

# Synthese von 9,10-Dihydroxystearinsäure aus Ölsäure mittels Cytochrom P450<sub>bmp</sub> Monooxygenase

*Al-Kaidy, Huschyar; Hering, Thomas; Tippkötter, Nils; Ulber, Roland; Lehrgebiet  
Bioverfahrenstechnik, TU Kaiserslautern, Kaiserslautern/Deutschland*

Cytochrom P450 sind Hämproteine und gehören zur Enzymklasse der Oxidoreduktasen (E.C. 1.14.x.y). Sie kommen bei Säugetieren in den Mikrosomen z. B. von der Leber und den Nieren vor und katalysieren den Stoffwechsel von Xenobiotika, biosynthetisieren Steroidhormone, oxidieren ungesättigten Fettsäuren und katalysieren stereo- und regiospezifisch den Stoffwechsel der fettlöslichen Vitamine. Der wichtigste Reaktionstyp ist die Hydroxylierung nicht-aktivierter C-H-Bindungen. Ein bedeutender Vorteil der Cytochrom P450 Monooxygenase ist, dass das Protein den Gelöstsauerstoff direkt für die Oxidation seines Substrates nutzen kann.

Ein aus dem Bakterium *Bacillus megaterium* stammendes Cytochrom P450<sub>bmp</sub> wurde in *Escherichia coli* Dh5 $\alpha$ -Zellen kloniert und wird intrazellulär exprimiert. Die Aufreinigung der Cytochrom P450<sub>bmp</sub> Monooxygenase erfolgt über einen fusionierten His-Tag unter Einsatz von Nickel-Chelat-Chromatographie sowie Iminodiessigsäure-aktivierte Magnetpartikel. Durch Einsatz der Magnetpartikel ist eine direkte Abtrennung des Enzyms aus dem aufgeschlossenen Fermentationsmedium möglich. Mit dem isolierten Enzym konnte die Plattformchemikalie 9,10-Dihydroxystearinsäure aus Ölsäure hergestellt werden. Aus dem Produkt können u. a. wichtige Monomerbausteine (z. B. Azelainsäure) für die Kunststoffindustrie gewonnen werden. Die enzymatische Bildung des Produkts im zweiphasigen Reaktionssystem findet als Feststoff an der Grenzfläche zwischen der Öl- und der wässrigen Phase statt. Das Produkt wurde mittels NMR, GC-MS und HPLC-MS analysiert und mit einem chemisch synthetisierten Standard der 9,10-Dihydroxystearinsäure verglichen. Zurzeit finden reaktionstechnische Untersuchungen der immobilisierten Enzyme im oben genannten Zwei-Phasen-System statt.

# ***Anwendung poröser Adsorbentien zur Produktabtrennung***

*Paul Bubenheim<sup>1</sup>, Ulrich Sohling<sup>2</sup>, Kirstin Suck<sup>2</sup>, Friedrich Ruf<sup>2</sup>, Dr. Lars Dähne<sup>3</sup>, Andreas Liese<sup>1</sup>,<sup>1</sup>Technische Universität Hamburg-Harburg,  
<sup>2</sup>Clariant Produkte Deutschland GmbH  
<sup>3</sup>Surflay Nanotec GmbH*

Es wurde ein neuartiges Verfahren zur enzymatischen Diolproduktion in dem organischen Lösungsmittel *tert*-Butylmethylether mit integrierter, kontinuierlicher und kostengünstiger Produktabtrennung realisiert. Durch Einsatz von Magnetventilen wurde die Anlage zusätzlich automatisiert.

Der Prozess kann unterteilt werden in:

1. eine kontinuierliche Produktionseinheit mit immobilisiertem Biokatalysator in Form eines Festbettes,
2. eine Adsorbereinheit zur selektiven Produktabtrennung mit vorgeschalteter Adsorbereinheit zur Entfernung von Wasser aus dem Produktstrom.

Als Biokatalysator wurde eine Alkohol-Dehydrogenase-`A` eingesetzt, welche ursprünglich aus dem Bakterium *Rhododoccus ruber* DSM 44541 stammt, durch Überexpression aber rekombinant in *E. coli* verfügbar ist und eine hohe Stabilität in unterschiedlichen Medien aufweist. Es wurden verschiedene Immobilisierungsstrategien auf oberflächenmodifizierten porösen Materialien wie Glas oder Fällungskieselsäuren (Sipernaten) untersucht. Zur Oberflächenmodifikation wurden Polyelektrolyte mittels Layer-by-Layer Verfahren aufgebracht. Untersucht wurde neben der kovalenten Anbindung durch Linkermoleküle auch die adsorptive Anbindung.

