



Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt  
Lehrstuhl für Chemie Biogener Rohstoffe

## Selektive $\omega$ -Oxidation aliphatischer Substrate – Charakterisierung von Monooxygenasen und Etablierung einer Biotransformationsplattform

**Nina Rimmel**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

### **Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Cordt Zollfrank  
Prüfer der Dissertation 1. Prof. Dr. Volker Sieber  
2. Prof. Dr. Wilfried Schwab

Die Dissertation wurde am 17.02.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 31.05.2016 angenommen.

Für meinen Vater

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>5</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>6</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1 Bioökonomie und das Potential biobasierter Polymere</b> .....	<b>7</b>
1.1.1 Bioökonomie als Strategie der Zukunft .....	7
1.1.2 Bifunktionale Moleküle und ihr Potential für die Bioökonomie .....	8
<b>1.2 Dicarbonsäureproduktion mittels <i>Candida tropicalis</i></b> .....	<b>10</b>
1.2.1 Geeignete Biokatalysatoren zur Dicarbonsäureproduktion .....	10
1.2.2 Biotransformation mit <i>Candida tropicalis</i> .....	11
1.2.3 Molekulare Transportwege der Dicarbonsäureproduktion .....	14
1.2.4 Reaktionskaskade der Oxidation durch <i>Candida tropicalis</i> .....	14
<b>1.3 Cytochrom P450 Monooxygenasen</b> .....	<b>17</b>
1.3.1 Vorkommen und Struktur .....	17
1.3.2 Katalytischer Mechanismus der Oxofunktionalisierung.....	19
1.3.3 Cytochrom P450 Monooxygenasen als industrielle Biokatalysatoren .....	20
<b>2 Zielsetzung</b> .....	<b>21</b>
<b>3 Material</b> .....	<b>22</b>
<b>3.1 Chemikalien</b> .....	<b>22</b>
<b>3.2 Enzyme und Antikörper</b> .....	<b>22</b>
<b>3.3 Kits und Standards</b> .....	<b>23</b>
<b>3.4 Geräte</b> .....	<b>23</b>
<b>3.5 Software und Datenbanken</b> .....	<b>26</b>
<b>3.6 Bakterien- und Hefestämme</b> .....	<b>27</b>
<b>3.7 Plasmide</b> .....	<b>28</b>
<b>3.8 Oligonukleotide</b> .....	<b>32</b>
<b>3.9 Nährmedien</b> .....	<b>33</b>
<b>3.10 Puffer und Lösungen</b> .....	<b>35</b>
3.10.1 <i>S. cerevisiae</i> Transformation .....	35
3.10.2 Antibiotika und Induktionsmittel.....	36
3.10.3 Agarosegelelektrophorese .....	36
3.10.4 SDS-Page.....	36
3.10.5 Western Blot.....	37
3.10.6 Zellaufschluss und Mikrosomen-Präparation .....	38
3.10.7 Biotransformation mit <i>C. tropicalis</i> .....	38
3.10.8 Aktivitätsassay und CO- Spektrum .....	39
3.10.9 Lösungen zur Analyse der C12 Oxidationsprodukte.....	39
3.10.10 Lösungen zur Analyse der C10-16 Oxidationsprodukte.....	40
3.10.11 Lösungen zur Analyse der Biotransformationsprodukte mittels GC/FID .....	40
3.10.12 Dünnschichtchromatografie.....	40

<b>4 Methoden</b> .....	<b>41</b>
<b>4.1 Mikrobiologische Methoden</b> .....	<b>41</b>
4.1.1 Bestimmung der optischen Dichte von Zellsuspensionen .....	41
4.1.2 Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i> , <i>S. cerevisiae</i> und <i>C. tropicalis</i> Stämmen .....	41
4.1.3 Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> Zellen zur Elektrotransformation.....	42
4.1.4 Transformation von elektrokompetenten <i>E. coli</i> Zellen .....	42
4.1.5 Transformation von <i>S. cerevisiae</i> Zellen .....	42
4.1.6 Rekombinante Proteinexpression mit <i>E. coli</i> .....	43
4.1.7 Rekombinante Proteinexpression mit <i>S. cerevisiae</i> .....	44
<b>4.2 Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>45</b>
4.2.1 Isolierung und Reinigung von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i> .....	45
4.2.2 Bestimmung der DNA-Konzentration .....	45
4.2.3 Amplifikation von DNA mittels PCR.....	45
4.2.4 Agarosegelelektrophorese.....	47
4.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten .....	47
4.2.6 Restriktionsverdau von dsDNA-Molekülen mit Restriktionsendonukleasen .....	47
4.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten.....	48
<b>4.3 Proteinchemische Methoden</b> .....	<b>49</b>
4.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	49
4.3.2 Western Blot .....	49
4.3.3 Zellaufschluss .....	50
4.3.4 Mikrosomen-Präparation .....	52
<b>4.4 Methoden zur Biotransformation mittels <i>C. tropicalis</i></b> .....	<b>53</b>
4.4.1 Kultivierung im Schüttelkolben.....	53
4.4.2 Vorkultur im 2 L Bioreaktor.....	53
4.4.3 Aufbau Biotransformationen im Parallelfementersystem .....	54
4.4.4 Vorbereitung der Biotransformationen im Parallelfementersystem .....	56
4.4.5 Biotransformationsparameter .....	58
4.4.6 Regelung verschiedener Prozessparameter.....	58
4.4.7 Ablauf der Biotransformationen .....	60
4.4.8 Probenahme .....	60
4.4.9 Bestimmung der Biotrockenmasse .....	60
4.4.10 Sterilkontrollen und Bestimmung der KBEs .....	61
<b>4.5 Analytische Methoden</b> .....	<b>62</b>
4.5.1 Assay zur Untersuchung der CYP-Aktivität.....	62
4.5.2 CO-Differenzspektren zur quantitativen und qualitativen CYP- Charakterisierung ...	63
4.5.3 Quantifizierung der C <sub>12</sub> -Oxidationsprodukte mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	63
4.5.4 Quantifizierung der C <sub>10-16</sub> -Oxidationsprodukte mittels HPLC .....	65
4.5.5 Löslichkeitsversuche begleitend zur Biotransforamtion mit <i>C. tropicalis</i> .....	68
4.5.6 Analyse der Biotransformationsproben mittels an HPLC gekoppelte Lichstredetektion.....	68
4.5.7 Analyse der Biotransformationsproben mittels Gaschromatographie .....	69
4.5.8 Vorbereitung der Biotransformationsproben zur GC/FID-Analyse .....	70
4.5.9 Dünnschichtchromatografie (DC) der Biotransformationsproben.....	70
4.5.10 Überprüfung der Extraktionsmethode bei höheren DDS-Konzentrationen.....	71
<b>4.6 Formeln und Berechnungen</b> .....	<b>72</b>
4.6.1 Berechnung von $\mu_{\max}$ .....	72
4.6.2 Berechnung der volumetrischen Produktivität $Q$ .....	72
4.6.3 Berechnung der DDS-Menge anhand der Basenzugabe.....	72
4.6.4 Statistische Betrachtung der durchgeführten Experimente.....	73

<b>5 Ergebnisse .....</b>	<b>74</b>
<b>5.1 Ganzzellbiotransformation mittels <i>Candida tropicalis</i> .....</b>	<b>74</b>
5.1.1 Ausgangssituation.....	74
5.1.2 Untersuchungen der Wachstumsphase .....	74
5.1.3 Erste Biotransformationen .....	78
5.1.4 Anpassung der Biotransformationsanalytik.....	81
5.1.5 Steigerung der Homogenität während der Biotransformation .....	84
5.1.6 Temperatureinfluss auf die Biotransformationsphase .....	85
5.1.7 Untersuchung der Substratfeedstrategie .....	87
5.1.8 Verifizierung der maximalen Feedrate .....	90
5.1.9 Erneute Betrachtung der Bilanzierung.....	93
<b>5.2 Identifizierung geeigneter Cytochrom P450 Monooxygenasen .....</b>	<b>95</b>
5.2.1 Auswahl geeigneter Cytochrom P450 Varianten.....	95
5.2.2 Expression der ausgewählten CYPs in <i>E. coli</i> .....	102
5.2.3 Nähere Untersuchungen der in <i>E. coli</i> exprimierten Varianten.....	103
5.2.4 Expression der ausgewählten CYPs im Hefesystem .....	105
5.2.5 Erweiterung des CYP-Spektrums .....	105
5.2.6 Expression der neuen CYP-Varianten .....	107
5.2.7 Adaptierte analytische Methode .....	109
5.2.8 Aktivitätsassays mit erweitertem Substratspektrum .....	111
5.2.9 Umsetzung von Fettsäuregemischen .....	116
5.2.10 Untersuchungen hinsichtlich Überoxidation .....	117
<b>6 Diskussion.....</b>	<b>119</b>
<b>6.1 Ganzzellbiotransformation mittels <i>Candida tropicalis</i> .....</b>	<b>119</b>
6.1.1 Downscaling kommerzieller biotechnologischer Prozesse.....	119
6.1.2 Optimierung der Wachstumsphase .....	119
6.1.3 Etablierung der Biotransformation .....	121
6.1.4 Temperaturlevel.....	121
6.1.5 Untersuchung der Substratfeedstrategie .....	122
<b>6.2 Identifizierung geeigneter Cytochrom P450 Monooxygenasen .....</b>	<b>126</b>
6.2.1 Auswahl geeigneter Monooxygenasen .....	126
6.2.2 Expression und Detektion der ausgewählten Monooxygenasen.....	127
6.2.3 Analytische Methoden zur Charakterisierung der ausgewählten CYPs .....	129
6.2.4 Charakterisierung der ausgewählten CYPs .....	130
<b>6.3 Ausblick .....</b>	<b>134</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>135</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>143</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>144</b>
<b>Aminosäuresequenzen der ausgewählten CYPs.....</b>	<b>144</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>150</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>152</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>156</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>158</b>

## Zusammenfassung

Die selektive biotechnologische Funktionalisierung aliphatischer Kohlenwasserstoffe stellt ein aktuelles Forschungsfeld für industrielle Anwendungen dar. Immer häufiger kommen dabei nachhaltige, spezifische, ganzzellkatalysierte Biotransformationen zum Einsatz. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Konversionsprozess von Laurinsäuremethylester (LSME) zur Dodecandisäure (DDS) mittels *Candida tropicalis* Zellen in einem reproduzierbaren Labormaßstab etabliert und optimiert. DDS ist ein Bestandteil des Kunststoffes Polyamid-6,12 und kann mittels Biotransformation auf Basis erneuerbarer Substrate wie Palmkernöl oder Kokosöl hergestellt werden. Zusätzlich wurden neue Cytochrom P450 (CYP) Varianten identifiziert, die die Schlüsselenzyme innerhalb des Oxidationsprozesses zur Dicarbonsäure darstellen, um zukünftig in den Ganzzellbiokatalysator integriert zu werden. Hauptaugenmerk bei der Enzymidentifikation lag auf der einstufigen Oxidation zum korrespondierenden Alkohol oder Aldehyd, nicht aber zur Säure. Hydroxyfettsäuren können als Bestandteil von Polyestern genutzt werden oder weiter zur Polyamidvorstufe  $\omega$ -Aminododecansäure umgesetzt werden. Damit kann das mögliche Produktspektrum der vorhandenen Biotransformation erweitert werden.

Zur näheren Charakterisierung des Herstellungsprozesses der Dicarbonsäure wurde eine reproduzierbare, kleinskalige Fermentationsplattform etabliert. Mittels angepasster Fermentationsparameter (z. B. Schaumvermeidung) konnten unerwünschte Phänomene wie Zell-Flotation unterbunden, und reproduzierbare Wachstumsphasen erzielt werden. Aufgrund einer angepassten pH-Shift Strategie konnte die sonst auftretende Präzipitation der Dicarbonsäure in der Biotransformationsphase verhindert, und eine homogene Verteilung der Substrate und Produkte im Reaktor erreicht werden. Basierend auf dieser Gleichverteilung wurden verschiedene Analysemethoden getestet und optimiert, um eine robuste, qualitative und quantitative Substrat- und Produktbestimmung zu gewährleisten.

Mittels der optimierten Prozessvariante wurden einzelne Parameter wie Temperatur und Substratfeed-Strategie evaluiert. Eine höhere Prozesstemperatur von 35 °C zeigte einen negativen Einfluss auf die Produktbildung im Vergleich zu 30 °C. Aufgrund der identifizierten inhibierenden Wirkung von LSME auf die *C. tropicalis* Zellen wurde die maximale LSME-Feedrate identifiziert, bei der noch eine vollständige Substratumsetzung ohne Akkumulation von LSME und dessen Intermediat Laurinsäure (LS) auftritt. Die hierfür notwendige Menge an Zelltrockenmasse zur Umsetzung von einem Gramm LSMEs zur korrespondierenden Dicarbonsäure DDS betrug dabei 0,58 g. Unterhalb dieser Grenzen konnte kein vollständiger Umsatz des Substrates mehr erreicht werden. Als maximaler Produkttiter an DDS wurden 66 g/L erreicht, was einer volumetrischen Produktivität nach 188 h Prozessdauer von 0,35 g/Lh und einer gebildeten Menge DDS pro Gramm BTM von 2,51 g/g entspricht.

Parallel zur Ganzzellbiotransformation wurden sieben neue, aktive CYP-Varianten unterschiedlichen Ursprungs identifiziert, und bezüglich ihres Substratspektrums charakterisiert. Die Expression in *Escherichia coli* lieferte keine aktiven Enzymvarianten, weswegen eine Expression in unterschiedlichen *S. cerevisiae* Expressionssystemen getestet wurde. Mittels eines entwickelten Aktivitätsassays, und anschließender LC/MS Analytik wurden das Substratspektrum sowie eine potentielle Neigung zur Überoxidation der Varianten evaluiert. Alle sieben aktiven Varianten waren in der Lage Laurinsäure umzusetzen, welche aber nur von einer Variante das bevorzugte Substrat darstellte. Keine der getesteten Varianten zeigte Anzeichen einer unerwünschten Überoxidation.

## Abstract

Highly selective biotransformation of renewable substrates represents an interesting and future oriented field for the chemical industry. Whole cell biocatalysis is more and more frequently applied to produce energy and materials by use of cost effective conversion processes. This study outlines a successful downscale approach of an industrial production of polyamide precursors. A reproducible, lab-scale biotransformation platform was established based on the renewable substrate dodecanoic acid methyl ester (DAME). By means of this system, the industrial process of dodecanoic diacid (DDA) formation by *Candida tropicalis* cells blocked in  $\beta$ -oxidation was further explored and optimized. To overcome bottlenecks of the highly selective  $\omega$ -oxidation reaction in future, new Cytochrome P450 (CYP) hydroxylases were identified and characterized. The maximum oxidation level should be the corresponding aldehyde which enables the formation of products like  $\omega$ -amines via transamination or the formation of the dicarboxylic acid catalyzed by other enzyme classes. In future, versatile, high performance strains could be designed due to integration of new and powerful monooxygenases into the *C. tropicalis* whole cell catalyst. In combination with the established parallel biotransformation test system, strain and process optimization could be simplified and sped up.

Adjusting the process parameters of an industrial fermentation is often necessary to improve product yield and energy input. To obtain a realistic downscaled biotransformation system for DDA production, the first step was the optimization of the growth phase to produce a high amount of biomass. To ensure high reproducibility and comparability of parallel experiments, a foam avoiding strategy was used to prevent negative effects like cell flotation and high fluctuations in biomass measurements. Using an adapted pH shift strategy, a highly homogenous distribution of biotransformation substrate and product were achieved and no precipitation of product or biomass was observed. To evaluate the process qualitatively and quantitatively, robust and reliable analytical methods were developed. Due to the small scale model, process parameters such as different temperatures and substrate feeding strategies were studied. A slightly higher process temperature of 35 °C lead to lower product formation than at 30 °C. During different experiments an inhibitory effect of DAME to the *C. tropicalis* cells was observed, wherefore a maximum DAME feed rate was identified. To keep the negative effects of the substrate as low as possible, accumulation of the methyl ester and the demethylated substrate lauric acid (LA) was prevented. To ensure complete substrate conversion, 0.58 g of cell dry mass was needed to form 1 g of the corresponding dicarboxylic acid. The maximum product titer was 66 g/L which corresponds to a volumetric productivity of 0.35 g/l h (after 188 h) and a DDA formation of 2.51 g/g cell dry mass.

Simultaneously to the development of the whole cell downscale model, seven new Cytochrome P450 enzymes of different origins were heterologously produced and characterized concerning their substrate spectrum. No gene expression was observed by use of *E. coli* as host, but by use of the eukaryotic *S. cerevisiae* expression system, active CYPs were received. By applying an activity assay in combination with a highly sensitive LC/MS analytical method, the enzyme's substrate specificity and potential overoxidation were characterized. All seven new variants accepted LA and different additional fatty acids as substrate, but only one variant preferred LA. No overoxidation of the various fatty acids was observed for all CYP450 variants tested.

# 1 Einleitung

## 1.1 Bioökonomie und das Potential biobasierter Polymere

### 1.1.1 Bioökonomie als Strategie der Zukunft

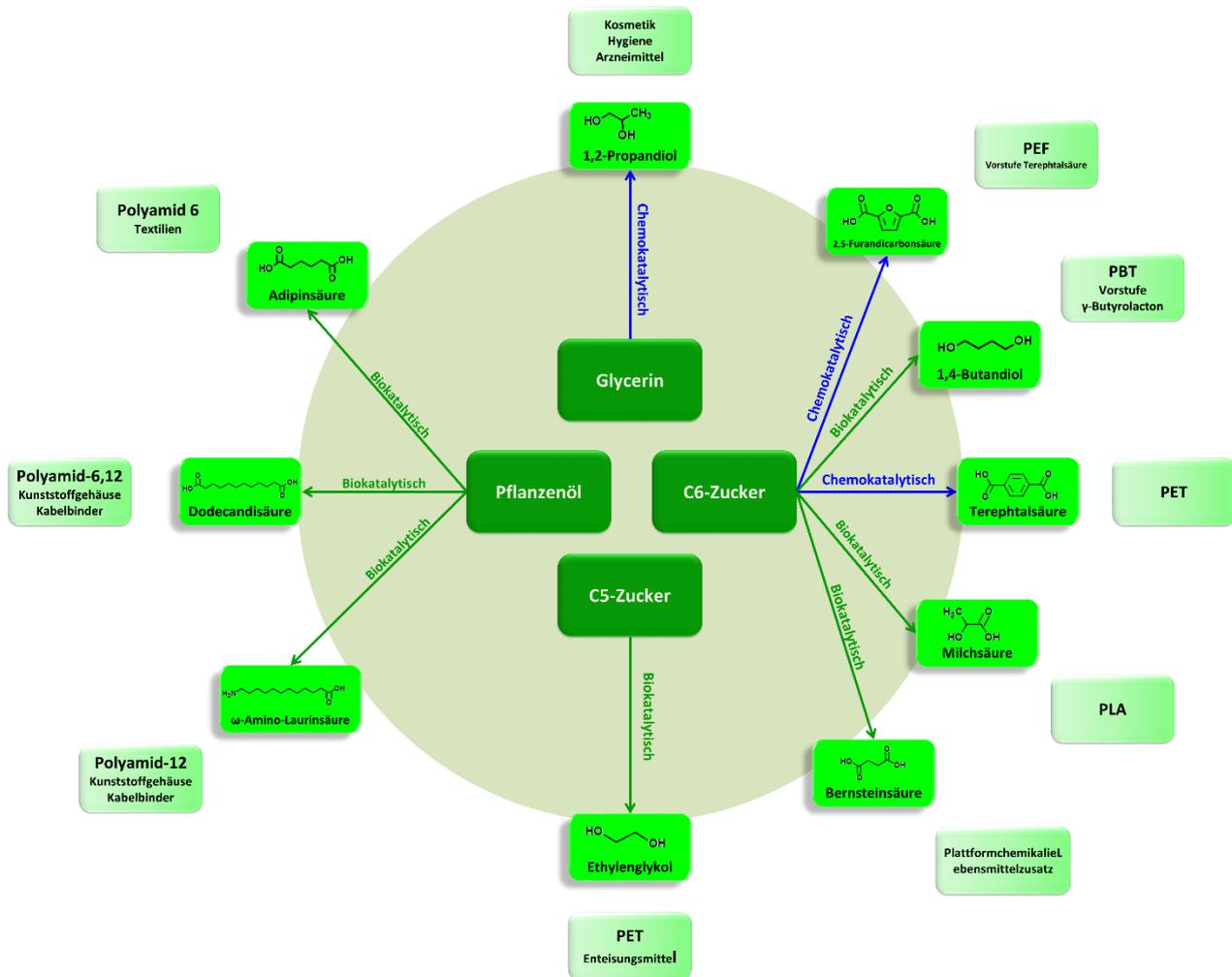
„Wären Sie bereit für ein nachhaltiges Produkt einen höheren Preis zu bezahlen als für ein herkömmliches?“ Diese Frage wurde in dieser oder ähnlicher Form bereits in mehreren Untersuchungen gestellt. Dabei zeigte sich oftmals die Bereitschaft der Befragten, mehr Geld in regenerative oder umweltfreundliche Produkte investieren zu wollen [1, 2]. Aus dieser Kundenperspektive ergibt sich die Frage, ob es für die Anbieterseite sinnvoll erscheint auf dieses Bedürfnis einzugehen. Dafür sprechen Fakten, die die Basis für den Wunsch nach mehr Nachhaltigkeit darstellen und die Unternehmen zum Teil selbst umtreiben. Ein anhaltendes Bevölkerungswachstum, besorgniserregende Prognosen über einen bevorstehenden Klimawandel und der Wunsch nach einem verantwortungsvollen Umgang mit heute vorhandenen Ressourcen als Basis für zukünftige Generationen. Dies sind mögliche Gründe für eine wachsende Nachfrage nach biobasierten und nachhaltigen Produkten vieler Menschen. Der Wunsch nach Rohstoffautarkie und damit einem möglichst hohen Maß an Unabhängigkeit von möglicherweise unberechenbaren Rohstofflieferanten treibt zusätzlich Politik und Wirtschaft in der heutigen Zeit an, nach einer vielseitigen, nachhaltigen und oftmals auch regionalen Rohstoffzufuhr zu streben. Dies schließt sowohl den Energie- und Transportsektor als auch den Rohstoff- und Konsumgütersektor mit ein. Beide haben genannte Probleme, Bedürfnisse und das damit verbundene Potential, neue nachhaltige Wege zu gehen, erkannt und streben nach verschiedenen Lösungsansätzen.

Ein zentrales Stichwort in diesem Zusammenhang ist die Bioökonomie. Im Monatsbericht 04/2014 des Bundesministeriums für Wirtschaft und Energie findet sich dazu die Definition der deutschen Bundesregierung aus der Politstrategie Bioökonomie: „Wissensbasierte Erzeugung und Nutzung nachwachsender Ressourcen, um Produkte, Verfahren und Dienstleistungen in allen wirtschaftlichen Sektoren im Rahmen eines zukunftsfähigen Wirtschaftssystems bereitzustellen. Das Konzept der Bioökonomie umfasst danach alle Wirtschaftssektoren und ihre zugehörigen Dienstleistungsbereiche, die nachwachsende Ressourcen – wie Pflanzen, Tiere und Mikroorganismen und deren Produkte – erzeugen, be- und verarbeiten, nutzen oder damit handeln“ [3]. Weiter heißt es dort: „Bioökonomie beschreibt vor allem ein Ziel: Es gilt, einen Strukturwandel zu dauerhaft nachhaltigem Wirtschaften auf Basis nachwachsender Rohstoffe und von Abfallstoffen zu erreichen und Alternativen zum erdölbasierten Wirtschaften zur Verfügung zu stellen. Bioökonomiepolitik ist nachhaltige Industrie- und Wirtschaftspolitik – und fügt sich so sehr gut in die Nachhaltigkeitsstrategie der Bundesregierung ein“ [3]. Neben der sehr positiven Haltung der Politik zeigt auch die Industrie Interesse an dem Feld der Bioökonomie. Neben der Erzeugung biobasierter Kraftstoffe, wird zunehmend die Produktion von biobasierten Basischemikalien oder auch Kunststoffmonomeren interessant. Um das Stadium der Kommerzialisierung solcher biobasierter Produkte erreichen zu können, müssen diese dennoch mit der Kostenstruktur petrochemisch basierter Produkte konkurrieren können. Dabei hat die petrochemisch basierte Produktion vieler Chemikalien und Energieträger lange Tradition und kann auf eine jahrzehntelange Optimierungsgeschichte zurückblicken. Trotz dieser enormen Herausforderungen entscheiden sich immer mehr Unternehmen, in eine nachhaltige Zukunft zu investieren und die Entwicklung biobasierter Produkte voranzutreiben.

Beispielsweise zeigt sich dieses Bestreben bei einigen Unternehmen eines bisher fast ausschließlich petrochemisch basierten Industriezweiges, der Polymerindustrie. Die weltweite Kunststoffproduktion betrug im Jahr 2013 ca. 299 Millionen Tonnen [4, 5]. Mehr als 99% dieser Polymere wurden auf der Basis fossiler Rohstoffe hergestellt [6]. Diese großen Produktionsmengen und das nicht zu unterschätzende weltweite Gesamtmarktvolumen von 454 Milliarden US-Dollar (Stand 2011) machen die teilweise Substitution petrochemisch basierter Polymere zu attraktiven und zukunftsorientierten Produkten für die chemische Industrie [7]. Um den Nachhaltigkeitsgedanken bestmöglich umsetzen zu können, wird zum einen versucht erneuerbare Rohstoffquellen zu erschließen, zum anderen soll der Herstellungsprozess an sich ebenfalls möglichst „grün“ ablaufen, dabei aber wirtschaftlich attraktiv bleiben. Um dies erreichen zu können, müssen die Produktionsprozesse möglichst effizient sein. Dies schließt eine möglichst hohe Produktausbeute, geringe Abfallströme, einen niedrigen Energieverbrauch und die Minimierung schädlicher Emissionen ein. Nachwachsende Rohstoffe werden chemokatalytisch umgesetzt, petrobasierte Ausgangsstoffe werden biotechnologisch modifiziert oder nachwachsende Rohstoffe werden biokatalytisch umgesetzt, auf der Suche nach neuen Wegen zu so genannten Drop-In-Produkten oder der Entwicklung völlig neuer Anwendungsfelder [8, 9]. Biokatalysierte Systeme bieten oftmals Vorteile im Vergleich zu chemischen Verfahren. So können diese oft bei milden Reaktionsbedingungen wie neutralem pH-Wert, moderaten Temperaturen und Normaldruck ablaufen. Weiterhin sind biokatalytische Reaktionen oftmals chemischen Synthesen in ihrer Chemo-, Stereo-, und Regioselektivität weit überlegen [10]. Der grüne (biologische, biotechnologische) Weg birgt allerdings auch Nachteile, wie ein oftmals hoher Wasserbedarf, sodass auch diese Prozesse einem unbedingten Optimierungsbedarf unterliegen. Diese Optimierung muss an vielen Drehschrauben ansetzen, zum Beispiel am Biokatalysator selbst, dem Design des Upstream Prozesses, der Distribution geeigneter Substrate, am Downstream Prozess und weiteren Komponenten dieser komplexen Systeme.

### 1.1.2 Bifunktionale Moleküle und ihr Potential für die Bioökonomie

Im Rahmen bioökonomischer Ansätze stellen bifunktionale Monomere wie  $\alpha,\omega$ -Dicarbonsäuren,  $\omega$ -Hydroxysäuren, Diole oder  $\omega$ -Aminocarbonsäuren interessante und vielseitige Moleküle dar. Sie sind wichtige Grundbausteine verschiedener Polymere, wie Polyamide und Polyester sowie Bestandteile verschiedener Geruchsstoffe, Antibiotika und Klebstoffe [11-13]. Weiterhin können sie beispielsweise als Kraftstoffe, Lösungsmittel oder Plattformchemikalien eingesetzt werden. Eine Auswahl verschiedener bifunktionaler Moleküle, deren nachwachsende Rohstoffquelle und mögliche Anwendungsfelder sind in **Abb. 1.1** dargestellt. Diese Komponenten werden heute bereits von verschiedenen international operierenden Unternehmen, wie beispielsweise BASF, Evonik Industries und Cargill auf biokatalytischen oder chemokatalytischen Wegen produziert. Firmen wie Coca Cola, Heinz, Ford und Procter & Gamble, die für ihre Produktion immer mehr auf biobasierte Polymere setzen, schaffen Märkte für „Grüne Basischemikalien“ und tragen dadurch zur positiven Entwicklung der weltweiten Bioökonomie bei [8, 14].



**Abb. 1.1: Übersicht über einige bifunktionale Moleküle basierend auf nachwachsenden Rohstoffen**  
Mittels chemischer Katalyse oder Biokatalyse können aus Pflanzenölen und zuckerhaltigen Substraten bifunktionale Basischemikalien gewonnen werden, die anschließend z. B. als Ausgangsstoff verschiedener Polymere dienen

Auch wenn sich viele „grüne“ Prozesse bisher noch in frühen Entwicklungsstadien befinden, sind doch einige bereits fortgeschritten. Coca Cola’s „Plant bottle“ enthält bis heute bereits einen Anteil von bis zu 30% pflanzenbasierten Kunststoffmonomeren. Durch die chemische Konversion zuckerbasierten Ethanols kann Monoethylenglykol erzeugt werden, ein Monomer des Kunststoffes Polyethylenterephthalat (PET). Dieser Kunststoff stellt das Basismaterial für eine große Menge jährlich produzierter Getränkeflaschen dar. Gleichzeitig wird auch an der biobasierten Substitution der zweiten, bisher ausschließlich petrobasierten Komponente des PET Kunststoffes Terephthalsäure intensiv gearbeitet. Auf der Weltausstellung Expo Milano 2015 in Mailand stellte Coca Cola gemeinsam mit der Firma Virent die erste PET-basierte „100% Plant bottle“ vor [15]. Daher ist es wahrscheinlich nur eine Frage der Zeit, wann die erste 100%ige „Plant bottle“ auch am Markt verfügbar sein wird.

Einige der genannten bifunktionalen, biotechnologisch hergestellten Verbindungen sind in ihrer Entwicklung zum kommerziellen Produkt ebenfalls auf einem sehr guten Weg [16, 17]. Das Polyamid 12 Monomer 12-Aminododecansäure kann beispielsweise durch eine Ganzzellbiotransformation mit *E. coli*

Bakterien hergestellt werden. Dabei wird Laurinsäuremethylester (LSME) als Substrat verwendet, welcher zuvor durch eine Umesterungsreaktion aus Pflanzenölen wie Palmkernöl oder Kokosöl gewonnen werden kann. Durch vorhergehendes Metabolic Engineering sind die Zellen in der Lage, das Substrat zunächst äußerst selektiv zu oxidieren und im Anschluss zu aminieren [18]. Dieser Prozess wird durch die Firma Evonik Industries bereits im Pilotmaßstab erfolgreich betrieben und es sollen weitere Up-scaling-Schritte folgen [19-21]. Ein weiteres Beispiel stellt die Ganzzellbiokatalyse bei der Herstellung von Dicarbonsäuren dar. Bei diesem Prozess werden verschiedene Substrate wie Alkane, Fettsäuren oder deren Methylester durch Mikroorganismen selektiv an der  $\omega$ -Position oxidiert und zu Dicarbonsäuren umgesetzt. Dieser Prozess konnte bereits in größerem Maßstab realisiert werden, bedarf aber weiterhin einer fundierten Optimierung bzw. bietet das Potential zur Entwicklung weiterer Produkte.

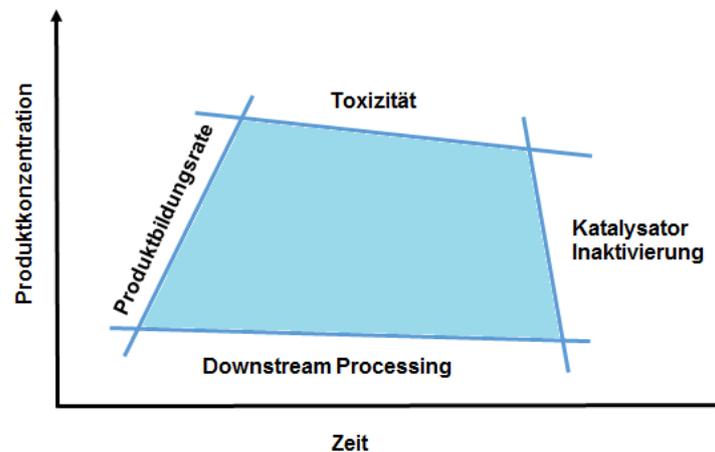
## 1.2 Dicarbonsäureproduktion mittels *Candida tropicalis*

### 1.2.1 Geeignete Biokatalysatoren zur Dicarbonsäureproduktion

Die Effizienz eines biotechnologischen Prozesses hängt maßgeblich von den zellulären Eigenschaften des Produktionsstammes sowie dessen Enzymausstattung ab. Oft werden Organismen ausgewählt, welche bereits natürlicherweise zur Herstellung des Produktes in der Lage sind. Im Falle der Dicarbonsäuren sind dies verschiedene Mikroorganismen. Zum Beispiel besitzen die Hefen *Candida tropicalis* [22, 23], *Candida cloacae* [24] und Corynebakterien [25] die enzymatische Ausstattung um die Oxidation von Substraten unterschiedlicher Kettenlängen zu katalysieren. Wichtig ist zudem, ob sich der Organismus weitestgehend für den angestrebten Prozess eignet. Wie hoch liegen tolerierbare Produkt- oder Substratkonzentrationen? Ist der Organismus anspruchsvoll im Hinblick auf Kultivierungsbedingungen? Besitzt er akzeptable Generationszeiten? Treten unerwünschte Nebenreaktionen auf und müssen beim Umgang besondere Sicherheitsmaßnahmen berücksichtigt werden? Für die Produktion von Dicarbonsäuren erfüllt *Candida tropicalis* viele Anforderungen und eignet sich daher sehr gut als Biokatalysator. Allerdings werden potentielle Substrate von den Organismen als alternative Kohlenstoffquelle verwendet und durch die  $\beta$ -Oxidation über katabole Reaktionen metabolisiert. Dieser Schritt führt zu Nebenprodukten und zu geringen Produkttitern. Um die verwendeten Stämme effizienter zu gestalten, können diese mittels Metabolic Engineering gezielt optimiert werden. Im Falle von *Candida tropicalis* konnte die  $\beta$ -Oxidation unterdrückt werden, wodurch die Produktausbeuten signifikant gesteigert werden konnten [22]. Eine weitere Möglichkeit, neben dem gezielten Ausschalten bestimmter Stoffwechselforgänge der Zelle, ist das Einbringen neuer, leistungsstarker Enzyme oder die Manipulation der Expressionsregulation ausgewählter Enzyme. Auch diese Maßnahmen können die Performance eines Ganzzellbiokatalysators enorm verbessern [22, 23, 26, 27]. Trotz großer Fortschritte in der Biokatalysatorentwicklung, besteht weiterhin Raum für Optimierung oder auch eine Alternierung der Stoffwechselwege, um weitere Produkte mit diesem vielversprechenden Mikroorganismus produzieren zu können, oder ein breiteres Substratspektrum zugänglich zu machen. Diese Schritte machen einen solchen biokatalysierten Prozess flexibler gegenüber Substratangebot und Produktnachfrage und erhöhen die Konkurrenzfähigkeit gegenüber möglichen alternativen Prozessrouten.

### 1.2.2 Biotransformation mit *Candida tropicalis*

Im Zusammenspiel mit der Optimierung des Biokatalysators sollte die Prozessführung angepasst werden. Auch dabei ergeben sich bestimmte Anforderungen wie hohe Produktausbeuten, kurze Laufzeiten, möglichst geringe Kosten, größtmögliche Umweltverträglichkeit und eine möglichst simple Produktaufarbeitung. Diese Anforderungen beeinflussen die Rahmenbedingungen der angestrebten Biotransformation. **Abb.1.2** zeigt beispielhaft das Zusammenwirken verschiedener wichtiger Einflussfaktoren einer Ganzzellbiotransformation, darunter die Umsatzrate, die Stabilität des Biokatalysators, die Toxizität des Produktes und die Komplexität des Downstream Prozesses. Ziel ist es, den Punkt im „Prozessfenster“ zu finden, an dem besonders die wichtigsten Anforderungen optimal erfüllt werden. An diesem Punkt sind optimaler Weise die Kosten, der Energieverbrauch und anfallende Abfallströme möglichst gering, Qualität und Ausbeute des Produktes gleichzeitig möglichst hoch. Dadurch ergibt sich im besten Fall ein profitabler, konkurrenzfähiger und nachhaltiger Prozess.



**Abb. 1.2: Prozessfenster einer Ganzzellbiotransformation** Schematische Darstellung verschiedener Faktoren, welche die Prozessgrenzen eines Biotransformationsprozesses bilden. Ziel ist es, den optimalen Bereich des Fensters zu finden um den Prozess möglichst effizient zu gestalten, Abbildung nach [28]

Prozessparameter, welche die Grenzen eines solchen Fensters beeinflussen können sind zum Beispiel die Temperatur, der pH-Wert, die Gelöstsauerstoffkonzentration, die Medienkomposition, die Wahl der Kohlenstoffquelle, die Durchmischung innerhalb des Reaktors und viele weitere mehr. Die Produktion von Dicarbonsäuren durch *C. tropicalis* ist ein zweistufiger Prozess, der in eine Wachstumsphase und eine Biotransformationsphase gegliedert werden kann. Zunächst werden die Zellen bei möglichst optimalen Wachstumsbedingungen herangezogen, anschließend wird das Substrat für die Biotransformation zugesetzt. Neben der Wahl des Stammes wurde in verschiedenen Studien bereits der Einfluss einiger Parameter auf diese spezielle Biotransformation untersucht.

