für die CYP jedoch wurde erst nach Induktion eine positive Konzentration bestimmt (Abb. 3.29). Da die erwähnten Enzyme von unterschiedlichen Plasmiden exprimiert wurden, kann eine undichte Expression der 3 α -HSDH vom pSEVA-Plasmid nicht ausgeschlossen werden. Bei der P450-Konzentration wurde nach 10 Stunden ein Maximum von 3,4 μ M erreicht (Abb. 3.29), mehr als doppelt so hoch wie für den Schüttelkolben (Tab. 3.17). Danach war eine leichte Abnahme der P450-Konzentration festzustellen. Auch dies ist ein Hinweis, dass die Expressionszeit verkürzt werden könnte.

Trotz konstanter Sauerstoffversorgung konnte die Reaktion nicht verlängert werden (Abb. 3.30). Der näherungsweise konstante Sauerstoffbedarf der Zellen spricht für gleichbleibende Viabilität auch nach Permeabilisierung. Da im Bioreaktor eine niedrigere Polymyxin B-Konzentration eingesetzt wurde, könnte eine Verdopplung der Polymyxin B-Konzentration auf das Niveau der Schüttelkolbenumsetzungen zu erhöhter Produktivität führen. Eine andere Limitierung des Systems könnte die das Reaktionsvolumen durchströmende Luft dargestellt haben, die das Produkt möglicherweise austrug. Optionen für zukünftige Experimente, um das volatile Produkt in Lösung zu halten, wären Überdruck, eine

organische Trägerphase, Kühlung oder das Herabsetzen des Volumenstroms der Belüftung. Alle Maßnahmen dürften eine Wirkung auf die Gelöstsauerstoffkonzentration haben und müssten mit Rücksicht auf die Sauerstoffversorgung der Zellen und der Reaktion angewandt werden.

Schlussfolgerung

Bei den in dieser Arbeit gezeigten Biotransformationen schienen stammabhängige Unterschiede einen Einfluss auf die Leistungsfähigkeit der Biokatalysatoren auszuüben. So bildete *P. putida* DSM12264 als Antwort auf die Zugabe von α -Pinen schleimige Zellaggregate, während dies bei *P. putida* KT2440 nicht zu beobachten war. Ein ähnlicher Phänotyp wurde für *P. putida* DSM12264 auch in Gegenwart von n-Oktan beobachtet [154]. Zudem wurde auch von anderen lösemitteltoleranten *P. putida*-Stämmen berichtet, die schleimige Zellpellets nach Induktion mit n-Oktan bildeten, während *P. putida* KT2440 keinen solchen Phänotyp zeigte [130]. Die Veränderung des Erscheinungsbilds könnte ein Hinweis auf zelluläre Anpassungsmechanismen sein, die den Bakterien ermöglichen, toxische Konzentrationen organischer Substanzen zu tolerieren. Bekannte Anpassungsmechanismen, die Lösemitteltoleranz vermitteln, sind u.a. Zellmembran- und Zellwandveränderungen, aktives Ausschleusen des Lösemittels, Anpassung des Energiestatus und morphologische Veränderungen [217]. Die Anpassung von *P. putida* DSM12264 könnte somit zu den generell niedrigen Umsätzen und zur vergleichsweise geringen Verbesserung durch die Polymyxin B-Behandlung beigetragen haben (Abb. 3.23 und 3.24). Die Erhöhung der Produktbildung durch Koexpression von GldA wiederum könnte Hinweis auf einen veränderten Energiestatus von *P. putida* DSM12264 in Gegenwart von hydrophoben Substanzen wie α -Pinen sein.

In den hier gezeigten Untersuchungen wurden verschiedene Limitierungen für die Biotransformation von α -Pinen zu Verbenon identifiziert. Während der Massentransfer des Substrats in die Zelle sowohl für *E. coli*- als auch für *P. putida*-Biokatalysatoren eine generelle Limitierung darzustellen schien, war die mangelnde Versorgung mit reduziertem Kofaktor in den *P. putida*-Biokatalysatoren von größerer Bedeutung. Die beobachteten stammabhängigen Effekte zeigen darüber hinaus die Wichtigkeit der Wahl eines geeigneten Stammes für die P450-basierte Biotransformation. Sowohl die Produktivität von *E. coli*- als auch von *P. putida*-Biokatalysatoren wurde für die Bildung von Verbenon aus α -Pinen verbessert. Am erfolgreichsten war in diesem Zusammenhang die Implementierung einer P450-ADH-Kaskade in *E. coli* BL21, die eine beinahe vollständige (94 %) Oxidation von gebildetem Verbenol zum Zielprodukt Verbenon ermöglichte und eine Produktivität von fast 20 mg/g_{cdw} erreichte (Abb. 3.27). Diesbezüglich wurde festgestellt, dass die maximale Produktivität

des *E. coli*-Biokatalysators mit koexprimierter P450-BM3-Variante, Glukosedehydrogenase und Glukosefaszilitator bei der Bildung von α -Pinenepoxid ebenfalls etwa 20 mg/g_{cdw} betrug [54]. Der in dieser Arbeit geschaffene *E. coli* BL21-Biokatalysator wurde erfolgreich auf Minimalmedium in einem Rührreaktor zu hoher Dichte herangezogen, eine Expression durchgeführt und die Umsetzung zu Verbenon aus α -Pinen gezeigt (Abb. 3.28 bis 3.30). Auf diese Weise wurde ein leicht handhabbarer bakterieller Biokatalysator für die selektive Oxidation von α -Pinen zu Verbenon etabliert. Weitere Verbesserungen sind auf dem Feld der Prozessentwicklung zu erwarten. Zum Beispiel führte der Einsatz einer organischen Substratphase in Kombination mit einem biokompatiblen Kosolvenz beim erwähnten Biokatalysator zur Bildung von α -Pinenepoxid zu einer Verbesserung der Produktivität [9].

5 Literaturverzeichnis

- [1] UNITED NATIONS, DEPARTMENT OF ECONOMIC AND SOCIAL AFFAIRS, POPULATION DIVISION: *World Population Prospects - The 2015 Revision: Key findings & advance table*. New York, 2015
- [2] INTERNATIONAL MONETARY FUND: *World Economic Outlook Database: April 2015 Edition*. <https://www.imf.org/external/pubs/ft/weo/2015/01/weodata/index.aspx>
- [3] WORLD FOOD PROGRAMME: *Was sind die Ursachen von Hunger?* <http://de.wfp.org/hunger-ursachen>
- [4] UNITED NATIONS: *United Nations Millennium Declaration*. New York, 2000
- [5] IPCC: *Climate Change 2014: Mitigation of Climate Change: Working Group III Contribution to the IPCC Fifth Assessment Report*. New York, 2014. – ISBN 978–1–107–05821–7
- [6] S. FRANCK, C. BOUNAMA, W. VON BLOH: Causes and timing of future biosphere extinctions. In: *Biogeosciences* 3 (2006), Nr. 1, S. 85–92
- [7] EUROPÄISCHE KOMMISSION: *Innovating for sustainable growth: a bioeconomy for Europe: Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the Economic and Social Committee and the Committee of the Region*. Brüssel, 2012. – ISBN 978–92–79–25376–8
- [8] BUNDESMINISTERIUM FÜR BILDUNG UND FORSCHUNG: *Nationale Forschungsstrategie BioÖkonomie 2030: Unser Weg zu einer bio-basierten Wirtschaft*. Bonn/Berlin, 2010
- [9] H. SCHEWE, D. HOLTSMANN, J. SCHRADER: P450_{BM-3}-catalyzed whole-cell biotransformation of α -pinene with recombinant *Escherichia coli* in an aqueous–organic two-phase system. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 83 (2009), Nr. 5, S. 849–857
- [10] R. G. BERGER: *Flavours and fragrances: Chemistry, bioprocessing and sustainability*. Berlin/New York, 2007. – ISBN 978–3–540–49339–6
- [11] ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT: *A framework for biotechnological statistics*. <https://www.oecd.org/sti/sci-tech/34935605.pdf>
- [12] R. ULBER, K. SOYEZ: 5000 Jahre Biotechnologie: Vom Wein zum Penicillin. In: *Chemie in unserer Zeit* 38 (2004), Nr. 3, S. 172–180
- [13] K. FABER: *Biotransformations in Organic Chemistry*. Berlin/Heidelberg, 2011. – ISBN 978–3–642–17392–9
- [14] U. T. BORNSCHEUER, G. W. HUISMAN, R. J. KAZLAUSKAS, S. LUTZ, J. C. MOORE, K. ROBINS: Engineering the third wave of biocatalysis. In: *Nature* 485 (2012), S. 185–194
- [15] J. MUSCHIOL, C. PETERS, N. OBERLEITNER, M. D. MIHOVILOVIC, U. T. BORNSCHEUER, F. RUDROFF: Cascade catalysis - strategies and challenges en route to preparative synthetic biology. In: *Chemical Communications* 51 (2015), Nr. 27, S. 5798–5811
- [16] A. SCHMID, J. S. DORDICK, B. HAUER, A. KIENER, M. WUBBOLTS, B. WITHOLT: Industrial biocatalysis today and tomorrow. In: *Nature* 409 (2001), Nr. 6817, S. 258–268

- [17] R. WOHLGEMUTH: Biocatalysis - key to sustainable industrial chemistry. In: *Current Opinion in Biotechnology* 21 (2010), Nr. 6, S. 713–724
- [18] W. AEHLE: *Enzymes in industry: Production and applications*. 3. Auflage. Weinheim, 2007. – ISBN 978–3–527–31689–2
- [19] J. LIMA-RAMOS, W. NETO, J. M. WOODLEY: Engineering of Biocatalysts and Biocatalytic Processes. In: *Topics in Catalysis* 57 (2014), Nr. 5, S. 301–320
- [20] A. J. J. STRAATHOF, S. PANKE, A. SCHMID: The production of fine chemicals by biotransformations. In: *Current Opinion in Biotechnology* 13 (2002), Nr. 6, S. 548–556
- [21] K.-E. JAEGER, T. EGGERT: Lipases for biotechnology. In: *Current Opinion in Biotechnology* 13 (2002), Nr. 4, S. 390–397
- [22] M. T. LUNDEMO, J. M. WOODLEY: Guidelines for development and implementation of biocatalytic P450 processes. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 99 (2015), Nr. 6, S. 2465–2483
- [23] R. BERNHARDT, V. B. URLACHER: Cytochromes P450 as promising catalysts for biotechnological application: chances and limitations. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (2014), Nr. 14, S. 6185–6203
- [24] V. B. URLACHER, R. D. SCHMID: Recent advances in oxygenase-catalyzed biotransformations. In: *Current opinion in chemical biology* 10 (2006), Nr. 2, S. 156–161
- [25] K. PETZOLDT, K. ANNEN, H. LAURENT, R. WIECHERT: *Process for the preparation of 11-β-hydroxy steroids*. Version: Oktober 1982. <http://www.google.com/patents/US4353985>
- [26] D. H. PETERSON, H. C. MURRAY, S. H. EPPSTEIN, L. M. REINEKE, A. WEINTRAUB, P. D. MEISTER, H. M. LEIGH: Microbiological Transformations of Steroids. I. Introduction of Oxygen at Carbon-11 of Progesterone. In: *Journal of the American Chemical Society* 74 (1952), Nr. 23, S. 5933–5936
- [27] T. MATSUOKA, S. MIYAKOSHI, K. TANZAWA, K. NAKAHARA, M. HOSOBUCHI, N. SERIZAWA: Purification and characterization of cytochrome P-450_{sca} from *Streptomyces carbophilus*. In: *European journal of biochemistry / FEBS* 184 (1989), Nr. 3, S. 707–713
- [28] C. DUPORT, R. SPAGNOLI, E. DEGRYSE, D. POMPON: Self-sufficient biosynthesis of pregnenolone and progesterone in engineered yeast. In: *Nature biotechnology* 16 (1998), Nr. 2, S. 186–189
- [29] S. SCHULZ, M. GIRHARD, V. B. URLACHER: Biocatalysis: Key to Selective Oxidations. In: *ChemCatChem* 4 (2012), Nr. 12, S. 1889–1895
- [30] D.-K. RO, E. M. PARADISE, M. OUELLET, K. J. FISHER, K. L. NEWMAN, J. M. NDUNGU, K. A. HO, R. A. EACHUS, T. S. HAM, J. KIRBY, M. C. Y. CHANG, S. T. WITHERS, Y. SHIBA, R. SARPONG, J. D. KEASLING: Production of the antimalarial drug precursor artemisinin acid in engineered yeast. In: *Nature* 440 (2006), Nr. 7086, S. 940–943
- [31] D. R. NELSON: *Cytochrome P450 Homepage* <http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>
- [32] C. J. C. WHITEHOUSE, S. G. BELL, L.-L. WONG: P450_{BM3} (CYP102A1): connecting the dots. In: *Chemical Society Reviews* 41 (2012), Nr. 3, S. 1218–1260
- [33] T. OMURA, R. SATO: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. In: *The Journal of Biological Chemistry* 239 (1964), S. 2370–2378