Zur Abtrennung des Reaktionsproduktes wurde die Adsorption von polaren Komponenten auf Aluminiumoxiden und Aluminiumsilikaten untersucht. Diese ist in der Literatur beschrieben [Hart *et al.* 1990], wird allerdings hauptsächlich zur Abtrennung von Wasser aus organischen Lösungsmitteln genutzt. Aus Voruntersuchungen war die selektive Anbindung polarer Komponenten auf Aluminiumoxiden aus Essigsäureethylester bekannt. Ausgehend von diesen Versuchen wurde der Einfluss der Polarität unterschiedlicher Lösungsmittels untersucht. Neben Adsorptionsisothermen zur kinetischen Charakterisierung wurden Durchbruchkurven zur thermodynamischen Charakterisierung der Adsorber gemessen. Im Prozess wurden die einzelnen Komponenten verschaltet und mithilfe der immobilisierten ADH-`A` wurde kontinuierlich das Produkt (2S,5S)-Hexandiol in einem Festbettreaktor produziert. Der von dem Enzym benötigte Cofaktor Nicotinamid-Adenindinukleotid in Wasser, wurde durch Vorspülen des Immobilisates mit Puffer-Cofaktorlösung eingebracht und ermöglichte einen stabilen Betrieb des Reaktors > 100 Verweilzeiten (> 65 Stunden) mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 44,3 g L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> in *tert*-Butylmethylether

# **Oxidation of fatty aldehydes to fatty acids by *Escherichia coli* cells expressing the *Vibrio harveyi* fatty aldehyde dehydrogenase (FALDH)**

*Markus Buchhaupt, Jan Guder, Fenja Sporleder, Melanie Paetzold, Jens Schrader, DECHEMA-Forschungsinstitut, Biochemical Engineering, Frankfurt/Main, Germany*

Fatty acids represent an important renewable feedstock for the chemical industry. To enable biotechnological one carbon truncations of fatty acids, the enzymes  $\alpha$ -dioxygenase and fatty aldehyde dehydrogenase (FALDH) have to be combined in a two-step process. We expressed an FALDH from *V. harveyi* in *E. coli* and characterized its substrate spectrum with a focus on the number and position of double bonds in the fatty aldehyde molecules. Synthesis of the expected fatty acid products was proven by analysis of whole cell biotransformation products. Coexpression of a H<sub>2</sub>O-forming NADPH oxidase (NOX) from *Lactobacillus sanfranciscensis* led to the implementation of a cofactor regeneration cycle in *in vitro* oxidation experiments. The presence of NOX in whole cell biotransformations improved reaction velocity but did not result in higher product yields. We could further demonstrate that at least part of the endogenous NAD(P)<sup>+</sup> regeneration capacity in the resting cells results from the respiratory chain. The whole cell catalyst with the high broad range FALDH activity described here is an important biotechnological module for lipid biotransformation processes, especially the shortening of fatty acids.



## **Production of terpene-based flavor compounds via bioconversion of synthesized terpene intermediates**

Steffen Hartwig<sup>1</sup>, Thore Frister<sup>1</sup>, Sascha Beutel<sup>1</sup>, Thomas Scheper<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>*Institute of Technical Chemistry, Leibniz University Hannover, Germany;*

Terpenes, a diverse group of organic compounds, constitutes the largest class of flavour and fragrance molecules in nature. Important representatives of this class, e. g. limonene, menthol, or nootkatone are used widely in various foods, beverages, exclusive perfumes and personal care products. Nowadays, terpenes are still most frequently produced by extraction and steam distillation of the relevant plant source material. Because of this often laborious, unreliable and cost demanding production route, aroma suppliers are searching for alternative ways to generate valuable terpene-based flavour and fragrance compounds.

By mimicking the bioconversion pathway of isoprenoids in plants, we present one possible alternative route based on biotechnological methods. The key isoprenoids, namely Farnesylpyrophosphate (FPP) and Geraniolpyrophosphate (GPP), are produced in large quantities by employing upscale techniques on established organic synthesis protocols. Thus, a production of isoprenoid intermediates from relatively cheap source material up to gram-scale is possible.

Isoprenoid-converting enzymes like patchoulol-synthase (PTS) are expressed by recombinant *E. coli* and purified by affinity-tag purification methods. For obtaining efficient protein production, fusion proteins have to be attached to the eukaryotic terpene-synthases from plants. Fusion proteins increase the solubility of heterologous enzymes in prokaryotic hosts.