Die Zusammensetzung des Mediums bildet die Grundlage des Zellwachstums. Je nach Komposition kann das Medium einen großen Kostenfaktor darstellen und eventuell Auswirkungen auf die spätere Produktabtrennung haben [26, 29]. Bei der Biotransformation mit *C. tropicalis* wurden bisher definierte und semidefinierte Medien verwendet, wobei unterschiedliche Kohlenstoffquellen wie Saccharose, Glucose und Glycerin getestet wurden [30-32]. In den meisten Fällen wurde Glucose verwendet, wobei diese ausschließlich als Cosubstrat zur Aufrechterhaltung des Metabolismus dient. Die untersuchten

Substrate für die Biotransformation reichen von Alkanen, freien Fettsäuren verschiedener Kettenlängen und deren Methylester, bis hin zu Gemischen wie Pflanzenölen [23, 33]. Die Substrate sind alle sehr hydrophob und nur in geringen Konzentrationen in Wasser löslich. Daher spielt die Emulgierbarkeit und damit die gleichmäßige Verteilung des Substrates für einen optimalen Massentransfer eine große Rolle. Die genauen Mechanismen des Substrattransports in, und die Ausschleusung des Produktes aus der Zelle, sind bisher kaum bekannt, könnten aber eine mögliche Limitierung für eine maximale Produktivität sein und bieten Raum für Verbesserungen [34]. Eine basische Umgebung scheint den Übergang der Disäure in das umgebende Medium aufgrund der erhöhten Löslichkeit im wässrigen System zu begünstigen, wodurch dem pH-Wert während der Biotransformationsphase große Bedeutung zukommt. Im neutralen bis basischen pH-Bereich erhöht sich die Löslichkeit des gebildeten Produktes deutlich (5,8 g/L Wasser bei pH 5 und 25 °C auf 1.000 g/L bei pH 8 und 25 °C). Dies könnte eine Erklärung für einen erleichterten Produkttransport und den positiven Effekt auf die Produktbildung darstellen. Allerdings führt ein erhöhter pH-Wert zu einer Limitierung der Zellvitalität und des Zellwachstums. Liu et al. entwickelten daher eine stufenweise Änderung des pH Wertes von 5,5 während des Wachstums, auf einen pH Wert von 8 während der späten Biotransformation [32]. Neben dem pH-Wert des Mediums scheint auch das Säure-Base Milieu innerhalb der Zelle wichtig zu sein und Einfluss auf die Aktivität einiger beteiligter Enzyme zu haben [35]. Um möglichst geringe Mengen basischer Chemikalien zuführen zu müssen, wären weiterführende Informationen über den Einfluss des pH-Shifts auf den gesamten Prozess, inklusive des Downstream Prozesses, sehr hilfreich. **Tab. 1.2-1** zeigt eine Übersicht über einige bisher durchgeführte Prozessuntersuchungen bezüglich der Dicarbonsäureproduktion mittels *Candida tropicalis*. Obwohl bereits einige Untersuchungen und Optimierungen am Prozess vorgenommen wurden, besteht weiterhin Informationsbedarf bezüglich verschiedener Parameter. Detailliertere Informationen über die Biokatalyse, mögliche inhibitorische Effekte, oder Engstellen im Stoffwechsel können durch eine ausgefeilte Produktanalytik und Einblicke in Bereiche wie das Transskriptom, Proteom oder Metabolom während unterschiedlicher Prozessabschnitte gewonnen werden. Damit kann die Entwicklung effizienter, nachhaltiger und wirtschaftlicher Prozesse gefördert werden.

**Tab. 1.2-1: Übersicht einiger untersuchter Prozessparameter der Biotransformation mit *C. tropicalis***

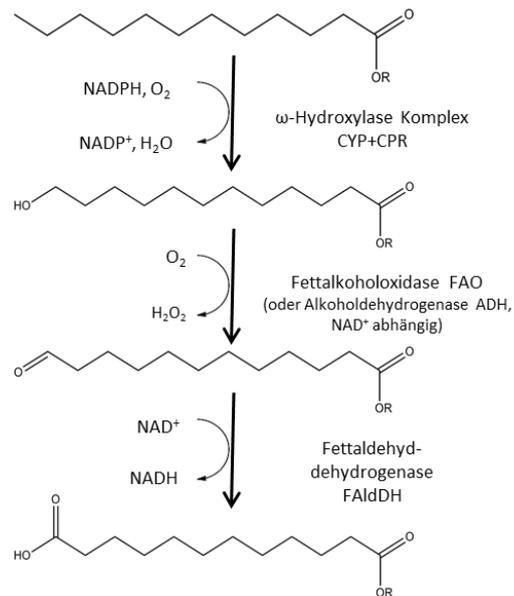
<b><i>C. tropicalis</i> Stamm</b>	<b>C-Quelle</b>	<b>Substrat</b>	<b>pH-Wert</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Besonderheiten</b>	<b>Referenz</b>
<b>S76</b>	Substrate der Biotransformation	Alkane (C <sub>12+13</sub> ), Fettalkohole (C <sub>12+13</sub> ) Fettsäuren (C <sub>12+13</sub> ) Diole (C <sub>12+13</sub> )	k. A.	30 °C	Immobilisierung mit Carrageen	[36]
<b>S76</b>	Glycerin	Alkane (C <sub>11-16</sub> )	Wachstum pH 6,5; Biotransformation kontinuierlich auf pH 8	32 °C		[33]
<b>M25</b>	Glycerin	Palmitinsäure zur Induktion, Substrat Linolensäure	Wachstum pH 6,5; Biotransformation kontinuierlich auf pH 8	k. A.		[31]
<b>M25</b>	Glycerin	Sonnenblumenöl, Rapsöl, Rizinolsäure	Wachstum pH 6,5; Biotransformation kontinuierlich auf pH 8	k. A.		[17]
<b>DP428</b>	Erst Glucose, später Glycerin	Fettsäuren, Fettsäuremethylester	Wachstum und Biotransformation pH 6	30°C	Angestrebtes Produkt ω-Hydroxysäuren	[37, 38]
<b>CT1-12</b>	Saccharose zu Beginn	Tridecan	Wachstum 6,5 Biotransformation 8	30 °C	Zugabe geringer Mengen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[39]
<b>CGMCC356</b>	Saccharose	Tridecan	Wachstum 5,5 -6,5 ; Biotransformation 7,5-8	30 °C	Betrachtung des pH Wertes im Zellinneren	[35]
<b>CGMCC356</b>	Saccharose	Alkane (C <sub>12-14</sub> )	Wachstum 6; danach Ermittlung stufenweiser pH Strategie	30 °C		[32]
<b>CZ-15</b>	Glucose	Tridecan	Wachstum unreguliert 4-5; danach 8	30 °C		[40]
<b>M20</b>	Glucose nur zu Beginn	Fettsäuren aus Reiskleie und Kokosnussöl	Wachstum 6,5 danach 7,5	32 °C		[16]
<b>20962</b>	Glucose	Ölsäure, Erucasäure, 9,10 Epoxystearinsäure	Wachstum 6,3; danach 7,6	30 °C		[23]

### 1.2.3 Molekulare Transportwege der Dicarbonsäureproduktion

Die  $\omega$ -Oxidation von Alkanen oder Fettsäuren erfolgt bei Hefen in den Mikrosomen oder genauer Peroxisomen. Dabei handelt es sich um kleine Vesikel innerhalb der Zelle, die durch eine Phospholipid-Doppelschicht vom Cytosol abgrenzt sind. Für die erfolgreiche Oxidation, muss das Substrat zunächst in die Zelle und in die Mikrosomen gelangen. Bei Hefen wird ein passiver Transport via Diffusion durch die Phospholipidmembran angenommen, bei einigen zeigen sich durch die Inkubation mit hydrophoben Substanzen Modifizierungen an der Zelloberfläche, welche den Transport des Substrates beeinflussen könnten [41, 42]. Nachdem sich das Substrat innerhalb der Zelle befindet, kommt es zu Transportvorgängen zwischen den verschiedenen Zellkompartimenten, welche allerdings ebenfalls kaum beschrieben sind. ABC-Transporter wurden bei Mutanten der Hefe *Yarrowia lipolytica* mit dem zellinternen Transport von Alkanen in Verbindung gebracht [43]. Aber auch passive Mechanismen oder andere Transportproteine sind weitere mögliche Szenarien [44]. Bei intakter  $\beta$ -Oxidation wird die resultierende Säure im Anschluss abgebaut und dem Energiestoffwechsel zugeführt. Bei Produktionsstämmen, bei denen die  $\beta$ -Oxidation blockiert wurde, findet sich die Disäure im umgebenden Medium. Auch diese Exportvorgänge des resultierenden Produktes sind bisher nicht aufgeklärt, werden aber wahrscheinlich von dem umgebenden pH Wert und der damit verbundenen Löslichkeit beeinflusst [32]. Ein genaueres Verständnis der Transportabläufe und eine darauf aufbauende Optimierung könnte großes Potential zur Verbesserung der Biotransformation bergen.

### 1.2.4 Reaktionskaskade der Oxidation durch *Candida tropicalis*

Die Oxidation des Substrates durch *C. tropicalis* besteht aus drei aufeinanderfolgenden Schritten und ist schematisch in **Abb. 1.3** dargestellt. Zunächst erfolgt die Hydroxylierung des Substrates an der endständigen Position durch einen Hydroxylasekomplex. Der zweite Teil der Reaktion wird durch Fettkoholoxidasen katalysiert. Dieses Enzym ist ebenfalls in den Peroxisomen lokalisiert, membrangebunden, Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) abhängig und enthält ein charakteristisches Aminosäuremuster der Cytochrom b Proteinfamilie. Mit Hilfe von Sauerstoff wird der zuvor entstandene primäre Alkohol zum korrespondierenden Aldehyd oxidiert, wobei gleichzeitig Wasserstoffperoxid gebildet wird. Betrachtungen des zweiten Schritts der Reaktionskaskade durch Lu et al. zeigten außerdem, dass die Oxidation zum korrespondierenden Aldehyd zusätzlich auch durch in *C. tropicalis* vorhandene Alkoholdehydrogenasen katalysiert werden kann [38]. Der dritte Schritt ist die Oxidation des Aldehyds zur korrespondierenden Säure unter  $\text{NAD}^+$  Verbrauch, welcher in diesem Fall durch eine Fettsäurealdehyd-Dehydrogenase katalysiert wird.

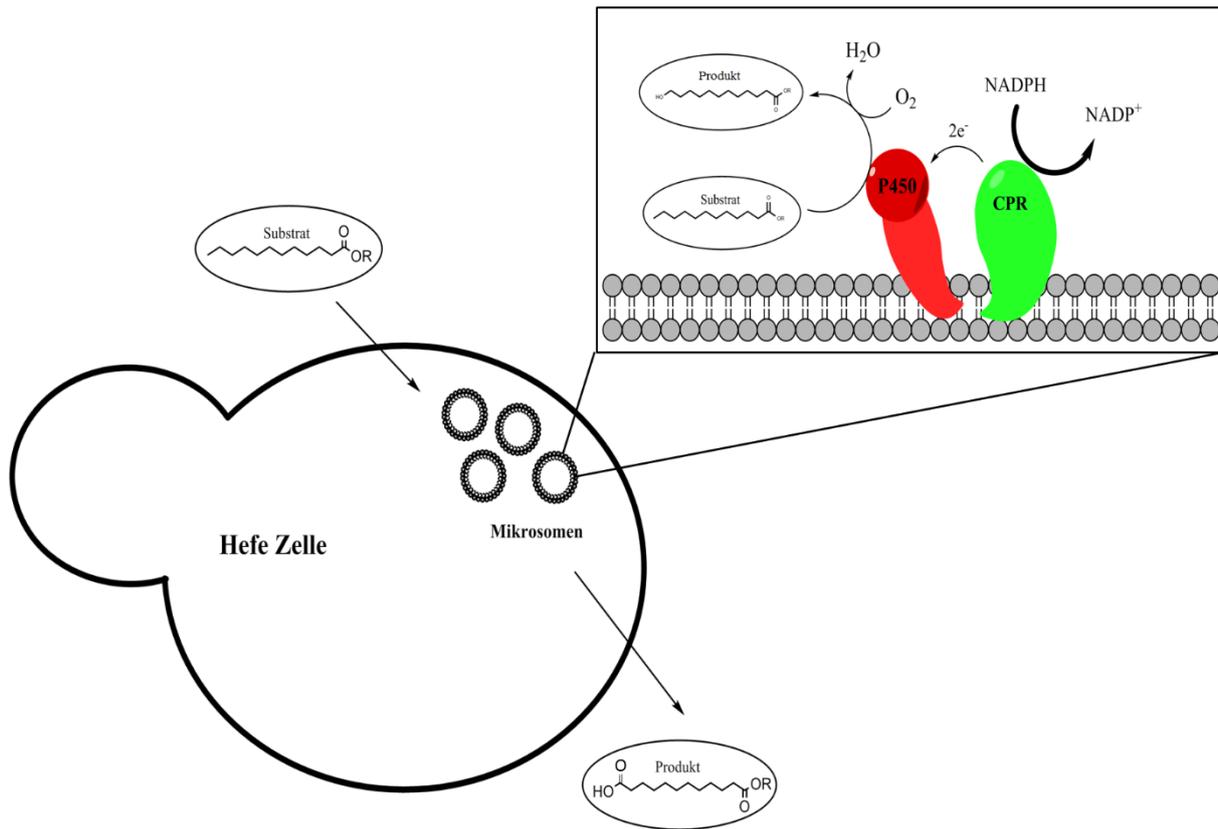


**Abb. 1.3: Oxidationsschritte der Dicarbonsäurebildung mittels *Candida tropicalis*** Zunächst erfolgt die  $\omega$ -Oxidation des Substrates, katalysiert durch einen Hydroxylasekomplex. Anschließend erfolgt die zweite Oxidation durch eine Fettsäurealkoholoxidase oder alternativ durch eine Alkoholdehydrogenase zum Aldehyd und zuletzt die Oxidation zur korrespondierenden Säure mittels einer Aldehyddehydrogenase [38].

Der limitierende Schritt bei der Reaktionsfolge der Dicarbonsäurebildung durch *C. tropicalis* ist die erste Oxidation zum primären Alkohol. Diese Reaktion wird durch einen Komplex aus einer Cytochrom P450 Monooxygenase (CYP) und einer zugehörigen Cytochrom P450 Reduktase (CPR) katalysiert. Dabei wird molekularer Sauerstoff durch die Übertragung von Elektronen gespalten und eines der Sauerstoffatome durch das Zusammenspiel der beiden Enzyme auf das Substrat übertragen. Dadurch entsteht das oxidierte Substrat unter Abspaltung von Wasser. Als Reduktionsäquivalente dienen dabei die Cofaktoren Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) oder Nicotinamidadenindinukleotid (NADH). Beide Enzyme sind im Falle von *C. tropicalis* membrangebunden und in den Peroxisomen lokalisiert.

**Abb. 1.4** zeigt schematisch den Ablauf der  $\omega$ -Oxidation.

Lu et al. führten bei einem zur Disäureproduktion optimierten *C. tropicalis* Stamm (blockierte  $\beta$ -Oxidation) detaillierte Untersuchungen zum Ablauf der  $\omega$ -Oxidations-Reaktionskaskade durch, wobei dabei der erste und zweite Oxidationsschritt im Fokus standen. Dabei wurde die Expression einiger, vermutlich an der Reaktion beteiligten Enzyme gezielt verhindert. Um die Aktivität verschiedener CYPs *in vivo* zu untersuchen, wurden diese nachträglich wieder in die Zellen integriert. War die Expression der ausgewählten CYPs unterdrückt, konnte keine signifikante  $\omega$ -Oxidation der eingesetzten Substrate mehr nachgewiesen werden. Dies zeigte, dass der initiale Schritt der  $\omega$ -Oxidation ausschließlich durch Monooxygenasen katalysiert wird.



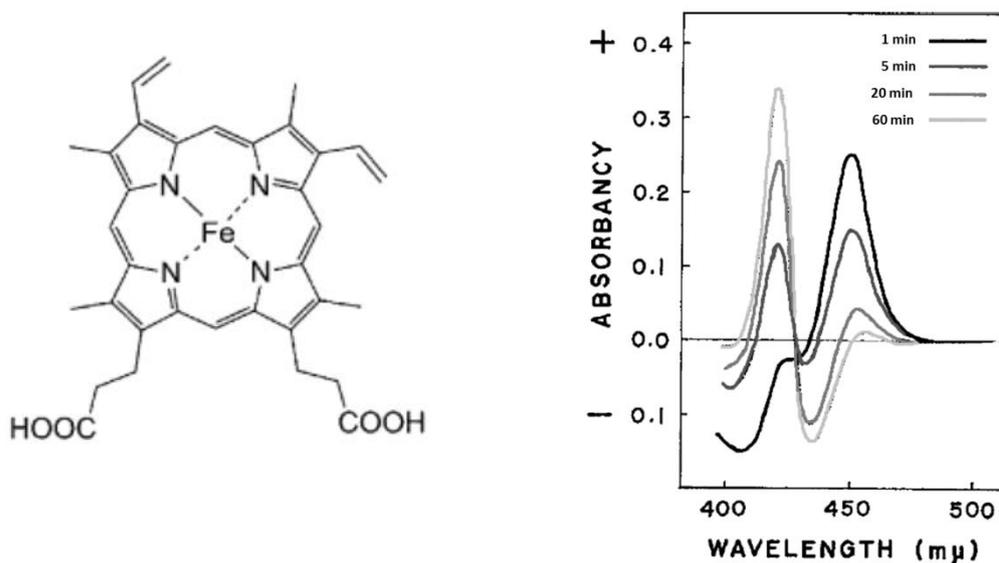
**Abb. 1.4: Schematische Übersicht über die  $\omega$ -Oxidation von Fettsäuren oder ähnlichen Substraten**  
 In den Peroxisomen der Hefezelle werden die Substrate durch den membranständigen Enzymkomplex aus Cytochrom P450 Monooxygenase und korrespondierender Reduktase am terminalen Ende zum Alkohol oxidiert.

Aktivitätstests mit den rekombinant exprimierten Monooxygenasen CYP52A13 und CYP52A17 aus *Candida tropicalis* und CYP52A3 aus *Candida maltosa*, zeigten die direkte Oxidation von Fettsäuren und Alkanen zur Dicarbonsäure. In diesen Fällen waren außer der entsprechenden Reduktase keine weiteren Enzyme beteiligt. Das Hauptprodukt war auch in diesen Fällen zunächst der primäre Alkohol, über eine längere Inkubationsdauer reicherte sich aber zusätzlich die Disäure an. Dieses Phänomen wird auch als Überoxidation bezeichnet [11, 45, 46]. Ist die Dicarbonsäure das Zielprodukt, führt diese Eigenschaft der Enzyme zu keinen unerwünschten Nebenprodukten, kann sich aber negativ auf die Cofaktor-Regenerierung innerhalb der Zelle auswirken. Für die Produktion einiger anderer interessanter bifunktionaler Monomere, wie beispielsweise den  $\omega$ -Aminocarbonsäuren, ist die Oxidation zur Disäure unerwünscht, da eine Transaminierung der Säuregruppe nicht mehr möglich ist [18]. Die Säurebildung stellt in diesem Fall eine Konkurrenzreaktion dar und mindert die Effizienz des Biokatalysators. Um ein breiteres Substratspektrum erschließen zu können, unerwünschte Nebenreaktionen zu minimieren und neue Prozesswege zu gestalten, sind Cytochrom P450 Hydroxylasen, die keine Überoxidation zeigen, interessante und vielversprechende Angriffspunkte für weitere Engineering Ansätze.

## 1.3 Cytochrom P450 Monooxygenasen

### 1.3.1 Vorkommen und Struktur

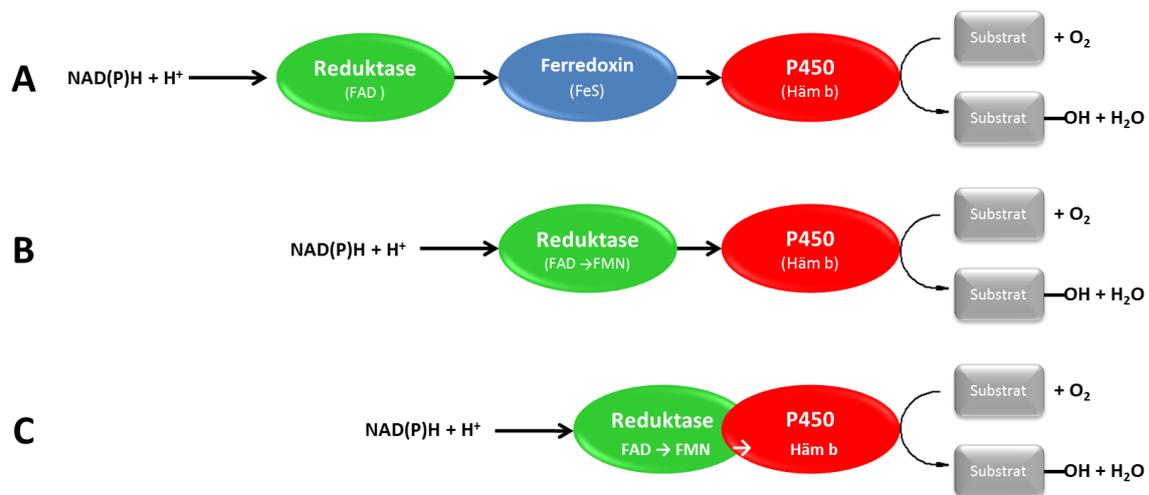
Cytochrom P450 Monooxygenasen (CYPs) kommen in nahezu allen Lebensformen vor. Mit ihrer besonderen Eigenschaft nicht aktivierte C-H-Bindungen selektiv angreifen und oxidieren zu können, spielen sie in verschiedenen Stoffwechselfvorgängen bei Pro- und Eukaryonten eine große Rolle. Bei Säugtieren sind sie an Phase-I-Reaktionen und beispielweise am Steroidhormonstoffwechsel beteiligt [47]. Die prosthetische Gruppe dieser Enzymfamilie wird dabei von einem Eisen-Protophoryn IX-Komplex gebildet. Dieser Komplex ist allgemein bekannt unter der Bezeichnung Häm b und bindet im Laufe der Oxidation den molekularen Sauerstoff. Bei der Häm b Gruppe liegt das Eisen-Ion in nicht kovalent gebundener Form vor (Abb. 1.5) [48].



**Abb. 1.5:** Links: Schematische Darstellung der prosthetischen Gruppe einer Cytochrom P450 Monooxygenase Sie besteht aus einem Eisen-Protophoryn IX-Komplex, welcher während der Oxidation den Sauerstoff bindet [48]. Rechts: Absorptionsspektrum einer CYP Monooxygenase unter an dauernder Denaturierung mittels Schlangengift. Durch das Schlangengift wird das Enzym zusehends denaturiert, wodurch der charakteristische Peak bei 450 nm verschwindet und der Peak bei 420 nm zunimmt [49].

Das „P450“ im Namen dieser Enzymfamilie wird abgeleitet von „Pigment“ und 450 nm. Befinden sich diese Proteine im reduzierten Zustand und sind mit Kohlenmonoxid komplexiert, zeigen sie *in vitro* eine charakteristische Absorptionsbande bei 450 nm im UV/VIS Spektrum. Die Intensität der 450 nm Absorptionsbande ist ein Hinweis auf den Gehalt an nativen P450 Enzymen und kann auch zur quantitativen Bestimmung genutzt werden. Befinden sich diese in denaturiertem oder nicht korrekt gefaltetem Zustand, verschiebt sich die charakteristische Absorptionsbande zu 420 nm. Abb. 1.5 zeigt mehrere Absorptionsspektren einer CYP-Probe, welche mit Schlangengift behandelt wurde. Das Gift führt mit zunehmender Inkubationsdauer zu zunehmender Denaturierung des Proteins. Es ist deutlich erkennbar, wie der 450 nm Peak mit der Zeit abnimmt, während der 420 nm Peak zunimmt [49, 50].

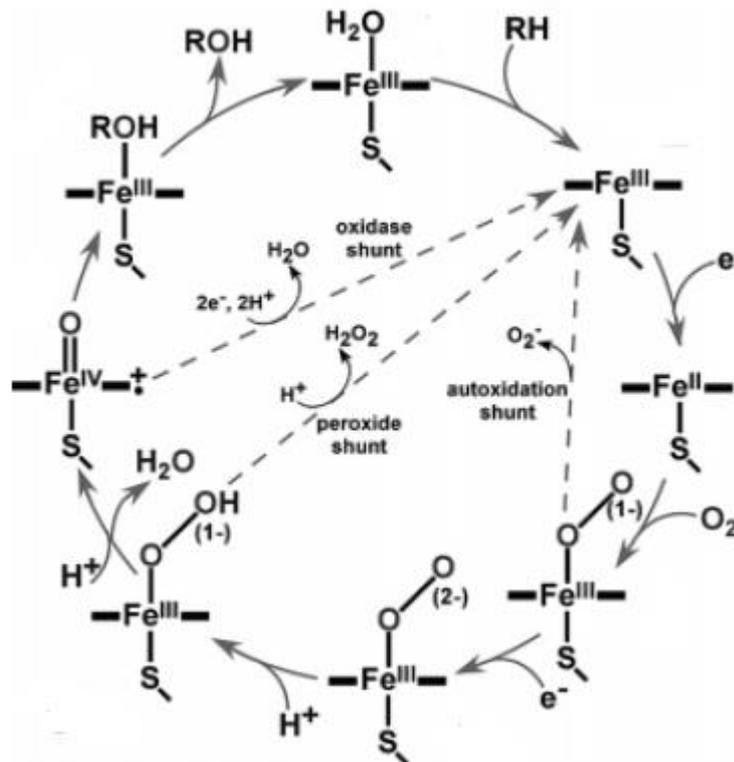
Beinahe alle Cytochrom P450 Monooxygenasen sind von den Cofaktoren NADH oder NADPH abhängig. Für die Oxidation des Substrates bedarf es zusätzlicher Redoxproteine, welche die Elektronen von den Cofaktoren auf das Eisenzentrum der Häm-Gruppe übertragen. Je nach beteiligtem Redoxpartnerprotein werden die Monooxygenasen klassifiziert. Klasse I setzt sich aus einem Drei-Komponenten-System zusammen, einem Eisen-Schwefel Ferredoxin, einer FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid) enthaltene Reduktase und der P450 Monooxygenase. In eukaryotischen Zellen liegen die drei Komponenten membrangebunden innerhalb der Mitochondrien vor, in Prokaryoten dagegen löslich innerhalb des Cytoplasmas. Klasse II CYPs bestehen aus einem typischerweise NADPH abhängigem Zwei-Komponenten-System, wozu die Cytochrom P450 Reduktase (CPR) und die Monooxygenase zählen. Der Elektronentransfer erfolgt durch die in der Reduktase enthaltenen Flavin-Adenin-Dinukleotid und Flavin-Mononukleotid Moleküle. Monooxygenasen dieses Typs sind typisch für eukaryotische Zellen. Beide, in den meisten Fällen membrangebundenen Proteine sind im Endoplasmatischen Reticulum, Mikrosomen oder anderen Membranvesikeln lokalisiert. Als dritte Variante gibt es Einkomponenten-Systeme, welche aus Fusionsproteinen der Monooxygenase und einem Reduktase ähnlichen Protein bestehen. Dieses System kann sowohl löslich als auch membrangebunden vorliegen und kommt in eukaryotischen, wie auch in prokaryotischen Zellen vor [48, 51]. **Abb. 1.6** zeigt eine Übersicht über alle drei möglichen Systeme.



**Abb. 1.6:** Schematische Übersicht über verschiedene Klassen von P450 Monooxygenasen A) zeigt das dreikomponenten-System der Klasse I Monooxygenasen, bestehend aus der Reduktase, Ferredoxin und der Monooxygenase; B) zeigt das zweikomponenten-System der Klasse II Monooxygenasen, bestehend aus der Reduktase und der Monooxygenase, C) zeigt das einkomponenten-System der Klasse III Monooxygenasen, bestehend aus einem Fusionsprotein aus einem reductase-ähnlichen Protein und der Monooxygenase modifiziert nach [51].

### 1.3.2 Katalytischer Mechanismus der Oxofunktionalisierung

Die Oxidation nicht aktivierter Kohlenstoffbindungen durch Cytochrom P450 Enzyme ist in der Literatur detailliert beschrieben. **Abb. 1.7** zeigt eine allgemeine, schematische Übersicht des Reaktionsmechanismus nach Denisov et al. [52].



**Abb. 1.7:** Schematische Übersicht des postulierten Oxidationsmechanismus katalysiert durch Häm-abhängige Cytochrom P450 Monooxygenasen [52].

Dabei ist der erste Schritt der Oxidation die Bindung des Substrates an die Monooxygenase. Anschließend wird ein Elektron auf das  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Zentrum des Häm b übertragen, wodurch dieses zum  $\text{Fe}^{\text{II}}$  reduziert wird. An das  $\text{Fe}^{\text{II}}$  kann dann der molekulare Sauerstoff gebunden werden und es entsteht ein Oxo-P450-Komplex. Durch die Übertragung eines weiteren Elektrons wird dieser Komplex reduziert und nach einer zweifachen Protonierung am distalen Sauerstoff kann der molekulare Sauerstoff gespalten werden. Aufgrund des resultierenden reaktiven Enzymintermediates kann ein Sauerstoffatom in das Substrat eingeführt werden und das Produkt entsteht. Nach dem Dissoziieren des Produktes bleibt das Häm b mit einem Wasser als Liganden zurück und befindet sich erneut im Ausgangszustand. Im Laufe des Reaktionszyklus kann es zu unerwünschten Nebenreaktionen kommen. Dabei können verschiedene Zwischenstufen im Zyklus in einen oxidierten Zustand zurückfallen, wodurch es zu Wasserstoffperoxid- oder Wasserbildung kommen kann. Dadurch sinkt die Effizienz der Enzymreaktion, da die Elektronen des beteiligten Cofaktors nicht auf das Substrat sondern auf die Nebenprodukte übertragen werden und dadurch größere Mengen des Cofaktors benötigt werden. Weiterhin kann entstehendes  $\text{H}_2\text{O}_2$  zur Schädigung des Proteins führen. Diese Art der Nebenreaktion wird auch als Entkopplungsreaktion bezeichnet [48, 52, 53].

Wie bereits im Falle einiger CYPs verschiedener *Candida* Spezies erwähnt, kann es neben der Oxidation der nicht aktivierten C-H-Bindungen, auch zu weiteren Oxidationsschritten, katalysiert durch die gleichen Monooxygenasen kommen. Diese Art der Überoxidationsreaktion wurde allerdings nicht bei allen bisher untersuchten Monooxygenasen beobachtet und kann zusätzlich vom jeweiligen Substrat abhängig sein [11, 18, 46, 54, 55].

### 1.3.3 Cytochrom P450 Monooxygenasen als industrielle Biokatalysatoren

Cytochrom P450 Monooxygenasen stellen aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften interessante und vielversprechende Biokatalysatoren, auch für industrielle Anwendungen dar. Neben ihrer Fähigkeit selektiv Redoxreaktionen zu katalysieren, welche chemisch nur unter größtem Aufwand realisiert werden können, ist die Vielfalt der bekannten CYPs insgesamt zur Umsetzung eines sehr breiten Substratspektrums in der Lage [56]. Sie finden zum Beispiel Anwendung bei der Produktion verschiedener Medikamente, wie Chemotherapeutika [57], Antibiotika [58] oder verschiedener Steroide [59]. Weitere Anwendungsbereiche sind Biosensoren zur Detektion von Medikamenten in Blutproben und der Abbau von toxischen Komponenten wie polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe [60]. Diese Eigenschaften zusammen mit den generellen Vorteilen einer enzymatischen Katalyse prädestinieren diese Enzymfamilie zur Anwendung als industrielle Biokatalysatoren – zumindest auf den ersten Blick. Anders als beispielsweise die sehr robusten, kostengünstigen und bereits kommerziell genutzten Enzyme, wie Lipasen in Waschmitteln [61], stellt die großtechnische Nutzung von CYPs eine größere Herausforderung dar. Neben einer vergleichsweise geringen Stabilität gegenüber verschiedenen Faktoren, wie z. B. pH Wert und Temperatur, bestehen die meisten CYP-Systeme aus mehreren Proteinkomponenten, die zudem in vielen Fällen membrangebunden sind [51, 62]. Natürliche Fusionsproteine, wie die CYP aus *Bacillus megatherium* BM3, oder synthetisch hergestellte, modifizierte Proteine, stellen einen vielversprechenden Ansatz für den Einsatz in industriellen Anwendungen dar [51]. Kann die Stabilität solcher Enzyme hinsichtlich vorliegender Prozessbedingungen optimiert werden, bleibt allerdings die Abhängigkeit von Cofaktoren in stöchiometrischen Mengen als Problem bestehen. Diese Elektronen liefernden Cofaktoren sind in Organismen vorhanden und werden dort in der Gesamtheit des Metabolismus ständig regeneriert und stehen so in ausreichenden Mengen zur Verfügung. Fehlen für den gewünschten Prozess geeignete Regenerationssysteme, müssen große Mengen dieser komplexen Moleküle dem Reaktionsansatz zugesetzt werden. Der momentan noch sehr hohe Preis für die verschiedenen Cofaktoren macht eine Anwendung im industriellen Maßstab bisher nahezu unmöglich [51, 63, 64].

Um diese und vorher genannte Probleme auch für die membrangebundenen und aus mehreren Komponenten bestehenden Systeme umgehen zu können, bietet sich die Kombination von ausgewählten CYPs mit einem geeigneten Ganzzellkatalysesystem an.

## 2 Zielsetzung

Die Optimierung biotechnologischer Prozesse zur stofflichen Nutzung nachwachsender Rohstoffe birgt ein großes Zukunftspotential. Ziel dieser Arbeit war es, eine Biotransformationsplattform zu etablieren, welche den Produktionsprozess von  $\alpha$ - $\omega$ -Dicarbonsäuren reproduzierbar und zuverlässig abbildet. Mit diesem downscale Ansatz sollte der Einfluss verschiedener Prozessparameter auf die Produktbildung und den Prozessablauf untersucht werden. Dieses System sollte die Basis für zukünftige Screeningansätze nach neuen, optimierten Produktionsstämmen darstellen, indem es durch den erhöhten Durchsatz das Screeningverfahren beschleunigt. Zudem galt es neue Cytochrom P450 Monooxygenasen zu identifizieren, um zukünftig das mögliche Produktspektrum zu erweitern. Der Biotransformationsprozess sollte ausgehend vom Substrat LSME im Labormaßstab untersucht werden und parallel dazu geeignete enzymatische Katalysatoren zur selektiven Oxidation des gleichen Substrates identifiziert und anschließend charakterisiert werden.

Um den Prozess der ganzzellkatalysierten Biotransformation zur Dicarbonsäure mittels *C. tropicalis* besser zu verstehen, detaillierter abbilden zu können und zukünftig den Vergleich von neuen Varianten im hohen Durchsatz ermöglichen zu können, musste eine reproduzierbare und verlässliche Fermentationsplattform im kleinen Maßstab etabliert werden. Grundlage dazu war ein achtfaches Parallelfementersystem. In einem ersten Abschnitt sollten die Wachstums- und Biotransformationsphase untersucht und charakterisiert werden. Daran angeschlossen sollte die Etablierung geeigneter analytischer Methoden erfolgen. Diese sollten den Verlauf der Biomassekonzentration sowie die Substrat-, und Produktkonzentrationen und mögliche Zwischenprodukte zuverlässig detektieren können. Dabei musste die zunehmende Hydrophilizität der resultierenden Produkte berücksichtigt werden, um alle Komponenten vollständig zu erfassen. Auf Basis der etablierten, reproduzierbaren, kleinskaligen Prozessplattform sollten einzelne Prozessparameter variiert, und deren Einfluss auf das System untersucht werden.

Des Weiteren sollten Cytochrom P450 Enzyme identifiziert werden, welche bevorzugt Substrate mit der Kohlenstoffkettenlänge  $C_{12}$  selektiv an der  $\omega$ -Position zum korrespondierenden Alkohol oder Aldehyd oxidieren. Zu genannten Substraten gehören zum Beispiel Laurinsäure und Laurinsäuremethylester. Die Überoxidation zur korrespondierenden Dicarbonsäure war dabei unerwünscht und sollte nicht auftreten. Anhand einer umfassenden Literaturrecherche sollten geeignete enzymatische Katalysatoren gefunden und anschließend in einem geeigneten Expressionssystem hergestellt werden. Nach erfolgreicher Expression sollte eine umfassende Charakterisierung bezüglich des Substratspektrums und der möglichen Überoxidation erfolgen. Um die Aktivität der erhaltenen Enzyme beurteilen zu können, sollten geeignete Aktivitätsassays angewendet werden und mit zuvor etablierten analytischen Methoden ausgewertet werden.

Mit dem erzielten Wissen aus beiden Bereichen sollte der Grundstein für eine neue, effektive biotechnologische Ganzzellkatalyse geschaffen werden. Durch die etablierte Fermentationsplattform soll die Evaluierung verschiedenster Prozessparameter in Kombination mit den neu identifizierten Biokatalysatoren möglich werden. Darauf aufbauend soll zukünftig eine vielversprechende Produktionsplattform für Polymervorstufen geschaffen werden.