- [34] D. R. NELSON, L. KOYMANS, T. KAMATAKI, J. J. STEGEMAN, R. FEYEREISEN, D. J. WAXMAN, M. R. WATERMAN, O. GOTOH, M. J. COON, R. W. ESTABROOK, I. C. GUNSALUS, D. W. NEBERT: P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. In: *Pharmacogenetics* 6 (1996), Nr. 1, S. 1–42
- [35] R. BERNHARDT: Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. In: *Journal of Biotechnology* 124 (2006), Nr. 1, S. 128–145
- [36] M. SONO, M. P. ROACH, E. D. COULTER, J. H. DAWSON: Heme-Containing Oxygenases. In: *Chemical Reviews* 96 (1996), Nr. 7, S. 2841–2888
- [37] F. P. GUENGERICH, A. W. MUNRO: Unusual cytochrome P450 enzymes and reactions. In: *The Journal of Biological Chemistry* 288 (2013), Nr. 24, S. 17065–17073
- [38] V. B. URLACHER, M. GIRHARD: Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application. In: *Trends in Biotechnology* 30 (2012), Nr. 1, S. 26–36
- [39] K. KOSCHORRECK, C. J. VON BÜHLER, S. SCHULZ, V. B. URLACHER: Protein Engineering of Cytochrome P450 Monooxygenases. In: S. LUTZ, U. T. BORNSCHEUER (Hrsg.): *Protein engineering handbook* Bd. 3. Weinheim, 2013. – ISBN 978-3-527-33123-9
- [40] J. RITTLE, M. T. GREEN: Cytochrome P450 Compound I: Capture, Characterization, and C-H Bond Activation Kinetics. In: *Science* 330 (2010), Nr. 6006, S. 933–937
- [41] A. J. WARMAN, O. ROITEL, R. NEELI, H. M. GIRVAN, H. E. SEWARD, S. A. MURRAY, K. J. MCLEAN, M. G. JOYCE, H. TOOGOOD, R. A. HOLT, D. LEYS, N. S. SCRUTTON, A. W. MUNRO: Flavocytochrome P450 BM3: an update on structure and mechanism of a biotechnologically important enzyme. In: *Biochemical Society Transactions* 33 (2005), Nr. 4, S. 747–753
- [42] F. HANNEMANN, A. BICHET, K. EWEN, R. BERNHARDT: Cytochrome P450 systems—biological variations of electron transport chains. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1770 (2007), Nr. 3, S. 330–344
- [43] M. D. TRUPPO: 7.4 Cofactor Recycling for Enzyme Catalyzed Processes. In: E. M. CARREIRA, H. YAMAMOTO (Hrsg.): *Comprehensive chirality*. Amsterdam/Waltham, 2012. – ISBN 978-0-08-095168-3
- [44] D. MONTI, G. OTTOLINA, G. CARREA, S. RIVA: Redox reactions catalyzed by isolated enzymes. In: *Chemical Reviews* 111 (2011), Nr. 7, S. 4111–4140
- [45] V. B. URLACHER, S. SCHULZ: Multi-Enzyme Systems and Cascade Reactions Involving Cytochrome P450 Monooxygenases. In: S. RIVA, W.-D. FESSNER (Hrsg.): *Cascade Biocatalysis Integrating Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions*. Weinheim, 2014. – ISBN 978-3-527-33522-0, S. 87–133
- [46] I. F. ESCAPA, C. DEL CERRO, J. L. GARCÍA, M. A. PRIETO: The role of GlpR repressor in *Pseudomonas putida* KT2440 growth and PHA production from glycerol. In: *Environmental microbiology* 15 (2013), Nr. 1, S. 93–110
- [47] D. L. WEISSENORN, N. WITTEKINDT, T. J. LARSON: Structure and regulation of the *glpFK* operon encoding glycerol diffusion facilitator and glycerol kinase of *Escherichia coli* K-12. In: *The Journal of Biological Chemistry* 267 (1992), Nr. 9, S. 6122–6131
- [48] H. P. SCHWEIZER, C. PO: Regulation of glycerol metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of the *glpR* repressor gene. In: *Journal of Bacteriology* 178 (1996), Nr. 17, S. 5215–5221

- [49] S. SCHULZ: *Cascade Reactions combining a Cytochrome P450 Monooxygenase and an Alcohol Dehydrogenase for the Synthesis of (+)-Nootkatone*. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität, Dissertation, 2015
- [50] D. FU, A. LIBSON, L. J. W. MIERCKE, C. WEITZMAN, P. NOLLERT, J. KRUCINSKI, R. M. STROUD: Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. In: *Science* 290 (2000), Nr. 5491, S. 481–486
- [51] L. M. BLANK, B. E. EBERT, K. BUEHLER, B. BÜHLER: Redox biocatalysis and metabolism: molecular mechanisms and metabolic network analysis. In: *Antioxidants & redox signaling* 13 (2010), Nr. 3, S. 349–394
- [52] R. AGUDO, M. T. REETZ: Designer cells for stereocomplementary *de novo* enzymatic cascade reactions based on laboratory evolution. In: *Chemical Communications* 49 (2013), Nr. 93, S. 10914–10916
- [53] T. MOURI, J. MICHIZOE, H. ICHINOSE, N. KAMIYA, M. GOTO: A recombinant *Escherichia coli* whole cell biocatalyst harboring a cytochrome P450cam monooxygenase system coupled with enzymatic cofactor regeneration. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 72 (2006), Nr. 3, S. 514–520
- [54] H. SCHEWE, B.-A. KAUP, J. SCHRADER: Improvement of P450_{BM-3} whole-cell biocatalysis by integrating heterologous cofactor regeneration combining glucose facilitator and dehydrogenase in *E. coli*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 78 (2008), Nr. 1, S. 55–65
- [55] D. ZEHENTGRUBER, F. HANNEMANN, S. BLEIF, R. BERNHARDT, S. LUTZ: Towards preparative scale steroid hydroxylation with cytochrome P450 monooxygenase CYP106A2. In: *ChemBioChem* 11 (2010), Nr. 5, S. 713–721
- [56] D. ZEHENTGRUBER, V. B. URLACHER, S. LUTZ: Studies on the enantioselective oxidation of β -ionone with a whole *E. coli* system expressing cytochrome P450 monooxygenase BM3. In: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 84 (2012), S. 62–64
- [57] Y. MIURA, A. J. FULCO: (ω -2) hydroxylation of fatty acids by a soluble system from *Bacillus megaterium*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 249 (1974), Nr. 6, S. 1880–1888
- [58] L. O. NARHI, A. J. FULCO: Characterization of a catalytically self-sufficient 119,000-dalton cytochrome P-450 monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 261 (1986), Nr. 16, S. 7160–7169
- [59] L. O. NARHI, A. J. FULCO: Identification and characterization of two functional domains in cytochrome P-450_{BM-3}, a catalytically self-sufficient monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 262 (1987), Nr. 14, S. 6683–6690
- [60] S. D. BLACK, S. T. MARTIN: Evidence for conformational dynamics and molecular aggregation in cytochrome P450 102 (BM-3). In: *Biochemistry* 33 (1994), Nr. 40, S. 12056–12062
- [61] C. J. C. WHITEHOUSE, S. G. BELL, H. G. TUFTON, R. J. P. KENNY, L. C. I. OGILVIE, L.-L. WONG: Evolved CYP102A1 (P450_{BM3}) variants oxidise a range of non-natural substrates and offer new selectivity options. In: *Chemical Communications* (2008), Nr. 8, S. 966–968
- [62] A. SEIFERT, J. PLEISS: Identification of selectivity-determining residues in cytochrome P450 monooxygenases: a systematic analysis of the substrate recognition site 5. In: *Proteins* 74 (2009), Nr. 4, S. 1028–1035
- [63] A. SEIFERT, M. ANTONOVICI, B. HAUER, J. PLEISS: An Efficient Route to Selective Bio-oxidation Catalysts: an Iterative Approach Comprising Modeling, Diversification, and Screening, Based on CYP102A1. In: *ChemBioChem* 12 (2011), Nr. 9, S. 1346–1351

- [64] P. LE-HUU, T. HEIDT, B. CLAASEN, S. LASCHAT, V. B. URLACHER: Chemo-, Regio-, and Stereoselective Oxidation of the Monocyclic Diterpenoid β -Cembrenediol by P450 BM3. In: *ACS Catalysis* 5 (2015), Nr. 3, S. 1772–1780
- [65] D. P. NICKERSON, L.-L. WONG: The dimerization of *Pseudomonas putida* cytochrome P450_{cam}: practical consequences and engineering of a monomeric enzyme. In: *Protein engineering* 10 (1997), Nr. 12, S. 1357–1361
- [66] W. H. BRADSHAW, H. E. CONRAD, E. J. COREY, I. C. GUNSALUS, D. LEDNICER: Microbiological degradation of (+)-camphor. In: *Journal of the American Chemical Society* 81 (1959), Nr. 20, S. 5507
- [67] J. HEDEGAARD, I. C. GUNSALUS: Mixed function oxidation. IV. An induced methylene hydroxylase in camphor oxidation. In: *The Journal of Biological Chemistry* 240 (1965), Nr. 10, S. 4038–4043
- [68] M. KATAGIRI, B. N. GANGULI, I. C. GUNSALUS: A soluble cytochrome P-450 functional in methylene hydroxylation. In: *The Journal of Biological Chemistry* 243 (1968), Nr. 12, S. 3543–3546
- [69] I. C. GUNSALUS, G. C. WAGNER: Bacterial P-450_{cam} methylene monooxygenase components: Cytochrome *m*, putidaredoxin, and putidaredoxin reductase. In: *Methods in Enzymology* 52 (1978), S. 166–188
- [70] I. SCHLICHTING, J. BERENDZEN, K. CHU, A. M. STOCK, S. A. MAVES, D. E. BENSON, R. M. SWEET, D. RINGE, G. A. PETSKO, S. G. SLIGAR: The Catalytic Pathway of Cytochrome P450_{cam} at Atomic Resolution. In: *Science* 287 (2000), Nr. 5458, S. 1615–1622
- [71] U. T. BORNSCHEUER, M. POHL: Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. In: *Current opinion in chemical biology* 5 (2001), Nr. 2, S. 137–143
- [72] K.-E. JAEGER, T. EGGERT, A. EIPPER, M. T. REETZ: Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 55 (2001), Nr. 5, S. 519–530
- [73] P. A. DALBY: Strategy and success for the directed evolution of enzymes. In: *Current opinion in structural biology* 21 (2011), Nr. 4, S. 473–480
- [74] U. SCHWANEBERG, C. SCHMIDT-DANNERT, J. SCHMITT, R. D. SCHMID: A continuous spectrophotometric assay for P450 BM-3, a fatty acid hydroxylating enzyme, and its mutant F87A. In: *Analytical biochemistry* 269 (1999), Nr. 2, S. 359–366
- [75] S. LUTZ: Beyond directed evolution—semi-rational protein engineering and design. In: *Current Opinion in Biotechnology* 21 (2010), Nr. 6, S. 734–743
- [76] S. KILLE, F. E. ZILLY, J. P. ACEVEDO, M. T. REETZ: Regio- and stereoselectivity of P450-catalysed hydroxylation of steroids controlled by laboratory evolution. In: *Nature chemistry* 3 (2011), Nr. 9, S. 738–743
- [77] A. SEIFERT, S. VOMUND, K. GROHMANN, S. KRIENING, V. B. URLACHER, S. LASCHAT, J. PLEISS: Rational Design of a Minimal and Highly Enriched CYP102A1 Mutant Library with Improved Regio-, Stereo- and Chemoselectivity. In: *ChemBioChem* 10 (2009), Nr. 5, S. 853–861
- [78] E. RICCA, B. BRUCHER, J. H. SCHRITTWIESER: Multi-Enzymatic Cascade Reactions: Overview and Perspectives. In: *Advanced Synthesis & Catalysis* 353 (2011), Nr. 13, S. 2239–2262
- [79] F. LOPEZ-GALLEGO, C. SCHMIDT-DANNERT: Multi-enzymatic synthesis. In: *Current opinion in chemical biology* 14 (2010), Nr. 2, S. 174–183

