

Molekularbiologische und prozesstechnische Optimierung der P450_{BM-3} basierten Ganzzellbiotransformation von α -Pinen im wässrig-organischen Zweiphasenprozess

Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. Nat.)
genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

Arnd Hendrik Schewe
aus Stuttgart

Hauptberichter: Prof. Dr. Rolf D. Schmid (MBA)
Mitberichter: Prof. Dr.-Ing Dr. h.c. Matthias Reuss

Tag der mündlichen Prüfung: 18.11.2009

INSTITUT FÜR TECHNISCHE BIOCHEMIE DER UNIVERSITÄT STUTTGART

2008

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Frankfurt, den 01.10.2008 _____

(Hendrik Schewe)

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Rolf D. Schmid bedanken, der mir durch die Betreuung dieser Arbeit als Doktorvater eine Promotion überhaupt erst ermöglicht.

Herrn Dr. Jens Schrader danke ich ganz herzlich für die hervorragende Betreuung meiner wissenschaftlichen Arbeit, für die angeregten Diskussionen und Tipps, für seine Geduld, Unterstützung und Ermutigungen, die meinen wissenschaftlichen und persönlichen Weg nachhaltig beeinflusst haben.

Dem Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie danke ich für die finanzielle Unterstützung des Forschungsvorhabens über die Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen (AiF).

Der DECHEMA e.V. gebührt mein Dank für die hervorragenden Arbeitsbedingungen, die mir zur Verfügung gestellt wurden.

Den Projektpartnern des Instituts für Technische Biochemie der Universität Stuttgart und des Lebensmittelchemischen Instituts der Universität Hannover danke ich für die Zusammenarbeit innerhalb des Forschungsvorhabens zur Oxyfunktionalisierung von Pinen-Abfallströmen.

Frau Dr. Vlada Urlacher danke ich für die Bereitstellung von CYP102A1-Varianten und die wertvollen Anregungen während gemeinsamer Treffen im Rahmen der projektbegleitenden Ausschüsse.

Meinen ehemaligen Büro- und Doktorandenkollegen Martin Schilling und Marco Mirata gilt mein Dank für die gute Zeit, die wir gemeinsam am Karl-Winnacker-Institut erlebt haben.

Bei den langjährigen Mitgliedern Arbeitsgruppe Bioverfahrenstechnik des Karl-Winnacker-Instituts der DECHEMA e.V. Dr. Markus Buchhaupt, Kristina Ehrich, Dr. Marlene Etschmann, Bernhard Gödelmann, Dr. Dirk Holtmann, Dr. Björn Kaup, Christoph Nacke, Michael Pescheck und Robert Walisko bedanke ich mich für die beispiellos gute, kollegiale und kuchenreiche Arbeitsatmosphäre.

Schließlich möchte ich meinen Eltern und ganz besonders Joanna danken. Durch ihren Beistand haben sie mit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung -----	III
Inhaltsverzeichnis -----	IV
Abkürzungsverzeichnis -----	VII
Zusammenfassung -----	X
Abstract -----	XI
Einleitung -----	1
1 Cytochrom P450-Monooxygenasen -----	1
1.1 Klassifizierung von P450-Monooxygenasen -----	2
1.2 Reaktionsmechanismus -----	5
1.3 Biotechnologische Bedeutung von P450-Monooxygenasen -----	6
1.4 CYP102A1 (P450 _{BM-3}) -----	8
2 Terpenkohlenwasserstoffe -----	9
2.1 Pinene -----	10
2.2 Biotechnologische Bedeutung von Terpenkohlenwasserstoffen -----	11
3 Biokatalyse in flüssigen Zweiphasensystemen -----	14
3.1 Wässrig-organische Zweiphasensysteme -----	17
3.2 Toxizität organischer Lösungsmittel -----	19
3.3 logP _{Oct} -Konzept -----	20
3.4 Erwünschte Eigenschaften einer organischen Trägerphase -----	21
Aufgabenstellung und Zielsetzung -----	23
Material und Methoden -----	24
1 Material -----	24
1.1 Chemikalien -----	24
1.2 Geräte -----	24
1.3 Medien -----	25
1.4 Puffer und Lösungen -----	27
1.5 Mikroorganismen -----	28
1.6 Kommerzielle Kits, Enzyme und Marker -----	29
1.7 Plasmide und Oligonukleotide -----	30
1.8 Ganzzellbiokatalysatoren -----	31
2 Methoden -----	32
2.1 Mikrobiologische Methoden -----	32
2.1.1 Stammhaltung und Kultivierung von <i>E. coli</i> -----	32
2.1.2 Messung der Zellkonzentration -----	32
2.2 Molekularbiologische Methoden -----	32
2.2.1 Plasmidpräparation -----	32

2.2.2	Herstellung chemisch kompetenter Zellen (Rubidiumchlorid-Methode) ---	32
2.2.3	Transformation chemisch kompetenter Zellen -----	33
2.2.4	Agarosegelelektrophorese -----	33
2.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) -----	33
2.2.6	Restriktionsverdau und Klonierung von PCR-Produkten -----	35
2.2.7	Klonierung von P450 _{BM-3} QM und Glucosedehydrogenase in pETDUET-135	
2.3	Proteinbiochemische Methoden -----	35
2.3.1	Rekombinante Proteinexpression -----	35
2.3.2	Herstellung von Rohzellextrakten -----	36
2.3.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) -----	36
2.3.4	P450-Konzentrationsbestimmung (CO-Spektrum) -----	37
2.3.5	Aktivitätstest P450 _{BM-3} (pNCA-Assay) -----	38
2.3.6	Aktivitätstest P450 _{BM-3} (NADPH-Verbrauch) -----	38
2.3.7	Aktivitätstest Glucosedehydrogenase (NADP ⁺ -Verbrauch) -----	39
2.4	Analytische Methoden -----	39
2.4.1	Gaschromatographische Analyse der wässrigen und organischen Phase ---	39
2.4.2	Bestimmung von Verteilungskoeffizienten -----	41
2.5	Toxizitätsanalyse von DINP und α -Pinen -----	42
2.6	Biotransformation im Erlenmeyerkolben -----	42
2.7	Biotransformationen im Bioreaktor -----	43
2.8	Berechnung von Prozesskenngrößen -----	44
	Ergebnisse -----	45
1	Vorcharakterisierung der Biokatalyse -----	45
1.1	<i>In vitro</i> Aktivität von P450 _{BM-3} QM -----	45
1.1.1	<i>In vitro</i> Biotransformation von α -Pinen -----	45
1.1.2	Produkte der <i>in vitro</i> α -Pinenoxidation durch P450 _{BM-3} QM -----	46
1.1.3	Produktthemmung -----	47
1.1.4	Produktstabilität und Entkopplung -----	48
1.2	Aktivität <i>in vivo</i> - Vorcharakterisierung der Biokatalyse im Erlenmeyerkolben-	49
1.2.1	Produkte der Biotransformation im Erlenmeyerkolben -----	49
1.2.2	Einflussfaktoren auf Produktbildung -----	50
1.2.2.1	Biotrockenmasse -----	50
1.2.2.2	Inhibierung des Biokatalysators -----	52
2	Molekularbiologische Optimierung der Biokatalysatoreigenschaften -----	53
2.1	<i>In vitro</i> Analyse des rekombinanten intrazellulären Cofaktorregenerationssystems	
	54	
2.1.1	Expressionsanalysen -----	54
2.1.2	<i>In vitro</i> Aktivitätsmessungen -----	54
2.2	Vergleich der katalytischen <i>in vivo</i> Aktivität von BL21 (P450 _{BM-3} QM) und BL21 (P450 _{BM-3} QM/GlcDH/GLF) in einem wässrig-organischen Zweiphasensystem -----	56

3	Bioprozessentwicklung im organisch-wässrigen Zweiphasensystemen	60
3.1	Screening nach einer geeigneten organischen Trägerphase für den Zweiphasenbioprozess	60
3.1.1	Gewünschte Eigenschaften der organischen Trägerphase	60
3.1.2	Literaturrecherche	61
3.1.3	Biokompatibilität, Emulsionsbildungstendenz, Prozesssicherheit	62
3.1.4	Abbau der organischen Phase	62
3.1.5	Vorteilhafte Eigenschaften für Produktaufreinigung	63
3.1.6	Verteilungskoeffizienten	64
3.2	Charakterisierung von DINP als Teil eines wässrig-organischen Zweiphasensystems	65
3.3	Toxizitätsversuche im Bioreaktor	66
3.4	Produktion von Ganzzellbiokatalysatoren	67
3.5	Optimierung der Biotransformationen von α -Pinen im Bioreaktor	69
3.5.1	Zusammensetzung der organischen Phase	69
3.5.2	Rührerdrehzahl	71
4	Pilotprozess zur α-Pinenoxidation im organisch-wässrigen Zweiphasensystemen im Bioreaktor	72
	Diskussion	77
1	<i>In vitro</i> Aktivität von P450_{BM-3} QM	77
2	Maßnahmen zur Optimierung der Biokatalyse	78
2.1	Prozesstechnische Optimierung des Zweiphasenbioprozesses	78
2.1.1	$\log P_{\text{Oct}}$ der organischen Phase, Volumenanteil des Substrats an der organischen Phase	81
2.1.2	Biotrockenmassekonzentration	83
2.1.3	Energieeintrag und Volumen der organische Phase	85
2.2	Molekularbiologische Optimierung des Ganzzellbiokatalysators	86
2.2.1	<i>In vitro</i> Untersuchung des Cofaktorregenerationssystems	86
2.2.2	Biotransformationen im Erlenmeyerkolben	87
2.2.3	Biotransformation im Bioreaktor	88
2.3	Ausblick	89
	Literatur	91

Abkürzungsverzeichnis

12-pNCA	<i>p</i> -Nitrophenoxydodecansäure
μ	Wachstumsrate (h^{-1})
μ_{max}	Maximale Wachstumsrate (h^{-1})
A_{P450}	Aktivität bezogen auf die P450-Konzentration (μmol Produkt $\text{min}^{-1} \mu\text{mol}_{\text{P450}}$)
BEHP	<i>Bis</i> (2-ethylhexyl)phthalat
bp	Basenpaare
BTM	Biotrockenmasse
c_{Aq}	Produktkonzentration bezogen auf das Volumen der wässrigen Phase ($\text{mg l}^{-1}_{\text{Aq}}$) (Berechnung siehe Material und Methoden 2.8, S. 44)
c_{S}	Substratkonzentration
CYP	Cytochrom P450
DINP	Diisononylphthalat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DO	Gelöster Sauerstoff (dissolved oxygen)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinadeninmononukleotid
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie

GlcDH	Glucosedehydrogenase
GLF	Glucosefacilitator
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
k_{cat}	Wechselzahl (Umsatz an Substratmolekülen pro aktivem Zentrum pro Zeiteinheit)
kDa	Kilo Dalton
K_M	Michaeliskonstante
KPi	Kaliumphosphat
LB	Luria-Bertani
$\log P_{\text{Oct}}$	Dekadischer Logarithmus des Verteilungskoeffizienten einer Substanz in einem Zweiphasensystem bestehend aus Wasser und Octanol
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
OD_{600}	Optische Dichte gemessen bei 600 nm
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pO_2	Sauerstoffpartialdruck (%)
Q	Spezifische initiale Produktbildungsrate (Berechnung siehe Material und Methoden 2.8, S. 44)
QM	Fünffachvariante (englisch: quintuple mutant)
R_f	Retentionsfaktor
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
SBE	Stearinsäurebutylester
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

sp.	Spezies
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TB	Terrific Broth
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tfb	Transformationspuffer (transformation buffer)
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
tRNA	Transfer RNA
TTN	Total Turnover Number (Mol Produkt pro Mol Katalysator)
U	Unit (Menge Enzym, welche unter angegebenen Bedingungen ein μmol Substrat pro Minute umsetzt)
UV	Ultraviolett
v	Reaktionsgeschwindigkeit ($\mu\text{mol min}^{-1}$)
v/v	Volumenanteil (Volumen pro Volumen)
Vis	Visuelles elektromagnetisches Spektrum
$Y_{P/P450}$	P450-spezifische Produktausbeute ($\mu\text{mol } \mu\text{mol}^{-1}_{P450}$) (Berechnung siehe Material und Methoden 2.8, S. 44)
$Y_{P/X}$	Spezifische Produktausbeute (mg g^{-1}_{BTM}) (Berechnung siehe Material und Methoden 2.8, S. 44)

Zusammenfassung

Im Zentrum dieser Arbeit stand die Entwicklung eines wässrig-organischen Zweiphasenprozesses zur regio- und stereoselektiven Ganzzellbiotransformation eines apolaren und toxischen Terpens zu hochwertigen Produkten. Die Fünffachvariante V26T R47F A74G F87V L188K der katalytisch unabhängigen P450-Monooxygenase CYP102A1 (P450_{BM-3} QM) und das bicyklische Monoterpen (-)- α -Pinen wurden als Modellenzym bzw. -terpen verwendet, um die mikrobielle Ganzzellbiotransformation durch rekombinante *Escherichia coli* BL21 (DE3) Zellen zu untersuchen. Dabei konnten Produktausbeuten und Produktkonzentrationen des wässrig-organischer Zweiphasenbioprozess sowohl durch prozesstechnische als auch molekularbiologische Optimierungen verbessert werden.

P450_{BM-3} QM oxidiert in einer cofaktorabhängigen Reaktion (-)- α -Pinen zu (-)- α -Pinenoxid, (-)-*trans*-Verbenol und (-)-Myrtenol mit einem Enantiomerenüberschuß >92%. Verbenol und Myrtenol fördern die Entkopplung der NADPH-Oxidation von der Substratoxidation und hemmen dadurch P450_{BM-3} QM kompetitiv. Zusätzlich zu diesem Phänomen machte die Instabilität von α -Pinenoxid in wässriger Lösung eine interne *in situ* Produktabtrennung durch Extraktion in eine organische Trägerphase, die im direkten Kontakt mit dem Ganzzellbiokatalysator steht und gleichzeitig als Substratreservoir dient, notwendig.

Im Erlenmeyerkolben mit reinem α -Pinen als organische Phase konnten einige prozessrelevante Parameter, wie toxische Einflüsse einer α -Pinenphase auf *E. coli*, identifiziert werden. Durch Expression eines Glucosefacilitators (GLF) aus *Zymomonas mobilis* und einer Glucosedehydrogenase (GlcDH) aus *Bacillus megaterium* konnte ein, auf extrazellulär vorliegender Glucose basierendes, intrazelluläres Cofaktorregenerationssystem eingeführt werden und dessen positiver Einfluss auf die spezifische Produktausbeute $Y_{P/X}$ und die spezifische initiale Produktbildungsrate Q beschrieben werden. Bei Verwendung eines Ganzzellbiokatalysators mit rekombinanter Cofaktorregenerierung konnte $Y_{P/X}$ um das Sechsfache und Q um das Neunfache gesteigert werden.

Bei der prozesstechnischen Optimierung des Zweiphasenbioprozesses konnte, durch Einführung von Diisononylphthalat (DINP) als organische Trägerphase für das Substrat α -Pinen, eine Verbesserung der Biokompatibilität der organischen Phase und dadurch eine Verlängerung des Produktbildungszeitraums auf über 4 h erreicht werden. Weitere prozessrelevante Parameter wie Rührerdrehzahl, Volumen der organischen Phase und Anteil des Substrats α -Pinen in der organischen Phase wurden identifiziert und optimiert. Die Kombination prozesstechnischer und molekularbiologischer Optimierungen führte zu bisher in der Literatur nicht beschriebenen Konzentrationen für die biokatalytische Oxidation von α -Pinen von über 1 g l⁻¹ oxidierte Produkte bezogen auf das Volumen der wässrigen Phase nach 4 h Biotransformationszeit. Diese Produktausbeuten stellen einen weiteren Schritt zur Etablierung industrieller Verfahren zur biologischen Wertschöpfung auf Basis von Terpenen dar.

Abstract

In the present work, a variant of the catalytically self-sufficient cytochrome P450 monooxygenase CYP102A1 and the monoterpene α -pinene were chosen as model enzyme and component, respectively, to establish a biphasic whole-cell biotransformation process for microbial oxidation of an apolar and toxic substrate to a value-added product.

Cytochrome P450 monooxygenases (P450s) are heme enzymes that are found in virtually all organisms from archaeobacteria to humans, one notable exception being *Escherichia coli*. P450 enzymes have significant potential in biotransformation applications because their ability of regiospecific and stereoselective insertion of molecular oxygen into allylic positions or unactivated C-H bonds under mild conditions has no equivalent in organic synthesis (Bell et al. 2003b). Besides difficulties in isolating P450 which are often membrane-bound and typically show low activities (Ortiz de Montellano 1995), their stoichiometric demand for the costly electron donating cofactor NAD(P)H (Lewis 1996; Nebert und Gonzalez 1987) is a critical property which hampers the application of P450 monooxygenases as *in vitro* biocatalysts. Instead of designing *in vitro* P450 reaction systems of higher complexity by integrating an additional enzyme reaction for *in vitro* cofactor regeneration, whole-cell biocatalysis is a promising alternative which has already frequently been studied and applied for P450 based processes (Bell et al. 2001; Mouri et al. 2006; Sowden et al. 2005). With whole-cell P450 catalysis there is no need for costly enzyme isolation and reduced cofactor is provided by the metabolic reaction sequences of the cell (Schmid et al. 2001).

In contrast to other bacterial P450 monooxygenases P450_{BM-3} contains both, an amino-terminal heme domain and a carboxy-terminal flavin reductase in a single polypeptide (Narhi und Fulco 1986; Ruettinger et al. 1989). The P450_{BM-3} wild type enzyme naturally catalyses subterminal hydroxylation of saturated long-chain fatty acids (Boddupalli et al. 1992; Narhi und Fulco 1986) up to reaction rates which are the highest reported for P450s (turnover frequencies $>1000 \text{ min}^{-1}$). Furthermore, the enzyme, which has a wide substrate spectrum, has been shown to be a very suitable candidate for rational and evolutionary engineering approaches by which its substrate spectrum has been shifted towards a variety of other compounds, e.g. more hydrophobic ones, such as aromatics and terpenoids (Wong et al. 2000). The quintuple variant V26T R47F A74G F87V L188K of CYP102A1 (P450_{BM-3}) had been generated by rational evolution (Lentz et al. 2001) and is able to accept the monoterpene α -pinene as substrate for selective oxidation as shown in this work.

Especially terpenoids, which are widespread in nature, e.g. in essential oils of plants (Hill 1993), constitute an abundantly available pool of chiral building blocks and thus the ideal starting material for chemical derivatization to value-added products. In contrast to chemical methods biooxidation of natural terpenoids does not only usually occur with superior stereo- and regioselectivity, it also provides the chance to obtain flavors and fragrances with "natural" label which are of higher market value compared to their chemically synthesized counterparts

(“nature identical”). The main obstacles hampering the realization of terpenoid biooxidation processes on industrial scale so far arise from both technical and biological reasons, such as low water solubility, high volatility and cytotoxicity of monoterpenoids, relatively low catalytic activity of natural terpenoid-transforming P450 monooxygenases and the diversity of interfering metabolic derivatization and degradation pathways (Schrader 2007).

To address said disadvantages an aqueous-organic two-phase biotransformation process was developed. It features the advantage of *in situ* product removal (ISPR) by extraction of hydrophobic, potentially toxic or unstable products into a biocompatible inert organic phase which may simultaneously serve as reservoir for the hydrophobic (and also potentially toxic) substrate, thereby allowing higher productivities and product concentrations (Freeman et al. 1993; Lye und Woodley 1999; Malinowski 2001; Schmid et al. 2001; Stark und von Stockar 2003; Woodley und Lilly 1990; Wubbolts et al. 1994). Biphasic systems rank among the four most important technological advances in replacement of classical chemical processes by biocatalyst-mediated transformations (Lilly 1994). A few two-phase bioprocesses have already been developed to process scale (Lye und Woodley 2001).

This work reports on the biotransformation of (-)- α -pinene to (-)- α -pinene oxide, (-)-*trans*-verbenol and (-)-myrtenol with an enantiomeric excess of >92% by a recombinant *E. coli* BL21 (DE3) strain overexpressing a quintuple variant (V26T R47F A74G F87V L188K) of the catalytically self-sufficient cytosolic P450 monooxygenase CYP102A1 (P450_{BM-3} QM) from *Bacillus megaterium* (Fig. 1).

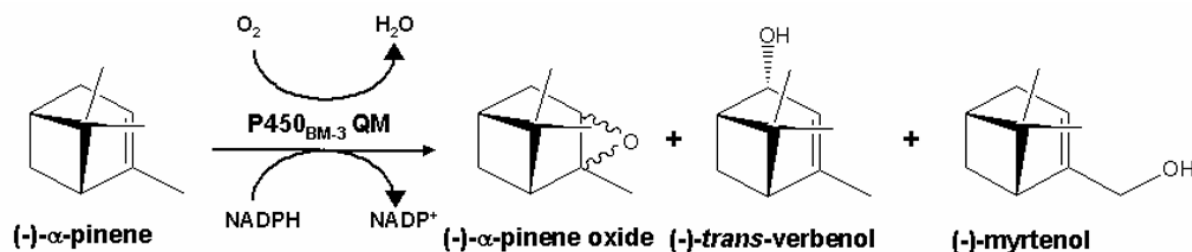


Fig. 1: Biotransformation of α -pinene catalyzed by P450_{BM-3} (V26T R47F A74G F87V L188K) (P450_{BM-3} QM).

Molecular biological improvement of the *E. coli* whole-cell biocatalyst

An accessory intracellular cofactor regeneration system supports *E. coli*'s intracellular NADPH regeneration pathways and may therefore be of advantage for substrate conversion (Mouri et al. 2006). Thus, by cloning and expression of two additional heterologous genes into *E. coli* BL21 (DE3) already heterologously overexpressing P450_{BM-3} QM a novel whole-cell biocatalyst with improved intracellular cofactor regeneration simply driven by external glucose was constructed (Fig. 2).

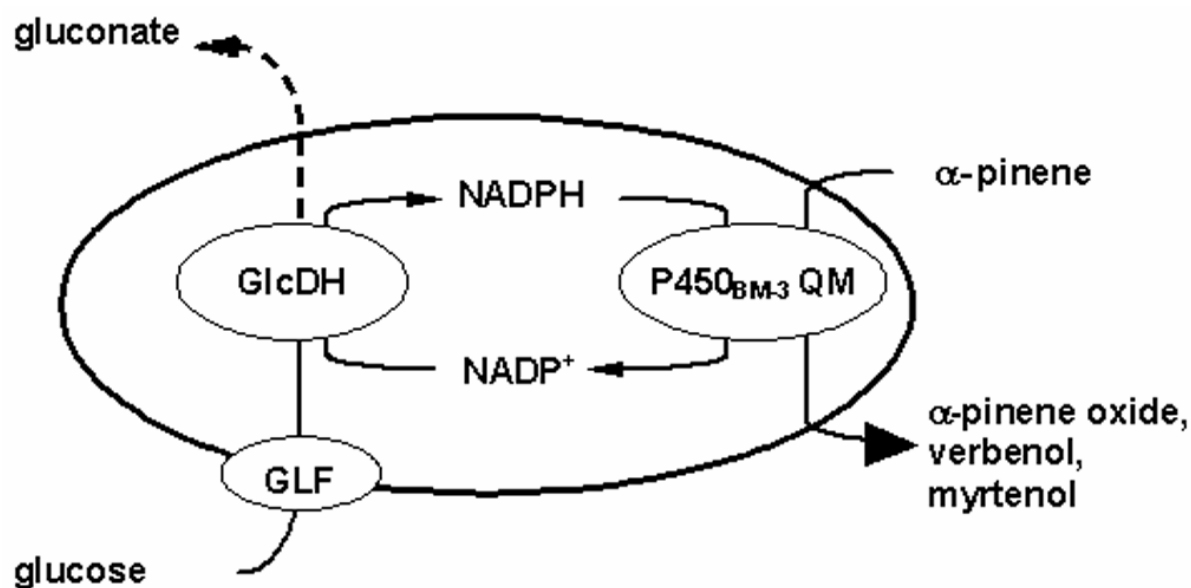


Fig. 2: *E. coli* whole-cell biocatalyst BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) with improved intracellular cofactor regeneration driven by external glucose.

The recombinant biocatalyst utilizes the activity of facilitator-mediated diffusion of glucose via a glucose facilitator (GLF) from *Zymomonas mobilis* which does not require metabolic energy in the form of proton potential or phosphoenolpyruvate (Weisser et al. 1995). Subsequently unphosphorylated glucose in the cytoplasm is oxidized by glucose dehydrogenase (GlcDH) from *Bacillus megaterium* to gluconolactone which spontaneously hydrolyzes to gluconate. Thereby NADPH is stoichiometrically regenerated from NADP⁺ which is used by the quintuple variant of CY102A1 (P450_{BM-3} QM) for α -pinene oxyfunctionalization. The respective whole-cell biocatalyst was named BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF).

In order to quantify the impact of the recombinant intracellular cofactor regeneration system on the *in vivo* biotransformation performance data of the whole-cell biocatalyst with heterologous cofactor regeneration, BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF), and that without, BL21 (P450_{BM-3} QM), were compared. BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) and BL21 (P450_{BM-3} QM) showed comparable intracellular P450_{BM-3} QM expression titers after recombinant protein expression in Erlenmeyer flasks. Product formation during whole-cell biotransformation is given as cell dry weight-specific α -pinene oxide concentration $Y_{P/X}$ during the initial 1.5 hours (Fig. 3).

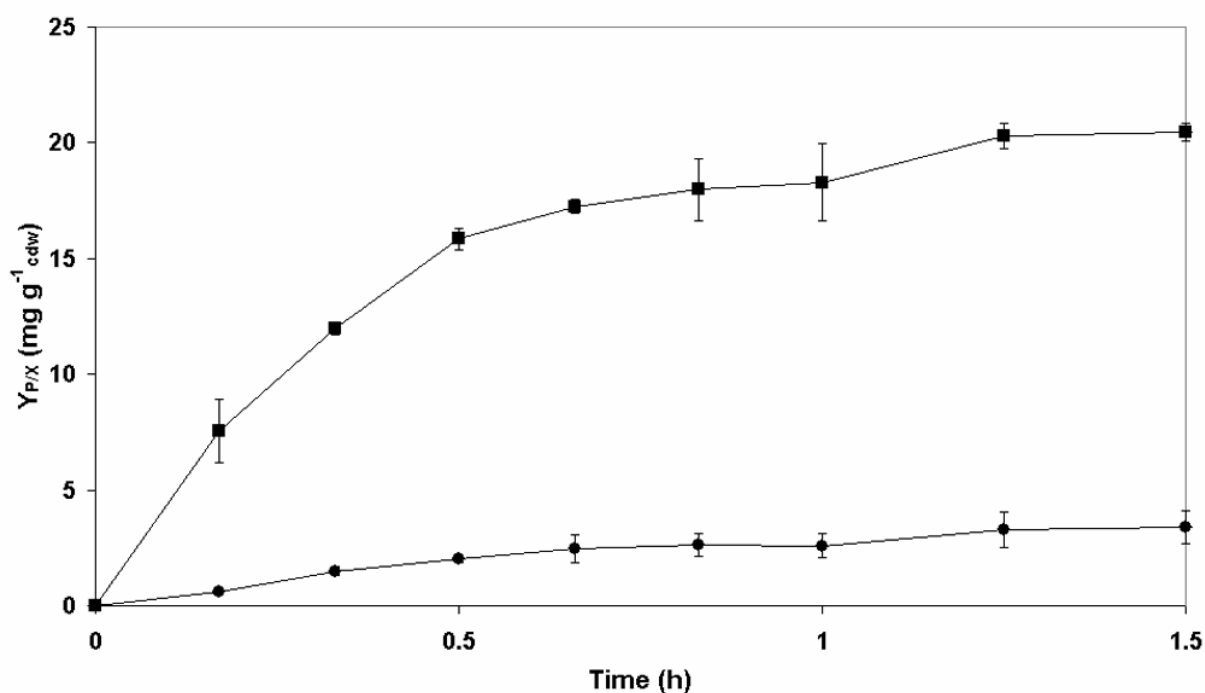


Fig. 3: Time course of α -pinene conversion to α -pinene oxide with BL21 (P450_{BM-3} QM) (●) and BL21 (P450_{BM-3}/GlcDH/GLF) (■) in Erlenmeyer flasks. The volume ratio of the aqueous phase to the α -pinene phase was 3:2. Mean values of duplicate experiments are given.

BL21 (P450_{BM-3} QM) produced 3 ± 0.7 mg of the main product α -pinene oxide g⁻¹ cell dry weight in 1.5 hours. In the same time frame BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) accumulated 20 ± 0.4 mg α -pinene oxide g⁻¹ cell dry weight corresponding to an approximately 6-fold increase in specific product yield $Y_{P/X}$. The accumulation of the other products of α -pinene oxidation by P450_{BM-3} QM, verbenol and myrtenol, showed comparable characteristics, i.e. a several-fold increase of $Y_{P/X}$ when BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) was used.

The improved biooxidation performance of BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) can be taken as a clear proof that *E. coli*'s endogenous NADPH regeneration was a limiting factor during P450_{BM-3} QM-catalyzed pinene oxidation. In further experiments it was shown that α -pinene was oxyfunctionalized by BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) without glucose addition in the aqueous phase, although at low level. This result indicates that endogenous NADPH was used for the reaction leading to product concentrations comparable to those accumulated by BL21 (P450_{BM-3} QM). Addition of glucose brought about an approximately 7-fold increase in cell dry weight specific α -pinene oxide concentration with a simultaneous decrease in glucose concentration in the aqueous phase. These results indicate that exogenous glucose was transported through the membrane of *E. coli* BL21 cells and was intracellularly available to GlcDH for oxidation and NADPH regeneration. Examination of whole-cell biotransformations with BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH), a whole-cell biocatalyst that does not express GLF,

demonstrated the importance of the incorporation of a glucose uptake system because glucose addition did not lead to enhanced product accumulation as it was the case with BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF).

In the first 30 minutes of whole-cell biotransformation with BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF), product formation occurred at almost constant rate, followed by a rate decrease until after 1.5 hours no further product formation could be monitored (Fig. 3). Samples of the biomass were taken at the end of biotransformation and analysis of cell-free extracts did not give any absorbance at 450 nm in CO-spectrum analysis and no P450_{BM-3} QM activity in an activity assay which suggests an inactivation of the biocatalyst during biotransformation of α -pinene in the aqueous-organic two-phase system. This inactivation most probably resulted from molecular and phase toxicity effects (León et al. 1998; Vermuë et al. 1993) caused by the precursor α -pinene which has a $\log P_{\text{Oct}}$ value of 4.5 (logarithm of the ratio of equilibrium concentrations of an organic compound in a two-phase system composed of n-octanol and water) and which was present far above its saturation concentration forming a separate organic phase. Thus, under the given conditions α -pinene can be expected to be incorporated at high concentration into the cell membrane thereby destroying physiologically essential transmembrane gradients of the whole-cell biocatalyst (Sikkema et al. 1994; Sikkema et al. 1995). As counteractive measures against these toxic effects a more biocompatible organic phase ($\log P_{\text{Oct}} > 5$) as organic carrier solvent acting as both precursor reservoir and *in situ* product extractant was introduced.

Procedural improvement of the two-phase bioprocess in bioreactor environment

After a series of experiments diisononyl phthalate (DINP; $\log P_{\text{Oct}} = 9.4$) was chosen as organic carrier solvent for biotransformation in bioreactors as it featured the absolute condition of biocompatibility and desirable properties such as low emulsion-forming tendency, chemical, thermal and biological stability, favourable properties for product recovery and low price.

Results presented in this work suggested that several factors assisted product formation while others limited product accumulation in aqueous-organic two-phase bioreactors. The high $\log P_{\text{Oct}}$ value of the organic carrier solvent for the substrate α -pinene DINP positively influenced the outcome of the aqueous-organic two-phase bioprocess. The carrier solvent DINP obviously masked toxic effects mediated by α -pinene in the two-phase bioreactor. Use of pure α -pinene ($\log P_{\text{Oct}} = 4.5$) in two-phase bioreactors led to loss of product formation as well as glucose and oxygen consumption by the whole-cell biocatalyst. In contrast, the ability to maintain a cofactor dependent enzyme reaction over more than 4 hours, the metabolization of glucose and the consumption of oxygen during the biotransformation process and after cessation of product formation indicated a successfully prolonged metabolic and biocatalytic activity of *E. coli* cultures by using aqueous-organic two-phase systems with DINP as organic carrier solvent.

The volumetric content of the substrate α -pinene in the organic phase was also a parameter critical for product formation. Two mechanisms of substrate uptake by the whole-cell biocatalyst are possible. α -Pinene, featuring an aqueous solubility of 4.6 mg l^{-1} , transfers across the two-phase interface and dissolves in the aqueous phase where it is assimilated and oxidized by the whole-cell biocatalyst. The other way of gaining access to the substrate is direct contact of the whole-cell biocatalyst to the interfacial area and the substrate dissolved within by direct attachment to the immiscible solvent phase (Deziel et al. 1999; Goswami und Singh 1991; MacLeod und Daugulis 2005; Munoz et al. 2008). The two aforementioned mechanisms may happen consecutively or simultaneously. Generally, these substrate transfer mechanisms are difficult to distinguish experimentally because an increase in interfacial area will increase surface for cell contact as well as diffusional mass-transfer rate (Westgate et al. 1995). An α -pinene / DINP ratio of 30:70 (v/v_{Org}) with an aqueous-organic phase ratio of 3:2 turned out to be the optimal medium composition for maximal total product concentration related to aqueous phase volume (c_{Aq}). Oxygen and glucose consumption, as shown by the *E. coli* whole-cell biocatalyst during and after the biotransformation, indicated that DINP contents of over 50% (v/v_{Org}) made survival of *E. coli* cells in presence of otherwise toxic α -pinene possible allowing for α -pinene oxidation in the first place. Due to gradual decrease of the $\log P_{\text{Oct}}$ value by increasing amounts of α -pinene in the organic phase, no biotransformation could be monitored in agitated bioreactor systems when the α -pinene content in the organic phase exceeded 50% (v/v_{Org}). Previously, products of α -pinene biotransformation were found when a neat α -pinene phase was used as organic phase in two-phase Erlenmeyer flask experiments. This effect may be ascribed to enhanced stress which the cells are exposed to in a two-phase bioreactor. As a result of a higher energy input in a stirred bioreactor associated with an improved phase mixing and an enhanced mass transfer of toxic α -pinene from the organic to the aqueous phase as well as an increased interfacial area (Bar 1988; Hocknull und Lilly 1987) *E. coli* faces elevated molecular toxicity mediated by the accumulation of α -pinene in its cell membranes. Another indication for biostatic effects mediated by α -pinene and DINP was the fact that a cessation of cell growth was observed from the time point when the organic phase (α -pinene / DINP ratio of 30:70 (v/v_{Org})) was added to the culture. Obviously, direct interfacial contact of whole-cell biocatalysts to the organic phase containing DINP, α -pinene and biotransformation products, of which the latter additionally competitively inhibit P450_{BM-3} QM activity, negatively influenced biocatalytic activity, cell integrity and vitality resulting in total cessation of product formation after 4-5 hours (cf. Fig. 4).

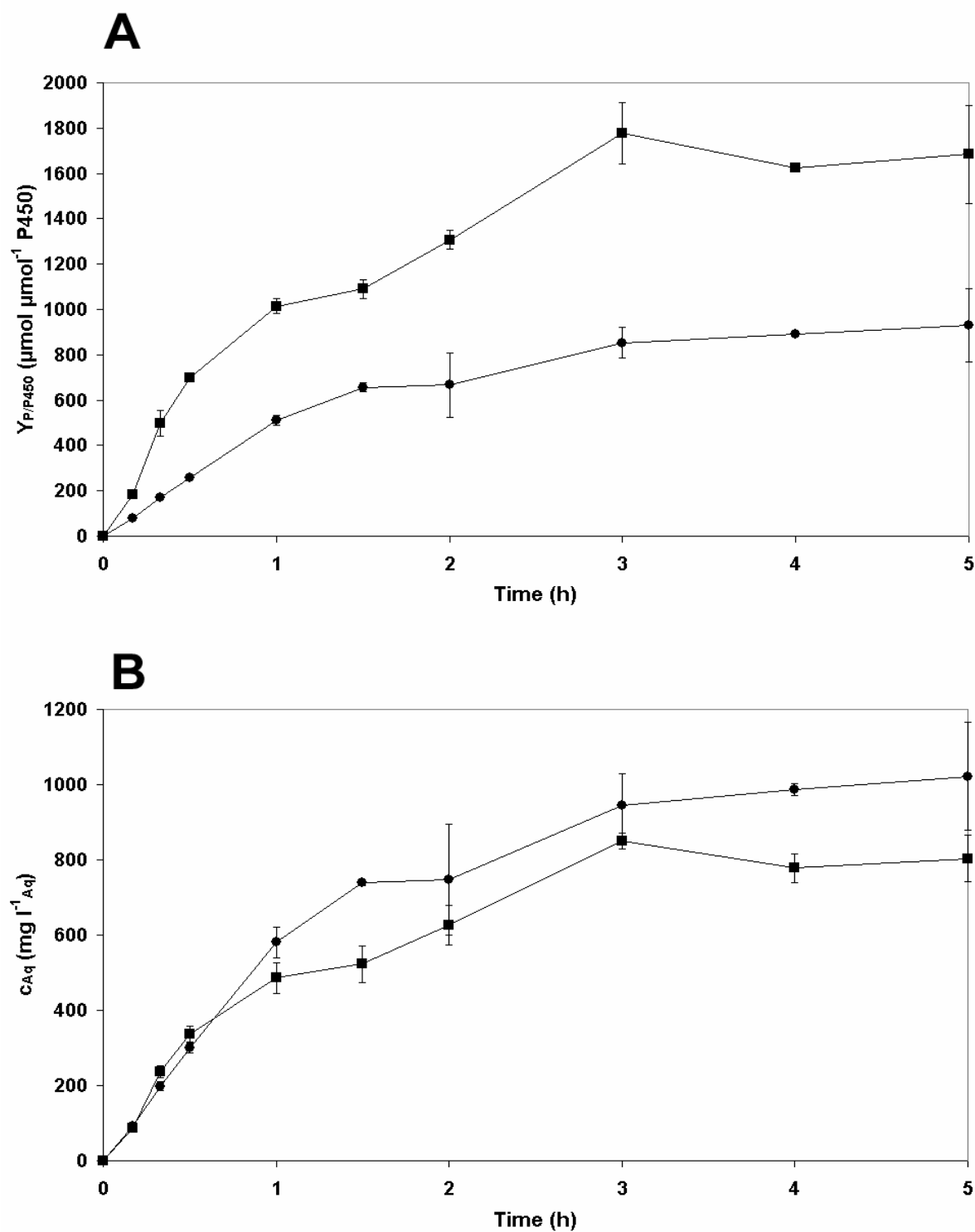


Fig. 4: Total product formation of α -pinene biotransformation with BL21 (P450_{BM-3} QM) (●) and BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) (■) in an aqueous-organic two-phase bioreactor. A: P450 specific total product yield $Y_{P/P450}$ ($\mu\text{mol } \mu\text{mol}^{-1}_{P450}$). B: Total product concentration related to aqueous phase volume c_{Aq} (mg l^{-1}_{Aq}). The organic phase consisted of 70% (v/v) DINP and 30% (v/v) α -pinene. The volume ratio of the aqueous phase to the organic phase was 3:2 at a total volume of 250 ml. Mean values of duplicate experiments and measurements are given.

Normalized to the P450 concentration in the cells, BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) showed a superior specific α -pinene oxidation yield ($Y_{P/P450}$) especially in the initial phase of the biotransformation (Fig. 4a). On average, BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) showed a 2-fold higher $Y_{P/P450}$ over 5 hours of biotransformation indicating that the recombinant cofactor regeneration system allowed for a more effective use of intracellular P450_{BM-3} QM for α -pinene oxidation. After 5 hours BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) reached a $Y_{P/P450}$ of $1680 \pm 220 \mu\text{mol} \mu\text{mol}^{-1}_{P450}$ compared to $930 \pm 160 \mu\text{mol} \mu\text{mol}^{-1}_{P450}$ accumulated by BL21 (P450_{BM-3} QM). The combination of optimized process conditions and recombinant cofactor regeneration in biocatalyst BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) resulted in promising yields of $39 \pm 1.3 \text{ mg}$ oxidized products per gram of cell dry weight in 1 hour and $64 \pm 8.3 \text{ mg g}^{-1}$ cell dry weight after a biotransformation time of 5 hours. Relating to the aqueous volume this corresponds to $490 \pm 41 \text{ mg l}^{-1}_{\text{Aq}}$ after 1 hour and $800 \pm 61 \text{ mg l}^{-1}_{\text{Aq}}$ of oxidized products after 5 hours, respectively (Fig. 4b). Due to lower expression levels of P450_{BM-3} QM in BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF), the total product concentration was lower than that produced by BL21 (P450_{BM-3} QM) which accumulated $96 \pm 15 \text{ mg g}^{-1}$ cell dry weight and $1020 \pm 144 \text{ mg l}^{-1}_{\text{Aq}}$ of oxidized products after 5 hours respectively. Despite lower P450_{BM-3} QM expression levels, BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) was on par with BL21 (P450_{BM-3} QM) in the initial phase of the biotransformation (Fig. 4b). The positive effect of a recombinant intracellular cofactor regeneration system during α -pinene biotransformations in bioreactors was less pronounced than that observed in Erlenmeyer flask experiments. The stable bioprocess conditions such as constant pH, increased oxygen availability and continuous C- and N-source feed, as maintained by a controlled bioreactor system, obviously supported *E. coli*'s intrinsic cofactor regeneration by native metabolic reactions. This effect potentially lowers the performance gap between BL21 (P450_{BM-3} QM) and BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) by reducing the impact of BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF)'s improved NADPH regeneration to a certain extent. This may explain why the impact of the recombinant cofactor regeneration system was not as profound as in Erlenmeyer flask experiments where BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) featured a six fold higher α -pinene oxide yield. However, BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) achieved a more efficient use of P450_{BM-3} QM in a controlled bioreactor environment than BL21 (P450_{BM-3} QM), especially in the initial phase of α -pinene oxidation, illustrated by a 100% increase in P450 specific product yield $Y_{P/P450}$ (cf. Fig. 4a).

Mixing intensity influences the size of the interfacial area and thereby the mass transfer and accessibility of the substrate. The cell dry weight concentration together with the size of the interfacial area decide about the contact time of a single whole-cell biocatalyst with the potentially harmful organic phase and thus its inactivation and product formation period. By adjusting system parameters such as mixing intensity, whole-cell biocatalyst concentration, organic phase composition and phase ratio accordingly, a compromise between maximal interfacial surface resulting in optimal substrate availability and product transfer to the

organic phase and the loss of biological activity due to toxic effects has to be found. In doing so accepting lower initial product formation rates may pay off through a prolonged product formation period of the whole-cell biocatalyst.

Microbial conversion of pinenes has been investigated since the early 1960s (Shukla und Bhattacharyya 1968; Trudgill 1994). Due to many diverse degradation pathways there are many interesting products resulting from oxyfunctionalization of pinenes. However, bioconversion yields have usually been in the milligrams per litre range and thus rather low compared to other terpene biooxidations, possibly due to the more complex bicyclic structure of the pinenes (Schrader 2007). One noteworthy exception was an α -pinene biotransformation with *Hormonema* sp. leading to 0.3 g l⁻¹ verbenone and 0.4 g l⁻¹ verbenol after 96 hours (van Dyk et al. 1998). In this context, total product concentrations of over 1 g l_{Aq}⁻¹ after only 4 hours of biotransformation as presented in this work mark a very promising step forward towards a future application of recombinant microorganisms for the oxidation of α -pinene.

Einleitung

1 Cytochrom P450-Monooxygenasen

Cytochrom P450-Monooxygenasen (E.C. 1.14.-.-) sind Häm-Enzyme aus der Enzymklasse der Oxidoreduktasen mit Schlüsselfunktion im Metabolismus exogener und endogener Verbindungen. Sie kommen praktisch ubiquitär in fast allen Lebensformen, vom Archaeobakterium bis hin zum Menschen, vor. Eine Ausnahme bildet z.B. das Darmbakterium *Escherichia coli* (Schuler und Sligar 2006). Häm-Proteine zeigen üblicherweise ein Absorptionsband, das sogenannte Soret-Band, bei 380-420 nm. Die Verschiebung auf 450 nm bei Cytochrom P450-Monooxygenasen rührt von der direkten Bindung des Cysteinat-Schwefels als fünfter Ligand des Porphyrinsystems zum Eisenatom her. Über dieses Cysteinat ist das Häm-System als prosthetische Gruppe an die P450-Monooxygenase gebunden (Abb. 1).