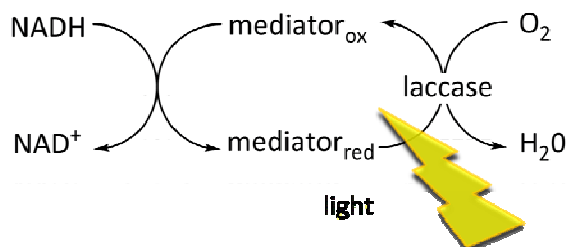
Bioconversion of FPP to (-)-patchoulol via recombinant PTS is performed in aqueous, buffered media. The terpene-alcohol is recovered by extraction with organic solvents. Our method constitutes a simple combination of organic synthesis and recombinant enzyme methods without the need of extensive pathway and metabolic engineering normally necessary for biotechnological terpene production.

## Enhanced NAD<sup>+</sup> regeneration by combining photochemistry with the laccase mediator system

*Svenja Kochius, DECHEMA Research Institute, Frankfurt; Frank Hollmann, TU Delft, Delft/Netherlands; Jens Schrader, DECHEMA Research Institute, Frankfurt; Dirk Holtmann, DECHEMA Research Institute, Frankfurt*

Cell-free biocatalysis is of increasing interest for organic syntheses. A broad range of used enzymes are nicotinamide-dependent. Since cofactors cannot be used in stoichiometric amounts, an efficient cofactor regeneration system has to be applied. Different strategies exist to regenerate cofactors, e.g. enzyme- or substrate-coupled systems. Furthermore, electrochemical cofactor regeneration has been applied several times. For this strategy an electron shuttle (mediator) is necessary.

Recently, we found that some of these mediators were also suitable for photochemical NAD<sup>+</sup> regeneration. Examined mediators were Meldola's Blue, neutral red, methylene blue, methylene green and Azure B. In further experiments we tested these mediators for the application in the laccase mediator system (LMS) for cofactor regeneration. Afterwards we combined both approaches (figure 1).



**Figure 1: NAD<sup>+</sup> regeneration by combining photochemistry with the laccase mediator system**

Although, solely ABTS and methylene green showed reactivity towards NADH in the LMS, the combination of photochemistry and the LMS had a significant influence on the cofactor regeneration. Methylene blue showed the highest oxidation rate for NADH and was chosen for the further investigations. Furthermore, the cofactor regeneration system was coupled to enzymatic reactions. The conversion of 1,4-butanediol to  $\gamma$ -butyric acid lactone with ADH was investigated. Additionally, we coupled this regeneration approach with the enzymatic oxidation of glucose by GDH achieving high conversion rates. This combination of photochemistry and the LMS allows simple and cost effective regeneration of oxidized cofactors.

# Initiale Biofilmbildung auf mikrostrukturierten Metalloberflächen in statischen und dynamischen Kultivierungssystemen

C. Schlegel<sup>1</sup>, J. Fessler<sup>1</sup>, C. Müller<sup>2</sup>, I. Reichenbach<sup>3</sup>,  
C. Ziegler<sup>2</sup>, J. Aurich<sup>3</sup>, K. Muffler<sup>1</sup>, R. Ulber<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lehrgebiet für Bioverfahrenstechnik, TU Kaiserslautern, D-67663 Kaiserslautern

<sup>2</sup>AG Grenzflächen - Nanomaterialien – Biophysik, TU Kaiserslautern, D-67663 Kaiserslautern

<sup>3</sup>Lehrstuhl für Fertigungstechnik und Betriebsorganisation, TU Kaiserslautern, D-67663 Kaiserslautern

Mikrobielles Wachstum in Form von Biofilmen wird häufig zu verhindern versucht, kann aber für die Biotechnologie auch von großem Nutzen sein. So wird eine kontinuierliche Prozessführung ermöglicht, da die Produktionsorganismen in der selbst-generierten Biofilm-Matrix zurückgehalten werden. Von Vorteil hierbei ist, dass keine nachteiligen Effekte von immobilisierenden Fremdstoffen ausgehen.

Eine entscheidende Rolle bei der Biofilmbildung spielt die dargebotene Oberfläche. Für technische Prozesse sind insbesondere metallische Materialien geeignet, da sich diese durch eine Korrosions- und Temperaturbeständigkeit auszeichnen. Abhängig von der Oberflächentopographie, ist eine Förderung des Biofilmwachstums zu erwarten. Beispielsweise werden den Zellen je nach Oberflächenstruktur vermehrt Anlagerungspunkte geboten und auch der Schutz vor Scherstress bei ausreichender Rautiefe begünstigt das mikrobielle Wachstum [1, 2].

Ziel dieses Teilprojekts des SFB 926 *Bauteiloberflächen: Morphologie auf der Mikroskala* ist die Konstruktion eines neuartigen Biofilmreaktors zur Biotransformation pharmazeutisch wichtiger Substanzen. Hier soll zunächst die Primärbesiedlung unterschiedlich mikrostrukturierter Metalloberflächen durch Modell-Mikroorganismen in statischen und dynamischen Kultivierungssystemen vorgestellt werden. Als grundlegende Analysetechnik dient dazu die konfokale Laser Scanning Mikroskopie. Das dynamische System der Durchflusszelle wird neben dem ansatzweisen Verfahren zudem zum kontinuierlichen Prozess ausgebaut. Dabei soll ebenfalls die in diesem Rahmen entwickelte Beimpfungs-Methode zum Einsatz kommen, um vergleichbare Bedingungen voraussetzen zu können.