- [80] C. HOLEC, K. NEUFELD, J. PIETRUSZKA: P450 BM3 Monooxygenase as an Efficient NAD(P)H-Oxidase for Regeneration of Nicotinamide Cofactors in ADH-Catalysed Preparative Scale Biotransformations. In: *Advanced Synthesis Catalysis* 358 (2016), Nr. 11, S. 1810–1819
- [81] N. C. BRUCE, R. E. WILLIAMS: 'New uses for an Old Enzyme' – the Old Yellow Enzyme family of flavoenzymes. In: *Microbiology* 148 (2002), Nr. 6, S. 1607–1614
- [82] N. M. KAMERBEEK, D. B. JANSSEN, W. J. H. VANBERKEL, M. W. FRAAIJE: Baeyer–Villiger Monooxygenases, an Emerging Family of Flavin-Dependent Biocatalysts. In: *Advanced Synthesis & Catalysis* 345 (2003), Nr. 6-7, S. 667–678
- [83] M. D. MIHOVILOVIC: Baeyer-Villiger Oxidations. In: K. DRAUZ, H. GRÖGER, O. MAY (Hrsg.): *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*. Weinheim, 2012. – ISBN 9783527639861
- [84] A. PENNEC, F. HOLLMANN, M. S. SMIT, D. J. OPPERMAN: One-pot Conversion of Cycloalkanes to Lactones. In: *ChemCatChem* 7 (2015), Nr. 2, S. 236–239
- [85] M. HÖHNE, U. T. BORNSCHEUER: Application of Transaminases. In: K. DRAUZ, H. GRÖGER, O. MAY (Hrsg.): *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*. Weinheim, 2012. – ISBN 9783527639861, S. 779–820
- [86] J. M. BERG, J. L. TYMOCZKO, L. STRYER, N. D. CLARKE: *Biochemistry*. 5. Auflage. New York, 2002. – ISBN 0–7167–4684–0
- [87] T. J. MAIMONE, P. S. BARAN: Modern synthetic efforts toward biologically active terpenes. In: *Nature Chemical Biology* 3 (2007), Nr. 7, S. 396–407
- [88] D.-K. RO: Terpenoid Biosynthesis. In: H. ASHIHARA, A. CROZIER, A. KOMAMINE (Hrsg.): *Plant Metabolism and Biotechnology*. Chichester, 2011. – ISBN 9781119991311, S. 217–240
- [89] A. CROZIER, M. N. CLIFFORD, H. ASHIHARA: *Plant secondary metabolites: Occurrence, structure and role in the human diet*. Oxford/Ames, 2006. – ISBN 978–1–4051–2509–3
- [90] A. GOSSAUER: *Struktur und Reaktivität der Biomoleküle: Eine Einführung in die organische Chemie*. Zürich, 2006. – ISBN 3–906390–29–2
- [91] D. S. SEIGLER: *Plant secondary metabolism*. Boston, 1998. – ISBN 0–412–01981–7
- [92] T. LAUE, A. PLAGENS: *Named Organic Reactions*. Chichester, UK, 2005. – ISBN 9780470010426
- [93] H. GAMBLIEL, R. CROTEAU: Pinene cyclases I and II. Two enzymes from sage (*Salvia officinalis*) which catalyze stereospecific cyclizations of geranyl pyrophosphate to monoterpene olefins of opposite configuration. In: *The Journal of Biological Chemistry* 259 (1984), Nr. 2, S. 740–748
- [94] E. J. CORY, W. E. RUSSEY, P. R. ORTIZ DE MONTELLANO: 2,3-oxidosqualene, an intermediate in the biological synthesis of sterols from squalene. In: *Journal of the American Chemical Society* 88 (1966), Nr. 20, S. 4750–4751
- [95] P. J. MOHR, R. L. HALCOMB: Total synthesis of (+)-phomactin a using a B-alkyl Suzuki macrocyclization. In: *Journal of the American Chemical Society* 125 (2003), Nr. 7, S. 1712–1713
- [96] M. DIETRICH, S. EIBEN, C. ASTA, T. A. DO, J. PLEISS, V. B. URLACHER: Cloning, expression and characterisation of CYP102A7, a self-sufficient P450 monooxygenase from *Bacillus licheniformis*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 79 (2008), Nr. 6, S. 931–940

- [97] M. GIRHARD, T. KLAUS, Y. KHATRI, R. BERNHARDT, V. B. URLACHER: Characterization of the versatile monooxygenase CYP109B1 from *Bacillus subtilis*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 87 (2010), Nr. 2, S. 595–607
- [98] Y. KHATRI, M. GIRHARD, A. ROMANKIEWICZ, M. RINGLE, F. HANNEMANN, V. B. URLACHER, M. C. HUTTER, R. BERNHARDT: Regioselective hydroxylation of norisoprenoids by CYP109D1 from *Sorangium cellulosum* So ce56. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 88 (2010), Nr. 2, S. 485–495
- [99] T. B. T. LY, Y. KHATRI, J. ZAPP, M. C. HUTTER, R. BERNHARDT: CYP264B1 from *Sorangium cellulosum* So ce56: a fascinating norisoprenoid and sesquiterpene hydroxylase. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 95 (2012), Nr. 1, S. 123–133
- [100] J. B. VAN BEILEN, R. HOLTACKERS, D. LÜSCHER, U. BAUER, B. WITHOLT, W. A. DUETZ: Biocatalytic Production of Perillyl Alcohol from Limonene by Using a Novel *Mycobacterium* sp. Cytochrome P450 Alkane Hydroxylase Expressed in *Pseudomonas putida*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 71 (2005), Nr. 4, S. 1737–1744
- [101] S. SCHULZ, M. GIRHARD, S. K. GASSMEYER, V. D. JÄGER, D. SCHWARZE, A. VOGEL, V. B. URLACHER: Selective Enzymatic Synthesis of the Grapefruit Flavor (+)-Nootkatone. In: *ChemCatChem* 7 (2015), Nr. 4, S. 601–604
- [102] R. CRIEGEE: Neuere Untersuchungen über Oxydationen mit Bleitetraacetat. In: *Angewandte Chemie* 70 (1958), Nr. 7, S. 173–196
- [103] S. G. BELL, X. CHEN, R. J. SOWDEN, F. XU, J. N. WILLIAMS, L.-L. WONG, Z. RAO: Molecular Recognition in (+)- α -Pinene Oxidation by Cytochrome P450_{cam}. In: *Journal of the American Chemical Society* 125 (2003), Nr. 3, S. 705–714
- [104] M. BUDDE: *Biokatalyse mit Cytochrom P450 Monooxygenasen: Zur selektiven Oxidation von Terpenen und Fettsäuren*. Stuttgart, Universität Stuttgart, Dissertation, 2007
- [105] R. J. F. BRANCO, A. SEIFERT, M. BUDDE, V. B. URLACHER, M. J. RAMOS, J. PLEISS: Anchoring effects in a wide binding pocket: The molecular basis of regioselectivity in engineered cytochrome P450 monooxygenase from *B. megaterium*. In: *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 73 (2008), Nr. 3, S. 597–607
- [106] J. A. A. RENWICK, P. R. HUGHES, I. S. KRULL: Selective production of *cis*- and *trans*-verbenol from (-)- and (+)- α -pinene by a bark beetle. In: *Science* 191 (1976), Nr. 4223, S. 199–201
- [107] P. R. HUGHES: Effect of α -pinene exposure on *trans*-verbenol synthesis in *Dendroctonus ponderosae* Hopk. In: *Die Naturwissenschaften* 60 (1973), Nr. 5, S. 261–262
- [108] J. A. A. RENWICK, J. P. VITÉ: Bark Beetle Attractants: Mechanism of Colonization by *Dendroctonus frontalis*. In: *Nature* 224 (1969), Nr. 5225, S. 1222–1223
- [109] S. A. XIE, S. J. LV: An improved lure for trapping the bark beetle *Dendroctonus armandi* (Coleoptera: Scolytinae). In: *European Journal of Entomology* 109 (2012), Nr. 4, S. 569–577
- [110] J. P. VITÉ, G. B. PITMAN: Bark Beetle Aggregation: Effects of Feeding on the Release of Pheromones in *Dendroctonus* and *Ips*. In: *Nature* 218 (1968), Nr. 5137, S. 169–170
- [111] J. A. BYERS: Bark beetle conversion of a plant compound to a sex-specific inhibitor of pheromone attraction. In: *Science* 220 (1983), Nr. 4597, S. 624–626

- [112] D. L. WOOD, R. W. STARK, R. M. SILVERSTEIN, J. O. RODIN: Unique Synergistic Effects produced by the Principal Sex Attractant Compounds of *Ips confusus* (LeConte) (Coleoptera: Scolytidae). In: *Nature* 215 (1967), Nr. 5097, S. 206
- [113] G. B. PITMAN: *trans*-Verbenol and Alpha-Pinene: Their Utility in Manipulation of the Mountain Pine Beetle. In: *Journal of Economic Entomology* 64 (1971), Nr. 2, S. 426–430
- [114] F. SCHLYTER, J. A. BYERS, J. LÖFQVIST: Attraction to pheromone sources of different quantity, quality, and spacing: Density-regulation mechanisms in bark beetle *Ips typographus*. In: *Journal of Chemical Ecology* 13 (1987), Nr. 6, S. 1503–1523
- [115] G. J. BLOMQUIST, R. FIGUEROA-TERAN, M. AW, M. SONG, A. GORZALSKI, N. L. ABBOTT, E. CHANG, C. TITTIGER: Pheromone production in bark beetles. In: *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40 (2010), Nr. 10, S. 699–712
- [116] A. BAKKE, J. P. VITÉ: *Composition for attraction of pine shoot beetles*. <http://www.google.com/patents/EP0236418A1?cl=en>. Version: 1987
- [117] W. D. ANGERER, E. D. BUSCHMANN, H. D. HOLTSMANN, J. P. VITÉ, E. D. BAADER: *Vorrichtung zur Bekämpfung von Borkenkäfern insbesondere des Buchdruckers*. <https://www.google.com/patents/EP0413325A2?cl=pt>. Version: 1991
- [118] T. L. PAYNE, R. F. BILLINGS, W. FRANCKE, J. P. VITÉ: *Compositions and method for controlling the black turpentine beetle*. <https://www.google.com/patents/DE3626109A1?cl=en>. Version: 1988
- [119] J. H. BORDEN, J. E. CONN, A. C. OEHLISCHLAGER, H. D. PIERCE, L. J. CHONG: *Composition for attracting, and methods of combating mountain pine beetles*. <https://www.google.com/patents/CA1212044A1?cl=en>. Version: 1986
- [120] S. A. TEALE, D. CZOKAJLO, F. X. WEBSTER: *Pine shoot beetle attractant compositions*. <https://www.google.com/patents/US6203786>. Version: 2001
- [121] J. P. VITÉ: *Compositions for combatting bark beetles*. <https://www.google.com/patents/US4839383>. Version: 1989
- [122] BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT: *Pflanzenschutzmittel-Verzeichnis 2015 - Teil 4 Forst (ISSN 0178-062X)*. http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/04_Pflanzenschutzmittel/psm_verz_4.pdf?sessionid=6E1E065C6AE545437A267A0EDD566F0B.2_cid340?__blob=publicationFile&v=9
- [123] BUNDESAMT FÜR LANDWIRTSCHAFT DER SCHWEIZ: *Pflanzenschutzmittelverzeichnis (ISSN 2235-171X)*. <http://www.blw.admin.ch/psm>
- [124] K. M. MEEPAGALA, J. M. KUHAJEK, G. D. STURTZ, D. E. WEDGE: Vulgarone B, the antifungal constituent in the steam-distilled fraction of *Artemisia douglasiana*. In: *Journal of Chemical Ecology* 29 (2003), Nr. 8, S. 1771–1780
- [125] E. RODUNER, W. KAIM, B. SARKAR, V. B. URLACHER, J. PLEISS, R. GLÄSER, W.-D. EINICKE, G. A. SPRENGER, U. BEIFUSS, E. KLEMM, C. LIEBNER, H. HIERONYMUS, S.-F. HSU, B. PLIETKER, S. LASCHAT: Selective Catalytic Oxidation of C-H Bonds with Molecular Oxygen. In: *ChemCatChem* 5 (2013), Nr. 1, S. 82–112