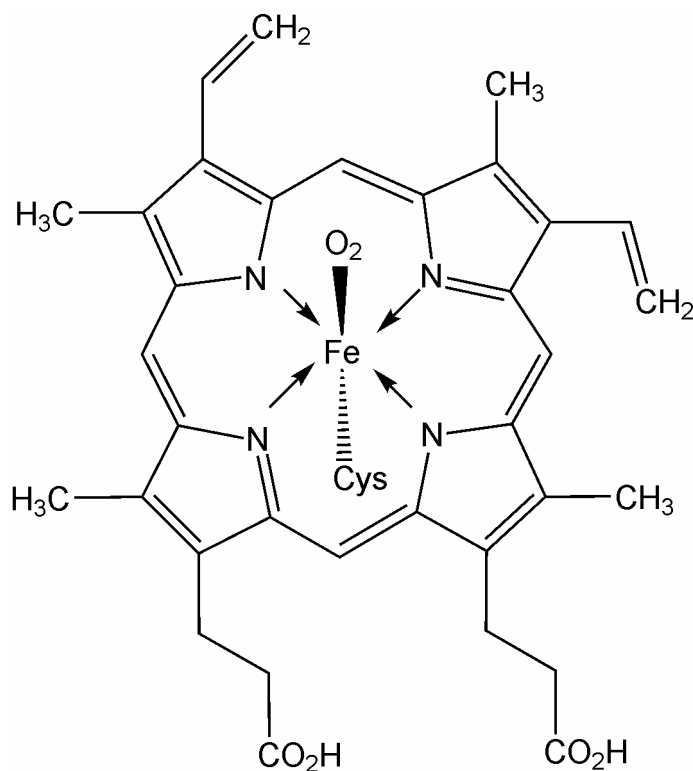


Abb. 1: Fe-Protoporphyrin IX (Häm b). Das Eisenatom ist im Porphyrin-Komplex koordiniert und über ein Cysteinat als prosthetische Gruppe an die P450-Monooxygenase gebunden. Modifiziert nach Walsh (2001).

Das reduzierte Häm-System kann mit Kohlenmonoxid einen Komplex bilden, der im UV/Vis-Spektrum bei 450 nm ein charakteristisches Absorptionsmaximum aufweist (Omura und Sato 1964). Cytochrom steht für Häm-Protein, P steht für Pigment, also Farbmittel und 450 bezeichnet das oben erwähnte Absorptionsmaximum. Die Terminologie von Cytochrom

P450-Monooxygenasen beruht also, im Gegensatz zu anderen Enzymklassen, nicht auf der Enzymfunktion, sondern ist ursprünglich auf die spektralen Eigenschaften des Häm-Systems zurückzuführen.

Der Namenszusatz Monooxygenase ist Hinweis auf die katalysierte Reaktion: P450-Monooxygenasen katalysieren die Einführung eines einzelnen Sauerstoffatoms aus molekularem Sauerstoff in ein Substrat. Die aliphatische Hydroxylierung nicht-aktivierter C-Atome und die Epoxidierung von C=C-Doppelbindungen sind die am weitesten verbreitete katalysierte Reaktion. Aber auch die Oxidation von Heteroatomen und Dealkylierungsreaktionen, Hydroxylierung aromatischer C-Atome, Mehrfachoxidationen innerhalb eines Substratmoleküls, sowie Reduktionen wurden bereits beschrieben (Cryle et al. 2003; Guengerich 2001). P450-Monooxygenasen katalysieren mehr als 60 verschiedene chemische Reaktionstypen (Estabrook 1996). Diese große Zahl an unterschiedlichen Reaktionstypen und akzeptierten Substratmolekülen lässt sich durch die Flexibilität der so genannten Substraterkennungsregionen erklären (Gotoh 1992). Diese Eigenschaft macht P450-Monooxygenasen zu den vielseitigsten bekannten biologischen Katalysatoren (Hannemann et al. 2007).

Die biologische Funktion von P450-Monooxygenasen ist ebenso essentiell wie vielseitig. Sie sind zentrale Bestandteile verschiedener Stoffwechselwege zur Biosynthese von Steroiden, Hormonen, Fettsäuren, fettlöslichen Vitaminen, strukturellen Zellbestandteilen und Antibiotika. Sie sind im Fettsäuremetabolismus zu finden, sind an Abbaureaktionen von Xenobiotika beteiligt und verleihen Mikroorganismen die Fähigkeit verschiedenste Kohlenwasserstoffe als Energiequelle zu verwenden.

1.1 Klassifizierung von P450-Monooxygenasen

P450-Monooxygenasen gehören zur Klasse der externen Monooxygenasen, welche die für die Oxidationsreaktion benötigten Elektronen von einer externen Quelle beziehen. Sie repräsentieren eine der größten und ältesten Gensuperfamilien. Über 8000 verschiedene P450-Monooxygenasen aus Menschen, Pflanzen, Tieren, Bakterien, Protisten und Pilzen, eingeteilt in 884 P450-Familien, sind zurzeit bekannt (<http://drnelson.utmem.edu/P450.statsfile.html>). Eine Klassifizierung dieser Vielfalt wurde nach Vorschlägen eines Nomenklaturkomitees durchgeführt (Nelson et al. 1996). Allgemein werden P450-Monooxygenasen basierend auf Homologien ihrer Aminosäuresequenz verschiedenen Familien zugeteilt. Dabei wird jeder P450-Monooxygenase der Stammpräfix CYP (für Cytochrom P450) vorgestellt, gefolgt von einer arabischen Ziffer zur Spezifizierung der Familie. Zuordnung zu einer Familie erfolgt bei mindestens 40% Sequenzhomologie. Ein Buchstabe bezeichnet die Unterfamilie, in die P450-Monooxygenasen mit mindestens 55% Sequenzhomologie eingeordnet werden. Eine weitere Zahl hinter dem Buchstaben bezeichnet das individuelle Gen innerhalb der Unterfamilie chronologisch nach der Reihenfolge der Entdeckung des Enzyms bzw. seiner Beschreibung in der Literatur.

Bezug nehmend auf ihre unterschiedlichen Mechanismen der reduktiven Aktivierung molekularen Sauerstoffs und der beteiligten Redoxpartner unterteilt man P450-Monooxygenasen in unterschiedliche Klassen. Nach der Einordnung von Hannemann et al. (2007) werden zehn Klassen unterschieden.

Enzyme der Klasse 1, zu der die meisten bakteriellen und eukaryotischen mitochondriellen P450-Monooxygenasen gehören, transportieren Elektronen von NAD(P)H über eine FAD-enthaltende Reduktase und ein Eisen-Schwefel-Redoxin (Ferredoxin) zur P450-Monooxygenase. Eine FAD/FMN-enthaltende Reduktase wird bei P450-Monooxygenasen der Klasse 2, zu der die meisten eukaryotischen P450-Monooxygenasen gehören, als Elektronentransportsystem verwendet. P450-Monooxygenasen der Klasse 3, deren bekanntester Vertreter P450cin aus *Citrobacter braakii* ist, sind bezüglich der Elektronentransportkette denen der Klasse 1 sehr ähnlich. Die Übertragung von Elektronen von einer FAD-enthaltenden Reduktase auf die P450-Monooxygenase übernimmt jedoch hier ein Flavodoxin und nicht ein Eisen-Schwefel-Redoxin. CYP119 aus *Sulfolobus solfataricus* ist eine der wenigen bisher beschriebenen extrem temperatur- und druckbeständigen P450-Monooxygenasen der Klasse 4. P450-Monooxygenasen dieser Klasse erhalten Reduktionsäquivalente über eine 2-Oxosäure-Ferredoxinoxidoreduktase und Ferredoxin. Bisher ist nur ein Mitglied der P450-Monooxygenasen der Klasse 5 bekannt, bei der der Elektronentransport über zwei getrennte Proteinkomponenten erfolgt: eine noch nicht nachgewiesene NAD(P)H-abhängige Reduktase und ein P450-Monooxygenase-Ferredoxin-Fusionsprotein. Ein ähnliches Fusionsprotein liegt bei P450-Monooxygenasen der Klasse 6 vor. Ein P450-Monooxygenase-Flavodoxin-Fusionsprotein erhält Elektronen von einer noch nicht nachgewiesenen NAD(P)H-abhängigen Flavoprotein-Reduktase. Klasse 7 P450-Monooxygenasen weisen eine C-terminal fusionierte Phthalatdioxygenase Reduktase-Domäne bestehend aus einer FMN-bindenden Domäne, einer NADH-bindenden Domäne und einer Ferredoxindomäne auf. P450-Monooxygenasen der Klasse 8 sind „katalytisch unabhängig“, da sie mit einem Diflavin-Reduktasepartner, der Cytochrom P450-Reduktase, fusioniert sind. Zu dieser Klasse gehört die in dieser Arbeit verwendete P450-Monooxygenase aus *Bacillus megaterium* CYP102A1 (P450_{BM-3}). Klasse 9 beinhaltet momentan lediglich eine P450-Monooxygenase, CYP55 (P450_{nor}), die unabhängig von anderen Elektronentransferproteinen NADH als Elektronendonator verwenden kann. Klasse 10 Enzyme sind autark und benötigen keine Elektronendonatoren, da sie peroxygenierte Substrate umsetzen, die bereits Sauerstoff enthalten.

Tab. 1: Verschiedene Klassen von P450-Monooxygenasen eingeteilt nach der Topologie der in der Elektronentransportkette beteiligten Proteinkomponenten. Modifiziert nach Hannemann et al. (2007). Abkürzungen der Proteinkomponenten: Fdx, (Eisen-Schwefel-Cluster); FdR, Ferredoxin-Reduktase (FAD); CPR, Cytochrom P450 Reduktase (FAD, FMN); Fldx, Flavodoxin (FMN); OFOR, 2-Oxosäure:Ferredoxinoxidoreduktase (Thiamin Pyrophosphat, [4Fe-4S] Cluster); PFOR, Phthalatoxygenase Reduktase (FMN, [2Fe-2S] Cluster). A: Fdx mit Eisen-Schwefel-Cluster des [2Fe-2S], [3Fe-4S], [4Fe-4S], [3Fe-4S]/ [4Fe-4S] Typs.

Klasse	Ursprung	Elektronentransportkette	Lokalisierung
1	Bakteriell	NAD(P)H ► [FdR] ► [Fdx] ^a ► [P450]	Zytosolisch gelöst
	Mitochondriell	NADPH ► [FdR] ► [Fdx] ► [P450]	P450: innere Mitochondrienmembran FdR: membranassoziiert Fdx: mitochondrielle Matrix, löslich
2	Bakteriell	NADH ► [CPR] ► [P450]	Zytosolisch gelöst
	Microsomal A	NADPH ► [CPR] ► [P450]	Membrangebunden, ER
	Microsomal B	NADPH ► [CPR] ► [cytb5] ► [P450]	Membrangebunden, ER
	Microsomal C	NADH ► [cytb5Red] ► [cytb5] ► [P450]	Membrangebunden, ER
3	Bakteriell	NAD(P)H ► [FdR] ► [Fldx] ► [P450]	Zytosolisch gelöst
4	Bakteriell	Pyruvat, CoA ► [OFOR] ► [Fdx] ► [P450]	Zytosolisch gelöst
5	Bakteriell	NADH ► [FdR] ► [Fdx-P450]	Zytosolisch gelöst
6	Bakteriell	NADH ► [FdR] ► [Fldx-P450]	Zytosolisch gelöst
7	Bakteriell	NADH ► [PFOR-P450]	Zytosolisch gelöst
8	Bakteriell, Pilze	NADPH ► [CPR-P450]	Zytosolisch gelöst
9	Nur NADH abhängig, Pilze	NADH ► [P450]	Zytosolisch gelöst
10	Unabhängig, Pflanzen, Säugetiere	[P450]	Membrangebunden, ER

1.2 Reaktionsmechanismus

Durch eine intra- bzw. intermolekulare Elektronentransferreaktion werden Elektronen durch die in Tab. 1 aufgelisteten Transfermechanismen von Reduktionsäquivalenten (meist NADH oder NADPH) auf die Häm-Domäne und von dort auf molekularen Sauerstoff übertragen. Ein Sauerstoffatom wird dabei unter Reduktion auf das Substrat übertragen, das andere Sauerstoffatom wird unter Bildung von Wasser protoniert (Abb. 2). Diese Reaktion kann unspezifisch erfolgen, wie z.B. bei der Oxidation von Xenobiotika oder regio- und stereoselektiv, wie z.B. bei der Hydroxylierung von Fettsäuren ablaufen.

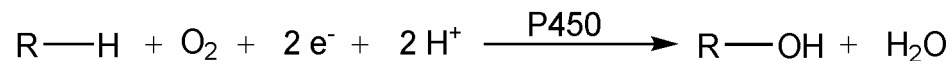


Abb. 2: Allgemeine Hydroxylierungsreaktion katalysiert von P450-Monooxygenasen in Gegenwart von molekularem Sauerstoff. R = Molekülrest.

Der Reaktionszyklus von P450-Monooxygenasen umfasst 8 Schritte (Abb. 3). Ausgehend von der oxidierten Form des Enzyms (1) bindet zunächst, unter Ersetzung eines Wassermoleküls, ein Substratmolekül an die Eisen(III)-Form des Enzyms (2). Durch Übertragung eines Elektrons wird die Eisen(III)-Form zur Eisen(II)-Form reduziert (3). Diese reduzierte Form kann nun molekularen Sauerstoff binden und geht in einen Eisen(II)-Dioxykomplex über (4). In einem zweiten Reduktionsschritt wird ein weiteres Elektron übertragen und ein Eisen(II)-Peroxyanion gebildet (5). Anschließende Übertragung eines Protons führt zu einem Eisenhydroperoxo-Übergangszustand (6), der durch Spaltung der Sauerstoffbindung und der Abspaltung eines Wassermoleküls in ein postuliertes Eisen(IV)-Oxoporphyrinradikalkation übergeht (7), welches das Substrat oxidiert (8). Dieser Übergangszustand (7), auch „Compound I“ genannt, ist für die Mehrzahl von P450-Monooxygenasen katalysierten Oxidationsreaktionen verantwortlich. Einige Reaktionen werden vermutlich auch durch das Eisen(II)-Peroxyanion (5) katalysiert. Nach Oxidation des Substrats erfolgt dessen Freisetzung.

Es gibt zwei zentrale Abbruchreaktionen dieses katalytischen Zyklus: Eine Autoxidation des Eisen(II)-Dioxykomplex (4) unter Bildung eines Hyperoxidanions (O_2^-) und Entkopplung der Oxidase unter Oxidation des Eisen-Oxo-Übergangszustands (7) zu Wasser.

In einem Nebenweg, der von vielen, jedoch nicht allen, P450-Monooxygenasen durchgeführt werden kann, dem so genannten „Peroxid-Shunt“, kann Wasserstoffperoxid gleichzeitig als Elektronen- und Sauerstoffquelle verwendet werden. Diese „Peroxygenase“-Aktivität ermöglicht eine zellfreie P450-Katalyse ohne elektronenübertragende Proteine oder die Notwendigkeit zur NAD(P)H-Regenerierung.

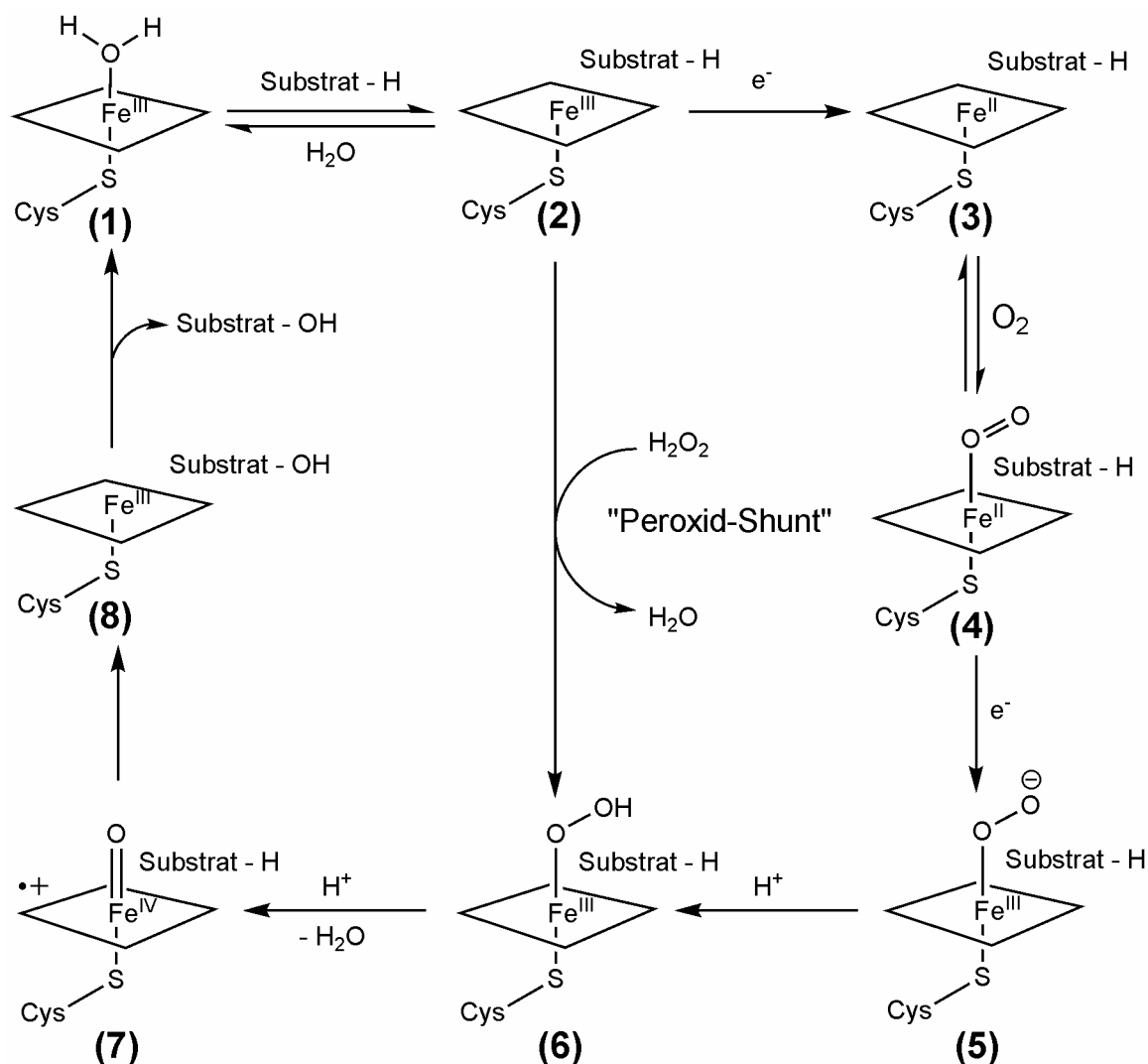


Abb. 3: Reaktionszyklus von P450-Monooxygenasen. Modifiziert nach Cryle et al. (2003).

1.3 Biotechnologische Bedeutung von P450-Monooxygenasen

Biokatalyse wird immer mehr zu einem wichtigen Werkzeug zur Lösung einer der zentralen Herausforderungen der synthetischen organischen Chemie: die regio- und stereoselektive Einführung von Atomen in komplexe Moleküle (Straathof et al. 2002). Prinzipiell sind dabei verschiedene Herangehensweisen denkbar: die regio- und stereospezifische Veränderung eines Vorläufermoleküls zum gewünschten Zielprodukt mit Hilfe einer oder mehrerer Enzymaktivitäten (Biotransformation), eine *de novo* Synthese des Zielprodukts ausgehend von einem strukturell nicht verwandtem Ausgangsmolekül durch mehrere Enzymaktivitäten im Sinne eines Stoffwechselwegs oder eine Kombination beider Ansätze. Prinzipiell ist auch eine Kombination dieser biotechnologischen Methoden mit klassischen Herangehensweisen der organischen synthetischen Chemie möglich. Zum Beispiel wird durch biotechnologische regio- und enantioselektive Einbringung eines Heteroatoms Zugang zu einem bestimmten

Atom innerhalb eines komplexen Moleküls erlangt. Durch weitere organisch-chemische Syntheseschritte können nun gezielt weitere Veränderungen an diesem Atom vorgenommen werden, um das gewünschte Zielprodukt zu synthetisieren.

Ihre Fähigkeit regio- und stereoselektiv molekularen Sauerstoffs in allylische Positionen oder nicht-aktivierte C-H-Bindungen unter milden Reaktionsbedingungen einzuführen macht P450-Monooxygenasen zu einem der organischen Synthese überlegenen Biokatalysator (Bell et al. 2003b; Urlacher et al. 2004). Bisher sind jedoch nur wenige biotechnologische Prozesse mit diesen Enzymen beschrieben. Die geringe Stabilität unter Prozessbedingungen von P450-Monooxygenasen, ihr Bedarf an Cofaktormolekülen (NAD(P)H) und ihre Abhängigkeit von elektronenübertragenden Proteinen stellen große Herausforderungen an die Etablierung industrieller Prozesse dar. Deshalb wird zur Zeit der Einsatz von in Bioreaktoren einfach zu vermehrenden Ganzzellbiokatalysatorsystemen, die durch ihre zellinternen Stoffwechselwege regenerierte Cofaktormoleküle zur Verfügung stellen und durch Proteinbiosynthese inaktive Enzyme ersetzen können, favorisiert.

Die enormen Möglichkeiten für den biotechnologischen Einsatz von P450-Monooxygenasen liegen in drei Faktoren begründet: die katalytische Vielseitigkeit von P450-Monooxygenasen, die Vielfältigkeit an akzeptierten Substratmolekülen und die große Anzahl bisher entdeckter P450-Monooxygenasen. Konkret werden P450-Monooxygenasen großes Potential bei der Herstellung von Arzneimitteln, Feinchemikalien und Antibiotika attestiert (Guengerich 2002; Urlacher und Eiben 2006). Dieses Potential wurde schon früh erkannt und in Form von Fermentationsprozessen mit Ganzzellbiokatalysatoren erfolgreich im industriellen Maßstab eingesetzt. Die Enzymaktivitäten, welche die entsprechende Reaktion katalysieren, wurden dabei oft nicht identifiziert oder veröffentlicht. Frühe Beispiele beschäftigen sich vor allem mit der Modifizierung von Steroiden. So wurde 1952 die Herstellung von Cortison durch die von *Rhizopus*-Kulturen katalysierte 11 α -Hydroxylierung von Progesteron bei Upjohn beschrieben (Peterson et al. 1952). Schering verfügt über ein Patent zur Hydroxylierung von Steroiden mit Hilfe des Pilzes *Curvularia lunata* (Petzoldt et al. 1981). Den vergleichbaren Ansatz einer P450-katalysierten Oxidation eines Vorläufermoleküls innerhalb eines Ganzzellbiotransformationsprozesses wird von der Firma Sankyo bei der Produktion des Cholesterolsyntheseenzymhemmers Pravastatin verfolgt (Serizawa und Matsuoka 1991).

Eine Alternative zur Biotransformation eines Vorläufermoleküls ist die *de novo* Synthese eines Wirkstoffes innerhalb eines gentechnisch veränderten Organismus. Beispielsweise wurden 13 veränderte Gene (davon 4 P450-Monooxygenasen) in ein *Saccharomyces cerevisiae*-Ganzzellsystem kloniert, welches nun in der Lage ist, ausgehend von Glucose bzw. Ethanol Hydrocortison zu synthetisieren (Szczebara et al. 2003). Dieses Ganzzellsystem soll bei der Firma Sanofi-Aventis Einzug in den Produktionsbereich halten. Gleich fünf P450-Monooxygenasen sind in dem Biosyntheseweg des hochwirksamen Antitumorwirkstoffes Taxol aus der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) beteiligt. Ihre rekombinante Expression in einem mikrobiellen Wirtsorganismus bietet eine kostengünstige Alternative zur Gewinnung

aus Pflanzenmaterial oder pflanzlichen Zellkulturen und den damit verbundenen hohen Produktionskosten und Wirkstoffpreisen (Dejong et al. 2006).

Die Synthese neuartiger Antibiotika ist ein weiteres wichtiges Einsatzgebiet für die biotechnologische Anwendung von P450-Monooxygenasen da diese Enzyme essentielle Bestandteile von verschiedenen Antibiotikabiosynthesewegen sind und gleichzeitig Antibiotika im Wettrennen mit sich ausbildenden mikrobiellen Resistenzen kontinuierlich ersetzt und ergänzt werden müssen.

Eine weitere biotechnologisch interessante Anwendung von P450-Monooxygenasen ergibt sich aus einer ihrer biologischen Funktionen: dem Abbau von Xenobiotika. Aufgrund ihrer Fähigkeit Fremdstoffe zu oxidieren und damit zugänglich für einen oxidativen Abbau zu machen, eignen sich P450-Monooxygenasen potentiell für den Abbau von Schadstoffkontaminationen der Umwelt (Guengerich 1995).

1.4 CYP102A1 (P450_{BM-3})

Die P450-Familie CYP102A umfasst zurzeit hauptsächlich bakterielle P450-Monooxygenasen des Genus *Bacillus*. Bakterielle P450-Monooxygenasen zeigen üblicherweise höhere katalytische Aktivität als eukaryotische P450-Monooxygenasen. Sie lassen sich in hohen Konzentrationen heterolog exprimieren, liegen zytosolisch gelöst vor und bieten daher gegenüber pflanzlichen oder tierischen P450-Monooxygenasen, welche oft membranassoziiert sind, den Vorteil einer einfacheren Zugänglichkeit und besseren Handhabbarkeit.

CYP102A1 ist eine nicht-membrangebundene wasserlösliche P450-Monooxygenase mit einem Molekulargewicht von 120 kDa. Die fettsäurehydroxylierende Aktivität von CYP102A1 wurde erstmals von Miura und Fulco (1974) in Zelllysaten von *Bacillus megaterium* beschrieben. CYP102A1, als dritte beschriebene P450-Monooxygenase aus *Bacillus megaterium* auch als P450_{BM-3} abgekürzt, ist, im Gegensatz zu anderen P450-Monooxygenasen, ein natürliches Fusionsprotein (Klasse 8) und enthält eine aminoterminal Häm-Domäne und eine carboxyterminale Flavin-Reduktase (mit FAD und FMN als prosthetische Gruppen) kombiniert in einem Polypeptid. P450_{BM-3} wird aufgrund dieser Einheit von P450-Monooxygenase und Reduktase als „katalytisch unabhängig“ bezeichnet. Der Wildtyp von P450_{BM-3} katalysiert die ω -1-, ω -2- und ω -3- Hydroxylierung langkettiger gesättigter Fettsäuren der Kettenlänge C12-C22 und wurde bereits in den 80er Jahren des vergangenen Jahrtausends isoliert und rekombinant in *Escherichia coli* exprimiert (Narhi et al. 1988). Die bei der subterminalen Hydroxylierung langkettiger Fettsäuren beobachteten Reaktionsraten von $>2500 \text{ min}^{-1}$ sind unerreicht in der Familie der P450-Monooxygenasen (Narhi und Fulco 1986), deren andere Mitglieder tendenziell eher geringere Reaktionsraten zeigen. Die Struktur von P450_{BM-3} und seiner Häm-Domäne wurden sowohl durch Röntgenstrukturanalyse als auch durch NMR-Spektroskopie aufgeklärt (Li und Poulos 1997; Ravichandran et al. 1993; Sevrioukova et al. 1999).

Aufgrund ihrer hohen Aktivität, Stabilität, katalytischen Unabhängigkeit, heterologen Expressierbarkeit und Löslichkeit ist P450_{BM-3} besonders geeignet für gerichtete Evolutionsexperimente. Eine Vielzahl von verschiedenen Varianten von P450_{BM-3} wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen generiert und charakterisiert. Dabei wurde die ursprüngliche, fettsäurehydroxylierende Aktivität hin zu sich strukturell von Fettsäuren sehr unterscheidenden Substraten verändert. Die Dreifachvariante A74G F87V L188Q kann so unterschiedliche Substrate wie Oktan, Naphthalin, Cumol, Pyridin, Quinolin und Indol hydroxylieren (Appel et al. 2001; Li et al. 2000) und R47L Y51F F87V hydroxyliert β -Ionon regioselektiv (Urlacher et al. 2006). Es konnte gezeigt werden, dass P450_{BM-3} durch unterschiedliche Mutagenesetechniken an mehreren Aminosäurepositionen in eine hoch effiziente Alkan- und Alkenhydroxylase überführt werden kann (Farinas et al. 2004; Glieder et al. 2002; Peters et al. 2003). Lentz (2001) beschrieb die P450_{BM-3} Fünffachvariante V26T R47F A74G F87V L188K, die in der Lage war, Derivate des Surrogatsubstrats 12-*p*-Nitrophenoxydecansäure (12-*p*NCA) mit verringerter Kettenlänge (10-*p*NCA, 8-*p*NCA) zu hydroxylieren. Wie innerhalb der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, kann diese Fünffachvariante von P450_{BM-3} auch das Monoterpen α -Pinen oxidieren.

Ein Beispiel für eine bereits etablierte industrielle Anwendung von CYP102 bei der Synthese von Arzneimitteln ist die Herstellung von Epoxyeicosatriensäure aus Arachidonat und von Leukotoxin B aus Linolensäure mit dem Wildtyp bzw. einer Variante von CYP102 aus *Bacillus megaterium* (Falck et al. 2001). Epoxyeicosatriensäuren induzieren Mitogenese in Epithelzellen, stimulieren die Freisetzung zellulärer Mediatoren, modulieren Kinasen und regulieren die Gentranskription, während Leukotoxine antibakterielle und antifungale Wirkungen haben.

2 Terpenkohlenwasserstoffe

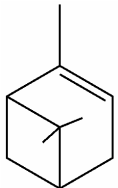
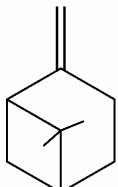
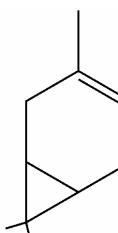
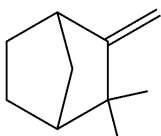
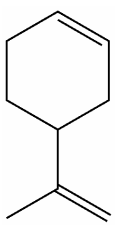
Terpenkohlenwasserstoffe und ihre oxofunktionalisierten Derivate (Terpenoide) sind ubiquitäre sekundäre Pflanzenstoffe, die vor allem in ätherischen Pflanzenölen vorkommen und denen ein einheitliches Bauprinzip, ausgehend von C5 (Isopren) Einheiten, zugrunde liegt. Es handelt sich um eine stark heterogene Stoffklasse, die vielfältigste in der Natur (Hill 1993), mit derzeit über 40.000 verschiedenen bekannten Molekülen. Die allgemeine Summenformel von Terpenkohlenwasserstoffen lautet $(C_5H_8)_n$. In der Natur kommen überwiegend Kohlenwasserstoff-, Alkohol-, Glycosid-, Ether-, Aldehyd-, Keton-, Carbonsäure- und Ester-Terpene vor, aber auch Vertreter weiterer Stoffgruppen sind unter den Terpenen zu finden. Terpene und Terpenoide sind in ihrer biologischen und pharmakologischen Wirkungen sehr interessant, wenn auch bisher nur bruchteilhaft erforscht. Man findet unter ihnen viele interessante Aktivitäten wie antimikrobielle, antikanzerogene und vor allem olfaktorische und gustatorische Eigenschaften. Daher finden zurzeit Terpenoide vor allem in der Duft- und Aromastoffindustrie Anwendung. Da aber immer mehr pharmazeutische

Wirkungen von Terpenoiden erforscht werden, ist auch in diesem Bereich mit einer wachsenden Zahl von interessanten Anwendungen zu rechnen (Schrader und Berger 2001).

2.1 Pinene

Pinene (α - und β -Pinen) gehören zu den bicyklischen Monoterpenen. Die wichtigste natürliche Quelle für diese mengenmäßig dominierenden Monoterpene (C10) ist Kiefernrohharz (Produktion ca. 1,5 Mio. t p.a.). Durch Wasserdampfdestillation werden jährlich weltweit ca. 160.000 t α -Pinen und 26.000 t β -Pinen gewonnen, wovon ca. 25% als billiges Ausgangsmaterial für die chemische Synthese von Duft- und Aromastoffen, der überwiegende Rest als preiswerte Lösemittel in die Lack- und Farbenindustrie geht. Bedingt durch die mit ihrer guten Verfügbarkeit einhergehenden niedrigen Preisen, waren Pinene schon seit den 1960er Jahren Forschungsschwerpunkt für Experimente zur mikrobiellen Konversion (Shukla und Bhattacharyya 1968; Trudgill 1994). Tab. 2 veranschaulicht Strukturformeln und prozentuale Anteile der wesentlichen Monoterpene in verschiedenen Balsamterpentinölen, die durch Normal- oder Vakuumdestillation aus Terpentin gewonnen werden. Holzterpentinöl (aus totem Holz durch Wasserdampfdestillation gewonnen) enthält im Allgemeinen ca. 80% α -Pinen, 5-15% Camphen, 2% β -Pinen, 1% Limonen. Auch 3-Caren und Cadinen wurden beschrieben. Sulfatterpentinöl (Nebenprodukt der Celluloseherstellung) enthält je nach Holzart 60-77% α -Pinen, 2-20% β -Pinen, 2-41% 3-Caren, 2-8% Limonen, 1-4% Camphen (Martinetz und Hartwig 1998).

Tab. 2: Strukturformeln und prozentuale Anteile der wesentlichen Monoterpene in verschiedenen Balsamterpentinölen.

		USA	Deutschland	Russland
α -Pinen		65,6	39	59,8
β -Pinen		28,1	17	4,1
3-Caren		-	30	24,1
Camphen		1,7	k.A.	1,4
Limonen		3,2	k.A.	3,7

2.2 Biotechnologische Bedeutung von Terpenkohlenwasserstoffen

Die Substitution umweltbelastender chemischer Synthesen durch saubere Technologien gewinnt vor dem Hintergrund wachsender Umweltauflagen zunehmend Bedeutung auch für die ökonomische Bewertung industrieller Produktionsverfahren. Ein Teil der prinzipiell durch Biokatalyse erschließbaren terpenoiden Zielsubstanzen wird gegenwärtig durch Chemosynthese, ein Teil auch durch energie- und zeitaufwendige Rektifikation aus etherischen Ölen höherer Pflanzen gewonnen. Da typischerweise der Gehalt an ätherischen Ölen in Pflanzen

gering ist, lohnt sich die kommerzielle Extraktion entsprechender Substanzen nur in seltenen Fällen. Daher werden viele Aromastoffe chemisch synthetisiert, wodurch sie als „naturidentisch“ gekennzeichnet werden müssen und damit einen geringeren Marktpreis erzielen als die strukturidentischen, klassischerweise durch extraktive Aufarbeitung gewonnenen, „natürlichen“ Aromastoffe.

Mit den Monoterpenen steht ein großer Pool chiraler Naturstoffe zur Verfügung, deren Potential als Leitstrukturen für die Synthese hochwertiger bioaktiver Wertstoffe bisher nur in geringem Umfang industriell genutzt wird. Ausgehend vom nachwachsenden Rohstoff Holz eröffnen sich neue, umweltschonende Wege zur Gewinnung von Wertstoffen für verschiedene Industriezweige. Die biotechnologische Oxyfunktionalisierung hat gegenüber unselektiven chemischen Oxidationsmitteln (z.B. Cr^{+6} oder Mn^{+7}) den großen Vorteil der Regio- und Enantioselektivität, besseren Umweltverträglichkeit, Sicherheit und der Möglichkeit das Endprodukt als „natürlicher Aromastoff“ deklarieren zu dürfen.

Die prinzipielle Eignung der Biokatalyse zur selektiven Oxyfunktionalisierung von Terpenen ist mit einer Vielzahl mikrobieller Systeme belegt worden (für eine Zusammenfassung siehe Schrader und Berger (2001) und Schrader (2007)). Mögliche Produkte der mikrobiellen Oxyfunktionalisierung von α -Pinen sind in Abb. 4 dargestellt.

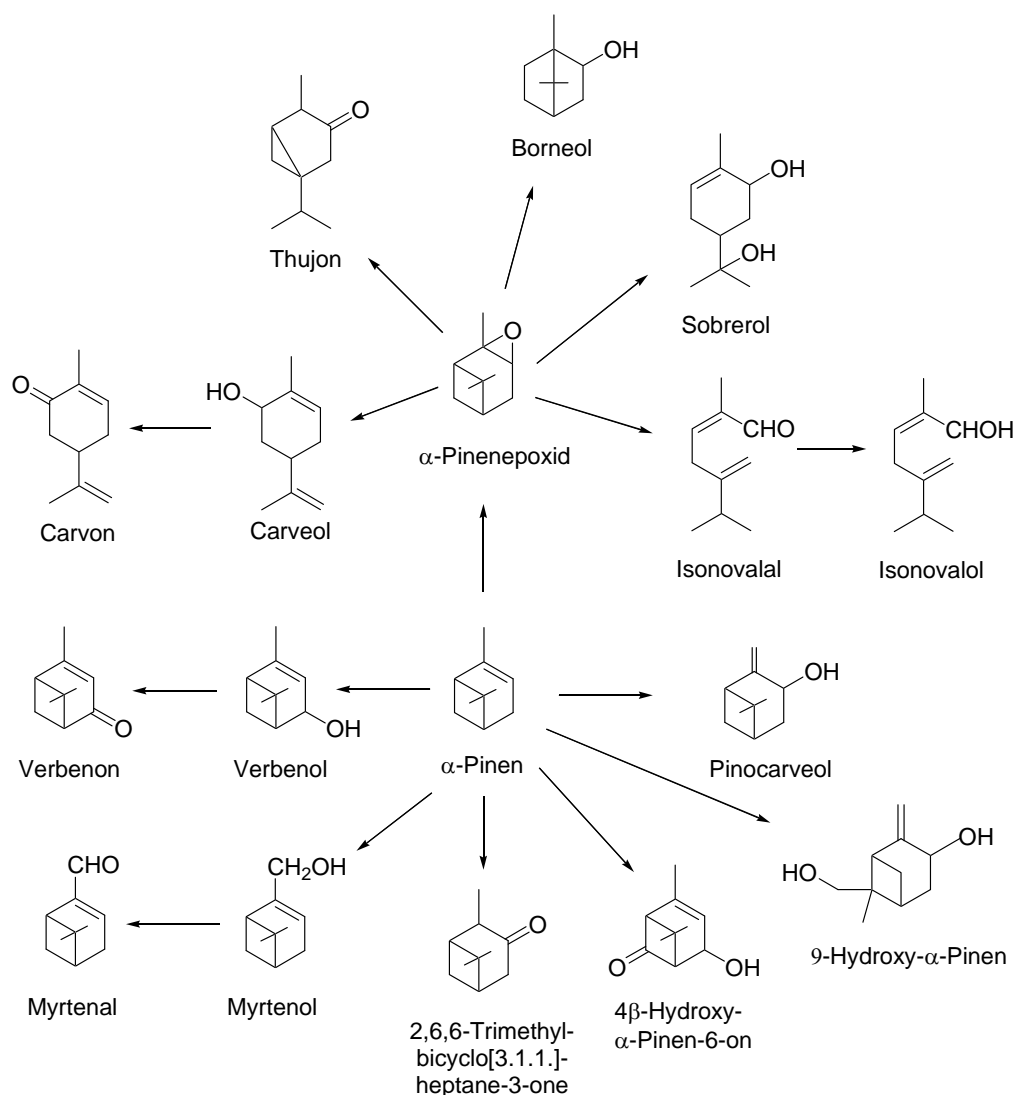


Abb. 4: Mikrobielle Oxyfunktionalisierungen des α -Pinen (Berger et al. 1999; Busmann und Berger 1994; Farooq et al. 2002; Trudgill 1994).

Alle in Abb. 4 dargestellten Produkte (bis auf die Dirole) besitzen charakteristische sensorische Eigenschaften und sind direkt oder in Form ihrer Derivate wichtige Aroma- und Riechstoffe (Bauer et al. 2001). So vermitteln die beiden Stereoisomere von Carvon die olfaktorischen Eindrücke von Kümmel bzw. Minze. Zusätzlich besitzen die meisten Monoterpene antimikrobielle Eigenschaften und können damit als natürliche Konservierungsmittel Verwendung finden (Griffin et al. 1999). Das bei akuter und chronischer Bronchitis und Sinusitis eingesetzte Gelomyrtol[®] ist eine Mischung der Monoterpene α -Pinen, Cineol und Limonen. Verbenol und Verbenon sind natürliche Insektenpheromone und besitzen hohes Anwendungspotential als umweltverträgliche Pestizide (Trudgill 1994). Verbenon dient auch als Synthesebaustein für Taxol (Krebsmedikament) und Taxolanaloge. Ausgehend vom Epoxid des α -Pinen (α -Pinenepoxid, α -Pinenoxid) sind einige, z.T. patentierte, enzymatische und nicht-enzymatische Prozesse zu interessanten Zielprodukten beschrieben. So hat Sobrerol Potential als Wirkstoff gegen chronische Rhinosinusitis (Bellussi

et al. 1990) und wird als natürliches, mukolytisches Therapeutikum (Exspectorans) verwendet. Aufgrund von Antitumor-Aktivitäten wird Carveol und Sobrerol sogar chemotherapeutische Bedeutung attestiert, wobei die Wirkung mit dem Hydroxylierungsgrad steigt (Loza-Tavera 1999). Carvon entfaltet eine neuropharmakologische Wirkung durch Inhibierung der Acetylcholinesterase (Miyazawa et al. 1997). Wegen ihrer zitrus- bis holzähnlichen organoleptischen Eigenschaften sind Novalaldehyde begehrte Parfümzusatzstoffe.

Die mikrobielle Biotransformation von Terpenen ist mit einigen technischen und biologischen Herausforderungen verbunden. Terpene sind im Allgemeinen schlecht wasserlöslich, leicht flüchtig und vermitteln antimikrobielle Effekte. Aufgrund der sehr unterschiedlichen Abbaustoffwechselwege führen Biotransformationen von Terpenen durch Bakterien, Hefen und Pilze oft zu einer Vielzahl von Nebenprodukten (Schrader 2007; Schrader und Berger 2001). Aufgrund dieser Probleme konnten bislang bei der Biotransformation von Pinenen nur sehr geringe Produktkonzentrationen von einigen Milligramm pro Liter erreicht werden. Die bislang bei weitem erfolgreichste mikrobielle Oxyfunktionalisierung von Pinen wurde mit der Hefe *Hormonema* sp. erreicht, wobei $0,3 \text{ g l}^{-1}$ Verbenon und $0,4 \text{ g l}^{-1}$ Verbenol nach 96 Stunden Biotransformation produziert wurden (van Dyk et al. 1998).

3 Biokatalyse in flüssigen Zweiphasensystemen

Biokatalytische Prozesse bieten gegenüber traditionellen organo-chemischen Prozessen mehrere Vorteile. Ausgehend von erneuerbaren natürlichen Rohstoffen können Reaktionen unter milden und umweltfreundlichen Bedingungen mit einem Minimum an Nebenreaktionen und -produkten durchgeführt werden. Hochkomplexe Moleküle können in biokatalytischen Prozessen in nur wenigen Reaktionsschritten synthetisiert bzw. regio- und enantioselektiv verändert werden, was mit konventionellen organo-chemischen Prozessen aufgrund vieler aufwändiger Syntheseschritte und Schutzgruppenchemie oft wegen des zu hohen prozesstechnischen Aufwands nicht wirtschaftlich durchgeführt werden kann. In den vergangenen 30 Jahren fanden biokatalytische Prozesse vor allem in der pharmazeutischen Industrie und Feinchemikalienherstellung bei der Synthese hochwertiger Produkte Anwendung. Im Jahre 2001 wurden weltweit über 100 biokatalytische Prozesse kommerziell betrieben (Lye und Woodley 2001).

Einer der Hauptunterschiede zwischen chemischen und biologischen Katalysatoren ist, dass biologische Katalysatoren sich in der Natur für den Einsatz unter physiologischen Bedingungen entwickelt haben, während chemische Katalysatoren vom Menschen für den Einsatz unter nicht-physiologischen Bedingungen konzipiert wurden. Die sich aus der petrochemischen Herkunft vieler chemischer Prozesse und Substrate ergebende Notwendigkeit, Reaktionen unter für den Biokatalysator ungeeigneten Bedingungen ablaufen lassen zu müssen, limitiert die Produktivität vieler Bioprozesse. Auf diese Herausforderung kann mit Anpassung des Biokatalysators an die gegebenen Prozessbedingungen (z.B. hohe Temperaturen, Druck,

Gegenwart organischer Lösungsmittel...) durch molekularbiologische Methoden oder durch prozesstechnische Maßnahmen zur Erhöhung der Biokatalysatorstabilität und -produktivität reagiert werden.