## 3 Material

### 3.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wiesen die größtmögliche Reinheit auf und wurden von folgenden Anbietern bezogen:

ABCR GmbH und Co.Kg	Karlsruhe
AppliChem GmbH	Darmstadt
Bio-Rad Laboratories	München
Biozym Scientific	Hees. Oldendorf
Bode Chemie GmbH	Hamburg
Carl Roth GmbH und Co.Kg	Karlsruhe
GE Healthcare Europe GmbH	Freiburg
Gerbu Biotechnik	Gailberg
Life Technologies GmbH	Darmstadt
Merck KGaA	Darmstadt
Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg
Sigma-Aldrich	St. Louis (MO, USA)
Takara Bio Inc.	Otsu Shiga (Japan)
Thermo Fisher Scientific	Waltham (MA, USA)
VWR Interational GmbH	Darmstadt

### 3.2 Enzyme und Antikörper

Folgende Enzyme und Antikörper wurden während dieser Arbeit verwendet:

AvRII	New England Biolabs (Ipswich, USA)
EcoRI	New England Biolabs (Ipswich, USA)
KpnI	New England Biolabs (Ipswich, USA)
NcoI	New England Biolabs (Ipswich, USA)
NdeI	New England Biolabs (Ipswich, USA)
NotI	New England Biolabs (Ipswich, USA)
SalI	New England Biolabs (Ipswich, USA)
XbaI	New England Biolabs (Ipswich, USA)
DpnI	New England Biolabs (Ipswich, USA)
T4 DNA Ligase	New England Biolabs (Ipswich, USA)
NEB-Taq DNA Polymerase	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Taq DNA Polymerase	Rapidozym Gesellschaft für Laborhandel und DNS Diagnostika GmbH (Berlin)
Tetra HisAntibody, BSA free	QIAGEN GmbH – Germany (Hilden)
Rabbit anti-Mouse IgGFC	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Rabbit CPR	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)

LongLife™ Zymolyase®	G-Biosciences (St. Luis, USA)
Lysozym	Carl Roth GmbH und Co.Kg (Karlsruhe)
Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)

### 3.3 Kits und Standards

<i>GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
<i>Nucleo Spin® Gel and PCR Clean up Kit</i>	Machery-Nagel GmbH & Co. KG
<i>2-Log DNA Ladder</i>	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
<i>Dynabeads® His-Tag Isolation and Pulldown</i>	Novex by Life technologies (Carlsbad USA)
<i>PageRuler unstained Protein Ladder</i>	Fermentas (St. Leon-Rot, USA)
<i>Prestained Protein Molecular marker</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

### 3.4 Geräte

Autoklav: Varioklav 135S	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
AirFuge Ultrazentrifuge, 4x 400 µL	Beckman Coulter Deutschland, Krefeld
Atomabsorptionsspektrometer ZEEnit 700	Analytik Jena Aktiengesellschaft, Jena

#### Chromatographieanlagen:

##### Ultra Performance Liquid Chromatography:

UltiMate 3000 RS LC System:	Thermo Fischer Scientific, Dionex, Idstein
Entgaser SRD 3.400	Thermo Fischer Scientific, Dionex, Idstein
Pumpe HPG 2.400 RS	Thermo Fischer Scientific, Dionex, Idstein
Autosampler WPS 3000 TRS	Thermo Fischer Scientific, Dionex, Idstein
Säulenofen TCC 3000 RS	Thermo Fischer Scientific, Dionex, Idstein
Dioden-Array-Detektor 3000 RS	Thermo Fischer Scientific, Dionex, Idstein

##### Verwendete Säulen:

Gravity C18 (100 mm, 2 mm Ø Partikelgröße: 1,8 µm)	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
---	-------------------------------------

##### Gaschromatographie:

Trace GC Ultra	Thermo Fischer Scientific, Dreieich
TriPlus Autosampler	Thermo Fischer Scientific, Dreieich
Verwendete Säulen:	
BPX5-Säule (30 m, 0,25 Ø, 0,25 µm Filmdicke)	SGE Analytical Science, Milton Keynes

#### Elektroporator MicroPulser™

Bio-Rad Laboratories GmbH

#### Fermentationsanlagen:

##### Parallelfementer System:

Abgasanalysator GA4	DASGIP, Jülich
Bioblock	DASGIP, Jülich
Bioreaktor	DASGIP, Jülich
Gasmischmodul MX4/4	DASGIP, Jülich
Multipumpenmodul MP8	DASGIP, Jülich

Sensormodul PH4 PO4 RD4	DASGIP, Jülich
Temperatur- und Agitationsmodul TC4SC4	DASGIP, Jülich
<b>2L System:</b>	
Biostat® Bplus	Sartorius Stedim, Göttingen
<b>Gelektrophoresekammern:</b>	
Agarose-Elektrophorese-Apparatur	Bio-Rad Laboratories GmbH
Mini-Sub Cell GT System	Bio-Rad Laboratories GmbH
SDS-Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH
Mini-PROTEAN®-Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH
Netzteil PowerPac™ Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr-Hausgeräte, Ochsenhausen
Gefrierschrank -80 °C Forma 906 -86°C ULT	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Alpha 2-4 LD plus	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH
mit Vakuumpumpe RC 6	VACUUBRAND GmbH + Co. KG
Geldokumentation Gel iX Imager	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Hamilton Mikrotiterspritze, 25 µl	Hamilton AG, Bonaduz, Schweiz
Heißluftpistole HG 2000 E	STEINEL GmbH, Hezebrock-Clarholz
Heizblock-Thermostat TMix	Analytik Jena Aktiengesellschaft, Jena
Heizschrank Function Line T12	Thermo Fischer Scientific, Haeraeus
Hochdruckzellaufschluss ONE SHOT	I&L Biosystems GmbH, Königswinter
Inkubationsschränke / -räume:	
Klimaschrank KBF 240 E5.1/C	BINDER GmbH, Tuttlingen
Brutschrank Function Line B12	Thermo Fischer Scientific, Haeraeus
Inkubationsraum 37 °C	Albert GmbH, Rain
Inkubationsschüttler:	
HT Minitron	Infors AG, Bottmingen/Basel, Schweiz
MaxQ 2000	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
TiMix 5 control	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Konzentrator Savant SpeedVac Plus SC210A	
mit Savant Refrigerated Vapor Trap RVT100	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Kühlraum 4 °C	Albert GmbH, Rain
Magnetrührer:	
MR 3001 K	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
VMS-C7	VWR International GmbH
Microliterpipetten:	
Transferpette® S 0,1 – 1 µl	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Transferpette® S 1 – 10 µl	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Transferpette® S 10 – 100 µl	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Transferpette® S 100 – 1.000 µl	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim

Transferpette® S 500 – 5.000 µl	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Transferpette® S 1.000 – 10.000 µl	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Transferpette® S -8 5 – 50 µl	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Transferpette® S -8 10 – 100 µl	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Transferpette® S -12 20 – 200 µl	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Mikroliterpipetten, elektrisch	
Transferpette® S -8 electronic 10 – 200 µl	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Research pro 8x 1200 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Research pro 12x 300 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Microwelle MH 25 ED	ECG, Prag, Tschechien
Mikroskop BA310	Motic Deutschland GmbH
pH-Messgeräte und Elektroden:	
FiveGo™	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
FiveEasy™	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
InLab® Expert Pro pH 0-14; 0-100 °C	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
InLab® Micro Pro pH 0-14; 0-100 °C	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
PCR-Geräte:	
MJMini™ Personal Thermo Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH
MyCycler™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH
Reinstwasseranlage PURELAB Classic	ELGA LabWater, Celle
Titratort TL7000, Elektrode IoLine	SI Analytics GmbH, Mainz
Ultraschallbad Ultrasonic Cleaner	VWR International GmbH
Ultraschall-Prozessor UIS250L mit Sonotrode „VialTweeter“	Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow
UV-Cabinet UV INSPECTION 022.9070	CAMAG, Berlin
UV-Vis Spektralphotometer:	
Multiskan Spectrum	Thermo Fischer Scientific
Varioskan	Thermo Fischer Scientific
Vakuumpumpe PC 2004 VARIO	VACUUBRAND GmbH + Co. KG
Vertikalschüttler Rocking Platform	VWR International GmbH
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc, Bohemia, USA
Waagen:	
Feinwaage Pioneer™	Ohaus Europe GmbH, Nänikon, Schweiz
TE6101	Sartorius AG, Göttingen
TE1502S	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad ED-33	JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach
Zentrifugen:	
Sorvall RC 6+	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Fresco 21 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Airfuge	Beckmann & Coulter, Krefeld

### 3.5 Software und Datenbanken

Basic Local Alignment Search Tool BLAST	National Center vor Biotechnology Information <a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov</a>
bioedit	T. Hall, Ibis Biosciences (Carlsbad, USA)
Clone Manager 9	Scientific & Educational Software (USA)
Chromeleon	Dionex, Dreieich
DASGIP Control 4.5	DASGIP Information and Process Technology GmbH
GATC™ Viewer	GATC Biotech AG (Konstanz) <a href="http://www.gatcbiotech.com/en/textbausteine/downloadsundntzlichenlinks.html">http://www.gatcbiotech.com/en/textbausteine/downloadsundntzlichenlinks.html</a>
Gel Jet Imager	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Hystar	Bruker Bellerica US
PDB	<a href="http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do">http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do</a>
QuantAnalysis	Bruker, Bellerica US
SciFinder	Chemical Abstract Service <a href="http://www.cas.org/products/scifinder">http://www.cas.org/products/scifinder</a>
Sigma Plot 11.0	Systat Software GmbH (Erkrath)
Skani-Software	Thermo Fisher Scientific (USA)
UniProt	<a href="http://www.uniprot.org/">http://www.uniprot.org/</a>
Xcalibur	Thermo Fisher Scientific (USA)

### 3.6 Bakterien- und Hefestämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene *E. coli* und *S. cerevisiae* Stämme und ein *C. tropicalis* Stamm verwendet. **Tab. 3.6-1** zeigt eine Übersicht über alle verwendeten Stämme und deren Verwendungszweck.

**Tab. 3.6-1: Übersicht über verwendete Bakterien- und Hefestämme**

Stamm	Genotyp	Verwendungszweck	Referenz
<i>E. coli</i> XL1Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tet<sup>R</sup>)]</i>	Klonierungsarbeiten	Stratagene Heidelberg
<i>E. coli</i> XL10Gold	<i>endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tetR F'[proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tet<sup>R</sup> Amy CmR)]</i>	Klonierungsarbeiten	Stratagene Heidelberg
<i>E. coli</i> JM109	<i>endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB+ Δ(lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB+ lacIq lacZΔM15] hsdR17(rK-mK+)</i>	Klonierungsarbeiten Proteinexpression	Promega Madison USA
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>F<sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdSB(rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>) λ(DE3 [lacI lacUV5- T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>	Proteinexpression	Novagen Darmstadt
<i>E. coli</i> Tuner (DE3)	<i>F<sup>-</sup> ompT hsdSB(rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>) gal dcm lacY1 (DE3)</i>	Proteinexpression	Novagen Darmstadt
<i>S. cerevisiae</i> AH22	MATa leu2-3 leu2-112 his4-519 can1 [KIL-o], form I rDNA	Proteinexpression	DSMZ Braunschweig [65]
<i>S. cerevisiae</i> GRF18	MATalpha leu23 leu2112 his311 his315; phenotype: canR	Proteinexpression	DSMZ Braunschweig [66]
<i>S. cerevisiae</i> WAT11	MAT a; ade 2-1; his 3-11, -15; leu 2-3, -112; canR; cyr+	Proteinexpression	Dr. P. Urban CNRS Frankreich [67, 68]
<i>S. cerevisiae</i> W (R)	MATa ade2-1 his3-11-15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1	Proteinexpression	Dr. P. Urban CNRS Frankreich [69]
<i>C. tropicalis</i> ATCC 20962	<i>pox5:ura3A pox5:ura3A pox4A:ura3A pox4B:URA3A</i>	Biotransformationsstamm	ATCC Manassas USA

### 3.7 Plasmide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Vektoren zur Expression in *E. coli* und *S. cerevisiae* verwendet. **Tab. 3.7-1** zeigt eine Übersicht über alle verwendeten Plasmide und entstandenen Konstrukte mit genannten Inserts. Die genannten Referenzen geben die Herkunft des verwendeten Vektors wieder, die Accessionnummer (A.No.) aus der Datenbank Uniprot, bezieht sich auf die Sequenz des verwendeten Proteins.

**Tab. 3.7-1: Übersicht über verwendete Plasmide**

Plasmid	Expressions-system	Beschreibung	Schnittstellen	A.No. Insert, Referenz
pMK-RQ-CYP52A5	<i>E. coli</i>	Kan <sup>R</sup> , C-DNA Sequenz der synthetisierten CYP52A5 aus <i>C. maltosa</i> im pMK-RQ Vektor, codon-optimiert für <i>E. coli</i>		P24458
pMK-RQ-CYP52A13	<i>E. coli</i>	Kan <sup>R</sup> , C-DNA Sequenz der CYP52A13 aus <i>C. tropicalis</i> im pMK-RQ Vektor, codon-optimiert für <i>E. coli</i>		Q874J4
pMK-RQ-CYP52A17	<i>E. coli</i>	Kan <sup>R</sup> , C-DNA Sequenz der CYP52A17 aus <i>C. tropicalis</i> im pMK-RQ Vektor, codon-optimiert für <i>E. coli</i>		Q874I9
pMK-RQ-CYP78A1	<i>E. coli</i>	Kan <sup>R</sup> , C-DNA Sequenz der CYP78A1 aus <i>Zea mays</i> im pMK-RQ Vektor, codon-optimiert für <i>E. coli</i>		P48420
pMK-RQ-CPR	<i>E. coli</i>	Kan <sup>R</sup> , C-DNA Sequenz der CPR aus <i>C. tropicalis</i> im pMK-RQ Vektor, codon-optimiert für <i>E. coli</i>		P37201
pMK-RQ-CYPi2	<i>S. cerevisiae</i>	Kan <sup>R</sup> , C-DNA Sequenz der CYP2 aus <i>Vitis vinifera</i> im pMK-RQ Vektor, codon-optimiert für <i>S. cerevisiae</i>		F6GXN1
pMK-RQ-CYPi3	<i>S. cerevisiae</i>	Kan <sup>R</sup> , C-DNA Sequenz der CYP3 aus <i>Glycine max</i> , im pMK-RQ Vektor, codon-optimiert für <i>S. cerevisiae</i>		I1N9N7
pMK-RQ-CYPi5	<i>S. cerevisiae</i>	Kan <sup>R</sup> , C-DNA Sequenz der CYP5 aus <i>Oryza sativa</i> , im pMK-RQ Vektor, codon-optimiert für <i>S. cerevisiae</i>		Q8LRA6
pMK-RQ-CYPi6	<i>S. cerevisiae</i>	Kan <sup>R</sup> , C-DNA Sequenz der CYP86A1 aus <i>A. thaliana</i> , im pMK-RQ Vektor, codon-optimiert für <i>S. cerevisiae</i>		P48422
pMK-RQ-CYPi7	<i>S. cerevisiae</i>	Kan <sup>R</sup> , C-DNA Sequenz der CYP7 aus <i>Glycine max</i> , im pMK-RQ Vektor, codon-optimiert für <i>S. cerevisiae</i>		I1MB99

pMK-RQ-CYPi8	<i>S. cerevisiae</i>	Kan <sup>R</sup> , C-DNA Sequenz der CYP8 aus <i>Linum usitatissimum</i> , im pMK-RQ Vektor, codon-optimiert für <i>S. cerevisiae</i>		I6XNF1
pMK-RQ-CYPi9	<i>S. cerevisiae</i>	Kan <sup>R</sup> , C-DNA Sequenz der CYP9 aus <i>A. thaliana</i> , im pMK-RQ Vektor, codon-optimiert für <i>S. cerevisiae</i>		Q9CAD6
pMK-RQ-CYPi10	<i>S. cerevisiae</i>	Kan <sup>R</sup> , C-DNA Sequenz der CYP10 aus <i>Medicago truncatula</i> , im pMK-RQ Vektor, codon-optimiert für <i>S. cerevisiae</i>		G7JPI5
pMK-RQ-CYPi12	<i>S. cerevisiae</i>	Kan <sup>R</sup> , C-DNA Sequenz der CYP12 aus <i>Sorghum bicolor</i> , im pMK-RQ Vektor, codon-optimiert für <i>S. cerevisiae</i>		C5WMA2
pMK-RQ-CYPi17	<i>S. cerevisiae</i>	Kan <sup>R</sup> , C-DNA Sequenz der CYP17 aus <i>Trifolium pratense</i> , im pMK-RQ Vektor, codon-optimiert für <i>S. cerevisiae</i>		Q2PEZ7
pMK-RQ-CYPi25	<i>S. cerevisiae</i>	Kan <sup>R</sup> , C-DNA Sequenz der CYP25 aus <i>C. dubliniensis</i> ATCC MYA-646, im pMK-RQ Vektor, codon-optimiert für <i>S. cerevisiae</i>		B9WKL7
pMK-RQ-CYPi27	<i>S. cerevisiae</i>	Kan <sup>R</sup> , C-DNA Sequenz der CYP27 aus <i>Penicillium marneffe</i> ATCC 18224, im pMK-RQ Vektor, codon-optimiert für <i>S. cerevisiae</i>		B6QM59
pACY-Duet <sup>TM</sup>	<i>E. coli</i>	P15A lacI <sup>q</sup> T7 promoter, Cm <sup>R</sup> Expressionsvektor mit zwei MCS zur parallelen Expression zweier Gene		Novagen
pACY-Duet-CPR	<i>E. coli</i>	Cm <sup>R</sup> , pACY-Duet <sup>TM</sup> mit C-DNA Sequenz der CPR aus <i>C. tropicalis</i>	NdeI + AvrII	Diese Arbeit
pACY-Duet-CPR-A5	<i>E. coli</i>	Cm <sup>R</sup> , pACY-Duet <sup>TM</sup> mit C-DNA Sequenz der CPR aus <i>C. maltosa</i> und der CYP52A5 aus <i>C. tropicalis</i>	CPR: NdeI + AvrII CYP: NcoI + NotI	Diese Arbeit
pACY-Duet-CPR-A13	<i>E. coli</i>	Cm <sup>R</sup> , pACY-Duet <sup>TM</sup> mit C-DNA Sequenz der CPR aus <i>C. tropicalis</i> und der CYP52A13 aus <i>C. tropicalis</i>	CPR: NdeI + AvrII CYP: NcoI + NotI	Diese Arbeit
pACY-Duet-CPR-A17	<i>E. coli</i>	Cm <sup>R</sup> , pACY-Duet <sup>TM</sup> mit C-DNA Sequenz der CPR aus <i>C. tropicalis</i> und der CYP52A17 aus <i>C. tropicalis</i>	CPR: NdeI + AvrII CYP: NcoI + NotI	Diese Arbeit
pACY-Duet-CPR-78A1	<i>E. coli</i>	Cm <sup>R</sup> , pACY-Duet <sup>TM</sup> mit C-DNA Sequenz der CPR aus <i>C. tropicalis</i> und der CYP78A1 aus <i>Zea mays</i>	CPR: NdeI + AvrII CYP: NcoI + NotI	Diese Arbeit
pCWori	<i>E. coli</i>	tac promoter, Amp <sup>R</sup> Expressionsvektor zur Expression von CYPs in <i>E. coli</i>	CPR: NdeI + AvrII CYP: NcoI + NotI	Dr. Eric Johnson [70]
pCWORI-CPR	<i>E. coli</i>	Amp <sup>R</sup> , pCWori mit C-DNA Sequenz der CPR aus <i>C. tropicalis</i>	XbaI + NdeI	Diese Arbeit

pCWORI-CYP52A5	<i>E. coli</i>	Amp <sup>R</sup> , pCWori mit C-DNA Sequenz der CPR aus <i>C. maltosa</i> und der CYP52A5 aus <i>C. tropicalis</i>	XbaI + NdeI	Diese Arbeit
pCWORI-CYP52A13	<i>E. coli</i>	Amp <sup>R</sup> , pCWori mit C-DNA Sequenz der CPR aus <i>C. tropicalis</i> und der CYP52A13 aus <i>C. tropicalis</i>	XbaI + NdeI	Diese Arbeit
pCWORI-CYP52A17	<i>E. coli</i>	Amp <sup>R</sup> , pCWori mit C-DNA Sequenz der CPR aus <i>C. tropicalis</i> und der CYP52A17 aus <i>C. tropicalis</i>	XbaI + NdeI	Diese Arbeit
pCWORI-CYP78A1	<i>E. coli</i>	Amp <sup>R</sup> , pCWori mit C-DNA Sequenz der CPR aus <i>C. tropicalis</i> und der CYP78A1 aus <i>Zea mays</i>	XbaI + NdeI	Diese Arbeit
pAUR-123	<i>S. cerevisiae</i>	Amp <sup>R</sup> ( <i>E. coli</i> ) AbA <sup>R</sup> ( <i>S. cerevisiae</i> ), konstitutiver ADH1 Promotor  Shuttlevektor zur Klonierung in <i>E. Coli</i> und Expression in <i>S. cerevisiae</i> mit Fungizidresistenz gegen Aureobasidin A		Takara Japan
pAUR-123-CPR	<i>S. cerevisiae</i>	Amp <sup>R</sup> ( <i>E. coli</i> ) AbA <sup>R</sup> ( <i>S. cerevisiae</i> ) pAUR-123 mit C-DNA Sequenz der CPR aus <i>C. tropicalis</i>	XbaI + SalI	Diese Arbeit
pAUR-123-CYP52A5	<i>S. cerevisiae</i>	Amp <sup>R</sup> ( <i>E. coli</i> ) AbA <sup>R</sup> ( <i>S. cerevisiae</i> ) pAUR-123 mit C-DNA Sequenz der CYP52A5 aus <i>C. maltosa</i>	XbaI + SalI	Diese Arbeit
pAUR-123-CYP52A13	<i>S. cerevisiae</i>	Amp <sup>R</sup> ( <i>E. coli</i> ) AbA <sup>R</sup> ( <i>S. cerevisiae</i> ) pAUR-123 mit C-DNA Sequenz der CYP52A13 aus <i>C. tropicalis</i>	XbaI + SalI	Diese Arbeit
pAUR-123-CYP52A17	<i>S. cerevisiae</i>	Amp <sup>R</sup> ( <i>E. coli</i> ) AbA <sup>R</sup> ( <i>S. cerevisiae</i> ) pAUR-123 mit C-DNA Sequenz der CYP52A17 aus <i>C. tropicalis</i>	XbaI + SalI	Diese Arbeit
pAUR-123-CYP78A1	<i>S. cerevisiae</i>	Amp <sup>R</sup> ( <i>E. coli</i> ) AbA <sup>R</sup> ( <i>S. cerevisiae</i> ) pAUR-123 mit der C- DNA Sequenz der CYP78A1 aus <i>Zea mays</i>	XbaI + SalI	Diese Arbeit
pYeDP60	<i>S. cerevisiae</i>	Selektionsmarker URA3 und ADE2 GAL10–CYC1 Hybridpromotor  Shuttlevektor zur Klonierung in <i>E. Coli</i> und Expression in <i>S. cerevisiae</i> speziell zur Expression von CYPs		Dr. P. Urban CNRS Frankreich [67]
pYeDP60-CYP2	<i>S. cerevisiae</i>	URA3 und ADE2, pYeDP60 mit C-DNA Sequenz der CYP2 aus <i>Vitis vinifera</i>	KpnI + EcoRI	Diese Arbeit
pYeDP60-CYP3	<i>S. cerevisiae</i>	URA3 und ADE2, pYeDP60 mit C-DNA Sequenz der CYP3 aus <i>Glycine max</i>	KpnI + EcoRI	Diese Arbeit

pYeDP60-CYP5	<i>S. cerevisiae</i>	URA3 und ADE2, pYeDP60 mit C-DNA Sequenz der CYP5 aus <i>Oryza sativa</i>	KpnI + EcoRI	Diese Arbeit
pYeDP60-CYP6	<i>S. cerevisiae</i>	URA3 und ADE2, pYeDP60 mit C-DNA Sequenz der CYP86A1 aus <i>A. thaliana</i>	KpnI + EcoRI	Diese Arbeit
pYeDP60-CYP7	<i>S. cerevisiae</i>	URA3 und ADE2, pYeDP60 mit C-DNA Sequenz der CYP7 aus <i>Glycine max</i>	KpnI + EcoRI	Diese Arbeit
pYeDP60-CYP8	<i>S. cerevisiae</i>	URA3 und ADE2, pYeDP60 mit C-DNA Sequenz der CYP8 aus <i>Linum usitatissimum</i>	KpnI + EcoRI	Diese Arbeit
pYeDP60-CYP9	<i>S. cerevisiae</i>	URA3 und ADE2, pYeDP60 mit C-DNA Sequenz der CYP9 aus <i>A. thaliana</i>	KpnI + EcoRI	Diese Arbeit
pYeDP60-CYP10	<i>S. cerevisiae</i>	URA3 und ADE2, pYeDP60 mit C-DNA Sequenz der CYP10 aus <i>Medicago truncatula</i>	KpnI + EcoRI	Diese Arbeit
pYeDP60-CYP12	<i>S. cerevisiae</i>	URA3 und ADE2, pYeDP60 mit C-DNA Sequenz der CYP12 aus <i>Sorghum bicolor</i>	KpnI + EcoRI	Diese Arbeit
pYeDP60-CYP17	<i>S. cerevisiae</i>	URA3 und ADE2, pYeDP60 mit C-DNA Sequenz der CYP17 aus <i>Trifolium pratense</i>	KpnI + EcoRI	Diese Arbeit
pYeDP60-CYP25	<i>S. cerevisiae</i>	URA3 und ADE2, pYeDP60 mit C-DNA Sequenz der CYP25 aus <i>C. dubliniensis</i> ATCC MYA-646	KpnI + EcoRI	Diese Arbeit
pYeDP60-CYP27	<i>S. cerevisiae</i>	URA3 und ADE2, pYeDP60 mit C-DNA Sequenz der CYP27 aus <i>Penicillium marneffe</i> ATCC 18224	KpnI + EcoRI	Diese Arbeit

### 3.8 Oligonukleotide

Die hier aufgeführten Oligonukleotide wurden mit der Software „Clonemanager“ designt und durch die Firma Biomers synthetisiert. Die Lagerung erfolgte bei einer Konzentration von 100 pg/L in ddH<sub>2</sub>O bei – 20 °C.

Bezeichnung	Schnittstelle	Sequenz
CYP52A13-Xbal-ase	Xbal	GCGTCTAGATTAATACATCTCAATGTTTGC
CYP52A13-Ndel-se	Ndel	CGGCCATATGGCAGTGCATGATATT
CYP52A17-Ndel-se	Ndel	GCGGCATATGGCAGAACAGCTGC
CYP52A17-Xbal-ase	Xbal	CGGCGTCTAGATTAATCAAATTTAACAATTGCACC
CYP52A5-Ndel-se	Ndel	CCGCGCATATGGCAATTGAGCAG
CYP52A5-Xbal-ase	Xbal	GCGTCTAGATTATTTGGCGCTAATAAAC
CYP78A1-Ndel-se	Ndel	CGCCATATGGCAATGGCAAGCGC
CYP78A1-Xbal-ase	Xbal	GGCTCTAGATTATGCGGTACGCGG
CPR-Ndel-se	Ndel	GCGCATATGGCACTGGATAAACTGG
CPR-Xbal-ase	Xbal	CGCAGGCGTCGACATGGCACTGGATAAAC
CPR-se-SalI	SalI	GACGGCGTCGACATGGCAATTGAGCAG
CYP52A5-se-SalI	SalI	GGCGCCGTCGACATGGCAGTGCATGATATTATTG
CYP52A13-se-SalI	SalI	GCGGCAAAGTCGACATGGCAGAACAGCTGCTGG
CYP52A17-se-SalI	SalI	GGCCAAGGTCGACATGGCAATGGCAAGC
CYP78A1-se-SalI	SalI	CGGCCTCTAGATTACCAAACATCTTC
CPR-His-Xbal-ase	Xbal	GGCCGCTCTAGATTAATGGTGATGGTGATGAT-GCCAAACATCTTCTTGATAGCG
A5-His-Xbal-ase	Xbal	GGCCGCTCTAGATTAATGGTGATGGTGATGAT-GGGCGCTAATAAACACGCCTTC
A13-His-Xbal-ase	Xbal	GGCCGCTCTAGATTAATGGTGATGGTGATGAT-GATACATCTCAATGTTTGCACC
A17-His-Xbal-ase	Xbal	GGCCGCTCTAGATTAATGGTGATGGTGATGAT-GATCAAATTTAACAATTGCACC

78A1-His-Xbal-ase	Xbal	GGCCGCTCTAGATTAATGGTGATGGTGATGAT-GTGCGGTACGCGGAATGGCTGC
CYP52A5his-EcoRI-ase	Xbal	GGCCGCGAATTCTTAATGGTGATGGTGATGAT-GTTTGGCGCTAATAAACAC
CYP52A5-KpnI-se	KpnI	CGGGCGCGGTACCATGGCAATTGAGCAGAT-TATTG
CYP52A13his-EcoRI-ase	EcoRI	GGCCGCGAATTCTTAATGGTGATGGTGATGAT-GATACATCTCAATGTTTGCACC
CYP52A13-KpnI-se	KpnI	GGCGCCGGTACCATGGCAGTGCATGATAT-TATTGC
CYP52A17his-EcoRI-ase	EcoRI	GGCCGCGAATTCTTAATGGTGATGGTGATGAT-GATCAAATTTAACAATTGCACC
CYP52A17-KpnI-se	KpnI	GGCGCCGGTACCATGGCAGAACAGCTGCTGG
CYP78A1his-EcoRI-ase	EcoRI	GATCGCGAATTCTTAATGGTGATGGTGATGAT-GTGCGGTACGCGGAATGGCTG
CYP78A1-KpnI-se	KpnI	GTCGCCGGTACCATGGCAATGGCAAGCGCAG
Histag-EcoRI-ase	EcoRI	CGGCGCCGAATTCATTAATGGTGATGGTGATGAT

### 3.9 Nährmedien

Alle hitzestabilen Medien und Medienkomponenten wurden zur Sterilisation 20 min bei 121 °C und 2 bar Überdruck autoklaviert. Alle hitzelabilen Komponenten wurden sterilfiltriert (0,2 µm steriler PTFE-Filter) und nach dem Abkühlen zugegeben. Falls nicht anders beschrieben, wurde der pH-Wert aller Medien vor dem Autoklavieren mit 10 M NaOH-Lösung oder 37% HCl-Lösung eingestellt. Alle Angaben beziehen sich auf die Endkonzentrationen der fertigen Medien.

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

5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl, 10 g/L Trypton/Pepton  
pH 7

#### LB-Agar

LB-Medium plus 1,5% (w/v) Agar-Agar  
pH 7

#### TB-Medium:

12 g/L Pepton, 24 g/l Hefeextrakt, 12,5 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

#### LB-low-Medium

5 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl, 10 g/L Trypton/Pepton  
pH 7

**SOB-Medium [71]**

5 g/L Hefeextrakt, 0,5 g/L NaCl, 20 g/L Trypton/Pepton

Nach dem Autoklavieren wurden 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 2,5 mM KCl (jeweils steril filtriert) hinzugefügt.

**SOC-Medium**

SOB-Medium plus Zugabe von 20 mM Glucose (getrennt autoklaviert) nach abkühlen

**NZY-Medium**

5 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl, 10 g/L NZ-Amin, 2 g/L MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O

pH 7,5

**NZY-Agar**

5 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl, 10 g/L NZ-Amin, 2 g/L MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 1,5% (w/v) Agar-Agar

pH 7,5

**YEPD-Medium**

10 g/L Hefeextrakt, 20 g/L Trypton/Pepton, 20 g/L Glucose (separat autoklaviert, und nach dem Abkühlen zugeben)

pH 6,5

**YEPD-Agar**

10 g/L Hefeextrakt, 20 g/L Trypton/Pepton, 1,5% (w/v) Agar-Agar, 20 g/L Glucose (separat autoklaviert, und nach dem Abkühlen zugeben)

pH 6,5

**YM-Medium**

5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl, 10 g/L Trypton/Pepton

pH 7

**YM-Agar**

5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl, 10 g/L Trypton/Pepton, 1,5% (w/v) Agar-Agar

pH 7

**SGI-Medium [67]**

1 g/L Bactocasamino Acids, 6,7 g/L Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren, 40 mg/L D/L-Tryptophan, 20 g/L Glucose (separat autoklaviert, und nach dem Abkühlen zugeben)

**SGI-Agar [67]**

1 g/L Bactocasamino Acids, 6,7 g/L Yeast Nitrogen Base without Amino acids, 40 mg/L D/L-Tryptophan, 1,5% (w/v) Agar-Agar, 20 g/L Glucose (separat autoklaviert, und nach dem Abkühlen zugeben)

**SGAI-Medium [67]**

1 g/L Bactocasamino Acids, 6,7 g/L Yeast Nitrogen Base without Amino acids, 40 mg/L D/L-Tryptophan, 30 mg/L Adenin, 20 g/L Glucose (separat autoklaviert, und nach dem Abkühlen zugeben)

**SGAI-Agar [67]**

1 g/L Bactocasamino Acids, 6,7 g/L Yeast Nitrogen Base without Amino acids, 40 mg/L D/L-Tryptophan, 30 mg/L Adenin, 1,5% (w/v) Agar-Agar, 20 g/L Glucose (separat autoklaviert, und nach dem Abkühlen zugeben)

**SLI-Medium [67]**

1 g/L Bactocasamino Acids, 6,7 g/L Yeast Nitrogen Base without Amino acids, 40 mg/L D/L-Tryptophan, 20 g/L Galactose (separat autoklaviert, und nach dem Abkühlen zugeben)

**SLI-Agar [67]**

1 g/L Bactocasamino Acids, 6,7 g/L Yeast Nitrogen Base without Amino acids, 40 mg/L D/L-Tryptophan, 1,5% (w/v) Agar-Agar, 20 g/L Galactose (separat autoklaviert, und nach dem Abkühlen zugeben)

**SLAI-Medium [67]**

1 g/L Bactocasamino Acids, 6,7 g/L Yeast Nitrogen Base without Amino acids, 40 mg/L D/L-Tryptophan, 30 mg/L Adenin, 20 g/L Galactose (separat autoklaviert, und nach dem Abkühlen zugeben)

**SLAI-Agar [67]**

1 g/L Bactocasamino Acids, 6,7 g/L Yeast Nitrogen Base without Amino acids, 40 mg/L D/L-Tryptophan, 30 mg/L Adenin, 1,5% (w/v) Agar-Agar, 20 g/L Galactose (separat autoklaviert, und nach dem Abkühlen zugeben)

**OPT-1 Medium [26]**

5 g/L Hefeextrakt, 8 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 g/L NaCl, 0,132 g/L  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$   
4 mM  $\text{MgSO}_4$  (1 M Stammlösung), 1 mL/L Spurenelementlösung (siehe 3.10.7),  
30 g/L Glucose (Stammlösung 500 g/L)  
separat autoklaviert und nach dem Abkühlen zugeben

## 3.10 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen wurden falls notwendig zur Sterilisation 20 min bei 121 °C und 2 bar Überdruck autoklaviert, oder sterilfiltriert (0,2 µm steriler PTFE-Filter). Falls nicht anders beschrieben, erfolgte das Einstellen des pH-Wertes mit 10 M NaOH-Lösung oder 37% HCl-Lösung.

### 3.10.1 *S. cerevisiae* Transformation

**Lithiumacetat Puffer [72]**

100 mM Lithiumacetat, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA  
pH 7,5, sterilfiltriert

**Lithium-PEG Puffer [72]**

40% PEG 4.000 in Lithiumacetat Puffer  
sterilfiltriert, frisch bei Anwendung ansetzen

**TE-Puffer**

10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA  
pH 8, sterilfiltriert

**Heringssperma-DNA-Lösung Stammlösung**

20 mg/mL Heringssperma in TE-Puffer  
50 µL Aliquots ( 150 µg DNA pro Portion), Lagerung -20 °C

### 3.10.2 Antibiotika und Induktionsmittel

#### Chloramphenicol (CA) Stammlösung

34 mg/mL Chloramphenicol in Ethanol. Sterilfiltriert, Lagerung bei -20 °C, 1:1.000 einzusetzen

#### Kanamycin (Kan) Stammlösung

30 mg/mL Kanamycin in ddH<sub>2</sub>O. sterilfiltriert, Lagerung bei -20 °C, 1:1.000 einzusetzen

#### Ampicillin (Amp) Stammlösung

100 mg/mL Ampicillin in ddH<sub>2</sub>O

Sterilfiltriert, Lagerung bei -20 °C, 1:1.000 einzusetzen

#### Aureobasidin A (AbA) Stammlösung

0,5 mg/mL Aureobasidin in Ethanol

Sterilfiltriert, Lagerung bei -20 °C, 1:1.000 einzusetzen

#### Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) Stammlösung

1M IPTG in ddH<sub>2</sub>O

Sterilfiltriert, Lagerung bei -20 °C, 1:1.000 einzusetzen

#### δ-Aminolävulinsäure Stammlösung

65 mg/mL δ-Aminolävulinsäure in ddH<sub>2</sub>O

Sterilfiltriert, Lagerung bei -20 °C, 1:1.000 einzusetzen

### 3.10.3 Agarosegelelektrophorese

#### 50x TAE-Puffer

2 M Tris, 50 mM EDTA, 17,5% (v/v) Essigsäure

#### Agarose Gel

1,5% (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer

Agarose durch Aufkochen in TAE-Puffer lösen, Lagerung bei 60°C

#### Ethidiumbromid-Färbelösung

0,01 mg/mL Ethidiumbromid in 1x TAE-Puffer

#### 5x DNA-Probenauftragungspuffer (loading dye)

0,075 mM Tris, 0,05 mM EDTA, 50% (v/v) Glycerin, 0,025% (w/v) Bromphenolblau, 0,025%

(w/v) Xylencyanol

pH 7,6

### 3.10.4 SDS-Page

#### Ammoniumpersulfat (APS)-Stammlösung

10% (w/v) APS in ddH<sub>2</sub>O, Lagerung bei 4 °C

#### Comassie Färbelösung

0,2% (w/v) Comassie Brilliant Blau G250 und R250, 50% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure

Lösung wurde mindestens 3 h gerührt und anschließend filtriert,

Lagerung lichtgeschützt bei Raumtemperatur

**4x SDS-Trenngelpuffer**

0,8% (w/v) SDS, 1,5 M Tris/HCl  
pH 8,8

**4x SDS-Sammelgelpuffer**

0,8% (w/v) SDS, 0,5 M Tris/HCl  
pH 8,8

**10x SDS-Laufpuffer**

1% (w/v) SDS, 0,25 M Tris, 1,92 M Glycin  
pH 8,5 (pH darf nicht eingestellt werden)

**5x SDS-Probenauftragspuffer**

50% (v/v) Glycerin, 12,5% (v/v) Mercaptoethanol, 7,5% (w/v) SDS, 0,25 M Tris, 0,25 g/L Bromphenolblau  
pH 6,8

**3.10.5 Western Blot****TBS-Puffer**

10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl  
pH 7,5

**TBS-Tween/Triton Puffer**

20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0,05% (w/v) Tween 20, 0,2% (w/v) TritonX-100  
pH 7,5

**Semi-Dry Puffer**

25 mM Tris, 150 mM Glycin, 10% Methanol (v/v)  
pH 8,3 (pH darf nicht eingestellt werden)

**Blocking Puffer**

3,3% (w/v) BSA in TBS-Puffer  
sterilfiltriert

**WB-Puffer A**

100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>  
pH 9,5

**NBT-Stammlösung**

5% (w/v) Nitroblau Tetrazoliumchlorid (NBT) in 70% (v/v) Dimethylformamid  
Lagerung lichtgeschützt, -20 °C

**BCIP Stammlösung**

5% (w/v) 5-Brom-4-Chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) in 70% (v/v) Dimethylformamid  
Lagerung lichtgeschützt, -20 °C

**Antikörperstammlösungen**

Zielkonzentration 0,2 mg/mL des Antikörpers in ddH<sub>2</sub>O  
Aliquotieren, Lagerung -20 °C

**WB-Färbelösung**

66 µL NBT-Stammlösung und 33 µL BCIP-Stammlösung in 10 mL WB-Puffer A verdünnen

### 3.10.6 Zellaufschluss und Mikrosomen-Präparation

#### Spheroplastenpuffer

50 mM Mops, 100 mM KCl, 1 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA), 1 mM Dithiothreitol (DTT)

pH 7,5, Lagerung bei 4 °C

#### Lysozym Stammlösung

0,25 mg/mL Lysozym in ddH<sub>2</sub>O

#### TE-Puffer

50 mM Tris HCl, 2 mM EDTA

pH 7,4

#### TEKM-Puffer

50 mM Tris HCl, 2 mM EDTA, 100 mM KCl, 100 mM Mercaptoethanol

pH 7,4

#### TES-B-Puffer

50 mM Tris HCl, 2 mM EDTA, 0,6 M Sorbitol

pH 7,4

#### TEG-Puffer

50 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, 20% (v/v) Glycerin

pH 7,4

#### Zymolyase Stammlösung

Fertige Lösung 1500 U/mL Zymolyase (G-Biosciences)

#### KP<sub>i</sub>-Puffer pH 7,4

100 mM, pH 7,4

81 mL: 200 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in ddH<sub>2</sub>O

19 mL: 200 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in ddH<sub>2</sub>O

Verdünnen mit 100 mL ddH<sub>2</sub>O

### 3.10.7 Biotransformation mit *C. tropicalis*

#### Spurenelementlösung

0,4 g/L MnSO<sub>4</sub> \*H<sub>2</sub>O;

0,4 g/L ZnSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O;

0,1 g/L KI;

0,5 g/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

0,2 g/L Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O

0,6 g/L FeCl<sub>3</sub>\*6H<sub>2</sub>O

0,04 g/L CuSO<sub>4</sub>\*5H<sub>2</sub>O

#### Glucoselösung

500 g/L Glucose

**Saccharoselösung**

900 g/L

**Base**

- 6 M NaOH
- 2 M NaOH
- 25% (v/v) Ammoniak  
nicht autoklaviert

**Säure**

7% (v/v) Phosphorsäure

**Antischaum**

10% (v/v) Antischaum B

**3.10.8 Aktivitätsassay und CO- Spektrum****KP<sub>i</sub>-Puffer pH 7,4**

100 mM, pH 7,4

81 mL: 200 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in ddH<sub>2</sub>O

19 mL: 200 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in ddH<sub>2</sub>O

Verdünnen mit 100 mL ddH<sub>2</sub>O

**Substrat-Stammlösungen**

Für die Aktivitätsassays wurden FS<sub>10-16</sub> und HS<sub>12+16</sub> als Substrate verwendet.