- [126] N. H. WILSON, V. PEESAPATI, R. L. JONES, K. HAMILTON: Synthesis of prostanoids with bicyclo[2.2.1]heptane, bicyclo[3.1.1]heptane and bicyclo[2.2.2]octane ring systems. Activities of 15-hydroxy epimers on human platelets. In: *Journal of Medicinal Chemistry* 25 (1982), Nr. 5, S. 495–500
- [127] M. SCHREWE, M. K. JULSING, B. BÜHLER, A. SCHMID: Whole-cell biocatalysis for selective and productive C-O functional group introduction and modification. In: *Chemical Society Reviews* 42 (2013), Nr. 15, S. 6346–6377
- [128] J. SIKKEMA, J. A. M. DE BONT, B. POOLMAN: Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 59 (1995), Nr. 2, S. 201–222
- [129] C. LAANE, S. BOEREN, K. VOS, C. VEEGER: Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. In: *Biotechnology and Bioengineering* 30 (1987), Nr. 1, S. 81–87
- [130] S. CORNELISSEN, S. LIU, A. T. DESHMUKH, A. SCHMID, B. BÜHLER: Cell physiology rather than enzyme kinetics can determine the efficiency of cytochrome P450-catalyzed C-H-oxygenation. In: *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 38 (2011), Nr. 9, S. 1359–1370
- [131] A. M. KLIBANOV: Improving enzymes by using them in organic solvents. In: *Nature* 409 (2001), Nr. 6817, S. 241–246
- [132] T. S. WONG, F. H. ARNOLD, U. SCHWANEBERG: Laboratory evolution of cytochrome P450 BM-3 monooxygenase for organic cosolvents. In: *Biotechnology and Bioengineering* 85 (2004), Nr. 3, S. 351–358
- [133] S. C. MAURER, H. SCHULZE, R. D. SCHMID, V. B. URLACHER: Immobilisation of P450 BM-3 and an NADP⁺ Cofactor Recycling System: Towards a Technical Application of Heme-Containing Monooxygenases in Fine Chemical Synthesis. In: *Advanced Synthesis & Catalysis* 345 (2003), Nr. 67, S. 802–810
- [134] Y. MIKAMI: Microbial Conversion of Terpenoids. In: *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 6 (1988), Nr. 1, S. 271–320
- [135] R. E. ANDREWS, L. W. PARKS, K. D. SPENCE: Some effects of douglas fir terpenes on certain microorganisms. In: *Applied and Environmental Microbiology* 40 (1980), Nr. 2, S. 301–304
- [136] E. M. J. GILLAM: Extending the capabilities of nature's most versatile catalysts: directed evolution of mammalian xenobiotic-metabolizing P450s. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 464 (2007), Nr. 2, S. 176–186
- [137] S. URIBE, J. RAMIREZ, A. PEÑA: Effects of beta-pinene on yeast membrane functions. In: *Journal of Bacteriology* 161 (1985), Nr. 3, S. 1195–1200
- [138] Y. N. SARDESSAI, S. BHOSLE: Industrial potential of organic solvent tolerant bacteria. In: *Biotechnology progress* 20 (2004), Nr. 3, S. 655–660
- [139] R. AONO, H. KOBAYASHI: Cell surface properties of organic solvent-tolerant mutants of *Escherichia coli* K-12. In: *Applied and Environmental Microbiology* 63 (1997), Nr. 9, S. 3637–3642
- [140] N. TSUKAGOSHI, R. AONO: Entry into and release of solvents by *Escherichia coli* in an organic-aqueous two-liquid-phase system and substrate specificity of the AcrAB-TolC solvent-extruding pump. In: *Journal of Bacteriology* 182 (2000), Nr. 17, S. 4803–4810
- [141] Y. N. SARDESSAI, S. BHOSLE: Tolerance of bacteria to organic solvents. In: *Research in Microbiology* 153 (2002), Nr. 5, S. 263–268

- [142] J. L. RAMOS, E. DUQUE, M.-T. GALLEGOS, P. GODOY, M. I. RAMOS-GONZÁLEZ, A. ROJAS, W. TERÁN, A. SEGURA: Mechanism of solvent tolerance in Gram-negative bacteria. In: *Annual Review of Microbiology* 56 (2002), Nr. 1, S. 743–768
- [143] H. P. SØRENSEN, K. K. MORTENSEN: Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. In: *Journal of Biotechnology* 115 (2005), Nr. 2, S. 113–128
- [144] S. SCHNEIDER, M. G. WUBBOLTS, D. SANGLARD, B. WITHOLT: Production of chiral hydroxy long chain fatty acids by whole cell biocatalysis of pentadecanoic acid with an *E. coli* recombinant containing cytochrome P450_{BM-3} monooxygenase. In: *Tetrahedron: Asymmetry* 9 (1998), Nr. 16, S. 2833–2844
- [145] W. ZHANG, W. L. TANG, Z. WANG, Z. LI: Regio- and Stereoselective Biohydroxylations with a Recombinant *Escherichia coli* Expressing P450_{pyr} Monooxygenase of *Sphingomonas* Sp. HXN-200. In: *Advanced Synthesis & Catalysis* 352 (2010), Nr. 18, S. 3380–3390
- [146] M. K. JULSING, M. SCHREWE, S. CORNELISSEN, I. HERMANN, A. SCHMID, B. BUHLER: Outer Membrane Protein AlkL Boosts Biocatalytic Oxyfunctionalization of Hydrophobic Substrates in *Escherichia coli*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 78 (2012), Nr. 16, S. 5724–5733
- [147] S. CORNELISSEN, M. K. JULSING, J. VOLMER, O. RIECHERT, A. SCHMID, B. BÜHLER: Whole-cell-based CYP153A6-catalyzed (S)-limonene hydroxylation efficiency depends on host background and profits from monoterpene uptake via AlkL. In: *Biotechnology and Bioengineering* 110 (2013), Nr. 5, S. 1282–1292
- [148] S. JANOCHA, R. BERNHARDT: Design and characterization of an efficient CYP105A1-based whole-cell biocatalyst for the conversion of resin acid diterpenoids in permeabilized *Escherichia coli*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (2013), Nr. 17, S. 7639–7649
- [149] A. INOUE, K. HORIKOSHI: A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. In: *Nature* 338 (1989), Nr. 6212, S. 264–266
- [150] J. L. RAMOS, E. DUQUE, M.-J. HUERTAS, A. HAÏDOUR: Isolation and expansion of the catabolic potential of a *Pseudomonas putida* strain able to grow in the presence of high concentrations of aromatic hydrocarbons. In: *Journal of Bacteriology* 177 (1995), Nr. 14, S. 3911–3916
- [151] F. J. WEBER, L. P. OOIJKAAS, R. M. SCHEMEN, S. HARTMANS, J. A. M. DE BONT: Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to high concentrations of styrene and other organic solvents. In: *Applied and Environmental Microbiology* 59 (1993), Nr. 10, S. 3502–3504
- [152] M. A. MIRATA, D. HEERD, J. SCHRADER: Integrated bioprocess for the oxidation of limonene to perillic acid with *Pseudomonas putida* DSM 12264. In: *Process Biochemistry* 44 (2009), Nr. 7, S. 764–771
- [153] T. VALLON, M. GLEMSER, S. HONDA MALCA, D. SCHEPS, J. SCHMID, M. SIEMANN-HERZBERG, B. HAUER, R. TAKORS: Production of 1-Octanol from *n*-Octane by *Pseudomonas putida* KT2440. In: *Chemie Ingenieur Technik* 85 (2013), Nr. 6, S. 1–9
- [154] F. TIEVES, I. N. ERENBURG, O. MAHMOUD, V. B. URLACHER: Synthesis of chiral 2-alkanols from *n*-alkanes by a *P. putida* whole-cell biocatalyst. In: *Biotechnology and Bioengineering* early view (2016)
- [155] B. E. EBERT, F. KURTH, M. GRUND, L. M. BLANK, A. SCHMID: Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to Increased NADH and ATP Demand. In: *Applied and Environmental Microbiology* 77 (2011), Nr. 18, S. 6597–6605

- [156] I. POBLETE-CASTRO, J. BECKER, K. DOHNT, V. MARTINS DOS SANTOS, C. WITTMANN: Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida* and related species. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 93 (2012), Nr. 6, S. 2279–2290
- [157] J. MI, D. BECHER, P. LUBUTA, S. DANY, K. TUSCH, H. SCHEWE, M. BUCHHAUPT, J. SCHRADER: *De novo* production of the monoterpenoid geranic acid by metabolically engineered *Pseudomonas putida*. In: *Microbial cell factories* 13 (2014), S. 170
- [158] H. BEUTTLER, J. HOFFMANN, M. JESKE, B. HAUER, R. D. SCHMID, J. ALTENBUCHNER, V. B. URLACHER: Biosynthesis of zeaxanthin in recombinant *Pseudomonas putida*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 89 (2011), Nr. 4, S. 1137–1147
- [159] A. LOESCHCKE, A. MARKERT, S. WILHELM, A. WIRTZ, F. ROSENAU, K.-E. JAEGER, T. DREPPER: TREX: a universal tool for the transfer and expression of biosynthetic pathways in bacteria. In: *ACS synthetic biology* 2 (2013), Nr. 1, S. 22–33
- [160] A. LOESCHCKE, S. THIES: *Pseudomonas putida*-a versatile host for the production of natural products. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 99 (2015), Nr. 15, S. 6197–6214
- [161] J. B. VAN BEILEN, D. PENNINGA, B. WITHOLT: Topology of the membrane-bound alkane hydroxylase of *Pseudomonas oleovorans*. In: *The Journal of Biological Chemistry* 267 (1992), Nr. 13, S. 9194–9201
- [162] R. W. EATON: *p*-Cymene Catabolic Pathway in *Pseudomonas putida* F1: Cloning and Characterization of DNA Encoding Conversion of *p*-Cymene to *p*-Cumate. In: *Journal of Bacteriology* 179 (1997), Nr. 10, S. 3171–3180
- [163] WHITHAM, G. H.: 423. The reaction of α -pinene with lead tetra-acetate. In: *Journal of the Chemical Society (Resumed)* (1961), S. 2232–2236
- [164] K. MORI: Synthesis of Optically Pure (+)-*trans*-Verbenol and Its Antipode, the Pheromone of *Dendroctonus* Bark Beetles. In: *Agricultural and Biological Chemistry* 40 (1976), Nr. 2, S. 415–418
- [165] M. LINDMARK-HENRIKSSON, D. ISAKSSON, K. SJÖDIN, H.-E. HÖGBERG, T. VANEK, I. VALTEROVÁ: Transformation of α -pinene using *Picea abies* suspension culture. In: *Journal of natural products* 66 (2003), Nr. 3, S. 337–343
- [166] E. T. GRIFFITHS, S. M. BOCIEK, P. C. HARRIES, R. JEFFCOAT, D. J. SISSONS, P. W. TRUDGILL: Bacterial metabolism of α -pinene: pathway from α -pinene oxide to acyclic metabolites in *Nocardia* sp. strain P18.3. In: *Journal of Bacteriology* 169 (1987), Nr. 11, S. 4972–4979
- [167] D. BUSMANN, R. G. BERGER: Oxyfunctionalization of α - and β -Pinene by Selected Basidiomycetes. In: *Zeitschrift für Naturforschung* 49c (1994), S. 545–552
- [168] U. KRINGS, N. LEHNERT, M. A. FRAATZ, B. HARDEBUSCH, H. ZORN, R. G. BERGER: Autoxidation versus Biotransformation of α -Pinene to Flavors with *Pleurotus sapidus*: Regioselective Hydroperoxidation of α -Pinene and Stereoselective Dehydrogenation of Verbenol. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (2009), S. 9944–9950
- [169] M. S. VAN DYK, E. VAN RENSBURG, N. MOLELEKI: Hydroxylation of (+)limonene, (-) α -pinene and (-) β -pinene by a *Hormonema* sp. In: *Biotechnology Letters* 20 (1998), Nr. 4, S. 431–436
- [170] R. AGRAWAL, R. JOSEPH: Bioconversion of alpha pinene to verbenone by resting cells of *Aspergillus niger*. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 53 (2000), Nr. 3, S. 335–337

- [171] M. TRYTEK, K. JĘDRZEJEWSKI, J. FIEDUREK: Bioconversion of α -pinene by a novel cold-adapted fungus *Chrysosporium pannorum*. In: *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 42 (2015), Nr. 2, S. 181–188
- [172] C. J. C. WHITEHOUSE, S. G. BELL, W. YANG, J. A. YORKE, C. F. BLANFORD, A. J. F. STRONG, E. J. MORSE, M. BARTLAM, Z. RAO, L.-L. WONG: A Highly Active Single-Mutation Variant of P450_{BM3} (CYP102A1). In: *ChemBioChem* 10 (2009), Nr. 10, S. 1654–1656
- [173] P. FONTANILLE, C. LARROCHE: Optimization of isonovalal production from α -pinene oxide using permeabilized cells of *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 60 (2003), Nr. 5, S. 534–540
- [174] S. KRAUSER, P. KIEFER, E. HEINZLE: Multienzyme Whole-Cell In Situ Biocatalysis for the Production of Flaviolin in Permeabilized Cells of *Escherichia coli*. In: *ChemCatChem* 4 (2012), Nr. 6, S. 786–788
- [175] S. KRAUSER, C. WEYLER, L. K. BLASS, E. HEINZLE: Directed Multistep Biocatalysis Using Tailored Permeabilized Cells. In: A.-P. ZENG (Hrsg.): *Fundamentals and Application of New Bioproduction Systems*. Berlin/Heidelberg, 2013. – ISBN 978–3–642–41520–3
- [176] M. MALIK, A. GANGULI, M. GHOSH: Modeling of permeabilization process in *Pseudomonas putida* G7 for enhanced limonin bioconversion. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 95 (2012), Nr. 1, S. 223–231
- [177] B. WILMS, A. HAUCK, M. REUSS, C. SYLDATK, R. MATTES, M. SIEMANN, J. ALTENBUCHNER: High-cell-density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an expression system based on the *Escherichia coli rhaBAD* promoter. In: *Biotechnology and Bioengineering* 73 (2001), Nr. 2, S. 95–103
- [178] R. STIEF: *Etablierung eines multi-enzymatischen Systems zur Herstellung von Verbenon aus Pinen*. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität, Bachelorarbeit, 2014
- [179] S. VOMUND: *Ganzzellbiotransformation von n-Octan zu 2-Octanol mit rekombinanten Pseudomonas putida im 2-Phasen-System*. Stuttgart, Universität Stuttgart, Diplomarbeit, 2010
- [180] V. DE LORENZO, L. ELTIS, B. KESSLER, K. N. TIMMIS: Analysis of *Pseudomonas* gene products using *lacI^q/Ptrp-lac* plasmids and transposons that confer conditional phenotypes. In: *Gene* 123 (1993), Nr. 1, S. 17–24
- [181] S. C. LEHMANN: Process limitations in *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli* whole cells catalyzing the selective oxidation of α -pinene to verbenone. In: *In Vorbereitung* (2016)
- [182] M. M. BRADFORD: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Analytical Biochemistry* 72 (1976), S. 248–254
- [183] U. K. LAEMMLI: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (1970), Nr. 5259, S. 680–685
- [184] T. OMURA, R. SATO: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification, and properties. In: *The Journal of Biological Chemistry* 239 (1964), S. 2379–2385
- [185] H. M. GIRVAN, H. E. SEWARD, H. S. TOOGOOD, M. R. CHEESMAN, D. LEYS, A. W. MUNRO: Structural and spectroscopic characterization of P450 BM3 mutants with unprecedented P450 heme iron ligand sets. New heme ligation states influence conformational equilibria in P450 BM3. In: *The Journal of Biological Chemistry* 282 (2007), Nr. 1, S. 564–572