In vielen industriellen Biotransformationsprozessen werden zur Kostenersparnis ganze Zellen als Biokatalysatoren eingesetzt (Nikolova und Ward 1993). Die Verwendung ganzer Zellen erspart eine kostspielige und mit Aktivitätsverlust einhergehende Enzymextraktion und –aufreinigung. Durch die ständige Neubildung von Enzymen innerhalb des Zellmetabolismus behält der Ganzzellbiokatalysator seine Aktivität über einen längeren Zeitraum, was die volumetrische Produktivität und die Endproduktkonzentrationen positiv beeinflusst. Besonders wenn für die entsprechende enzymatische Reaktion Cofaktoren notwendig sind, bieten ganze Zellen, durch die Möglichkeit mit ihrem Metabolismus zellinterne kontinuierliche Cofaktorregenerierung zu betreiben, einen entscheidenden Vorteil. Diese Cofaktorregenerationsreaktionen können zusätzlich durch entsprechende molekularbiologische Beeinflussung des Metabolismus des Ganzzellbiokatalysators unterstützt werden. Dem Nachteil der unerwünschten Akkumulation von Nebenprodukten bei Einsatz eines Ganzzellbiokatalysators kann durch entsprechende Veränderung des Ganzzellbiokatalysators oder der Wahl einer günstigen Reaktionsumgebung, wie z.B. einem Zweiphasensystem, begegnet werden.

Generelles Ziel von Zweiphasenbioprozessen ist es eine Trennung zwischen Biokatalysator und Substrat bzw. den Produkten des Bioprozesses zu erreichen. Durch diese Kompartimentierung können inhibitorische (reversibler Verlust an Biokatalysatoraktivität) oder toxische Effekte (irreversibler Verlust an Biokatalysatoraktivität) vermittelt durch Substrat und/oder Produkt vermieden und gleichzeitig die Stabilität des Biokatalysators erhöht, Reaktionsgleichgewichte zu Gunsten der Synthese beeinflusst, Produktverlust durch unkontrollierte Weiterreaktion oder Abbau verhindert, schlecht wasserlösliche Substrate zugänglich gemacht und das Downstream-Processing und die Abwasseraufbereitung, einer der Hauptkostenfaktoren bei Biokatalysen, vereinfacht werden.

Eine der prozesstechnischen Maßnahmen zur Behebung inhibitorischer bzw. toxischer Effekte auf den Biokatalysator ist die *in situ* Produktabtrennung (ISPR), auch extraktive Fermentation, Biokonversion, Biotransformation oder Biokatalyse genannt. Diese Herangehensweise macht neue Prozesse möglich, die sonst nicht wirtschaftlich durchführbar wären. Da ISPR mit zusätzlichem prozesstechnischen Aufwand und Investitionen in Prozessequipment verbunden ist, wird sie zumeist bei Produkten mit hoher Wertschöpfung und geringem Produktionsvolumen eingesetzt (Bruce und Daugulis 1991; Freeman et al. 1993; Lye und Woodley 1999; Malinowski 2001).

Generell unterscheidet man bei der ISPR den direkten oder indirekten Kontakt des Biokatalysators zur Produktabtrennungsphase. Der Kontakt kann weiterhin intern im Bioreaktor selber oder in einem dem Bioreaktor angeschlossenen Kreislauf stattfinden (vgl. Abb. 5).

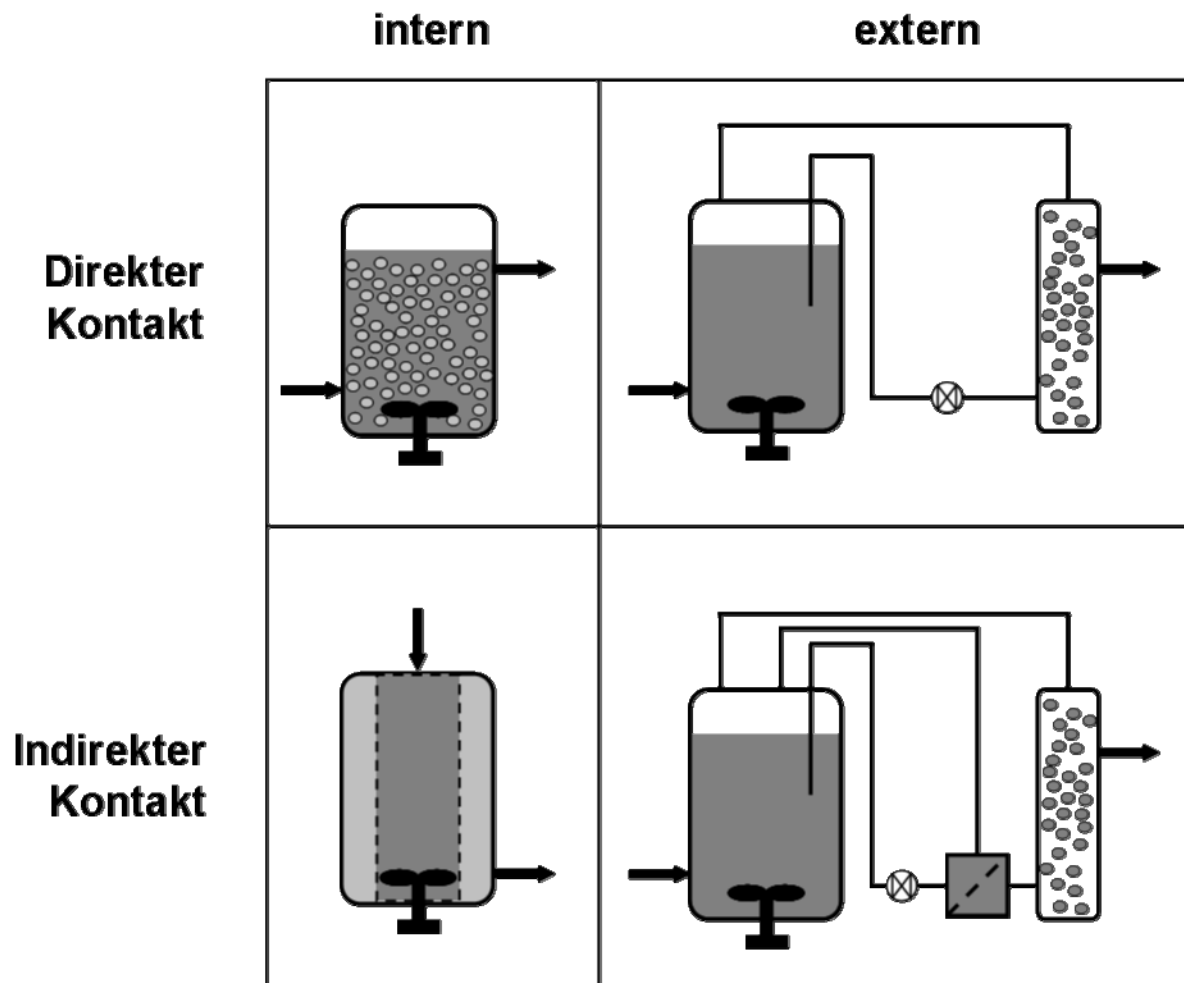


Abb. 5: Schemata von internen und externen ISPR-Methoden mit direktem und indirektem Kontakt des Biokatalysators zur Produktabtrennungsphase. Die den Biokatalysator enthaltende (zumeist wässrige) Phase ist dunkelgrau, die Produktabtrennungsphase hellgrau dargestellt. Gestrichelte Linien stellen für den Biokatalysator undurchlässige Abtrennvorrichtungen (z.B. Membranen) dar. Pfeile stellen Stoffflüsse von Substraten und Produkten dar. Modifiziert nach Woodley et al. (2008).

Die zu wählende ISPR-Methode richtet sich hauptsächlich nach physikochemischen Eigenschaften des abzutrennenden Moleküls wie Siedepunkt, Hydrophobizität, Molekulargewicht, Ladung und spezifischen Bindungseigenschaften. Diesen Eigenschaften können Abtrennungsmethoden wie Evaporation, Extraktion (durch organische Lösungsmittel, superkritische Flüssigkeiten), Permeation (Dialyse, Elektrodialyse, reverse Osmose, Nanofiltration), Immobilisierung (hydrophobe Adsorption, Ionenaustausch, Affinitätsadsorption) oder Präzipitation zugeordnet werden. Die Komplexität des Prozessaufbaus und -betriebs, und damit auch der Kosten, ist für externe ISPR-Methoden und indirekten Kontakt als höher anzusehen (Freeman et al. 1993; Stark und von Stockar 2003).

3.1 Wässrig-organische Zweiphasensysteme

Die molekulare Struktur, Größe oder Hydrophobizität von Substraten und Produkten in Zweiphasenbioprocessen haben oft wenige Gemeinsamkeiten mit dem natürlichen Substrat eines entsprechenden Enzyms. Deshalb werden in solchen Fällen oft niedrige Umsatzraten beobachtet. Im Falle nicht-natürlicher Substanzen, die schlecht wasserlöslich sind, kommen erschwerend zu diesem Phänomen noch geringe wässrige Substratkonzentrationen hinzu (Lye und Woodley 2001). Diesen Problemen kann wirksam durch Etablierung eines wässrig-organischen Zweiphasensystems begegnet werden. Tab. 3 fasst die Vor- und Nachteile von Biokatalyse in flüssigen Zweiphasensystemen zusammen.

Tab. 3: Potentielle Vor- und Nachteile von Biokatalyse in wässrig-organischen Zweiphasensystemen.

Modifiziert nach Lye und Woodley (2001).

Prozessabschnitt	Vor- und Nachteile
Reaktorbetrieb	<ul style="list-style-type: none"> + Lösung schwer wasserlöslicher Moleküle + Reduzierte Inhibition/Toxizität + hervorragender Kontakt Substrat/Katalysator – reduzierte Aktivität pro Volumeneinheit – Diffusionslimitierungen – Schädigung des Biokatalysators an flüssig-flüssig Phasengrenzfläche – Schädigung des Biokatalysators durch gelöste Moleküle der organischen Phase
Produktaufarbeitung	<ul style="list-style-type: none"> + Trennung von Reaktant, Edukt und Produkt + höhere Produktkonzentrationen – Emulsionsbildung

Der Mechanismus der Substrataufnahme aus der organischen Phase kann prinzipiell auf zwei Wegen erfolgen (Goswami und Singh 1991; Nakahara et al. 1977; Woodley et al. 1991) (Abb. 6). Beim ersten Weg gehen hydrophobe Substratmoleküle innerhalb ihrer begrenzten Wasserlöslichkeit in die wässrige Phase über, wo sie vom Ganzzellbiokatalysator umgesetzt werden. Um das thermodynamische Gleichgewicht aufrechtzuerhalten, lösen sich weitere Substratmoleküle in der wässrigen Phase. Ist die maximale Aktivität des Biokatalysators bei der maximalen Wasserlöslichkeit des Substrats nicht erreicht, so hängt die Produktbildungsrate von der Massentransferrate des Substrats aus der organischen in die wässrige Phase ab (B in Abb. 6). Abhängig von seiner Wasserlöslichkeit akkumuliert das Produkt in der wässrigen Phase oder geht in die organische Phase über.

Mikroorganismen können Substratmoleküle auf einem zweiten Weg durch direkten Kontakt an der Phasengrenzfläche zwischen organischer und wässriger Phase über ihre Membran aufnehmen (C in Abb. 6). Der genaue Mechanismus dieser Aufnahme ist dabei unklar, z.B. könnte die Substratkonzentration in der wässrigen Phase in der Nähe der Phasengrenzfläche höher sein und dadurch eine Aufnahme erleichtern. Auch eine Adhäsion der Zellen an die Phasengrenzfläche ist möglich. Die Zelladhäsion an der Grenzfläche erfolgt durch nichtspezifische hydrophobe Wechselwirkungen (Singer und Finnerty 1984) und ist abhängig vom Kulturmedium, Kultivierungsbedingungen und physiologischer Aktivität der Zellen (Rosenberg 1991).

Welcher der beiden Substrataufnahmemechanismen vorliegt ist schwer experimentell zu ermitteln, da sich mit der Zunahme der Phasengrenzfläche nicht nur die Fläche für Zellkontakt erhöht, sondern auch die Massentransferrate (Westgate et al. 1995). Auch besteht die Möglichkeit, dass die verschiedenen Aufnahmemechanismen in Kombination oder gleichzeitig in einem wässrig-organischen Zweiphasensystem vorliegen, abhängig von den Eigenschaften des verwendeten Mikroorganismus, Art der organischen Phase und Wachstumsbedingungen (Deziel et al. 1999). Während der Kultivierung in wässrig-organischen Zweiphasensystem nimmt die Konzentration oberflächenaktiver Substanzen zu. Diese werden entweder von den Mikroorganismen synthetisiert und ins Medium abgegeben oder entstehen durch Freisetzung aus lysierten Zellen (D in Abb. 6) (Desai und Banat 1997).

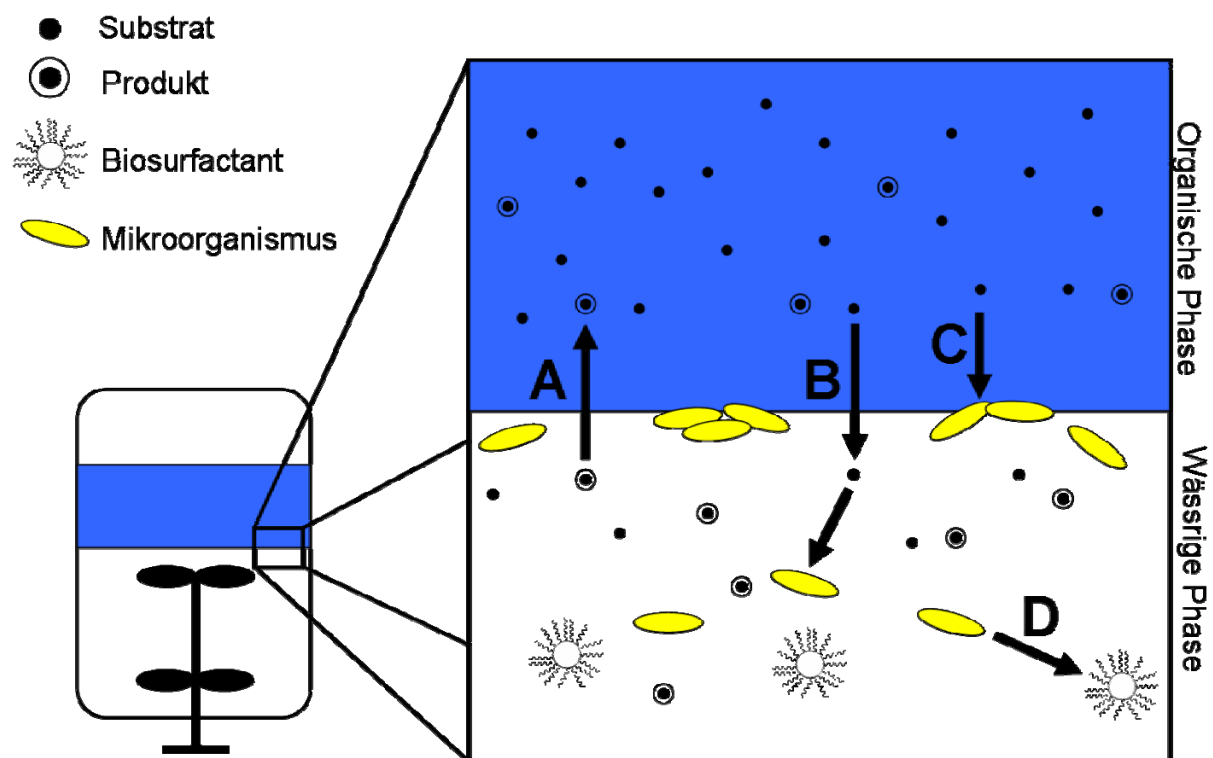


Abb. 6: Physikochemische und biologische Mechanismen in wässrig-organischen Zweiphasensystemen. (A) Stoffübergang und Lösung hydrophober und toxischer Produktmoleküle in die organische Phase. (B) Stoffübergang hydrophober Substratmoleküle in die wässrige Phase mit anschließender Aufnahme durch

die Mikroorganismen. (C) Substrataufnahme an der Phasengrenzfläche durch anhaftende Mikroorganismen. (D) Produktion oberflächenaktiver amphiphatischer Substanzen (Biotenside). Modifiziert nach Déziel (1999).

Bei diesen oberflächenaktiven Substanzen handelt es sich um in Mikroorganismen omnipräsente Moleküle wie Lipopolysaccharide und Proteine, deren amphiphatische Natur eine Verringerung der Oberflächenspannung bewirkt. Die Produktion oberflächenaktiver Substanzen kann sowohl förderlich als auch nachteilhaft für die Produktbildung und -aufreinigung innerhalb eines wässrig-organischen Zweiphasenprozesses sein. Die Verringerung der Oberflächenspannung durch Freisetzung dieser Moleküle kann zur erhöhten Tendenz von Emulsionsbildung führen, deren Auftreten die Phasentrennung nach Prozessende und damit die Produktaufreinigung, die oft den Hauptkostenfaktor bei biotechnologischen Prozessen darstellt, erschweren kann (Mathys et al. 1998b). Oberflächenaktive Moleküle sowie die Mikroorganismen selber können durch Blockierung der Phasengrenzfläche eine Verminderung der Massentransferrate von Molekülen zwischen den Phasen hervorrufen (Crabbe et al. 1986; Pursell et al. 2004). Andererseits können oberflächenaktive Substanzen die Dispergierung schlecht wasserlöslicher Substanzen erleichtern und stellen damit eine weitere Aufnahmemöglichkeit von hydrophoben Substraten dar (Deziel et al. 1999), so erleichtern zellwandständige oberflächenaktive Substanzen das Eindringen von Kohlenwasserstoffen in den periplasmatischen Raum (Desai und Banat 1997).

Der Schlüssel zur erfolgreichen Auslegung eines Zweiphasenbioreaktorsystems liegt in der Angleichung von Substrattransfer- bzw. Produktabtrennungsraten an die Reaktionsrate des Biokatalysators, um inhibitorische Substrat- oder Produktkonzentrationen zu vermeiden und gleichzeitig die vorhandene Biokatalysatoraktivität optimal auszunutzen (Lye und Woodley 2001). Biotransformationen in wässrig-organischen Zweiphasensystemen wurden bereits vielfach erfolgreich zur Produktausbeutesteigerung in Ganzzellbiokatalysen eingesetzt (Übersichten bei Léon (1998), Nikolova und Ward (1993), Stark und von Stockar (2003)), wovon einige schon die industrielle Prozessgrößenordnung erreicht haben (Lye und Woodley 2001). Allgemein gehören laut Lilly (1994) Zweiphasensysteme als Lösungsansatz für Biotransformationen von schlecht wasserlöslichen und potentiell toxischen Substraten, neben großtechnischer Enzymaufreinigung, Enzym- und Zellimmobilisierung und rekombinanter DNA-Technologie, zu den vier wichtigsten Fortschritten bei der Ersetzung klassischer chemischer Prozesse durch biokatalytische Systeme.

3.2 Toxizität organischer Lösungsmittel

Während einer Biotransformation in einem wässrig-organischen Zweiphasensystem mit direkter *in situ*-Produktabtrennung befindet sich der Ganzzellbiokatalysator in unmittelbarem Kontakt mit dem organischen Lösungsmittel. Organische Lösungsmittel wirken im Allgemeinen jedoch toxisch auf Mikroorganismen. Apolare Lösungsmittelmoleküle können

durch Wechselwirkungen mit der lipophilen Zellmembran deren essentielle Funktionen stören, membrangebundene Enzyme denaturieren, wichtige Transportmechanismen behindern oder inaktivieren und in hohen Konzentrationen zur Zellyse führen (Lilly et al. 1987). Diese Effekte werden als molekulare Toxizität bezeichnet. Negative Effekte, die durch die direkte Präsenz einer organischen Phase entstehen, wie z.B. Extraktion von Nährstoffen aus der wässrigen Phase, Blockade der Aufnahme von Nährstoffen oder Aufbrechen der Zellwand durch direkten Kontakt zwischen organischem Lösungsmittel und Zelle bezeichnet man als Phasentoxizität (Bar 1987; León et al. 1998).

Mikroorganismen haben verschiedene Arten von Abwehrmechanismen gegen den Kontakt mit organischen Lösungsmitteln entwickelt. Die meisten dieser Anpassungen betreffen die Eigenschaften der Zellmembran und ihrer Komponenten. *E. coli* kann die durch die Einlagerung von lipophilen Substanzen hervorgerufene Erhöhung der Zellmembranfluidität entgegenwirken, indem der Anteil gesättigter Fettsäuren in der Membran erhöht wird (Ingram 1977; Keweloh et al. 1990). Auch die Erhöhung der Acylgruppenkettenlänge von Fettsäuren und des Anteils von Proteinen in der Zellmembran kann die Toleranz gegen organische Lösungsmittel erhöhen (Heipieper et al. 1994). Diese Maßnahmen erfordern eine *de novo* Synthese von Zellmembranbestandteilen, können also nur von wachsenden Zellen durchgeführt werden. Einige *Pseudomonas*-Stämme und *Vibrio* sp. können die Konfiguration von ungesättigten Fettsäuren von *cis* nach *trans* auch postbiosynthetisch ändern (Heipieper und de Bont 1994). Außerdem verfügen *Pseudomonas*-Stämme über energieabhängige Exportsysteme für organische Lösungsmittelmoleküle aus der Zellmembran.

3.3 $\log P_{\text{Oct}}$ -Konzept

Es gab viele Versuche die Toxizität von verschiedenen organischen Lösungsmitteln mit ihren physikochemischen Eigenschaften in Verbindung zu bringen. Einer der praktikablen Ansätze wurde von Laane et al. (1985) entwickelt. Die Arbeitsgruppe korrelierte den Logarithmus des Verteilungskoeffizienten eines organischen Lösungsmittels in einem Zweiphasensystem aus Octanol und Wasser, auch Hansch-Parameter genannt, mit der Biokompatibilität des organischen Lösungsmittels. Dabei wurde die Annahme getroffen, dass ein Octanol-Wasser-System eine ausreichende Beschreibung von hydrophoben Interaktionen und Transportmechanismen liefern kann, die eine Substanz bei Einführung in ein biologisches System erfahren würde. Der $\log P_{\text{Oct}}$ -Wert ist proportional zur Konzentration des organischen Lösungsmittels in der Zellmembran, die wiederum proportional zur Toxizität des organischen Lösungsmittels ist (Bruce und Daugulis 1991). Als allgemeine Regel wurde abgeleitet, dass Substanzen mit einem $\log P_{\text{Oct}}$ kleiner als 2 zu polar und nicht als organische Lösungsmittel im Einsatz bei biokatalytischen Systemen geeignet sind. Bei $\log P_{\text{Oct}}$ -Werten zwischen 2 und 4 ist eine Vorhersage der Biokompatibilität schwer zu treffen, während organische Lösungsmittel mit einem $\log P_{\text{Oct}}$ -Wert von über 4 zumeist als biokompatibel anzusehen sind. Die Korrelation von $\log P_{\text{Oct}}$ -Wert und Biokompatibilität ist deshalb so hilfreich, weil der $\log P_{\text{Oct}}$ -Wert einer

Substanz, unabhängig von experimentellen Messungen, basierend auf ihrer Molekülstruktur vorhergesagt werden kann. Neben diesem Maß der Hydrophobizität eines organischen Lösungsmittels ist jedoch die Biokompatibilität immer auch von weiteren Faktoren abhängig: vom jeweiligen Mikroorganismus, wahrscheinlich aufgrund von Unterschieden in Zellwand-aufbau und –zusammensetzung (Laane et al. 1987a), vom Energieeintrag (Hocknull und Lilly 1987) und von der molekularen Struktur des organischen Lösungsmittels (León et al. 1998; Vermuë et al. 1993). So kann sich für den Einzelfall der $\log P_{\text{Oct}}$ -Wert, der die Grenze der Biokompatibilität bezeichnet, verschieben, was eine empirische Herangehensweise bei der Auswahl eines geeigneten organischen Lösungsmittels erforderlich macht.

3.4 Erwünschte Eigenschaften einer organischen Trägerphase

Durch Einsatz eines biokompatiblen organischen Lösungsmittels, in dem das hydrophobe Substrat α -Pinen gelöst wird, sollen dessen toxische Effekte maskiert und damit die Produktivität des wässrig-organischen Zweiphasenbioprozesses verbessert werden.

Die Auswahl einer geeigneten biokompatiblen organischen Trägerphase ist entscheidend für die Umsetzung eines wässrig-organischen Zweiphasenbioprozesses (Cruz et al. 2004; León et al. 1998). Bruce et al. (1991) formulierte einige absolut notwendige und wünschenswerte Eigenschaften einer organischen Trägerphase. Anhand dieser Eigenschaften, die direkten Einfluss auf die Wirtschaftlichkeit des Zweiphasenbioprozesses haben, kann nach einer passenden organischen Trägerphase gesucht werden.

- *Biokompatibilität.* Da die Trägerphase im direkten Kontakt mit dem Ganzzellbiokatalysator steht, ist Biokompatibilität eine absolut notwendige Eigenschaft. Eine biokompatible Trägerphase erhöht die Stabilität und die Standzeit des Ganzzellbiokatalysators und damit die Produktivität und Wirtschaftlichkeit des Bioprozesses. Verringerte Zellyse vereinfacht aufgrund des geringeren Anteils oberflächenaktiver Substanzen und der daraus folgenden geringeren Tendenz zur Bildung stabiler Emulsionen die spätere Phasentrennung (Schmid et al. 1998). Bei großtechnischen Bioprocessen entfallen 50 bis 70% der Gesamtproduktionskosten auf die Erreichung hoher Zelldichten (Daugulis et al. 1991). Daher reduzieren Maßnahmen zur Vermeidung von Zellschäden die Bioprocesskosten.
- *Geringe Wasserlöslichkeit* vermindert den Verlust an organischer Trägerphase nach Phasentrennung.
- *Geringe Tendenz zur Emulsionsbildung* vereinfacht die Phasentrennung nach Prozessende und erleichtert damit die Produktaufreinigung (Mathys et al. 1998b).
- *Chemische und thermische Stabilität* ermöglicht lange Prozesslaufzeiten (z.B. kontinuierlicher Prozess) und Recycling der organischen Trägerphase und trägt damit zur Kostensenkung bei. Verschiedene Produktaufreinigungsmethoden aus der organischen Trägerphase wie z.B. Destillation erfordern chemische und thermische Stabilität. Organische Trägerphasen mit hohem Siedepunkt erweisen sich als vorteilhaft bei der

destillativen Aufarbeitung von apolaren Biotransformationsprodukten (Mathys et al. 1998a). Neben dem Siedepunkt gibt es noch weitere Lösungsmiteleeigenschaften, die die Produktabtrennung beeinflussen wie Dichte, Viskosität und günstige Verteilungskoeffizienten für die Produkte der Biotransformation. Ein günstiger Verteilungskoeffizient der Produkte erlaubt den Einsatz möglichst geringer Mengen der organischen Trägerphase.

- *Biologische Stabilität.* Der Ganzzellbiokatalysator sollte die organische Trägerphase nicht als Substrat verwenden können um ihre Stabilität über die Prozessdauer zu gewährleisten. Abbau der organischen Trägerphase lenkt katalytische Aktivität des Ganzzellbiokatalysators von der erwünschten Biotransformation zur Generierung unerwünschter Nebenprodukte, die das Downstream Processing verkomplizieren könnten.
- *Ungefährlich.* Im Sinne der Prozesssicherheit (Explosionsgefahr) sollte die organische Trägerphase einen hohen Flammpunkt aufweisen. Wenn leicht entzündliche und flüchtige Substrate in einer hochsiedenden Trägerphase gelöst werden, können Explosionsrisiken minimiert werden (Schmid 1997).
- *Preiswert.* Die organische Trägerphase sollte preiswert und in großen Mengen verfügbar sein.

Aufgabenstellung und Zielsetzung

Mit der vorliegenden Arbeit sollte ein Konzept für ein Verfahren zur biokatalytischen P450-basierten regio- und stereoselektiven Oxyfunktionalisierung von hydrophoben und toxischen Monoterpenen zu wertvollen chiralen Produkten entwickelt werden. Durch die Kombination molekularbiologischer und prozesstechnischer Methoden sollte die Produktausbeute im Bioreaktor im Labormaßstab gesteigert werden. Die Biokatalyse bietet hierbei nicht nur eine ökologisch kompatiblere Verfahrensalternative, sondern auch Zugang zu einer ganzen Reihe von Naturstoffen, die mit existierenden Verfahren (Extraktion aus pflanzlichen Rohstoffen, chemische Synthese) bisher nicht wirtschaftlich gewinnbar sind. Für die vorliegende Aufgabe der mikrobiellen Biotransformation des toxischen Substrats α -Pinen wurde aufgrund dessen physikochemischer Eigenschaften (hydrophobe, nicht flüchtige und nicht geladene Moleküle niedrigen Molekulargewichts) ein Zweiphasenbioprozess mit kontinuierlicher Extraktion durch ein organisches Lösungsmittel (direkte interne Kontaktierung) gewählt. Die organische Phase dient hierbei sowohl als Substratreservoir als auch als Extraktionsmittel für die entstehenden Produkte, fungiert also als Trägerphase für Substrat und Produkt. Dadurch wird deren Konzentration in der wässrigen Phase verringert und inhibierende oder toxische Effekte vermieden. Als Biokatalysator wurden ganze Zellen von *Escherichia coli* eingesetzt, die rekombinant die Fünffachvariante V26T R47F A74G F87V L188K von P450_{BM-3} (P450_{BM-3} QM) exprimierten, die für die Oxyfunktionalisierung von hydrophoben Molekülen entworfen wurde. P450_{BM-3} QM wurde als Modell einer rekombinant exprimierten P450-Monooxygenase verwendet, um die prinzipielle Möglichkeit zur Optimierung P450-basierter Oxyfunktionalisierungen zu zeigen.

Dadurch ergaben sich folgende Arbeitsschritte:

- Vorcharakterisierung der Biokatalyse mit rekombinanten *E. coli*-Kulturen
- Screening nach geeigneten organischen Lösungsmitteln für den Einsatz als Trägerphase im wässrig-organischen Zweiphasensystem
- Bioprozessentwicklung im wässrig-organischen Zweiphasensystemen
- Optimierungen der Biokatalysatoreigenschaften

Durch die Kombination der molekularbiologischen sowie prozesstechnischen Verfahrensoptimierung sollte ein weiterer Schritt in Richtung auf die Entwicklung eines wirtschaftlichen industriellen Prozesses zur mikrobiellen P450-basierten Pinenoxyfunktionalisierung gemacht werden.

Material und Methoden

1 Material

1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien außer Diisononylphthalat und Stearinsäurebutylester, die als technische Estergemische erworben wurden, wurden in puriss. p.a. Reinheit verwendet. Die Chemikalien wurden bei den folgenden Firmen bezogen: Sigma Aldrich, Fluka, Riedel de Haën (jeweils Taufkirchen), Carl Roth (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt).

1.2 Geräte

Während der Arbeit verwendete Geräte sind in Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 4: Verwendete Geräte

Anwendung	Modell	Hersteller
Agarosegelelektrophorese	Mini-Sub Cell GT	BioRad
	BioDoc Analyze	Biometra
	PowerShot G3	Canon
Bioreaktoren	FedBatchPro	DASGIP
Gaschromatographie	GC 17A	Shimadzu
	GC 17A mit GCMS QP5050	Shimadzu
Glucoseanalysator	2700 Select	YSI
Inkubatoren	Minitron	Infors
	Certomat R	B. Braun Biotech International
	Certomat H	B. Braun Biotech International
	Certomat HK	B. Braun Biotech International
Magnetrührer	Electronicrührer Mono	VarioMag
	Ikamag RET	IKA Labortechnik
	Ikamag RCT	IKA Labortechnik
Netzteile	PowerPac Universal	BioRad
	PowerPac Basic	BioRad

PCR	MasterCycler gradient	Eppendorf
SDS PAGE	Mini-Protean 3	Bio-Rad
Spektrophotometer UV/VIS	Biowave CO8000 Lamda 25	WPA Perkin Elmer
Thermomixer	Thermomixer compact Thermomixer comfort	Eppendorf Eppendorf
Ultrareinwasseranlage	Purelab ultra	ELGA
Ultraschalldesintegrator	W-250 D	Branson
Vortexer	Vortex-Genie	Bender & Hobein AG
Waagen	AB204 CP2202S	Mettler Toledo Sartorius
Wasserbad	U3	Julabo
Zentrifugen	Mini Spin plus Centrifuge 5415R GK15 Centrikon H-401	Eppendorf Eppendorf Sigma Kontron Instruments

1.3 Medien

Verwendete Medien sind in Tab. 5 aufgelistet. Zur Lösung der Inhaltsstoffe aller Medien wurde destilliertes Wasser verwendet. SOC-Medium wurde von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) kommerziell erworben. Zur Herstellung von M9-Medium wurden Glucose-, $MgSO_4$ -, $CaCl_2$ - und Spurenelementlösung getrennt sterilisiert und zu M9-Medium vermischt. Zur Herstellung von TB-Medium wurde Kaliumphosphatpuffer 10-fach konzentriert angesetzt, getrennt autoklaviert und anschließend in der entsprechenden Verdünnung TB-Medium zugesetzt.

Tab. 5: Verwendete Medien

Medium	Substanz	Konzentration
LB-Agar	Trypton	10 g l ⁻¹
	Hefeextrakt	5 g l ⁻¹
	NaCl	10 g l ⁻¹
	Agar-Agar	1,5% (m/v)
M9-Medium	Na ₂ HPO ₄	6 g l ⁻¹
	KH ₂ PO ₄	3 g l ⁻¹
	NH ₄ Cl	1 g l ⁻¹
	NaCl	0,5 g l ⁻¹
	MgSO ₄	0,24 g l ⁻¹
	CaCl ₂	11 mg l ⁻¹
	Glucose	10 g l ⁻¹
	200x Spurenelementlösung	5 ml l ⁻¹
200x Spurenelementlösung	MnCl · 4 H ₂ O	1,5 g l ⁻¹
	ZnSO ₄	1,05 g l ⁻¹
	H ₃ BO ₃	0,3 g l ⁻¹
	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,25 g l ⁻¹
	CuSO ₄	0,14 g l ⁻¹
	Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O	0,84 g l ⁻¹
	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	4,87 g l ⁻¹
	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,18 g l ⁻¹
SOC-Medium	Trypton	20 g l ⁻¹
	Hefeextrakt	5 g l ⁻¹
	NaCl	10 mM
	KCl	2,5 mM
	MgCl	10 mM
	MgSO ₄	10 mM
	D-Glucose	20 mM
TB-Medium	Trypton	12 g l ⁻¹
	Hefeextrakt	24 g l ⁻¹
	Glycerol	5 g l ⁻¹
	KH ₂ PO ₄	2,31 g l ⁻¹
	K ₂ HPO ₄	12,54 g l ⁻¹

1.4 Puffer und Lösungen

Tab. 6: Verwendete Puffer und Lösungen

Anwendung	Puffer/Lösung	Substanz	Konzentration
Zellaufschlusspuffer	Tris-Puffer, pH 7,5	Tris Mit HCl einstellen auf pH 7,5	50 mM
Agarosegelelektrophorese	50x TAE-Puffer	Tris	2 M
		Essigsäure	1 M
		EDTA pH 8	0,05 M
	6x Ladepuffer	Bromphenolblau	0,25% (m/v)
		Xylencyanol FF	0,25% (m/v)
		Saccharose	40% (m/v)
SDS PAGE	5x Probenpuffer	Tris	0,25 M
		β -Mercaptoethanol	0,5 M
		SDS	10% (m/v)
		Bromphenolblau	0,5% (m/v)
		Glycerin pH 6,8	50% (v/v)
	Trenngelpuffer	Tris pH 8,8	1,5 M
	Sammelgelpuffer	Tris pH 6,8	0,5 M
	Laufpuffer	Tris Glycin SDS pH 8,3	0,125 M
			1,25 M
			0,5% (m/v)
Färbelösung	Coomassie Brilliant Blau R-250 Ethanol Essigsäure	0,05% (m/v)	
		50% (v/v)	
		10% (v/v)	
Entfärbelösung	Ethanol	20% (v/v)	

		Essigsäure	10% (v/v)	
	APS-Lösung	Ammoniumperoxodisulfat	1,5% (m/v)	
<i>p</i> NCA-Assay	Tris-Puffer, pH 8,2	Tris Mit HCl einstellen auf pH 8,2	100 mM	
Herstellung chemisch kompetenter Zellen	TfbI	Kaliumacetat	30 mM	
		Rubidiumchlorid	100 mM	
		Calciumchlorid	10 mM	
		Manganchlorid	50 mM	
		Glycerol	15% (v/v)	
			pH 5,8 (mit verdünnter Essigsäure)	
	TfbII	MOPS	10 mM	
		Calciumchlorid	75 mM	
		Rubidiumchlorid	10 mM	
		Glycerol	15% (v/v)	
			pH 6,5 (mit verdünnter NaOH)	

1.5 Mikroorganismen

Alle verwendeten Mikroorganismen wurden als chemisch kompetente Zellen bei Invitrogen (Karlsruhe) oder Novagen (Darmstadt) erworben. Die Mikroorganismen sowie ihre relevanten genotypischen Charakteristika sind in Tab. 7 aufgeführt.

Tab. 7: Verwendete Mikroorganismen mit relevanten Eigenschaften

Mikroorganismus	Relevante Charakteristika	Hersteller	Referenz
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> <i>rne131</i> (DE3)	Novagen	(Studier und Moffatt 1986)
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>phoA supE44 λ thi-1 gyrA96</i> <i>relA1</i>	Invitrogen	(Hanahan 1983)

1.6 Kommerzielle Kits, Enzyme und Marker

Tab. 8 fasst innerhalb der Arbeit verwendete kommerziellen Kits, Enzyme und Marker zusammen.

Tab. 8: Verwendete kommerzielle Kits, Enzyme und Marker

Anwendung	Kommerzieller Kit/Enzym/Marker	Hersteller
Aufreinigung von DNA-Fragmenten	High-Pure PCR-Product Purification Kit	Roche
DNA-Amplifikation	High Fidelity PCR Master	Roche
Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	GenElute Gel Extraction Kit	Sigma
Plasmidpräparation	GenElute Plasmid Miniprep Kit	Sigma
DNA-Amplifizierung	<i>Taq</i> Polymerase	Qiagen
	HIFI-Polymerase	Roche
Ligation	T4-Ligase	Fermentas
Restriktionsverdau	<i>NdeI</i>	Roche
	<i>XhoI</i>	Roche
	<i>XbaI</i>	Roche
	<i>NotI</i>	Roche
	<i>DpnI</i>	Roche
Agarosegelelektrophorese	Gene Ruler 1 kb DNA Ladder	Fermentas
SDS-PAGE	Protein Molecular Weight Marker	Fermentas

1.7 Plasmide und Oligonukleotide

In der Arbeit verwendete Plasmide sowie ihre relevanten Charakteristika sind in Tab. 9 aufgeführt. Verwendete Oligonukleotide (Tab. 10) wurden von der Operon Biotechnologies GmbH (Köln) synthetisiert und als salzfreies Lyophilisat geliefert. Oligonukleotidlyophilisate wurden in sterilem bidest. H₂O zu einer Endkonzentration von 100 µM gelöst. Diese Primerstammlösungen wurden in zehnfacher Verdünnung eingesetzt. Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen.

Tab. 9: Verwendete Plasmide

Plasmid	Promoter	Antibiotikum zur Plasmidselektion	Hersteller/Referenz
pET24a ⁺	T7	Kanamycin (35 µg ml ⁻¹)	Novagen
pETDUET-1	T7	Ampicillin (100 µg ml ⁻¹)	Novagen
pET24 <i>gldh</i>	T7	Kanamycin (35 µg ml ⁻¹)	Zur Verfügung gestellt von H. Sahn
pET28 <i>bm-3qm</i>	T7	Kanamycin (35 µg ml ⁻¹)	(Lentz et al. 2001)
pETDUET <i>gldh</i>	T7	Ampicillin (100 µg ml ⁻¹)	diese Arbeit
pETDUET <i>bm-3qm gldh</i>	T7	Ampicillin (100 µg ml ⁻¹)	diese Arbeit
pZY507 <i>glf</i>	P _{<i>tac</i>}	Chloramphenicol (25 µg ml ⁻¹)	(Weisser et al. 1995)

Tab. 10: Verwendete Oligonukleotide. Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen. T_m bezeichnet die vom Hersteller angegebene Schmelztemperatur des betreffenden Oligonukleotids.

Anwendung	Nr.	Sequenz (5' - 3')	T_m (°C)
Klonierung <i>gldh</i> aus pET24 <i>gldh</i> in pETDUET-1	1	TATAC <u>CATATGT</u> TATACAGATTTAAAA	51,5
	2	ATAT <u>CTCGAGT</u> TAACTCTTCCCGCTT	64,6
Klonierung <i>bm-3qm</i> aus pET28 <i>bm-3qm</i> in pETDUET <i>gldh</i>	3	GCGCT <u>CTAGAA</u> ATAATTTTGTTTAACTTTAAG	60,8
	4	ATAT <u>GCGGCCG</u> CAAGCTTGTCGACGGAGCTC	73,9

1.8 Ganzzellbiokatalysatoren

Durch Transformation einzelner oder mehrerer der in Tab. 9 aufgelisteten Plasmide wurden verschiedene Ganzzellbiokatalysatoren generiert, deren Bezeichnungen innerhalb der Arbeit in Tab. 11 aufgeführt sind. Als Expressionsstamm kam jeweils *E. coli* BL21 (DE3) zum Einsatz.

Tab. 11: Bezeichnung der innerhalb der Arbeit verwendeten Ganzzellbiokatalysatoren

Bezeichnung	Plasmid	Genprodukte
BL21 (P450 _{BM-3} QM)	pET28 <i>bm-3qm</i>	CYP102A1 V26T/R47F/A74G/F87/V/L188K
BL21 (P450 _{BM-3} QM/GlcDH)	pETDUET <i>bm-3qm</i> <i>gldh</i>	CYP102A1 V26T/R47F/A74G/F87/V/L188K GlcDH
BL21 (P450 _{BM-3} QM/GlcDH/GLF)	pETDUET <i>bm-3qm</i> <i>gldh</i> pZY507 <i>glf</i>	CYP102A1 V26T/R47F/A74G/F87/V/L188K GlcDH GLF

2 Methoden

2.1 Mikrobiologische Methoden

2.1.1 Stammhaltung und Kultivierung von *E. coli*

Zellvermehrung vor Ganzzellbiotransformationen nutzen als Startpunkt frisch mit den entsprechenden Plasmiden transformierte *E. coli* BL21 (DE3) Einzelkolonien auf LB-Agar. Zur Inokulation einer Vorkultur wurde eine einzelne Kolonie mit einer Impföse aufgenommen und in Erlenmeyerkolben mit TB-Medium mit den entsprechenden Antibiotikazugaben überführt.

2.1.2 Messung der Zellkonzentration

Wachstum von *E. coli* Kulturen wurde durch photometrische Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen destilliertes Wasser als Nullwert bestimmt. Berechnung der Biotrockenmassekonzentration ($g_{\text{BTM}} l^{-1}$) erfolgte durch Multiplikation der optischen Dichte (OD_{600}) mit einem experimentell bestimmten Umrechnungsfaktor.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Plasmidpräparation

Zur Plasmidextraktion aus rekombinanten *E. coli* Kulturen wurden jeweils 5 ml LB- oder TB-Medium mit der entsprechenden Antibiotikakonzentration mit einer Kolonie direkt von einer Agarplatte oder aus einer Glycerolkultur inokuliert und über Nacht bei 37°C in einem Rotationsinkubator in Reagenzgläsern vermehrt. Die Kulturen wurden anschließend abzentrifugiert und die Plasmidisolierung nach Anweisungen des GenElute Plasmid miniprep Kits durchgeführt.