10 mM Einzel-Substrat gelöst in 5 mL DMSO

10 mM aller gewünschten Substrate gelöst in 5 mL DMSO

**Glucose-6-Phosphat-Stammlösung 40x**

268 mM Glucose-6-Phosphat in ddH<sub>2</sub>O

**Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase Stammlösung**

250 U/mL gelöst in ddH<sub>2</sub>O

**NADPH-Stammlösung 33,33x**

33,33 mM in ddH<sub>2</sub>O

Jeweils frisch angesetzt

**KP<sub>i</sub>-Puffer pH 8**

1,3 M, pH 8

94,7 mL: 1,3 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in ddH<sub>2</sub>O

5,3 mL: 1,3 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in ddH<sub>2</sub>O

**3.10.9 Lösungen zur Analyse der C12 Oxidationsprodukte****Standard-Stammlösungen**

LSME, OS12, OSME12, DSME12 und HSME12

5 mM in Acetonitril

LS, HS12 und DDS

5 mM in Acetonitril/ddH<sub>2</sub>O im Verhältnis 1:1

**Eluent A**

0,1% (v/v) Ameisensäure in ddH<sub>2</sub>O

**Eluent B**

0,1% (v/v) Ameisensäure in Acetonitril

**3.10.10 Lösungen zur Analyse der C10-16 Oxidationsprodukte****Standard-Stammlösungen**

FS13-16, HS16, OS12

1 mM in Acetonitril

FS10-12, HS10+12, DS10+12+14

1 mM in Acetonitril/ddH<sub>2</sub>O im Verhältnis 1:1

**Eluent A**

0,1% (v/v) Ameisensäure in ddH<sub>2</sub>O

**Eluent B**

0,1% (v/v) Ameisensäure in Acetonitril

**3.10.11 Lösungen zur Analyse der Biotransformationsprodukte mittels GC/FID****Standard-Stammlösungen**

LSME, LS, HSME12, HS12, OSME12, OS12, DSME12 und DDS

50 mM in Pyridin

**3.10.12 Dünnschichtchromatografie****Standard-Stammlösungen DC**

LSME, LS, und DDS

50 mM in Pyridin

**Mobile Phase**

1% (v/v) Essigsäure in Ethylacetat

**Detektionslösung**

7.5 g/L KMnO<sub>4</sub>, 50 g/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.15% (w/v) NaOH in ddH<sub>2</sub>O

## 4 Methoden

### 4.1 Mikrobiologische Methoden

#### 4.1.1 Bestimmung der optischen Dichte von Zellsuspensionen

Die optische Dichte wurde mittels Plastikküvetten bei 600 nm vermessen (Thermofischer Scientific, Multiscan Spectrum). Als Blank diente das entsprechend verwendete Nährmedium, wobei 1 mL einer geeigneten Verdünnung (maximal OD<sub>600</sub> von 1) der Zellsuspension vermessen wurde.

#### 4.1.2 Anzucht und Lagerung von *E. coli*, *S. cerevisiae* und *C. tropicalis* Stämmen

##### *E. coli*:

Wenn nicht anders beschrieben, wurden alle verwendeten *E. coli* Stämme bei 37 °C und bei 150 rpm auf einem Rotationsschüttler (Thermo Fischer Scientific, MaxQ 2.000) kultiviert. Die Anzucht erfolgte in LB-Medium (3.9 Nährmedien), wobei für plasmidtragende Stämme das entsprechende Antibiotikum aus einer tausendfach konzentrierten Lösung zugegeben wurde. Zur Herstellung von kompetenten Zellen, Proteinexpressionen und anderen zellbasierten Experimenten wurde die Zellsuspension auf LB-Agarplatten, die falls benötigt das entsprechende Antibiotikum enthielten, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde eine Vorkultur mit einer Einzelkolonie inokuliert. Zur kurzzeitigen Lagerung von *E. coli* Stämmen wurden die Platten oder Suspensionen mit Parafilm verschlossen und bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Zur dauerhaften Lagerung wurden Flüssigkulturen einer über Nacht- Kultivierung bei einer Endkonzentration von 30% (w/v) Glycerin in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

##### *S. cerevisiae*:

Wenn nicht anders beschrieben, wurden alle verwendeten *S. cerevisiae* Stämme bei 30 °C und bei 150 rpm auf einem Rotationsschüttler (Thermo Fischer Scientific, MaxQ 2.000) angezogen. Die Anzucht erfolgte in YPD-Medium (3.9 Nährmedien), wobei zu plasmidtragenden Stämmen das entsprechende Antibiotikum aus einer tausendfach konzentrierten Lösung zugegeben wurde. Zur Herstellung von kompetenten Zellen, Genexpressionen und anderen zellbasierten Experimenten wurde die Zellsuspension entweder auf YPD-Agarplatten, oder dem erforderlichen Selektionsmedium für die auxotrophen Stämme, oder mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Daraufhin wurde eine Vorkultur im entsprechenden Medium mit einer Einzelkolonie inokuliert. Zur kurzzeitigen Lagerung von *S. cerevisiae* Stämmen wurden die Platten oder Suspensionen mit Parafilm verschlossen und bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Zur dauerhaften Lagerung wurden über Nacht-Flüssigkulturen bei einer Endkonzentration von 30% (w/v) Glycerin in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

##### *C. tropicalis*:

Wenn nicht anders beschrieben, wurde der verwendete *C. tropicalis* Stamm bei 30 °C und bei 150 rpm auf einem Rotationsschüttler (Thermo Fischer Scientific, MaxQ 2.000) angezogen. Die Anzucht erfolgte

in YM-Medium (3.9 Nährmedien). Zur Durchführung der Biotransformationsexperimente wurde die Zellsuspension auf YM-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Daraufhin wurde eine Vorkultur mit einer Einzelkolonie inokuliert. Zur kurzzeitigen Lagerung des *C. tropicalis* Stammes wurden die Platten oder Suspensionen mit Parafilm verschlossen und bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Zur dauerhaften Lagerung wurden über Nacht-Flüssigkulturen bei einer Endkonzentration von 30% (w/v) Glycerin in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

#### 4.1.3 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen zur Elektrotransformation

Ausgehend von einem Glycerin-Stock wurde eine Einzelkolonie des gewünschten *E. coli* Stammes verwendet, um eine 5 mL Vorkultur LB-low-Medium zu beimpfen. Nach einer Übernacht Kultivierung bei 37 °C und 150 rpm wurden mit der Vorkultur 100 mL LB-low-Medium für die Hauptkultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 beimpft. Die Hauptkultur wurde bei 37 °C und 150 rpm inkubiert bis eine OD<sub>600</sub> von 0,5 - 0,6 erreicht wurde. Danach wurde die Kultur für 15 min auf Eis abgekühlt, in zwei 50 mL Falcon Tubes überführt und abzentrifugiert (Sorvall RC 6+ Centrifuge mit SH-3.000 Rotor, 3.500 g, 15 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde jeweils in 10 mL ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Anschließend wurden die Röhren auf 50 mL mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Nach dreimaligem, vorsichtigem Invertieren wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (Sorvall RC 6+ Centrifuge mit SH-3.000 Rotor, 3.500 g, 15 min, 4 °C) und jeweils in 10 mL 10% (v/v) Glycerin resuspendiert. Anschließend wurden die Röhren erneut mit 10% (v/v) Glycerin auf 50 mL aufgefüllt. Nach erneutem Invertieren wurden die Zellen ein letztes Mal abzentrifugiert (Sorvall RC 6+ Centrifuge mit SH-3.000 Rotor, 3.500 g, 15 min, 4 °C) und insgesamt in 300 µL 10% (v/v) Glycerin vereinigt und resuspendiert. Die optische Dichte dieser Suspension wurde dann mit 10% (v/v) Glycerin auf einen Wert von 50 eingestellt. Die kompetenten Zellen wurden in einem Volumen von 70 µL in sterile 1,5 mL Reaktionsgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

#### 4.1.4 Transformation von elektrokompetenten *E. coli* Zellen

Für die Transformation eines auf Eis aufgetauten Aliquots (70 µL) kompetenter *E. coli* Zellen wurden entweder 1,5 µL an Plasmid oder bis zu 5 µL Ligationsansatz eingesetzt. Die eingesetzte DNA-Menge betrug 10-150 ng. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz in eine Elektroporationsküvette (1 mm Spaltbreite) überführt. Nach dem elektrischen Puls (1,8 kV, 1 Puls für 5 ms) im Elektroporator (Bio-Rad Laboratories GmbH, Micropulser™) wurden die Zellen sofort in 900 µL SOC-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Danach wurden geeignete Verdünnungen (von 1:50 bis zu 1:200) der Zellsuspension hergestellt, je 100 µL auf Selektivagar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die erhaltenen Klone ausgezählt.

#### 4.1.5 Transformation von *S. cerevisiae* Zellen

Zur Anzucht der *S. cerevisiae* Stämme GRF18 und AH22 wurden YPD-Medium und YPD-Agarplatten verwendet. Bei den Stämmen W(R) und WAT11 wurden SGAI-Medium und SGAI-Agarplatten verwendet. Die Transformationsmethode wurde abgewandelt nach Gietz et al. durchgeführt [72, 73].

Mit einer Einzelkolonie wurden 10 mL des passenden Nährmediums im Schüttelkolben angeimpft und bei 30 °C und 150 rpm über Nacht inkubiert. Für die Hauptkultur wurden 50 mL des entsprechenden Mediums mit 500 µL der Vorkultur beimpft (Verhältnis 1:100) und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1-2 bei 30 °C und 150 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 1.000 g für 5 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes, wurde das Pellet in 10 mL Lithium-Acetat Puffer resuspendiert und erneut bei 1.000 g für 5 min zentrifugiert. Die Zellen wurden in der entsprechenden Lithiumacetat Puffer Menge resuspendiert, damit die resultierende OD<sub>600</sub> 150 betrug. Pro Transformationsansatz wurden 100 µL Zellsuspension in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben und bei 30 °C 1 h inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubationszeit wurden 5 µg Plasmid-DNA und 150 µg Heringssperma-DNA (Stammlösung zuvor 5 min aufgekocht bei 95 °C und auf Eis wieder abgekühlt) und 850 µL des Lithium-PEG Puffers zugegeben und vorsichtig vermischt. Darauf folgte eine 30 minütige Inkubation bei 30 °C, danach ein 15 minütiger Hitzeschock bei 42 °C und eine 10 minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die Ansätze wurden im Anschluss bei 10.000 rpm zentrifugiert, in steriler 100 µL 0,9%iger Kochsalzlösung resuspendiert und auf Selektionsplatten (GRF18 und AH22 auf YPD + Aureobasidin; W(R) und WAT11 auf SGI-Platten) ausplattiert und bei 30 °C inkubiert. Erfolgreich transformierte Kolonien wurden nach drei bis vier Tagen sichtbar.

#### 4.1.6 Rekombinante Proteinexpression mit *E. coli*

Zur Proteinexpression der rekombinanten Gensequenzen wurden die unter 3.6 beschriebenen *E. coli* Stämme, sowie die unter 3.9 aufgeführten Nährmedien verwendet. Falls notwendig wurde dem Medium das erforderliche Antibiotikum zugesetzt. Die verwendeten Zellen wurden zuvor durch die unter 4.1.4 beschriebene Methode mit dem gewünschten Vektorkonstrukt transformiert.

Bei allen Expressionsvarianten wurden zunächst 10 mL Medium (je nach Expressionssystem, siehe **Tab. 4.1-1**) mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C und 150 rpm im Schüttelkolben inkubiert. Die Hauptkultur wurde auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 mit der Vorkultur beimpft und zunächst 4 h bei der angestrebten Expressionstemperatur (siehe **Tab. 4.1-2**) und 150 rpm inkubiert. Daraufhin erfolgte die Induktion mittels Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) (Konzentrationen siehe **Tab. 4.1-1**). Zusätzlich wurde den Kulturen die Häm-Vorstufe δ-Aminolävulinsäure in einer finalen Konzentration von 65 mg/L parallel zur Induktion zugegeben, um eine erfolgreiche Expression zu unterstützen. **Tab. 4.1-1** können alle durchgeführten bakteriellen Expressionsvarianten entnommen werden.

**Tab. 4.1-1: Übersicht über Expressionsbedingungen im *E. coli* System**

Expressions-system	Medium	Expressions-temperatur	Induktion	Durchmischung	Sonstiges
JM 109 + pCWOri+	Inkubation über Nacht in LB <sub>Amp</sub> ; danach TB <sub>Amp</sub>	22 °C 30 °C 16 °C	1 mM	150 rpm Schüttelkolben (mit und ohne Schikanen)	65 mg/L δ-Aminolävulinsäure parallel zur Induktion; Expression über 48 h, 16 °C Expression über 72 h
BL21DE3 + pACYC-Duet-CPR	Inkubation über Nacht in LB <sub>CA</sub> ; danach TB <sub>CA</sub>	22 °C	1 mM 0,5 mM	150 rpm Schüttelkolben (mit und ohne Schikanen)	65 mg/L δ-Aminolävulinsäure parallel zur Induktion; Expression über 48 h
TunerDE3 + pACYC-Duet-CPR	Inkubation über Nacht in LB <sub>CA</sub> ; danach TB <sub>CA</sub>	22 °C 30 °C	0,3 mM 0,1 mM	150 rpm Schüttelkolben (mit und ohne Schikanen)	65 mg/L δ-Aminolävulinsäure parallel zur Induktion; Expression über 48 h

#### 4.1.7 Rekombinante Proteinexpression mit *S. cerevisiae*

Zur rekombinanten Proteinexpression der Gensequenzen wurden die unter 3.6 beschriebenen *S. cerevisiae* Stämme, sowie die unter 3.9 aufgeführten Nährmedien verwendet. Falls notwendig, wurde dem Medium das erforderliche Antibiotikum zugesetzt. Die verwendeten Zellen wurden zuvor durch die unter 4.1.5 beschriebene Methode mit dem gewünschten Vektorkonstrukt transformiert.

Bei allen Expressionsvarianten wurden zunächst 10 mL Medium (je nach Expressionssystem, siehe **Tab. 4.1-2**) mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 30 °C und 150 rpm im Schüttelkolben inkubiert. Die Hauptkultur wurde auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 mit der Vorkultur beimpft und bei verschiedenen Temperaturen (siehe **Tab. 4.1-2**) und 150 rpm inkubiert. Teilweise wurde den Kulturen δ-Aminolävulinsäure in einer finalen Konzentration von 65 mg/L zugegeben, um eine induzierte Expression hervorzurufen. **Tab 4.1-2** können alle durchgeführten Expressionsvarianten in den *S. cerevisiae* Systemen entnommen werden.

**Tab. 4.1-2: Übersicht über Expressionsbedingungen in den *S. cerevisiae* Systemen**

Expressions-system	Medium	Expressions-temperatur	Induktion	Durchmischung	Sonstiges
GRF18 + pAUR123	Vor- und Hauptkultur in YPD <sub>AbA</sub>	30 °C	keine	150 rpm Schüttelkolben (mit und ohne Schikanen)	Mit und ohne 65 mg/L δ-Aminolävulinsäure , Expression über ca. 48 h
GRF18 + pAUR123	Vor- und Hauptkultur in YPD <sub>AbA</sub>	30 °C	keine	150 rpm Schüttelkolben (mit und ohne Schikanen)	Mit und ohne 65 mg/L δ-Aminolävulinsäure , Expression über ca. 48 h,
WAT11 + pYedP60 W (R) + pYedP60	Vorkultur in SGI, Hauptkultur in SLI	30 °C 28 °C	Galactose in SLI enthalten	150 rpm Schüttelkolben (mit und ohne Schikanen)	Mit und ohne 65 mg/L δ-Aminolävulinsäure , Expression über ca. 48 h

## 4.2 Molekularbiologische Methoden

### 4.2.1 Isolierung und Reinigung von Plasmid DNA aus *E. coli*

Zur Plasmid-DNA Isolierung und Reinigung aus *E. coli* wurde das GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fischer Scientific) verwendet. Die Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben, wobei 2 – 10 mL einer frischen über Nacht Kultur verwendet wurden. Die Plasmid-Präparation wurde mit Wasser eluiert und anschließend bei -20 °C gelagert.

### 4.2.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt (Implen, Nanophotometer). Dazu wurde ein Probenvolumen von 1 µL verwendet. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz entspricht eine Extinktion von 1,0 bei 260 nm und einer Schichtdicke von  $d = 1$  cm einer dsDNA-Konzentration von 50 µg/mL. Eine DNA-Lösung gilt als rein, wenn sie keine Extinktion oberhalb von 300 nm und einen Quotienten aus  $A_{260}/A_{280}$  von mindestens 1,8 aufweist.

### 4.2.3 Amplifikation von DNA mittels PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht die enzymatische Vervielfältigung auch kleinster Mengen von DNA-Fragmenten *in vitro* [74]. Die Anlagerungstemperatur der verwendeten Primerpaare wurde sowohl beim Design (mittels der Software Clonemanager) als auch bei der Gestaltung des jeweiligen PCR-Programms berücksichtigt. Dabei wurden ähnliche Schmelztemperaturen des Primerpaares angestrebt und die Anlagerungstemperatur nicht zu niedrig angesetzt um eine unspezifische Amplifikation gering zu halten.

**Klonierungen:**

Für die während dieser Arbeit durchgeführten Klonierungen wurde die Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Das Standardvolumen betrug dabei 50 µL. Der Ansatz enthielt 50-100 ng Template DNA, 500 pM Primer (jeweils sense und antisense), 200 µM Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) (jeweils dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1 Unit DNA-Polymerase und 1x Phusion™ HF-Reaktionspuffer (enthält 1,5mM MgCl<sub>2</sub>). **Tab. 4.2-1** zeigt beispielhaft die typischen PCR-Bedingungen.

**Tab. 4.2-1: Übersicht PCR Ablauf für Klonierungsansätze**

PCR-Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	3 min	1x
Denaturierung	98 °C	30 s	
Annealing	57 °C	25 s	30-33x
Extension	72 °C	70 s	
Finale Extension	72 °C	5 min	1x
Abkühlung	12 °C	∞	

**Kolonie-PCR:**

Um die Vektoren in transformierten *E. coli* und *S. cerevisiae* Zellen auf korrekte Insertion des klonierten DNA-Fragmentes zu überprüfen, wurde ein Insert-Screening mittels Kolonie-PCR durchgeführt. Dafür wurde von den auf Selektivagar gewachsenen Einzelkolonien jeweils eine geringe Menge mit einer Pipettenspitze abgenommen und dem PCR-Ansatz hinzugefügt. Als Primer wurden genspezifische Primer (CPR, CYP52A5, CYP52A13, CYP52A17 und CYP78A1) und genflankierende Primer (alle anderen ausgewählten CYPs) eingesetzt und die Taq DNA-Polymerase (Rapidozym GmbH) verwendet. Als Kontrolle dienten einerseits der verwendete jeweilige Vektor ohne Insert und andererseits ein Ansatz ohne Templat. Das Volumen des Ansatzes betrug jeweils 20 µL. Im Ansatz befanden sich 500 pM beider Primer, 200 µM jedes dNTPs, 1x Taq DNA-Polymerase Puffer und 0,5 U Taq DNA-Polymerase (Rapidozym GmbH). **Tab. 4.2-2** zeigt beispielhaft die typischen PCR-Bedingungen.

**Tab. 4.2-2: Übersicht PCR Ablauf für Kolonie-PCR**

PCR-Phase	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1x
Denaturierung	95 °C	30 s	
Annealing	57 °C	25 s	30-33x
Extension	72 °C	105 s	
Finale Extension	72 °C	5 min	1x
Abkühlung	12 °C	∞	

#### 4.2.4 Agarosegelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend deren Länge erfolgte in 1,5% (w/v) Agarosegelen. Zur Herstellung der Gele wurde die Agarose-Lösung in Gelkammern mit für das Probenvolumen passenden Taschenkämmen gegossen. Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden in Probenpuffer auf eine 1x-Probenpuffer-Endkonzentration eingestellt. Danach wurden sie in die Gel-taschen gegeben und anschließend die Gelelektrophorese bei einer Spannung von 110 Volt für 25 min durchgeführt. Die Auftrennung wurde nach Anfärben der Nukleinsäuren für 10 min in einem Ethidiumbromid-Färbebad und anschließendem Entfärben für ca. 15 min in TAE-Puffer durch Fluoreszenz im UV-Licht (Wellenlänge 302 nm) sichtbar gemacht und mit Hilfe der Geldokumentationsanlage (INTAS, Gel iX Imager) dokumentiert. Als Größenstandard diente der 2-log DNA Ladder der Firma New England Biolabs GmbH.

#### 4.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten

Nach der elektrophoretischen Trennung wurden die gewünschten, unter UV-Licht der Wellenlänge 302 nm sichtbar gemachten DNA-Fragmente mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden anschließend in 2 mL Reaktionsgefäße überführt. Die Extraktion der DNA erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kits (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers. Die so isolierte DNA wurde in 50 µL ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

#### 4.2.6 Restriktionsverdau von dsDNA-Molekülen mit Restriktionsendonukleasen

Die spezifische Spaltung von dsDNA-Molekülen erfolgte je nach Konstrukt mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen (siehe 3.7). Nach dem Verdau durch die entsprechenden Restriktionsenzyme entstanden einzelsträngige Überhänge der dsDNA-Moleküle, sogenannte sticky-ends. Für den analytischen Verdau wurde 1 µg DNA zusammen mit 10-20 Units Enzym 1 h bei 37 °C inkubiert und danach hitzeinaktiviert (laut Herstellerangaben für das verwendete Enzym). Für einen präparativen Verdau zur späteren Ligation wurden 2-5 µg DNA eingesetzt und die notwendigen Enzymmengen entsprechend der Anzahl der auf der Test-DNA vorhandenen Restriktionsschnittstellen, die vom Hersteller angegeben sind, nach folgender Formel angepasst:

$$U_{\text{Verdau}} = \frac{BP_{\text{Assay-DNA}}}{S_{\text{Assay-DNA}}} * \frac{S_{\text{Insert-DNA}}}{BP_{\text{Insert-DNA}}} * m_{\text{DNA}} * f / t \quad (1)$$

$BP_{\text{Assay-DNA}}$ :	Anzahl an Basenpaaren der Assay-DNA laut Hersteller
$S_{\text{Assay-DNA}}$ :	Anzahl an Schnittstellen des einzusetzenden Restriktionsenzym auf der Assay-DNA
$BP_{\text{Insert-DNA}}$ :	Anzahl an Basenpaaren der eingesetzten DNA pro DNA-Molekül
$S_{\text{Insert-DNA}}$ :	Anzahl an Schnittstellen des einzusetzenden Restriktionsenzym auf der Insert-DNA
$m_{\text{DNA}}$ :	eingesetzte DNA-Menge in µg
$f$ :	Skalierungsfaktor zur Berechnung des $f$ -fachen Überschusses an Restriktionsenzym
$t$ :	Inkubationszeit des Restriktionsverdaus

Die Restriktionsenzyme wurden mit einem Maximalvolumen von 10% (v/v) des Gesamtvolumens des Restriktionsansatzes eingesetzt, da die glycerinhaltige Lösung in der die Enzyme gelagert werden deren Aktivität negativ beeinflussen kann. Zur Einstellung der optimalen Bedingungen für den Restriktionsverdau, wurden die vom Hersteller empfohlenen und mitgelieferten Puffer verwendet. Die nach dem Verdau erhaltenen Fragmente wurden mit Hilfe von Agarosegelelektrophorese analysiert (4.2.4) und für die Ligationsreaktion aus dem Gel (4.2.5) aufgereinigt.

#### 4.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Vektor und DNA-Fragment wurden in einem molaren Verhältnis von 1:3 gemischt, nachdem die absolut benötigten Volumina mit Hilfe der folgenden Formel berechnet wurden (verändert nach Heckman and Pease [75]).

$$c(\text{Insert})[\text{ng}/\mu\text{L}] = 3 * \left( \frac{\text{Insertgröße [kb]}}{\text{Vektorgröße [kb]}} * c(\text{Vektor}) \right) [\text{ng}/\text{L}] \quad (2)$$

$c(\text{Insert})$ :      *Konzentration der Insert-DNA*

$c(\text{Vektor})$ :     *Konzentration der Vektor-DNA*

Die Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu\text{L}$  mit 1 U T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) über Nacht bei 16 °C im entsprechenden Ligase-Puffer. Danach wurden kompetente *E. coli* Zellen (bevorzugt XL10 gold) mit 5  $\mu\text{L}$  aus dem Ansatz elektrisch transformiert.

## 4.3 Proteinchemische Methoden

### 4.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde nach dem von Laemmli etablierten Protokoll durchgeführt [76]. Die verwendeten Puffer und Lösungen sind unter 3.10.4 aufgeführt. **Tab. 4.3-1** zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Gele, die mit Hilfe der Mini-Protean®3 Multi-Casting Chamber (Bio-Rad Laboratories GmbH) hergestellt wurden.

**Tab. 4.3-1: Übersicht über SDS-Gel Komponenten für 14 Gele**

	80 mL Trenngel (12%)	40 mL Sammelgel (5%)
Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung 30% (w/v)	24 mL	5,2 mL
Puffer (Trenn-/Sammelgel)	20 mL	10mL
ddH <sub>2</sub> O	34,32 mL	23,96 mL
SDS (10% (w/v))	800 µL	400 µL
APS (10% (w/v))	800 µL	400 µL
Polymerisationsstart durch:		
TEMED	80 µL	40 µL

Proben wurden 1:5 mit 5x SDS-PAGE Probenpuffer verdünnt, 5 min bei 95 °C inkubiert und kurz zentrifugiert (Thermo Fischer Scientific Heraeus, Fresco 21 Centrifuge, 21.000 g, 10 s). Als Größenstandard wurde der PageRuler unstained Protein Ladder (Fermentas) verwendet. Die Geltaschen wurde mit jeweils 10 µL Probe gefüllt und anschließend wurde die Elektrophorese bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA pro SDS-Gel für ca. 50 Minuten (Bio-Rad Laboratories GmbH, Mini-PROTEAN Tetra Cell) durchgeführt. Anschließend wurden die Gele mit Coomassie-Färbelösung 15 min gefärbt und zur anschließenden Entfärbung in ddH<sub>2</sub>O in einer Mikrowelle kurz aufgeköcht. Durch leichtes Schütteln auf dem Vertikalschüttler löst sich der überschüssige Farbstoff aus dem SDS-Gel und kann so durch ein dem Wasser beigefügten Papiertuch aus der Lösung aufgenommen werden. Bei Bedarf wurde die Entfärbeprozedur mehrmals wiederholt.

### 4.3.2 Western Blot

Um die exprimierten Proteine selektiv und sensitiv nachweisen zu können, wurde ein Western Blot durchgeführt. Bei dieser Methode werden die durch SDS-Page getrennten Proteine durch elektrischen Fluss auf eine Membran übertagen und per Antikörper (AK) gekoppeltem Nachweis sichtbar gemacht. Als primärer AK wurden Anti-His-AK verwendet, die spezifisch an einen vorhandenen His-Tag binden. Als Nachweis dient eine Farbreaktion, katalysiert durch alkalische Phosphatase. Dadurch, dass diese Enzyme durch die AK spezifisch an der gesuchten Proteinbande gebunden sind, färbt sich nur diese deutlich dunkel violett. Das Blotting der Proteine wurde im Semi-Dry-Verfahren durchgeführt. Zum Blotting wurde eine PVDF-Membran (Hybond-P 300 mm x 3 m, Porengröße 0,45 µm, GE-Healthcare)

und extra dickes Filterpapier (GB005 Gel Blotting Paper, GE Healthcare Whatman) verwendet. Die benötigten Antikörper sind unter 3.2 aufgeführt, die verwendeten Lösungen und Puffer unter 3.10.5. Zunächst wurde eine SDS-Page der gewünschten Proben durchgeführt wie unter 4.3.1 beschrieben, allerdings wurde als Größenstandard der Prestained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Scientific) verwendet. Parallel wurden vier Filterpapiere und die Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten und für das Blotten vorbereitet. Dazu musste die Membran zunächst 10 min in 100% Methanol und anschließend 10 min in ddH<sub>2</sub>O equilibriert werden. Danach wurden Membran und Filterpapiere für 10 - 30 min in Semi-dry Puffer inkubiert. Zum Blotten wurden zwei Filterpapiere auf der Kathode der Transferapparatur platziert, darauf die Membran, gefolgt vom SDS-Gel und den zwei restlichen Filterpapieren. Beim Schichten der Komponenten dürfen keine Luftblasen eingeschlossen werden. Der Transfer wurde bei 25 V für etwa 25 min durchgeführt, wobei anhand des farbigen Markers der Fortschritt des Transfers kontrolliert werden kann.

Zur Immundetektion wurden mehrere aufeinanderfolgende Schritte durchgeführt. Zuerst wurde die Membran 2x mit TBS-Puffer bei RT für jeweils 10 min gewaschen. Danach folgte eine einstündige Inkubation bei RT in Blocking-Puffer. Nach zweimaligem Waschen in TBS-Tween/Triton Puffer (RT, je 10 min) und einmaligem Waschen in TBS-Puffer (RT, 10 min) folgt die Inkubation mit dem primären AK (Antikörperstammlösung Anti-His-AK 1:1.000 in Blocking-Puffer verdünnt, 1 h, RT). Darauf folgte die gleiche Abfolge von Waschrissen wie zuvor (2x 10 min TBS-Tween/Triton Puffer, 1x 10min TBS-Puffer) und die Inkubation mit dem sekundären AK (Antikörperstammlösung Anti-Mouse-AK 1:1.000 in Blocking-Puffer verdünnt, 1 h, RT). Nach vier darauffolgenden Waschrissen in TBS-Tween/Triton Puffer (je 10 min, RT) wurde die Membran 5-15 min in der WB-Färbelösung inkubiert. Die Membran sollte dabei vor Licht geschützt sein und während der Inkubationsdauer nicht bewegt werden. Nach ausreichender Färbung wird die Membran 2x mit ddH<sub>2</sub>O (10 min, RT) gewaschen und kann anschließend nach dem Trocknen dokumentiert werden.

### 4.3.3 Zellaufschluss

Je nach Experiment wurden geeignete Mengen der gewünschten Expressionskultur verwendet. Die verwendeten Lösungen und Puffer sind unter 3.10.6 aufgeführt.

#### **Aufschluss durch Lysozym-Verdau und Sonifikation (*E. coli* und *S. cerevisiae*)**

Die verwendete Methode wurde angelehnt an Barnes et al. [77]. Die gewünschte Menge Zellen wurde zunächst mittels Zentrifugation pelletiert und mit einem äquivalenten Volumen Spheroblasten-Puffer einmal gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen in einem Zwanzigstel des ursprünglichen Kulturvolumens im gleichen Puffer resuspendiert und 300 µL wurden in 1,5 mL Reaktionsgefäße aliquotiert. Zum Verdau der Zellwand wurde Lysozym in einer finalen Konzentration von 0,2 mg/mL eingesetzt (Inkubation 30 min auf Eis). Die resultierenden Spheroblasten wurden danach durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Dazu wurde die Sonotrode „VialTweeter“ (Hielscher Ultrasonics GmbH) verwendet, mit der es möglich ist Proben in 1,5 mL Reaktionsgefäßen mit Ultraschall zu behandeln. Die Proben werden jeweils 2x 45 s bei einer Leistung von 100% behandelt, dazwischen wurden die Proben mindestens 45 s auf Eis gekühlt. Um Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen zu entfernen wurden die aufgeschlossenen Proben bei 1.200 g, 4 °C für 10 min zentrifugiert.

### **Aufschluss mittels Glaskugeln (*S. cerevisiae*)**

Die verwendete Methode wurde angelehnt an Pompon et al. und Akiyama et al. [67, 78]. Die gewünschte Menge Zellen wurde zunächst in zuvor gewogenen Falcons pelletiert (4.100 g, 4 °C, 10 min) und mit 50 mL TE-Puffer einmal gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen in TEKM-Puffer resuspendiert (Zielkonzentration feuchter Zellen von 0,5 g/mL) und 10 min bei RT inkubiert. Nach erneutem Pelletieren (7.000 g, 4 °C, 10 min) wurden die Zellen in 4 °C kalten TES-B-Puffer resuspendiert (Zielkonzentration feuchter Zellen von 0,3 g/mL). Das Falcon wurde bis zum Erreichen der Flüssigkeitskante mit gekühlten (4 °C) sterilen Glaskugeln (Durchmesser 1 mm) befüllt und anschließend bei 4 °C Umgebungstemperatur 5 min auf höchster Stufe gevortext. Der Überstand wurde so weit möglich mit der Pipette abgenommen und in ein weiteres Falcon überführt. Die Glaskugeln wurden zweimal mit TES-B-Puffer gewaschen (Volumen äquivalent zum vorherigen Resuspendieren der Zellen), wobei der Überstand mit den vorherigen zusammengeführt wurde. Der Ansatz wurde jeweils kurz anzentrifugiert (30 s 1.000 g), um die Abnahme des Überstandes zu erleichtern. Um Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen zu entfernen wurde der Überstand aus den aufgeschlossenen Proben bei 1.200 g, 4 °C für 10 min zentrifugiert.

### **Aufschluss durch Zymolyase-Verdau und Glaskugeln (*S. cerevisiae*)**

Die verwendete Methode wurde angelehnt an Pompon et al. und Akiyama et al. [67, 78]. Zunächst wurden 20 mL der gewünschten Kultur in zuvor gewogenen Falcons pelletiert (4.100 g, 4 °C, 10 min) und mit 20 mL TE-Puffer einmal gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen in 1 mL TES-B-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 15 Units Zymolyase folgte eine einstündige Inkubation (37 °C, 150 rpm). Zum Pelletieren der resultierenden Spheroblasten folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (3.000 g, 4 °C, 10 min), welcher nach einem Waschschrift mit TES-B-Puffer (1 mL) wiederholt wurde. Nach anschließendem Resuspendieren in 700 µL TEG-Puffer wurden die Spheroblasten in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt und bis zum Erreichen der Flüssigkeitskante mit gekühlten (4 °C) sterilen Glaskugeln (Durchmesser 1 mm) befüllt und anschließend bei 4 °C Umgebungstemperatur 5 min auf höchster Stufe gevortext. Nach Abnahme des Aufschlussüberstandes wurden die Kugeln einmal mit 700 µL TEG-Puffer gewaschen. Aufschlussüberstand und der Überstand des Waschschriftes werden vereinigt und bei 1.200 g, 4 °C für 10 min zentrifugiert, um Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen zu entfernen.

### **Zellaufschluss im Hochdruckhomogenisator**

Der Hochdruckzellaufschluss wurde unter Verwendung eines „One Shot“ – Systems zum Aufschluss von Probenvolumina zwischen 2 und 10 mL durchgeführt (IUL Systems). Die Zellen wurden dabei nach dem Prinzip der Hochdruckentspannung aufgeschlossen. Mindestens 2 h vor Verwendung des Geräts wurde die Aufschlussapparatur (Kopfraum) bei 4 °C gekühlt. Die Zellen wurden in  $KP_1$ -Puffer vollständig (keinerlei sichtbaren Zellagglomerate) resuspendiert. Nach dem Zusammensetzen der Apparatur wurde die Zellsuspension einmal bei 2,49 kbar aufgeschlossen und in 50 ml Falcons überführt. Zwischen den unterschiedlichen Proben wurden die Aufschlussapparatur dreimal mit ddH<sub>2</sub>O (ca. 30 mL) gespült. Sowohl Zellsuspension als auch Zellaufschluss wurden soweit möglich auf Eis gelagert. Zellfragmente und unlösliche Bestandteile wurden anschließend durch Zentrifugation (1.200 g, 4 °C für 10 min) abgetrennt. Das Gerät wurde zur Reinigung mit 0,1 mM NaOH und ddH<sub>2</sub>O gespült.