Das Projekt wird finanziell von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt (SFB 926/1-2013).

[1] D. Howell, B. Behrends: A review of surface roughness in antifouling coatings illustrating the importance of cutoff length, *Biofouling* 22 (2006) 401-410

[2] K. A. Whitehead, J. Colligon, J. Verran: Retention of microbial cells in substratum surface features of micrometer and sub-micrometer dimensions 41 (2005) 129-138

# A novel *in-silico* approach to predict mediators for mediator driven bioelectrocatalysis with P450cin

F. W. Ströhle<sup>1</sup>, A. O. Magnusson<sup>1</sup>, S. Zengin-Çekiç<sup>1</sup>, K. M. Mangold<sup>2</sup>,  
J. Schrader<sup>1</sup>, D. Holtmann<sup>1</sup>

DECHEMA Research Institute, <sup>1</sup>Biochemical Engineering, <sup>2</sup>Electrochemistry, Theodor-Heuss-Allee 25, 60486 Frankfurt am Main, Germany, e-mail: stroehle@dechema.de

P450cin catalyzes the stereoselective hydroxylation of 1,8-cineole to (2S)-2 $\beta$ -hydroxy-1,8-cineole<sup>[1]</sup>. 1,8-Cineole is widely used in pharmaceutical preparations. The hydroxylated products of 1,8-cineole have a high potential for organic chemistry applications. Moreover, esters of 2-hydroxy-1,8-cineole have antimicrobial and antibacterial activities<sup>[2,3]</sup>. A key issue for catalytic applications of isolated P450cin is the demand for NADPH which is far too expensive to be used in equimolar concentrations during technical applications.

In our study, different mediators and prosthetic groups (e.g. phenosafranine, viologens, FAD, FMN) were tested with P450cin for the stereoselective hydroxylation of 1,8-cineole. Investigations were done in an electrochemical cell where mediators were reduced on a metal electrode, which then deliver the electrons to the heme of P450cin. Mediators which enable the electrochemically driven product formation without the need for the natural cofactor and co-proteins have been identified<sup>[4]</sup>.

For bioelectrocatalysis the selection of an efficient mediator is crucial for an efficient process. To this end we have developed a computational screening method using freely available software<sup>[5]</sup>. Potential binding sites of the mediator on the enzyme are found, based on surface complementarities, using PatchDock<sup>[6]</sup>. Subsequently, the mediator-enzyme interactions are refined using FiberDock<sup>[7]</sup>. Finally, the software HARLEM is used to calculate the electron transfer path and rates between the mediators and the enzyme. The electron transfer rates were compared with measured product formation rates resulting in a good correlation. The novel *in-silico* procedure will allow a faster identification of suitable mediators for electrochemically driven P450 catalyzed reactions. It may also lead to a massive reduction of experimental effort for the development of bioelectrochemical reaction systems in the future.

[1] Hawkes, D.B., et al., *Cytochrome P450(cin) (CYP176A), isolation, expression, and characterization*. J Biol Chem, 2002. **277**(31): p. 27725-32.

[2] Miyazawa, M. and Y. Hashimoto, *Antimicrobial and bactericidal activities of esters of 2-endo-hydroxy-1,8-cineole as new aroma chemicals*. J Agric Food Chem, 2002. **50**(12): p. 3522-6.

[3] Miyazawa, M., et al., *Oxidation of 1,8-cineole, the monoterpene cyclic ether originated from eucalyptus polybractea, by cytochrome P450 3A enzymes in rat and human liver microsomes*. Drug Metab Dispos, 2001. **29**(2): p. 200-5.

[4] Zengin-Çekiç, S., Holtmann, D., Güven, G., Mangold, K.-M., Schwaneberg, U., Schrader, J., *Mediated electron transfer with P450cin*, Electrochemistry Communications, 2010. **12**(11): p. 1547-1550.

[5] Ströhle, F.W., et al., *A computational protocol to predict suitable redox mediators for substitution of NAD(P)H in P450 monooxygenases*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2013. **88**(0): p. 47-51.

[6] Schneidman-Duhovny, D., et al., *PatchDock and SymmDock: servers for rigid and symmetric docking*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**: p. W363-7.

[7] Mashiach, E., R. Nussinov, and H.J. Wolfson, *FiberDock: Flexible induced-fit backbone refinement in molecular docking*. Proteins, 2010. **78**(6): p. 1503-19.