2.2.2 Herstellung chemisch kompetenter Zellen (Rubidiumchlorid-Methode)

Üblicherweise wurden chemisch kompetente Zellen der Hersteller Invitrogen und Novagen verwendet. Zur Erzeugung chemisch kompetenter *E. coli* BL21 (DE3) Zellen, die das Plasmid pZY507*glf* tragen, wurde die Rubidiumchloridmethode angewendet. Ein Volumen von 50 ml TB-Medium mit dem entsprechenden Zusatz von Chloramphenicol wurden mit 5 ml einer TB-Medium-Vorkultur von *E. coli* BL21 (DE3) pZY507*glf* angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,6 bei 37°C und 220 rpm kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen 15 min auf Eis gekühlt und zentrifugiert (5000 g, 5 min, 4°C). Das Zellpellet wurde mit 20 ml TfbI (Tab. 6) gewaschen, zentrifugiert (5000 g, 5 min, 4°C) und in 2 ml TfbII resuspendiert. Aliquots von 0,2 ml wurden nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C in Cryoröhrchen gelagert.

2.2.3 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Transformationen chemisch kompetenter Zellen erfolgten nach der Vorschrift der Hersteller. Für die Herstellung von BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF), der zwei Plasmide trägt, wurden diese nacheinander transformiert. Zunächst wurde pZY507*glf* in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Anschließend wurden kompetente Zellen aus einer positiven Transformante generiert (vgl. Abschnitt 2.2.2) und dann pETDUET*bm-3qm glcdh* transformiert.

2.2.4 Agarosegelelektrophorese

Zum Nachweis von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurde die Agarosegelelektrophorese eingesetzt. Agarosegelelektrophorese wurde mit TAE-gepufferten Gelen mit einem Agarosegehalt von 1,5% (w/v) und einem Ethidiumbromidanteil von 0,05% (v/v) durchgeführt. Proben wurden in 6x Ladepuffer (Tab. 6) suspendiert und Volumina von 5-10 µl aufgetragen. Analytische Gele wurden für 30-45 min bei einer konstanten Spannung von 100 V entwickelt, präparative Gele bei 80 V für 60-75 min. Ein Marker zur Abschätzung der DNA-Fragmentgröße wurde eingesetzt (Tab. 8). Die Gele wurden in einer Dokumentationsanlage (Tab. 4) nach Fluoreszenzanregung unter UV-Licht fotografiert und ausgewertet. Aufreinigung einzelner DNA-Banden aus dem Agarosegel erfolgte durch Ausschneiden der entsprechenden Bande und anschließender Verwendung eines kommerziellen Gelextraktions-Kits (Tab. 8).

2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Klonierung der Gensequenz von GlcDH in pETDUET-1 und der Gensequenz von P450_{BM-3} QM in pETDUET*glcdh* wurden zunächst die entsprechenden Gensequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) aus pET24*glcdh* Konstrukt (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von H. Sahn, Forschungszentrum Jülich) und pET28*bm-3qm* (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von R.D. Schmid, Universität Stuttgart) amplifiziert. Alle zu klonierenden DNA-Fragmente wurden mit dem HIFI-Polymerasemix (Tab. 8) amplifiziert. Die Polymerase-Mastermischungen waren 2-fach konzentriert und enthielten neben der Polymerase die entsprechenden Konzentrationen an Puffer, MgCl₂ und dNTPs. Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde in Konzentrationen von 3-5% (v/v) zugesetzt. Alle PCR-Mischungen wurden auf Eis gemäß der in Tab. 12 beschriebenen Zusammensetzung in sterilen PCR-Gefäßen gemischt.

Tab. 12: Zusammensetzung von *Taq*- und HIFI-PCR-Reaktionen.

Bestandteil	Volumen
Template	1 μ l
Primer forward und reverse (10 mM)	je 0,5-1 μ l
Polymerase-Mastermischung	25 μ l
DMSO	2-5% (v/v)
Wasser	ad 50 μ l

Die PCR wurde anschließend mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt.

Tab. 13: PCR-Temperaturprogramm

	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94	2 min	1
Denaturierung	94	10 s	} 10 x
Primerhybridisierung	5°C unter Primerschmelzpunkt	0,5 min	
Elongation	72	1 min pro 1 kb	
Denaturierung	94	15 s	} 20 x
Primerhybridisierung	5°C unter Primerschmelzpunkt	0,5 min	
Elongation	72	1 min pro 1 kb	
Finale Elongation	72	5 min	1

Präparative DNA-Fragmente, die zur Klonierung weiterverwendet wurden, wurden mit dem High-Pure PCR-Product Purification Kit von Roche aufgereinigt, sodass sie für den folgenden Restriktionsverdau in sterilem bidest. H₂O vorlagen. Anschließend wurde der jeweilige Restriktionsverdau unter Zusatz von *DpnI* zur Eliminierung verschleppter Template-Plasmid-DNA durchgeführt. Bei PCR-Amplifikationen zu analytischen Zwecken wurde *Taq*-Polymerase (Qiagen) eingesetzt.

2.2.6 Restriktionsverdau und Klonierung von PCR-Produkten

Sämtliche Klonierungsschritte wurden vor Durchführung mit der Software Clone Manager (Version 7.04) simuliert. Vergleiche zwischen verschiedenen DNA-Sequenzen erfolgten mit Hilfe der Freeware ClustalX (Version 1.83).

Nach Amplifizierung und Aufreinigung der Gensequenzen wurden Restriktionsspaltungen nach den für das jeweilige Enzym spezifischen vom Hersteller (Roche) empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Bei Doppelverdau wurde der vom Hersteller empfohlene Reaktionspuffer verwendet. Pro Spaltungsansatz wurden 0,1 bis 10 µg DNA mit 10-20 U Restriktionsenzym behandelt. Die Reaktionsansätze wurden in einem Gesamtvolumen von 15 µl bei analytischen und 50 µl bei präparativen Restriktionsverdau durchgeführt. Die Inkubationszeit der Spaltungsansätze betrug 1-3 h bei 37°C. Nach Beendigung des Restriktionsverdau wurde eine Aufreinigung durch das High-Pure PCR-Product Purification Kit (Roche) angeschlossen. Die so erhaltene DNA wurde für weitere Klonierungsexperimente verwendet oder im Agarosegel elektrophoretisch analysiert.

Ligationen wurden mit T4-Ligase (Fermentas) durch Inkubation über Nacht bei 8°C in einem Gesamtvolumen von 10-20 µl durchgeführt.

2.2.7 Klonierung von P450_{BM-3} QM und Glucosedehydrogenase in pETDUET-1

Die DNA-Sequenz der Glucosedehydrogenase (GlcDH) wurde mittels PCR mit den Primern 1 und 2 (Tab. 10) aus einem pET24*gldh* amplifiziert. Das resultierende Fragment (788 bp) wurde mit *Nde*I und *Xho*I verdaut und in pETDUET-1 ligiert. Erfolgreiche Ligation wurde durch Restriktionsanalyse, erfolgreiche Expression und Aktivität durch SDS-PAGE-Analyse von Rohzelleextrakten und Messung der GlcDH-Aktivität in den Extrakten nach Expression in *E. coli* BL21 (DE3) bestätigt. Das resultierende Plasmid wurde als pETDUET*gldh* (Tab. 9) und *E. coli* BL21 (DE3) mit pETDUET*gldh* als BL21 (GlcDH) (Tab. 11) bezeichnet.

Mit den Primern 3 und 4 (Tab. 10) wurde die DNA-Sequenz von P450_{BM-3} QM aus einem pET28*bm-3qm* zusammen mit der Ribosomenbindungsstelle amplifiziert. Das resultierende Fragment (3333 bp) wurde mit *Xba*I und *Not*I verdaut und in pETDUET*gldh* ligiert. Erfolgreiche Ligation wurde durch Restriktionsanalyse bestätigt. Funktionelle parallele Expression von P450_{BM-3} QM und GlcDH wurde durch SDS-PAGE und Bestimmung der Enzymaktivitäten in Rohzelleextrakten bestätigt. Das resultierende Plasmid wurde als pETDUET*bm-3qm gldh* (Tab. 9) und *E. coli* BL21 (DE3) mit pETDUET*bm-3qm gldh* als BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH) (Tab. 11) bezeichnet.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Rekombinante Proteinexpression

Die Induktion der Proteinexpression erfolgte bei allen Plasmiden durch den Zusatz verschiedener Konzentrationen von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) aus einer

100 mM Stammlösung. Der Expressionswirt war in allen Fällen *E. coli* BL21 (DE3). Dabei wurden je nach Kulturvolumen verschiedene Expressionsparameter wie Induktionszeitpunkt, OD₆₀₀ bei Induktion, Expressionstemperatur und –dauer gewählt. Diese sind bei den jeweiligen Experimenten näher beschrieben.

2.3.2 Herstellung von Rohzelleextrakten

Rohzelleextrakte wurden unter Einsatz eines Ultraschalldesintegrators hergestellt. Zellpellets wurden in 5 ml Zellaufschlusspuffer (50 mM Tris/HCl Puffer, pH 7,5) resuspendiert und unter Eiskühlung die Arbeitsspitze in der Zellsuspension arretiert. Es wurden zwei Arbeitsspitzen verschiedenen Durchmessers verwendet. Bei Verwendung der Arbeitsspitze mit 3 mm Durchmesser wurde als Ultraschallprogramm bei einer Amplitude von 10% 6 Minuten beschallt (3 Impulse, Länge je 1 min dazwischen je 1 min Pause). Das Programm bei der Arbeitsspitze mit 5 mm Durchmesser verwendete eine Amplitude von 10% und eine Beschallungszeit von 4 min (120 Impulse, Länge je 1 s dazwischen je 1 s Pause). Zur Abtrennung der Zelltrümmer wurde der Rohzelleextrakt anschließend in einer vorgekühlten Zentrifuge bei 4°C für 5 min bei 10.000 g zentrifugiert und dann bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt. Bei Bestimmung der spezifischen P450-Konzentrationen pro Gramm Biotrockenmasse wurde die optische Dichte der resuspendierten Zellkultur vor dem Zellaufschluss bestimmt.

2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Überprüfung von Expressionsprodukten wurden Rohzelleextrakte mittels SDS-PAGE in 15% SDS-Polyacrylamidgelen gelelektrophoretisch aufgetrennt und analysiert. Die Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel sind in Tab. 14 dargestellt.

Tab. 14: Zusammensetzung SDS-PAGE Gele

	Sammelgel	Trenngel (15%)
Sammelgel-Puffer	1,67 ml	-
Trenngel-Puffer	-	1,25 ml
H ₂ O	3,77 ml	4,4 ml
Polyacryl/Bisacrylamid (29:1, 40%)	0,83 ml	3,75 ml
10% SDS	67 µl	100 µl
1,5% APS	333 µl	500 µl
TEMED	5 µl	5 µl

Sammel- und Trenngele wurden sukzessiv in einer mini-Protean 3 Zelle (Bio-Rad) jeweils mindestens 30 min polymerisiert. Rohzelleextrakte wurden mit 5x Probenpuffer versetzt und für 10 min, Proteingrößenmarker (Protein Molecular Weight Marker, Fermentas) für 5 min, bei 95°C erhitzt. Die SDS-PAGE-Gele wurden mit Lauffpuffer überschichtet und pro Tasche 10 µl Probe aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei konstant 200 V für 60-70 min. Im Anschluss wurden die Gele in Färbelösung für mindestens 1 h gefärbt und dann unter mehrfachem Wechsel der Entfärbelösung entfärbt.

2.3.4 P450-Konzentrationsbestimmung (CO-Spektrum)

P450-Monooxygenasekonzentrationen innerhalb von Rohzelleextrakten wurden durch Messung des CO-Differenzspektrums bestimmt. Dabei wird die charakteristische Absorptionsänderung der Häm-Gruppe nach Bindung von Kohlenmonoxid im reduzierten Zustand gemessen (Omura und Sato 1964). Der Rohzelleextrakt wurde mit 50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,5 in einem Gesamtvolumen von 1 ml verdünnt und zur Reduktion des Häm-Eisens von Fe³⁺ zu Fe²⁺ eine Spatelspitze Natriumdithionit zugegeben. Anschließend wurde zur Aufnahme einer Referenzkurve das Absorptionsspektrum zwischen 400 und 500 nm gemessen. Danach wurde der Rohzelleextraktes für 1 min mit Kohlenstoffmonoxid (Flussrate 1 ml min⁻¹) begast und das Spektrum zwischen 400 und 500 nm erneut aufgenommen. Das Referenzspektrum vor Begasung wurde vom Spektrum der begasten Probe abgezogen und die P450-Konzentration entsprechend dem Lambert-Beerschen Gesetz nach folgender Formel berechnet (1):

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

ϵ : Extinktionskoeffizient Häm-CO-Komplex; $91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

d : Schichtdicke; 1 cm

Die Messungen des CO-Differenzspektrums wurden mindestens in Doppelbestimmung durchgeführt.

Die im CO-Differenzspektrum gemessene P450-Konzentration c_{P450} (μM) wurde auf die Biotrockenmassekonzentration X ($\text{g}_{\text{BTM}} \text{ l}^{-1}$) des Zellaufschlusses bezogen, um die spezifische P450-Konzentration C_X^{P450} ($\mu\text{mol g}^{-1}_{\text{BTM}}$) gemäß Formel (2) zu berechnen.

$$C_X^{P450} = \frac{c_{P450}}{X} \quad (2)$$

2.3.5 Aktivitätstest P450_{BM-3} (pNCA-Assay)

Die Aktivität von P450 BM-3 QM in Rohzellextrakten wurde mit Hilfe des von Schwaneberg et al. (1999) entwickelten pNCA-Assays bestimmt. Dieser Assay nutzt die stöchiometrische Bildung des photometrisch detektierbaren Produkts *p*-Nitrophenolat aus dem Surrogatsubstrat *p*-Nitrophenoxydecansäure (12-*p*NCA) durch oxidative Aktivität von P450_{BM-3}. Dazu wurden $7,5 \mu\text{l}$ einer 6 mM 12-*p*NCA Stammlösung in DMSO mit 100 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,2) und Rohzellextrakt zu einem Endvolumen von $900 \mu\text{l}$ gemischt und die Reaktion durch Zugabe von $100 \mu\text{l}$ einer 1 mM NADPH Lösung in 100 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,2) gestartet. Die Bildung von *p*-Nitrophenolat wurde photometrisch bei 410 nm verfolgt und die Aktivität von P450_{BM-3} QM unter Einbeziehung des molaren Extinktionskoeffizienten von *p*-Nitrophenolat ($13,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) berechnet. Aktivitätstests wurden bei 25°C mit temperiertem Puffer und Küvettenschlitten durchgeführt. Die Bestimmung der Aktivitäten erfolgte aus Mittelwerten von Doppel- bis Vierfachbestimmungen.

2.3.6 Aktivitätstest P450_{BM-3} (NADPH-Verbrauch)

Die P450_{BM-3} QM-katalysierte Oxidation von nicht unmittelbar photometrisch detektierbaren Substraten oder Produkten wurde indirekt durch Messung der NADPH-Verbrauchsrate bestimmt. Da hierbei die Aktivität der Reduktasedomäne gemessen wird und bekannt ist, dass es bei mutierten P450-Monooxygenasen beim Umsatz nicht-natürlicher Substrate zur Entkopplung der NADPH-Oxidation von der Substratoxidation kommt, kann aus der NADPH-Verbrauchsrate nicht direkt eine Aktivität im Sinne einer Produktbildung abgeleitet werden. Für die Messung der NADPH-Verbrauchsrate von P450_{BM-3} QM bei verschiedenen organischen Lösungsmitteln wurden $20 \mu\text{l}$ einer Stammlösung von 30 mM des jeweiligen organischen Lösungsmittels in DMSO mit $830 \mu\text{l}$ 50 mM KPi-Puffer (pH 7,5) vermischt und $50 \mu\text{l}$ Rohzellextrakt von BL21 (P450_{BM-3} QM), die $14 \mu\text{M}$ P450_{BM-3} QM enthielten, zugegeben. Durch Zugabe von $100 \mu\text{l}$ 5 mM NADPH in 50 mM KPi-Puffer (pH 7,5) wurde die Reaktion gestartet. Die Gesamtkonzentration von DMSO im Assay betrug jeweils 2% (v/v). Die Assaytemperatur betrug 25°C .

Für die Messung der Kinetik der NADPH-Verbrauchsrate bei verschiedenen α -Pinenkonzentrationen wurden verschiedene Volumina und Verdünnungen einer 100 mM Stammlösung von α -Pinen in DMSO in 790 μ l 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) gelöst und 100 μ l Rohzelleextrakt von BL21 (P450_{BM-3} QM) mit 5,7 μ M P450_{BM-3} QM zugegeben. α -Pinenkonzentrationen zwischen 0 und 1 mM α -Pinen wurden eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μ l 1,5 mM NADPH in 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) gestartet. Die Gesamtkonzentration von DMSO im Assay betrug jeweils 1% (v/v). Der Assay wurde bei 37°C durchgeführt.

Im Unterschied zur oben beschriebenen Vorgehensweise wurden bei der Messung der Produktstabilität 10 μ l einer 50 mM Stammlösung von α -Pinenoxid, Verbenol und Myrtenol in DMSO und BL21 (P450_{BM-3} QM) Rohzelleextrakt mit 8,1 μ M P450_{BM-3} QM verwendet. Die Assaytemperatur betrug 25°C.

Die Reaktionen wurden jeweils bei 340 nm photometrisch verfolgt und die Aktivität unter Einbeziehung des molaren Extinktionskoeffizienten von NADPH (6,3 mM⁻¹ cm⁻¹) berechnet. Da DMSO hemmend auf die P450_{BM-3}-Aktivität wirkt, wurden zuvor jeweils mehrere Negativkontrollen mit reinem DMSO ohne Substratzusatz und Ansätzen ohne P450_{BM-3} durchgeführt.

2.3.7 Aktivitätstest Glucosedehydrogenase (NADP⁺-Verbrauch)

Die Aktivität der Glucosedehydrogenase (GlcDH) wurde durch den photometrisch detektierbaren Absorptionsanstieg bei 340 nm, bedingt durch die Reduktion von NADP⁺ zu NADPH bei der Oxidation von Glucose zu Gluconolacton, bestimmt. Ein Volumen von 790 μ l 50 mM KPi-Puffer (pH 7,5) wurde mit 10 μ l einer zehnfachen Verdünnung von Rohzelleextrakt in 50 mM KPi-Puffer (pH 7,5) und 100 μ l einer 20 mM Stammlösung von NADP⁺ in 50 mM KPi-Puffer (pH 7,5) gemischt und die Reaktion durch Zugabe von 100 μ l einer 1 M Glucoselösung in 50 mM KPi-Puffer (pH 7,5) gestartet. Mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten von NADPH (6,3 mM⁻¹ cm⁻¹) konnte die Aktivität berechnet werden.

Aktivitätstests wurden grundsätzlich bei 25°C mit temperiertem Puffer und Küvettenschlitten durchgeführt. Die Bestimmung der Aktivitäten erfolgte aus Mittelwerten von Doppel- bis Vierfachbestimmungen.

2.4 Analytische Methoden

2.4.1 Gaschromatographische Analyse der wässrigen und organischen Phase

Identifizierung und Quantifizierung von Produkten P450_{BM-3} QM-katalysierter Oxidationen erfolgte durch gaschromatographische Analyse. Es wurden zwei Detektorsysteme verwendet: Flammenionisationsdetektor (FID) und Massenspektrometer (MS). Zur Quantifizierung von Chromatogramm-Peaks wurde die Methode der Konzentrationsbestimmung über einen

internen Standard (Bestimmung des R_f -Wertes) verwendet. Als interner Standard wurde entweder (+)-Campher oder (-)-Menthol eingesetzt. Messungen erfolgten grundsätzlich als Doppelbestimmung. Kommerziell erhältliche GC-Standards kamen zum Einsatz.

Zur Analyse und Quantifizierung der Substrate und Produkte verwendete Methoden und Chromatographiesäulen sind in Tab. 15 und Tab. 16 aufgelistet. Die Massenspektren der analysierten Produkte sind in Form der zehn Hauptfragmentationen und ihrer relativen Intensität in Tab. 17 aufgeführt.

Tab. 15: Verwendete Gaschromatographiemethoden

	GC-FID		GCMS
	Methode 1	Methode 2	Methode 3
Trägergas	Helium	Helium	Helium
Make-up Gas	Helium	Helium	-
Säulenfluß (ml min ⁻¹)	0,7	0,55	1
Split	10:1	10:1	10:1
Injektortemperatur (°C)	230	230	230
Detektortemperatur (°C)	300	300	250
Temperaturprogramm	110°C (2 min), 1°C/min bis 120°C (5 min)	150°C (9 min)	100°C (2 min), 1°C/min bis 115°C (1 min)

Tab. 16: Verwendete Chromatographiesäulen

Detektor	Säule	Spezifikation			Hersteller
		Länge (m)	Durchmesser (mm)	Filmgröße (μm)	
GC-FID	VB-5	30	0,25	0,25	Valcobond
	DB-WAXetr	30	0,25	0,25	J&M Scientific
GC-MS	Equity-5	30	0,25	0,25	Supelco

Zur Analyse der organischen Phase wurden Proben aus Biotransformationsansätzen genommen. Die organische Phase wurde durch Zentrifugation von der wässrigen Phase getrennt und mit einer Pipette abgenommen. Nach Trocknung der organischen Phase über Natriumsulfat erfolgte bei reinem α -Pinen als organische Phase die direkte gaschromatographische Analyse. Identifizierung von Biotransformationsprodukten erfolgte durch GC-MS (VB-5, Methode 3, Tab. 15). Bei α -Pinen/DINP-Mischungen wurde vor der gaschromatographischen Analyse die Probe zehnfach in Hexan verdünnt.

Tab. 17: Massenzahlen und relative Intensität der durch GC-MS identifizierten Biotransformationsprodukte

Substanz	Massenzahl (relative Intensität)
α -Pinenoxid	55 (88), 67 (100), 69 (51), 81 (34), 82 (44), 83 (74), 93 (51), 95 (35), 108 (34), 109 (46)
<i>cis</i> -Verbenol	55 (71), 59 (82), 67 (48), 69 (46), 79 (55), 81 (52), 91 (65), 94 (100), 95 (42), 109 (76)
<i>trans</i> -Verbenol	55 (31), 57 (31), 67 (29), 77 (35), 79 (30), 91 (100), 92 (38), 94 (30), 109 (43), 119 (45)
Myrtenol	51 (20), 53 (20), 55 (17), 57 (35), 77 (34), 79 (100), 91 (42), 93 (19), 107 (44), 108 (26)

2.4.2 Bestimmung von Verteilungskoeffizienten

Zur Bestimmung von Verteilungskoeffizienten von α -Pinenoxid, Verbenol und Myrtenol wurden verschiedene Vorgehensweisen verwendet. Einmal wurden 4 ml wässriger Lösungen von Verbenol und Myrtenol im Konzentrationsbereich von 0,25 bis 2 mM mit dem gleichen Volumen organischen Lösungsmittels überschichtet. Das wässrig-organische Zweiphasen-

system wurde bei 25°C über Nacht auf einem Rotationsinkubator bei 250 rpm geschüttelt. Durch Zentrifugation wurden die Phasen getrennt und gaschromatographisch durch GC-FID analysiert. Dabei kam bei der Analyse der organischen Phase eine VB-5-Säule (Methode 1, Tab. 15) und bei der wässrigen Phase eine DB-WAXetr-Säule (Methode 2, Tab. 15) zum Einsatz. Als interner Standard zur Konzentrationsbestimmung wurde (-)-Menthol bzw. (+)-Campher verwendet. Da α -Pinenoxid in wässriger Lösung exothermen Umlagerungsreaktionen unterliegt, wurde hier der Verteilungskoeffizient mit einer anderen Methode gemessen. α -Pinenoxid wurde in einem Konzentrationsbereich von 1,5-650 mM in 2 ml organischer Phase gelöst, dieselbe Menge bidest. Wasser zugegeben und das wässrig-organische Zweiphasensystem für 10 min gevortext. Nach Phasentrennung durch Zentrifugation wurde die organische Phase sowie ein Hexan-Extrakt der wässrigen Phase durch GC-MS (Equity-5, Methode 3 Tab. 15) mit (+)-Campher als interner Standard gemessen.

2.5 Toxizitätsanalyse von DINP und α -Pinen

Zur Messung der spezifischen Glucoseverbrauchsrate wurden $1 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ l}^{-1}$ *E.coli* BL21 (DE3) Zellen in einem konstanten Volumen von 40 ml M9-Medium, das 8 g l^{-1} Glucose enthielt, suspendiert. Die Zellsuspension wurde mit steigenden Volumina von α -Pinen bzw. DINP überschichtet. Um die daraus resultierenden unterschiedlichen Gesamtvolumina dem Gefäßvolumen und dem Energieeintrag anzupassen, wurden Erlenmeyerkolben verschiedener Größen verwendet, um ein konstantes Verhältnis von Flüssigkeitsvolumen zu Gefäßvolumen von 0,16-0,18 einzustellen. Die Erlenmeyerkolben wurden bei 300 rpm und 37°C auf einem Rotationsinkubator geschüttelt. Die Positivkontrolle bestand aus einer Zellsuspension ohne Zusatz einer organischen Phase. Proben wurden aus der wässrigen Phase entnommen und nach Zentrifugation wurde die spezifische Glucoseverbrauchsrate ($\text{g h}^{-1} \text{ g}^{-1}_{\text{BTM}}$) durch lineare Regression des in Doppelbestimmung über einen Zeitraum von 4 h mit einem Glucoseanalysator stündlich gemessenen spezifischen Glucoseverbrauchs ($\text{g g}^{-1}_{\text{BTM}}$) berechnet. Die relative spezifische Glucoseverbrauchsrate wurde durch Bezug der erhaltenen Daten auf die Positivkontrolle bestimmt.

2.6 Biotransformation im Erlenmeyerkolben

Für das Modellsystem im Erlenmeyerkolben wurde mit einer organischen Phase aus reinem α -Pinen gearbeitet. TB-Medium mit den entsprechenden Antibiotikazusätzen wurde mit einer Einzelkolonie von LB-Agarplatten inokuliert und über Nacht bei 30°C inkubiert. Als Hauptkultur wurde TB-Medium mit den entsprechenden Antibiotikazusätzen mit 2% (v/v) der Vorkultur inokuliert und bis zu einer OD_{600} von 1 inkubiert. Dann erfolgte die Induktion der rekombinanten Proteinexpression mit 0,1 mM IPTG. Parallel dazu wurden $0,12 \text{ mg l}^{-1}$ FeCl_3 zugegeben. Die Expression wurde für mindestens 6 h bei 30-37°C durchgeführt.

Die Biotransformation wurde durch Zugabe des entsprechenden Volumens α -Pinen gestartet. Vor Start der Biotransformation wurden die intrazellulären Expressionstiter der rekombinanten Proteine durch die entsprechenden Assays bestimmt. Die Biotransformation erfolgte bei 37°C im Rotationsinkubator (Certomat R, Certomat H) bei 300 rpm. Proben wurden aus der organischen Phase genommen und gaschromatographisch analysiert.

2.7 Biotransformationen im Bioreaktor

Ganzzellbiotransformationen im wässrig-organischen Zweiphasensystem wurden in einem DASGIP-Parallelermentationssystem durchgeführt. In diesem Parallelermentationssystem können Biotransformationen in 4 Bioreaktoren mit einem maximalen Füllvolumen von 350 ml unter identischen Bedingungen unter ständiger Prozesskontrolle (Temperatur, Rührerdrehzahl, pH-Wert, pO_2 -Wert, Belüftungsrate, Zufütterungsrate) und –dokumentation zeitgleich durchgeführt werden. Dadurch wird die Vergleichbarkeit verschiedener Bioprozesse untereinander verbessert.

Zwei verschiedene Verfahren zur Generierung von aktiven Ganzzellbiokatalysatoren wurden in Vorbereitung einer Ganzzellbiotransformation im DASGIP-Parallelermentationssystem angewendet (Abb. 18, S. 68). Um die Reproduzierbarkeit der rekombinanten Proteinexpression zu erhöhen, wurden frisch transformierte *E. coli* BL21 (DE3) Zellen als Inokulum für die Vorkulturen verwendet. Diese Vorkulturen bestanden aus 20 ml TB-Medium mit den entsprechenden Antibiotikazusätzen, die mit einer einzelnen Kolonie von Transformationsagarplatten von BL21 (P450_{BM-3} QM), BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH) oder BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 5-6 auf einem Rotationsinkubator angezüchtet wurden.

Im Ansatz A (Abb. 18) wurde die Vorkultur zur Inokulation von M9-Medium mit den entsprechenden Antibiotikazusätzen verwendet. Die Zellen wurden, nach Verbrauch der vorgelegten 10 g l⁻¹ Glucose, unter C-Quellenlimitierung bei Temperaturen von 30-37°C im Fed-Batch-Modus über Nacht inkubiert. Die Belüftung erfolgte mit einer konstanten Belüftungsrate von 10 l h⁻¹ Druckluft. Die Rührerdrehzahl wurde konstant bei 750-800 rpm eingestellt. Zur Steuerung der Kohlenstoff- und Energiequellenzugabe wurde entweder Glucose aus einer 500 g l⁻¹ Stammlösung (BL21 (P450_{BM-3} QM)) oder Glycerol aus einer 50% (v/v) Stammlösung (BL21 (P450_{BM-3} QM) und BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF)) entweder mit einer kontinuierlichen Feedingrate oder nach der DO-Stat-Methode zugegeben. Der pH-Wert wurde durch Zugabe einer Mischung aus 1 M NaOH und 20% (v/v) NH₄OH reglungstechnisch bei 7,2 eingestellt. Die rekombinante Proteinexpression wurde durch Zugabe von 0,5 mM IPTG bei einer OD₆₀₀ von ca. 30-40 gestartet und für 2-3 h durchgeführt. Die Biotransformation wurde durch Zugabe von 100 ml organischer Phase, bestehend aus α -Pinen bzw. α -Pinen/DINP-Gemischen, gestartet. Während der Biotransformation wurde Glucose aus einer 500 g l⁻¹ Stammlösung zudosiert. Mg²⁺- und Ca²⁺-Ionen wurden in Form

von sterilen MgSO_4 und CaCl_2 -Lösungen in regelmäßigen Abständen zugegeben. Proben wurden aus der organischen Phase genommen und gaschromatographisch analysiert.

Im Ansatz B (Abb. 18) wurde mit der Vorkultur eine Hauptkultur im Erlenmeyerkolben inokuliert und in TB-Medium bis zu einer OD_{600} von 1 inkubiert. Durch Zugabe von $0,1 \text{ mM}$ IPTG wurde die rekombinante Proteinexpression induziert und durch Zugabe von $0,12 \text{ mg l}^{-1}$ FeCl_3 eine ausreichende Versorgung mit Eisenatomen zur Häm-Produktion sichergestellt. Die rekombinante Proteinexpression wurde für 6 h bei 37°C und einer Rotationsinkubatorgeschwindigkeit von 250 rpm durchgeführt und anschließend die Zellen entweder direkt oder nach einem Aufkonzentrierungsschritt in 150 ml TB-Medium mit den entsprechenden Antibiotikazusätzen in die Bioreaktoren übertragen und die Biotransformation durch Zugabe von 100 ml organischer Phase gestartet.

Bei Ganzzellbiotransformationen im Bioreaktor wurde mit einem Phasenverhältnis von 3:2 gearbeitet. Zum Start der Ganzzellbiotransformation wurden 100 ml organische Phase zu 150 ml wässriger Phase zugegeben. Während der Biotransformation wurde eine konstante Belüftungsrate von 5 l h^{-1} Druckluft, eine Rührerdrehzahl von 800-2000 rpm, eine Temperatur von 37°C und ein pH-Wert von 7,2 eingestellt.

2.8 Berechnung von Prozesskenngrößen

Aus den verschiedenen Messwerten wie Produktkonzentration in der organischen Phase und Expressionstiter rekombinanter Proteine wurden verschiedene Prozesskenngrößen errechnet.

Die spezifische Produktausbeute $Y_{P/X}$ ($\text{mg g}^{-1}_{\text{BTM}}$) berechnete sich aus den Produktkonzentrationen zu den jeweiligen Zeitpunkten und der Biotrockenmassekonzentration direkt vor Zugabe der organischen Phase.

Die P450-spezifische Produktausbeute $Y_{P/P450}$ ($\mu\text{mol } \mu\text{mol}^{-1}_{\text{P450}}$) wurde durch Division der im System gebildeten Produktmenge durch die im System direkt vor Zugabe der organischen Phase befindlichen P450-Menge errechnet. Formell entspricht $Y_{P/P450}$ der Total Turnover Number (TTN) angegeben in Mol Produkt pro Mol Katalysator. Die TTN beschreibt die Biokatalysatorstabilität unter Prozessbedingungen.

Durch Auftragung von $Y_{P/P450}$ über die Biotransformationszeit konnte durch lineare Regression (meistens über 1 h) die spezifische initiale Produktbildungsrate Q ($\mu\text{mol h}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}_{\text{P450}}$) berechnet werden. Die Umrechnung der Produktkonzentration in der organischen Phase auf das Volumenverhältnis zwischen organischer und wässriger Phase ergab c_{Aq} ($\text{mg l}^{-1}_{\text{Aq}}$).

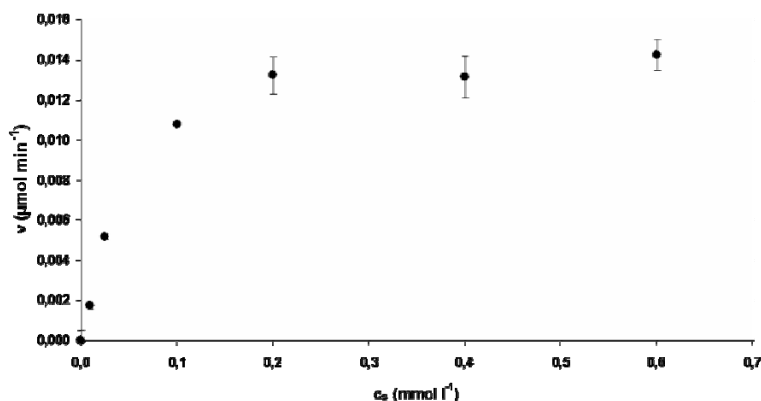
Ergebnisse

1 Vorcharakterisierung der Biokatalyse

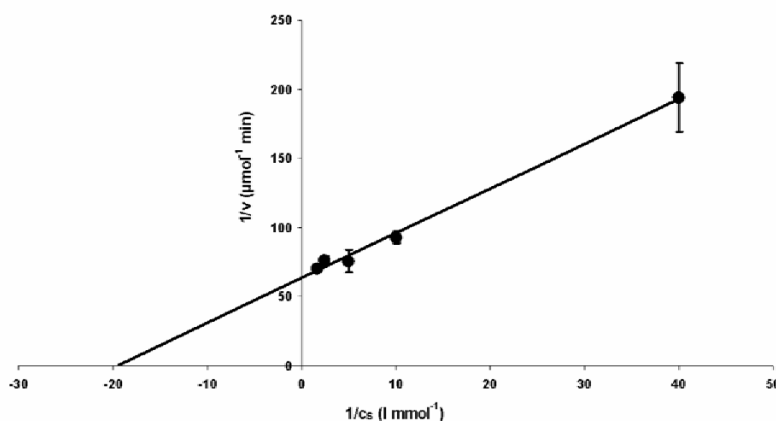
1.1 *In vitro* Aktivität von P450_{BM-3} QM

1.1.1 *In vitro* Biotransformation von α -Pinen

Die Aktivität der Fünffachvariante V26T R47F A74G F87V L188K von CYP102A1 (P450_{BM-3} QM) gegen das Substrat α -Pinen wurde in einem *in vitro*-Ansatz nachgewiesen. Mangels einer Methode zur direkten Verfolgung des Substratverbrauchs oder der Produktbildung wurde spektrophotometrisch die NADPH-Verbrauchsrate von P450_{BM-3} QM bei 340 nm in der Gegenwart verschiedener α -Pinenkonzentrationen zwischen 0-1 mM bei 37°C, pH 7,5 und einem DMSO-Anteil von 1% (v/v) gemessen. Die gemessenen Aktivitäten von P450_{BM-3} QM wurden im Lineweaver-Burk-Diagramm grafisch dargestellt (Abb. 7).



A



B

Abb. 7: NADPH-Verbrauch während der *in vitro* Oxidation von α -Pinen durch P450_{BM-3} QM bei 37°C und pH 7,5.

c_s : Substratkonzentration (mmol l⁻¹); v : Reaktionsgeschwindigkeit (µmol min⁻¹).

Es sind Mittelwerte und Fehlerbalken von Doppelbestimmung gezeigt.

A: Michaelis-Menten Diagramm

B: Lineweaver-Burk Diagramm

Lineare Regression der Lineweaver-Burk Auftragung aus Abb. 7B ergab einen apparenten K_M -Wert von $51,1 \pm 11,3 \mu\text{M}$. Weiterhin konnte eine NADPH-Verbrauchsrate von $27,6 \pm 0,5 \mu\text{mol min}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$ P450 bei 37°C und pH 7,5 bestimmt werden.

1.1.2 Produkte der *in vitro* α -Pinenoxidation durch P450_{BM-3} QM

Durch gaschromatographische Analyse mittels GC-MS konnten die Produkte der Oxidation von α -Pinen durch P450_{BM-3} QM anhand ihrer Retentionszeiten und Massenspektren identifiziert werden. P450_{BM-3} QM oxidiert (-)- α -Pinen zu (-)- α -Pinenoxid, (-)-*trans*-Verbenol und (-)-Myrtenol im Verhältnis 5:2:1 (Abb. 8). (-)- α -Pinen verfügt über zwei chirale Zentren an C-Atom 1 und 5, die über den intramolekularen aliphatischen Ring miteinander verbunden sind. Nach Einführung der Epoxidgruppe sind für Pinenoxid zwei Konfigurationen, eine *cis*- und eine *trans*-Stellung der Epoxidgruppe zum mit zwei Methylgruppen substituierten aliphatischen Ring möglich. Die endgültige Konfiguration von (-)- α -Pinenoxid konnte nicht abschließend bestimmt werden. Chirale gaschromatographische Analyse am Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hannover, zeigte einen deutlichen Enantiomerenüberschuß einer der beiden Konfigurationen, jedoch konnte mangels kommerziell erhältlicher Standards nicht bestimmt werden, ob es sich um die *cis*- oder *trans*-Konfiguration handelte. Durch Einbringung einer Hydroxylgruppe am C-Atom Nummer 3 entsteht Verbenol, wo durch die Generierung eines neuen chiralen Zentrums an dieser Stelle wieder *cis*- und *trans*-Konfigurationen der Hydroxylgruppe zum substituierten aliphatischen Ring möglich sind. Gaschromatographische Analytik ergab einen Enantiomerenüberschuß von $>92\%$ für (-)-*trans*-Verbenol. Die Hydroxylierung an der Methylgruppe von C-Atom 2 führt zur Bildung von (-)-Myrtenol. Hierbei entsteht kein neues chirales Zentrum.

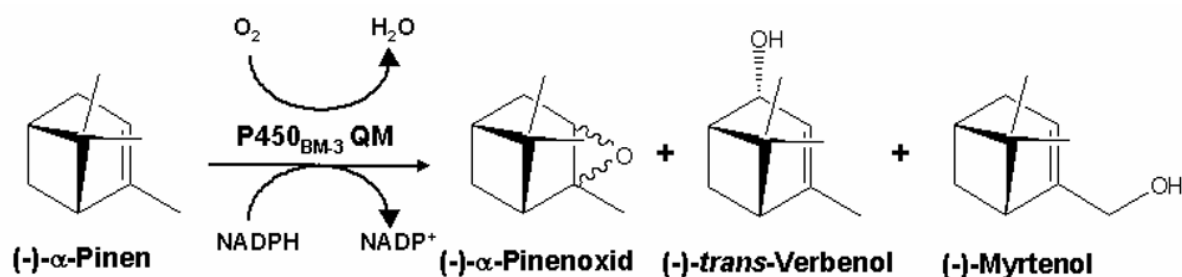


Abb. 8: Biotransformation von (-)- α -Pinen durch P450_{BM-3} QM.

Tab. 18 fasst einige physikochemische Eigenschaften von α -Pinen bzw. den Oxidationsprodukten der durch P450_{BM-3} QM katalysierten Reaktion, α -Pinenoxid, Verbenol und Myrtenol, zusammen.

Tab. 18: Physikochemische Eigenschaften von α -Pinen und den Oxidationsprodukten P450_{BM-3} QM katalysierter Oxidation von α -Pinen.

Terpen	Wasserlöslichkeit (mg l ⁻¹)	logP _{Oct}	Siedepunkt (°C)
α -Pinen	4,6 ^b	4,5 ^a	157
α -Pinenoxid	388 ^a	2,9 ^b	185
Verbenol	614 ^b	2,7 ^b	214-215
Myrtenol	427 ^b	3,2 ^a	221,5

a: Experimentelle Werte; b: abgeschätzte Werte. Die Werte stammen aus der Datenbank Interactive PhysProp Database Demo (<http://www.syrres.com/esc/physdemo.htm>).

Nach Oxidation ist für die Produkte eine Erhöhung des Siedepunkts zu verzeichnen. Durch die gleichzeitig verbesserte Wasserlöslichkeit sinkt auch der logP_{Oct}-Wert und damit die potentiell toxische Wirkung auf Mikroorganismen.

1.1.3 Produkthemmung

Mit Hilfe des *p*NCA-Assays (siehe Material und Methoden, 2.3.5, S. 38) wurde der Einfluss der Oxidationsprodukte auf P450_{BM-3} QM überprüft. Dazu wurden Bestimmungen der P450-Aktivität mit und ohne Zusatz einer Inhibitorlösung bestehend aus 1 mM α -Pinenoxid, 0,5 mM Verbenol und 0,5 mM Myrtenol durchgeführt. Nach Expression in *E. coli* BL21 (DE3) und anschließendem Zellaufschluss konnte in Rohzelleextrakten nach Zugabe von NADPH die Oxidation von 12-*p*NCA durch P450_{BM-3} QM nachgewiesen werden. Bei einer Assaytemperatur von 25°C, einem pH-Wert von 8,2 und einem DMSO-Anteil von 1% (v/v) konnte durch Variation der 12-*p*NCA-Konzentration zwischen 6-300 μ M eine Kinetik aufgenommen und in einer Lineweaver-Burk Auftragung dargestellt werden (Abb. 9).

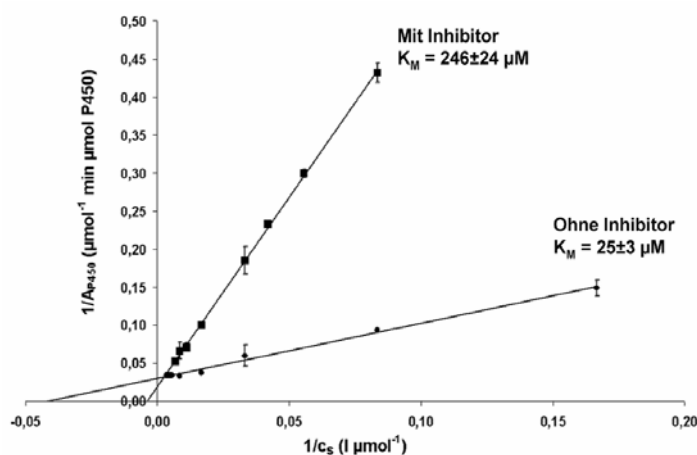


Abb. 9: Lineweaver-Burk Auftragung der *in vitro* Oxidation von 12-*p*NCA durch P450_{BM-3} QM bei 25°C, 1% (v/v) DMSO und pH 8,2 mit (■) und ohne (●) Zusatz einer Inhibitorlösung. Mittelwerte und Fehlerbalken von Doppelbestimmungen sind gezeigt. Die Inhibitorlösung bestand aus 1 mM α -Pinenoxid, 0,5 mM Verbenol

und 0,5 mM Myrtenol. c_S : Substratkonzentration ($\mu\text{mol l}^{-1}$); A_{P450} : Aktivität bezogen auf P450-Konzentration ($\mu\text{mol min}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}_{P450}$).

Aus der linearen Regression der Lineweaver-Burk Auftragung errechneten sich für den *in vitro* Ansatz ohne Inhibitorlösung aus dem Schnittpunkt mit der Abszisse ein K_M von $25 \pm 3 \mu\text{M}$ und aus dem Schnittpunkt mit der Ordinate ein k_{cat} von $0,6 \pm 0,03 \text{ s}^{-1}$ für die Bildung von *p*-Nitrophenolat bei 25°C und pH 8,2. Unter gleichen Bedingungen wurde nach Zusatz der Inhibitorlösung eine drastische Erhöhung des K_M -Wertes auf $246 \pm 24 \mu\text{M}$ festgestellt während der k_{cat} mit $0,8 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$ sich in derselben Dimension wie bei der Messung ohne Zusatz der Inhibitorlösung bewegte. Erhöhte K_M -Werte kombiniert mit gleich bleibenden k_{cat} -Werten sind Charakteristika einer kompetitiven Enzymhemmung.