### **4.3.4 Mikrosomen-Präparation**

Die Isolierung der Mikrosomen wurde in Anlehnung an Pompon et al durchgeführt [67]. Die verwendeten Puffer und Lösungen sind unter 3.10.6 aufgeführt. Der Isolierung der Mikrosomen folgte auf den Zellaufschluss (siehe 4.3.3) und es wurde jeweils der von Zelltrümmern und intakten Zellen befreite Überstand verwendet.

#### **Mikrosomen-Präparation durch Ultrazentrifugation**

Nach dem Zellaufschluss wurden je 400 µL des resultierenden Überstandes in Ultrazentrifugationsröhrchen (Beckmann Coulter) überführt. Dabei konnten pro Lauf 4x 400 µL Proben behandelt werden. Nach exaktem Austarieren wurden die Proben 60 min, bei RT und 100.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in TEG-Puffer resuspendiert.

#### **Mikrosomen-Präparation durch PEG-Fällung**

Zur Fällung der Mikrosomen wird dem Zellaufschlussüberstand NaCl und PEG 4.000 zugesetzt (finale Konzentration NaCl 0,15 M, PEG 4.000 0,1 mg/mL). Nach Inkubation (15 min auf Eis), werden die Ansätze zentrifugiert (10.000 g, 10 min, 4 °C). Das Pellet wurde im kleinstmöglichen Volumen TEG-Puffer resuspendiert.

## 4.4 Methoden zur Biotransformation mittels *C. tropicalis*

Bei den durchgeführten Biotransformationsexperimenten wurde der *C. tropicalis* Stamm ATCC 20962 verwendet (siehe 3.6). Alle verwendeten Nährmedien sind unter 3.9 aufgeführt.

### 4.4.1 Kultivierung im Schüttelkolben

Zunächst wurden Einzelkolonien des verwendeten *C. tropicalis* Stamms durch Ausstriche einer entsprechenden Kryokultur auf YM-Platten (Inkubation mind. 12 h, 30 °C) generiert. Mit einer solchen Einzelkolonie wurde die Vorkultur (200 mL YM-Medium in einem 1 L Schikanekolben) beimpft und bei 30 °C und 150 rpm über Nacht inkubiert.

### 4.4.2 Vorkultur im 2 L Bioreaktor

#### Aufbau 2 L-System

Die Vorkultur der Biotransformationsexperimente wurde in einem 2 L Bioreaktor (Sartorius) kultiviert. Dieser Reaktor ist mit vier Peristaltikpumpen ausgestattet, mit denen dem System Säure, Base und Antischaummittel zugeführt wurde. Die vierte Pumpe wurde während der Vorkultur nicht verwendet. Die Temperatur wurde automatisch über einen Heizmantel geregelt. Die Begasung erfolgte mit steriler Druckluft (Sterilfilter PTFE, 0,2 µm Porengröße). Der pH-Wert wurde durch eine pH Sonde aufgezeichnet und durch die automatische Zudosierung von Säure oder Base konstant gehalten. Die Zugabe des verwendeten Antischaummittels wurde durch eine Schaumsonde reguliert, welche durch die Messung der Leitfähigkeit eine Schaumbildung detektierte. Die Durchmischung der Kultur erfolgte mittels Rührwerks, welches mit Impeller Rührorganen bestückt ist.

#### Fermentationsparameter während der Vorkultur

**Tab. 4.4-1** zeigt eine Übersicht über die verwendeten Fermentationsparameter während der Herstellung der Vorkultur. Unter 3.3.9 sind die verwendeten Medien und unter 3.10.7 die verwendeten Lösungen zur Herstellung der Vorkultur aufgeführt.

**Tab. 4.4-1: Übersicht über Fermentationsparameter zur Herstellung der Vorkultur im 2 Liter Bioreaktor**

Parameter	
Temperatur	30 °C
pH-Wert	5,8 (konstant)
Begasung	6 L/h
Volumen gesamt	1.000 mL
Rührerdrehzahl	500 rpm

**Tab. 4.4-2: Übersicht über verwendete Medien und Lösungen während 2 L-Vorkultur**

Parameter	
Medium	OPT-1 Medium
Säure	7% Phosphorsäure
Base	2 M NaOH
Antischaummittel	Silikon Basis
Inokulum	10% (v/v)

### Vorbereitung und Ablauf der Vorkultur

Zunächst musste der Fermenter vorbereitet und sterilisiert werden. Dazu wurden 900 mL des Nährmediums OPT-1 vorbereitet (ohne Glucose,  $MgSO_4$  und Spurenelemente) und in den Fermenter gefüllt. Vor der Sterilisation musste die pH-Sonde einer Zweipunkt-Kalibrierung unterzogen werden. Dazu wurden definierte Maßlösungen mit einem pH-Wert von 4 und 7 verwendet. Nach der Kalibrierung wurde die pH-Sonde in den Fermenter eingesetzt, alle Zuleitungen angeschlossen und abgeklemmt, die Zuluft inklusive Sterilfilter angeschlossen und der Heizmantel mit Wasser befüllt. Der gesamte Fermenter und die bereits angeschlossenen Vorlageflaschen wurden 30 min bei 121 °C und 2 bar Überdruck sterilisiert. Nach dem Abkühlen des Fermenters wurde dieser vollständig angeschlossen und die gewünschten Prozessparameter eingestellt. Die Vorkultur (100 mL einer Schüttelkolbenkultur (siehe 4.4.1)) wurde per Spritze über eine nicht belegte Zuleitung zugeführt. Um Kontaminationen zu vermeiden wurden alle Anschlüsse vor dem Öffnen mit 80% Ethanol desinfiziert. Unter genannten Bedingungen wurde für 24 h im Reaktor kultiviert.

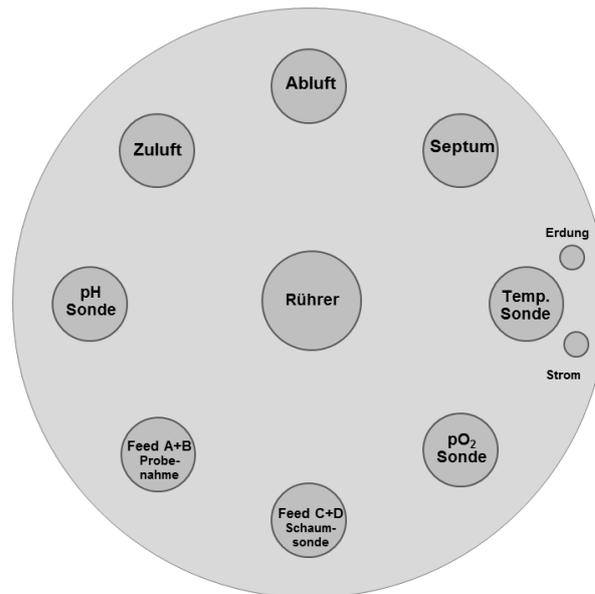
### 4.4.3 Aufbau Biotransformationen im Parallelfermentersystem

Alle Biotransformationsexperimente wurden in einem Parallel-Kultivierungssystem (DASGIP) durchgeführt. Das verwendete System besteht aus acht parallel zu betreibenden Bioreaktoren, wobei jeweils vier Reaktoren zu einer Einheit zusammengefasst sind, die unabhängig voneinander betrieben werden können. Das System besteht aus mehreren Komponenten die in **Tab. 4.4-3** aufgeführt sind.

**Tab. 4.4-3: Übersicht über die Steuerungsmodule des Parallelermentersystems**

Modul	Bezeichnung	Funktion
Begasung	MX4/4	Begasung mit individuellem Gasgemisch aus Luft, N <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> und O <sub>2</sub> möglich, Begasungsraten 0,5-50 sl/h
Abgasanalytik	GA4E Abgasanalysator-modul	Echtzeitmessung von CO <sub>2</sub> - und O <sub>2</sub> -Gehalten in der Abluft durch galvanischen Zelle und Volumensstromerfassung
Temperatursteuerung	Temperier- und Rührsystem TCSC	Steuerung nach Informationen der Pt100-Sonden innerhalb der Bioreaktoren
Temperierung	Bioblock	Individuelles Heizen und Kühlen der einzelnen Bioreaktoren
Verarbeitung der Sondeninformationen	Sensormodul pH4pO4	Informationsverarbeitung der pH, pO <sub>2</sub> und der Antischaumsonden
Pumpen	Multipump-Module MP8	Vier Peristaltikpumpen, die die benötigte Zufuhr von Feeds wie Säure, Base und Antischaum gewährleisten

Bei den verwendeten Reaktoren handelt es sich um Glasreaktoren mit einem Arbeitsvolumen von 0,2 – 1 L, bei einem Gesamtvolumen von 1,4 L. Die Bioreaktoren sind mit allen Ein- und Aufbauten autoklavierbar. Die vorhandenen Dichtungen bestehen aus Viton und sind beständig gegenüber dem verwendeten Substrat LSME und den übrigen verwendeten Komponenten. **Abb. 4.1** zeigt schematisch die Deckelansicht der Bioreaktoren. Enthalten sind eine pH-Sonde (Mettler Toledo 405-DPAS-SC-K8S), pO<sub>2</sub>-Sonde (Mettler Toledo inPro 6820 DO-Sonde), die Zuläufe für die Feedstrecken A (Säurezugabe pH-Regulierung), B (Basenzugabe pH-Regulierung), C (Antischaumzugabe) und D (Feedzugabe). Für die Feedstrecke des LSMEs wurden beständige Vitonschläuche mit einem Durchmesser von 1,14 mm verwendet. Weiterhin sind eine Temperatursonde (Pt100-Sensor) und eine Probenahmeinheit, bestehend aus einem Steigrohr mit selbstdichtendem Luer-Lock-Ventil, vorhanden. Zusätzlich gibt es ein Septum, durch welches Proben entnommen oder zusätzliche Lösungen mittels Kanüle zugegeben werden können.



**Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Bioreaktorperipherie (Deckelansicht)** Dargestellt ist eine schematische Übersicht eines der verwendeten DASGIP-Bioreaktoren. Die Komponenten innerhalb des Reaktors wurden, soweit möglich, immer entsprechend dieser Abbildung angeordnet. Die vorhandenen Komponenten sind: pH und DO-Sonde; vier Feedstrecken A, B, C, D; Begasungseinheit; Ablufteinheit mit Rückflusskühler, Septum, Temperatursonde, Erdung und Energieversorgung

Die Begasungseinheit liegt in Form eines L-Spargers vor (Luft wird vor Eintritt mittels PTFE 0,2 µm Sterilfilter sterilisiert), die auftretende Abluftstrom wird durch einen Rückflusskühler von potentieller Feuchtigkeit befreit und über einen Sterilfilter (PTFE, 0,2 µm) der Abgasanalyse oder der Umgebung zugeführt. Die Durchmischung erfolgt durch einen Sechsstabscheibenrührer, als Strömungsbrecher dienen die verschiedenen Einbauten.

#### 4.4.4 Vorbereitung der Biotransformationen im Parallelfermentersystem

##### Kalibrierung der pH-Sonden

Zur Kalibrierung der pH-Sonden wurden Maßpufferlösungen (pH 4+7 (VWR)) verwendet und die Zweipunktkalibrierung erfolgte nach Herstellerangaben (DASGIP User Manual). Nach der Reinigung der Sonde wurden diese in der Maßlösung (zuerst pH 4) platziert. Nachdem sich der pH-Wert konstant zeigte, wurden die Sonden auf pH 4 kalibriert. Anschließend wurde die Prozedur bei pH 7 wiederholt. Im Anschluss wurden die Sonden zum Autoklavieren in die mit Medium befüllten Fermenter eingesetzt.

##### Kalibrierung der Peristaltikpumpen

Die Kalibrierung der Pumpen gewährleistete die korrekte Zufuhr der gewünschten Volumina in die Fermenter, wobei der Durchmesser der verwendeten Schläuche und die Dichte der zu pumpenden Komponente berücksichtigt wurden. Für den LSME-Feed wurden Vitonschläuche mit einem Innendurchmesser von 1,14 mm verwendet, für alle anderen Feedstrecken Silikonschläuche mit einem Innendurchmesser von 0,5 mm. Der Kalibrierungsvorgang verlief nach Herstellerangaben (DASGIP User Manual).

**Cleaning in place (CIP)**

Um die Sterilität der zuführenden Leitungen gewährleisten zu können, wurde eine Reinigungsprozedur gemäß Herstellerangaben (DASGIP User Manual) durchgeführt. Dabei wurden die Leitungen vor dem Anschließen an die Bioreaktoren zunächst mit 80%igem Ethanol, danach mit 6 M NaOH-Lösung und abschließend mit ddH<sub>2</sub>O gespült.

**Sterilisation und Anschließen der Bioreaktoren**

Alle verwendeten Bioreaktoren wurden mit der entsprechenden Menge OPT-1 Medium (ohne Glucose-, MgSO<sub>4</sub>-, und Spurenelementlösung) befüllt, wie unter 4.4.3 beschrieben zusammengesetzt, verschlossen und bei 121 °C, 2 bar Überdruck für 20 min autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde das Medium komplettiert und die Bioreaktoren angeschlossen, wobei alle Zuleitungen und Anschlüsse zuvor mit 80%igem Ethanol desinfiziert wurden.

**Kalibrierung der DO-Sonden**

Die Kalibrierung der DO-Sonden erfolgte nach Herstellerangaben (DASGIP User Manual). Dazu wurde die Begasung, die Rührerdrehzahl und Temperatur auf die für den Prozess gewählten Maximalwerte gebracht. Bei Erreichen von stabilen Messwerten, wurde die Kalibrierung auf 100% Gelöstsauerstoffkonzentration vorgenommen.

**Kalibrierung der Abgasanalytik**

Die Kalibrierung der Abgasanalytik erfolgte nach Herstellerangaben (DASGIP User Manual). Dazu wurde diese zunächst mit Druckluft gespült (mindestens 30 min). Anschließend wurde auf einen Sauerstoffgehalt von 21% und einen Kohlendioxidgehalt von 0% in der Zuluft kalibriert. Bei der Verwendung der Abgasanalytik dürfen keine Komponenten in diese gelangen, die zu einer Beschädigung führen können. Zu vermeiden sind beispielsweise Ammoniak, verschiedene organische Lösungsmittel und Feuchtigkeit.

### 4.4.5 Biotransformationsparameter

Die Standardbiotransformationsbedingungen sind in **Tab. 4.4-4** zusammengefasst. Diese Bedingungen stellen die Ausgangssituation für alle weiteren Anpassungen und Variationen der Biotransformation dar. Die verwendeten Lösungen sind unter 3.10.7 und das verwendete Medium unter 3.9 aufgeführt.

**Tab. 4.4-4: Ausgangssituation der Prozessparameter für alle folgenden Untersuchungen (Standardvariante)**

Parameter	
Medium	OPT-1 Medium (siehe 3.9)
Kohlenstoffquelle	Glucose (30 g/L zu Beginn)
Feed Kohlenstoffquelle	Feed: Glucose 500g/L Start des Feeds parallel zum LSME Feed 1 g/h
pH-Wert	5,8 konstant
Säure	Keine, pH-Regelung nur mit Base
Base	6 M NaOH
Antischaummittel	Silikon Basis, 1:10 in ddH <sub>2</sub> O Dosierung geregelt über Trigger (siehe 4.4.6 Regelungskaskaden)
Inokulum	10% (v/v) Inokulum
pO <sub>2</sub>	25% (Kaskadenregelung, siehe 4.4.6 Regelung verschiedener Prozessparameter)
Begasung	Druckluft (21% O <sub>2</sub> )
Begasungsrate	Start: 6 sL/h Maximal: 16 sL/h siehe 4.4.6 Regelung verschiedener Prozessparameter
Rührerdrehzahl	Start: 500 rpm Maximal: 1200 rpm siehe 4.4.6 Regelung verschiedener Prozessparameter
Temperatur	30 °C
Arbeitsvolumen	Start: 300 mL Maximal: 700 mL
Prozessdauer	Wachstumsphase: 24 h Biotransformationsphase: 120 h

### 4.4.6 Regelung verschiedener Prozessparameter

#### DO-Regelung

Die Regelung der Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium wurde durch eine Kaskadenregelung gesteuert. Fiel der Wert unter den gewählten Sollwert, erhöhte sich zunächst kontinuierlich die Rührerdrehzahl von 500 auf 1.200 rpm, je nach vorliegender Abweichung. Nach Erreichen der maximalen

Rührerdrehzahl, wurde zusätzlich die Begasungsrate von 6 sL/h bis auf 16 sL/h erhöht. Im Falle einer konstanten Begasungsrate wurde nur die Rührerdrehzahl auf zuvor beschriebene Weise geregelt.

### **pH-Regelung**

Um den pH-Wert zu regeln, wurde bei detektierter Abweichung automatisch Base bis zum Erreichen des gewünschten pH-Wert zugesetzt. Stieg der pH-Wert über das eingestellten Level, wurde nicht gegengeregelt.

### **Regelung der Antischaumdosierung**

Für die Zugabe des Antischaummittels wurde ein Trigger verwendet. Erreicht der Schaum die Schaumsonde, erhöhte sich deren Leitfähigkeit. Ab einer Leitfähigkeit von 10  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , für mehr als 10 s, dosierte der Trigger solange Antischaum zu, bis der Leitfähigkeitswert unter 7  $\mu\text{S}/\text{cm}$  fiel. Die Dosierung des Antischaummittels erfolgt über eine zeitlich gesteigerte Pumprate, wobei diese innerhalb von 5 Minuten von 5 mL/h auf 20 mL/h anstieg. So wurde eine möglichst geringe Dosierung des Antischaummittels gewährleistet.

### **Glucose Feed**

Zur Steuerung des Glucosefeeds wurde die Pumpgeschwindigkeit während der ersten 24 h auf 0 mL/h gesetzt. Ab einer Dauer von 24 h nach der Inokulation wurde der Feed auf 2 mL/h eingestellt und falls nicht anders beschrieben, konstant beibehalten.

### **LSME Feed**

LSME wurde je nach Ansatz entweder manuell per Spritze zugegeben, oder gekoppelt an das Arbeitsvolumen automatisch zu gepumpt. Die automatische Dosierung erfolgte basierend auf folgender Funktion, wobei die zugehörige Bezugsgröße das kumulierte Reaktorvolumen darstellte:

'Script parameters

dim feed as double = 1 'Feed [g/L/h]

dim con As double = 600 'Feed bottle [g/L]

y = x \* feed / con ' [ml\*(g/L/h) / (g/L)] = [ml/h]

feed: Variable für Menge in Gramm

con: Variable für Konzentration der Lösung, im Fall von LSME die Dichte mit 870 g/L

Nach manuellem Start dieser Funktion, wurde automatisch die angestrebte Feedrate [g/Lh] den Reaktoren zugeführt.

### 4.4.7 Ablauf der Biotransformationen

#### Inokulation

Zur Inokulation der Biotransformationsansätze wurde die Vorkultur (siehe 4.4.2) verwendet. Zunächst wurde das entsprechende Volumen steril, aus dem 2 L Bioreaktor mit einer geeigneten, sterilen Spritze über die Probenahmeinheit entnommen. Das Inokulum wurde anschließend entweder über eine freie Zuleitung, oder über die Basenleitung zugegeben. Alle Zuleitungen und Anschlüsse wurden mit 80%-igem EtOH desinfiziert um mögliche Kontaminationen zu vermeiden.

#### Wachstumsphase

Die Wachstumsphase startete mit der Inokulation und hatte je nach Ansatz eine Dauer von 12-24 h. Bei der Standardvariante zu Beginn betrug die Dauer 24 h. Während dieser Phase wurden weder LSME, noch zusätzliche Mengen der Kohlenstoffquelle zugeführt. Die Zellvitalität und Viabilität wurden mittels dem CO<sub>2</sub>-Gehalt in der Abluft, der Messung der Optischen Dichte bei 600 nm (siehe 4.1.1) und der Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM, siehe 4.4.9) und der Kolonien-bildende-Einheiten (KBE, siehe 4.4.10) beobachtet. Dazu wurden in verschiedenen Zeitabständen Proben entnommen (siehe 4.4.8).

#### Biotransformationsphase

Die Biotransformationsphase startete mit Beginn des LSME-Feeds. Parallel dazu wurde, falls nicht anders beschrieben, der Feed der Kohlenstoffquelle ebenfalls gestartet. Die Dauer der Biotransformationsphase betrug 60-175 h, je nach Ansatz. Die Dauer bei der Standardvariante zu Beginn betrug 120 h. Um den Verlauf der Biotransformation beurteilen zu können, wurden regelmäßig Proben zur Titerbestimmung von LS, LSME und DDS entnommen. Zusätzlich wurde der Gehalt an Biotrockenmasse dieser Proben bestimmt. Die Bestimmung der optischen Dichte ist nach Zugabe des wasserunlöslichen Substrates nicht mehr zielführend, da die entstehende Trübung eine zuverlässige Messung unmöglich macht. Einmal täglich wurden Sterilkontrollen entnommen, um Kontaminationen ausschließen zu können. Beim Abbruch der Biotransformationsphase wurden Endproben entnommen (20-50 mL), welche bei -20 °C gelagert wurden. Die Sonden (pH, pO<sub>2</sub>) und die Bioreaktoren wurden anschließend samt der übrigen Fermentationsbrühe autoklaviert, welche anschließend sachgemäß entsorgt wurde.

### 4.4.8 Probenahme

Proben wurden mittels der Probenahmeinheit und sterilen Spritzen entnommen. Da das Steigrohr der Probenahmeinheit ein Totvolumen von ca 1,5 ml besitzt, wurde entweder ein geringes Volumen (1,5-2 mL) entnommen und anschließend verworfen, oder das Steigrohr wurde durch das Einbringen steriler Luft (mittels steriler Spritze und Spritzenaufsatzfilter, PTFE, 0,2 µm) vor der Probenahme entleert, da besonders bei geringen Arbeitsvolumina und häufiger Probenahme die Entnahme größerer Probenmengen den Prozess beeinflussen kann.

### 4.4.9 Bestimmung der Biotrockenmasse

Zunächst wurde das Gewicht leerer 1,5 mL Reaktionsgefäße bestimmt. Die entnommenen Proben (0,5 mL) wurden zentrifugiert (21.000 g, 5 min, 4 °C) und der Überstand mit der Pipette abgenommen.

Anschließend wurde das Pellet mit geöffnetem Deckel bei 60 °C für mindestens 24 h im Trockenschrank getrocknet. Nach dem Trocknen wurde die Probe inklusive Reaktionsgefäß erneut gewogen und die Differenz der beiden Gewichtsbestimmungen ermittelt.

#### **4.4.10 Sterilkontrollen und Bestimmung der KBEs**

Zur Detektion potentiell vorhandene Kontaminationen wurden Sterilkontrollen durchgeführt. Dazu wurden die steril entnommenen Proben auf zwei geeignete Level (zwischen 1:100 und 1:100.000, je nach Zelldichte) mit OPT-1 Medium verdünnt und auf LB-Agar und YPD-Agar ausplattiert. Nach der Inkubation über Nacht (LB-Platten bei 37 °C, YPD-Platten bei 30 °C) konnten, falls vorhanden, Kontaminationen anhand möglicher Unterschiede in der Morphologie der Kolonien identifiziert werden.

Um die Anzahl der KBEs bestimmen zu können, wurden ebenfalls geeignete Verdünnungen auf YPD-Agarplatten ausplattiert und anschließend ausgezählt. Dabei wurde die Verdünnung so gewählt, dass sich auf jeder Platte etwa 30-300 Kolonien befanden. Um dies zu erreichen, wurden 2-3 Verdünnungsstufen ausplattiert und falls geeignet, ausgewertet.

## 4.5 Analytische Methoden

### 4.5.1 Assay zur Untersuchung der CYP-Aktivität

Im Verlauf der Arbeit wurde der verwendete Assay zur Untersuchung der CYP-Aktivitäten mehrfach angepasst. Folgend wird die Variante beschrieben, mit der die höchste Aktivität gemessen werden konnte. Zur Untersuchung der einzelnen CYPs wurden sowohl isolierte Membranfraktionen (siehe 4.3.4) als auch Überstände des Zellaufschlusses verwendet. Der Assay erfolgte möglichst zeitnah zum Zellaufschluss (siehe 4.3.3). **Tab. 4.5-1** zeigt die finalen Konzentrationen des durchgeführten Aktivitätsassays, (verwendete Lösungen siehe 3.10.8). Die getesteten Substrate wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) vorgelöst, sodass die finale Menge des zugesetzten DMSOs im Ansatz einen Gesamtanteil von 2,5% nicht überschritt (siehe 3.10.8). Bei Substratmischungen, betrug die finale Konzentration jeder Komponente 200  $\mu\text{M}$ , bei einem DMSO-Anteil von maximal 2,5%. Die Basis des Assays stellte der Zellaufschlussüberstand (in 100 mM  $\text{KPi}$ -Puffer) oder die in 100 mM  $\text{KPi}$ -Puffer resuspendierten, zuvor aus dem Zellaufschlussüberstand isolierten, Membranfraktionen dar. Dieser wurde vorgelegt, anschließend wurden die restlichen Komponenten, zuletzt das NADPH, zugegeben. Der Assay wurde mit der Zugabe des Cofaktors gestartet, durch mehrmaliges auf- und abpipettieren durchmischt und 2 h (30 °C, 900 rpm auf einem Mikrotiterplattenschüttler) inkubiert. Je nach Volumen wurde der Assay in Mikrotiterplatten (max. 200  $\mu\text{L}$ ) oder in Deepwellplatten (max. 1 mL) durchgeführt.

**Tab. 4.5-1: Übersicht über finale Konzentrationen im Aktivitätsassay**

Komponente	Finale Konzentration
Substrat in DMSO	200 $\mu\text{M}$
NADPH	1 mM
Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase	2,5 U/mL
Glucose-6-Phosphat	6,7 mM

Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Ansatz, entweder durch Einfrieren bei -20 °C oder durch das Verdünnen im Verhältnis 1:30 mit 100% Acetonitril gestoppt. Durch Zugabe des organischen Lösungsmittels präzipitieren aggregierte Proteine und weitere polare Substanzen. Um eine vollständige Durchmischung in den Mikrotiterplattenansätzen zu gewährleisten, wurden die Ansätze 10 min geschüttelt (900 rpm). Um die Feststoffe aus der Lösung zu entfernen, wurde die Platte zentrifugiert (2.000 g, 4 °C, 5 min). Anschließend wurden 200  $\mu\text{L}$  des resultierenden Überstandes in eine Filterplatte (PTFE, 0,2  $\mu\text{m}$ ) überführt. Diese wurde auf eine neue Mikrotiterplatte aufgesetzt und erneut zentrifugiert (2.000 g, 4 °C, 10 min). Die filtrierte Proben wurden anschließend mit einer Silikonmatte verschlossen.

### 4.5.2 CO-Differenzspektren zur quantitativen und qualitativen CYP- Charakterisierung

Omura & Sato entwickelten 1964 eine Methode zu Konzentrationsbestimmung von Cytochrom P450 Enzymen [49]. Durch die charakteristische Absorption bei 450 nm der Hämgruppe im reduzierten, Kohlenmonoxid-gebundenen Zustand kann die enthaltene Menge nativer CYPs einer Probe bestimmt werden. Gleichzeitig zeigt sich bei vorhandenen, nicht korrekt gefalteten CYPs ein Peak bei 420 nm, der Aufschluss über den Zustand der CYPs innerhalb der untersuchten Probe gibt. Um eine größere Anzahl Proben messen zu können, wurde eine angepasste Methode nach Otey [79] verwendet [80].

Dabei wurde eine ausreichende Menge 1,3 M  $\text{KPi}$ -Puffer (pH 8,0) verwendet. Nach Zusatz von festem Natriumdithionit (Zielkonzentration 400 mM) wurde die Hälfte der Lösung mit Kohlenmonoxid begast (ca. 30 min). Untersucht wurden Zellaufschlussüberstände (siehe 4.3.3), isolierte Membranfraktionen (siehe 4.3.4) oder auch Proben ganzer Zellen. Die zu untersuchende CYP-Probe durfte dabei keine zu starke Trübung aufweisen und wurde ggf. mit einer geeigneten Menge 100 mM  $\text{KPi}$ -Puffer (pH 7,4) verdünnt. Von jeder Probe wurden je 2x 160  $\mu\text{L}$  Proteinlösung vorgelegt. Anschließend wurden einmal 40  $\mu\text{L}$  begaster und einmal 40  $\mu\text{L}$  unbegaster Puffer zugegeben. Von beiden Proben wurde ein Absorptionsspektrum von 400 bis 500 nm aufgenommen (Shimadzu Corporation, UV-Vis Spektralphotometer UV 1800 oder BMG Labtech, FLUOstar Omega). Um das Differenzspektrum zu erhalten, wurde vom Spektrum der begasten Probe, das der unbegasten abgezogen. Bei einem deutlich erkennbaren Peak bei 450 nm ergab sich die Konzentration der enthaltenen nativen CYPs aus der Differenz der Extinktion bei 450 nm und 490 nm mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon_{450-490} = 91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  nach dem Lambert-Beerschen Gesetz. Zusätzlich wurde das Spektrum auf das Vorhandensein eines charakteristischen Peaks bei 420 nm untersucht, um Informationen über enthaltene, aber nicht native CYPs zu erhalten.

### 4.5.3 Quantifizierung der $\text{C}_{12}$ -Oxidationsprodukte mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Zur Analyse der durchgeführten Aktivitätsassays mit LS oder LSME als Substrate, wurde eine chromatografische Trennung der Komponenten mittels HPLC vorgenommen und eine anschließende Analyse per Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) durchgeführt. Dabei wurden die zu untersuchenden Komponenten nach der Trennung mittels Elektrospray-Ionisation (ESI) ionisiert, anschließend in einer Ionenfalle gesammelt, fragmentiert und detektiert (Allgemeine Hintergrundinformationen zur Methode [81]). Die Separierung der Probenkomponenten wurde mit einem UltiMate-3000RS HPLC-System (Dionex), bestehend aus einem Entgaser (SRD 3.400), einem Pumpenmodul (HPG 3400RS), einem Säulenofen (TCC 3000RS) ausgestattet mit einer Gravity C18 Säule (100 x 2 mm, 1,8  $\mu\text{m}$  Partikelgröße, Machery & Nagel) und einem Autosampler (WPS 3000TRS) durchgeführt. Die HPLC wurde durch die Software Chromeleon (Dionex) gesteuert. In Kombination mit der HPLC wurde ein angeschlossenes Massenspektrometer (Brucker EsquireHCT Ion Trap) zur Detektion verwendet. **Tab. 4.5-2** können die Parameter der chromatografischen Trennung entnommen werden. Alle verwendeten Lösungen sind unter 3.10.9 aufgeführt.

**Tab. 4.5-2: Übersicht über die wichtigsten HPLC-Parameter C<sub>12</sub>-Methode**

Parameter	
Säule	Gravity C18 (100 x 2 mm, 1,8 µm Partikelgröße, Machery & Nagel)
Drucklimit	800 bar
Eluent A	ddH <sub>2</sub> O mit 0,1% (v/v) Ameisensäure
Eluent B	Acetonitril mit 0,1% (v/v) Ameisensäure
Temperatur Autosampler	20 °C
Temperatur Säule	40 °C
Flussrate	0,7 mL/min (Splitter nach der Säule, vor dem Detektor 1:4)
Gemisch zu Beginn	45% A und 55% B
Gradient	2 min bis zu 100% B, danach 2 min konstant 100% B, dann 0,5 min konstant 55% B

Die aus dem Aktivitätsassay resultierenden Proben wurden wie unter 4.5.1 beschrieben verdünnt und filtriert. Das Standardinjektionsvolumen betrug jeweils 10 µL pro Messung. Zur Kalibrierung wurde ein Sammelstandard verwendet, welcher alle methylierten und nicht-methylierten C<sub>12</sub>-Oxidationsprodukte enthält. Der Standard wurde aus 5 mM Stammlösungen der Einzelkomponenten (siehe 3.10.9) zusammengefügt und auf die Zielkonzentration von 5 µM mit Acetonitril verdünnt. Von diesem Sammelstandard wurden verschiedene Volumina (10 µL; 7,5 µL; 5 µL; 2,5 µL; 1 µL; 0,5 µL und 0,25 µL) injiziert, wodurch sich der Kalibrierungsbereich über den Bereich von 5 µM – 0,125 µM erstreckte. Um die notwendige hohe Sensitivität zu erreichen, wurden die gesuchten, ionisierten Komponenten fragmentiert und die Hauptfragmente gezielt detektiert. Dadurch konnten geringste Mengen von Substrat, Produkt und Intermediaten, trotz des vorhandenen Hintergrunds, quantifiziert werden. Vor dem Eintritt ins MS wurde der Fluss gesplittet, sodass nur ein Viertel des Flusses ins MS gelangte, die verbleibende Menge wurde verworfen. Die anfallenden Daten wurden mittels der Software Hystar (Bruker) erfasst und analysiert. **Tab. 4.5-3** können die wichtigsten, für die Komponenten spezifischen MS/MS-Parameter, **Tab. 4.5-4** die wichtigsten, allgemeinen MS/MS-Parameter, entnommen werden.

**Tab. 4.5-3: Übersicht über die MS/MS-Parameter für die einzelnen Komponenten der C<sub>12</sub>-Methode**

Parameter	DDS	HS 12	OS 12	DSME 12	HSME 12	OSME 12	LS	LSME
Retentionszeit [min]	0,5	0,6	0,8	1,1	1,4	1,8	2,4	3,0
MS/MS Frag Ampl [V]	0,4	0.21	0.4/0.8	1.5	0.4	0.45	1.1	1.1
Mutterion m/z	231	217	215	245	231	229	201	215
Hauptfragment m/z	213	199	197	177	213	215		130
Sonstige Fragmente m/z		181, 163	179, 161	167, 159, 149	199, 181, 163	197, 179, 161		

**Tab. 4.5-4: Übersicht über die allgemeinen MS/MS-Parameter der C<sub>12</sub>-Methode**

Parameter	
Mode	Ultra scan mode (26.000 m/z/s)
Capillary Voltage	4 kV
Nebulizer	40 psi
Dry gas	6 L/min
Dry Temp	325 °C
Polarity	positive
Smart target	200.000
Max. Accu Time	50 ms
Scan	50 – 300 m/z
Averages	4
Rolling Averages	off

Die gesammelten Daten wurden durch die Software QuantAnalysis (Bruker) ausgewertet. Die Quantifizierung erfolgte durch die Integration der Komponenten spezifischen Peaks der „Extracted Ion Chromatograms“ (EIC), mit Berücksichtigung der gemessenen Kalibrierung des Sammelstandards.

#### 4.5.4 Quantifizierung der C<sub>10-16</sub>-Oxidationsprodukte mittels HPLC

Zur Analyse der durchgeführten Aktivitätsassays der Substrate FS<sub>10-16</sub>, wurde das unter 4.5.3 beschriebene System verwendet. Dabei wurden der Gradient und die Dauer der HPLC-Methode abgewandelt. Auch die MS/MS-Methode wurde angepasst (Allgemeine Hintergrundinformationen zur Methode [81]). **Tab. 4.5-5** können die Parameter der chromatografischen Trennung entnommen werden. Alle verwendeten Lösungen sind unter 3.10.10 aufgeführt. Die Proben wurden ebenfalls wie unter 4.5.3 beschrieben behandelt. Zur Kalibrierung wurden erneut Sammelstandards von allen vorhandenen Referenzsubstanzen angesetzt. In **Tab. 4.5-7** sind die Zusammensetzung der Sammelstandards und die finalen Konzentrationen der enthaltenen Komponenten aufgeführt. Die verwendeten Stammlösungen der Referenzsubstanzen sind unter 3.10.10 aufgeführt. Zur Verdünnung der Standards wurde der Zellaufschlussüberstand der Leervektorkontrolle 1:10 mit 100% Acetonitril verdünnt und filtriert (PTFE, 0,2 µm). Im Laufe der Untersuchungen hatte sich ein Einfluss der Matrix auf die Ionisierung der Komponenten gezeigt. Daher sollten die Standards den Proben größtmöglichst ähneln um diese zuverlässig quantifizieren zu können. Die Kalibrierung verlief wie unter 4.5.3 beschrieben, durch die Injektion verschiedener Sammelstandardvolumina. Der Kalibrierungsbereich erstreckte sich über einen Bereich von 10 µM – 0,25 µM.

**Tab. 4.5-5: Übersicht über die wichtigsten HPLC-Parameter FS<sub>10-16</sub> Methode**

Parameter	
Säule	Gravity C18 (100 x 2 mm, 1,8 µm Partikelgröße, Machery & Nagel)
Drucklimit	800 bar
Eluent A	ddH <sub>2</sub> O mit 0,1% (v/v) Ameisensäure
Eluent B	Acetonitril mit 0,1% (v/v) Ameisensäure
Temperatur Autosampler	20 °C
Temperatur Säule	40 °C
Flussrate	0,7 mL/min (Splitter nach der Säule, vor dem Detektor 1:4)
Gemisch zu Beginn	60% A und 40% B
Gradient	5 min bis zu 100% B, danach 1 min konstant 100% B, danach 2,2 min 40% B

Die Detektion wurde erneut per MS/MS durchgeführt. Allerdings wurden bei dieser Methode nicht bestimmte Massen gezielt isoliert und analysiert, sondern alle Massen per Auto-MS Mode erfasst und die Ionen mit der höchsten Signalintensität fragmentiert. **Tab. 4.5-6** können die allgemeinen MS/MS Parameter entnommen werden.

**Tab. 4.5-6: Übersicht über die allgemeinen MS/MS Parameter der C<sub>10-16</sub>-Methode**

Parameter	
Mode	Ultra scan mode (26.000 m/z/s)
Capillary Voltage	4 kV
Nebulizer	40 psi
Dry gas	6 L/min
Dry Temp	325 °C
Polarity	positive
Smart target	200.000
Max. Accu Time	50 ms
Scan	50 – 1.500 m/z
Averages	4
Rolling Averages	off
MS/MS Frag Ampl	0,8

Zur Quantifizierung wurde erneut die Software QuantAnalysis (Bruker) verwendet. Quantifiziert wurden bei dieser Methode die Mutterionen der Komponenten, außer im Fall der erhaltenen Hydroxyfettsäuren. Diese fragmentierten bereits bei der ersten Ionisierung und das Ion des Hauptfragmentes zeigte eine wesentlich höhere Signalintensität als das Mutterion selbst. Das Fragmentierungsmuster der Komponenten, in Kombination mit der Retentionszeit und der gesuchten Masse, diente zur Identifizierung

der Komponenten, für welche keine Referenzsubstanzen verfügbar waren. **Tab. 4.5-7** können die verschiedenen Daten der untersuchten Komponenten entnommen werden. Waren keine Referenzsubstanzen vorhanden und konnten die Substanzen nicht während der Untersuchungen identifiziert werden, wurden die Retentionszeiten angelehnt an vorhandene Informationen abgeschätzt.