- [186] E. CHOVANCOVA, A. PAVELKA, P. BENES, O. STRNAD, J. BREZOVSKY, B. KOZLIKOVA, A. GORA, V. SUSTR, M. KLVANA, P. MEDEK, L. BIEDERMANNNOVA, J. SOCHOR, J. DAMBORSKY: CAVER 3.0: a tool for the analysis of transport pathways in dynamic protein structures. In: *PLoS Computational Biology* 8 (2012), Nr. 10, S. e1002708
- [187] O. TROTT, A. J. OLSON: AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. In: *Journal of computational chemistry* 31 (2010), Nr. 2, S. 455–461
- [188] D. HANAHAN: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. In: *Journal of Molecular Biology* 166 (1983), Nr. 4, S. 557–580
- [189] A. W. SMITH, B. H. IGLEWSKI: Transformation of *Pseudomonas aeruginosa* by electroporation. In: *Nucleic Acids Research* 17 (1989), Nr. 24, S. 10509
- [190] C. J. C. WHITEHOUSE, W. YANG, J. A. YORKE, B. C. ROWLATT, A. J. F. STRONG, C. F. BLANFORD, S. G. BELL, M. BARTLAM, L.-L. WONG, Z. RAO: Structural Basis for the Properties of Two Single-Site Proline Mutants of CYP102A1 (P450_{BM3}). In: *ChemBioChem* 11 (2010), Nr. 18, S. 2549–2556
- [191] H. LI, T. L. POULOS: The structure of the cytochrome p450BM-3 haem domain complexed with the fatty acid substrate, palmitoleic acid. In: *Nature structural biology* 4 (1997), Nr. 2, S. 140–146
- [192] J. P. CLARK, C. S. MILES, C. G. MOWAT, M. D. WALKINSHAW, G. A. REID, S. N. DAFF, S. K. CHAPMAN: The role of Thr268 and Phe393 in cytochrome P450 BM3. In: *Journal of Inorganic Biochemistry* 100 (2006), Nr. 5–6, S. 1075–1090
- [193] H. M. GIRVAN, A. J. DUNFORD, R. NEELI, I. S. EKANEM, T. N. WALTHAM, M. G. JOYCE, D. LEYS, R. A. CURTIS, P. WILLIAMS, K. FISHER, M. W. VOICE, A. W. MUNRO: Flavocytochrome P450 BM3 mutant W1046A is a NADH-dependent fatty acid hydroxylase: implications for the mechanism of electron transfer in the P450 BM3 dimer. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 507 (2011), Nr. 1, S. 75–85
- [194] S. C. MAURER, K. KÜHNEL, L. A. KAYSSER, S. EIBEN, R. D. SCHMID, V. B. URLACHER: Catalytic Hydroxylation in Biphasic Systems using CYP102A1 Mutants. In: *Advanced Synthesis & Catalysis* 347 (2005), S. 1090–1098
- [195] S. C. TROESCHEL, S. THIES, O. LINK, C. I. REAL, K. KNOPS, S. WILHELM, F. ROSENAU, K.-E. JAEGER: Novel broad host range shuttle vectors for expression in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas putida*. In: *Journal of Biotechnology* 161 (2012), Nr. 2, S. 71–79
- [196] T. STUMPP, B. WILMS, J. ALTENBUCHNER: Ein neues, L-Rhamnose-induzierbares Expressionssystem für *Escherichia coli*. In: *Biospektrum* 6 (2000), Nr. 1, S. 33–36
- [197] M. JESKE, J. ALTENBUCHNER: The *Escherichia coli* rhamnose promoter *rhaP_{BAD}* is in *Pseudomonas putida* KT2440 independent of Crp–cAMP activation. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 85 (2010), Nr. 6, S. 1923–1933
- [198] H. A. BOER, L. J. COMSTOCK, M. VASSER: The *tac* promoter: A functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80 (1983), Nr. 1, S. 21–25
- [199] T. HILBERATH: *Optimierung der Expression von P450 BM3 aus Bacillus megaterium in Pseudomonas putida*. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität, Bachelorarbeit, 2013

- [200] D. KIM, P. R. ORTIZ DE MONTELLANO: Tricistronic overexpression of cytochrome P450_{cam}, putidaredoxin, and putidaredoxin reductase provides a useful cell-based catalytic system. In: *Biotechnology Letters* 31 (2009), Nr. 9, S. 1427–1431
- [201] A. KREISSL: *Homologe Expression von Cytochrom P450_{cam} in Pseudomonas putida*. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität, Bachelorarbeit, 2012
- [202] E. MARTÍNEZ-GARCÍA, T. APARICIO, A. GOÑI-MORENO, S. FRAILE, V. DE LORENZO: SEVA 2.0: an update of the Standard European Vector Architecture for de-/re-construction of bacterial functionalities. In: *Nucleic acids research* 43 (2015), Nr. D1, S. D1183–D1189
- [203] R. N. MOORE, C. GOLUMBIC, G. S. FISHER: Autoxidation of α -Pinene. In: *Journal of the American Chemical Society* 78 (1956), Nr. 6, S. 1173–1176
- [204] T. KROLL: *Permeabilisierung der Zellmembranen von Pseudomonas putida für Ganzzellkatalyse*. Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität, Bachelorarbeit, 2013
- [205] S. GOVINDARAJ, T. L. POULOS: Role of the linker region connecting the reductase and heme domains in cytochrome P450BM-3. In: *Biochemistry* 34 (1995), Nr. 35, S. 11221–11226
- [206] Q. S. LI, U. SCHWANEBERG, P. FISCHER, R. D. SCHMID: Directed evolution of the fatty-acid hydroxylase P450 BM-3 into an indole-hydroxylating catalyst. In: *Chemistry* 6 (2000), Nr. 9, S. 1531–1536
- [207] Q. S. LI, U. SCHWANEBERG, M. FISCHER, J. SCHMITT, J. PLEISS, S. LUTZ-WAHL, R. D. SCHMID: Rational evolution of a medium chain-specific cytochrome P-450 BM-3 variant. In: *Biochimica et biophysica acta* 1545 (2001), Nr. 1-2, S. 114–121
- [208] Z. CHEN, T. W. B. OST, J. P. M. SCHELVIS: Phe393 mutants of cytochrome P450 BM3 with modified heme redox potentials have altered heme vinyl and propionate conformations. In: *Biochemistry* 43 (2004), Nr. 7, S. 1798–1808
- [209] S. KUMAR: Engineering cytochrome P450 biocatalysts for biotechnology, medicine and bioremediation. In: *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 6 (2010), Nr. 2, S. 115–131
- [210] D. BAKONYI, A. WIRTZ, W. HUMMEL: Large-scale Enzymatic Synthesis of 12-Ketoursodeoxycholic Acid from Dehydrocholic Acid by Simultaneous Combination of 3 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase from *Pseudomonas testosteroni* and 7 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase from *Collinsella aerofaciens*. In: *Zeitschrift für Naturforschung* 67b (2012), Nr. 10
- [211] R. S. CAHN, C. INGOLD, V. PRELOG: Spezifikation der molekularen Chiralität. In: *Angewandte Chemie* 78 (1966), Nr. 8, S. 413–447
- [212] N. ITOH: Use of the anti-Prelog stereospecific alcohol dehydrogenase from *Leifsonia* and *Pseudomonas* for producing chiral alcohols. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (2014), Nr. 9, S. 3889–3904
- [213] Y. YANG, J. LIU, Z. LI: Engineering of P450_{pyr} Hydroxylase for the Highly Regio- and Enantioselective Subterminal Hydroxylation of Alkanes. In: *Angewandte Chemie* 126 (2014), Nr. 12, S. 3184–3188
- [214] M. GIRHARD, K. MACHIDA, M. ITOH, R. D. SCHMID, A. ARISAWA, V. B. URLACHER: Regioselective biooxidation of (+)-valencene by recombinant *E. coli* expressing CYP109B1 from *Bacillus subtilis* in a two-liquid-phase system. In: *Microbial cell factories* 8 (2009), S. 36

- [215] Z. UDAONDO, L. MOLINA, C. DANIELS, M. J. GÓMEZ, M. A. MOLINA-HENARES, M. A. MATILLA, A. ROCA, M. FERNÁNDEZ, E. DUQUE, A. SEGURA, J. L. RAMOS: Metabolic potential of the organic-solvent tolerant *Pseudomonas putida* DOT-T1E deduced from its annotated genome. In: *Microbial biotechnology* 6 (2013), Nr. 5, S. 598–611
- [216] A. ROJAS, E. DUQUE, G. MOSQUEDA, G. GOLDEN, A. HURTADO, J. L. RAMOS, A. SEGURA: Three efflux pumps are required to provide efficient tolerance to toluene in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. In: *Journal of Bacteriology* 183 (2001), Nr. 13, S. 3967–3973
- [217] H. J. HEIPIEPER, G. NEUMANN, S. CORNELISSEN, F. MEINHARDT: Solvent-tolerant bacteria for biotransformations in two-phase fermentation systems. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 74 (2007), Nr. 5, S. 961–973
- [218] J. KIEBOOM, J. J. DENNIS, J. A. M. DE BONT, G. J. ZYLSTRA: Identification and molecular characterization of an efflux pump involved in *Pseudomonas putida* S12 solvent tolerance. In: *The Journal of Biological Chemistry* 273 (1998), Nr. 1, S. 85–91
- [219] H. NIKAIIDO, Y. TAKATSUKA: Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. In: *Biochimica et biophysica acta* 1794 (2009), Nr. 5, S. 769–781
- [220] J. LUBELSKI, W. N. KONINGS, A. J. M. DRIESSEN: Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria. In: *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 71 (2007), Nr. 3, S. 463–476
- [221] M. C. SULAVIK, C. HOUSEWEART, C. CRAMER, N. JIWANI, N. MURGOLO, J. GREENE, B. DIDOMENICO, K. J. SHAW, G. H. MILLER, R. HARE, G. SHIMER: Antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* strains lacking multidrug efflux pump genes. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 45 (2001), Nr. 4, S. 1126–1136
- [222] M. J. DUNLOP, Z. Y. DOSSANI, H. L. SZMIDT, H. C. CHU, T. S. LEE, J. D. KEASLING, M. Z. HADI, A. MUKHOPADHYAY: Engineering microbial biofuel tolerance and export using efflux pumps. In: *Molecular Systems Biology* 7 (2011), Nr. 487
- [223] Z. YU, W. QIN, J. LIN, S. FANG, J. QIU: Antibacterial mechanisms of polymyxin and bacterial resistance. In: *BioMed research international* 2015 (2015), Nr. 679109
- [224] J. R. ANTHONY, L. C. ANTHONY, F. NOWROOZI, G. KWON, J. D. NEWMAN, J. D. KEASLING: Optimization of the mevalonate-based isoprenoid biosynthetic pathway in *Escherichia coli* for production of the anti-malarial drug precursor amorpha-4,11-diene. In: *Metabolic engineering* 11 (2009), Nr. 1, S. 13–19
- [225] O. A. CARTER, R. J. PETERS, R. CROTEAU: Monoterpene biosynthesis pathway construction in *Escherichia coli*. In: *Phytochemistry* 64 (2003), Nr. 2, S. 425–433

6 Appendix

6.1 GC/MS-Analyse des Medikaments GeloMyrtol® forte

Der flüssige Kern einer Kapsel wurde in Ethylacetat mit dem Faktor 10^4 verdünnt und gaschromatographisch mittels achiraler stationärer Phase analysiert (vgl. Abschnitt 2.2.5).