1.1.4 Produktstabilität und Entkopplung

Die Stabilität der Produkte α -Pinenoxid, Verbenol und Myrtenol gegen weitere P450_{BM-3} QM katalysierte Oxidationen wurde *in vitro* durch spektrophotometrische Analyse des NADPH-Verbrauchs nach Zugabe von Stammlösungen in DMSO überprüft. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tab. 19 zusammengefasst.

Tab. 19: NADPH-Verbrauchsrate von P450_{BM-3} QM nach Zugabe von je 0,5 mM Terpen bei 25°C , 1% (v/v) DMSO und pH 7,5. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen einer Vierfachbestimmung.

Terpen	NADPH-Verbrauchsrate ($\mu\text{mol min}^{-1} \mu\text{mol}^{-1} \text{P450}$)
α -Pinenoxid	0
Verbenol	$10 \pm 2,6$
Myrtenol	$151 \pm 5,8$

Auffällig war die hohe NADPH-Verbrauchsrate von P450_{BM-3} QM, wenn Verbenol und vor allem Myrtenol als Substrat angeboten wurde. Nach Extraktion der Reaktionslösung und anschließender GC-MS-Analyse konnte jedoch kein sich von Verbenol oder Myrtenol ableitendes Oxidationsprodukt gefunden werden. Daraus wurde geschlossen, dass Verbenol und vor allem Myrtenol die Entkopplung der NADPH-Oxidation von der Substratoxidation fördern.

1.2 Aktivität *in vivo* - Vorcharakterisierung der Biokatalyse im Erlenmeyerkolben

Nachdem die Aktivität von P450_{BM-3} QM gegen α -Pinen *in vitro* nachgewiesen werden konnte (Abb. 7), wurden erste Versuche zur *in vivo* Biotransformation von α -Pinen mit ganzen *E. coli*-Zellen, die rekombinant P450_{BM-3} QM exprimieren, durchgeführt. Um eine Vorcharakterisierung der Biotransformation im Zweiphasensystem innerhalb eines überschaubaren Zeitraums realisieren zu können, wurde der Erlenmeyerkolben als leicht handhabbares Reaktionssystem gewählt. Die Ganzzellbiokatalysatoren wurden in Komplexmedium im Erlenmeyerkolben vermehrt, die rekombinante Proteinexpression induziert und nach einer gewissen Expressionszeit wurde die Biotransformation durch Zugabe von reinem α -Pinen als organische Phase gestartet und durch gaschromatographische Analyse verfolgt.

1.2.1 Produkte der Biotransformation im Erlenmeyerkolben

Kulturen von *E. coli* BL21 (DE3) (Negativkontrolle) und BL21 (P450_{BM-3} QM) wurden mit einer Phase aus α -Pinen überschichtet und in Erlenmeyerkolben auf einem Rotationsinkubator inkubiert. Das Volumenverhältnis wässrige zu organische Phase betrug dabei 4:1. Während bei Ganzzellbiotransformationen mit *E. coli* BL21 (DE3) als Negativkontrolle keine Oxidationsprodukte festgestellt werden konnten, wurden Signale von α -Pinenoxid, Verbenol und Myrtenol gefunden, wenn BL21 (P450_{BM-3} QM) als Ganzzellbiokatalysator verwendet wurde. Die Produkte wurden durch Verwendung einer GC-MS anhand Retentionszeitenvergleichs mit kommerziell erhältlichen Standards und ihrer Massenspektren identifiziert. Für *trans*-Verbenol war kein kommerzieller Standard erhältlich, jedoch konnte eine Identifizierung über Spuren von *trans*-Verbenol in einem *cis*-Verbenolstandard erfolgen. Abb. 10 zeigt Chromatogramme einer gaschromatographischen Analyse der α -Pinenphase nach 2 Stunden Biotransformationszeit im Vergleich mit Signalen entsprechender GC-Standards und Proben aus der α -Pinenphase der Negativkontrolle.

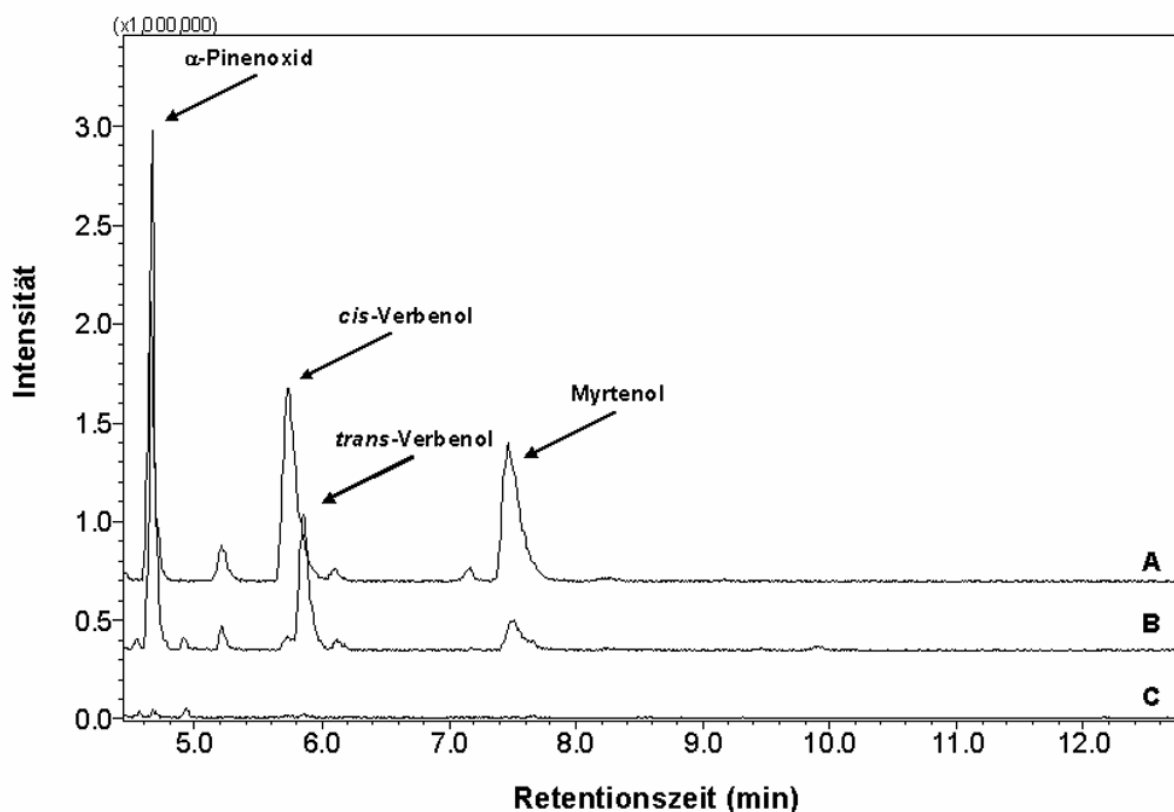


Abb. 10: GC-MS-Analyse der α -Pinenphase nach 2 h Biotransformation mit $5 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ l}^{-1}$ Ganzzellbiokatalysator *E. coli* BL21 (P450_{BM-3} QM) in einem wässrig-organischem Zweiphasensystem (Phasenverhältnis 4:1). Chromatogramm A: GC-Standards (je 0,25 mM α -Pinenoxid, *cis*-Verbenol und Myrtenol); Chromatogramm B: Produkte der Biotransformation mit BL21 (P450_{BM-3} QM) α -Pinenoxid, *trans*-Verbenol und Myrtenol; Chromatogramm C: Negativkontrolle [*E. coli* BL21 (DE3)].

Durch Vergleich mit der Negativkontrolle konnte die Produktbildung auf die Aktivität von rekombinant exprimierter P450_{BM-3} QM zurückgeführt und eine Autoxidation des Substrats während der Biotransformation sowie mögliche störende Einflüsse *E. coli* eigener Enzymaktivitäten ausgeschlossen werden. Der Ganzzellbiokatalysator BL21 (P450_{BM-3} QM) ist in der Lage α -Pinen aufzunehmen, zu oxyfunktionalisieren und die Produkte in die organische Phase abzugeben.

1.2.2 Einflussfaktoren auf Produktbildung

Innerhalb der Vorcharakterisierung der Biotransformation im Erlenmeyerkolben wurden die verschiedenen Parameter, die die Produktbildung beeinflussen können, näher untersucht.

1.2.2.1 Biotrockenmasse

Die gebräuchlichste Herangehensweise zur Steigerung der Produktivität eines Bioprozesses ist die Steigerung der Zellkonzentration im Bioreaktor. Daher wurde der Einfluss verschiedener Biotrockenmassekonzentrationen des Ganzzellbiokatalysators BL21 (P450_{BM-3} QM) auf

die Produktbildung untersucht. In einem Zweiphasensystem aus 48 ml TB-Medium und 12 ml α -Pinen wurden verschiedene Mengen des Ganzzellbiokatalysators BL21 (P450_{BM-3} QM) (zellinterne P450-Konzentration 0,3 $\mu\text{mol g}^{-1}$ BTM) suspendiert und die Masse der gebildeten Produkte nach 2 h Biotransformationszeit bei 37°C und 300 rpm verglichen (Abb. 11).

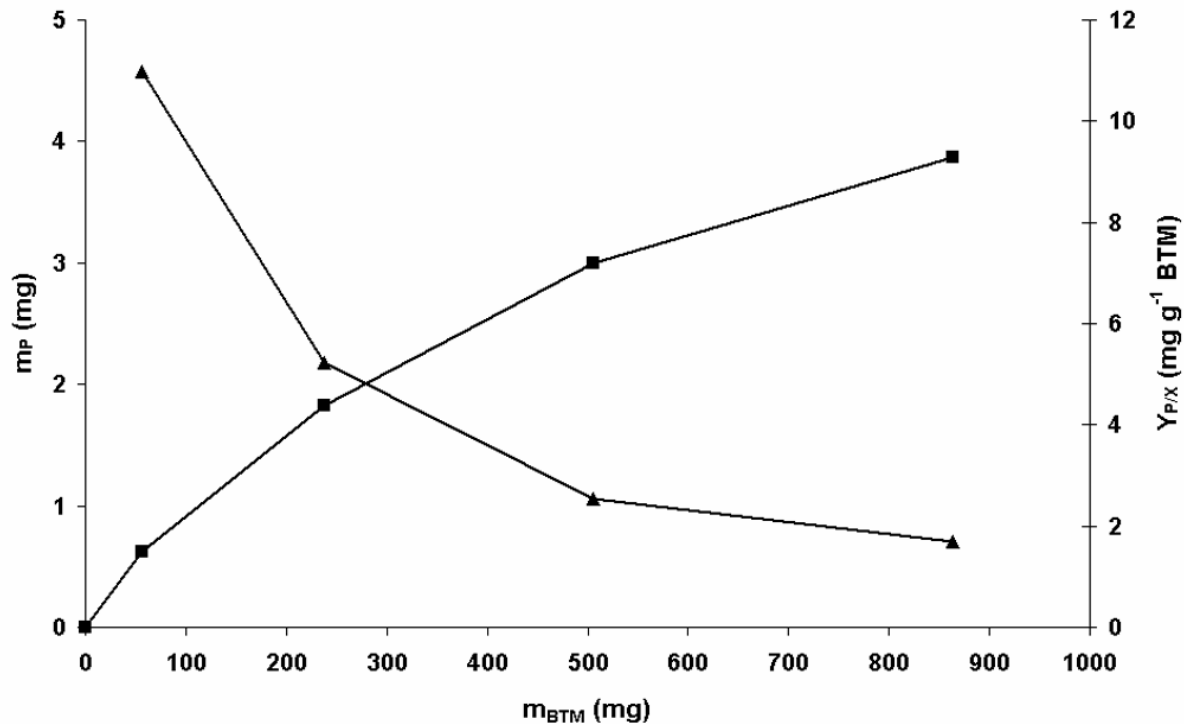


Abb. 11: Zusammenhang zwischen der Masse an Ganzzellbiokatalysator BL21 (P450_{BM-3} QM) m_{BTM} und der Masse an oxidierten Produkten (α -Pinenoxid, Verbenol und Myrtenol) m_{P} (\blacksquare) bzw. der spezifischen Produktausbeute $Y_{\text{P/X}}$ (\blacktriangle) nach 2 h Biotransformation bei 37°C und 300 rpm im Erlenmeyerkolben. Wässrige Phase: 48 ml TB-Medium; organische Phase: 12 ml α -Pinen.

Mit der Masse an eingesetztem Ganzzellbiokatalysator stieg erwartungsgemäß die Masse der gebildeten Oxidationsprodukte α -Pinenoxid, Verbenol und Myrtenol. Dabei wurde ein nicht-linearer Zusammenhang zwischen Biotrockenmasse und akkumulierter Menge an Oxidationsprodukten beobachtet.

Entsprechend zu dem in Abb. 11 dargestellten Zusammenhang zwischen der eingesetzten Ganzzellbiokatalysatormasse und der Masse der gebildeten Produkte sank die spezifische Produktausbeute $Y_{\text{P/X}}$ mit steigender Masse an eingesetztem BL21 (P450_{BM-3} QM). Mit steigenden Biotrockenmassekonzentrationen sank also die Produktivität der einzelnen Zelle. So wurden mit 60 mg Biotrockenmasse 4,6 mg oxidierte Produkte g^{-1} BTM, dagegen mit 860 mg Biotrockenmasse nur ca. 2 mg oxidierte Produkte g^{-1} BTM gebildet.

Mit steigender Masse an eingesetztem Ganzzellbiokatalysator BL21 (P450_{BM-3} QM) wurde als weiteres Phänomen eine Verlängerung der Produktbildungsphase beobachtet. War die Produktbildungsphase bei 60 mg BL21 (P450_{BM-3} QM) schon nach 45 min beendet, so konnten 860 mg Ganzzellbiokatalysator die Produktbildung über 1,5 h aufrechterhalten.

1.2.2.2 Inhibierung des Biokatalysators

In einer Reihe von Versuchen während der Vorcharakterisierung der Biotransformation im Erlenmeyerkolben wurde festgestellt, dass unabhängig vom Volumenanteil des zugegebenen α -Pinen (20-40% (v/v)) bei vergleichbaren Biotrockenmasskonzentrationen, Energieeintrag und Temperaturen reproduzierbar die Produktbildung nach ca. 1-1,5 h eingestellt wurde. Nach Beendigung der Produktbildung wurden immer typische Produktverhältnisse von 5:2:1 für α -Pinenoxid, Verbenol und Myrtenol gefunden. Abb. 12 zeigt die typische Entwicklung der spezifischen Produktkonzentrationen $Y_{P/X}$ ($\text{mg g}^{-1}_{\text{BTM}}$) von α -Pinenoxid, Verbenol und Myrtenol bei einer Biotransformation von 80 ml α -Pinen mit 0,6 g Biotrockenmasse von BL21 (P450_{BM-3} QM), die 0,25 $\mu\text{mol g}^{-1}_{\text{BTM}}$ P450_{BM-3} QM enthielten, suspendiert in 120 ml TB-Medium im Erlenmeyerkolben (Phasenverhältnis 3:2).

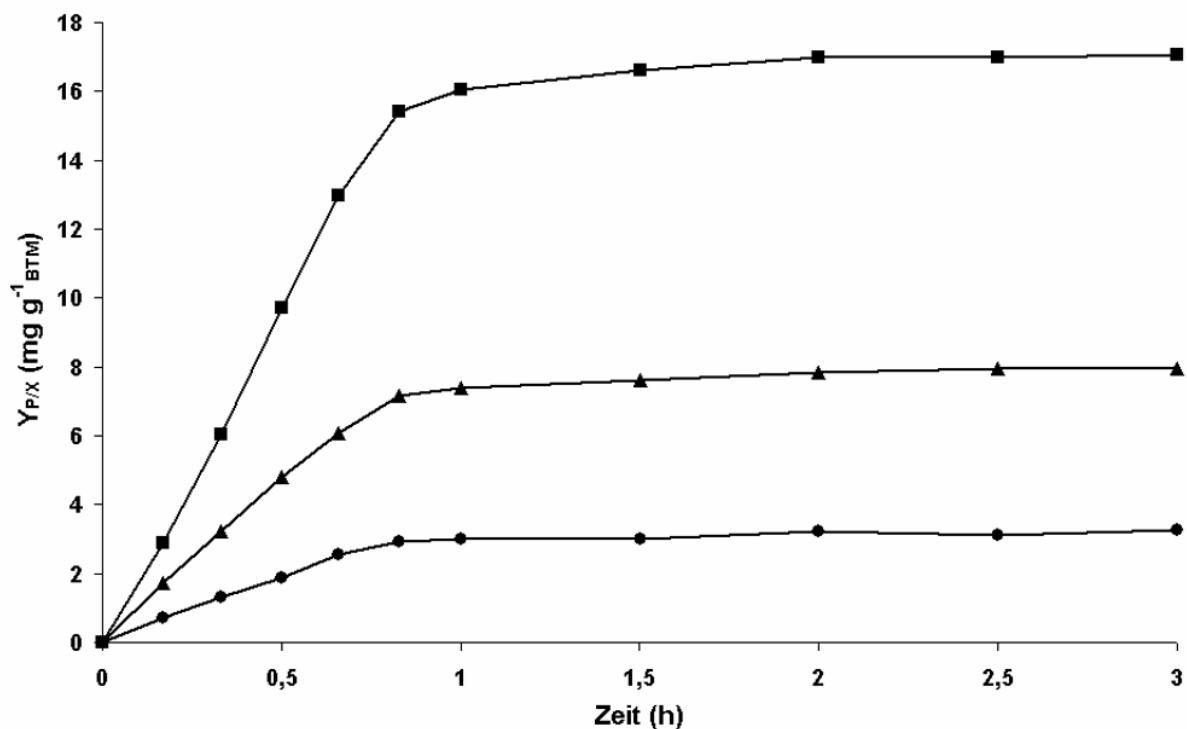


Abb. 12: Typischer zeitlicher Verlauf der Biotransformation von α -Pinen zu α -Pinenoxid (■), Verbenol (▲) und Myrtenol (●) durch $5,3 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ l}^{-1}$ BL21 (P450_{BM-3} QM) im Erlenmeyerkolben bei 37°C und 300 rpm. Dargestellt ist die zu jedem Zeitpunkt gebildete spezifische Produktausbeute $Y_{P/X}$ ($\text{mg g}^{-1}_{\text{BTM}}$). Das Phasenverhältnis der wässrigen Phase zur α -Pinenphase betrug 3:2.

Der negative Einfluss einer organischen Phase aus reinem α -Pinen auf *E. coli* BL21 (DE3) wurde in einem Experiment im Erlenmeyerkolben untersucht. Verschiedene Volumenanteile α -Pinen wurden zu in 40 ml M9-Medium suspendierten *E. coli*-Zellen gegeben und die spezifische Glucoseverbrauchsrate über 4 h gemessen und mit einer Positivkontrolle ohne Zugabe einer organischen Phase verglichen. Bereits ein geringer Volumenanteil von 5% (v/v)

α -Pinen führte zu einer drastischen Verminderung der spezifischen Glucoseverbrauchsrate (vgl. Abb. 17, Absatz 3.2, S. 65).

2 Molekularbiologische Optimierung der Biokatalysatoreigenschaften

Durch die Expression hoher intrazellulärer Konzentrationen ($0,3\text{-}0,5 \mu\text{mol g}^{-1}_{\text{BTM}}$) einer hochaktiven P450-Monooxygenase (*in vitro* NADPH-Verbrauchsrate von $27,6 \pm 0,5 \mu\text{mol min}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}_{\text{P450}}$ für α -Pinen bei 37°C) wird der intrazelluläre Pool des anabolen Cofaktors NADPH in Gegenwart des Substrates α -Pinen stark belastet. Eine molekularbiologische Integration eines Cofaktorregenerationssystems würde die *E. coli* eigenen zellinternen NADPH-Regenerationsreaktionen unterstützen und könnte die Aktivität des Ganzzellbiokatalysators, für den Fall einer vorliegenden NADPH-Limitierung, steigern.

Abb. 13 zeigt eine schematische Darstellung eines optimierten Ganzzellbiokatalysators BL21 ($\text{P450}_{\text{BM-3}} \text{QM}/\text{GlcDH}/\text{GLF}$) der durch rekombinante Expression eines Glucosefacilitators (GLF) aus *Zymomonas mobilis* und einer Glucosedehydrogenase (GlcDH) aus *Bacillus megaterium* über eine rekombinante intrazelluläre Cofaktorregenerierung verfügt. GLF katalysiert die Aufnahme von extrazellulär vorliegenden Glucosemolekülen über die Zellmembran ins Zytoplasma, ohne dabei metabolische Energie in Form von Protonenpotentialen oder Phosphoenolpyruvat zu benötigen oder Veränderungen (z.B. Phosphorylierung) am Glucosemolekül vorzunehmen (Weisser et al. 1995).

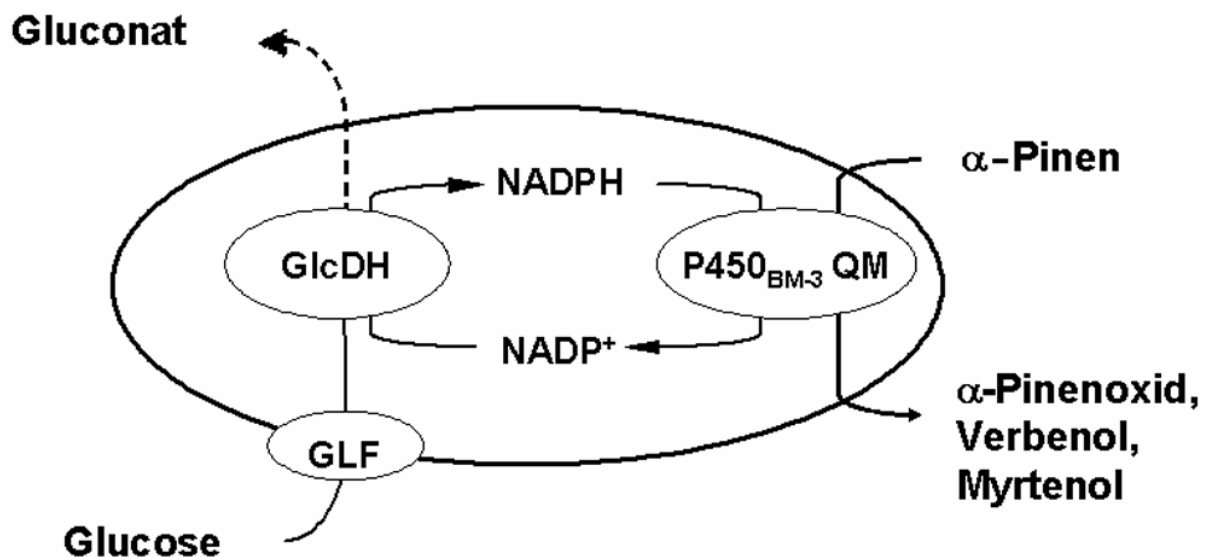


Abb. 13: Optimierter Ganzzellbiokatalysator BL21 ($\text{P450}_{\text{BM-3}} \text{QM}/\text{GlcDH}/\text{GLF}$) mit verbesserter intrazellulärer Cofaktorregenerierung angetrieben durch extrazelluläre Glucose. GLF: Glucosefacilitator; GlcDH: Glucosedehydrogenase; $\text{P450}_{\text{BM-3}} \text{QM}$: Fünffachvariante der P450-Monooxygenase CYP102A1.

Glucose wird intrazellulär von GlcDH unter Reduktion eines NADP^+ -Moleküls zu Gluconolacton oxidiert, welches spontan zu Gluconat hydrolysiert. Regenerierte NADPH-Moleküle stehen P450_{BM-3} QM zur Oxidation von α -Pinen zu α -Pinenoxid, Verbenol und Myrtenol zur Verfügung

2.1 *In vitro* Analyse des rekombinanten intrazellulären Cofaktorregenerationssystems

Nach erfolgreicher Klonierung von P450_{BM-3} QM und GlcDH in pETDUET-1 wurde die Expression und die prinzipielle Funktionsfähigkeit der Komponenten des Cofaktorregenerationssystems *in vitro* mit Rohzellextrakten von BL21 (GlcDH), BL21 (P450_{BM-3} QM) und BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) gemessen.

2.1.1 Expressionsanalysen

Die rekombinante Expression von P450_{BM-3} QM und GlcDH wurde durch SDS-PAGE-Analyse von Rohzellextrakten bestätigt. Untersuchungen von Rohzellextrakten von BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) ergaben, dass obwohl drei rekombinante Proteine exprimiert werden die intrazellulären Konzentrationen von P450_{BM-3} QM, abhängig von den Expressionsbedingungen, annähernd vergleichbare Werte im Vergleich zu Expressionstitern in BL21 (P450_{BM-3} QM)-Rohzellextrakten erreichten. P450_{BM-3} QM wurde von BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) in seiner katalytisch aktiven Form exprimiert, da in entsprechenden Rohzellextrakten im Differenzspektrum nur geringe Peakintensitäten bei 420 nm, was dem Absorptionsmaximum inaktiver P450-Monooxygenasen entspricht, gemessen werden konnten. Die Aktivität von P450_{BM-3} QM war dabei laut Ergebnissen aus *p*NCA-Assays vergleichbar mit Werten aus Rohzellextrakten von BL21 (P450_{BM-3} QM).

Für die Aktivitätsmessung von GLF benutzten Weisser et al. (1995) radioaktiv markierte Glucosemoleküle und konnten nach Messung bei Temperaturen von 5°C bis 20°C einen v_{\max} von 410 nmol min⁻¹ mg⁻¹_{BTM} bei 30°C extrapolieren. Die Aktivität von GLF wurde innerhalb dieser Arbeit nicht direkt gemessen. Die Expression von GLF wurde indirekt durch Nachweis der durch *pZY507glf* kodierten Chloramphenicoltransferase-Bande in Rohzellextrakten nach SDS-PAGE bestätigt. Für BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) konnten aufgrund der GLF-Aktivität unter gleichen Versuchsbedingungen im Vergleich höhere spezifischen Glucoseaufnahmeraten gemessen werden als für BL21 (P450_{BM-3} QM) und BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH).

2.1.2 *In vitro* Aktivitätsmessungen

Die Aktivität von GlcDH wurde durch spektrophotometrische Messung der NADPH-Bildung nach Zugabe von Glucose bestätigt. Vor *in vivo* Ganzzellbiotransformationen wurden zum Nachweis der erfolgreichen Kopplung von NADPH-Verbrauch und -Regeneration *in vitro* *p*NCA-Assays durchgeführt. Dazu wurde in einem Experiment Rohzellextrakt von BL21 (P450_{BM-3} QM) und Mischungen von Rohzellextrakten von BL21 (P450_{BM-3} QM) und BL21

(GlcDH) verwendet. Zunächst wurde die Aktivität von P450_{BM-3} QM im Rohzellextrakt von BL21 (P450_{BM-3} QM) unter Standardbedingungen des *p*NCA-Assays und Verwendung von 0,1 mM NADPH als Elektronendonator gemessen. Im nächsten Schritt wurde NADPH durch Rohzellextrakt von BL21 (GlcDH) mit 60 U ml⁻¹ (pH 7,5, 25°C) GlcDH, 10 mM Glucose und 0,1 mM NADP⁺ ersetzt. Auch in diesem Ansatz konnte P450_{BM-3} QM-Aktivität in Form von 12-*p*NCA-Oxidation beobachtet werden und zwar mit vergleichbaren Wechselzahlen von 0,8 s⁻¹ (20°C, pH 8,2) wie mit NADPH als Elektronendonator.

In weiterführenden Untersuchungen der Assaybedingungen mit Rohzellextrakten von BL21 (P450_{BM-3} QM) und BL21 (GlcDH) konnte gezeigt werden, dass NADP⁺-Konzentrationen zwischen 0,1-1 mM keinen Einfluss auf die Aktivität von P450_{BM-3} QM hatten.

Obwohl bei *in vitro* *p*NCA-Assays kein GLF-katalysierter Transmembrantransport von Glucose nötig ist, wurden Untersuchungen in Rohzellextrakten von BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) durchgeführt, um Messungen zum funktionellen Zusammenwirken von P450_{BM-3} QM und GlcDH bei den entsprechenden Expressionstern durchzuführen. Verschiedene Glucosekonzentrationen von 0-50 mM wurden neben 0,1 mM NADP⁺ und 45 μM 12-*p*NCA zu Zellysat von BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) gegeben, welches 0,2 μM P450_{BM-3} QM und 8,2 U ml⁻¹ (25°C, pH 7,5) GlcDH enthielt. Ohne Glucosezusatz wurde auch keine *p*-Nitrophenolatbildung gemessen. Mit steigender Glucosekonzentration stieg auch die Wechselzahl der 12-*p*NCA-Oxidation. Ab Glucosekonzentrationen von 10 mM wurde kein weiterer Aktivität fördernder Effekt auf die *p*-Nitrophenolatbildung durch P450_{BM-3} QM beobachtet (Abb. 14).

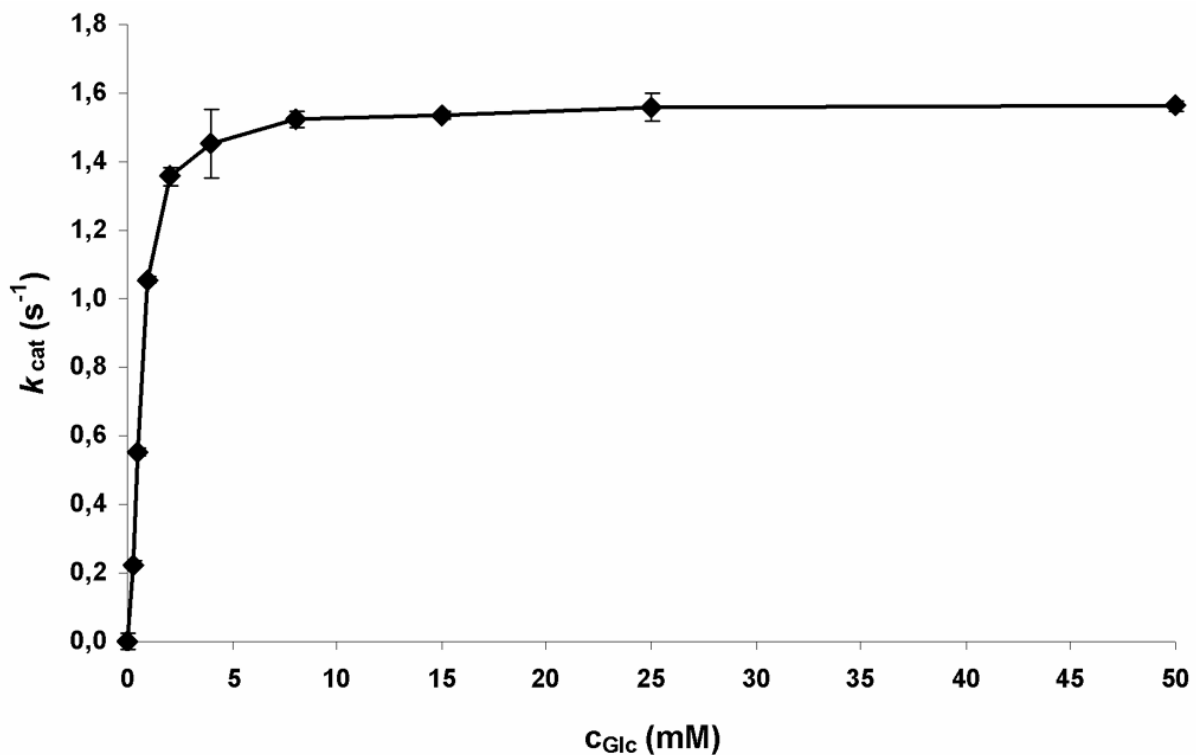


Abb. 14: Einfluss verschiedener Glucosekonzentrationen c_{Glc} (mM) auf die Wechselzahl k_{cat} (s^{-1}) der *in vitro* Oxidation von 12-*p*NCA durch P450_{BM-3} QM in Rohzellextrakten von BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) in Gegenwart von 0,1 mM NADP⁺, T = 25°C, pH 8,2. Mittelwerte und Fehlerbalken von Doppelexperimenten sind angegeben.

In einem weiteren Experiment mit Rohzellextrakten von BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) wurden die Wechselzahlen für P450_{BM-3} QM-katalysierte 12-*p*NCA-Oxidation mit Zugabe von 0,1 mM NADPH als Cofaktor mit Wechselzahlen nach Zugabe von 0,1 mM NADP⁺ und 10 mM Glucose verglichen. Wenn NADPH als Cofaktor eingesetzt wurde, konnte ein k_{cat} von $0,9 \pm 0,03 \text{ s}^{-1}$ gemessen werden. Der Austausch von NADPH durch NADP⁺ und Glucose ergab einen vergleichbaren k_{cat} -Wert von $0,9 \pm 0,06 \text{ s}^{-1}$. Der Unterschied zu den k_{cat} -Werten in Abb. 14 ist mit der hier verwendeten geringeren Assaytemperatur von 20°C zu erklären.

2.2 Vergleich der katalytischen *in vivo* Aktivität von BL21 (P450_{BM-3} QM) und BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) in einem wässrig-organischen Zweiphasensystem

Um den Einfluss des rekombinanten intrazellulären Cofaktorregenerationssystems auf die Biotransformation bei der *in vivo* Oxidation von α -Pinen durch Ganzzellbiokatalysatoren mit und ohne heterologe Cofaktorregenerierung zu ermitteln, wurden BL21 (P450_{BM-3}

QM/GlcDH/GLF) und BL21 (P450_{BM-3} QM) hinsichtlich ihrer Biotransformationsaktivität im Erlenmeyerkolben miteinander verglichen.

Zunächst wurden die Biotransformationsergebnisse von jeweils 4,5 g_{BTM} l⁻¹ BL21 (P450_{BM-3} QM) und BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) in einem wässrig-organischen Zweiphasensystem im Erlenmeyerkolben mit reinem α -Pinen als organische Phase und in Gegenwart von 10 g l⁻¹ Glucose verglichen. Beide Stämme zeigten zu Beginn des Experiments in Rohzellextrakten vergleichbare P450_{BM-3} QM-Konzentrationen von umgerechnet 0,33-0,4 $\mu\text{mol g}^{-1}_{\text{BTM}}$ sowie Wechselzahlen der *p*-Nitrophenolatbildung von $k_{\text{cat}} = 0,7 \pm 0,05 \text{ s}^{-1}$. Die Aktivität der GlcDH in BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) war $1,4 \cdot 10^4 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}_{\text{BTM}}$ bei pH 7,5 und Raumtemperatur.

In Abb. 15 ist die Produktbildung von α -Pinenoxid während einer Ganzzellbiotransformation mit BL21 (P450_{BM-3} QM) und BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) in Form der spezifischen Produktausbeute $Y_{P/X}$ dargestellt.

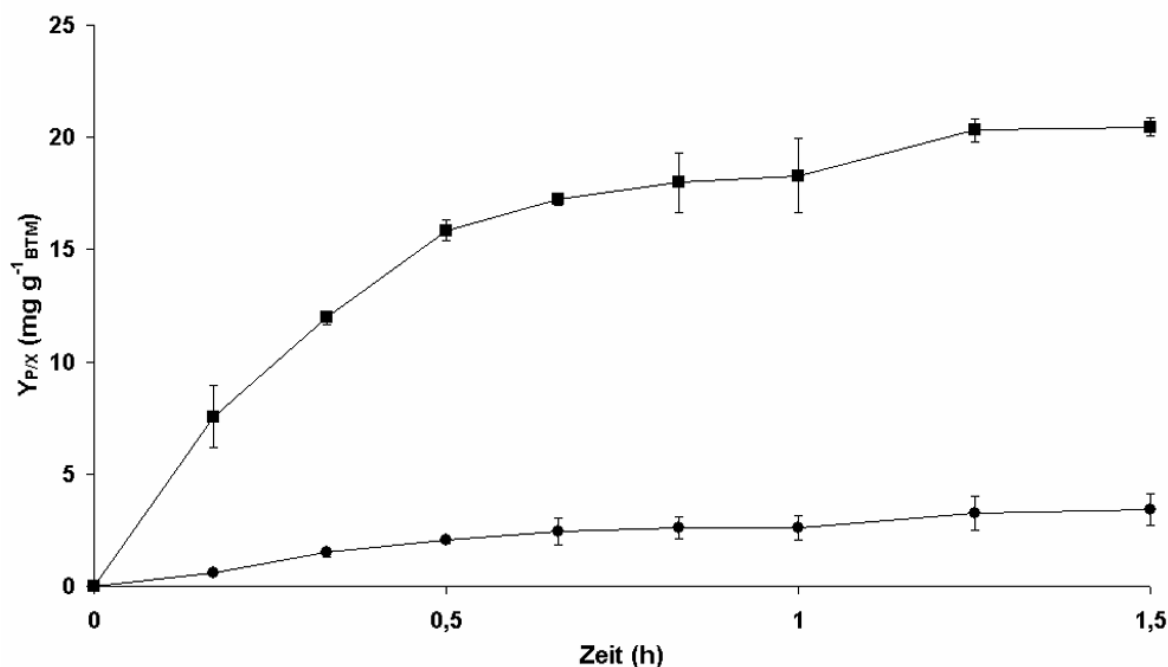


Abb. 15: Zeitlicher Verlauf der spezifischen Produktausbeute $Y_{P/X}$ (mg g⁻¹ BTM) von Pinenoxid bei der Oxidation von α -Pinen mit je 4,5 g_{BTM} l⁻¹ BL21 (P450_{BM-3} QM) (●) und BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) (■) im Erlenmeyerkolben. Wässrige Phase: 120 ml TB-Medium; organische Phase: 80 ml α -Pinen, Biotransformationstemperatur 37°C. Mittelwerte mit Fehlerbalken aus Doppelerperimenten sind gezeigt.

BL21 (P450_{BM-3} QM) produzierte in 1,5 h $3 \pm 0,7$ mg des Hauptproduktes α -Pinenoxid pro Gramm Biotrockenmasse. In derselben Zeit war BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) in der Lage, $20 \pm 0,4$ mg α -Pinenoxid g⁻¹ BTM herzustellen, was ungefähr einer Versechsfachung der Produktausbeute $Y_{P/X}$ entspricht. Gleichzeitig stieg die spezifische initiale Produktbildungsrate Q von α -Pinenoxid in den ersten 30 min von 67 ± 3 auf $616 \pm 3 \mu\text{mol h}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}_{\text{P450}}$. Die

Bildung der anderen Produkte der Oxidation von α -Pinen, Verbenol und Myrtenol zeigte ebenfalls einen Anstieg von $Y_{P/X}$ und Q , wenn BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) als Ganzzellbiokatalysator verwendet wurde (Tab. 20).

Tab. 20: Spezifische initiale Produktbildungsrate Q über die ersten 30 min Reaktionszeit und spezifische Produktausbeuten $Y_{P/X}$ von α -Pinenoxid, Verbenol und Myrtenol nach 1,5 h Ganzzellbiotransformation von reinem α -Pinen mit je $4,5 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ l}^{-1}$ BL21 (P450_{BM-3} QM) und BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) im Erlenmeyerkolben bei einer Biotransformationstemperatur von 37°C .

	$Q \text{ (}\mu\text{mol h}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}_{\text{P450}}\text{)}$			$Y_{P/X} \text{ (mg g}^{-1}_{\text{BTM}}\text{)}$		
	α -Pinenoxid	Verbenol	Myrtenol	α -Pinenoxid	Verbenol	Myrtenol
BL21 (P450_{BM-3} QM)	67 ± 3	68 ± 5	62 ± 3	$3 \pm 0,7$	$2 \pm 0,3$	$2 \pm 0,2$
BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF)	616 ± 3	248 ± 1	145 ± 11	$20 \pm 0,4$	$8 \pm 0,2$	$4 \pm 0,2$

Betrachtet man die Gesamtproduktbildung, so erreichte BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) eine spezifische initiale Produktbildungsrate von ungefähr $1000 \mu\text{mol h}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}_{\text{P450}}$ und bildete 32 mg oxidierte Produkte $\text{g}^{-1}_{\text{BTM}}$. Von BL21 (P450_{BM-3} QM) wurden lediglich 7 mg oxidierte Produkte $\text{g}^{-1}_{\text{BTM}}$ mit einer spezifischen initialen Produktbildungsrate von ca. $200 \mu\text{mol h}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}_{\text{P450}}$ akkumuliert.

BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH), der nicht über das rekombinante Glucoseaufnahmesystem verfügt, zeigte sehr viel geringere Produktausbeuten als BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF). Ebenfalls wurde keine Verbesserung der Produktbildung nach dem Zusatz von Glucose beobachtet.

In einem weiteren Experiment wurde eben dieser Einfluss von Glucosezusatz auf die katalytische Aktivität von BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) in einem Zweiphasensystem im Erlenmeyerkolben untersucht. Dazu wurden die Unterschiede bei der Produktbildung in Ansätzen mit und ohne Glucosezusatz verglichen. Der intrazelluläre Expressionstiter von P450_{BM-3} QM betrug $0,2\text{-}0,3 \mu\text{mol g}^{-1}_{\text{BTM}}$. Alle Analysen von *in vitro* Tests der Wechselzahlen von *p*-Nitrophenolatbildung bei Raumtemperatur betrug $k_{\text{cat}} = 0,9 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$ und GlcDH zeigte *in vitro* eine NADPH-Bildungsrate von $1,4 \cdot 10^4 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}_{\text{BTM}}$ bei pH 7,5 und Raumtemperatur. Abb. 16 zeigt, dass mit $3 \pm 2,5 \text{ mg}$ α -Pinenoxid $\text{g}^{-1}_{\text{BTM}}$ nach 1,5 h nur wenig α -Pinen oxidiert wurde, wenn keine Glucose zu BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) in der wässrigen Phase zugefügt wurde.

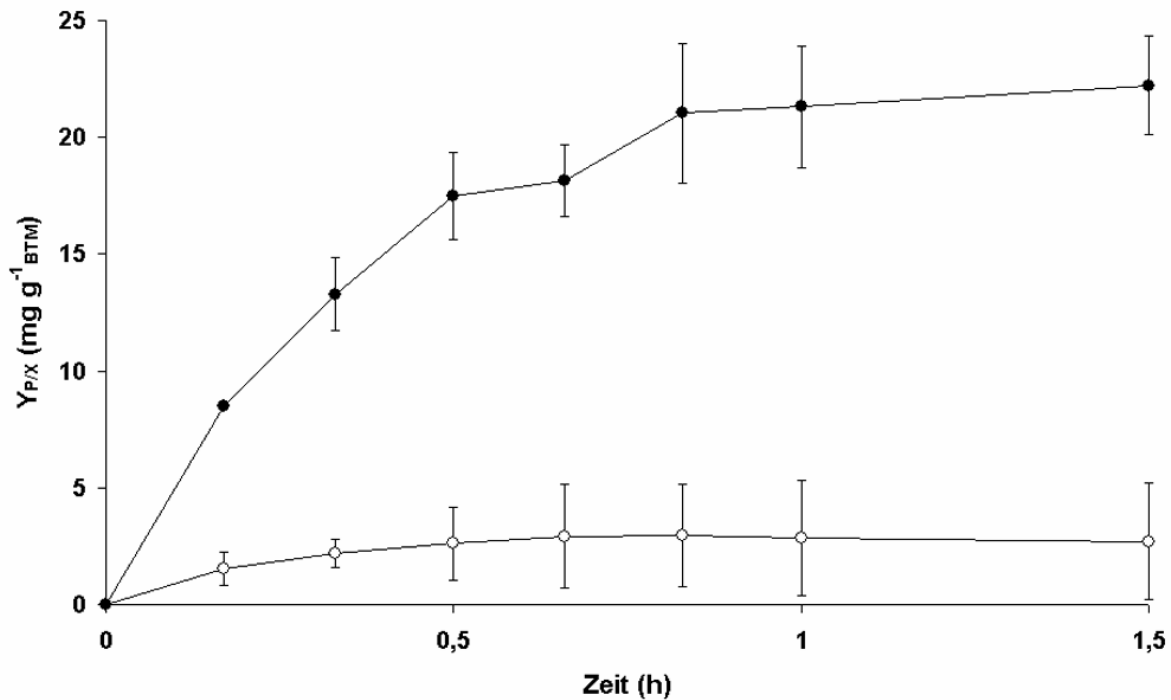


Abb. 16: Zeitlicher Verlauf der spezifischen Produktausbeute $Y_{P/X}$ (mg g⁻¹_{BTM}) von Pinenoxid bei der Oxidation von α -Pinen mit BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) als Ganzzellbiokatalysator mit (●) und ohne (○) Glucosezusatz zur wässrigen Phase. Wässrige Phase: 120 ml TB-Medium; organische Phase: 80 ml α -Pinen; Biotransformationstemperatur 37°C. Mittelwerte mit Fehlerbalken aus Doppelerperimenten sind gezeigt.