**Tab. 4.5-7: Übersicht über die MS/MS Daten spezifisch für die einzelnen Komponenten**

Komponente	Retentionszeit [min]	Mutterion m/z	Hauptfragment m/z	Konzentration Sammelstandard [ $\mu\text{M}$ ]
<b>DS10</b>	<b>0,7</b>	<b>203</b>		<b>10</b>
<b>HS10</b>	0,8	<b>189</b>	<b>171</b>	-
<b>HS11</b>	<b>0,9</b>	<b>203</b>	<b>185</b>	-
<b>DS11</b>	1,0	<b>217</b>		-
<b>OS10</b>	1,2	<b>187</b>		-
<b>DS12</b>	<b>1,2</b>	<b>231</b>		<b>10</b>
<b>HS12</b>	<b>1,4</b>	<b>217</b>	<b>199</b>	<b>10</b>
<b>OS11</b>	1,5	<b>201</b>		-
<b>DS13</b>	1,5	<b>245</b>		-
<b>HS13</b>	<b>1,65</b>	<b>231</b>	<b>213</b>	-
<b>OS12</b>	<b>1,8</b>	<b>215</b>		<b>10</b>
<b>DS14</b>	<b>1,9</b>	<b>259</b>		<b>10</b>
<b>HS14</b>	<b>2,15</b>	<b>245</b>	<b>227</b>	-
<b>DS15</b>	2,2	<b>259</b>		-
<b>HS15</b>	<b>2,45</b>	<b>245</b>	<b>227</b>	-
<b>OS13</b>	2,5	<b>229</b>		-
<b>OS14</b>	2,7	<b>243</b>		-
<b>DS16</b>	2,7	<b>287</b>		-
<b>FS10</b>	<b>2,8</b>	<b>173</b>		<b>25</b>
<b>HS16</b>	<b>3</b>	<b>273</b>	<b>255</b>	<b>5</b>
<b>OS15</b>	3,1	<b>243</b>		-
<b>FS11</b>	<b>3,3</b>	<b>187</b>		-
<b>OS16</b>	3,5	<b>271</b>		-
<b>FS12</b>	3,7	<b>201</b>		<b>10</b>
<b>FS13</b>	<b>4,1</b>	<b>215</b>		<b>10</b>
<b>FS14</b>	<b>4,5</b>	<b>229</b>		<b>10</b>
<b>FS15</b>	<b>4,9</b>	<b>229</b>		<b>10</b>
<b>FS16</b>	<b>5,2</b>	<b>257</b>		<b>25</b>

### 4.5.5 Löslichkeitsversuche begleitend zur Biotransformation mit *C. tropicalis*

Zur Analyse des bei den ersten Biotransformationen aufgetretenen Niederschlags wurden Löslichkeitsversuche durchgeführt. Dazu wurden die Proben jeweils mit Dimethylsulfoxid (DMSO), Acetonitril, Aceton und Ethylacetat versetzt, sowie mit einem 1:1 Gemisch des jeweiligen Lösungsmittels und OPT1-Medium. Es wurden jeweils 0,1 g des Niederschlags in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß eingewogen und jeweils mit 600 µL des jeweiligen reinen Lösungsmittels, oder dem 1:1 Gemisch, versetzt. Anschließend wurden die Proben mindestens eine Minute auf höchster Stufe gevortext.

### 4.5.6 Analyse der Biotransformationsproben mittels an HPLC gekoppelte Lichtstreuungsdetektion

Um eine aufwendige Probenvorbereitung zu vermeiden, wurde zur Analyse der Biotransformationsproben zunächst eine HPLC/ELSD Methode durchgeführt. Diese wurde an die unter 4.5.3 beschriebene Methode angelehnt. Zur Detektion wurde ein Lichtstreuungsdetektor (ELSD) verwendet, mit dem höhere Konzentrationsbereiche als mit dem Massenspektrometer erfasst werden können. Außer dem Detektor wurden alle übrigen Komponenten des unter 4.5.3 beschriebenen Systems beibehalten. **Tab. 4.5-8** können die Parameter der HPLC-Methode und der ELSD-Detektion entnommen werden.

**Tab. 4.5-8: Übersicht über die wichtigsten HPLC-Parameter der ELSD Methode**

Parameter	
Säule	Gravity C18 (100 x 2 mm, 1,8 µm Partikelgröße, Machery & Nagel)
Drucklimit	800 bar
Eluent A	ddH <sub>2</sub> O mit 0,1% (v/v) Ameisensäure
Eluent B	Acetonitril mit 0,1% (v/v) Ameisensäure
Temperatur Autosampler	20 °C
Temperatur Säule	40 °C
Flussrate	0,7 mL/min
Gemisch zu Beginn	45 % A und 55 % B
Gradient	1,5 min bis zu 100% B, danach 1,2 min konstant 100% B, danach 1,3 min 55% B
Evaporation Temp ELSD	30 °C
Nebuliser Temp ELSD	50 °C
Carrier flow ELSD	1,6 slm
Light source intensity ELSD	100%

Der verwendete Sammelstandard wurde in einer Konzentration von 1 mM vermessen. Die Referenzsubstanzen wurden dazu wie unter 3.10.11 beschrieben angesetzt. Die Fermentationsproben wurden vor der Messung 1:100 in Methanol verdünnt. Bei der Mischung dieser verdünnten Proben mit einem 1:1 Wasser/Acetonitril-Gemisch kam es allerdings zu einer klar erkennbaren Trübung. Da die Möglichkeit des Ausfallens der Proben auf der Säule und ein damit zusammenhängendes Verblocken nicht ausgeschlossen werden konnten, wurde diese Methode nicht weiter zur Biotransformationsanalytik herangezogen.

### 4.5.7 Analyse der Biotransformationsproben mittels Gaschromatographie

Als alternative Analysemethode der Biotransformationsproben wurde eine gaschromatografische Trennung, gekoppelt an einen Flammenionisationsdetektor (FID), mittels Trace GC Ultra System (Thermo Fisher Scientific) inklusive TriPlus Autosampler, durchgeführt. Für die Steuerung der Messung, Aufzeichnung der Daten und die anschließende Auswertung wurde die Software Xcalibur (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Mit dieser Methode konnten die Substrate LSME und LS sowie alle korrespondierenden Oxidationsprodukte qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden. **Tab. 4.5-9** zeigt die wichtigsten Parameter der verwendeten Methode.

**Tab. 4.5-9: Übersicht über die wichtigsten GC/FID-Parameter der C<sub>12</sub>-GC-Methode**

Parameter	
Säule	BPX5 (30 m, 0,25 Ø, 0,25 µm Filmdicke)
Trägergas	Helium
Flussrate	1 mL/min
Start Temperatur	180 °C
Gradient Rampe 1	8 °C/min bis 245 °C
Gradient Rampe 2	30 °C/min bis 300 °C
Basis Temperatur FID	320 °C
H <sub>2</sub> -Flussrate FID	35 mL/min
Synthetische Luft Flussrate FID	350 mL/min
Probenvolumen	0,5 µL

In ersten Messungen konnten die Substrate LSME und LS und das Produkt DDS, sonst aber keine Oxidationsprodukte detektiert werden. Daher wurde in späteren Messungen die Quantifizierung nur für diese drei Komponenten durchgeführt. Der Kalibrierungsbereich erstreckte sich über neun verschiedene Kalibrierungslevel (0,25 mM; 0,5 mM; 1 mM; 2,5 mM; 5 mM; 7,5 mM; 10 mM; 12,5 mM; 15 mM). Dabei wurde für jede Konzentration ein Sammelstandard in Dreifachbestimmung, aus unter 3.10.11 beschriebenen Stammlösungen der Referenzsubstanzen und dem zur Probenextraktion verwendeten Lösungsmittel Methyltertbutylether (MTBE), angesetzt. Die Standards wurden genauso wie die zu vermessenden Proben vor der Messung derivatisiert (siehe 4.5.8). **Tab. 4.5-10** können die Retentionszeiten aller Substrate und terminalen Oxidationsprodukte entnommen werden.

**Tab. 4.5-10: Übersicht über die wichtigsten GC/FID-Parameter der C<sub>12</sub>-GC-Methode**

Substanz	Retentionszeit
LSME	3,10
LS	3,82
OSME12	4,27
HSME12	5,51
DSME12	6,19
OS12	6,35
HS12	6,63
DDS	7,36

#### 4.5.8 Vorbereitung der Biotransformationsproben zur GC/FID-Analyse

Bevor die Proben der Biotransformation analysiert werden konnten, musste zunächst eine flüssig/flüssig Extraktion und eine anschließende Derivatisierung durchgeführt werden. Mit der beschriebenen Methode war die Disäure ohne vorhergehende Derivatisierung nicht detektierbar, daher wurden alle Proben einer vorgeschalteten Silylierung unterzogen. Alle verwendeten Lösungen sind unter 3.10.11 aufgeführt.

##### Extraktion der Biotransformationsproben

Um die Proben analysieren zu können mussten die Proben zunächst mit einem geeigneten Lösungsmittel extrahiert werden. Dabei durfte das organische Lösungsmittel keine freien Hydroxylgruppen aufweisen, da dies die erfolgreiche Derivatisierung der Proben verhindert. Zur Extraktion wurden 500 µL der wässrigen Probe mit 200 µL 2N HCl versetzt. Anschließend wurde 1 mL MTBE zugesetzt (Probe zu Lösungsmittel Verhältnis 1:2). Nach zweistündiger Extraktion auf dem Wippschüttler, wurde die organische Phase vorsichtig abgenommen und durch einen Spritzenvorsatzfilter (PTFE, 0,2 µm) filtriert.

##### Derivatisierung der Biotransformationsproben

Um die Produkte der Ganzzellbiotransformation detektieren zu können, wurde eine Derivatisierung mit N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (MSTFA) durchgeführt [82]. Dazu wurden die aus der Extraktion (siehe oben) resultierenden Proben zunächst mit MTBE verdünnt (in den Konzentrationsbereich zwischen 0,25 und 15 mM). Anschließend wurden 200 µL dieser Probe in ein Microglasvial überführt, mit 50 µL MSTFA versetzt und für ca. 10 s auf höchster Stufe gevortext. Anschließend konnten die Proben mittels der unter 4.5.7 beschriebenen Methode analysiert werden.

#### 4.5.9 Dünnschichtchromatografie (DC) der Biotransformationsproben

Zur zeitnahen Detektion von LSME, LS und DDS wurden entnommene Proben per Dünnschichtchromatografie untersucht. Alle dazu verwendeten Lösungen sind unter 3.10.12 aufgeführt. Dazu wurden enthaltene Zellen abzentrifugiert (21.000 g, RT, 5 min). Anschließend wurden jeweils 3 µL des resultierenden Überstandes und eines 5 mM Sammelstandards auf eine DC-Platte (Silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck) aufgetragen. Die mobile Phase bestand aus Ethylacetat versetzt mit 1% (v/v) Essigsäure. Die Platten wurde in eine DC-Kammer überführt und so lange inkubiert, bis die Flüssigkeitsgrenze das obere Ende

der Platte erreicht hatte. Zur Detektion der einzelnen Komponenten wurde eine Kaliumpermanganat-Lösung verwendet. Nach der Färbung wurden die Platten mittels Heißluft vorsichtig getrocknet, wonach LSME, LS und DDS sichtbar wurden, falls sie in der untersuchten Probe vorhanden waren.

#### **4.5.10 Überprüfung der Extraktionsmethode bei höheren DDS-Konzentrationen**

Da die Löslichkeit der Disäure sehr stark pH Wert abhängig ist, muss bei der Herstellung einer wässrigen Lösung mit definierter Konzentration gegentitriert werden um die Disäure vollständig zu lösen und in Lösung zu halten. Daher wurden stufenweise zunehmende Konzentrationen der Disäure eingestellt, indem der Feststoff eingewogen und dem zellfreien Fermentationsmedium (OPT-1 Medium, siehe 3.9) portionsweise zugegeben wurde. Nach jeder Feststoffzugabe wurde mit einer 4 M NaOH Lösung gegentitriert bis sich der pH-Wert bei 8 eingependelte. Zur exakten pH-Einstellung wurde ein Titrator (TL7000 mit Elektrode IoLiner, SI Analytics GmbH) verwendet. Bei diesem pH Wert sollte die Säure vollständig deprotoniert vorliegen und gänzlich in Lösung gehen. So konnten verschiedene Proben mit den definierten Konzentrationen von 35, 55, 75, 100 und 135 g/L; hergestellt werden. Diese Proben bekannter Konzentration, wurden verschiedene Extraktionsversuchen unterzogen. Dabei wurde die wässrige Phase vor der Extraktion mit Wasser im Verhältnis 1:1 verdünnt. Außerdem wurde das Lösungsmittelvolumen auf ein Verhältnis Probe zu Lösungsmittel von 1:4 erhöht. Als dritte Variante wurde eine zweistufige Extraktion durchgeführt. Bei dieser wurde zunächst wie bei der die Standardvariante (siehe 4.5.8) begonnen. Nach zweistündiger Extraktion wurde ein größtmögliches, definiertes Volumen der organischen Phase, ohne Teile der wässrigen oder falls vorhanden der Mischphase abgenommen und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Zu der verbleibenden organischen Phase wurde erneut die gleiche Menge MTBE gegeben wie zu Beginn. Nach weiteren zwei Stunden Extraktion wurden mindestens 500 µL der organischen Phase in ein weiteres 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Alle Extraktionsproben der unterschiedlichen DDS-Konzentrationen wurden filtriert und anschließend analysiert wie unter 4.5.7 beschrieben. Bei der mehrstufigen Extraktion wurde die extrahierte Menge durch die bekannten Konzentrationen und Volumina berechnet. Zur Beurteilung der Extraktionsmethoden wurde die Abweichungen der Ist- und Sollkonzentrationen betrachtet.

## 4.6 Formeln und Berechnungen

### 4.6.1 Berechnung von $\mu_{max}$

Zur Beurteilung des Wachstums von Mikroorganismen kann die maximale spezifische Wachstumsrate betrachtet werden. Betrachtet wird dabei die Phase des exponentiellen Wachstums der Mikroorganismen unter den gewählten Bedingungen.

$$\mu_{max} = \frac{\ln\left(\frac{X_{t_2}}{X_{t_1}}\right)}{(t_2 - t_1)} \quad (3)$$

$\mu_{max}$ : Maximale spezifische Wachstumsrate [ $h^{-1}$ ]

$t$ : Zeit [ $h$ ]

$X$ : Biomasse

### 4.6.2 Berechnung der volumetrischen Produktivität $Q$

Die volumetrische Produktivität  $Q$  bildet die Masse des gebildeten Produktes bezogen auf das Volumen der Fermenterbrühe über die Zeit ab.

$$Q = \frac{c}{t} \quad (4)$$

$Q$ : Volumetrische Produktivität [ $g/Lh$ ]

$t$ : Dauer zwischen Inokulation und Ende der Biotransformationsphase [ $h$ ]

$C$ : Konzentration des Produktes [ $g/L$ ]

### 4.6.3 Berechnung der DDS-Menge anhand der Basenzugabe

Um weitere Informationen über die tatsächliche DDS-Menge einiger Proben zu erhalten, wurde zusätzlich zu GC/FID-Analyse die Basenzugabe betrachtet. Dabei wurden die benötigten Mengen 6 M NaOH Lösung für den pH-Shift und die Neutralisation möglicher Stoffwechselprodukte beim Wachstum ohne Zusatz von LSME, durch den Vergleich mit einer Kontrolle, berücksichtigt. Davon wurde die gemessene Menge LS abgezogen.

$$N_{DDS\ theor} = \frac{(N_{NaOH} - N_{NaOH\ Kont})}{2} - N_{LS} \quad (5)$$

$N_{DDS\ theor}$ : Theoretische Stoffmenge DDS angelehnt an die Basenzugabe [ $mmol$ ]

$N_{NaOH}$ : Stoffmenge zugegebener Base bei Variante mit LSME-Feed [ $mmol$ ]

$N_{NaOH\ Kont.}$ : Stoffmenge zugegebener Base bei Variante ohne jegliche LSME-Zugabe [ $mmol$ ]

$N_{LS}$ : Gemessene Stoffmenge LS bei Variante mit LSME Feed [ $mmol$ ]

#### 4.6.4 Statistische Betrachtung der durchgeführten Experimente

Die Experimente wurden, falls möglich, in mehrfach Bestimmungen durchgeführt. Zur statistischen Beurteilung der Ergebnisse wurde das arithmetische Mittel bestimmt und die zugehörige Standardabweichung angegeben.

$$s = \sqrt{\left(\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2\right)} \quad (6)$$

$s$  : Standardabweichung

$n$  : Stichprobengröße

$x_i$  : Wert betrachtete Größe

$\bar{x}$  : Arithmetisches Mittel der betrachteten Größe

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Ganzzellbiotransformation mittels *Candida tropicalis*

#### 5.1.1 Ausgangssituation

Um nähere Informationen über die Produktion von Dicarbonsäuren mittels *Candida tropicalis* zu gewinnen, wurde eine Fermentationsplattform im achtfachen Parallelermentersystem im 1L Maßstab etabliert. Als Modells substrat (Hauptsubstrat) diente Laurinsäuremethylester (LSME), ein Produkt der Umesterung von Palmkern- oder Kokosöl und damit ein gut zugängliches, erneuerbares und bezahlbares Substrat. Das resultierende Produkt der Biotransformation mittels einer Hefe sollte Dodecandisäure (DDS), eine Vorstufe des Polymers Polyamid-6,12 sein. Die verwendete Hefe war der *Candida tropicalis* Stamm ATCC 20962, bei dem die  $\beta$ -Oxidation aliphatischer Substrate ausgeschaltet wurde. Durch diesen Schritt wird der Abbau des zuvor selektiv an der  $\omega$ -Position oxidierten Produktes verhindert und die Disäure kann im Fermentationsmedium angereichert werden. Parallel zur Biotransformation wurden verschiedene analytische Methoden getestet und im Laufe der Untersuchungen immer wieder angepasst und optimiert.

Das verwendete Parallelermentersystem der Firma DASGIP verfügt über acht gleiche Fermentereinheiten mit einem maximalen Arbeitsvolumen von 1 L. Neben dem pH-Wert, der Temperatur, der Gelöstsauerstoffkonzentration und dem Schaumlevel, können auch die zugeführten Feedströme genau geregelt und an die Bedürfnisse des Prozesses angepasst werden. Insgesamt stehen vier Pumpstrecken pro Fermenter zur Verfügung.

Die untersuchte Biotransformation mit dem gewählten Biokatalysator besteht aus zwei Phasen, zunächst der Wachstumsphase und anschließend der Biotransformationsphase. In der Wachstumsphase wird eine Basismenge Biomasse generiert, im Anschluss wird der Fermentationsbrühe das Biotransformations substrat LSME zugesetzt (nachfolgend als Substrat bezeichnet). Zur Kontrolle des Verlaufs und Charakterisierung des Prozesses wurden in regelmäßigen Zeitabständen Proben entnommen und auf den Gehalt an Substrat (LSME), Intermediat (kann auch als Substrat angesehen werden), Laurinsäure (LS) und gewünschtem Produkt (DDS), sowie möglicher Nebenprodukte und Biomassezustand hin untersucht.

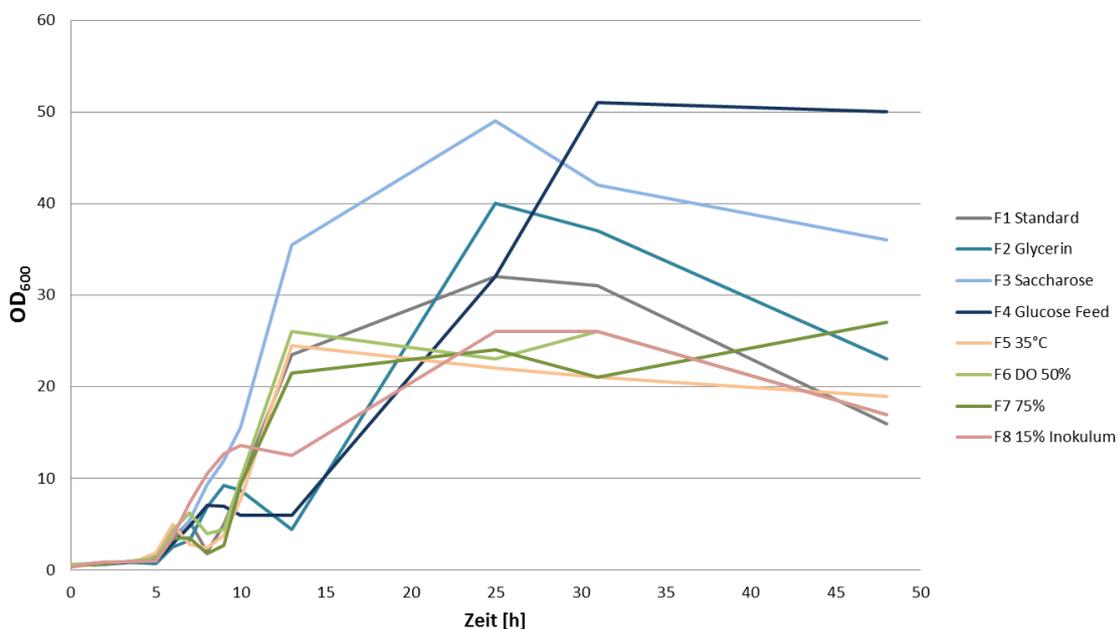
#### 5.1.2 Untersuchungen der Wachstumsphase

Als erster Schritt wurde die Wachstumsphase des Gesamtprozesses untersucht. Angelehnt an bereits früher durchgeführte Fermentationen wurde das OPT-1 Medium mit Glucose als C-Quelle verwendet, die Temperatur lag bei 30 °C, Gelöstsauerstoffkonzentration bei 25% und inokuliert wurde mit 10% (v/v) einer *C. tropicalis* Übernachtskultur. Diese Variante wurde als Standard angenommen und diente als Ausgangspunkt für weitere Experimente. Es wurden verschiedene Parameter wie die C-Quelle, Temperatur, Gelöstsauerstoffkonzentration und Anteil des Inokulums variiert. **Tab. 5.1-1** zeigt eine Übersicht der Varianten.

**Tab. 5.1-1: Vergleich der gewählten Prozessparameter während der Untersuchung der Wachstumsphase mit der Standardvariante**

Fermenter	Parameter Standard	Parameter Variation
1	Glucose 30 g/L	
2	Glucose 30 g/L	Glycerin als C-Quelle 30 g/L
3	Glucose 30 g/L	Saccharose als C-Quelle 30 g/L
4	Glucose 30 g/L	5g/L Glucose Startkonzentration und Glukosefeed von 1 g/Lh
5	30 °C	Temperatur 35 °C
6	25% DO-Wert	50% DO-Wert
7	25% DO-Wert	75% DO-Wert
8	10% (v/v) Inokulum	15% (v/v) Inokulum

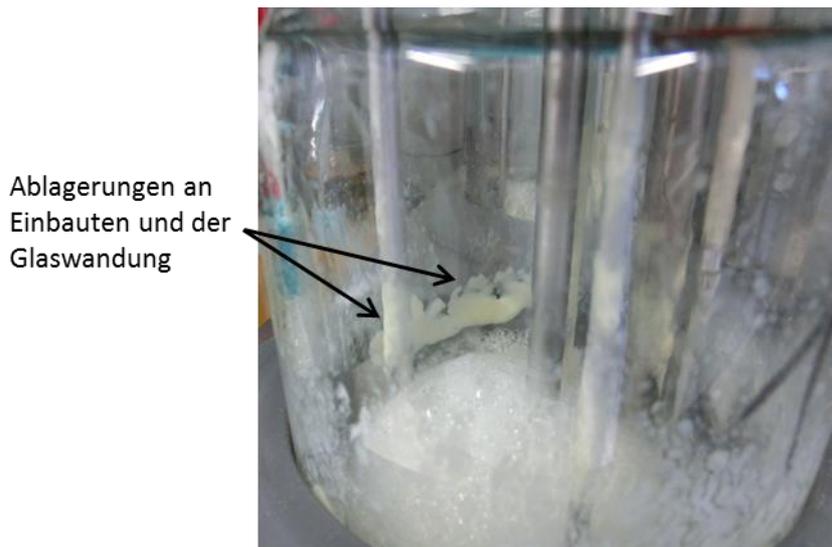
Gemessen wurden die optische Dichte bei 600 nm und die Biotrockenmasse. **Abb. 5.1** zeigt eine Übersicht über die Entwicklung der  $OD_{600}$  während der Wachstumsphase der verschiedenen Varianten. Sowohl die Verläufe der Standardvariante als auch die abweichenden Varianten unterlagen ungewöhnlich starken Schwankungen. Dies steht zumindest im Falle der Standardvariante im Gegensatz zu dem Verlauf einer klassischen mikrobiellen Wachstumskurve bei der Verwendung von Glucose als alleiniger Kohlenstoffquelle.



**Abb. 5.1: Verlauf der Biomasseentwicklung während der Wachstumsphase** Es wurden verschiedene Parameter (Kohlenstoffquelle, Temperatur, Gelöstsauerstoffanteil in der Fermentationsbrühe und Menge des Inokulums) während der Wachstumsphase variiert. Als Standardvariante diente die Wachstumsphase mit folgenden Parametern: pH 5,8, 30°C, OPT-1 Medium mit Glucose als C-Quelle, DO 25% und 10% (v/v) Inokulum. Durch den unregelmäßigen Verlauf können kaum signifikante Aussagen über den Einfluss der variierten Prozessparameter getroffen werden.

Diese Unregelmäßigkeiten erschweren einen eindeutigen Vergleich der verschiedenen Varianten, so dass nur Tendenzen abgeleitet werden können. Eine erhöhte Gelöstsauerstoffkonzentration scheint keinen starken Einfluss auf das Wachstum während der ersten Prozessphase zu haben. In der Tendenz scheint die Auswirkung allerdings eher negativ zu sein, vergleicht man sie mit der Standardkonzentration von 25%. Dies könnte an einer Zunahme der Scherkräfte innerhalb des Fermenters liegen, da eine höhere Rührerdrehzahl und eine stärkere Begasung erforderlich sind, um die höheren Zielwerte zu erreichen. Auch eine höhere Temperatur und ein erhöhter Anteil des Inokulums zeigten eher einen leicht negativen Einfluss, auch wenn dessen Signifikanz erneut fraglich ist. Einen positiven Effekt schien Saccharose als Kohlenstoffquelle zu haben. Die niedrigere Glucosekonzentration zu Beginn, kombiniert mit dem anschließend folgenden Glucosefeed, zeigte verglichen mit der Standardvariante eine geringere Zunahme der  $OD_{600}$  während der ersten Stunden der Wachstumsphase. Später zeigte die Feedvariante aber ein besseres Wachstum als die Standardvariante.

Auch in weiteren Fermentationen zeigten sich während der Wachstumsphase große Schwankungen bei der Biomassebestimmung. Es kam zu starker Schaumbildung und starker Ablagerungen an der Fermenterwand und verschiedenen Einbauten. Diese Ablagerungen, (**Abb. 5.2**) konnten durch manuelles Schwenken des gesamten Fermenters wieder in das Kulturmedium eingebracht werden.



**Abb. 5.2:** *Einblick in einen Fermenter während der Wachstumsphase* Deutlich sind die leicht gelblichen Ablagerungen an der Fermenterwand erkennbar, welche sich durch Schütteln des gesamten Fermenters allerdings wieder homogen in der Fermentationsbrühe verteilen lassen.

Die gemessene  $OD_{600}$  einer Probe, die unmittelbar nach dem Schwenken des Fermenters genommen wurde, überstieg den Messwert einer Probe unmittelbar vor dem Schwenken um durchschnittlich das Viereinhalbfache, wobei die Niederschläge im Fermenter im Anschluss geringer oder verschwunden waren. Dies sprach dafür, dass sich eine beachtliche Menge an Trübstoffen, wahrscheinlich Biomasse, außerhalb des Mediums befand. Dies machte eine aussagekräftige Beurteilung des Wachstumsverlaufes sehr schwierig.

Um gleichmäßige Biomasseverläufe zu erreichen wurde zunächst nach der Ursache der Schwankungen gesucht. Durch die starke Schaumbildung kann es zur Flotation bei *Candida*-Zellen kommen [83],

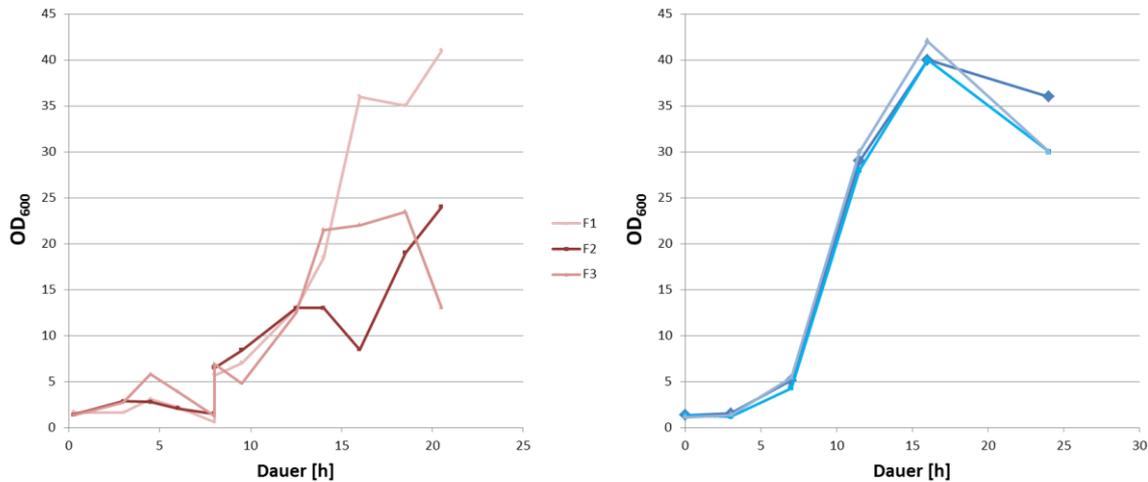
wodurch die Zellmenge in der Fermenterbrühe stark variiert. Um dieses Phänomen einzudämmen, wurde an einer effektiven Strategie zur Schaumvermeidung gearbeitet. Die normalerweise verwendeten Agenzien gegen starkes Schäumen (Antischaummittel) bergen verschiedene Nachteile. Um die Schaumbildung zu beeinflussen, werden daher eher andere Varianten bevorzugt, wie das Anbringen mechanischer Schaumbrecher, die den vorhandenen Schaum zerschlagen. Die Einbringung von dauerhaften Schaumbrechern in das vorhandene Parallelfermentersystem wäre nur unter erheblichem Aufwand möglich gewesen. Daher wurde auf eine leicht realisierbare Variante, wie von Riedel et al. beschrieben, zurückgegriffen [84]. Dabei werden herkömmliche Polyamidkabelbinder an der Rührwelle befestigt und auf eine geeignete Länge gebracht. **Abb. 5.3** zeigt den Aufbau der flexiblen, mechanischen Schaumbrecher, die zur Schaumminimierung in alle acht Fermenter eingebracht wurden.



**Abb. 5.3:** *Rührwerk eines DASGIP-Fermenters mit mechanischen Schaumbrechern aus Kabelbindern nach [84]. Diese einfache Maßnahme trug zu reproduzierbaren Wachstumsphasen des Bio-transformationsprozesses bei.*

Zusätzlich wurden die maximal zulässige Begasung und die einzuregelnde Gelöstsauerstoffkonzentration variiert. Dabei zeigten sich bei einer konstanten Begasung von 6 L/h und einer Gelöstsauerstoffkonzentration von 15% reproduzierbare Wachstumsphasen.

**Abb. 5.4** zeigt den Vergleich des Biomasseverlaufs einer Wachstumsphase ohne und mit Schaumvermeidungsstrategie, wobei eine deutliche Abnahme der Schwankungen zu erkennen ist.



**Abb. 5.4:** Vergleich des Biomasseverlaufs während der Wachstumsphase mit und ohne Schaumvermeidungsstrategie. Auf der linken Seite ist der sehr unregelmäßige Verlauf der Biomasse ohne Schaumvermeidungsstrategie zu sehen, rechts dagegen der gleichmäßige Verlauf mit angepasster Begasungsstrategie und Verwendung von mechanischen Schaumbrechern.

Um den Einfluss auf das Wachstum beurteilen zu können, wurde jeweils die maximale Wachstumsrate  $\mu_{\max}$  (siehe 4.6.1, Formel 1) im Bereich der exponentiellen Wachstumsphase betrachtet. Die so ermittelten Werte der einzelnen Fermentationsansätze sind in **Tab. 5.1-2** dargestellt.

**Tab. 5.1-2:** Vergleich der maximalen Wachstumsraten mit und ohne Schaumvermeidungsstrategie

	Standard	maximal 6 L/h Begasung	maximal 15% DO
$\mu_{\max}$	0,331 ± 0,003	0,360 ± 0,012	0,328 ± 0,019

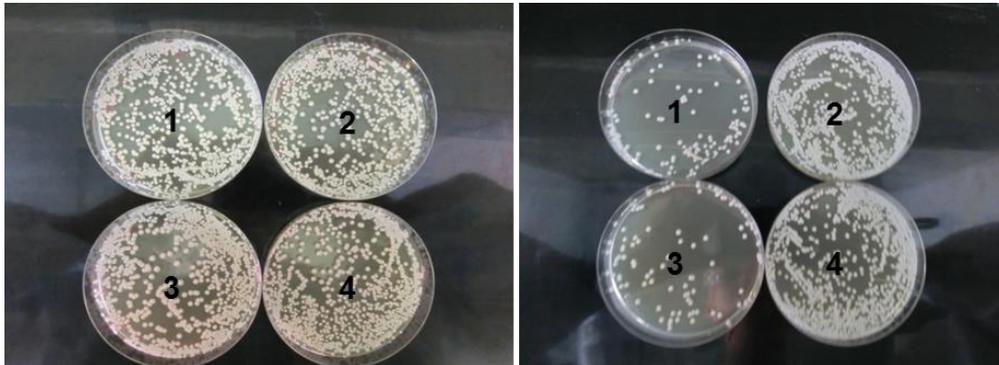
Die Schaumvermeidungsvarianten zeigten keine signifikante Beeinträchtigung des Wachstums im Vergleich zur Standardvariante. Durch die Entwicklung einer effektiven Schaumvermeidungsstrategie während der Wachstumsphase konnte eine gute, gleichmäßige und reproduzierbare Basis für die nachfolgende Biotransformationsphase geschaffen werden.

### 5.1.3 Erste Biotransformationen

Die ersten Biotransformationen wurden angelehnt an ein vorhandenes Biotransformationsprotokoll durchgeführt. Im Anschluss an die vorhergehende Wachstumsphase wurde die Biotransformationsphase durch die Zugabe des Substrates Laurinsäuremethylester gestartet. Die Temperatur lag konstant bei 30 °C und der pH Wert bei 5,8. Das Substrat wurde portionsweise im zeitlichen Abstand von 12 h zugegeben. Dabei wurde die Menge an zugeführtem Methylaurat variiert, wobei bis maximal 80 g zugegeben wurden. Um Kontaminationen ausschließen zu können, wurden regelmäßige Sterilkontrollen entnommen. Diese gaben durch die Ermittlung der koloniebildenden Einheiten (KBE) zusätzlich einen Eindruck bezüglich des Biomasseverlaufes. Die Bestimmung der Optischen Dichte ist in dem Fall eher

problematisch, da das eingebrachte, nicht in Wasser lösliche Substrat diese beeinflussen kann. Daher wurde die Bestimmung der optischen Dichte nur während der Wachstumsphase und damit in Abwesenheit des Substrates durchgeführt. Die Dauer der Biotransformationsphase lag bei 120 h.

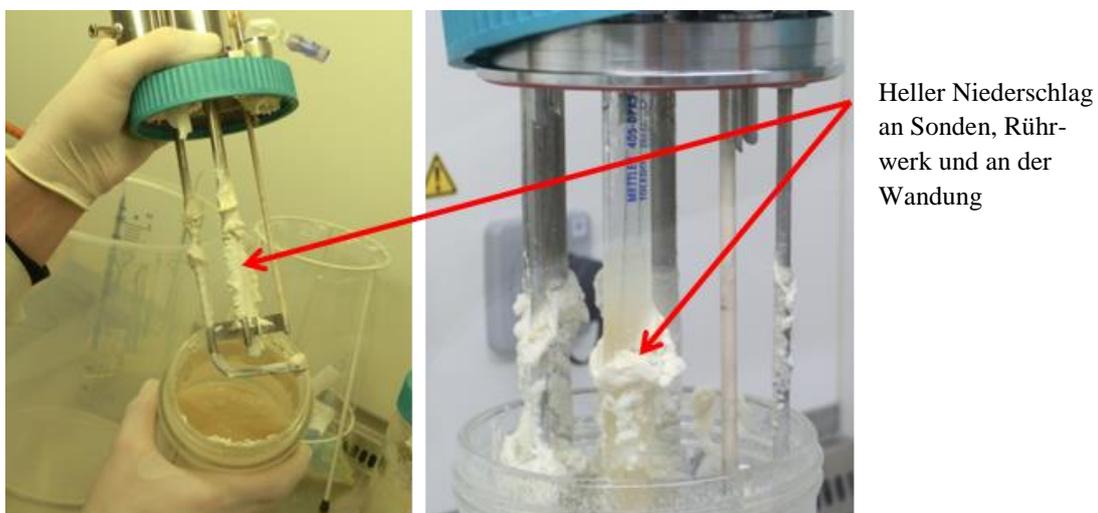
Die durchgeführten Sterilkontrollen ergaben, dass die Anzahl an KBE invers mit der zugesetzten Menge an LSME korrelierte (**Abb. 5.5**).