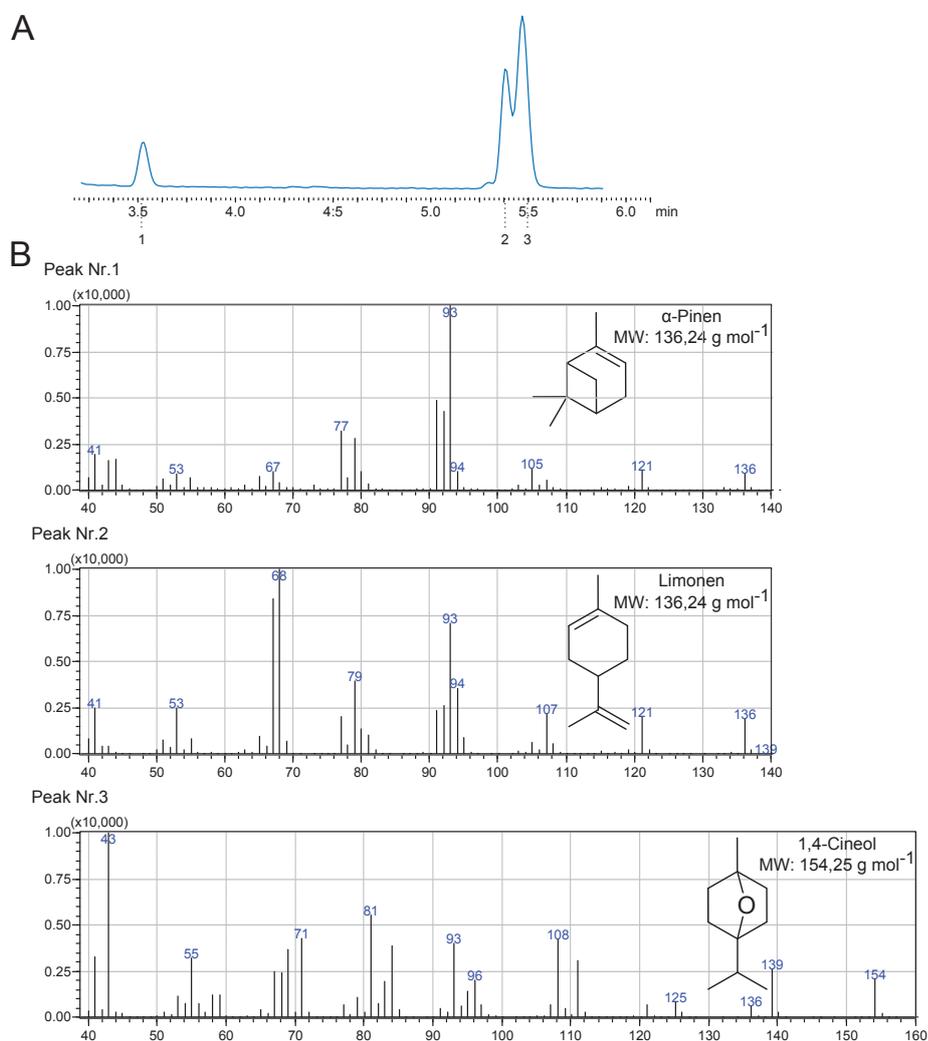


Abbildung 6.1: Analyse der Inhaltsstoffe von GeloMyrtol® forte - A: Die gaschromatographische Auftrennung der Inhaltsstoffe ergab drei Peaks, deren Fragmentierungsmuster mit der NIST-Datenbank verglichen wurden. B: Anhand des Vergleichs mit der NIST-Datenbank wurden drei Inhaltsstoffe identifiziert. Obwohl 1,4-Cineol als Produkt identifiziert wurde, ist wegen des stark eukalyptusartigen Aromas des ätherischen Öls davon auszugehen, dass es sich um 1,8-Cineol handelt.

6.2 Ausgabe der AutoDock Vina Software nach Docking von (-)- α -Pinen in P450-BM3-Variante F87G/A328I

mode	affinity	dist from best mode	
	(kcal/mol)	rmsd l.b.	rmsd u.b.
1	-6.6	0.000	0.000
2	-6.1	1.171	3.404
3	-6.0	2.143	3.515
4	-5.9	1.272	3.087
5	-5.8	1.232	3.366
6	-5.8	1.287	2.503
7	-5.8	1.677	3.372
8	-5.7	1.859	3.190
9	-5.4	1.246	3.476
10	-5.3	1.232	3.494

6.3 Chromatogramme der GC mit chiraler stationärer Phase

Zur Bestimmung des Diastereomerenüberschusses bei der Bildung bzw. kinetischen Spaltung von Verbenol wurde die Probe mittels einer chiralen stationären Phase aufgetrennt (Abb. 6.2).

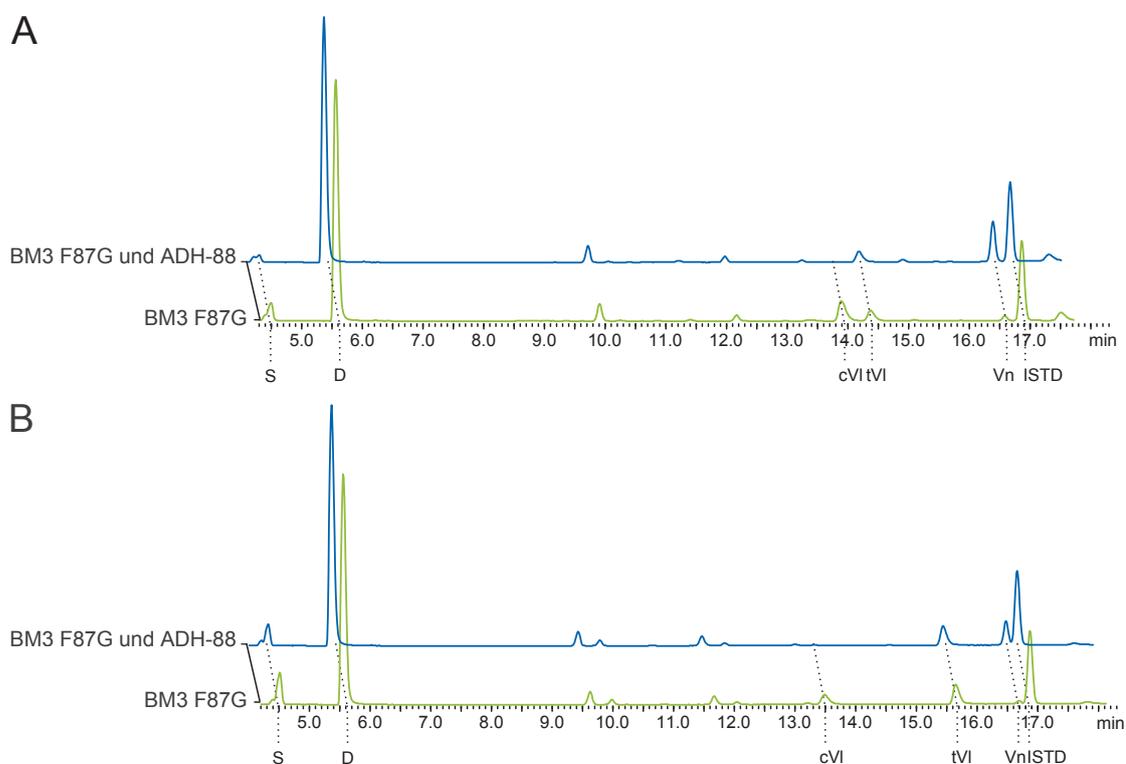


Abbildung 6.2: Chromatogramme der Umsetzung von (-)- bzw. (+)- α -Pinen durch eine Kaskade aus P450-BM3 F87G und ADH88 - A: Umsetzung von (-)- α -Pinen, B: Umsetzung von (+)- α -Pinen; S: Substrat, D: DMSO, cVI: *cis*-Verbenol, tVI: *trans*-Verbenol, Vn: Verbenon, ISTD: interner Standard.

Die Identifizierung der Produkte erfolgte über den Abgleich der Fragmentierungsmuster mit der NIST-Datenbank. Die Diastereomere des Verbenols konnten durch den Vergleich der Chromatogramme ohne und mit Zugabe von (*S*)-spezifischer ADH zweifelsfrei zugeordnet werden (Abb. 6.2). Durch Integration der Peaks und einen Flächenvergleich wurde der Diastereomerenüberschuss berechnet (siehe Formel 2.3).

6.4 Expression von P450cam^{C334A}/Pdx/PdR und Umsatz von (+)-Kampher*

* Zusammenfassung der Bachelorarbeit von Andreas Kreißl [201]

Für die Expression von P450cam^{C334A}/Pdx/PdR vom einem tricistronischen RNA-Konstrukt in unterschiedlichen bakteriellen Hosts wurde die Sequenz aus dem Ursprungsplasmid pCW'/101:Pd:PdR [200] durch PCR vermehrt und über die Schnittstellen XbaI und BsrGI in den p4782.1-Vektor eingefügt. Dann wurden *P. putida* DSM12264 und KT2440, sowie *E. coli* BL21(DE3) und JM109 mit dem Plasmid transformiert und eine Expression durchgeführt. Der Erfolg der Expression wurde durch SDS-PAGE-Analyse überprüft (Abb. 6.3).

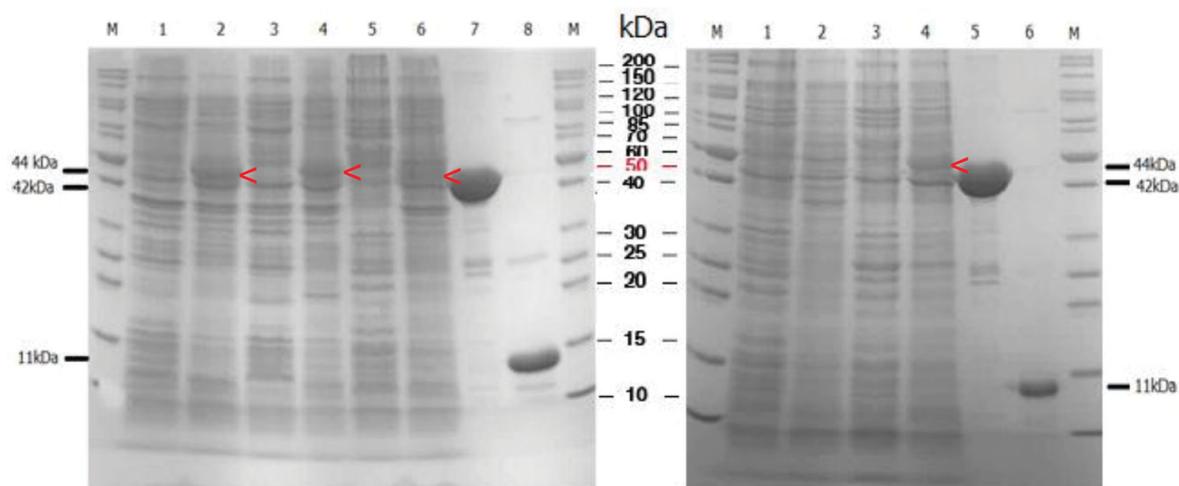


Abbildung 6.3: SDS-PAGE-Analyse der Expression von P450cam^{C334A}/Pdx/PdR in unterschiedlichen Hosts - M: Marker; Proben jeweils bei t=0 h und t=20 h links: 1+2 *E. coli* BL21(DE3) p4782.1::cyp101a1^{C334A}/Pdx/PdR, 3+4 *E. coli* JM109 p4782.1::cyp101a1^{C334A}/Pdx/PdR, 5+6 *P. putida* KT2440 p4782.1::cyp101a1^{C334A}/Pdx/PdR, 7: Putidaredoxinreduktase, 8: Putidaredoxin; rechts: 1+2 *P. putida* DSM12264 pJeM1-a (Leervektor), 3+4 *P. putida* DSM12264 p4782.1::cyp101a1^{C334A}/Pdx/PdR, 5: Putidaredoxinreduktase, 6: Putidaredoxin

Bei allen Stämmen mit p4782.1::cyp101a1^{C334A}/Pdx/PdR wurde nach 20 Stunden Expression das Erscheinen einer schwachen Bande bei etwa 44 kDa festgestellt. Bei Expression mit *P. putida* DSM12264 pJeM1-a (Leervektor) erschien diese Bande nicht. Die Bande läuft etwas oberhalb der Bande der aufgereinigten Putidaredoxinreduktase. Es handelt sich hierbei vermutlich um P450cam^{C334A}. Eine Bande für Putidaredoxinreduktase und Putidaredoxin

ist dagegen schwerlich auszumachen. Dies deckt sich jedoch weitestgehend mit den SDS-PAGE-Analysen, die in der Ursprungspublikation für die Transkription als tricistronisches Konstrukt und Expression in *E. coli* DH5 α gezeigt wurden [200]. Die funktionelle Expression von P450cam^{C334A} wurde durch Aufnahme eines CO-Differenzspektrums bestätigt und die Zellen für eine Biotransformation von (+)-Kampher, dem natürlichen Substrat der Wildtyp-P450cam, zu 5-*exo*-Hydroxykampher eingesetzt (Abb. 6.4).