Wurde Glucose in einer Konzentration von 10 g l⁻¹ der wässrigen Phase zugesetzt, so erhöhte sich die Produktausbeute $Y_{P/X}$ um das Siebenfache auf 22±2 mg α -Pinenoxid g⁻¹_{BTM}. Gleichzeitig sank während der ersten Stunde der Biotransformation die Glucosekonzentration in der wässrigen Phase um 33% als Folge der Aktivität von GLF und GlcDH, während die Glucosekonzentration bei einer Negativkontrolle (BL21 (P450_{BM-3} QM)) während dieses Zeitraums unverändert blieb.

3 Bioprozessentwicklung im organisch-wässrigen Zweiphasensystemen

3.1 Screening nach einer geeigneten organischen Trägerphase für den Zweiphasenbioprozess

Abhängig von der Biotrockenmassekonzentration und unabhängig von der Art des eingesetzten Ganzzellbiokatalysators wurde bei allen Ganzzellbiotransformationen im Erlenmeyerkolben, bei denen reines α -Pinen als organische Phase eingesetzt wurde, eine Einstellung der Produktbildung nach ca. 1-1,5 h beobachtet. Der *E. coli*-Ganzzellbiokatalysator war während dieses wässrig-organischen modellhaften Zweiphasenbioprozesses in direktem Kontakt mit dem apolaren Substrat α -Pinen. α -Pinen vermittelt aufgrund seiner chemischen Struktur und seines niedrigen $\log P_{\text{Oct}}$ -Wertes ($\log P_{\text{Oct}} = 4,5$) toxische Effekte, die die Aktivität und Stabilität unter Prozessbedingungen des Ganzzellbiokatalysators negativ beeinflussen. Durch Einsatz eines biokompatiblen organischen Lösungsmittels als Trägerphase für α -Pinen sollen diese toxischen Effekte maskiert, oxidierte Produkte *in situ* abgetrennt und die Produktivität des wässrig-organischen Zweiphasenbioprozesses verbessert werden.

3.1.1 Gewünschte Eigenschaften der organischen Trägerphase

Die organische Trägerphase sollte eine Reihe von obligatorischen und wünschenswerten Kriterien erfüllen (vgl. Einleitung 3.4, S. 21). Biokompatibilität ist hierbei ein obligatorisches Kriterium, da der Ganzzellbiokatalysator in direktem Kontakt mit dem organischen Lösungsmittel steht. Kriterien wurden in der Literatur formuliert (Bruce und Daugulis 1991) und sind in Tab. 21 unter Einbeziehung der in der Arbeit angewendeten Suchkriterien zusammengefasst.

Tab. 21: Eigenschaften und Kriterien zur Identifizierung einer geeigneten organischen Trägerphase zum Einsatz in einem wässrig-organischen Zweiphasensystem.

Eigenschaft^a	Suchkriterium
Biokompatibilität	$\log P_{\text{Oct}}$ 4-5
Geringe Tendenz zur Emulsionsbildung	Geringe Wasserlöslichkeit, großer Dichteunterschied zu Wasser, experimentelle Daten
Geringe Wasserlöslichkeit	Literaturdaten
Vorteilhafte Eigenschaften für Produktaufreinigung	Hoher Siedepunkt, chemische und thermische Stabilität, experimentell bestimmte Verteilungskoeffizienten
Biologisch inert	Literatur und experimentelle Daten
Prozesssicherheit	Hoher Flammpunkt
Günstig	Katalogpreise

a: übernommen aus Bruce und Daugulis (1991)

3.1.2 Literaturrecherche

Literaturdaten wurden nach bereits beschriebenen wässrig-organischen Zweiphasenbioprosessen durchsucht und chemische und physikalische Eigenschaften von 35 organischen Lösungsmitteln zusammengetragen. Durch Einbeziehung der in Tab. 21 aufgelisteten Kriterien konnte diese Auswahl auf 7 organische Lösungsmittel der folgenden Substanzklassen reduziert werden: *n*-Alkane, langkettige Fettsäuren und Fettsäurederivate sowie Phthalate. *n*-Alkane wurden bereits erfolgreich in Ganzzellbiotransformationen mit rekombinanten *E. coli* (Favre-Bulle et al. 1991; Favre-Bulle et al. 1993) eingesetzt und ihre Akkumulation in *E. coli*-Zellen wurde ebenfalls beschrieben (Tsukagoshi und Aono 2000).

Da *n*-Decan und Dodecan mit einem $\log P_{\text{Oct}}$ -Wert von 5-6 nicht toxisch für Gram-negative Bakterien sind (Vermuë et al. 1993), wurden sie für weitere Untersuchungen ausgewählt.

Einige langkettige Fettsäuren wie Ölsäure ($\log P_{\text{Oct}} = 7,7$) und Fettsäuregemische wie Olivenöl ($\log P_{\text{Oct}} = 7,5$), Maisöl ($\log P_{\text{Oct}} = 7,4$) sowie das Fettsäurederivat Stearinsäurebutylester (SBE) ($\log P_{\text{Oct}} = 9,7$) wurden ausgewählt, da sie bereits in Zweiphasensystemen mit *S. cerevisiae* getestet wurden (Stark 2001).

Viele erfolgreiche wässrig-organische Zweiphasenbioprosesse haben Phthalate als organische Trägerphase eingesetzt (Bühler et al. 2003b; Cruz et al. 2004; de Carvalho und da Fonseca 2004; Panke et al. 2002; Panke et al. 2000; Park et al. 2006). Diisononylphthalat (DINP, $\log P_{\text{Oct}} = 9,4$) wurde zur weiteren Untersuchung ausgewählt. DINP wurde *Bis*(2-ethylhexyl)phthalat (BEHP) aufgrund seines niedrigeren Katalogpreises (Sigma-Aldrich)

vorgezogen. Alle ausgewählten organischen Lösungsmittel wurden auf Erfüllung der in Tab. 21 aufgelisteten Eigenschaften hin untersucht.

3.1.3 Biokompatibilität, Emulsionsbildungstendenz, Prozesssicherheit

Die Toxizität von organischen Lösungsmitteln wird nicht nur durch ihren $\log P_{\text{Oct}}$ -Wert bestimmt, sondern hängt auch mit ihrer Molekülstruktur zusammen (Vermü et al. 1993). Daher wurden weitere Biokompatibilitätsuntersuchungen durchgeführt. Spezifische Wachstumsraten μ (h^{-1}) von *E. coli* BL21 (DE3) Submerskulturen in 50 ml TB-Medium im wässrig-organischen Zweiphasensystem im Erlenmeyerkolben mit Zusatz von 10 ml des entsprechenden organischen Lösungsmittels (Phasenverhältnis 5:1) wurden bei 37°C verfolgt. Die spezifischen Wachstumsraten wurden in Relation zur maximalen spezifischen Wachstumsrate μ_{max} (h^{-1}) einer Positivkontrolle ohne Zusatz einer organischen Phase gesetzt. Aus den gemessenen Verhältnissen μ / μ_{max} (-) von 0,8-1 wurde geschlossen, dass alle 7 organischen Lösungsmittel die obligatorische Eigenschaft der Biokompatibilität erfüllten. Während des Versuches mit Ölsäure als organische Phase konnte beobachtet werden, dass sich während der Kultivierung mit *E. coli* BL21 (DE3) eine stabile Emulsion bildet. Dieses Phänomen wurde bei den anderen organischen Lösungsmitteln nicht beobachtet.

Alle 7 organischen Lösungsmittel erfüllten weitere Kriterien wie geringe Wasserlöslichkeit und hohe Flammpunkte, was die Explosionsgefahr mindert und die Prozesssicherheit steigert.

3.1.4 Abbau der organischen Phase

Der Wildtyp von P450_{BM-3} katalysiert die ω -1, ω -2 und ω -3 Hydroxylierung von langkettigen Fettsäuren mit Kettenlängen von C12 bis C22. Die Fünffachvariante P450_{BM-3} QM wurde ursprünglich durch rationelles Design entworfen, um die Aktivität gegen kurzkettige Fettsäuren und andere hydrophobe Substrate zu erhöhen (Lentz et al. 2001). Da einige der ausgewählten organischen Lösungsmittel strukturelle Ähnlichkeiten mit dem Wildtyp-Substrat aufweisen, musste die Inertheit der organischen Lösungsmittel gegen oxidativen Angriff durch P450_{BM-3} QM überprüft werden. Unerwünschte Nebenreaktionen von P450_{BM-3} QM mit den organischen Lösungsmitteln wurde spektrophotometrisch durch *in vitro* Analyse der NADPH-Verbrauchsrate in Rohzelleextrakten von BL21 (P450_{BM-3} QM) gemessen. Laurinsäure wurde als Positivkontrolle verwendet. Die Ergebnisse sind in Tab. 22 aufgeführt.

Tab. 22: NADPH-Verbrauchsrate von P450_{BM-3} QM bei *in vitro* Messungen mit Rohextrakten bei pH 7,5 und Raumtemperatur gemessen bei 340 nm. Dargestellt sind Mittelwerte aus Doppelexperimenten.

Substrat	NADPH-Verbrauchsrate ($\mu\text{mol min}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}_{\text{P450}}$)
Laurinsäure ^a	640±1
Ölsäure	192±2
<i>n</i> -Decan	105±8
Dodecan	46±3
SBE	12±0.9
Olivenöl	12±0.4
Maisöl	7±0.5
DINP	0±0.7

a: Positivkontrolle

Ölsäure, *n*-Decan und Dodecan zeigten deutliche NADPH-Verbrauchsrate und wurden daher als ungeeignet für den Einsatz als organische Trägerphase angesehen. Geringe NADPH-Verbrauchsrate wurden für SBE, Olivenöl und Maisöl gemessen während für DINP kein NADPH-Verbrauch ermittelt wurde.

Langkettige Fettsäuren können von *E. coli* durch β -Oxidation nach einer ausgeprägten lag-Phase abgebaut werden (Nunn 1986). Der mögliche Abbau von Maisöl und Olivenöl, deren Hauptbestandteile langkettige Fettsäuren sind, durch den Zellmetabolismus von *E. coli* macht sie zu ungeeigneten organischen Trägerphasen.

3.1.5 Vorteilhafte Eigenschaften für Produktaufreinigung

DINP und SBE erwiesen sich als biokompatibel und biologisch inert gegen Oxidation durch P450_{BM-3} QM sowie gegen den Abbau durch den Zellmetabolismus von *E. coli* BL21. Destillation ist die wirtschaftlichste Methode, um Produkte aus einer a-priori Phase aufzuarbeiten (Mathys et al. 1998a). Um einen Destillationsschritt zur Produktaufreinigung am Ende des Bioprozesses etablieren zu können, sollte der Siedepunkt der organischen Trägerphase über den Siedepunkten der aufzureinigenden Produkte α -Pinenoxid (185°C), Verbenol (214-215°C) und Myrtenol (221,5°C) liegen. Wegen ihrer hohen Siedepunkte von 400°C bzw. 343°C, die die Siedepunkte der Produkte deutlich übersteigen, ermöglichen DINP und SBE die Verwendung destillativer Produktaufreinigungsmethoden.

3.1.6 Verteilungskoeffizienten

Der Verteilungskoeffizient einer Substanz zwischen einer wässrigen Phase und der organischen Trägerphase gibt die Extraktionseffizienz der organischen Trägerphase an. Mit steigendem Verteilungskoeffizient muss dementsprechend ein geringeres Volumen der organischen Trägerphase eingesetzt werden, um eine effektive Extraktion der Substanz zu erreichen.

Die Verteilungskoeffizienten von Verbenol und Myrtenol wurden in SBE/Wasser- und DINP/Wasser-Systemen im Phasenverhältnis wässriger zu organischer Phase von 1:1 ($v_{\text{Aq}}/v_{\text{Org}}$) bestimmt (Tab. 23).

Tab. 23: Verteilungskoeffizienten von Verbenol und Myrtenol in Zweiphasensystemen, bestehend aus deionisiertem Wasser und SBE bzw. DINP als organische Phase. Das Phasenverhältnis betrug 1:1 ($v_{\text{Aq}}/v_{\text{Org}}$). Mittelwerte und Standardabweichungen von Dreifachexperimenten sind angegeben.

Organische Phase	Substanz und Verteilungskoeffizient	
	Verbenol	Myrtenol
SBE	77,9±5,8	47,1±5,1
DINP	77,5±12,2	74,3±0,3

In der Gegenwart von Wasser unterliegt α -Pinenoxid Autoxidation und Umlagerungsreaktionen (Boontawan und Stuckey 2005; Buffon und Schuchardt 2003). Deshalb wurde im Falle von α -Pinenoxid eine alternative Vorgehensweise zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten gewählt. α -Pinenoxid wurde in DINP gelöst und in einem Zweiphasensystem nach Zugabe von deionisiertem Wasser geschüttelt. Nur Spuren von Autoxidationsprodukten konnten per GC-MS-Analyse in der wässrigen Phase entdeckt werden. Bei Ganzzellbiotransformationen konnte kaum Akkumulation von Autoxidationsprodukten von α -Pinenoxid in der organischen Phase detektiert werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass von einer direkten, praktisch quantitativen Extraktion von α -Pinenoxid in die organische Phase ausgegangen werden kann, sobald es durch den Ganzzellbiokatalysator in der wässrigen Phase gebildet wurde.

Das DINP/Wasser-System zeigte fast identische Verteilungskoeffizienten wie das SBE/Wasser-System. Myrtenol wurde besser von DINP extrahiert. Da SBE einen Schmelzpunkt von 19-22°C aufweist, was als nachteilig für den Betrieb industrieller Bioprozesse angesehen wurde, wurde DINP als organische Trägerphase für die Biotransformation von α -Pinen durch P450_{BM-3} QM ausgewählt.

3.2 Charakterisierung von DINP als Teil eines wässrig-organischen Zweiphasensystems

Um die Auswirkungen von DINP und α -Pinen auf *E. coli* zu untersuchen und um Unterschiede bei den vermittelten toxischen Effekten festzustellen, wurden Experimente im Erlenmeyerkolben durchgeführt. Dazu wurde die Glucoseverbrauchsrate relativ zu einer Positivkontrolle ohne Zusatz einer organischen Phase als Indikator für die Vitalität einer *E. coli* BL21 (DE3) Zellkultur bei steigenden volumetrischen Anteilen von DINP bzw. α -Pinen zwischen 5 und 50% (v/v) ermittelt (Abb. 17). Eine organische Trägerphase, die dem Biokatalysator genug Substrat zur Verfügung stellen und Produkte der Biotransformation aufnehmen kann, muss über eine ausreichende Kapazität verfügen. Deshalb wurde ein volumetrischer Anteil der organischen Phase am Gesamtsystem von 5% (v/v) als untere Grenze gewählt, während 50% (v/v) die Obergrenze eines wässrig-organischen Zweiphasensystems darstellt, bevor es zur Inversion der homogenen Phase kommt und in der Folge ein organisch-wässriges Zweiphasensystem vorliegt. Sinkende Glucoseverbrauchsraten wurden als Vitalitätsverlust interpretiert. Verglichen mit einer Positivkontrolle, die keine organische Phase enthielt, zeigte *E. coli* BL21 (DE3) eine relative Glucoseverbrauchsrate von $42,6 \pm 0,3\%$, wenn 5% (v/v) DINP ($\log P_{\text{Oct}} = 9,4$) zugefügt wurden. Im Gegensatz dazu führte die gleiche Menge α -Pinen ($\log P_{\text{Oct}} = 4,3$) zu einem beinahe kompletten Verlust der Zellvitalität. Steigende Mengen DINP führten zu einem Rückgang der Zellvitalität bis zu einem Minimum von 20%, das bei der Zugabe von 20% (v/v) DINP erreicht wurde. Weitere Zugaben von DINP bis zu 50% (v/v) führten nicht zu weiteren die Zellvitalität beeinträchtigenden Effekten. Die Tatsache, dass bereits bei der Zugabe von 5% (v/v) α -Pinen 95% der Zellvitalität verloren gingen, weist darauf hin, dass die Zellinaktivierung bereits bei geringeren α -Pinenkonzentrationen begann.

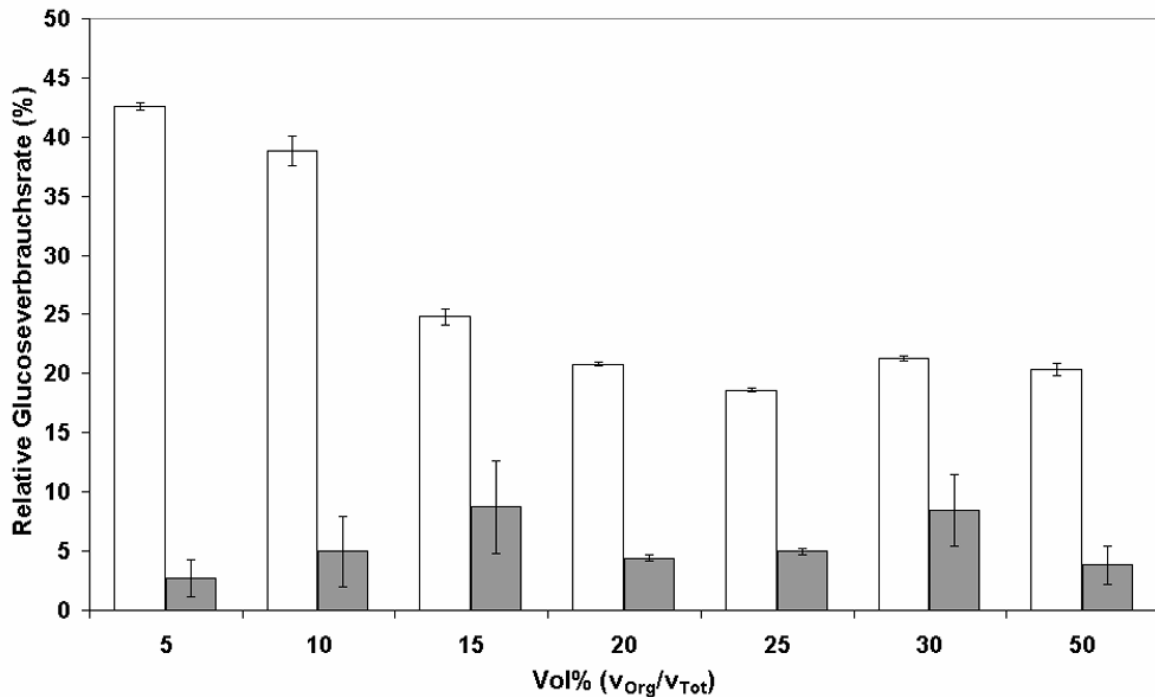


Abb. 17: Abnahme der relativen Glucoseverbrauchsrate von *E. coli* BL21 (DE3) bei steigenden volumetrischen Anteilen von α -Pinen ($\log P_{\text{Oct}} = 4,3$; graue Balken) und DINP ($\log P_{\text{Oct}} = 9,4$; weiße Balken) in einem wässrig-organischen Zweiphasensystem mit einem konstanten Volumen der wässrigen Phase von 40 ml. Die Positivkontrolle (100%-Wert) zeigte eine spezifische Glucoseverbrauchsrate von $2 \text{ g h}^{-1} \text{ g}^{-1}_{\text{BTM}}$ bei 37°C über 4 h. Mittelwerte mit Fehlerbalken aus Doppelbestimmungen sind gezeigt.

Obwohl bedingt durch seinen höheren $\log P_{\text{Oct}}$ -Wert DINP als biokompatibleres organisches Lösungsmittel als α -Pinen anzusehen ist, so hatte die Gegenwart einer organischen Phase nachteilige Effekte auf die Vitalität von *E. coli* BL21 (DE3)-Kulturen.

3.3 Toxizitätsversuche im Bioreaktor

Bisher wurde der Einfluss von reinen organischen Phasen auf *E. coli*-Kulturen im Erlenmeyerkolbenmaßstab untersucht. Da sich die Durchmischung von wässrig-organischen Zweiphasensystemen im Erlenmeyerkolben und im Bioreaktor aufgrund des abweichenden Energieeintrags unterscheidet, wurden Versuche zur Biokompatibilität von DINP und DINP/ α -Pinen-Mischphasen mit *E. coli* BL21 (DE3) im Bioreaktor durchgeführt.

Die im Erlenmeyerkolben gefundene Biokompatibilität von DINP konnte im Bioreaktor bestätigt werden. *E. coli*-Kulturen zeigten metabolische Aktivität in gerührten und belüfteten Zweiphasen-Bioreaktoren mit DINP/ α -Pinen-Mischphasen. DINP war in der Lage, die toxische Wirkung von α -Pinen auf *E. coli* zu maskieren. Die metabolische Aktivität konnte anhand der mit der Metabolisierung von Glucose einhergehenden Abnahme der Glucosekonzentration und des Sauerstoffpartialdruckes ($p\text{O}_2$ -Wert) im Zweiphasengemisch nachgewiesen

werden. Die Kulturen im Zweiphasensystem reagierten so zuverlässig auf Veränderungen der Glucosekonzentrationen, dass eine DO-Stat-kontrollierte Glucosedosierung etabliert werden konnte. Im Gegensatz zu Experimenten im Erlenmeyerkolben konnte bei Kultivierungen im Bioreaktor bei wässrig-organischen Zweiphasensystemen eine stärkere Emulsionsbildung beobachtet werden. Jedoch konnte durch Zentrifugation eine Trennung der organischen von der wässrigen Phase erreicht werden.

3.4 Produktion von Ganzzellbiokatalysatoren

Prinzipielles Ziel der Produktion von Ganzzellbiokatalysatoren war es, sowohl hohe Biotrockenmassekonzentrationen als auch hohe intrazelläre Expressionstiter von P450_{BM-3} QM zu erreichen. Zwei verschiedene Verfahrensweisen zur Erreichung dieses Ziels wurden untersucht (Abb. 18).

Bei Methode A handelt es sich um einen Fed-Batch-Prozess. Es wurde ein definiertes Minimalmedium (M9) eingesetzt und Glucose als limitierende Kohlenstoff- und Energiequelle zugegeben. Im Anschluss an eine Phase der Biomasseproduktion im Bioreaktor wurde die rekombinante Proteinexpression bei hohen Biotrockenmassekonzentrationen von ca. 10-11 g_{BTM} l⁻¹ induziert und über einen kurzen Zeitraum von 2-3 h durchgeführt. Anschließend wurde durch Zugabe der organischen Phase die Ganzzellbiotransformation gestartet.

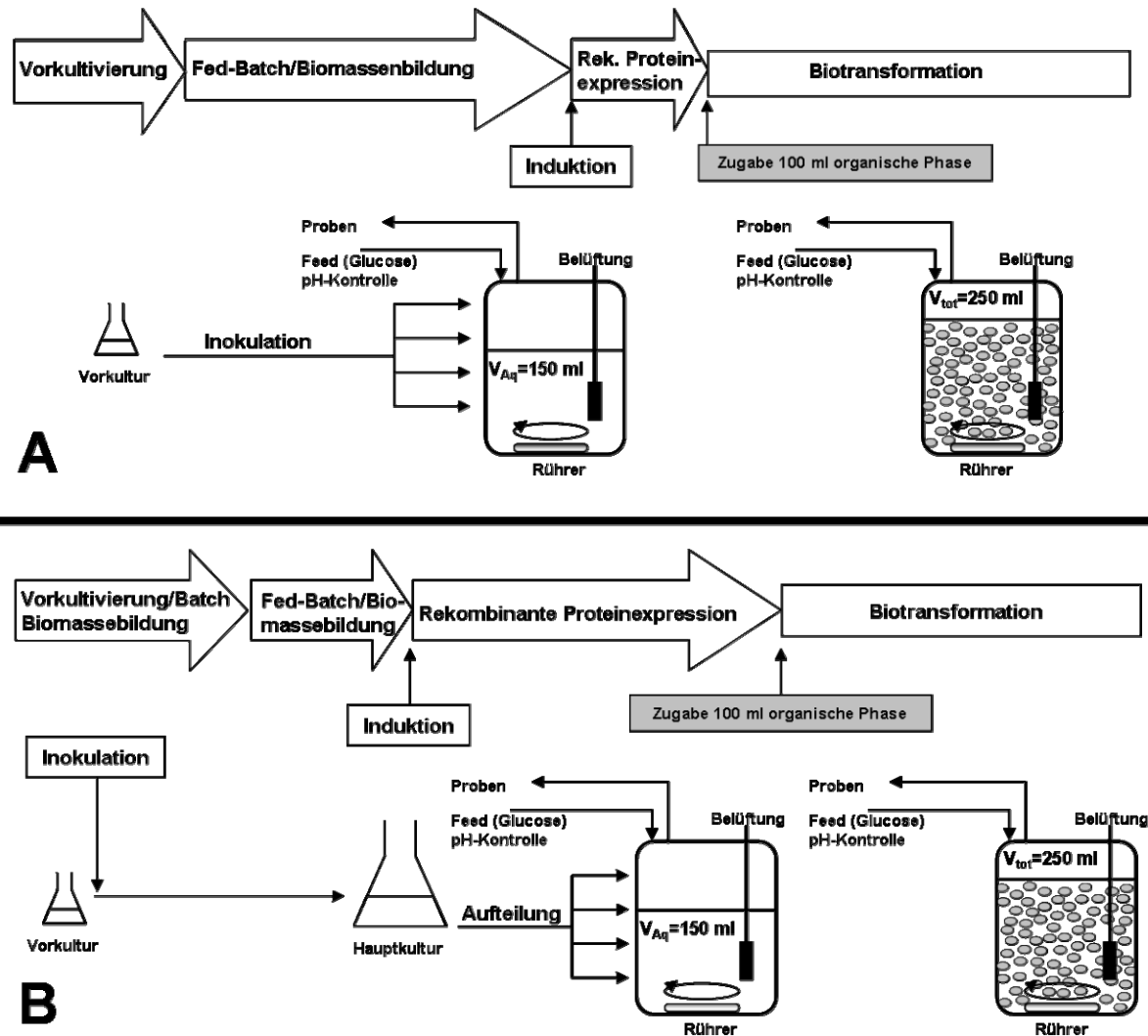


Abb. 18: Verschiedene Arbeitsschritte bei der Durchführung von Biotransformationen im wässrig-organischen Zweiphasensystem im Parallelfermentationssystem. A: Biomassebildung im Bioreaktor mit anschließender Induktion bei hoher Zelldichte und kurzer Expressionszeit (ca. 2-3 h). B: Biomassebildung im Erlenmeyerkolben, Induktion bei $OD_{600} = 1$ mit langer Expressionszeit (ca. 6 h), Übertragung der Biomasse in den Bioreaktor.

Durch Verwendung von Methode A konnten reproduzierbar einheitliche Biotrockenmassenkonzentrationen von Ganzzellbiokatalysator BL21 (P450_{BM-3} QM) und BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) von ca. $11 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ l}^{-1}$ in 20 h erreicht werden. Jedoch wurde eine Varianz in den intrazellulären Expressionstiteren von P450_{BM-3} QM von $0,1\text{-}0,4 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}_{\text{BTM}}$ bei BL21 (P450_{BM-3} QM) gemessen. Nach Induktion von BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) nach Methode A konnten bei Verwendung von M9-Medium mit Glucose als Kohlenstoff- und Energiequelle im Unterschied zu BL21 (P450_{BM-3} QM) nur sehr geringe intrazelluläre Expressionstiter von $0,02\text{-}0,08 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}_{\text{BTM}}$ gefunden werden. Diese geringen Expressionstiter wurden auf nachteilhaftige Effekte der Verwendung von Glucose als Kohlenstoff- und Energiequelle bei gleichzeitiger rekombinanter Expression glucosetransportierender und –

oxidierender rekombinanter Proteine zurückgeführt. Die Verwendung von Glycerol als Kohlenstoff- und Energiequelle führte zu ähnlich hohen $P450_{BM-3}$ QM-Expressionsternern von $0,1-0,3 \mu\text{mol g}^{-1}_{BTM}$, wie sie zuvor bei BL21 ($P450_{BM-3}$ QM) gemessen wurden, jedoch konnte wiederum eine hohe Varianz bei den Expressionsternern von $P450_{BM-3}$ QM beobachtet werden. Aufgrund der hohen Streuung bei den intrazellulären Expressionsternern von $P450_{BM-3}$ QM bei der Anwendung von Methode A aus Abb. 18 wurde ein alternativer Prozessablauf entwickelt, der sich im Prinzip an der Vorgehensweise zur rekombinanten Proteinexpression im Erlenmeyerkolben orientiert. Bei rekombinanten Proteinexpressionen im Erlenmeyerkolben konnten in Vorversuchen zur Charakterisierung der Biokatalyse reproduzierbare Expressionsternern von $P450_{BM-3}$ QM erreicht werden (siehe Ergebnisse 2.2, S. 56). Dieser Ablauf ist in Abb. 18B dargestellt. Es handelt sich um einen kombinierten Batch/Fed-Batch-Prozess. Nach Inokulation durch eine Vorkultur erfolgte Biomassebildung in einem Komplexmedium (TB) bis zu einer OD_{600} von 1. Hier wurde bereits die rekombinante Proteinexpression induziert, die über die gesamte Phase der weiterhin stattfindenden Biomassebildung durchgeführt wurde. Das Ergebnis dieser Produktion aktiver Ganzzellbiokatalysatoren führte zu reproduzierbaren intrazellulären Expressionsternern von $P450_{BM-3}$ QM in BL21 ($P450_{BM-3}$ QM) und BL21 ($P450_{BM-3}$ QM/GlcDH/GLF), allerdings auch zu geringeren Biotrockenmassekonzentrationen von $2-3 \text{ g}_{BTM} \text{ l}^{-1}$.

3.5 Optimierung der Biotransformationen von α -Pinen im Bioreaktor

3.5.1 Zusammensetzung der organischen Phase

Der Einfluss verschiedener Anteile von α -Pinen innerhalb der organischen Trägerphase auf die Produktentwicklung während der Biotransformation wurde mit BL21 ($P450_{BM-3}$ QM) als Ganzzellbiokatalysator untersucht. Die Zusammensetzung der organischen Phase hat einen starken Einfluss auf die Produktbildung. Dies wird deutlich, wenn die Gesamtproduktkonzentrationen bezogen auf das Volumen der wässrigen Phase c_{Aq} der Bioreaktorexperimente verglichen werden. Da Methode A (Abb. 18) bei der Ganzzellbiokatalysatorbildung angewendet wurde und daher Unterschiede in den intrazellulären Expressionsternern von $P450_{BM-3}$ QM von $0,08-0,17 \mu\text{mol g}^{-1}_{BTM}$ festgestellt wurden, wurden neben c_{Aq} ebenfalls die spezifischen initialen Produktbildungsraten Q ($\mu\text{mol oxidierte Produkte h}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}_{P450}$) berechnet. Abb. 19 zeigt c_{Aq} und Q nach 4 h Biotransformation mit BL21 ($P450_{BM-3}$ QM) in parallel betriebenen Bioreaktoren mit unterschiedlichen Mischungen von α -Pinen und DINP unter sonst identischen Bedingungen (konstante Biotransformationstemperatur, Biotrockenmasse, Phasenverhältnis wässrige zu organische Phase, Energieeintrag).

Laut Abb. 17 erwiesen sich bei Experimenten im Erlenmeyerkolben DINP-Anteile von 5-15% (v/v) als physiologisch vorteilhaft. Biotransformationen im Bioreaktor mit DINP-Anteilen von 5-15% (v/v) und darin gelösten Volumenanteilen von 5-50% (v/v_{Org}) α -Pinen

zeigten jedoch aufgrund der geringen Substratkonzentration, die dem Ganzzellbiokatalysator im Zweiphasensystem zur Verfügung stand, nur sehr geringe Produktbildung.

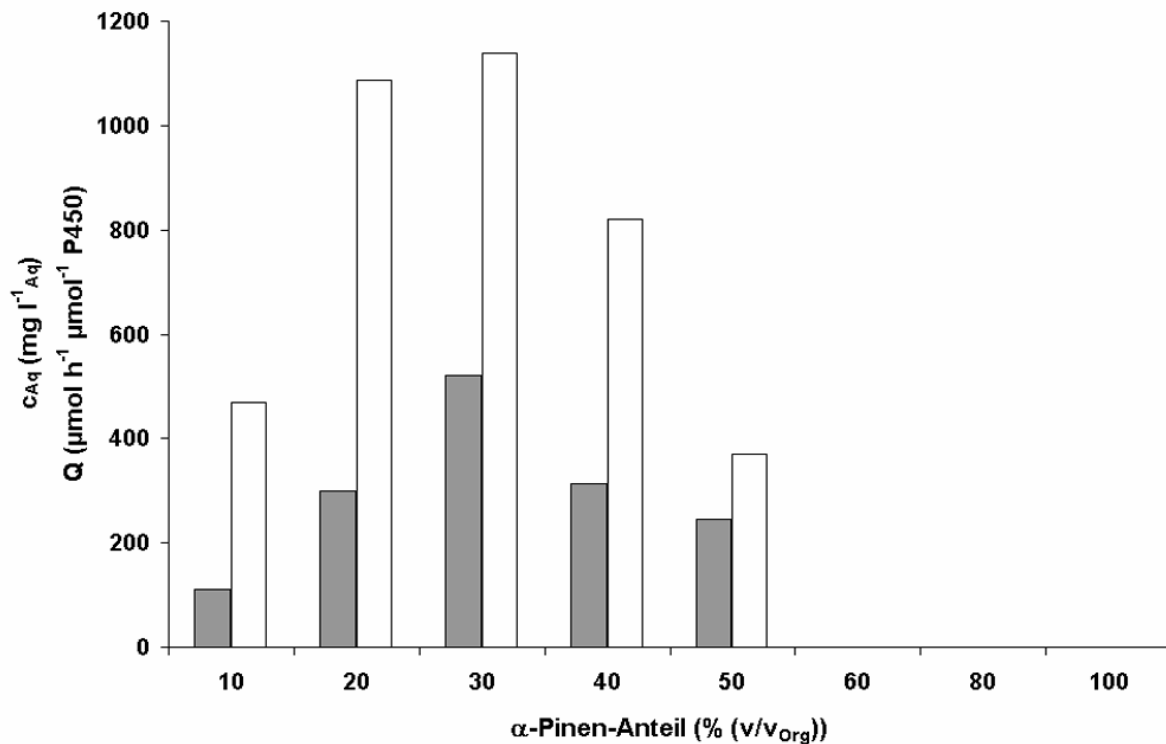


Abb. 19: Einfluss verschiedener Anteile α -Pinen (% (v/v_{Org})) in der organischen Phase auf die Gesamtproduktkonzentration bezogen auf das Volumen der wässrigen Phase c_{Aq} (graue Balken) und die spezifische initiale Produktbildungsrate Q (weiße Balken) bei Einsatz von BL21 (P450_{BM-3} QM) als Biokatalysator. Jedes Balkenpaar repräsentiert ein Bioreaktorexperiment. Das Volumen der organischen Phase betrug 100 ml, das der wässrigen Phase 150 ml. Eine konstante Rührerdrehzahl von 1100 rpm wurde verwendet. Die Biotrockenmassekonzentration war 9-10 g_{BTM} l⁻¹ in allen Reaktoren. Prozessdauer = 4 h.

Wenn reines α -Pinen (100% (v/v_{Org})) als organische Phase verwendet wurde, konnte keine Produktbildung beobachtet werden. Schrittweise Reduktion des α -Pinenanteils an der organischen Phase durch Beimischung von DINP zeigte zunächst keinen positiven Effekt auf die Produktbildung. Bei Volumenanteilen von 60-100% (v/v_{Org}) α -Pinen konnte neben fehlender Produktbildung auch keine metabolische Aktivität der Ganzzellbiokatalysatoren in Form von Sauerstoff- oder Glucoseverbrauch gemessen werden.

Ab einem DINP-Volumenanteil von 50% (v/v_{Org}) konnte ein signifikanter Anstieg von c_{Aq} auf 245 mg l⁻¹ Aq und von Q auf 370 μ mol oxidierte Produkte h⁻¹ μ mol⁻¹ P450 beobachtet werden. Weitere Erhöhung des Volumenanteils biokompatiblen DINPs führte zu weiterem Anstieg von c_{Aq} und Q bis zu Maximalwerten von 520 mg l⁻¹ Aq und 1140 μ mol h⁻¹ μ mol⁻¹ P450, die mit einer Mischung von 30% (v/v_{Org}) α -Pinen und 70% (v/v_{Org}) DINP erreicht wurden (Abb. 19).

Die verbesserte α -Pinenoxidation resultierte aus einer Kombination von gesteigerter initialer Produktbildungsrate bei einem insgesamt verlängerten Produktbildungszeitraum von 4 h.

3.5.2 Rührerdrehzahl

Die Rührerdrehzahl beeinflusst die Dispergierung der organischen Phase in der wässrigen Phase und damit die Größe der Phasengrenzfläche und des Massentransfers von Substrat in die wässrige Phase. Daher wurden verschiedene Biotransformationen mit BL21 (P450_{BM-3} QM) im Parallelfertigationssystem mit den bisher bestimmten optimalen Prozessparametern, wie ein Phasenverhältnis von 3:2 und ein α -Pinenanteil an der organischen Phase von 30% (v/v_{Org}), bei verschiedenen Rührerdrehzahlen durchgeführt. BL21 (P450_{BM-3} QM) wurde nach Methode A (Abb. 18) vermehrt. Es wurden einheitlich Biotrockenmassekonzentrationen von 10-11 g_{BTM} l⁻¹ an Ganzzellbiokatalysator eingesetzt. Aufgrund der variierenden intrazellulären Expressionstiter von P450_{BM-3} QM zwischen 0,07-0,17 $\mu\text{mol g}^{-1}$ _{BTM} wurde, zum Vergleich der verschiedenen Biotransformationen, neben der Gesamtproduktkonzentration bezogen auf das Volumen der wässrigen Phase c_{Aq} auch die spezifische initiale Produktbildungsrate Q als Parameter herangezogen (Abb. 20).

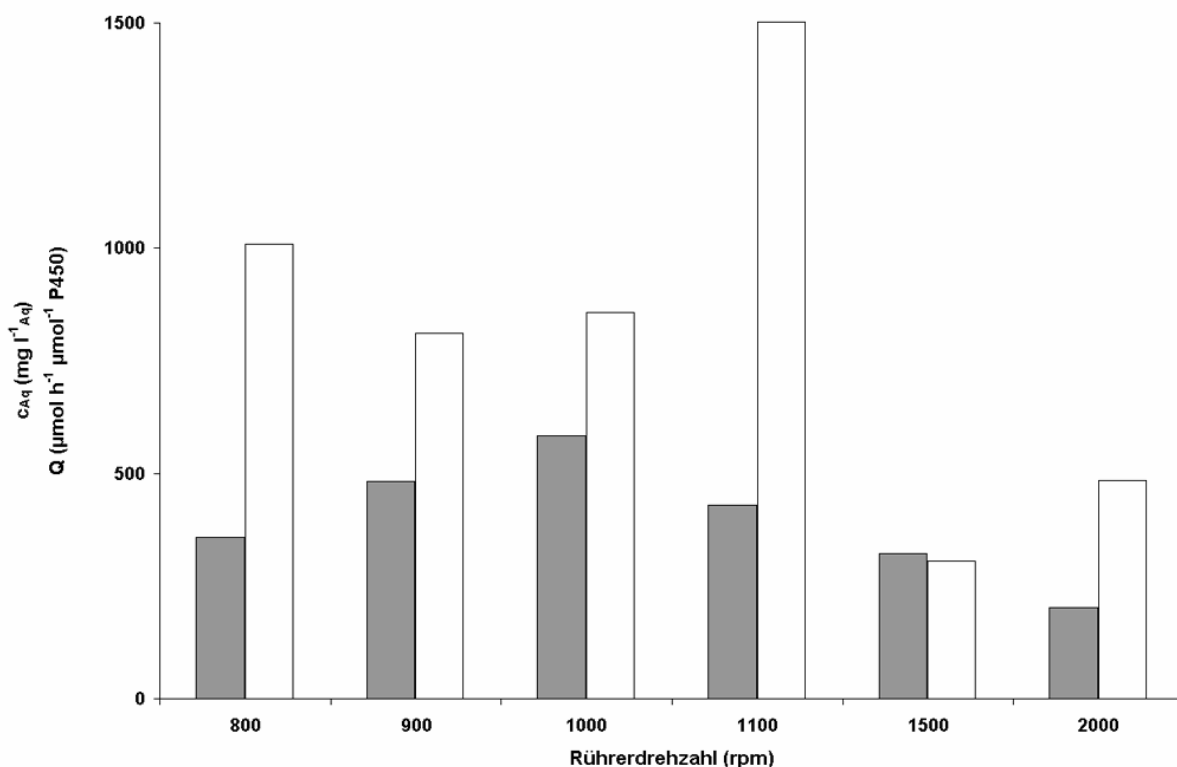


Abb. 20: Einfluss verschiedener Rührerdrehzahlen (rpm) auf die Gesamtproduktkonzentration bezogen auf das Volumen der wässrigen Phase c_{Aq} (graue Balken) und die spezifische initiale Produktbildungsrate Q (weiße Balken) bei Einsatz von BL21 (P450_{BM-3} QM) als Biokatalysator. Jedes Balkenpaar repräsentiert ein Bioreaktorexperiment. Das Volumen der organischen Phase betrug 100 ml, das der wässrigen Phase

150 ml und bestand aus 70% (v/v_{Org}) DINP und 30% (v/v_{Org}) α -Pinen. Die Biotrockenmassekonzentration betrug 10-11 g_{BTM} l⁻¹. Prozessdauer = 4 h.

Für c_{Aq} ließ sich mit steigender Rührerdrehzahl ein Optimum bei 1000 rpm feststellen, wo eine Gesamtproduktkonzentration von 580 mg l⁻¹_{Aq} erreicht wurde. Weitere Erhöhung der Rührerdrehzahl führte zu einer Abnahme von c_{Aq} . So sank bei doppelter Rührerdrehzahl von 2000 rpm die Gesamtproduktkonzentration um mehr als die Hälfte auf 160 mg l⁻¹_{Aq}. Der Verlauf von Q war nicht ganz so eindeutig zu interpretieren. Rührerdrehzahlen von 800-1000 rpm ergaben vergleichbare Werte für Q von 860-1000 μmol oxidierte Produkte pro Stunde und μmol P450. Ein Anstieg der Werte bis zu 1500 $\mu\text{mol h}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}$ _{P450} wurde ebenfalls verzeichnet, allerdings wurde dieses Maximum bei 1100 rpm erreicht. Eindeutig war der negative Einfluss höherer Drehzahlen von 1500-2000 rpm auf die spezifische initiale Produktbildungsrate Q.

Das Bioreaktorexperiment bei 1100 rpm zeigte innerhalb des Vergleichs den niedrigsten Expressionstiter von P450_{BM-3} QM von 0,07 $\mu\text{mol g}^{-1}$ _{BTM}. Daher wurde dem Maximum von Q bei dieser Drehzahl mehr Gewicht beigemessen als dem Maximum von c_{Aq} bei 1000 rpm, wo intrazelluläre P450_{BM-3} QM-Konzentrationen von 0,17 $\mu\text{mol g}^{-1}$ _{BTM} vorlagen, und somit 1100 rpm als die optimale Rührerdrehzahl für weitere Versuche verwendet.

4 Pilotprozess zur α -Pinenoxidation im organisch-wässrigen Zweiphasensystemen im Bioreaktor

Mit der zuvor als optimal befundenen Zusammensetzung der organischen Phase von 70% (v/v_{Org}) DINP und 30% (v/v_{Org}) α -Pinen sowie einem Phasenverhältnis wässriger zu organischer Phase von 3:2 und einer Rührerdrehzahl von 1100 rpm wurde die Biotransformationsleistung von BL21 (P450_{BM-3} QM) und BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) im Bioreaktor verglichen. Um vergleichbare intrazelluläre P450_{BM-3} QM-Expressionstiter zu erreichen, wurden die Ganzzellbiokatalysatoren nach der Methode B in Abb. 18 hergestellt. Trotz der dadurch erhöhten Reproduzierbarkeit der P450_{BM-3} QM-Expression wurden bei BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) mit 0,25 $\mu\text{mol g}^{-1}$ _{BTM} ein geringerer intrazellulärer Expressionstiter als bei BL21 (P450_{BM-3} QM) gemessen, dessen intrazelluläre P450-Konzentration 0,5 $\mu\text{mol g}^{-1}$ _{BTM} betrug.