**Abb. 5.5: Sterilkontrollen von Biotransformationen mit unterschiedlichem LSME-Zusatz** Links sind Sterilkontrollen unmittelbar vor Beginn der Biotransformationsphase zu sehen, rechts 48 h nach Beginn. Variante 1 und 3 erhielten insgesamt doppelt so viel LSME wie 4 (Varianten 1+3 insgesamt 80 g; Variante 4 insgesamt 40 g), Variante 2 erhielt kein LSME. Der negative Einfluss des Substrates ist anhand der deutlich geringeren KBE Anzahl deutlich erkennbar.

Die Variante mit der geringeren zugesetzten LSME-Menge wies eine ähnliche Anzahl KBEs auf, wie die Kontrolle ohne jeglichen Substratzusatz, die Variante mit der größeren Menge LSME zeigte deutlich weniger Kolonien. Eine erhöhte Menge an LSME schien demnach negative und inhibierende Effekte auf die Zelldichte, bzw. auf die nach wie vor teilungsfähigen Zellen im Fermenter zu haben.

Die Beurteilung der Produktbildung während der Biotransformationsphase gestaltete sich schwierig. Über den zeitlichen Verlauf der Fermentation konnte ein stetig zunehmender, schmieriger, butterartiger Niederschlag in den Bioreaktoren beobachtet werden. In **Abb. 5.6** ist beispielhaft der Zustand eines Fermenters sowie der Einbauten, nach Ende der Biotransformation dargestellt.

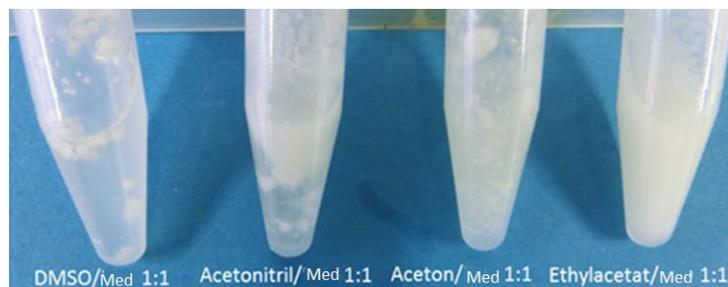


**Abb. 5.6: Fermenter nach Ende der Biotransformation** Überall im Innern des Fermenters zeigen sich schmierige, butterartige Ablagerungen. Durch die nicht vorhandene Homogenität innerhalb der Fermenter sind sichere Aussagen über den Biotransformationsverlaufes unmöglich.

Die Ablagerungen erschwerten eine Bilanzierung der Produktbildung und des Substratumsatzes erheblich, da über den Verlauf der Biotransformation keine homogene Probenentnahme möglich war. Eine klare Endpunktbestimmung war durch das Anhaften an den Fermentereinbauten ebenfalls nicht möglich. Um mehr Informationen über den Niederschlag zu gewinnen und zukünftig eine höhere Homogenität während der Biotransformation zu ermöglichen, wurden Löslichkeitsversuche mit den entnommenen Proben des Niederschlags durchgeführt. Dazu wurden die Proben jeweils mit Dimethylsulfoxid (DMSO), Acetonitril, Aceton und Ethylacetat versetzt, sowie mit einem 1:1 Gemisch des jeweiligen Lösungsmittels und OPT1-Medium. Die Proben wurden im Verhältnis 1:6 (m/v) Probe zu Lösungsmittel bzw. wässriges Lösungsmittelgemisch gemischt. **Abb. 5.7** zeigt das Löseverhalten der Proben verdünnt mit den genannten Lösungsmitteln, ohne zusätzlichen wässrigen Anteil.



**Abb. 5.7:** Löslichkeitsversuche der Fermentationsproben in verschiedenen Lösungsmitteln. Untersucht wurde die Löslichkeit des Niederschlags in DMSO, Acetonitril, Aceton und Ethylacetat. Die Proben wurden sechsfach mit dem entsprechenden Lösungsmittel verdünnt. Wie zu erkennen ist, löst sich die Probe vollständig in DMSO und unzureichend in den anderen Lösungsmitteln.



**Abb. 5.8:** Löslichkeitsversuche der Fermentationsproben in verschiedenen Lösungsmitteln, gemischt mit OPT-1 Medium im Verhältnis 1:1. Bei keinem der Gemische kann eine vollständige Lösung der Proben beobachtet werden, allerdings ergibt die Mischung in Ethylacetat eine relativ gleichmäßige Emulsion.

**Abb. 5.8** zeigt das Lösungsverhalten der Proben in den 1:1 Gemischen der Lösungsmittel und dem OPT1-Medium. Ein Lösen der Proben konnte bei keinem der Gemische beobachtet werden, allerdings zeigte sich die Emulsion des Ethylacetats, Medium und Probengemisches homogener als die anderen Mischungen. Weiterhin wurde der Einfluss unterschiedlicher pH-Werte in wässriger Lösung untersucht. Dazu wurden die Proben im Verhältnis 1:6 (m/v) mit Tris-Puffer der pH-Werte 6; 6,5; 7; 7,5 und 8 versetzt, wobei die Löslichkeit mit steigendem pH-Wert augenscheinlich besser wurde, es jedoch zu keiner vollständigen Lösung der Proben innerhalb von 24 h kam.

### 5.1.4 Anpassung der Biotransformationsanalytik

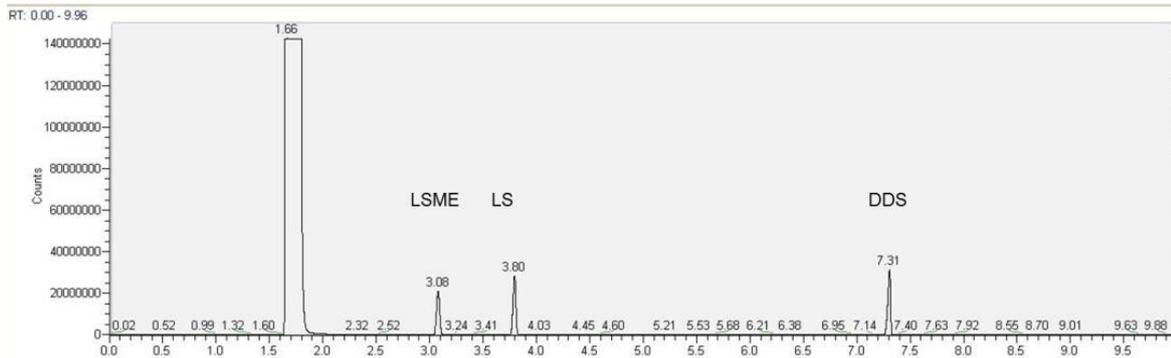
Um den Verlauf der Substrat-, Intermediat- und Produktkonzentrationen analysieren zu können, wurde eine bereits etablierte High Performance Liquid-Chromatography Methode in Kombination mit der Detektion durch Massenspektrometrie (HPLC/MS-Methode) abgewandelt. Die vorhandene Methode diente zur Analyse von Proben, die LSME, LS und DDS jeweils in Konzentrationsbereichen zehntausendfach niedriger als die der Biotransformation enthielten. Da starke Verdünnungen zu größeren Abweichungen führen können und die Analytik erheblich mehr Aufwand bedeutet, wurde die Methode angepasst. Die Chromatographie-Methode wurde nahezu beibehalten, allerdings wurde das Detektionsverfahren geändert. Von der sehr sensitiven Detektion mittels Massenspektrometrie wurde auf die auch bei höheren Konzentrationen stabilen Lichtstreuungsdetektion mittels eines Lichtstreuendetektors (ELSD) gewechselt. Zur Trennung der enthaltenen Komponenten wurde eine Gravity C18 Säule verwendet. Als Laufmittel dienten Mischungen (je nach Gradient) von Wasser und Acetonitril, jeweils versetzt mit 0,1% Ameisensäure. Mit dieser Methode konnten Mischungen, die LSME, LS und DDS in definierten Konzentrationen enthielten, zuverlässig qualitativ und quantitativ bestimmt werden. Der qualifizierbare Konzentrationsbereich aller drei Komponenten lag somit zwischen 0,1 und 15 mM. Bei den ersten Messungen von Fermentationsproben ergaben sich jedoch Probleme mit dieser Methode. Bevor die Proben gemessen werden konnten, mussten sie auch in diesem Fall zunächst verdünnt werden. Der Verdünnung mit Acetonitril folgte ein Filtrationsschritt (PTFE Filter, 0,2µm Porengröße) um möglicherweise enthaltene nicht lösliche Partikel zu entfernen. Eine vollständige Filtration wurde allerdings durch massive Präzipitation einiger Proben erschwert. So ließen diese sich teilweise gar nicht mehr oder nur teilweise filtrieren, was zu keinen oder verfälschten Ergebnissen führt, falls das vorgesehene Injektionsvolumen nicht korrekt aufgezogen werden kann. Da aufgrund der Probenbeschaffenheit keine zuverlässige Analyse mit dieser HPLC-Methode möglich war, musste eine alternative Methode angewendet werden.

In **Tab. 5.1-3** sind verschiedene, bereits beschriebene Methoden zur Bestimmung der Art der produzierten Disäuren und deren Quantifizierung aufgeführt. Dabei wurde der Gesamtgehalt der enthaltenen Produkte zum Teil durch Titration bestimmt. Aufgrund der schlechten Löslichkeit der protonierten Disäuren und der vielen Aufreinigungsschritte, wurde diese Methode in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet.

**Tab. 5.1-3: Beispiele von Analysemethoden zur Charakterisierung der Disäureproduktion durch Hefen**

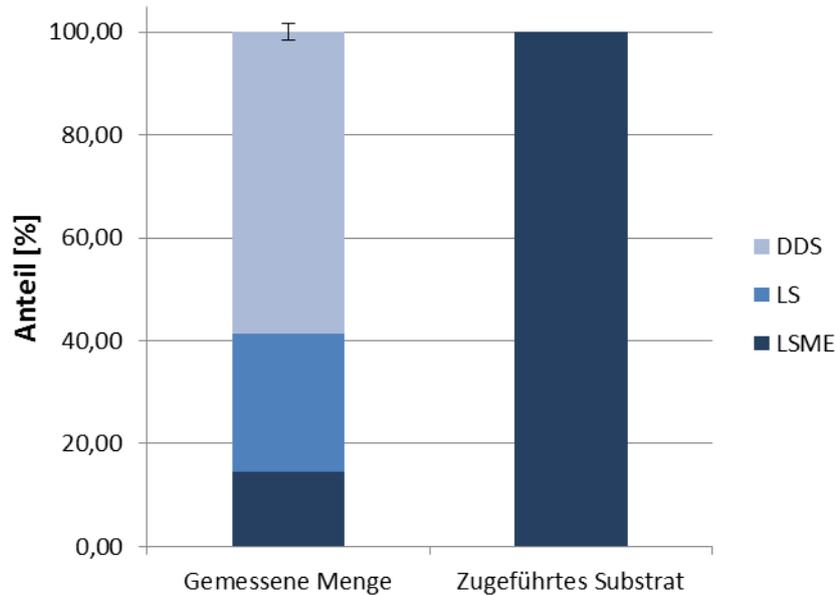
Methoden	Vorgehensweise	Produkt (Disäuren)	Referenz
Titration und GC	Titration zur Konzentrationsbestimmung: pH 10 mit NaOH, Aufkochen, Zentrifugation, Überstand 1:15 verdünnt mit Wasser, pH 2-3 mit H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , erneutes Aufkochen, abkühlen und filtrieren, mehrfach waschen mit Wasser, Lösen in erwärmter 90% EtOH Lösung und Titration mit 0,2M NaOH GC-FID zur Kompositionsbestimmung: Gefällte Disäure (s. o.) wird in Methanol gelöst, Veresterung mit BF <sub>3</sub>	C <sub>13</sub> Disäure	[32]
Titration	keine näheren Angaben	C <sub>13</sub> Disäure	[35]
GC-FID	pH 2 mit HCl dreifache Extraktion mit Diethylether Veresterung mit Diazomethan	Pflanzen Öl, hauptsächlich C <sub>16</sub> + C <sub>18</sub> Disäure	[17]
GC	Extraktion mit Hexan zur Entfernung von restlichem Substrat, Zentrifugation zum Abtrennen der Zellen, pH 2 und zweifache Extraktion mit Diethylether, Veresterung mit BF <sub>3</sub> -Methanol	C <sub>8</sub> -C <sub>18</sub> Disäuren,	[16]
GC-FID	pH 3 mit HCl, anschließend dreifache Extraktion mit Diethylether	C <sub>14</sub> + C <sub>18</sub> Disäure zweifach ungesättigt	[31]
GC-FID	Zugabe von 6N HCl Lösen in Aceton, danach trocknen Derivatisierung mit BSTFA	C <sub>14</sub> -C <sub>20</sub> Disäuren, teilweise ungesättigt	[26]
GC-FID	Abtrennung der Zellen (niedriger pH, kochen, zentrifugieren) pH 1 mit HCl zweifache Extraktion mit Diethylether	C <sub>5</sub> -C <sub>18</sub> Disäuren, Konzentrationen zwischen <1g/L und 30g/L	[30, 85]

Angelehnt an die Literatur wurde eine GC/FID Methode ausgewählt. Bei der Verwendung dieser Methode musste eine Derivatisierung der freien Hydroxylgruppen durchgeführt werden, da ansonsten eine Quantifizierung der detektierten Peaks nicht möglich gewesen wäre. Zu diesem Zweck sollte das Derivatisierungsmittel N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoracetamid (MSTFA) verwendet werden, durch das die vorhandenen Hydroxylgruppen silyliert werden. Da MSTFA auch mit Wassermolekülen reagiert, mussten die Proben möglichst wasserfrei sein. Dies schloss das einfache Verdünnen der Biotransformationsproben aus. Eine vollständige Trocknung unter Anlegen von Vakuum und anschließendes Rücklösen in einem geeigneten Lösungsmittel war zwar möglich, aber nicht reproduzierbar. Daher wurden die Proben vor der Derivatisierung durch Zugabe eines nicht mit Wasser mischbaren Lösungsmittels extrahiert. Als Lösungsmittel wird in der Literatur überwiegend Diethylether verwendet [17, 30, 31, 85]. Die hohe Flüchtigkeit dieser Substanz, sowie deren Toxizität, führten zu einer Suche nach Alternativen. Bei vergleichenden Extraktionen mit verschiedenen Lösungsmitteln zeigte sich Methyltertbutylether als gleichwertig geeignet, weswegen im Folgenden mit MTBE weitergearbeitet wurde. Um die Disäure in die organische Phase zu verschieben, wurde sie zuvor durch die Zugabe von Säure protoniert und konnte somit extrahiert werden. **Abb. 5.9** zeigt ein resultierendes Chromatogramm der verwendeten GC Methode. Dabei waren das Substrat (LSME), das demethylierte Substrat (LS) und das Produkt (DDS) jeweils gut erkennbar.



**Abb. 5.9:** Chromatogramm der gewählten GC-FID Methode zur Analyse der mit MSTFA derivatisierten Biotransformationsproben Die jeweiligen Peaks des Methylesters (LSME), der freien Säure (LS) und der Disäure (DDS) sind gut erkennbar und quantifizierbar.

Bei Untersuchungen bezüglich der Extraktionsdauer zeigte sich, dass diese keinen deutlichen Einfluss auf die Gesamtmenge der extrahierten Komponenten hat, wobei über 1, 3, 6 und 48 h extrahiert wurde. Bei den folgenden Experimenten wurde daher über 2 h extrahiert, da dieser Zeitraum, auch bei einer größeren Probenmenge genügend Spielraum für eine gleichmäßige Probenbehandlung gewährleistete. Diese Methode diente als Basis für die weitere Charakterisierung des Gesamtprozesses. Zu ihrer Evaluierung wurden zwei parallele Biotransformationen der durch die Schaumvermeidungsstrategie angepassten Standardvariante durchgeführt. Dabei wurde ein kontinuierlicher Feed von 0,5 g/Lh des Substrates gewählt. Nach einer Biotransformationsdauer von 120 h zeigte sich diese Variante erneut inhomogen. Der Niederschlag konnte allerdings leicht, durch manuelles Schütteln der Fermenter, verteilt werden. Bei diesen Experimenten konnten sowohl das Substrat, die freie Fettsäure und das Produkt nachgewiesen werden. Um die Eignung der analytischen Methode zu untersuchen, wurden Endproben nach starkem Schütteln entnommen und durch die beschriebene Extraktion und GC-Methode analysiert. **Abb. 5.10** zeigt den Vergleich Stoffmenge der zugeführten Menge Substrat zu der gemessenen Summe der Stoffmengen aus LSME, LS und DDS. Die Bilanz der Biotransformation konnte geschlossen werden, was bedeutete, dass alle enthaltenen relevanten Komponenten durch die gewählte Methode nachgewiesen werden konnten.



**Abb. 5.10: Bilanzierung einer Biotransformation unter Anwendung der etablierten analytischen Methode** Der Vergleich der zugeführten „Sollmenge“ und der mit MTBE extrahierten und mit der GC-FID Methode gemessenen „Istmenge“ zeigt, dass alle Komponenten wiedergefunden werden können und die Bilanz damit geschlossen werden kann. Die DDS Konzentration betrug zu diesem Zeitpunkt etwa 30 g/L. Der angegebene Fehler (Standardabweichung) bezieht sich auf die Summe der gemessenen Menge der Komponenten LS, LSME und DDS zweier Biotransformationsansätze.

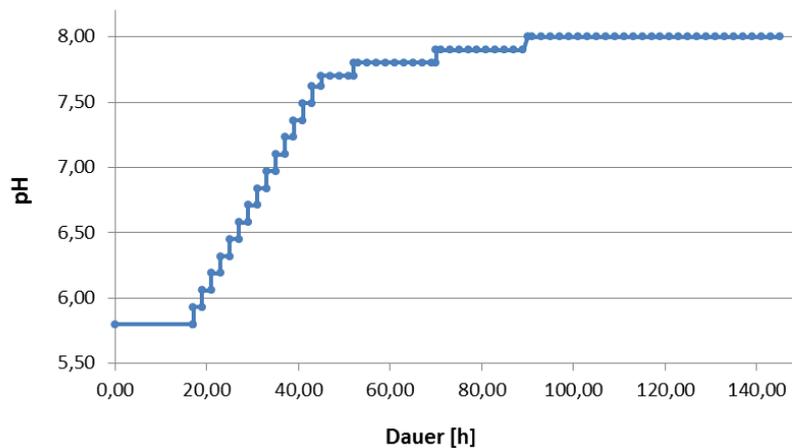
### 5.1.5 Steigerung der Homogenität während der Biotransformation

Um den Verlauf und Erfolg der Biotransformation beurteilen zu können, galt es die Niederschlagsbildung möglichst vollständig zu unterbinden. Hierfür wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Zum einen wurde der Fermentationsbrühe Ethylacetat zugesetzt, zum anderen wurden verschiedene pH-Shift Varianten untersucht.

Bei den zuvor durchgeführten Löslichkeitsversuchen des Niederschlags in Medium/Lösungsmittel Gemischen im Verhältnis 1:1, führte die Verwendung von Ethylacetat zur gleichmäßigsten Emulsion. Daher sollte der Zusatz geringer Mengen dieses Lösungsmittels zum Zeitpunkt des ersten Anzeichens der Niederschlagsbildung die Homogenität innerhalb des Fermenters erhöhen. Allerdings brachte dies nicht den gewünschten Erfolg. Das verwendete Ethylacetat homogenisierte die Fermentationsbrühe nicht deutlich sichtbar und es war nach wie vor keine repräsentative Probenahme möglich. Interessanterweise hatte der Einsatz des Lösungsmittels keine unmittelbar negativen Auswirkungen auf das Zellwachstum. Die entnommenen Sterilkontrollen zeigten eine ähnliche Anzahl Kolonien wie die Standardvariante ohne zusätzliche Lösungsmittelzugabe. Dies kann allerdings daran liegen, dass Ethylacetat möglicherweise, wegen des niedrigen Siedepunktes und dem hydrophoben Charakter von dem vorliegenden Luftstrom relativ schnell aus dem Medium ausgetragen worden ist.

Ein schneller pH-Shift (über eine Dauer von 1 h) von pH 5,8 auf pH 8 nach der Wachstumsphase führte ebenfalls nicht zum gewünschten Erfolg. Die entnommenen Proben zur KBE-Bestimmung zeigten eine deutlich negative Wirkung auf die Zellviabilität im Vergleich zur Standardvariante. Dabei schien die Art der verwendeten Base einen zusätzlichen Einfluss zu haben. Bei der pH Regelung durch 25%ige

Ammoniaklösung waren erheblich weniger koloniebildende Einheiten zu erkennen als bei der pH-Regelung mit 2 M NaOH-Lösung. Um die negativen Effekte zu minimieren, gleichzeitig aber die auftretenden positiven Effekte der erhöhten Produktlöslichkeit zu nutzen, wurde ein langsamer und stufenweiser pH-Shift, angelehnt an Liu et al. durchgeführt [8]. Dabei wurde die Geschwindigkeit des pH-Shiftes an die Produktbildungsrate angelehnt, wobei eine maximale, konstante Homogenität der Fermentationsbrühe angestrebt wurde. Der Shift erfolgte stufenweise um 0,13 pH-Einheiten pro 2 h, wobei die größte Änderung während der ersten 45 h erfolgte. **Abb. 5.11** zeigt den schematischen Verlauf des durchgeführten pH-Shiftes.

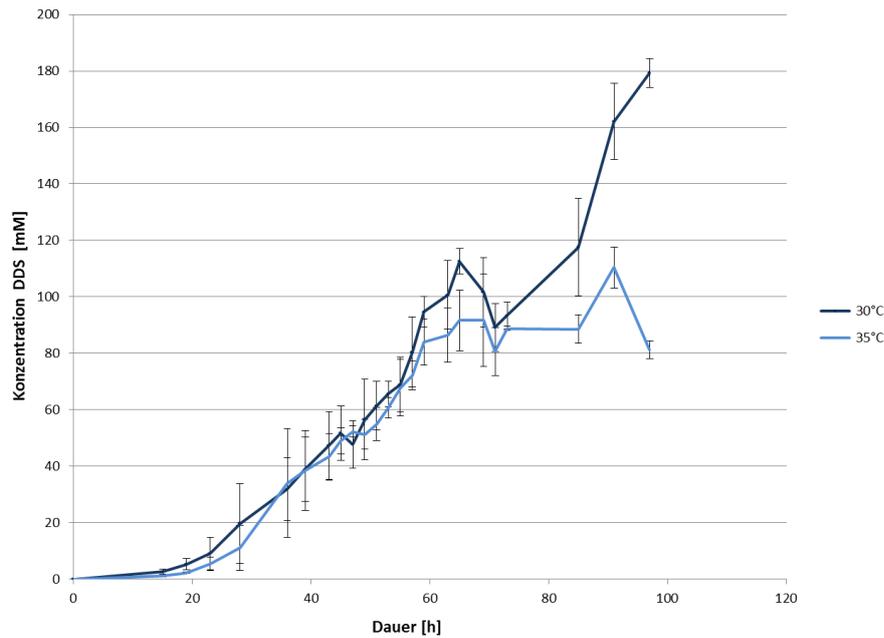


**Abb. 5.11: Schematischer Verlauf des pH-Shiftes** Nach einer Wachstumsphase von 17 h wird der pH Wert schrittweise (0,13 pH Einheiten pro 2 h) bis 7,7 durch die Zudosierung von NaOH erhöht. Nach einer Biotransformationsdauer von 90 h wird ein maximaler pH Wert von 8 erreicht.

Durch den pH-Shift wurde die Niederschlagsbildung unterbunden und eine reproduzierbare sowie charakterisierbare Phase der Biotransformation ermöglicht. In Kombination mit der entwickelten zugehörigen Analytik konnte der Einfluss unterschiedlicher Parameter auf das Biotransformationssystem untersucht werden.

### 5.1.6 Temperatureinfluss auf die Biotransformationsphase

Basierend auf den vorausgehenden Optimierungen wurden verschiedene Temperaturlevel untersucht. Für die ganzheitliche Effizienz des Prozesses ist es wichtig, die optimale Temperatur zu finden. Es wurden Experimente bei 30 und 35 °C durchgeführt, um einen möglichen Temperatureinfluss zu identifizieren. Sonstige Parameter, wie pH-Shift und Substratfeed wurden beibehalten. Besonderes Augenmerk galt jeweiligen Unterschieden in Produktbildung und Biomasseentwicklung. **Abb. 5.12** zeigt den Vergleich des DDS-Titers bei 30 °C und 35 °C.



**Abb. 5.12: Vergleich der DDS-Bildung während der Biotransformation bei unterschiedlichen Temperaturleveln** Zu Beginn zeigte sich der Verlauf der Produktbildung bei den unterschiedlichen Temperaturen sehr ähnlich, ab 60 h im Prozessverlauf konnte bei 30 °C allerdings deutlich mehr Produkt nachgewiesen werden als bei 35 °C.

Zunächst verhielt sich die Produktbildung bei beiden Temperaturvarianten ähnlich, nach einer Gesamtdauer von ca. 75 h zeigten sich bei 30 °C allerdings höhere Produkttiter als bei 35°C. Bei der Betrachtung des DDS-Titers, der Volumetrischen Aktivität, der Biomassekonzentration und der gebildeten Menge DDS pro Gramm Biotrockenmasse nach 91 h Gesamtdauer, zeigt sich der zum Teil deutlich negative Einfluss der höheren Temperatur (**Tab. 5.1-4**). Die Volumetrische Aktivität ist bei 35 °C nur noch halb so groß wie bei 30 °C. Auch der Disäure-Titer ist bei der niedrigeren Temperatur signifikant höher. Die Biotrockenmassekonzentration ist bei 37 °C zwar auf den ersten Blick größer, bezieht man allerdings die Schwankungen der BTM-Bestimmung und die Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen mit ein, unterscheiden sich beide Varianten nur noch geringfügig. Ebenso verhält es sich mit der gebildeten Menge an Disäure pro Gramm Biomasse. Die volumetrische Produktivität  $Q$  wurde dabei nach Formel 2 (siehe 4.6.2) berechnet.

**Tab. 5.1-4: Vergleich ausgewählter Prozessgrößen der Biotransformation bei 30° C und 35 °C** Alle Parameter beziehen sich auf eine Gesamtdauer von 91 h und wurden jeweils durch Triplikate bestimmt.

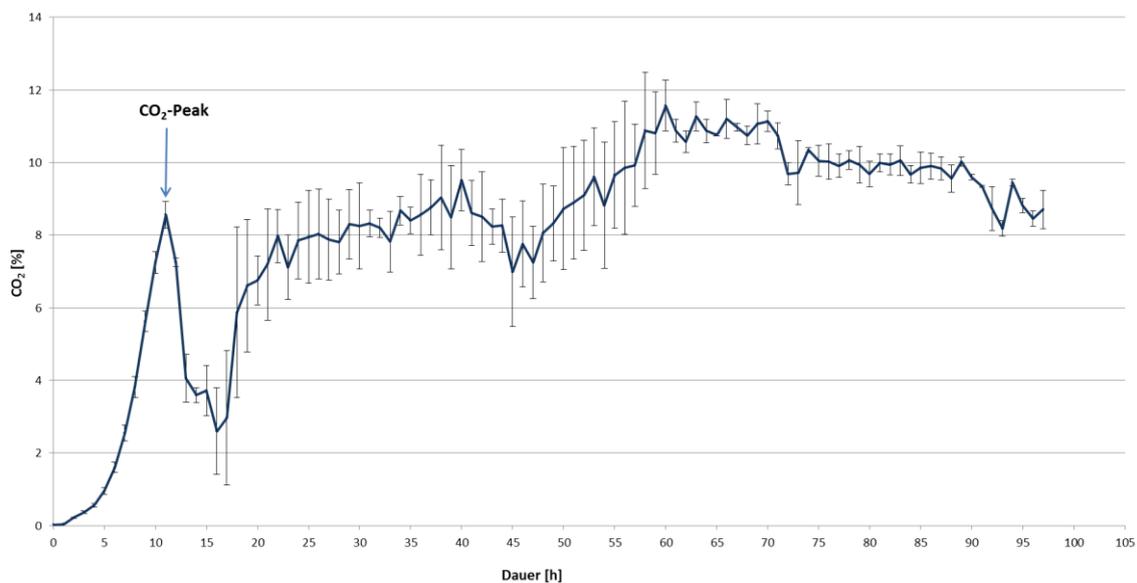
	DDS Titer [g/L]	Volumetrische Produktivität $Q$ [g/Lh]	BTM [g/L]	Menge DDS pro BTM [g/g]
<b>30°C</b>	37,32 ± 3,12	0,41 ± 0,03	22,4 ± 2,55	1,68 ± 0,24
<b>35°C</b>	25,42 ± 1,69	0,28 ± 0,02	18,77 ± 0,72	1,35 ± 0,07

Zusätzlich zu den geringeren Produktmengen, reicherten sich bei 35 °C das Substrat und die freie Säure zu einem früheren Zeitpunkt an als bei der 30 °C Variante. Aufgrund der negativen Auswirkungen des höheren Temperaturlevels wurden alle weiteren Experimente bei 30 °C durchgeführt.

### 5.1.7 Untersuchung der Substratfeedstrategie

Neben der Temperatur wurde der Einfluss unterschiedlicher Feedstrategien des Biotransformationssubstrates LSME untersucht. Dabei wurden sowohl der Startzeitpunkt des Feeds variiert, als auch die zugeführten Mengen. Bereits im Laufe der ersten Experimente zeigte sich eine gewisse hemmende Wirkung des Substrates auf die *Candida* Zellen, daher sollte der Substratfeed so angepasst werden, dass durch möglichst geringe Hemmung hohe Produktbildung erreicht werden konnte.

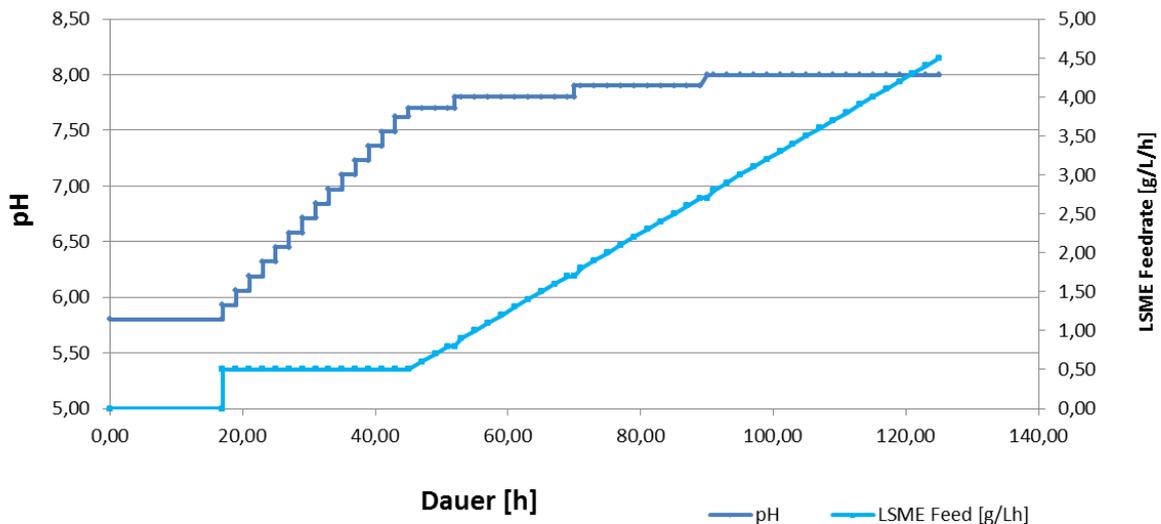
Bei der Betrachtung des geeigneten Zeitpunktes um mit der Biotransformationsphase zu beginnen, wurde ein auftretender Kohlenstoffdioxidpeak während der Wachstumsphase betrachtet. Dieser Peak zeigte sich, nachdem die im Medium von Beginn an vorhandene Kohlenstoffquelle in Form von Glucose von den Zellen aufgebraucht wurde (Beispiel **Abb. 5.13**).



**Abb. 5.13: Beispiel des CO<sub>2</sub>-Gehaltes in der Abluft im Verlauf einer Biotransformation** Zu Beginn ist ein deutlicher CO<sub>2</sub>-Peak erkennbar, zu dem Zeitpunkt an dem die im Medium enthaltene Glucose von den Zellen verbraucht wurde. Mit Einsetzen des Glucosefeeds stabilisierte sich die im Abgasstrom vorhandene Menge CO<sub>2</sub>. Um den Einfluss einer Glucoselimitierung vor Beginn der Biotransformationsphase zu untersuchen, wurde dessen Startzeitpunkt variiert.

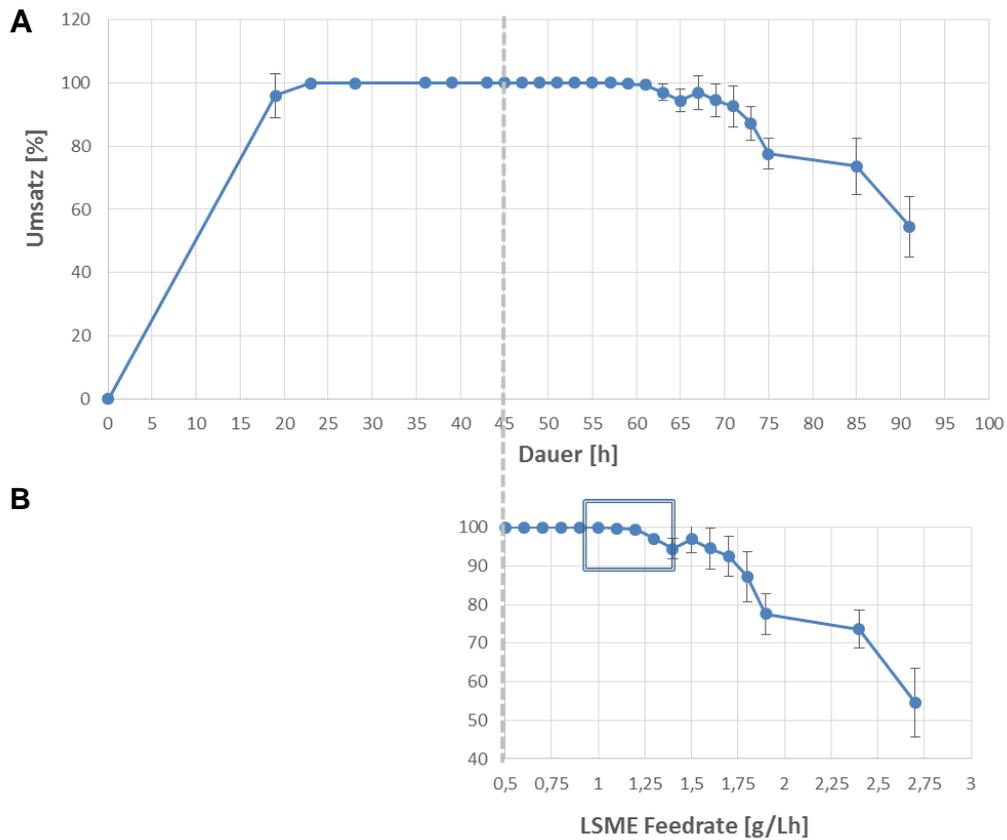
Eine mögliche Hungerphase der Zellen könnte aufgrund einer z. B. stärkeren Induzierung der am Alkan- bzw. Fettstoffwechsel beteiligten Enzyme die Umsetzung des Substrates begünstigen. Daher wurde der Substratfeed zu unterschiedlichen Zeitpunkten gestartet, allerdings ergaben diese Experimente bei einem Substratfeed von 2 g/Lh keine Produktbildung. Da mit dem gewählten System bei einer geringeren Feedrate in früheren Experimenten bereits Produktbildung erzielt werden konnte, lag die direkt von Beginn an gewählte Feedrate von 2 g/Lh zu hoch.

Um die maximale Feedrate für das gewählte System zu bestimmen, wurde diese während des pH-Shifts zunächst konstant bei 0,5 g/Lh gehalten und anschließend nach Ende des Shifts kontinuierlich gesteigert. Da sowohl der pH-Shift, als auch die Substratzugabe Stressbedingungen für die Zellen darstellen, wurde die Feedrate zunächst (für 28 h) in diesem niedrigen Bereich gehalten, bei dem zuvor bereits Produktbildung nachgewiesen werden konnte. Die Steigerung wurde danach in Schritten von 0,1 g/Lh pro 2 h durchgeführt. **Abb. 5.14** zeigt den Verlauf des pH-Shifts und des kontinuierlich gesteigerten Substratfeeds.