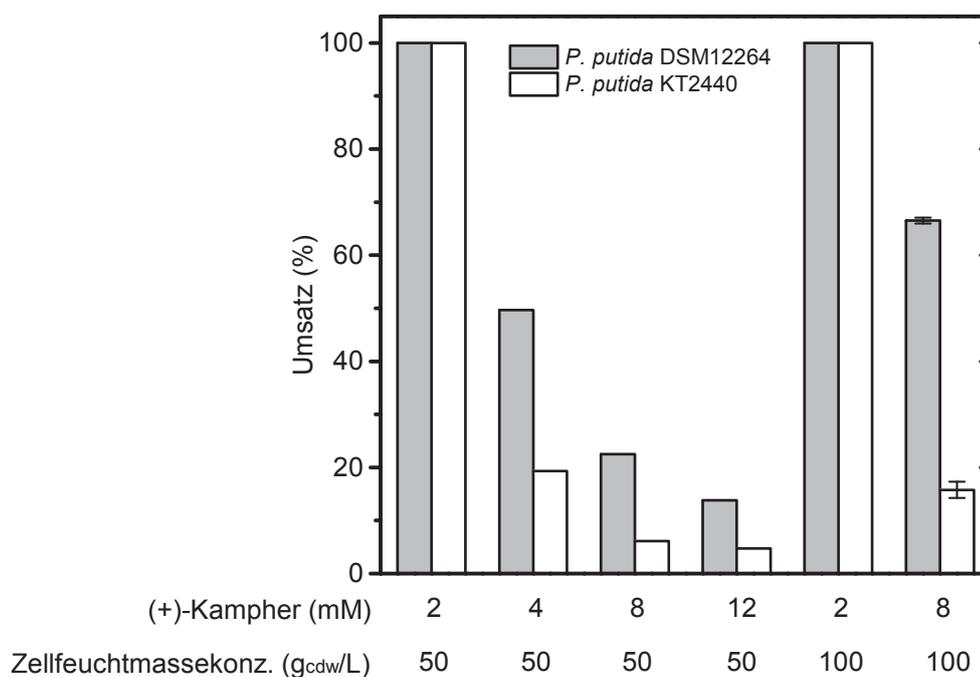


Abbildung 6.4: 24 h-Biotransformation von (+)-Kampher durch *P. putida* DSM12264 und KT2440 nach Expression von P450cam^{C334A}/Pdx/PdR - Umsatz in Prozent bei unterschiedlicher Substratkonzentration durch 50 mg_{c_{dw}}/mL bzw. 100 mg_{c_{dw}}/mL *P. putida* DSM12264 (grau) und KT2440 (weiß). Die Umsetzung mit 100 mg_{c_{dw}}/mL wurde als Doppelbestimmung ausgeführt.

Mit steigender Substratkonzentration sank der prozentuale Umsatz. Während bei 2 mM Substratkonzentration beide, *P. putida* DSM12264 und KT2440, vollständigen Umsatz zeigten, sank der Umsatz bei Verdopplung der Substratkonzentration auf 4 mM auf 50 % bei *P. putida* DSM12264 und sogar nur 20 % bei *P. putida* KT2440. Bei Substratkonzentrationen von 4 mM und höher erreichte *P. putida* DSM12264 höhere Umsätze als *P. putida* KT2440. Während der Umsatz bei *P. putida* DSM12264 in etwa konstant bei 2 mM bleibt, fiel er bei *P. putida* KT2440 bei Erhöhung der Substratkonzentration auf unter 1 mM. Bei Verdopplung der Zellfeuchtmasskonzentration konnte bei *P. putida* KT2440 eine Verdopplung des Umsatzes erreicht werden. Bei *P. putida* DSM12264 ist sogar ein um Faktor 3 höherer Umsatz zu beobachten. Die Expression von P450cam^{C334A}/Pdx/PdR in *P. putida* DSM12264 und KT2440 machte aus beiden Stämmen einen funktionellen Biokatalysator für die Hydroxylierung von (+)-Kampher zu 5-*exo*-Hydroxykampher.

6.5 Permeabilisierung der Zellmembran von *P. putida* DSM12264*

* Zusammenfassung der Bachelorarbeit von Tim Kroll [204]

P. putida DSM12264 wurde mit p4782.1::cyp102a1-atscvg (Karte in Appendix 6.6.2) transformiert und die Expression der P450-BM3-Variante ATSCVG im rekombinanten Stamm induziert (Durchführung wie in Abschnitt 2.4.4 und 2.5.4). Dann wurden die Zellen in CV2-Medium auf eine Zelltrockenmassekonzentration von etwa 14 g_{cdw}/L eingestellt und die Biotransformation durch Zugabe von (-)- α -Pinen in DMSO (Endkonzentration DMSO: 2 % (v/v), (-)- α -Pinen: 2 mM) gestartet. Die Zellen wurden mit variierenden Konzentrationen unterschiedlicher Permeabilisierungsgenzien versehen und die Produktivität der Zellen ($Y_{P/X}$) bestimmt. Das Detergenz Triton X-100, die Lösemittel Isopropanol und Toluol, sowie Polymyxin B-Sulfat wurden als Permeabilisierungsgenzien getestet und immer eine Negativkontrolle ohne Permeabilisierungsgenz mitgeführt. Im Gegensatz zu Isopropanol und Polymyxin B (Abb. 6.5) führte die Behandlung des Biokatalysators mit Triton X-100 und Toluol zu niedrigerem $Y_{P/X}$ im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Daten nicht gezeigt).

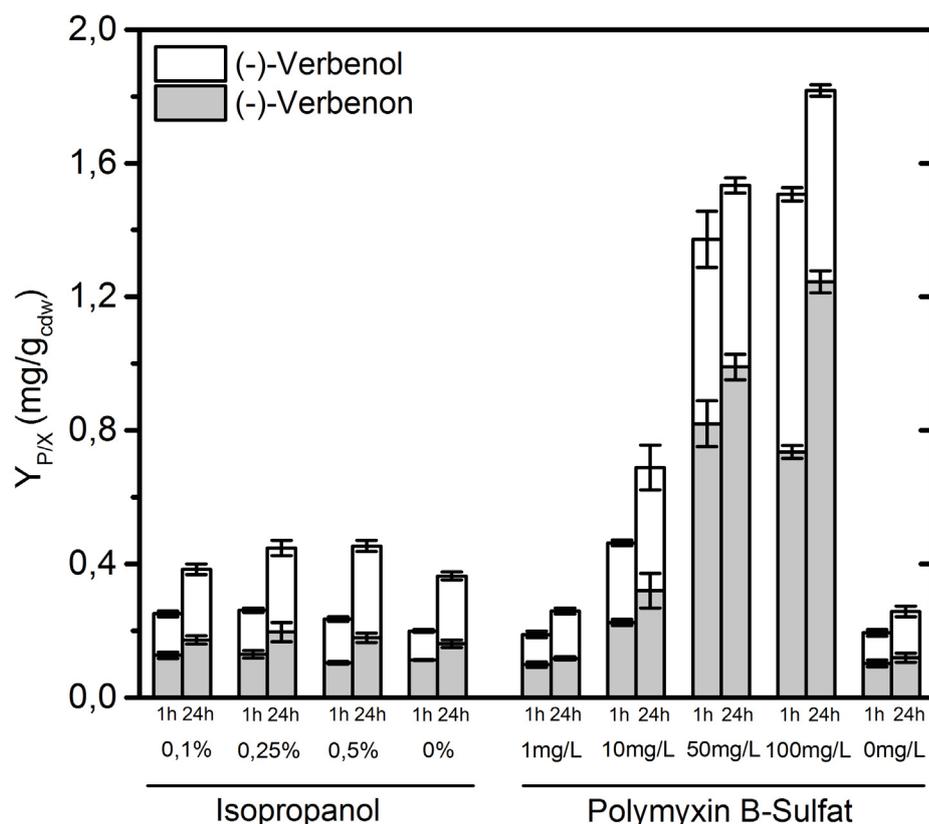


Abbildung 6.5: Produktivität $Y_{P/X}$ nach Permeabilisierung durch Isopropanol bzw. Polymyxin B-Sulfat - Gezeigt ist die Produktivität $Y_{P/X}$ nach 1 h und 24 h von *P. putida* DSM12264 nach Expression von P450-BM3-Variante ATSCVG unter ausschließlicher Berücksichtigung von Verbenol und Verbenon als Produkt.

Die Permeabilisierung mit Isopropanol führte zu einer geringfügigen Verbesserung der Produktivität, während die Behandlung mit Polymyxin B-Sulfat eine deutliche Verbesserung zur Folge hatte. Bei der höchsten getesteten Konzentration von 100 mg/mL wurde ein $Y_{P/X}$ von etwa 1,8 mg/g_{cdw} nach 24 Stunden erreicht. Dies ist eine Verbesserung um den Faktor 6 im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Dass die Behandlung des Biokatalysators mit Triton X-100 und Toluol zu niedrigerem $Y_{P/X}$ im Vergleich zu unbehandelten Zellen führt, wurde bereits in ähnlicher Weise bei der Permeabilisierung von *P. putida* G7 beobachtet [176]. Polymyxin B ging aus dieser Durchmusterung als geeignetes Permeabilisierungsagens für *P. putida* DSM12264 hervor, indem es die P450-katalysierte Umsetzung von (-)- α -Pinen deutlich verbesserte.

6.6 Plasmidkarten

Die Sequenzen der abgebildeten Plasmide wurden in die Clone Manager 9 Basic Edition der Fa. Scientific & Educational Software (Morrisville, USA) eingepflegt und Abbildungen mit Hilfe der Software erstellt.

6.6.1 pEX-K4::*gre2syn*

Die Synthese des Gens für die Expression der Gre2p wurde bei eurofins Genomics (Ebersberg, GER) in Auftrag gegeben. Dabei wurde die Sequenz durch die Firma für die Expression in *E. coli* kodonoptimiert und wie folgt synthetisiert:

```
5' -ATGTCCGTGTTTGTAGCGGGGCTAACGGCTTTATCGCACAACACATTGTCGATTTGCT
TCTGAAAGAGGACTACAAAGTAATCGGTAGTGCACGTTTCGCAGGAGAAAGCCGAGAATCTGA
CCGAAGCATTTCGAAATAATCCGAAATTTTCGATGGAGGTTGTGCCAGACATCAGCAAACCTC
GATGCCTTTGATCACGTGTTTCAGAAACATGGCAAAGATATCAAAATTGTCTTACATACCGC
CTCACCGTTTTGCTTCGACATTACGGATTCTGAGCGTGACCTGTTGATTCTGCGGTTAACG
GCGTAAAAGGGATTCTGCACTCCATCAAGAAATATGCCGCGGATAGTGTGGAACGTGTCGTG
TTGACTTCGTGATGCGCGGTTTTTCGATATGGCGAAAGAAAACGATAAATCACTGACCTT
TAACGAAGAAAGCTGGAATCCGGCTACTTGGGAATCATGCCAAAGTGACCCGGTTAATGCGT
ATTGTGGTAGTAAGAAATTCGCTGAGAAAGCGGCATGGGAATTTCTGGAGGAAAACCGCGAT
AGCGTGAAATTTGAACTCACAGCCGTCAATCCCGTGTACGTATTTGGTCCGCAGATGTTTGA
CAAGGACGTGAAGAAACACCTGAACACGAGCTGTGAATTAGTCAACTCTTTGATGCATCTTA
GCCCGGAAGATAAAATCCCCGAACTGTTTGGCGGCTACATTGACGTTTCGTGATGTTGCCAAA
GCGCATCTTGTGGCGTTTTAGAAAACGCGAAACCATTGGCCAACGCCTGATTGTAAGCGAAGC
ACGCTTACGATGCAGGATGTGTTAGACATCCTGAACGAAGATTTCCAGTCCTGAAGGGGA
ACATTCCGGTGGGTAAACCTGGCTCTGGTGCACCCATAATACCCTGGGTGCAACCCTGGAT
AACAAGAAATCCAAGAACTGTTAGGCTTCAAATTCGCAATCTCAAAGAAACGATTGATGA
TACAGCTTCCAGATCCTGAAATTCGAAGGACGGATTTAA-3'
```

Das Gen wurde im pEX-K4-Plasmid geliefert (Abb. 6.6) und für die weitere Nutzung durch PCR aus dem Plasmid vermehrt (Abschnitt 2.4.2).