Bezogen auf die Expressionstiter von P450_{BM-3} QM in den Ganzzellbiokatalysatoren zeigte BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) eine höhere P450-spezifische Produktausbeute ($Y_{P/P450}$) vor allem in der Anfangsphase der Biotransformation (Abb. 21). Die spezifische Produktausbeute nach 30 min Biotransformationszeit bei der Verwendung von BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) war mit 700 μmol oxidierte Produkte μmol^{-1} _{P450} um das 2,7-fache höher als die 260 μmol oxidierte Produkte μmol^{-1} _{P450}, die im selben Zeitraum von BL21 (P450_{BM-3} QM) produziert wurden. Über die gesamte Biotransformationszeit von 5 h betrachtet, wies

BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) doppelt so hohe spezifische Produktausbeuten wie BL21 (P450_{BM-3} QM) auf. Das bedeutet, dass das rekombinante intrazelluläre Cofaktorregenerationssystem für eine effektivere Nutzung intrazellulärer P450_{BM-3} QM sorgen konnte. Nach 5 h Biotransformationszeit erreichte BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) ein $Y_{P/P450}$ von $1680 \pm 220 \mu\text{mol oxidierte Produkte } \mu\text{mol}^{-1}_{P450}$ verglichen mit $930 \pm 160 \mu\text{mol oxidierte Produkte } \mu\text{mol}^{-1}_{P450}$, die von BL21 (P450_{BM-3} QM) gebildet wurden.

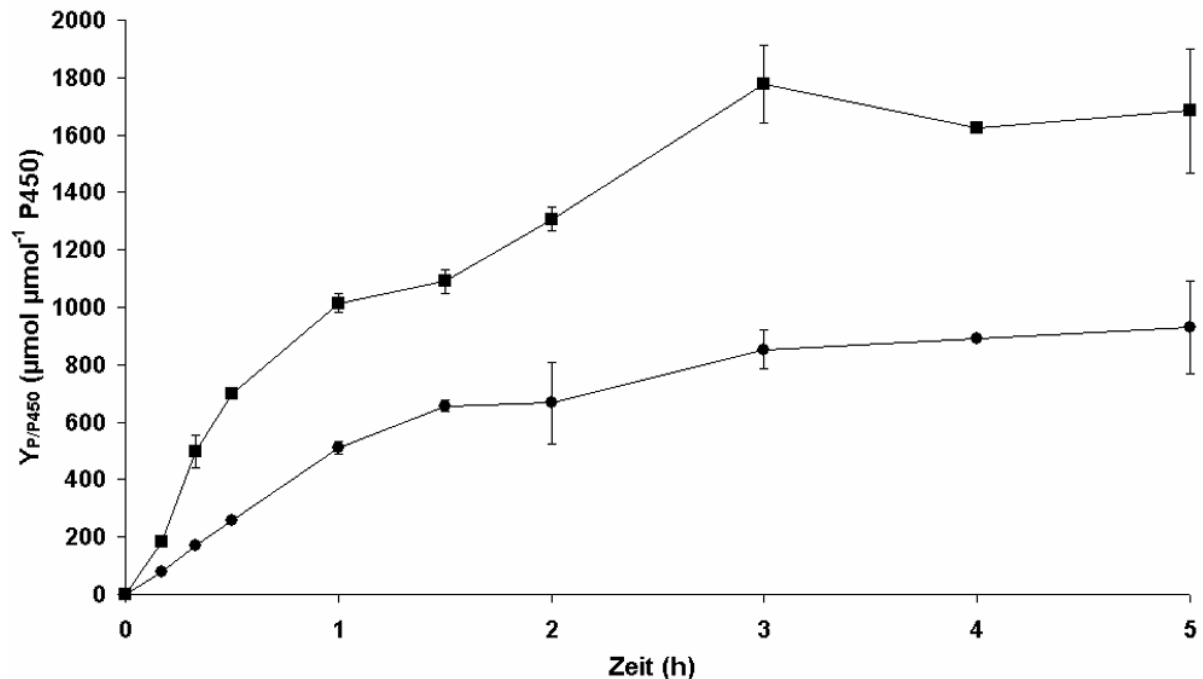


Abb. 21: Verlauf der P450-spezifischen Produktausbeute $Y_{P/P450}$ bei der Oxidation von α -Pinen im wässrig-organisch Zweiphasenbioprozess mit je $12 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ l}^{-1}$ BL21 (P450_{BM-3} QM) (●) und BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) (■). Das Volumen der wässrigen Phase betrug 150 ml, die Rührerdrehzahl 1100 rpm. Die organische Phase (100 ml) war zusammengesetzt aus 70 ml DINP und 30 ml α -Pinen. Mittelwerte mit Fehlerbalken aus Doppelexperimenten sind gezeigt.

Die Kombination optimierter Bioprozessbedingungen und der Verwendung des Ganzzellbiokatalysators mit rekombinanter intrazellulärer Cofaktorregenerierung führte zu vielversprechenden Produktkonzentrationen von $39 \pm 1.3 \text{ mg g}^{-1}_{\text{BTM}}$ nach 1 h und $64 \pm 8.3 \text{ mg g}^{-1}_{\text{BTM}}$ nach einer Biotransformationszeit von 5 h.

Die Gesamtproduktkonzentration bezogen auf das Volumen der wässrigen Phase war $490 \pm 41 \text{ mg l}^{-1}_{\text{Aq}}$ nach 1 h und $800 \pm 61 \text{ mg l}^{-1}_{\text{Aq}}$ nach 5 h (Abb. 22).

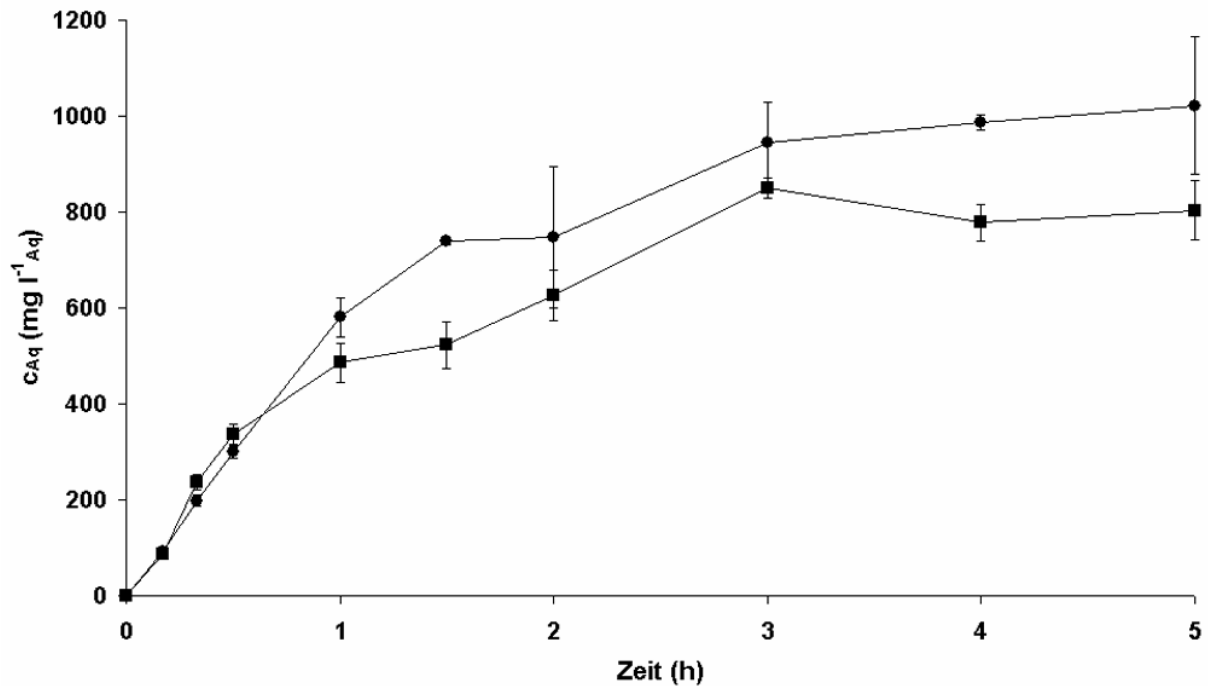


Abb. 22: Verlauf der Produktkonzentration bezogen auf das Volumen der wässrigen Phase c_{Aq} bei der Oxidation von α -Pinen im wässrig-organisch Zweiphasenbioprozess mit je $12 \text{ g}_{\text{BTM}} \text{ l}^{-1}$ BL21 (P450_{BM-3} QM) (●) und BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) (■). Das Volumen der wässrigen Phase betrug 150 ml, die Rührerdrehzahl 1100 rpm. Die organische Phase (100 ml) war zusammengesetzt aus 70 ml DINP und 30 ml α -Pinen. Mittelwerte mit Fehlerbalken aus Doppelerperimenten sind gezeigt.

Wegen des geringeren intrazellulären Expressionstiter von P450_{BM-3} QM in BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) war die Produktkonzentration geringer als die $96 \pm 15 \text{ mg g}^{-1}_{\text{BTM}}$ und $1020 \pm 144 \text{ mg l}^{-1}_{\text{Aq}}$ nach 5 h, die von BL21 (P450_{BM-3} QM) akkumuliert wurden. Trotz seiner geringeren intrazellulären Expressionstiter konnte BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) in der Anfangsphase der Biotransformation eine vergleichbare Gesamtproduktkonzentration c_{Aq} akkumulieren wie BL21 (P450_{BM-3} QM). Tab. 24 fasst die Ergebnisse der vergleichenden Ganzzellbiotransformationen im Bioreaktor zusammen.

Tab. 24: Prozessergebnisse einer wässrig-organischen Zweiphasenbiotransformation von α -Pinen mit BL21 (P450_{BM-3} QM) and BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) mit einem Phasenverhältnis von 3:2. Die organische Phase bestand aus 70% (v/v_{Org}) DINP und 30% (v/v_{Org}) α -Pinen. Die Biotransformationsdauer betrug 5 h. Biotrockenmassenkonzentrationen von 12 g_{BTM} l⁻¹ wurden eingesetzt. Mittelwerte aus Doppelexperimenten sind angegeben.

	BL21 (P450_{BM-3} QM)	BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF)
Produktkonzentration in Bezug auf die wässrige Phase c _{Aq} (mg l ⁻¹ _{Aq})	1020±144	800±61
Produktausbeute Y _{P/X} (mg g ⁻¹ _{BTM})	96±15	64±8.3
P450-spezifische Produktausbeute Y _{P/P450} (μmol μmol ⁻¹ P450)	930±160	1680±220
Spezifische initiale Produktbildungsrate Q (μmol h ⁻¹ μmol ⁻¹ P450)	720±15	1020±12
Expressionstiter P450 _{BM-3} QM (μmol g ⁻¹ _{BTM})	0,5±0,03 ^a	0,25±0,04 ^a

a: Standardabweichung einer vierfachen CO-Differenzspektrumsanalyse

Chemische Autoxidation von α -Pinen konnte ausgeschlossen werden, da keine Produktbildung beobachtet wurde, als die Biotransformation mit *E. coli* BL21 (DE3), der keine P450_{BM-3} QM rekombinant exprimiert, durchgeführt wurde.

Aufgrund der durch Methode B vermehrten und induzierten Ganzzellbiokatalysatoren konnten höhere Expressionstiter von P450_{BM-3} QM in BL21 (P450_{BM-3} QM) generiert und im Vergleich zu den Versuchen zum Einfluss der Rührerdrehzahl und der Zusammensetzung der organischen Phase, die unter sonst vergleichbaren Prozessbedingungen durchgeführt wurden, höhere Werte für c_{Aq} erreicht werden (Tab. 25).

Tab. 25: Zusammenhang zwischen Produktkonzentration in Bezug auf die wässrige Phase c_{Aq} (mg l^{-1}_{Aq}) nach 4 h und Expressionstiter von P450_{BM-3} QM bei drei unter identischen Bedingungen (Rührerdrehzahl 1100 rpm, Anteil α -Pinen an organischer Phase von 30% (v/v_{Org}), Phasenverhältnis 3:2, Biotrockenmassekonzentration 10-12 $\text{g}_{BTM} \text{l}^{-1}$) durchgeführten Biotransformationen mit BL21 (P450_{BM-3} QM).

	Biotransformation		
	1	2	3
Produktkonzentration in Bezug auf die wässrige Phase c_{Aq} (mg l^{-1}_{Aq})	470	520	990
Expressionstiter P450 _{BM-3} QM ($\mu\text{mol g}^{-1}_{BTM}$)	0,07	0,14	0,5

In allen Bioreaktorexperimenten mit ausreichenden Mengen an organischer Trägerphase konnte nach dem Ende der Produktbildung nach ca. 4-5 h weiterhin metabolische Aktivität in Form von „spiking“ des pO_2 -Wertes, also Abnahme des pO_2 -Wertes nach Zugabe von Glucose bzw. Zunahme des pO_2 -Wertes nach Metabolisierung der zugegebenen Glucosemenge, beobachtet werden. Durch die stärkere Emulsionsbildung bei Biotransformationen im Bioreaktor konnte von Biomasseproben, die nach Beendigung der Produktbildung genommen wurden, kein Zellaufschluss zur Bestimmung der intrazelluläre P450_{BM-3} QM-Konzentration oder -Aktivität hergestellt werden. Selbst nach mehrfachem Waschen mit alkoholischen Lösungen verblieben nicht entfernbare Reste der organischen Phase, die zur Denaturierung von Proteinen und Trübung im Zelllysat führten. In diesen Zellaufschlüssen konnte weder intrazelluläre Konzentrationen noch Aktivität von P450_{BM-3} QM festgestellt werden. Ob tatsächlich kein aktives P450_{BM-3} QM mehr in den Ganzzellbiokatalysatoren vorhanden war oder ob es zu Aktivitätsverlust bzw. Denaturierung von P450_{BM-3} QM während des Zellaufschlusses kam, konnte nicht bestimmt werden.

Diskussion

1 *In vitro* Aktivität von P450_{BM-3} QM

Aus Arbeiten der Arbeitsgruppe um Wong war bereits bekannt, dass P450_{Cam} und P450_{BM-3} in der Lage sind Terpenoide, darunter auch α -Pinen, zu oxyfunktionalisieren (Bell et al. 2003a; Bell et al. 2001; Sowden et al. 2005; Wong et al. 2000). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Fünffachvariante V26T R47F A74G F87V L188K von CYP102A1 (P450_{BM-3} QM) auch das bicyklische Monoterpen (-)- α -Pinen zu (-)- α -Pinenoxid, (-)-*trans*-Verbenol und (-)-Myrtenol im Verhältnis 5:2:1 mit einem Enantiomerenüberschuß von >92% oxidieren kann. Dabei hat die Stereochemie des Substrats Einfluss auf die Regioselektivität der Reaktion. Wird z.B. bei Biotransformationen mit P450_{BM-3} QM das Enantiomer (+)- α -Pinen als Substrat eingesetzt, so entstehen Pinenoxid und Verbenol im Verhältnis 1:3 (Budde 2007). Das Produktspektrum von P450_{BM-3}-Mehrfachvarianten bei verschiedenen Regioisomeren von Pinen hängt von der Zugänglichkeit und Form des aktiven Zentrums und der Flexibilität des Enzyms ab. Diese Faktoren bestimmen die Orientierung des Pinen zur reaktiven Sauerstoffspezies der Häm-Gruppe und damit den Ort der Oxidation im Molekül. Der durch Mutationen bei A74 und L188 erweiterte Substratzugangskanal ermöglicht Pinen Zugang zum aktiven Zentrum. Durch Einführung von Aminosäuren mit kürzerer Seitenkette an Position F87 wird der Zugang zur Häm-Gruppe erleichtert (Branco et al. 2008).

Bei der *in vitro* Messung der NADPH-Verbrauchsrate von P450_{BM-3} QM ergab sich für das Substrat α -Pinen ein Wert von $27,6 \pm 0,5 \mu\text{mol min}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}_{\text{P450}}$ bei 37°C und pH 7,5. Eine ähnliche NADPH-Verbrauchsrate von $30 \pm 1,5 \text{ nmol NADPH min}^{-1} \text{ nmol}_{\text{P450}}$ (pH 8,0; 30°C) wurde von Sowden et al. (2005) mit einer Dreifachvariante von CYP102A1 (R47L Y51F I263A) bei der Oxidation von (+)-Valencen beobachtet. Da bei der Messung des NADPH-Verbrauchs die Aktivität der Reduktasedomäne von P450_{BM-3} QM gemessen wird und bei mutierten P450_{BM-3}-Monooxygenasen eine Entkopplung der NADPH-Oxidation von der Substratoxidation vor allem bei Verwendung nicht-natürlicher Substrate mit Raten von 10-90% beschrieben wurden (Farinas et al. 2004; Noble et al. 1999; Sowden et al. 2005), ist der aus Abb. 7 berechnete apparente K_M -Wert von $51,1 \pm 11,3 \mu\text{M}$ als zu niedrig einzuschätzen. Diese Vermutung wurde untermauert durch die Ergebnisse der Untersuchungen zur Produktstabilität. Hier wurden bei Verwendung von Verbenol und vor allem Myrtenol als Substrat erhöhte NADPH-Verbrauchsrate von P450_{BM-3} QM gemessen (Tab. 19). Da kein Oxidationsprodukt gefunden werden konnte, scheinen Verbenol und Myrtenol in unvorteilhafter Orientierung im aktiven Zentrum von P450_{BM-3} QM zu koordinieren und damit die Effizienz der Kopplung der NADPH-Oxidation mit der Produktoxidation zu verringern. Ähnliche Beobachtungen von Entkopplungen bei der *in vitro* Biotransformation von Terpenen mit P450_{BM-3}-Mehrfachvarianten wurden von Watanabe et al. (2007) gemacht und mit der

Struktur der Substratmoleküle in Verbindung gebracht. Durch die Bindung in unvorteilhafter Orientierung und die dadurch verursachte Entkopplung und erhöhten NADPH-Verbrauchsrate bei Zusatz von α -Pinenoxid, Verbenol und Myrtenol zu *p*NCA-Assays kann eine kompetitive Hemmung von P450_{BM-3} QM beobachtet werden (Abb. 9).

2 Maßnahmen zur Optimierung der Biokatalyse

2.1 Prozesstechnische Optimierung des Zweiphasenbioprozesses

In ihrer Gesamtheit unterstreichen die *in vitro* Analysen zur P450_{BM-3} QM-katalysierten Oxidation von α -Pinen und 12-*p*NCA, insbesondere die durch Oxidationsprodukte verursachte kompetitive Hemmung sowie die Instabilität von α -Pinenoxid in wässriger Lösung, die Notwendigkeit einer geeigneten *in situ*-Produktabtrennungsmethode. Gemäß den physikochemischen Eigenschaften von Substrat und Produkt (hydrophobe Moleküle niedrigen Molekulargewichts) wurde entsprechend der Kategorisierung in der Literatur die Extraktion durch ein organisches Lösungsmittel als ISPR-Technik ausgewählt (Freeman et al. 1993; Stark und von Stockar 2003). Um den Materialaufwand und die Komplexität des Prozesses möglichst gering zu halten, wurde die direkte interne Kontaktierung des Ganzzellbiokatalysators mit der extraktiven Phase einer den Bioprozessaufbau verkomplizierenden externen oder indirekten Kontaktierung vorgezogen.

Organische Lösungsmittel wirken in unterschiedlicher Weise und Intensität toxisch auf Mikroorganismen (vgl. Einleitung 3.2, S. 19). So wird in den ersten 30 min der Ganzzellbiotransformation mit BL21 (P450_{BM-3} QM) oder BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) im Erlenmeyerkolben mit reinem α -Pinen als organischer Phase eine konstante Produktbildung beobachtet, die dann im weiteren Verlauf der Biotransformation abnimmt und nach 1,5 h völlig zum Erliegen kommt (Abb. 12). Rohzelleextrakte von Biomasseproben, die am Ende der Biotransformation untersucht wurden, zeigten kein Absorptionsmaximum bei 450 nm und keine P450_{BM-3} QM-Aktivität im *p*NCA-Assay. Das weist auf eine Inaktivierung des Biokatalysators im Laufe der Biotransformation hin. Eine mögliche Ursache für diese Inaktivierung wurde bei molekular- und phasentoxischen Effekten (Bar 1987; León et al. 1998; Lilly et al. 1987; Vermuë et al. 1993), hervorgerufen durch das Substrat α -Pinen ($\log P_{\text{Oct}} = 4,5$), vermutet. Als Lösung für dieses Problem sollte in der nächsten Phase der Bioprozessentwicklung die Verwendung eines biokompatiblen organischen Lösungsmittels ($\log P_{\text{Oct}} > 5$), das als organische Trägerphase die toxischen Effekte des Substrats maskiert und gleichzeitig als *in situ* Produktextraktionsmittel dient, untersucht werden.

Neben der Toxizität des in einem wässrig-organischen Zweiphasenbioprozesses verwendeten organischen Lösungsmittels beeinflussen verschiedene weitere Faktoren die durch einen Ganzzellbiokatalysator akkumulierte Produktmenge sowohl positiv als auch negativ. Die im

Rahmen der vorliegenden Arbeit identifizierten Zusammenhänge dieser Prozessvariablen und Effekte sind in Abb. 23 dargestellt und werden im Folgenden näher diskutiert.

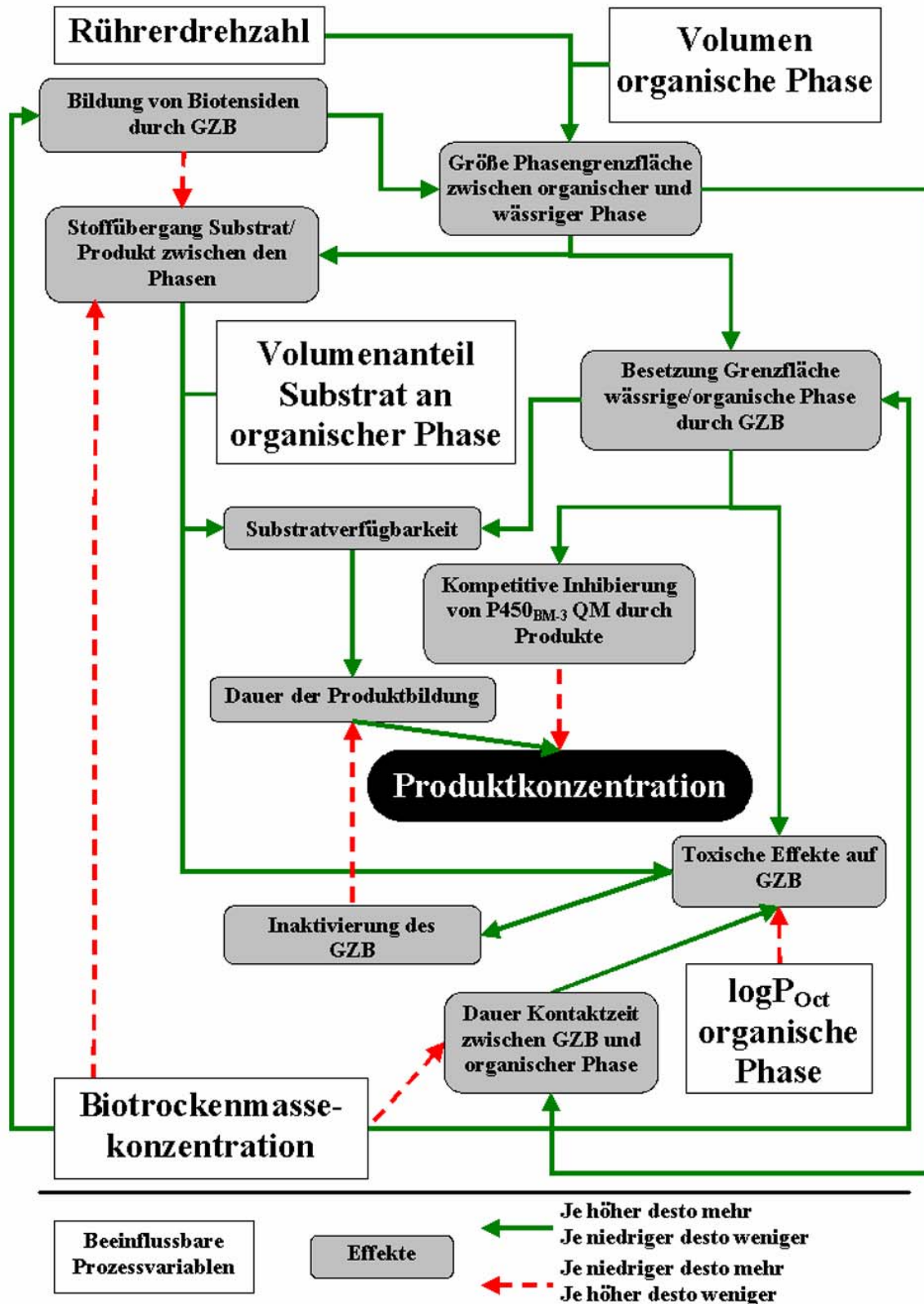


Abb. 23: Zusammenhänge beeinflussbarer Prozessvariablen mit Effekten innerhalb eines wässrig-organischen Zweiphasenbioprozesses und ihre Auswirkungen auf die akkumulierte Produktkonzentration. GZB: Ganzzellbiokatalysator.

2.1.1 $\log P_{\text{Oct}}$ der organischen Phase, Volumenanteil des Substrats an der organischen Phase

Der $\log P_{\text{Oct}}$ -Wert spielt eine zentrale Rolle bei der Bewertung der Toxizität einer organischen Phase (vgl. Einleitung 3.3, S. 20). Neben dem $\log P_{\text{Oct}}$ -Wert wurden weitere Kriterien und Konzepte zur Auswahl geeigneter biokompatibler organischer Trägerphasen zur Etablierung eines Zweiphasenbioprozesses mit einer organischen Trägerphase in der Literatur beschrieben (Bruce und Daugulis 1991; Laane et al. 1987b; León et al. 1998; Nikolova und Ward 1993). Aus 7, zuvor aus einer Liste von 35 organischen Lösungsmitteln ausgewählten Verbindungen, erwies sich Diisononylphthalat (DINP, $\log P_{\text{Oct}} = 9,4$) als die organische Trägerphase, die am besten die angelegten Kriterien (vgl. Tab. 21) wie Biokompatibilität, biologische Inertheit gegen Abbau durch *E. coli* und die verwendete P450-Monooxygenase sowie geringe Tendenz zur Emulsionsbildung erfüllte. Andere Phthalsäureester wie *Bis*(2-ethylhexyl)phthalat (BEHP) wurden in der Vergangenheit bereits erfolgreich in wässrig-organischen Zweiphasenbiotransformationen mit *E. coli* eingesetzt (Bühler et al. 2003a; Cruz et al. 2004; de Carvalho und da Fonseca 2004; Panke et al. 2000; Park et al. 2006), was die generelle Nützlichkeit dieser Stoffklasse für Ganzzellbiokatalysen in Zweiphasensystemen unterstreicht.

Die durch einen hohen $\log P_{\text{Oct}}$ -Wert gekennzeichnete Biokompatibilität der organischen Trägerphase DINP ($\log P_{\text{Oct}} = 9,4$) beeinflusst durch Verlängerung des Produktbildungszeitraums auf 4-5 h die Produktausbeute des Zweiphasenbioprozesses positiv (Abb. 21). Der Einsatz von reinem α -Pinen ($\log P_{\text{Oct}} = 4,5$) als organische Phase beeinträchtigt massiv die Vitalität der Ganzzellbiokatalysatorkultur, was durch das Fehlen von Sauerstoffverbrauch und Glucosemetabolisierung gekennzeichnet ist und fehlende Produktbildung im Bioreaktor zur Folge hat. Dieses Ergebnis steht zunächst im Widerspruch zu Erkenntnissen, die im Erlenmeyerkolben erlangt wurden, wo BL21 (P450_{BM-3} QM) und BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) in der Lage waren, mit reinem α -Pinen als organische Phase oxidierte Produkte zu bilden. Dieser Effekt kann auf den größeren Stress, den Zellen in einem wässrig-organischen Zweiphasensystem im Bioreaktor ausgesetzt sind, zurückgeführt werden. Durch den höheren Energieeintrag im Vergleich zum Erlenmeyerkolben ergibt sich eine, durch eine feinere Dispergierung von α -Pinen bedingte, größere Phasengrenzfläche und damit gesteigerten Massentransfer von α -Pinen in die wässrige Phase (Bar 1988; Hocknull und Lilly 1987) bzw. eine größere Kontaktfläche von toxischem α -Pinen, die durch den Ganzzellbiokatalysator besetzt werden kann. Die dadurch erhöhten molekular- und phasentoxischen Effekte wirken sich negativ auf die Vitalität von *E. coli* aus.

Mit steigenden Volumenanteilen von DINP steigt der $\log P_{\text{Oct}}$ -Wert der organischen Phase, womit deren Toxizität vermindert wird. Ein Verhältnis α -Pinen zu DINP von 30:70 (v/v_{Org}) erwies sich als optimale Zusammensetzung der organischen Phase, um eine maximale spezifische initiale Produktbildungsrate und P450-spezifische Produktausbeute innerhalb des Messzeitraums von 4 h zu erreichen. Die Akkumulation von ansonsten in wässriger Phase instabilem α -Pinenoxid in der organischen Phase zeigt, dass sie neben ihrer zentralen

Funktion, nämlich der *in situ* Produktabtrennung, auch zur Erhaltung der Produktstabilität beiträgt. Eine ähnliche Vermeidung der Autoxidation einer Epoxidgruppe in wässriger Lösung wurde bei der Biotransformation von Styrol zu Styroloxid beobachtet (Hofstetter et al. 2004). Bei Absenkung des α -Pinengehaltes unter das α -Pinen/DINP-Verhältnis von 30:70 (v/v_{Org}) wurde ein Rückgang der spezifischen initialen Produktbildungsrate Q und P450-spezifische Produktausbeute $Y_{P/P450}$ beobachtet. Neben dem Massentransfer von α -Pinen aus der organischen Phase über die Phasengrenzfläche in die wässrige Phase zum Ganzzellbiokatalysator (Weg B in Abb. 6), wurde direkter Kontakt des Ganzzellbiokatalysator mit der Phasengrenzfläche (Weg C in Abb. 6) als weitere Möglichkeit des Substratzugangs in der Literatur beschrieben (Bühler et al. 2003b; Bühler et al. 2006; Deziel et al. 1999; Goswami und Singh 1991; MacLeod und Daugulis 2005; Munoz et al. 2008). Enthalten die organischen Lösungsmitteltröpfchen in der sich ausbildenden Emulsion geringere Mengen an α -Pinen, so ist ein Rückgang der Substratverfügbarkeit sowohl in der wässrigen Phase als auch an der Phasengrenzfläche und damit eine verminderte Produktbildung zu verzeichnen.

Nach der Zugabe von DINP/ α -Pinen-Mischungen konnte im Gegensatz zu anderen in der Literatur beschriebenen wässrig-organischen Zweiphasenprozessen mit rekombinanten *E. coli* Zellen und BEHP als organischer Phase keine weitere Zunahme der Biotrockenmassekonzentration festgestellt werden (Panke et al. 2000; Park et al. 2006). Das Fehlen von Biomassebildung während der Biotransformation ist vermutlich auf durch α -Pinen vermittelte toxische Effekte zurückzuführen. Im Vergleich zu oben genannten Publikationen lag α -Pinen in 5-10-fach höherer Konzentration in der organischen Phase vor als das vergleichbar toxisch wirkende Styrol ($\log P_{Oct} = 3$). Gleichzeitig war die Biotrockenmassenkonzentration innerhalb des Zweiphasenbioprozesses zur Styrolepoxidierung vergleichsweise höher, womit sich die Kontaktzeit des einzelnen Ganzzellbiokatalysators mit der toxischen organischen Phase verringerte. Obgleich DINP als biokompatibler als α -Pinen einzustufen ist, so beeinflusst es doch als organische Phase die Vitalität von *E. coli* Kulturen negativ (Abb. 17). Da auch während der Biotransformationsphase IPTG im Medium vorlag, kann auch, neben der Anwesenheit einer organischen Phase, die rekombinante Proteinexpression als weiterer Stressfaktor die Biomassebildung beeinträchtigen (Kosinski et al. 1992). Aono et al. (1994) vermutete für *E. coli* die Existenz von solventtoleranten Subpopulationen innerhalb einer Zellkultur, deren Anzahl von der Mediumszusammensetzung abhängt. Diese Subpopulationen unterscheiden sich in der Zusammensetzung ihrer Zellwandkomponenten von den nicht solventtoleranten Populationen. Wenn die Zellkultur nun dem Selektionsdruck einer organischen Phase ausgesetzt wird, sind es diese Subpopulationen, die weiterhin Vitalitätszeichen zeigen und sich anreichern, was sich erst nach einer gewissen Zeit in Änderungen der optischen Dichte bemerkbar machen würde. Dieses Phänomen könnte ebenfalls das beobachtete Fehlen von Biomassebildung erklären. Allgemein ist *E. coli* in der Lage, durch *de novo* Synthese der Zellwand deren Fluidität zu verändern und sich so an eine organische Phase anzupassen (Favre-Bulle et al. 1991; Ingram 1977).

2.1.2 Biotrockenmassekonzentration

Die Erhöhung der Konzentration an Ganzzellbiokatalysator stellt die allgemein gebräuchlichste Maßnahme zur Steigerung der Produktivität eines Bioprozesses dar (Stark und von Stockar 2003). Daher wurden Zweiphasenbiotransformationen im Erlenmeyerkolben mit verschiedenen Mengen an Ganzzellbiokatalysator BL21 (P450_{BM-3} QM) durchgeführt. Jedoch ließ sich kein linearer Zusammenhang zwischen der eingesetzten Ganzzellbiokatalysatormasse und der gebildeten Produktmasse nachweisen (Abb. 11). Bei gleicher biokatalytischer Aktivität, die durch Verwendung einer Zellkultur mit einheitlicher intrazellulärer P450_{BM-3} QM-Konzentration sichergestellt war, und Substratmengen, die mit 10,3 g im Vergleich zu 60-860 mg Ganzzellbiokatalysator im Überschuss vorlagen, wäre ein solch linearer Anstieg zu erwarten gewesen. Eine Erklärung hierfür ist, dass durch oberflächenaktive Substanzen und die Biomasse selber die Substratzugänglichkeit verringert wird. Mikroorganismen können zum Teil große Mengen an löslichen und unlöslichen amphiphatischen, und daher oberflächenaktiven, Substanzen (Biotenside) freisetzen. Diese können, wenn sie zellwandständig sind, die Aufnahme von Kohlenwasserstoffen ins Periplasma erleichtern (Desai und Banat 1997) (siehe Abb. 6D). Neben aktiver Sekretion können oberflächenaktive Substanzen, z.B. Bestandteile der Zellmembran wie Lipopolysaccharide, Phospholipide und Proteine auch durch Zellyse freigesetzt werden (Schmid et al. 1998). Oberflächenaktive Moleküle können sowohl einen positiven als auch negativen Einfluss auf den Stofftransport zwischen den Phasen haben. So können oberflächenaktive Moleküle durch Senkung der Oberflächenspannung Emulsionsbildung fördern bzw. Emulsionen stabilisieren und den Massentransfer fördern (Agble und Mendes-Tatsis 2000). Biomasse und oberflächenaktive Substanzen können aber auch durch „Blockierung“ der Interphase den Stofftransport zwischen wässriger und organischer Phase behindern (Crabbe et al. 1986; Hamilton und Weatherley 1995; Pursell et al. 2004; Schmid et al. 1998).

Eine weitere Erklärung für den in Abb. 11 beobachteten Effekt der mit steigender Biotrockenmassezugabe sinkenden spezifischen Produktausbeute $Y_{P/X}$ ergibt sich aus der Beobachtung der Abhängigkeit der Dauer des Produktbildungszeitraums von der Biotrockenmassekonzentration. Mit steigender Biotrockenmassekonzentration war auch eine Verlängerung des Produktbildungszeitraums zu beobachten. Dieser Effekt kann durch eine durch erhöhte Zellkonzentration verursachte verringerte Expositionszeit des Ganzzellbiokatalysators zum toxischen Substrat verursacht werden. Eine verlängerte Expositionszeit bedeutet schnellere Inaktivierung des Ganzzellbiokatalysators, was wiederum zu einer Verkürzung der Produktbildungsphase führt. Da ein konstanter Energieeintrag in Form einer gleich bleibenden Schüttlerrotationsgeschwindigkeit gewählt wurde, steht einer wachsenden Konzentration an Ganzzellbiokatalysator eine konstante wässrig-organische Grenzfläche aus toxischem α -Pinen und Medium gegenüber. Diese Fläche kann von einer bestimmten Menge Ganzzellbiokatalysator besetzt werden. Wird eine größere Zahl von Ganzzellbiokatalysatoren zugegeben, verringert sich die Expositionszeit der einzelnen Zelle, wodurch deren katalytische Aktivität

länger erhalten bleibt (Park et al. 2006). Vitalitätshemmende Effekte können durch DINP, α -Pinen, α -Pinenoxid und Verbenol bzw. Myrtenol, die als Entkoppler P450_{BM-3} QM kompetitiv hemmen, vermittelt werden und dadurch eine Einstellung der Produktbildung nach 4-5 h bewirken.

Zwei Methoden zur Generierung hoher Konzentrationen von Ganzzellbiokatalysatoren wurden untersucht (Abb. 18). Bei Methode A handelt es sich um einen Fed-Batch-Prozess, welche am häufigsten zur Erreichung hoher Zelldichten eingesetzt werden (Riesenberg 1991; Yee und Blanch 1992). Da einige Mediumsbestandteile und Stoffwechselprodukte das Wachstum von *E. coli* und die rekombinante Proteinexpression hemmen können, wurden folgende Maßnahmen zur Kontrolle der Wachstumsrate von *E. coli* angewendet. Es wurde ein definiertes Minimalmedium (M9) eingesetzt und Glucose als limitierende Kohlenstoff- und Energiequelle zugegeben. Die spezifische Wachstumsrate wurde durch Absenkung der Inkubationstemperatur von 37°C auf 30°C verringert und eine Überdosierung von Glucose durch Einführung einer DO-Stat-Kontrolle verhindert. Ammoniumhydroxid diente als Stickstoffquelle und zur pH-Regulierung. Diese Maßnahmen wurden in vielen Hochzelldichtekultivierungen von *E. coli* erfolgreich angewendet (Lee 1996). Die während der Biotransformation zugegebenen divalenten Kationen Mg²⁺ und Ca²⁺ erhöhen, vermutlich durch Stabilisierung der Zellmembran, die Solventtoleranz von *E. coli* (Aono et al. 1994). Als Grund für die schlecht reproduzierbaren Expressionstiter von P450_{BM-3} QM bei Verwendung von Methode A wird ein Ungleichgewicht zwischen durch rekombinante Proteinexpression induzierten Mehrbedarf an Energie und Aminosäuresynthese sowie der metabolischen Leistungsfähigkeit von *E. coli* unter den gegebenen Prozessbedingungen vermutet. Die durch rekombinante Proteinexpression verursachte gesteigerte Verbrauch an Aminosäuren kann zu einer steigenden Anzahl unbeladener tRNAs führen, die durch ihre Sequenzhomologie mit RNAI und RNAII, den zentralen Molekülen der Plasmidreplikationsregulation durch *ColE1*, interagieren und dadurch den inhibitorischen Effekt von RNAI auf die Plasmidreplikation aufheben können. Dadurch steigt die Plasmid- und damit die Genkopienzahl was wiederum zu erhöhter rekombinanter Proteinexpression und weiterer Belastung des Zellmetabolismus führt (Cserjan-Puschmann et al. 1999; Grabherr et al. 2002). Da *E. coli* in Minimalmedium Aminosäuren *de novo* synthetisieren muss, kann es zu einer Akkumulation unbeladener tRNAs gekommen sein. Die Verwendung von Komplexmedium anstatt Minimalmedium führte allerdings weder zu höheren Expressionstitern noch zu einer besseren Reproduzierbarkeit der Expression, obwohl jeweils von einem frisch transformierten Klon ausgegangen wurde. Solche schwankenden Expressionslevel können auf das Phänomen chromosomaler Mutationen der T7-RNA-Polymerase im Zusammenhang mit rekombinanter Proteinexpression mit einem T7-Promotersystem zurückzuführen sein (Vethanayagam und Flower 2005).

Methode B (Abb. 18), die in Anlehnung an Expressionen im Erlenmeyerkolben entwickelt wurde, war in der Lage, reproduzierbare intrazelluläre Expressionstiter von P450_{BM-3} QM in BL21 (P450_{BM-3} QM) und BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) zu liefern. Allerdings wurden

durch diese Methode geringere Biotrockenmassekonzentrationen erreicht. Im Erlenmeyerkolben wurden anscheinend, bedingt durch den geringeren Sauerstoffeintrag, der fehlenden pH-Wertkontrolle und der Kohlenstoff- und Energiequellenzufuhr aus einem Komplexmedium im Batchverfahren, ein stabiler Kompromiss zwischen rekombinanter Proteinexpression und metabolischen Bedarf der Zelle gefunden.

2.1.3 Energieeintrag und Volumen der organische Phase

Der Energieeintrag in Form der Rührerdrehzahl und das Volumen der organischen Phase haben über die Feinheit der Dispergierung der organischen in der wässrigen Phase Einfluss auf die Größe der Phasengrenzfläche und damit auf den Massentransfer von Substrat und Produkt zwischen den Phasen. Vergleichende Ganzzellbiotransformationen im wässrig-organischen Zweiphasensystem wurden bei konstanten Werten für Biotrockenmassekonzentration, Phasenverhältnis und Volumenanteil des Substrats in der organischen Phase, jedoch verschiedenen Rührerdrehzahlen im Parallelermentationssystem durchgeführt (Abb. 20). Die leicht steigenden Werte von Q und $Y_{P/P450}$ im Bereich zwischen 800-1100 rpm erklären sich durch die Verbesserung der Substratzugänglichkeit für den Ganzzellbiokatalysator bedingt durch den verbesserten Massentransfer über eine größere Grenzfläche. Ob diese erleichterte Zugänglichkeit durch höhere Konzentrationen von α -Pinen in der wässrigen Phase oder durch eine größere Grenzfläche, durch die die Ganzzellbiokatalysatoren in direkten Kontakt mit dem Substrat kommen können oder eine Kombination dieser Phänomene erfolgt, ließ sich aus den gewonnenen Daten nicht schlussfolgern. Deutlich war jedoch eine kritische Grenze für den Energieeintrag festzustellen. Diese Grenze lag für das verwendete System zwischen 1100 und 1500 rpm. Erhöhter Energieeintrag führt zu einer vergrößerten Phasengrenzfläche. Dies wiederum führt zu vermehrtem Kontakt und verlängerter Expositionszeit von *E. coli* mit Lösungsmittelmolekülen, die in die Zellmembran interkalieren und dadurch destabilisieren (Heipieper et al. 1994; Sikkema et al. 1994; Sikkema et al. 1995). Dadurch werden die Zellen anfälliger für mechanische Belastungen wie z.B. Scherkräfte (Aono und Kobayashi 1997). Durch Beeinträchtigung der Zellintegrität und -vitalität verkürzt sich der Produktbildungszeitraum und geringere Produktkonzentrationen können akkumuliert werden.

Mit dem Volumenanteil der organischen Phase sinkt auch ihre Kapazität zur Aufnahme von Produkten, wodurch deren Konzentration in der wässrigen Phase zunehmen kann. Geringe Volumenanteile der organischen Trägerphase führen außerdem zu einer Verkleinerung der Phasengrenzfläche, wodurch zwar die toxischen Effekte auf den Ganzzellbiokatalysator abnehmen, aber gleichzeitig auch der Transfer von Substrat in die wässrige Phase und damit die Substratverfügbarkeit verringert wird. Daher wurde keine Produktbildung beobachtet wenn, gemessen am Gesamtvolumen, DINP-Volumenanteile von 5-15% (v/v) mit darin gelösten α -Pinenanteilen von 5-50% (v/v_{Org}) eingesetzt wurden. Volumen der organischen Phase, Energieeintrag und Biotrockenmassekonzentration stehen somit über die durch eine vergrößerte Phasengrenzfläche vermittelten positiven (besserer Stoffübergang) und negativen

Effekte (längere Kontaktzeit) im Zusammenhang mit der Produktkonzentration. Durch Anpassung und Optimierung dieser Systemparameter muss ein Kompromiss zwischen maximaler Substratverfügbarkeit und Produktabtrennung bei gleichzeitig minimalen Aktivitätsverlusten des Ganzzellbiokatalysators durch toxische Effekte gefunden werden. Dabei kann sich die Inkaufnahme einer anfangs geringen spezifischen initialen Produktbildungsrate oder spezifischen Produktausbeute durch einen verlängerten Produktbildungszeitraum des Ganzzellbiokatalysators bezahlt machen.