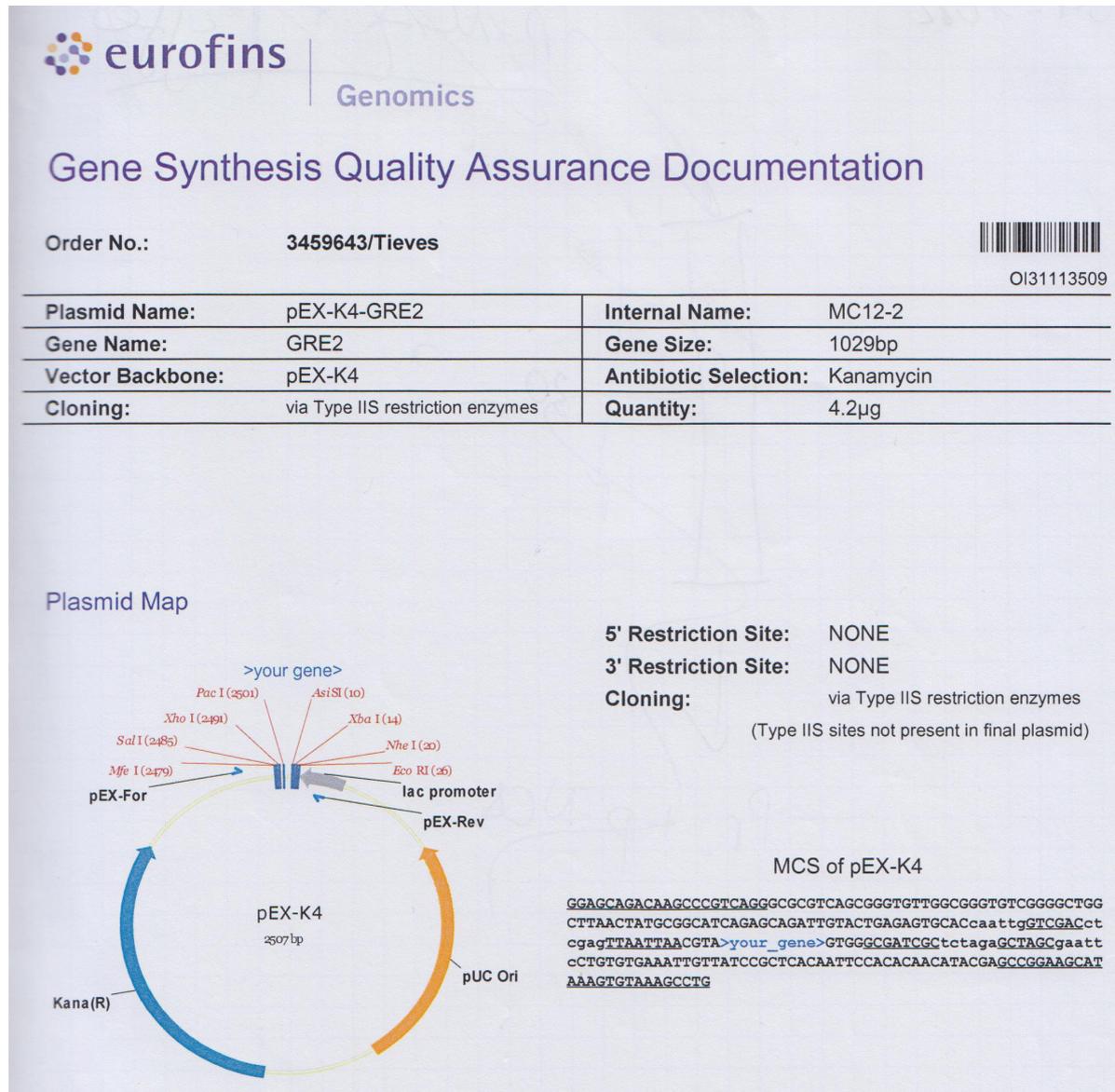
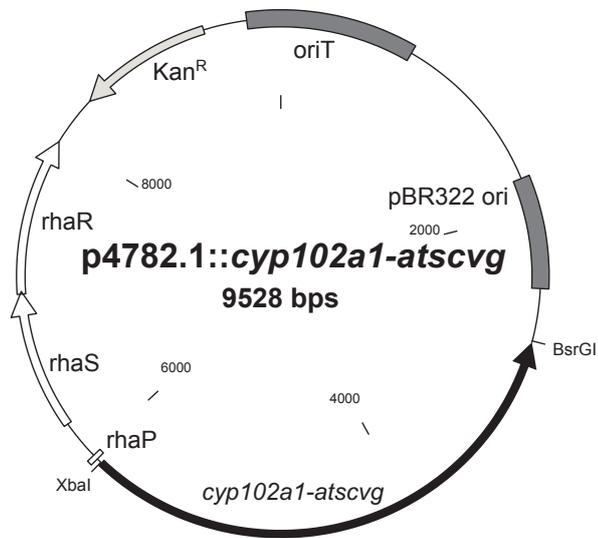
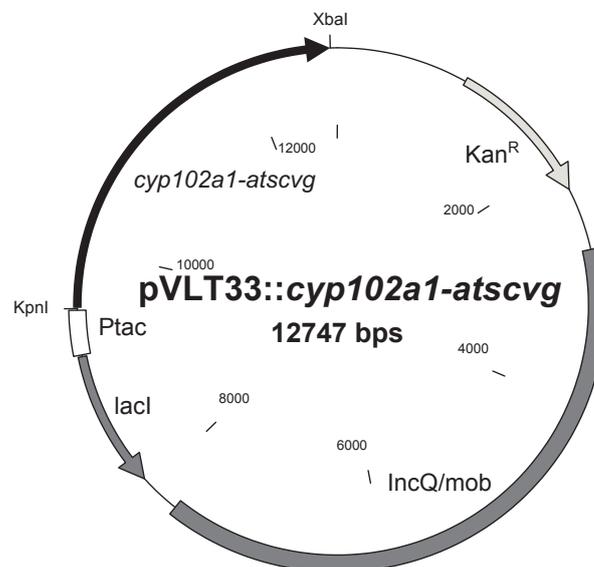


Abbildung 6.6: Ausschnitt aus der *Quality Assurance Documentation* der Synthese des *gre2syn*-Gens - Das Gen wurde in das pEX-K4-Plasmid eingefügt geliefert.

6.6.2 p4782.1::*cyp102a1-atscvg*Abbildung 6.7: Karte des p4782.1-Plasmids mit eingefügtem *cyp102a1-atscvg*-Gen6.6.3 pVLT33::*cyp102a1-atscvg*Abbildung 6.8: Karte des pVLT33-Plasmids mit eingefügtem *cyp102a1-atscvg*-Gen

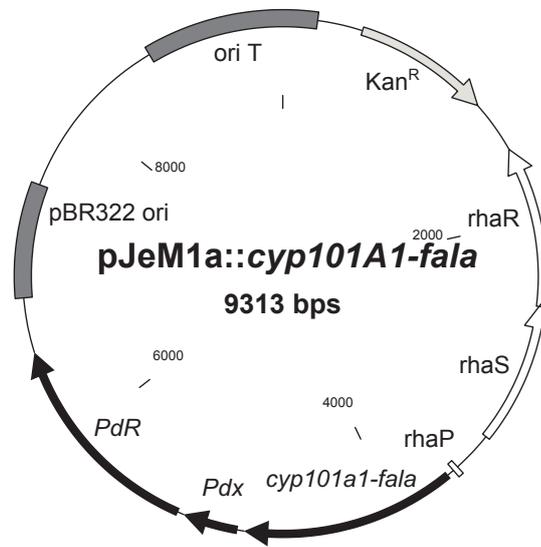
6.6.4 pJeM1a::*cyp101a1-fala*

Abbildung 6.9: Karte des pJeM1a-Plasmids mit eingefügtem tricistronischen *cyp101a1-fala/Pdx/PdR*-Konstrukt

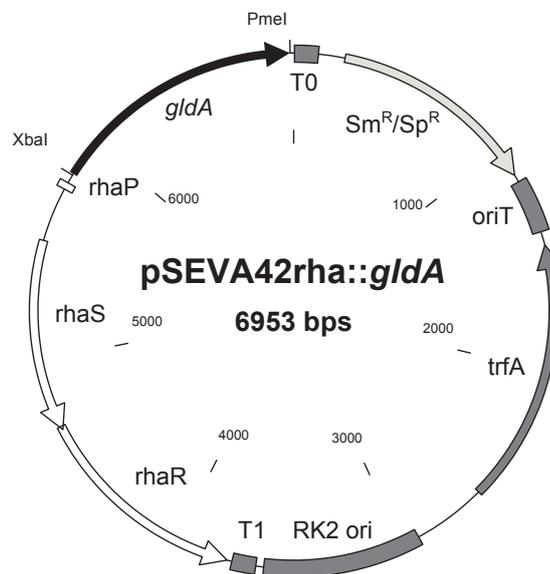
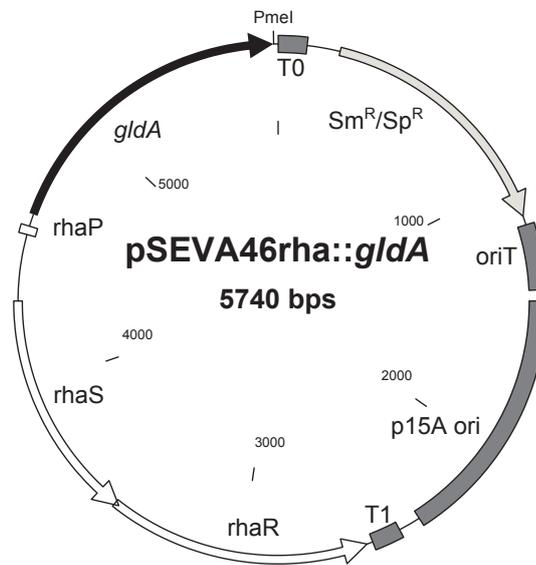
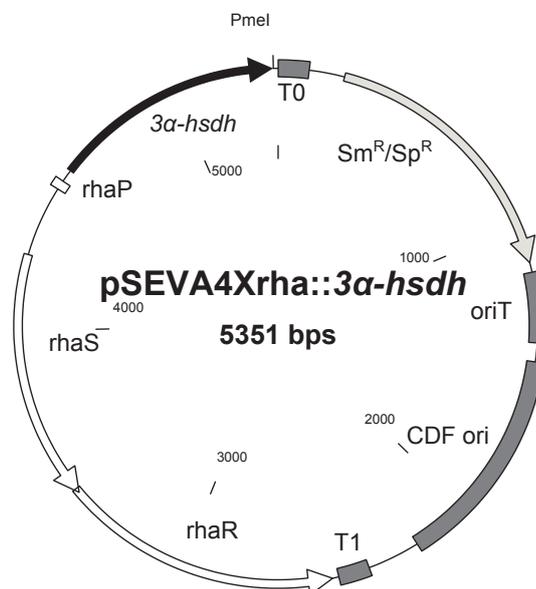
6.6.5 pSEVA42rha::*gldA*

Abbildung 6.10: Karte des pSEVA42rha-Plasmids für die Koexpression von GldA in *P. putida*

6.6.6 pSEVA46rha::*gldA*Abbildung 6.11: Karte des pSEVA46rha-Plasmids für die Koexpression von GldA in *E. coli*6.6.7 pSEVA4Xrha:: 3α -*hsdh*Abbildung 6.12: Karte des pSEVA4Xrha-Plasmids für die Koexpression von 3α -HSDH in *E. coli*

7 Abkürzungsverzeichnis

ADH	Alkoholdehydrogenase
AI	P450-BM3-Variante F87A/A328I
AIP	P450-BM3-Variante F87A/A328I/I401P
AIPLF	P450-BM3-Variante R47L/Y51F/F87A/A328I/I401P
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATSCVG	P450-BM3-Variante Y51V/A74G/F87A/A111T/L188S/R471C
AQCRG	P450-BM3-Variante K69R/A74G/F87A/L188Q/R471C
BMO	Monooxygenasedomäne der P450-BM3
BMR	Reduktasedomäne der P450-BM3
cdw	Zelltrockenmasse, engl. <i>cell dry weight</i>
c_{end}	finale Konzentration
CFU	kolonieformende Einheiten, engl. <i>colony forming units</i>
CPR	Cytochrom-P450-Reduktase
cww	Zellfeuchtmasse, engl. <i>cell wet weight</i>
CYP	Cytochrom-P450-Monooxygenase
ddH ₂ O	entionisiertes Wasser
<i>de</i>	Diastereomerenüberschuss, engl. <i>diastereomeric excess</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fa.	Firma
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMN	Flavin-Adenin-Mononukleotid
GC/MS	Gaschromatographie gekoppelt an Massenspektrometrie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan ^R	Kanamycinresistenz
KOAc	Kaliumacetat
KP _i	Kaliumphosphatpuffer
LB	Luria-Bertani

MD	Molekulardynamik, engl. <i>molecular dynamics</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
NAD(P)H	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)
NAD(P) ⁺	oxidiertes Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure, engl. <i>nickel-nitrilotriacetic acid</i>
NIST	National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg, USA)
OD _{600nm}	optische Dichte bei 600 nm
P450cam ^{FALA}	P450cam-Variante Y96F/L244A/V247L/C334A
PCR	Polymerasekettenreaktion, engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PdR	Putidaredoxin-Reduktase
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>P. testosteroni</i>	<i>Pseudomonas testosteroni</i>
Pdx	Putidaredoxin
RNA	Ribonukleinsäure, engl. <i>ribonucleic acid</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat, engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SIM	Einzelionenmodus, engl. <i>single ion mode</i>
Sm ^R /Sp ^R	Streptomycin- und Spectomycinresistenz
SV	Säulenvolumen
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TB	<i>terrific broth</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tfb	Transformationspuffer, engl. <i>transformation buffer</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UpM	Umdrehungen pro Minute
VVM	Volumen Gas pro Volumen Medium und Minute
xg	mal die Erdbeschleunigung

In der Arbeit verwendete Abkürzungen für Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	ALA	A
Arginin	ARG	R
Cystein	CYS	C
Glutamin	GLN	Q
Glycin	GLY	G
Isoleucin	ILE	I
Leucin	LEU	L
Lysin	LYS	K
Phenylalanin	PHE	F
Prolin	PRO	P
Threonin	THR	T
Tyrosin	TYR	Y
Valin	VAL	V