2.2 Molekularbiologische Optimierung des Ganzzellbiokatalysators

Der Cofaktor NADPH ist ein zentraler Bestandteil des P450_{BM-3}-Monooxygenasesystems. Wenn eine Kopplungsrate von 100% vorliegt, so entspricht die Oxidation eines NADPH-Moleküls der Oxidation eines Substratmoleküls. Da jedoch, wie in der Literatur beschrieben, mutierte P450_{BM-3}-Monooxygenasen bei nicht-natürlichen Substraten hohe Entkopplungsraten der NADPH-Oxidation von der Substratoxidation zeigen (Farinas et al. 2004; Noble et al. 1999; Sowden et al. 2005), kann die von P450_{BM-3} QM katalysierte Oxidation von α -Pinen durch die NADPH-Regenerationsrate des Wirtsorganismus *E. coli* limitiert sein. Die Einbringung cofaktorregenerierender Enzyme für die Optimierung der katalytischen Aktivität von Oxidoreduktasen in *E. coli* wurde bereits in der Vergangenheit als erfolgreiche Strategie beschrieben (Ernst et al. 2005; Kataoka et al. 2003; Kaup et al. 2004; Mouri et al. 2006; Schroer et al. 2007). Dabei wurde das Enzym Glucosedehydrogenase (GlcDH) erfolgreich zur NADPH-Regeneration eingesetzt (Kataoka et al. 1998; Schroer et al. 2007), auch in Zusammenhang mit einer P450_{BM-3}-Monooxygenase (Lu und Mei 2007). Innerhalb von Cofaktorregenerationssystemen werden Glucosedehydrogenasen bevorzugt, da sie bei der Reduzierung von NADP⁺ D-Glucose zu D-Gluconolacton oxidieren (Xu et al. 2007). Glucose ist eine äußerst kostengünstige Quelle für Reduktionsäquivalente (Wandrey 2004). GlcDH 2 aus *Bacillus megaterium* IAM1030 wurde als Cofaktorregenerationssystem ausgewählt, da sie eine hohe katalytische Aktivität aufweist und bevorzugt NADP⁺ als Cofaktor zur Glucoseoxidation verwendet (Nagao et al. 1992). Da GlcDH 2 nur unphosphorylierte Glucose als Substrat akzeptiert und die Glucoseaufnahmemechanismen von *E. coli* mit Phosphorylierungen verbunden sind, wurde das Cofaktorregenerationssystem um ein weiteres Enzym ergänzt. Der Glucosefacilitator (GLF) aus *Zymomonas mobilis* katalysiert die Diffusion von Glucosemolekülen über die Zellmembran, ohne dabei metabolische Energie in Form von Protonenpotentialen oder Phosphorendolpyruvat zu benötigen oder Veränderungen am Glucosemolekül vorzunehmen (Weisser et al. 1995).

2.2.1 *In vitro* Untersuchung des Cofaktorregenerationssystems

Der K_M von GlcDH 2 aus *B. megaterium* für Glucose und NADP⁺ liegt bei 12,4 bzw. 0,018 mM bei 30°C und pH 8. Unter diesen Bedingungen zeigt GlcDH einen k_{cat} -Wert von 140 s⁻¹ (Nagao et al. 1992). Expressionstiter von GlcDH in BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF)

wurden zwischen $2,2 - 3 \cdot 10^4 \text{ U g}^{-1}_{\text{BTM}}$ gemessen (25°C ; pH 7,5). P450_{BM-3} QM zeigte eine NADPH-Verbrauchsrate von $27,6 \pm 0,5 \text{ } \mu\text{mol min}^{-1} \mu\text{mol}^{-1}_{\text{P450}}$ bei 37°C und pH 7,5, wenn α -Pinen als Substrat eingesetzt wurde bei einem Expressionstiter von $0,2-0,5 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}_{\text{BTM}}$. Diese Zahlen weisen darauf hin, dass pro Ganzzellbiokatalysator genug NADPH-regenerierende Aktivität gebildet wurde und der rekombinante Redoxzyklus nicht durch die GlcDH-Aktivität limitiert war.

Bei den *in vitro* Aktivitätsmessungen von Rohzellextrakten von BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) konnte bei Verwendung von NADPH als Cofaktor eine vergleichbare Wechselzahl der *p*-Nitrophenolatbildung gemessen werden, wie nach Ersetzung von NADPH durch NADP⁺ und Glucose. Diese Daten weisen auf eine direkte Kopplung von NADPH-Verbrauch durch die P450-Monooxygenase und GlcDH-katalysierte NADPH-Regeneration in Form eines katalytischen Zyklus hin. Außerdem wurde gezeigt, dass das rekombinante Cofaktorregenerationssystem in der Lage ist, *in vitro* vergleichbare Reaktionsraten von P450_{BM-3} QM-katalysierter 12-*p*NCA-Oxidation zu erreichen wie ein NADPH-getriebenes System.

2.2.2 Biotransformationen im Erlenmeyerkolben

Der Erfolg dieser molekularbiologischen Optimierung konnte im Erlenmeyerkolbenmaßstab bei einem direkten Vergleich von BL21 (P450_{BM-3} QM) mit BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) durch eine Verfünffachung der spezifischen initialen Gesamtproduktbildungsrate und die Vervierfachung der Gesamtproduktausbeute beim Ganzzellbiokatalysator mit rekombinanter intrazellulärer Cofaktorregenerierung gezeigt werden (Abb. 15). Betrachtet man die spezifische initiale Produktbildungsrate und die Produktausbeute des Hauptproduktes α -Pinenoxid konnte sogar eine Verneun- bzw. Versechsfachung der entsprechenden Werte verzeichnet werden (Tab. 20). Die endogene NADPH-Regenerierung von *E. coli* kann also als limitierter Faktor der *in vivo* α -Pinenoxidation durch P450_{BM-3} QM angesehen werden.

In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) α -Pinen auch oxidiert, wenn keine Glucose im Medium vorliegt (Abb. 16). Das zeigt, dass endogenes NADPH für die Reaktion verwendet wurde und dabei Produktkonzentrationen vergleichbar mit den von BL21 (P450_{BM-3} QM) produzierten akkumuliert wurden. Die Zugabe von Glucose zum Medium führte zu einer Versiebenfachung der spezifischen α -Pinenoxidausbeute bei gleichzeitiger Verringerung der Glucosekonzentration in der wässrigen Phase. Diese Ergebnisse zeigen, dass exogen vorliegende Glucose über die Zellmembran in *E. coli* BL21 Zellen transportiert wurde und dort für die Oxidation und NADPH-Regenerierung durch GlcDH zur Verfügung stand. Untersuchungen zur Biotransformationsaktivität von BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH) zeigten die Wichtigkeit eines Glucoseaufnahmesystems, da nach Glucosezugabe zu Ganzzellbiotransformationen mit BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH) keine Verbesserung der Produktbildung beobachtet werden konnte. Damit wurde die Substratspezifität von GlcDH für unphosphorylierte Glucose durch

Einfügung des Glucosefacilitators erfolgreich adressiert. *E. coli* BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) kann somit als Ganzzellbiokatalysator betrachtet werden, der eine direkte glucosegetriebene Cofaktorregenerierung als ganze intakte Zelle ohne vorherige Permeabilisierung durchführen kann.

2.2.3 Biotransformation im Bioreaktor

In Übereinstimmung mit zuvor im Erlenmeyerkolben generierten Daten konnte ein positiver Effekt des rekombinanten intrazellulären Cofaktorregenerationssystems auch im Bioreaktormaßstab beobachtet werden (Abb. 21). BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) zeigte eine effektivere Nutzung intrazellulärer P450_{BM-3} QM vor allem in der Anfangsphase der Biotransformation, dokumentiert durch eine Steigerung der spezifischen initialen Produktbildungsrate Q um 100%. Trotz eines geringeren intrazellulären Expressionstiters von P450_{BM-3} QM bei BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) war dieser in der Lage, innerhalb der experimentellen Abweichung vergleichbare Produktkonzentrationen bezogen auf die wässrige Phase wie BL21 (P450_{BM-3} QM) zu erreichen (Abb. 22). Die P450-spezifische Produktausbeute $Y_{P/P450}$ wurde ebenfalls durchschnittlich verdoppelt. Damit war die Verbesserung der spezifischen initialen Produktbildungsrate nicht so ausgeprägt wie bei Experimenten im Erlenmeyerkolben, wo ein fünffach verbesserter Wert für Q durch Einführung des rekombinanten intrazellulären Cofaktorregenerationssystems erreicht werden konnte. Eine Erklärung hierfür könnten die vergleichsweise besseren Bedingungen im Bioreaktor wie konstanter kontrollierter pH-Wert, verbesserte Sauerstoffverfügbarkeit und kontinuierliche Kohlenstoff- und Stickstoffzufuhr sein, die die nativen intrazellulären Cofaktorregenerationsreaktionen des Zellmetabolismus von *E. coli* unterstützten. Deswegen fiel der Leistungsabstand zwischen BL21 (P450_{BM-3} QM) und BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) durch Verminderung des positiven Effekts des rekombinanten intrazellulären Cofaktorregenerationssystems von BL21 (P450_{BM-3} QM/GlcDH/GLF) nicht so deutlich aus wie im Erlenmeyerkolben. Bezogen auf das Volumen der wässrigen Phase konnten innerhalb der Ganzzellbiotransformation im Bioreaktor über $1 \text{ g l}_{\text{Aq}}^{-1}$ an oxidierten Produkten akkumuliert werden. Die mikrobielle Konversion von Pinenen wurde seit den frühen 1960er Jahren untersucht (Shukla und Bhattacharyya 1968; Trudgill 1994). Aufgrund vieler verschiedener Abbauwege leiten sich von der Oxyfunktionalisierung von Pinene viele interessante Produkte ab (vgl. Abb. 4). Jedoch wurden, vermutlich wegen der komplexen bityklischen Struktur der Pinene, üblicherweise im Vergleich zu anderen Terpenoxidationen nur sehr geringe Produktausbeuten im Milligramm pro Liter Bereich erreicht (Übersicht bei Schrader (2007)). Lediglich die Publikation von van Dyk et al. (1998) beschreibt eine α -Pinentransformation mit Produktkonzentrationen im Gramm pro Liter Bereich: mit der Hefe *Hormonema* sp. konnten $0,3 \text{ g l}^{-1}$ Verbenon und $0,4 \text{ g l}^{-1}$ Verbenol nach 96 Stunden Biotransformation akkumuliert werden. In diesem Zusammenhang sind Produktkonzentrationen von über $1 \text{ g l}_{\text{Aq}}^{-1}$ in nur 4 h Biotransformationszeit, wie sie in dieser Arbeit erreicht wurden, ein vielversprechender Schritt zur

Anwendung rekombinanter Mikroorganismen zur regio- und enantioselektiven Oxidation von α -Pinen.

2.3 Ausblick

Maßnahmen zur weiteren Verbesserung von Produktivität und Produktkonzentration und damit der Wirtschaftlichkeit eines Bioprozesses zur P450_{BM-3}-katalysierten α -Pinenoxidation liegen sowohl im molekularbiologischen als auch im prozesstechnischen Bereich. Ein Haupthindernis beim Erreichen hoher Produktkonzentrationen stellte, unter den untersuchten Prozessbedingungen, der begrenzte Produktbildungszeitraum dar. Toxische Effekte der organischen Phase führten zu verminderter Biokatalysatorproduktivität und Einstellung der Produktbildung nach 4-5 h. Selbst für hochpreisige natürliche Aromastoffe ist die TTN (bzw. $Y_{P/P450}$) mit ca. 1000 noch zu gering, um die Schwelle eines wirtschaftlichen Prozesses zu erreichen (Bommarius und Riebel 2004). Die Wiederverwendbarkeit des Ganzzellbiokatalysators nach Phasentrennung hätte eine höhere TTN zur Folge und einen positiven Effekt auf die Prozessökonomie. Eine Umgehung dieser toxischen Effekte wäre entweder durch Wahl einer indirekten Kontaktierung des Ganzzellbiokatalysators mit der organischen Phase, z.B. durch Abtrennung mit einer Membran (Perstraktion) oder durch Anwendung selektiver Adsorber, die sowohl das Substrat vermitteln als auch Produkte abtrennen können (Belin et al. 1992; Hilker et al. 2008), möglich. Die Wirtschaftlichkeit des Bioprozesses hängt u.a. auch vom Marktpreis und der Jahresproduktionsmenge des Produktes ab. Die Verwendung einer P450_{BM-3} Variante, die α -Pinen regio- und enantioselektiv zu einem einzigen hochwertigen Produkt oxidieren kann, würde Aufarbeitungskosten bei der Trennung der bisher produzierten drei Produkte α -Pinenoxid, Verbenol und Myrtenol sparen und über den hohen Marktpreis die Rentabilität des Gesamtprozess absichern. Um reproduzierbar hohe intrazelluläre Expressionstiter der P450-Monooxygenase bei gleichzeitigen hohen Biotrockenmassekonzentrationen zu erreichen, sollte das bisher modellhaft verwendete T7-Expressionssystem, mit den Nachteilen der Überlastung der Syntheseleistungen des Wirtsorganismus und Verwendung des teuren Induktors IPTG, durch ein geeigneteres Expressionssystem ersetzt werden. Zum Beispiel wurde über eine effiziente und stabile Expression mit Hilfe des *alk*-Regulationssystems aus *Pseudomonas oleovorans* berichtet und seine Eignung zur Expression von Monooxygenasegenen hervorgehoben (Panke et al. 2000). Innerhalb der Arbeit wurde das Downstream Processing nicht weiter untersucht, jedoch liefern die höheren Siedepunkte der Produkte im Vergleich zum Substrat und die Verwendung einer organischen Trägerphase mit einem hohen Siedepunkt (über 400°C für DINP) Argumente für eine Destillation als stabilste und ökonomischste Art der Produktaufreinigung aus einer apolaren Phase (Mathys et al. 1998a).

Weitere molekularbiologische Optimierungen des *E. coli*-Ganzzellbiokatalysators sind denkbar. So kann die Toleranz von *E. coli* gegen organische Lösungsmittel durch Überex-

pression verschiedener Proteine erhöht werden (Asako et al. 1997; Okochi et al. 2007; Tsukagoshi und Aono 2000). Die Flexibilität der Verwendung des Ganzzellbiokatalysators kann verbessert werden, indem die Proteine des heterologen Cofaktorregenerationssystems auf einem Plasmid vereinigt werden, während die P450-Monooxygenase auf einem zweiten Plasmid kodiert wird. Dadurch wäre ein Ganzzellbiokatalysator mit intrazellulärer rekombinanter Cofaktorregenerierung im Sinne einer mikrobiellen Plattform generiert, mit der nach Expression anderer P450-Monooxygenasen (falls nötig zusammen mit ihren Reduktasen und Elektronentransferproteinen), alternative interessante und hochwertige Produkte, wie sie z.B. aus der Biotransformation von Sesquiterpenoiden entstünden, produziert werden könnten.

Literatur

Agble D und Mendes-Tatsis MA (2000) The effect of surfactants on interfacial mass transfer in binary liquid-liquid systems. *Int J Heat Mass Transfer* 43: 1025-1034

Aono R und Kobayashi H (1997) Cell surface properties of organic solvent-tolerant mutants of *Escherichia coli* K-12. *Appl Environ Microbiol* 63: 3637-3642

Aono R, Kobayashi H, Joblin NK und Horikoshi K (1994) Effects of Organic Solvents on Growth of *Escherichia coli* K-12. *Biosci Biotechnol Biochem* 58: 2009-2014

Appel D, Lutz-Wahl S, Fischer P, Schwaneberg U und Schmid RD (2001) A P450_{BM-3} mutant hydroxylates alkanes, cycloalkanes, arenes and heteroarenes. *Journal of Biotechnology* 88: 167-171

Asako H, Nakajima H, Kobayashi K, Kobayashi M und Aono R (1997) Organic solvent tolerance and antibiotic resistance increased by overexpression of *marA* in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 63: 1428-1433

Bar R (1987) Phase toxicity in a water-solvent two-liquid phase microbial system. In: Laane, C, Tramper, J und Lilly, MD (eds) *Biocatalysis in organic media*. Elsevier, Amsterdam, S. 147-156

Bar R (1988) Effect of Interphase Mixing on a Water-Organic Solvent Two-Liquid Phase Microbial System: Ethanol Fermentation. *J Chem Tech Biotechnol* 43: 49-62

Bauer K, Garbe D und Surburg H (2001) *Common Fragrance and Flavor Materials. Preparation, Properties and Uses*. Wiley-VCH, Weinheim

Belin JM, Bensoussan M und Serrano-Carreón L (1992) Microbial biosynthesis for the production of food flavours. *Trends in Food Science & Technology* 3: 11-14

Bell SG, Chen X, Sowden RJ, Xu F, Williams JN, Wong LL und Rao Z (2003a) Molecular recognition in (+)- α -pinene oxidation by cytochrome P450cam. *J Am Chem Soc* 125: 705-714

Bell SG, Chen X, Xu F, Rao Z und Wong LL (2003b) Engineering substrate recognition in catalysis by cytochrome P450cam. *Biochem Soc Trans* 31: 558-562

Bell SG, Sowden RJ und Wong LL (2001) Engineering the haem monooxygenase cytochrome P450cam for monoterpene oxidation. *Chem Commun* 635-636

Bellussi L, Manini G, Buccella MG und Cacchi R (1990) Evaluation of the efficacy and safety of sobrerol granules in patients suffering from chronic rhinosinusitis. *J Int Med Res* 18: 454-459

Berger RG, Latza E, Neuser F und Onken J (1999) Terpenes and Amino Acids - Progenitors of Volatile Flavours in Microbial Transformation Reactions. In: Schieberle, P und Engel, KH (eds) *Frontiers of Flavour Science*. Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching, S. 394-399

- Boddupalli SS, Pramanik BC, Slaughter CA, Estabrook RW und Peterson JA (1992) Fatty acid monooxygenation by P450_{BM-3}: product identification and proposed mechanisms for the sequential hydroxylation reactions. *Arch Biochem Biophys* 292: 20-28
- Bommarius AS und Riebel BR (2004) *Biocatalysis - Fundamentals and Applications*. Wiley-VCH, Weinheim
- Boontawan A und Stuckey DC (2005) Mass transfer of terpenes through a silicone rubber membrane in a liquid-liquid contacting system. *Biotechnol Prog* 21: 1680-1687
- Branco RJ, Seifert A, Budde M, Urlacher VB, Ramos MJ und Pleiss J (2008) Anchoring effects in a wide binding pocket: The molecular basis of regioselectivity in engineered cytochrome P450 monooxygenase from *B. megaterium*. *Proteins*
- Bruce LJ und Daugulis AJ (1991) Solvent selection strategies for extractive biocatalysis. *Biotechnol Prog* 7: 116-124
- Budde M (2007) *Biokatalyse mit Cytochrom P450 Monooxygenasen: zur selektiven Oxidation von Terpenen und Fettsäuren*. Fakultät Chemie, Universität Stuttgart, Dissertation
- Buffon R und Schuchardt U (2003) Heterogenization of alkene epoxidation catalysts. *J Braz Chem Soc* 14: 347-353
- Bühler B, Bollhalder I, Hauer B, Witholt B und Schmid A (2003a) Chemical biotechnology for the specific oxyfunctionalization of hydrocarbons on a technical scale. *Biotechnol Bioeng* 82: 833-842
- Bühler B, Bollhalder I, Hauer B, Witholt B und Schmid A (2003b) Use of the two-liquid phase concept to exploit kinetically controlled multistep biocatalysis. *Biotechnol Bioeng* 81: 683-694
- Bühler B, Straathof AJJ, Witholt B und Schmid A (2006) Analysis of Two-Liquid-Phase Multistep Biooxidation Based on a Process Model: Indications for Biological Energy Shortage. *Org Process Res Dev* 10: 628-643
- Busmann D und Berger RG (1994) Oxyfunctionalization of α - and β -Pinene by Selected Basidiomycetes. *Z Naturforsch* 37: 39-43
- Crabbe PG, Tse CW und Munro PA (1986) Effect of microorganisms on rate of liquid extraction of ethanol from fermentation broths. *Biotechnol Bioeng* 28: 939 - 943
- Cruz A, Fernandes P, Cabral JMS und Pinheiro HM (2004) Solvent partitioning and whole-cell sitosterol bioconversion activity in aqueous-organic two-phase systems. *Enzyme Microb Technol* 34: 342-353
- Cryle MJ, Stok JE und De Voss JJ (2003) Reactions Catalyzed by Bacterial Cytochromes P450. *Aust J Chem* 56: 749-762
- Cserjan-Puschmann M, Kramer W, Duerrschmid E, Striedner G und Bayer K (1999) Metabolic approaches for the optimisation of recombinant fermentation processes. *Appl Microbiol Biotechnol* 53: 43-50

- Daugulis AJ, Axford DB und McLellan PJ (1991) The economics of ethanol production by extractive fermentation. *Can J Chem Eng* 69: 488-497
- de Carvalho CC und da Fonseca MM (2004) Solvent toxicity in organic-aqueous systems analysed by multivariate analysis. *Bioprocess Biosyst Eng* 26: 361-375
- Dejong JM, Liu Y, Bollon AP, Long RM, Jennewein S, Williams D und Croteau RB (2006) Genetic engineering of taxol biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* 93: 212-224
- Desai JD und Banat IM (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 47-64
- Deziel E, Comeau Y und Villemur R (1999) Two-liquid-phase bioreactors for enhanced degradation of hydrophobic/toxic compounds. *Biodegradation* 10: 219-233
- Ernst M, Kaup B, Muller M, Bringer-Meyer S und Sahm H (2005) Enantioselective reduction of carbonyl compounds by whole-cell biotransformation, combining a formate dehydrogenase and a (R)-specific alcohol dehydrogenase. *Appl Microbiol Biotechnol* 66: 629-634
- Estabrook RW (1996) The remarkable P450s: a historical overview of these versatile heme protein catalysts. *FASEB J* 10: 202-204
- Falck JR, Reddy YK, Haines DC, Reddy KM, Krishna UM, Graham S, Murry B und Peterson JA (2001) Practical, enantiospecific syntheses of 14,15-EET and leukotoxin B (vernolic acid). *Tetrahedron Letters* 42: 4131-4133
- Farinas ET, Alcalde M und Arnold F (2004) Alkene epoxidation catalyzed by cytochrome P450_{BM-3} 139-3. *Tetrahedron* 60: 525-528
- Farooq A, Tahara S, Choudhary MI, Atta ur R, Ahmed Z, Husnu CB und Demirci F (2002) Biotransformation of (-)- α -pinene by *Botrytis cinerea*. *Z Naturforsch [C]* 57: 303-306
- Favre-Bulle O, Schouten T, Kingma J und Witholt B (1991) Bioconversion of *n*-octane to octanoic acid by a recombinant *Escherichia coli* cultured in a two-liquid phase bioreactor. *Biotechnology (N Y)* 9: 367-371
- Favre-Bulle O, Weenink E, Vos T, Preusting H und Witholt B (1993) Continuous bioconversion of *n*-octane to octanoic acid by recombinant *Escherichia coli* (*alk+*) growing in a two-liquid-phase Chemostat. *Biotechnol Bioeng* 41: 263-272
- Freeman A, Woodley JM und Lilly MD (1993) In situ product removal as a tool for bioprocessing. *Biotechnology (N Y)* 11: 1007-1012
- Glieder A, Farinas ET und Arnold FH (2002) Laboratory evolution of a soluble, self-sufficient, highly active alkane hydroxylase. *Nat Biotechnol* 20: 1135-1139
- Goswami P und Singh HD (1991) Different modes of hydrocarbon uptake by two *Pseudomonas* species. *Biotechnol Bioeng* 37: 1-11
- Gotoh O (1992) Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *J Biol Chem* 267: 83-90

Grabherr R, Nilsson E, Striedner G und Bayer K (2002) Stabilizing plasmid copy number to improve recombinant protein production. *Biotechnol Bioeng* 77: 142-147

Griffin SG, Wyllie SG, Markham JL und Leach DN (1999) The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal* 14: 322-332

Guengerich FP (1995) Cytochrome P450 proteins and potential utilization in biodegradation. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 5: 25-28

Guengerich FP (2001) Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to metabolism and chemical toxicity. *Chemical Reserch in Toxicology* 16: 611-650

Guengerich FP (2002) Cytochrome P450 enzymes in the Generation of Commercial Products. *Nature Reviews Drug Discovery* 1: 359-366

Hamilton D und Weatherley LR (1995) The effect of biomass concentration on interfacial tension in whole broth liquid-liquid extraction system. *ICHEME Res Event* 1139-1141

Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580

Hannemann F, Bichet A, Ewen KM und Bernhardt R (2007) Cytochrome P450 systems--biological variations of electron transport chains. *Biochim Biophys Acta* 1770: 330-344

Heipieper HJ und de Bont JA (1994) Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to ethanol and toluene at the level of fatty acid composition of membranes. *Appl Environ Microbiol* 60: 4440-4444

Heipieper HJ, Weber FJ, Sikkema J, Keweloh H und de Bont JAM (1994) Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends Biotechnol* 12: 409-415

Hilker I, Gutierrez MC, Furstoss R, Ward J, R. W und Alphand V (2008) Preparative scale Baeyer-Villiger biooxidation at high concentration using recombinant *Escherichia coli* and *in situ* substrate feeding and product removal process. *Nat Protoc* 3: 546-554

Hill RA (1993) Terpenoids. In: Thomson, RH (eds) *The Chemistry of Natural Products*. Blackie Academic & Professional; Chapman & Hall, London New York, S. 106-139

Hocknull MD und Lilly MD (1987) The δ -1-dehydrogenation of hydrocortisone by *Arthrobacter simplex* in organic aqueous two-liquid phase environments. In: Laane, C, Tramper, J und Lilly, MD (eds) *Biocatalysis in organic media*. Elsevier, Amsterdam, S. 669-674

Hofstetter K, Lutz J, Lang I, Witholt B und Schmid A (2004) Coupling of biocatalytic asymmetric epoxidation with NADH regeneration in organic-aqueous emulsions. *Angew Chem Int Ed Engl* 43: 2163-2166

Ingram LO (1977) Changes in lipid composition of *Escherichia coli* resulting from growth with organic solvents and with food additives. *Appl Environ Microbiol* 33: 1233-1236

- Kataoka M, Kita K, Wada M, Yasohara Y, Hasegawa J und Shimizu S (2003) Novel bioreduction system for the production of chiral alcohols. *Appl Microbiol Biotechnol* 62: 437-445
- Kataoka M, Sri Rohani LP, Wada M, Kita K, Yanase H, Urabe I und Shimizu S (1998) *Escherichia coli* transformant expressing the glucose dehydrogenase gene from *Bacillus megaterium* as a cofactor regenerator in a chiral alcohol production system. *Biosci Biotechnol Biochem* 62: 167-169
- Kaup B, Bringer-Meyer S und Sahm H (2004) Metabolic engineering of *Escherichia coli*: construction of an efficient biocatalyst for D-mannitol formation in a whole-cell biotransformation. *Appl Microbiol Biotechnol* 64: 333-339
- Keweloh H, Weyrauch G und Rehm HJ (1990) Phenol-induced membrane changes in free and immobilized *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 33: 66-71
- Kosinski MJ, Rinas U und Bailey JE (1992) Isopropyl- β -d-thiogalactopyranoside influences the metabolism of *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 36: 782-784
- Laane C, Boeren S, Hilhorst R und Veeger C (1987a) Optimization of biocatalysis in organic media. In: Laane, C, Tramper, J und Lilly, M (eds) *Biocatalysis in organic media*. Elsevier, Amsterdam, S. 65-84
- Laane C, Boeren S und Vos K (1985) On optimizing organic solvents in multi-liquid-phase biocatalysis. *Trends Biotechnol* 3: 251-252
- Laane C, Boeren S, Vos K und Veeger C (1987b) Rules for Optimization of Biocatalysis in Organic Solvents. *Biotechnol Bioeng* 30: 81-87
- Lee SY (1996) High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* 14: 98-105
- Lentz O, Li Q-S, Schwaneberg U, Lutz-Wahl S, Fischer P und Schmid RD (2001) Modification of the fatty acid specificity of cytochrome P450_{BM-3} from *Bacillus megaterium* by directed evolution: a validated assay. *J Mol Catal B: Enzym* 15: 123-133
- León R, Fernandes P, Pinheiro HM und Cabral JMS (1998) Whole-cell biocatalysis in organic media. *Enzyme Microb Technol* 23: 483-500
- Lewis D (1996) P450: Structure, function and mechanism, vol. 1. Taylor&Francis, London
- Li H und Poulos TL (1997) The structure of the cytochrome P450_{BM-3} haem domain complexed with the fatty acid substrate, palmitoleic acid. *Nat Struct Biol* 4: 140-146
- Li QS, Schwaneberg U, Fischer P und Schmid RD (2000) Directed evolution of the fatty-acid hydroxylase P450_{BM-3} into an indole-hydroxylating catalyst. *Chemistry* 6: 1531-1536
- Lilly MD (1994) Advances in biotransformation processes. *Trans I Chem Eng* 72: 27-34
- Lilly MD, Brazier AJ, Hocknull MD, William AC und Woodley JM (1987) Biological conversions involving waterinsoluble organic compounds. In: Laane, C, Tramper, J und Lilly, MD (eds) *Biocatalysis in organic media*. Elsevier, Amsterdam, S. 65-84

- Loza-Tavera H (1999) Monoterpenes in Essential Oils. In: Shahidi, F, Kolodziejczyk, P, Whitaker, JR, Lopez Munguia, A und Fuller, G (eds) Chemicals via Higher Plant Bioengineering. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, S. 49-62
- Lu Y und Mei L (2007) Co-expression of P450_{BM-3} and glucose dehydrogenase by recombinant *Escherichia coli* and its application in an NADPH-dependent indigo production system. *J Ind Microbiol Biotechnol* 34: 247-253
- Lye GJ und Woodley JM (1999) Application of *in situ* product-removal techniques to biocatalytic processes. *Trends Biotechnol* 17: 395-402
- Lye GJ und Woodley JM (2001) Advances in the selection and design of two-liquid phase biocatalytic reactors. In: Cabral, JMS, Mota, M und Tramper, J (eds) Multiphase bioreactor design. Taylor & Francis, London, S. 115-134
- MacLeod CT und Daugulis AJ (2005) Interfacial effects in a two-phase partitioning bioreactor: degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a hydrophobic *Mycobacterium*. *Process Biochem* 40: 1799-1805
- Malinowski JJ (2001) Two-phase partitioning bioreactors in fermentation technology. *Biotechnol Adv* 19: 525-538
- Martinetz D und Hartwig R (1998) Taschenbuch der Riechstoffe. Harri Deutsch, Frankfurt
- Mathys RG, Schmid A, Kut OM und Witholt B (1998a) Alkanol Removal from the Apolar Phase of a Two-Liquid Phase Bioconversion System. Part 1: Comparison of a Less Volatile and a More Volatile in-situ Extraction Solvent for the Separation of 1-Octanol by Distillation. *J Chem Technol Biotechnol* 71: 315-325
- Mathys RG, Schmid A, Kut OM und Witholt B (1998b) Alkanol Removal from the Apolar Phase of a Two-Liquid Phase Bioconversion System. Part 2: Effect of Fermentation Medium on Batch Distillation. *J Chem Technol Biotechnol* 71: 326-334
- Miura Y und Fulco AJ (1974) (ω -2) hydroxylation of fatty acids by a soluble system from *Bacillus megaterium*. *J Biol Chem* 249: 1880-1888
- Miyazawa M, Watanabe H und Kameoka H (1997) Inhibition of Acetylcholinesterase Activity by Monoterpenoids with a *p*-Menthane Skeleton. *J Agric Food Chem* 45: 677-679
- Mouri T, Michizoe J, Ichinose H, Kamiya N und Goto M (2006) A recombinant *Escherichia coli* whole cell biocatalyst harboring a cytochrome P450cam monooxygenase system coupled with enzymatic cofactor regeneration. *Appl Microbiol Biotechnol* 72: 514-520
- Munoz R, Chambaud M, Bordel S und Villaverde S (2008) A systematic selection of the non-aqueous phase in a bacterial two liquid phase bioreactor treating α -pinene. *Appl Microbiol Biotechnol* 79: 33-41
- Nagao T, Mitamura T, Wang XH, Negoro S, Yomo T, Urabe I und Okada H (1992) Cloning, nucleotide sequences, and enzymatic properties of glucose dehydrogenase isozymes from *Bacillus megaterium* IAM1030. *J Bacteriol* 174: 5013-5020
- Nakahara T, Erickson LE und Gutierrez JR (1977) Characteristics of hydrocarbon uptake in cultures with two liquid phases. *Biotechnol Bioeng* 19: 9-25

- Narhi LO und Fulco AJ (1986) Characterization of a Catalytically Self-Sufficient 119,000 Dalton Cytochrome P-450 Monooxygenase Induced by Barbiturates in *Bacillus megaterium*. *J Biol Chem* 261: 7160-7169
- Narhi LO, Wen LP und Fulco AJ (1988) Characterization of the protein expressed in *Escherichia coli* by a recombinant plasmid containing the *Bacillus megaterium* cytochrome P450_{BM-3} gene. *Mol Cell Biochem* 79: 63-71
- Nebert DW und Gonzalez FJ (1987) P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu Rev Biochem* 56: 945-993
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC und Nebert DW (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6: 1-42
- Nikolova P und Ward OP (1993) Whole cell biocatalysis in nonconventional media. *J Ind Microbiol* 12: 76-86
- Noble MA, Miles CS, Chapman SK, Lysek DA, Mackay AC, Reid GA, Hanzlik RP und Munro AW (1999) Roles of key active-site residues in flavocytochrome P450_{BM-3}. *Biochem J* 339: 371-379
- Nunn WD (1986) A molecular view of fatty acid catabolism in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* 50: 179-192
- Okochi M, Kurimoto M, Shimizu K und Honda H (2007) Increase of organic solvent tolerance by overexpression of *manXYZ* in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 73: 1394-1399
- Omura T und Sato R (1964) The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature. *J Biol Chem* 239: 2370-2378
- Ortiz de Montellano PR (1995) *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry*. Plenum Press, New York
- Panke S, Held M, Wubbolts MG, Witholt B und Schmid A (2002) Pilot-scale production of (S)-styrene oxide from styrene by recombinant *Escherichia coli* synthesizing styrene monooxygenase. *Biotechnol Bioeng* 80: 33-41
- Panke S, Wubbolts MG, Schmid A und Witholt B (2000) Production of enantiopure styrene oxide by recombinant *Escherichia coli* synthesizing a two-component styrene monooxygenase. *Biotechnol Bioeng* 69: 91-100
- Park JB, Bühler B, Habicher T, Hauer B, Panke S, Witholt B und Schmid A (2006) The efficiency of recombinant *Escherichia coli* as biocatalyst for stereospecific epoxidation. *Biotechnol Bioeng* 95: 501-512
- Peters MW, Meinhold P, Glieder A und Arnold FH (2003) Regio- and enantioselective alkane hydroxylation with engineered cytochromes P450_{BM-3}. *J Am Chem Soc* 125: 13442-13450

- Peterson DH, Murray HC, Eppstein SH, Reineke LM, Weintraub A, Meister PD und Leigh HM (1952) Microbiological Transformations of Steroids.1 I. Introduction of Oxygen at Carbon-11 of Progesterone. J Am Chem Soc 74: 5933-5936
- Petzoldt K, Annen K und Laurent H (1981) Process for the preparation of 11- β -hydroxy steroids. EP0042451, SCHERING AG (DE)
- Pursell MR, Mendes-Tatsis MA und Stuckey DC (2004) Effect of fermentation broth and biosurfactants on mass transfer during liquid-liquid extraction. Biotechnol Bioeng 85: 155-165
- Ravichandran KG, Boddupalli SS, Hasermann CA, Peterson JA und Deisenhofer J (1993) Crystal structure of hemoprotein domain of P450_{BM-3}, a prototype for microsomal P450's. Science 261: 731-736
- Riesenberg D (1991) High-cell-density cultivation of *Escherichia coli*. Curr Opin Biotechnol 2: 380-384
- Rosenberg M (1991) Basic and applied aspects of microbial adhesion at the hydrocarbon:water interface. Crit Rev Microbiol 18: 159-173
- Ruettinger RT, Wen LP und Fulco AJ (1989) Coding nucleotide, 5' regulatory, and deduced amino acid sequences of P-450_{BM-3}, a single peptide cytochrome P-450:NADPH-P-450 reductase from *Bacillus megaterium*. J Biol Chem 264: 10987-10995
- Schmid A (1997) Two-liquid phase bioprocess development: Interfacial mass transfer rates and explosion safety. Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich, Dissertation
- Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M und Witholt B (2001) Industrial biocatalysis today and tomorrow. Nature 409: 258-268
- Schmid A, Kollmer A und Witholt B (1998) Effects of Biosurfactant and Emulsification on Two-Liquid Phase *Pseudomonas oleovorans* Cultures and Cell-Free Emulsions Containing *n*-Decane. Enzyme Microb Technol 22: 487-493
- Schrader J (2007) Microbial Flavour Production. In: Berger, RG (eds) Flavours and Fragrances Chemistry, Bioprocessing and Sustainability. Springer Berlin Heidelberg, S. 509-573
- Schrader J und Berger RG (2001) Biotechnological production of terpenoid flavor and fragrance compounds. In: Rehm, HJ und Reed, G (eds) Biotechnology. Wiley-VCH, Weinheim, S. 373-422
- Schroer K, Mackfeld U, Tan IA, Wandrey C, Heuser F, Bringer-Meyer S, Weckbecker A, Hummel W, Daussmann T, Pfaller R, Liese A und Lutz S (2007) Continuous asymmetric ketone reduction processes with recombinant *Escherichia coli*. J Biotechnol 132: 438-444
- Schuler MA und Sligar SG (2006) Diversities and similarities of P450 systems: an introduction. In: Sigel, A, Sigel, H und Sigel, R (eds) Metal ions in life sciences. Wiley, Chichester, S. 1-26

- Schwaneberg U, Schmidt-Dannert C, Schmitt J und Schmid RD (1999) A continuous spectrophotometric assay for P450 BM-3, a fatty acid hydroxylating enzyme, and its mutant F87A. *Anal Biochem* 269: 359-366
- Serizawa N und Matsuoka T (1991) A two component-type cytochrome P-450 monooxygenase system in a prokaryote that catalyzes hydroxylation of ML-236B to pravastatin, a tissue-selective inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Biochim Biophys Acta* 1084: 35-40
- Sevrioukova IF, Li H, Zhang H, Peterson JA und Poulos TL (1999) Structure of a cytochrome P450-redox partner electron-transfer complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 1863-1868
- Shukla OP und Bhattacharyya PK (1968) Microbial Transformation of Terpenes: Part XI - Pathways of Degradation of α - and β -Pinenes in a Soil *Pseudomonad* (PL-Strain). *Indian J Biochem* 5: 92-101
- Sikkema J, de Bont JA und Poolman B (1994) Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J Biol Chem* 269: 8022-8028
- Sikkema J, de Bont JA und Poolman B (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev* 59: 201-222
- Singer M und Finnerty W (1984) Microbial metabolism of straight-chain and branched alkanes. In: Atlas, R (eds) *Petroleum Microbiology*. Macmillan Publishing Company, New York, S. 1-59
- Sowden RJ, Yasmin S, Rees NH, Bell SG und Wong LL (2005) Biotransformation of the sesquiterpene (+)-valencene by cytochrome P450cam and P450BM-3. *Org Biomol Chem* 3: 57-64
- Stark D (2001) Extractive Bioconversion of 2-Phenylethanol from L-Phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae*. Epfl, Lausanne
- Stark D und von Stockar U (2003) *In situ* product removal (ISPR) in whole cell biotechnology during the last twenty years. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 80: 149-175
- Straathof AJ, Panke S und Schmid A (2002) The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr Opin Biotechnol* 13: 548-556
- Studier FW und Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189: 113-130
- Szcebara FM, Chandelier C, Villeret C, Masurel A, Bourot S, Duport C, Blanchard S, Groisillier A, Testet E, Costaglioli P, Cauet G, Degryse E, Balbuena D, Winter J, Achstetter T, Spagnoli R, Pompon D und Dumas B (2003) Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast. *Nat Biotechnol* 21: 143-149
- Trudgill PW (1994) Microbial Metabolism and Transformation of Selected Monoterpenes. In: Ratledge, C (eds) *Biochemistry of Microbial Degradation*. Kluwer Academic Publishers, London, S. 33-61

- Tsukagoshi N und Aono R (2000) 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. *J Bacteriol* 182: 4803-4810
- Urlacher VB und Eiben S (2006) Cytochrome P450 monooxygenases: perspectives for synthetic application. *Trends Biotechnol* 24: 324-330
- Urlacher VB, Lutz-Wahl S und Schmid RD (2004) Microbial P450 enzymes in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 64: 317-325
- Urlacher VB, Makhsumkhanov A und Schmid RD (2006) Biotransformation of β -ionone by engineered cytochrome P450 BM-3. *Appl Microbiol Biotechnol* 70: 53-59
- van Dyk MS, van Rensburg E und Moleleki N (1998) Hydroxylation of (+)limonene, (-) α -pinene and (-) β -pinene by a *Hormonema* sp. *Biotechnol Lett* 20: 431-436
- Vermuë M, Sikkema J, Verheul A, Bakker R und Tramper J (1993) Toxicity of homologous series of organic solvents for the gram-positive bacteria *Arthrobacter* and *Nocardia* Sp. and the gram-negative bacteria *Acinetobacter* and *Pseudomonas* Sp. *Biotechnol Bioeng* 42: 747 - 758
- Vethanayagam JG und Flower AM (2005) Decreased gene expression from T7 promoters may be due to impaired production of active T7 RNA polymerase. *Microb Cell Fact* 4: 3
- Walsh C (2001) Enabling the Chemistry of Life. *Nature* 409: 226-231
- Wandrey C (2004) Biochemical reaction engineering for redox reactions. *Chem Rec* 4: 254-265
- Watanabe Y, Laschat S, Budde M, Affolter O, Shimada Y und Urlacher VB (2007) Oxidation of acyclic monoterpenes by P450 BM-3 monooxygenase: influence of the substrate E/Z-isomerism on enzyme chemo- and regioselectivity. *Tetrahedron* 63: 9413-9422
- Weisser P, Kramer R, Sahm H und Sprenger GA (1995) Functional expression of the glucose transporter of *Zymomonas mobilis* leads to restoration of glucose and fructose uptake in *Escherichia coli* mutants and provides evidence for its facilitator action. *J Bacteriol* 177: 3351-3354
- Westgate S, Bell G und Halling PJ (1995) Kinetics of uptake of organic liquid substrates by microbial cells: A method to distinguish interfacial contact and mass-transfer mechanisms. *Biotechnol Lett* 17: 1013-1018
- Wong LL, Bell SG und Carmichael A (2000) Process for oxidising terpenes. WO 00/31273, ISIS Innovation Limited
- Woodley JM, Bisschops M, Straathof AJJ und Ottens M (2008) Future directions for in-situ product removal (ISPR). *J Chem Technol Biotechnol* 83: 121-123
- Woodley JM, Brazier AJ und Lilly MD (1991) Lewis cell studies to determine reactor design data for two-liquid-phase bacterial and enzymic reactions. *Biotechnol Bioeng* 37: 133-140
- Woodley JM und Lilly MD (1990) Extractive biocatalysis: the use of two-liquid phase biocatalytic reactors to assist product recovery. *Chem Eng Sci* 45: 2391-2396

Wubbolts MG, Hoven J, Melgert B und Witholt B (1994) Efficient production of optically active styrene epoxides in two-liquid phase cultures. *Enzyme Microb Technol* 16: 887-893

Xu Z, Jing K, Liu Y und Cen P (2007) High-level expression of recombinant glucose dehydrogenase and its application in NADPH regeneration. *J Ind Microbiol Biotechnol* 34: 83-90

Yee L und Blanch HW (1992) Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnology (N Y)* 10: 1550-1556