**Abb. 5.14: Schematischer Verlauf des pH-Shifts und der LSME Feedstrategie**

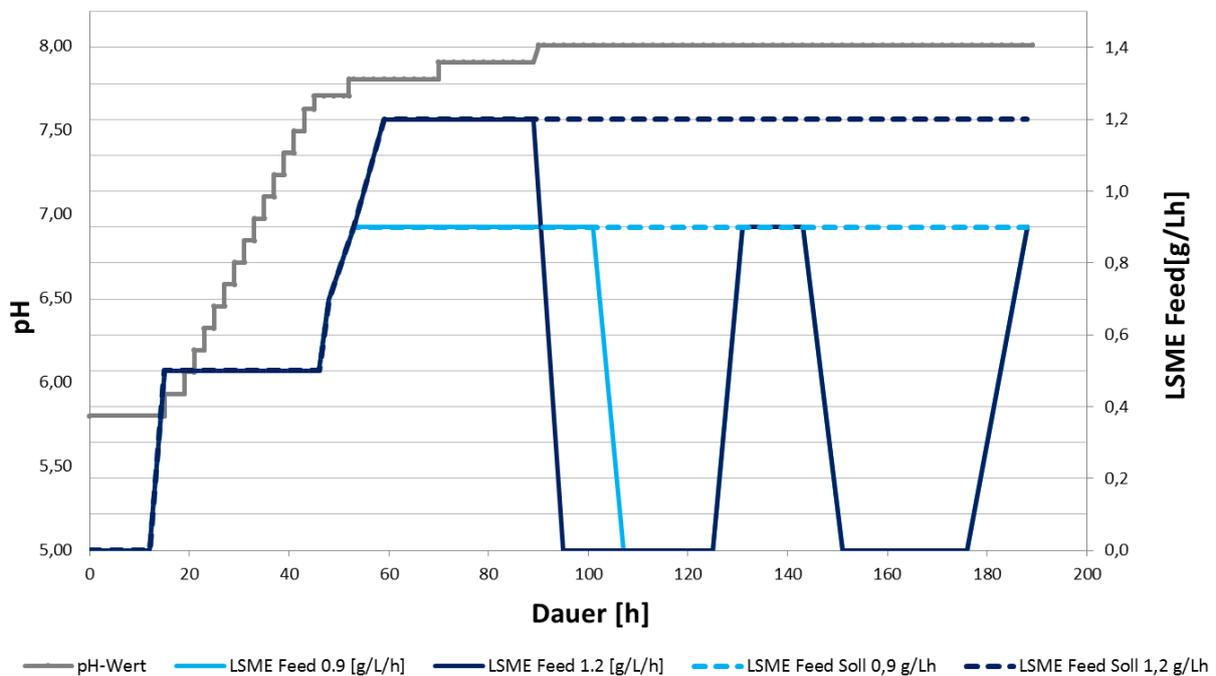
Eine optimale Feedrate sollte identifiziert werden um einen maximal effizienten Prozess zu etablieren. Eine Inhibierung der Zellen in Verbindung mit verringertem Umsatz resultiert in der Anreicherung von LSME und LS in der Fermentationsbrühe, über deren Detektion der Bereich der maximalen/optimalen Feedrate eingegrenzt werden kann. Die Produktausbeute wurde über den Vergleich der DDS-Bildung mit der zugeführten Substratmenge ermittelt und ergab das Fenster, in welchem sich die maximale Feedrate befinden sollte. **Abb. 5.15** zeigt den Verlauf des Substratumsatzes über die Dauer des gesamten Prozesses und über die zu diesem Zeitpunkt angelegte Feedrate. Bei der Betrachtung der Ausbeute ergab sich ein Bereich zwischen etwa 50 und 65 Stunden, bzw. Feedraten zwischen 0,9 g/Lh und 1,4 g/Lh, bei dem das meiste Substrat zum gewünschten Produkt umgesetzt werden konnte. Entsprechend der sinkenden Ausbeute innerhalb dieses Intervalls reicherten sich LSME und LS in der Fermentationsbrühe an, was auf die maximale Feedrate für das gewählte System in diesem Fenster hindeutet.



**Abb. 5.15: Ermittlung der maximalen Feedrate bei 30°C Biotransformation** A) Umsetzung des Substrates bezogen auf den zeitlichen Verlauf; B) Umsatz bezogen auf die zu diesem Zeitpunkt anliegende Feedrate. Das Fenster markiert den Bereich bei dem erstmalig eine Anreicherung von LSME und LS beobachtet wurde, was einen Rückgang des Substratumsatzes bedeutet. Die maximale Feedrate liegt daher im Bereich zwischen 0,9 und 1,4 g/Lh.

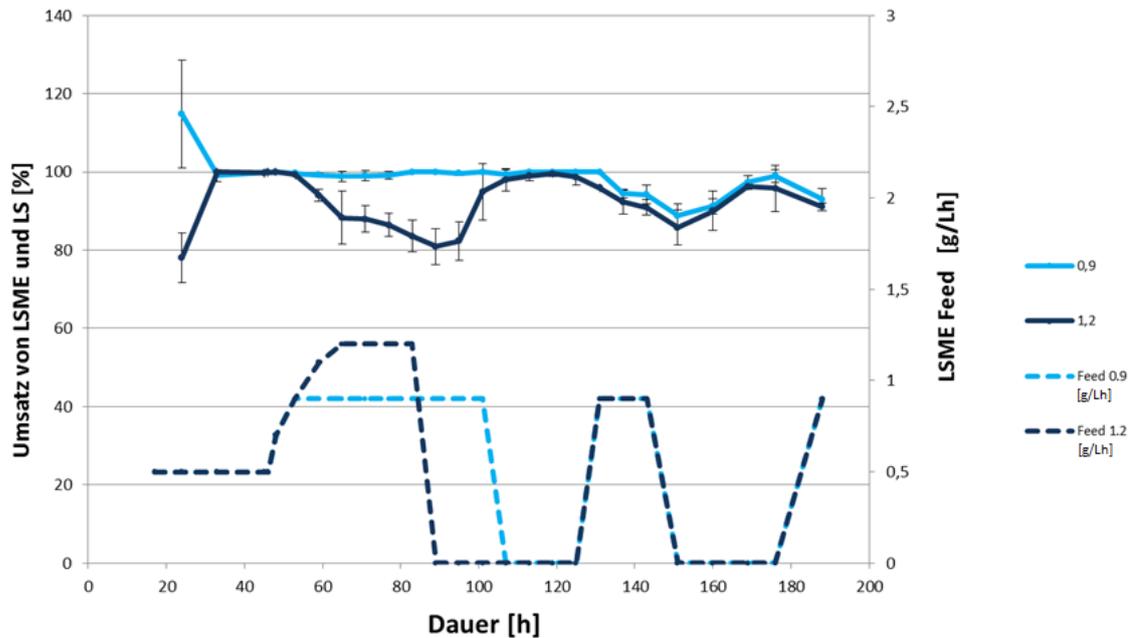
### 5.1.8 Verifizierung der maximalen Feedrate

Zur Findung der maximalen Feedrate in dem zuvor identifizierten Fenster wurden weitere Experimente durchgeführt. Dazu wurden finale Feedraten von 0,9 g/Lh und 1,2 g/Lh getestet. Der Verlauf der Feedraten war vergleichbar mit dem des vorherigen Experimentes, nur wurde nach dem Erreichen der angestrebten Feedrate vom 0,9 und 1,2 g/Lh der Substrat-Feed nicht weitergesteigert, sondern bei diesem Wert konstant gehalten. Um den Substratumsatz zu verfolgen, wurden regelmäßig Proben entnommen und mittels Dünnschichtchromatografie analysiert. Diese Methode konnte zwar nicht zur quantitativen Bestimmung der relevanten Substanzen verwendet werden, gab allerdings einen guten qualitativen Überblick über eine mögliche Anreicherung von LSME und LS. Um eine möglichst vollständige und lang andauernde Umsetzung zu erreichen und eine Hemmung der Zellen zu vermeiden, wurde bei den ersten Anzeichen der Akkumulation von LSME und LS in die Prozessführung eingegriffen und der Substratfeed unterbrochen. **Abb. 5.16** zeigt den geplanten und den tatsächlichen Feedverlauf der durchgeführten Experimente.



**Abb. 5.16:** Vergleich der geplanten und tatsächlich durchgeführten Substrat-Feed-Strategie Die gestrichelten Kurven zeigen die geplante Feedstrategie, die massiven Linien die tatsächlich durchgeführte.

Bei der Feedrate von 1,2 g/Lh konnte nach etwa 90 Stunden die erste Substratakkumulation festgestellt werden. Daraufhin wurde der Feed unterbrochen. Die Feedrate von 0,9 g/Lh zeigte ebenfalls eine Anreicherung von LSME und LS, welche allerdings verzögert (ca. 20 h später) auftrat. Bei den ersten Anzeichen der Akkumulation wurde daher auch hier der Feed ausgesetzt, und anschließend an den mittels DC vollständig nachgewiesenem Umsatz der akkumulierten Substrate, wieder gestartet. **Abb. 5.17** zeigt den mittels GC-Analyse nachträglich bestimmten Umsatz der Substrate LSME und LS und den tatsächlichen Verlauf des Substratzusatzes.



**Abb. 5.17: Betrachtung des Umsatzes der Substrate LSME und LS** Substratumsatz der Varianten mit 0,9 und 1,2 g/Lh Substratfeed. Die gestrichelten Kurven zeigen den Verlauf des Substratfeeds inklusive der Zeiten ohne Zufütterung, bis keine Akkumulation mehr beobachtet wurde. Nach der ersten Substratakkumulation und deren Wieder-Auflösung wurden beide Prozessvarianten bei 0,9 g/Lh gefahren. Sich überlappende Bereiche bedeuten einen gleichen Verlauf. Die Variante mit 0,9 g/Lh wurde in vierfacher Bestimmung durchgeführt, die Variante mit dem 1,2 g/Lh LSME-Feed wurde bis 96 h in dreifacher, ab dann in doppelter Bestimmung durchgeführt.

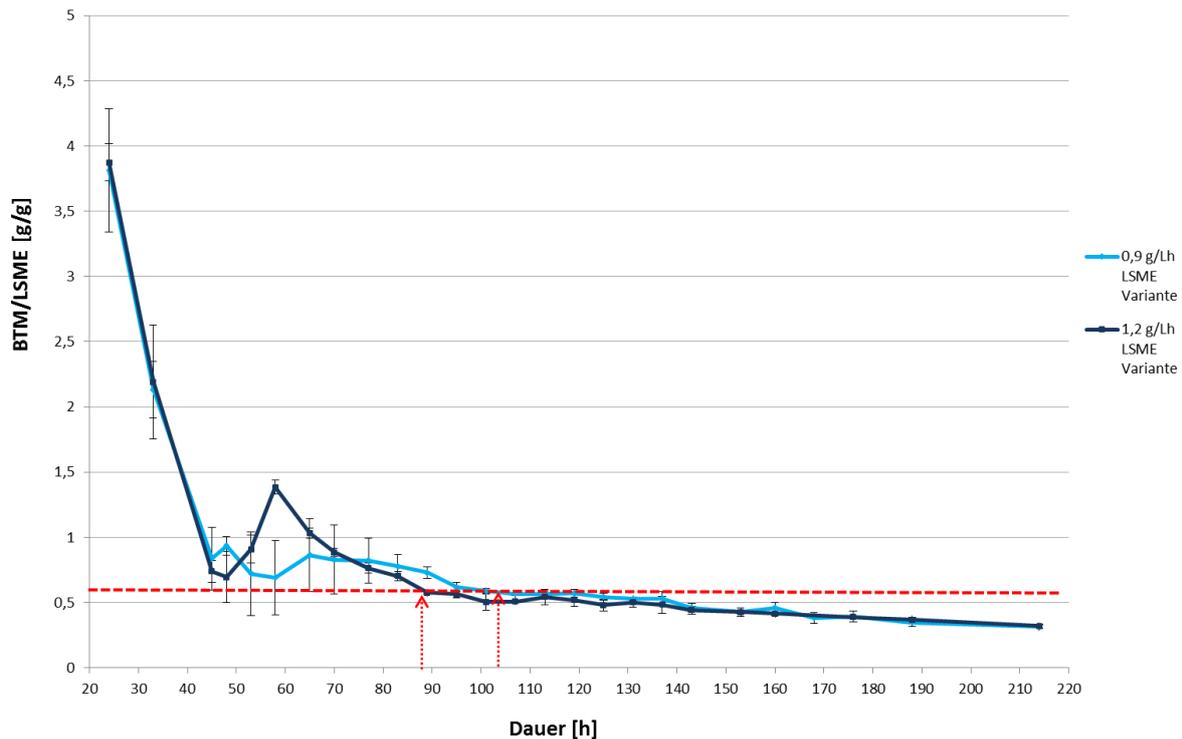
Bis zum Ende des pH-Shiftes und bei identisch gesteigertem Feed werden die zugegebenen Substratmengen vollständig umgesetzt. Nach Überschreiten der niedrigeren angestrebten Feedrate von 0,9 g/Lh sinkt der Umsatz der Variante mit der höheren Rate bis zum Aussetzen der LSME Zugabe kontinuierlich ab. Zeitnah nach der Unterbrechung der Substratzugabe nahm der Umsatz allerdings wieder zu, sodass das noch vorhandene Substrat komplett umgesetzt werden konnte. Nach der ersten Unterbrechung der Substratzuführung wurden alle Biotransformationen mit der gleichen Feedrate von 0,9 g/Lh fortgesetzt. Nach einigen Stunden sank der Umsatz erneut und der Feed wurde wieder unterbrochen. Auch nach dieser zweiten Unterbrechung stieg der Umsatz bei allen Ansätzen auf etwa 100% an, sank aber nach erneuter Substratzugabe unmittelbar wieder ab. Das Ergebnis dieser erneuten Untersuchung der optimalen Strategie der Substratzugabe ergab, dass die maximale Feedrate für das gewählte System bei etwa 0,9 g/Lh, bzw. noch etwas darunter, liegen muss.

**Tab. 5.1-5: Vergleich ausgewählter Prozessgrößen der Biotransformation bei einem LSME Feed von 0,9 g/Lh und 1,2 g/Lh** Die Variante mit 0,9 g/Lh wurde in vierfacher Bestimmung durchgeführt, die Variante mit dem 1,2 g/Lh LSME-Feed wurde bis 96 h in dreifacher, ab dann in doppelter Bestimmung durchgeführt.

	DDS Titer [g/l]	Volumetrische Produktivität [g/Lh]	BTM [g/L]	Menge DDS pro BTM [g/g]
<b>0,9 g/Lh</b>				
83 h	38,38 ± 2,19	0,46 ± 0,03	31,38 ± 1,97	1,23 ± 0,09
188 h	65,94 ± 3,57	0,35 ± 0,02	26,50 ± 2,31	2,51 ± 0,35
<b>1,2 g/Lh</b>				
83 h	44,05 ± 2,89	0,54 ± 0,03	33,60 ± 2,41	1,32 ± 0,14
188 h	60,86 ± 1,13	0,32 ± 0,01	27,02 ± 0,85	2,24 ± 0,03

**Tab. 5.1-5** zeigt den Feedeinfluss auf unterschiedliche Kenngrößen des Prozesses. Wie bereits bei der Untersuchung des Temperatureinflusses, werden der DDS-Titer, die Konzentration der Biotrockenmasse, die Volumetrische Produktivität (berechnet nach Formel 2) und die Menge des gebildeten Produktes pro Gramm Biotrockenmasse dargestellt. Um den Unterschied der Feedraten zu beurteilen, wurden die jeweiligen Werte bei einer Prozessdauer von 83 h betrachtet, da beide Feedraten bis dahin der geplanten Strategie entsprachen. Zusätzlich wurde das Ende der Biotransformationen nach 188 h betrachtet. Dabei ergab sich nach 83 h ein höherer DDS-Titer und eine höhere Volumetrische Produktivität bei einer Feedrate von 0,9 g/Lh. Der Vergleich der Biomasse und der gebildeten Menge Produkt pro Biomasse zeigte dagegen keine signifikanten Unterschiede. Nach 188 h waren keine signifikanten Unterschiede in allen Größen zu beobachten. Dies könnte daran liegen, dass die Feedmenge bis zu diesem Zeitpunkt so weit angepasst wurde, dass alle Ansätze eine nahezu identische Menge LSME erhalten hatten. Der maximal erreichte Titer lag mit dieser Feedstrategie bei etwa 66 g/L.

Bezieht man die zum jeweiligen Zeitpunkt vorliegende Biotrockenmasse mit in die Betrachtung ein, ergibt sich eine Mindestmenge an *Candida* Zellen, die notwendig ist, um jeweils ein Gramm LSME vollständig umsetzen zu können. **Abb. 5.18** zeigt den Verlauf der Biotrockenmasse pro zugesetzter Menge LSME. Kommt es zu keiner Substratakkumulation, reicht die vorhandene Biomasse aus, um einen vollständigen Umsatz zu gewährleisten. Reichern sich die Substrate an, ist die vorliegende Menge Biomasse nicht mehr ausreichend. Die Zeitpunkte der ersten beobachteten Akkumulationen von LS und LSME sind durch die rot gestrichelten Pfeile markiert und bilden die Grundlage der rot-gestrichelten Grenze. Dieser Grenzwert liegt bei etwa 0,575 g Biotrockenmasse pro Gramm zugeführtem Substrat. Bei bekannter Biomasse während der Biotransformation kann so gezielt die maximale Menge an Substrat zugeführt werden um einen stabilen, optimalen Umsatz zu erreichen. Der zusätzliche Vergleich der zugeführten Menge Substrat und der theoretisch und tatsächlich resultierenden Produktbildung, bezogen auf die jeweilige Menge Biomasse, unterstützte dieses Ergebnis. Dies zeigt deutlich die direkte Abhängigkeit des Umsatzes von der vorhandenen Biomasse.

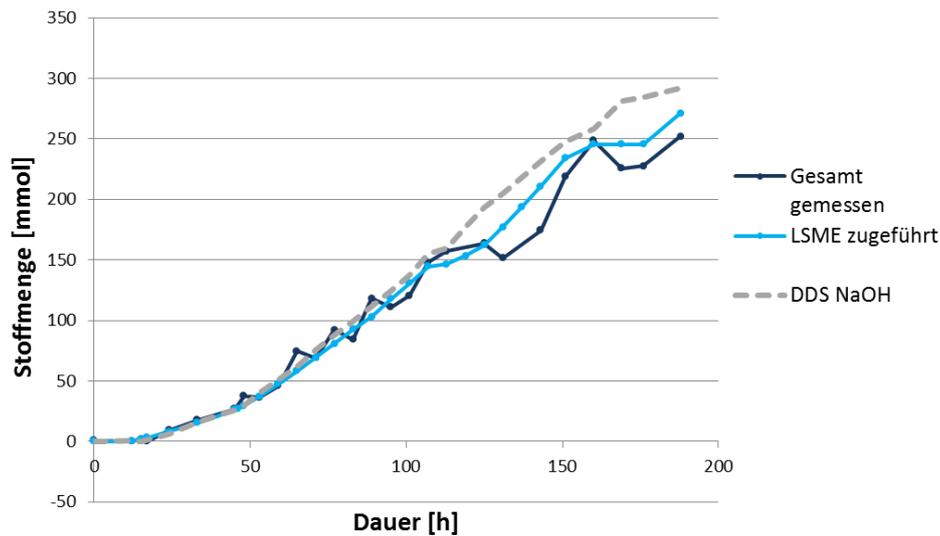


**Abb. 5.18:** Identifizierung der benötigten BTM-Mindestmenge zum vollständigen Substratumsatz. Der Zeitpunkt der ersten Substratakkumulation zeigt, dass pro Gramm zugeführtem LSME je 0,575 g BTM für einen vollständigen Umsatz benötigt werden.

### 5.1.9 Erneute Betrachtung der Bilanzierung

Bei der Betrachtung aller gemessenen Mengen der Komponenten DDS, LS und LSME kam es zum Teil zu erheblichen Abweichungen im Vergleich zur zugeführten Menge des Substrates. Dies könnte die Bildung von Nebenprodukten oder den Abbau des Substrates bedeuten. Im Zuge der angewendeten analytischen Methoden gab es aber keine Hinweise auf die Bildung von Nebenprodukten, wie beispielsweise kürzerkettigen organischen Säuren. **Abb. 5.19** zeigt beispielhaft die Bilanzierung eines Biotransformationsansatzes (Untersuchung der maximalen Feedrate). Es zeigten sich bei den einzelnen Bilanzen die größten Abweichungen in der späteren Phase der Biotransformation. Eine weitere Ursache für die auftretenden Differenzen in den Bilanzen könnte eine nicht vollständige Erfassung aller Komponenten durch die Analytik sein. Mit Hilfe der einfachen MTBE-Extraktion und der anschließenden Derivatisierung und GC-Analyse, konnten die Bilanzen zuvor zuverlässig geschlossen werden. Allerdings wurden dabei nur Biotransformationen mit einer maximalen Konzentration von ca. 30 g/L betrachtet. Um weitere Informationen zu erhalten wurde zusätzlich die Basenzugabe betrachtet. Dabei wurden die benötigten Mengen für den pH-Shift und die Neutralisation möglicher Stoffwechselprodukte bei Wachstum ohne Zusatz von LSME durch den Vergleich mit einer Kontrolle berücksichtigt.

**Abb. 5.19** zeigt weiterhin den DDS-Verlauf basierend auf der zugeführten Menge Base, wobei die gemessenen Mengen der Laurinsäure zuvor abgezogen wurden. Die genaue Berechnung kann Formel 3 (siehe 4.6.3) entnommen werden.



**Abb. 5.19: Vergleich einer Beispiel-Bilanzierung mit der theoretischen Menge gebildeter Disäure** Beispiel für die Bilanzierung einer der Fermenter zur Verifizierung der optimalen Feedrate. Die Abweichungen werden während des späteren Verlaufs der Biotransformationen größer. Die theoretische Stoffmenge der Disäure wurde von der zudosierten Menge Natronlauge abgeleitet und mit der tatsächlich gemessenen Menge DDS und der tatsächlich zugegebenen Menge LSME verglichen.

Die Endproben der Biotransformationsbrühe wurden zusätzlich hinsichtlich verschiedener Nebenprodukte wie Essigsäure, Milchsäure und Ethanol mittels einer HPLC-UV-VIS Methode untersucht, wobei sich auf diese Substanzen keine Hinweise ergaben. Die Möglichkeit, dass die Analysemethode nicht zur Detektion größerer Mengen der Disäure geeignet war, erschien immer noch wahrscheinlich. Da die Proben hin zu dem geeigneten Konzentrationsbereich verdünnt wurden, in dem sie zuverlässig quantifiziert werden konnten, schien das Problem nicht in der GC-FID-Methode selbst, sondern in der Extraktion oder Derivatisierung zu liegen. Da die Löslichkeit der Disäure sehr stark pH Wert abhängig ist, muss bei der Herstellung einer wässrigen Lösung mit definierter Konzentration gegentitriert werden, um die Disäure vollständig zu lösen und in Lösung zu halten. Daher wurden entsprechende Mengen des Feststoffes eingewogen, dem Fermentationsmedium (ohne Zellen) zugesetzt und mit einer 4M NaOH Lösung gegentitriert bis sich der pH-Wert bei 8 eingependelte. Bei diesem pH Wert sollte die Säure vollständig deprotoniert vorliegen und vollständig in Lösung gehen. Mit diesen Proben, bei denen die Konzentration bekannt war, wurden verschiedene Extraktionsversuche durchgeführt. Die wässrige Phase wurde vor der Extraktion verdünnt, das Lösungsmittelvolumen erhöht und eine mehrstufige Extraktion durchgeführt. Als Vergleich wurde auch die Standardvariante zur Analyse der definierten Proben verwendet. Bis zu einem Konzentrationsbereich von etwa 200 mM zeigt sich die bisher verwendete Methode als zuverlässig und verwendbar. Bei höheren Konzentrationen werden die Abweichungen allerdings zu groß. Dies deckt sich ebenfalls mit den betrachteten Bilanzen der bisher betrachteten Biotransformationen. Ab ca. 45 g/L DDS (entspricht ca. 200 mM) beginnen die Soll- und Ist-Menge voneinander abzuweichen. Die Verdünnung der wässrigen Phase brachte zwar Verbesserungen, aber nur bis zu einem Konzentrationsbereich von ca. 90 g/L (entspricht etwa 400 mM). Für höhere Konzentrationen erwies sich eine mehrstufige Extraktion als geeignet.

## 5.2 Identifizierung geeigneter Cytochrom P450 Monooxygenasen

### 5.2.1 Auswahl geeigneter Cytochrom P450 Varianten

Zur Auswahl geeigneter Cytochrom P450 Monooxygenasen (CYP) für die selektive  $\omega$ -Oxidation von Laurinsäuremethylester und Laurinsäure, wurde eine intensive Literaturrecherche durchgeführt. Dabei lag der Fokus auf CYP Proteinen aus der Spezies *Candida*, um möglichst nah am späteren Biotransformationssystem zu sein. Dabei waren die Vertreter der CYP52 Familie vielversprechend, da ihre zentrale Rolle bei der natürlichen Oxidation von aliphatischen Substraten durch Hefen gut beschrieben ist. Diese Enzyme gehören der Klasse II Monooxygenasen an, sind strikt Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) abhängig, membrangebunden und benötigen zum erfolgreichen Elektronentransfer eine zusätzliche Reduktase. Als Grundlage für die Recherche dienten verfügbare Informationen über Substratspektrum, Selektivität, beobachtete Überoxidation sowie bereits beschriebene rekombinante Expression der Enzymsysteme. **Tab. 5.2-1** zeigt eine Übersicht über bereits beschriebene CYP52 Varianten aus verschiedenen *Candida* Spezies.

Zusätzlich wurden weitere CYPs pflanzlichen Ursprungs anhand von Sequenzinformationen und Literaturhinweisen evaluiert, da bei pflanzlichen  $\omega$ -Hydroxylasen das Phänomen der Überoxidation bisher eher selten beschrieben ist [86]. Dies macht sie als Komponente für einen zukünftigen, optimierten Biotransformationsstamm interessant. **Tab. 5.2-2** zeigt eine Auswahl verschiedener, beschriebener pflanzlicher Cytochrom P450 Systeme, die die spezifische  $\omega$ -Oxidation verschiedener aliphatischer Substrate katalysieren, darunter auch Substrate der gewünschten Kettenlänge.

**Tab. 5.2-1: Auswahl verschiedener Cytochrom P450 Enzyme der CYP52 Familie aus verschiedenen *Candida* Spezies**

Gen	Organismus	Substrat	Überoxidation	rekombinante Expression	Referenz
CYP52A1	<i>C. tropicalis</i>	Hexadecan und LS, keine weiteren Substrate getestet	k. A.	<i>S. cerevisiae</i>	[22, 87, 88]
CYP52A2	<i>Candida tropicalis</i>	Hexadecan und LS, keine weiteren Substrate getestet	k. A.	<i>S. cerevisiae</i>	[87, 88]
CYP52A6	<i>C. tropicalis</i>	Hexadecan und LS, keine weiteren Substrate getestet	Wahrscheinlich ja, wegen großer AS-Sequenzähnlichkeit zu CYP52A3-Produkt	<i>S. cerevisiae</i>	[87]
CYP52A7	<i>C. tropicalis</i>	Hexadecan und LS, keine weiteren Substrate getestet	k. A.	<i>S. cerevisiae</i>	[87]
CYP52A8	<i>C. tropicalis</i>	Hexadecan und Laurinsäure, keine weiteren Substrate getestet	k. A.	<i>S. cerevisiae</i>	[87]
CYP52A12	<i>C. tropicalis</i>	Untersuchungen zum Expressionsprofil nicht zum Umsatz → Induktion: Ölsäure und Oktadecan. Keine Induktion: C <sub>18</sub> ; C <sub>18:1</sub> . Schwache Induktion: Emersol (FS-Mix C <sub>16</sub> - C <sub>18</sub> gesättigt + ungesättigt), keine weiteren Substrate getestet	k. A.		[11]
CYP52A13	<i>C. tropicalis</i>	Bevorzugt ungesättigte Substrate aber auch bei gesättigten aktiv	Geringe bis keine Überoxidation [12]. Nicht bei gesättigten FS	Sf9 Insektenzellen	[11, 12, 38]
CYP52A14	<i>C. tropicalis</i>	Untersuchungen zum Expressionsprofil nicht zum Umsatz → Induktion: Ölsäure und Oktadecan. Keine Induktion: C <sub>18</sub> ; C <sub>18:1</sub> . Schwache Induktion: Emersol (FS-Mix C <sub>16</sub> - C <sub>18</sub> gesättigt + ungesättigt), keine weiteren Substrate getestet	k. A.		[11]
CYP52A15	<i>C. tropicalis</i>	Untersuchungen zum Expressionsprofil nicht zum Umsatz → Induktion: Ölsäure und Oktadecan. Keine Induktion: C <sub>18</sub> ; C <sub>18:1</sub> . Schwache Induktion: Emersol (FS-Mix C <sub>16</sub> - C <sub>18</sub> gesättigt + ungesättigt), keine weiteren Substrate getestet	k. A.		[11]

Gen	Organismus	Substrat	Überoxidation	rekombinante Expression	Referenz
CYP52A16	<i>C. tropicalis</i>	Untersuchungen bezüglich Induktion nicht bezüglich Umsatz → keine Induktion durch Ölsäure und Oktadecan, keine Induktion durch C <sub>18</sub> ; C <sub>18:1</sub> und Emersol (FS-Mix C <sub>16</sub> - C <sub>18</sub> gesättigt + ungesättigt), keine weiteren Substrate getestet	k. A.		[11]
CYP52A17	<i>C. tropicalis</i>	Bevorzugt C <sub>12</sub> , C <sub>14</sub> , C <sub>16</sub> von getesteten Substraten (C <sub>10</sub> , C <sub>12</sub> , C <sub>14</sub> , C <sub>16</sub> , C <sub>18</sub> ; 18:1, 18:2, 18:3, 20:1) Zusätzliche Untersuchungen bezüglich Induktion nicht bezüglich Umsatz → Induktion durch Ölsäure und Oktadecan, Induktion durch C <sub>18</sub> ; C <sub>18:1</sub> und Emersol (FS-Mix C <sub>16</sub> - C <sub>18</sub> gesättigt + ungesättigt),	Überoxidation stark-abhängig vom Substrat	Sf9 Insektenzellen	[11, 12, 38, 45]
CYP52A18	<i>C. tropicalis</i>	Untersuchungen bezüglich Induktion nicht bezüglich Umsatz → Induktion durch Ölsäure und Oktadecan, Induktion durch C <sub>18</sub> ; C <sub>18:1</sub> und Emersol (FS-Mix C <sub>16</sub> - C <sub>18</sub> gesättigt + ungesättigt), keine weiteren Substrate getestet	Wahrscheinlich wie A17, da Allel		[11]
CYP52A19	<i>C. tropicalis</i>	Untersuchungen bezüglich Induktion nicht bezüglich Umsatz → keine Induktion durch Ölsäure und Oktadecan keine Induktion durch C <sub>18</sub> ; C <sub>18:1</sub> und Emersol (FS-Mix C <sub>16</sub> - C <sub>18</sub> gesättigt + ungesättigt), keine weiteren Substrate getestet	k. A.		[11]
CYP52A20	<i>C. tropicalis</i>	Untersuchungen bezüglich Induktion nicht bezüglich Umsatz → keine Induktion durch Ölsäure und Oktadecan keine Induktion durch C <sub>18</sub> ; C <sub>18:1</sub> und Emersol (FS-Mix C <sub>16</sub> - C <sub>18</sub> gesättigt + ungesättigt), keine weiteren Substrate getestet	k. A.		[11]
CYP52A3	<i>C. maltosa</i>	Bevorzugt Alkane, C <sub>16</sub> , keine Hydroxylierung von LS	Überoxidation von Alkanen	<i>S. cerevisiae</i> mit CPR aus <i>C. tropicalis</i>	[45, 46, 89, 90]

Gen	Organismus	Substrat	Überoxidation	rekombinante Expression	Referenz
CYP52A4	<i>C. maltosa</i>	Hohe Affinität zu FS, besonders C <sub>12</sub> (untersucht wurden C <sub>12,16,18</sub> ), stärkste Umsetzung der <i>C. maltosa</i> CYPs für LS, Präferenz bei kürzeren FS	Überoxidation	<i>S. cerevisiae</i> + CPR aus <i>C. tropicalis</i>	[45, 46, 89, 90]
CYP52A5	<i>C. maltosa</i>	Breites Substratspektrum, eher langkettige (C <sub>18</sub> )	5% des Produkts ω-1-Hydroxyfettsäure	<i>S. cerevisiae</i> + CPR aus <i>C. maltosa</i>	[89, 90]
CYP52A9	<i>C. maltosa</i>	Langkettige FS, Alkane werden kaum umgesetzt	Überoxidation, 5% des Produkts ω1-Hydroxyfettsäure	<i>S. cerevisiae</i> + CPR aus <i>C. maltosa</i>	[45, 89, 90]
CYP52A10	<i>C. maltosa</i>	Nur FS			[45, 89]
CYP52A11	<i>C. maltosa</i>	Nur FS			[45, 89]
CYP52A21	<i>C. albicans</i>	Bevorzugt LS, kein Dodecan	ω1-Hydroxyfettsäure	<i>E. coli</i> + Ratten-CPR	[91]

**Tab. 5.2-2: Auswahl verschiedener pflanzlicher Cytochrom P450  $\omega$ -Hydroxylasen**

Gen	Organismus	Substrat	Überoxidation	rekombinante Expression	Referenz
CYP94A1	<i>Vicia sativa</i>	C <sub>10</sub> -C <sub>16</sub> gesättigt C <sub>18:1,2,3</sub> ungesättigte FS	k. A.	<i>S. cerevisiae</i>	[54, 86, 92, 93]
CYP86A1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	FS werden C <sub>16</sub> >C <sub>18:1</sub> >C <sub>18:2</sub> >C <sub>14</sub> >C <sub>12</sub> umgesetzt, Hexadecan nicht	Keine Überoxidation	<i>S. cerevisiae</i> W(R)	[54, 86, 93-95]
CYP92B1	<i>Petunia hybrida</i>	LS, keine Umsetzung von C <sub>14,16,18</sub> FS	LS wurde nur zu Hydroxylaurinsäure umgesetzt, auch Umsatz von C <sub>18:2</sub> und <sub>18:3</sub> aber nicht zu Hydroxyfettsäure	<i>S. cerevisiae</i> AH22	[54, 86, 93]
CYP78A1	<i>Zea mays</i>	Sehr substratspezifisch für LS	Keine Überoxidation	<i>S. cerevisiae</i> AH22	[54, 86, 93, 96]
CYP76B9	<i>Petunia hybrida</i>	Umsatz von C <sub>10</sub> und C <sub>12</sub> FS	Keine Überoxidation	<i>S. cerevisiae</i> AH22	[97]
CYP94A2	<i>Vicia Sativa</i>	Bevorzugt C <sub>14</sub> FS, C <sub>12,16</sub> FS 10fach geringerer Umsatz	Überoxidation; In-Chain-Hydroxylierung	<i>S. cerevisiae</i> WAT11	[54, 86, 98]
CYP94A5	<i>Nicotiana tabacum</i>	C <sub>12,14,16</sub> FS werden umgesetzt	Überoxidation	<i>S. cerevisiae</i> WAT11	[54, 55, 86]
CYP94C1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	C <sub>12,14,16,18:1</sub> FS werden umgesetzt	Überoxidation, geringe Umsatzraten	<i>S. cerevisiae</i> WAT11	[54, 86]
CYP86A2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Geringer Umsatz von LS aber bevorzugt C <sub>18:1</sub>	k. A.	Sf9 Insektenzellen	[54, 86, 99, 100]

Gen	Organismus	Substrat	Überoxidation	rekombinante Expression	Referenz
CYP86A8	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Umsatz von C <sub>16</sub> und C <sub>18</sub> FS, gering auch C <sub>12</sub> FS	k. A.	<i>S. cerevisiae</i> WAT11 Sf9 Insektenzellen	[54, 86, 100]
CYP86A4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Geringer Umsatz von C <sub>12</sub> FS, aber wesentlich besser ab C <sub>16</sub> und länger	k. A.	Sf9 Insektenzellen	[54, 100]
CYP86B1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Bevorzugt C <sub>22</sub> und C <sub>24</sub>	k. A.		[54, 101]
CYP81B1	<i>Helianthus tuberosus</i>	Umsatz von C <sub>10</sub> , C <sub>12</sub> , C <sub>14</sub> , kein Umsatz von C <sub>16</sub> und C <sub>18</sub> FS	In-chain Hydroxylierung ω1 bis ω5	<i>S. cerevisiae</i>	[54, 86]
CYP704B1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Kein Umsatz von C <sub>12</sub> FS, bevorzugte Substrate C <sub>16</sub> , C <sub>18:1</sub> , C <sub>18:2</sub> , C <sub>18:3</sub> FS	k. A.	<i>S. cerevisiae</i> WAT11	[86, 102]
CYP704B2	<i>Oryza sativa</i>	Setzt C <sub>16</sub> und C <sub>18</sub> (gesättigt und ungesättigt) FS um Hinweise dafür dass CYP704B2 keine methylierten-FS umsetzt	k. A.	<i>S. cerevisiae</i> WAT11	[86, 103]

Basierend auf den Auswahlkriterien (Aktivität, Substratspektrum, Tendenz zur Überoxidation und rekombinante Expression) wurden vier CYPs und eine Cytochrom P450 Reduktase (CPR) ausgewählt. Die ausgewählten CYPs waren CYP52A13 aus *C. tropicalis*, CYP52A17 aus *C. tropicalis*, CYP52A5 aus *C. maltosa*, CYP78A1 aus *Zea mays* und eine CPR aus *C. tropicalis* (Tab. 5.2-3).

**Tab. 5.2-3: Finale Auswahl der ersten CYPs und der CPR zur Expression in *E. coli***

Enzym	Organismus	Substrat	Enzymatische Aktivität	Expression	Besonderheiten	Referenz
CYP52A13	<i>C. tropicalis</i>	Bevorzugt ungesättigte Substrate aber auch bei gesättigten aktiv	$\omega$ -Hydroxylierung	Sf9 Insektenzellen	Geringe Überoxidation, keine bei gesättigten Substraten; Umsatz von Methyltetradecanoat zu 14-Hydroxydecansäure	[11, 12, 38, 45]
CYP52A17	<i>C. tropicalis</i>	Bevorzugt C <sub>14,12,16</sub> , von getesteten Substraten (C <sub>10,12,14,16,18</sub> ; 18:1, 18:2, 18:3, 20:1)	$\omega$ -Hydroxylierung	Sf9 Insektenzellen	Geringe Überoxidation, in Abhängigkeit vom Substrat; Umsatz von Methyltetradecanoat zu 14-Hydroxydecansäure	[11, 12, 38, 45]
CYP52A5	<i>C. maltosa</i>	Breites Substratspektrum aber eher langkettige (C <sub>18</sub> )	$\omega$ -Hydroxylierung, sehr gering auch $\omega$ 1-Hydroxylierung	<i>S. cerevisiae</i>	5% des Produkts $\omega$ 1-Hydroxyfettsäure	[89, 90]
CYP78A1	<i>Zea mays</i>	Substratspezifisch für LS	$\omega$ -Hydroxylierung	<i>S. cerevisiae</i> AH22		[54, 86, 93, 96]
CPR	<i>C. tropicalis</i>		Regeneration der Monooxygenase durch NADPH	<i>S. cerevisiae</i>		[12]

Die Auswahl von CYP52A13 und CYP52A17 aus *C. tropicalis* erfolgte anhand der Berichte zur geringen Dicarbonsäurebildung und dem passenden Substratspektrum [12]. Beide Enzyme waren *in vivo* (mittels entsprechend modifiziertem *C. tropicalis*-Stamm) in der Lage, die Umsetzung von Methyltetradecanoat zu katalysieren [38], was für eine mögliche Umsetzung von LSME spricht. Für die CYP52A5 aus *C. maltosa* ist bisher keine Oxidation über die erste Oxidationsstufe hinaus beschrieben. Darüber hinaus besitzt sie ein breites Substratspektrum, was für eine Umsetzung des Methylesters spricht. Die pflanzliche CYP78A1 weist bisher keine Überoxidation des Substrates zur Dicarbonsäure auf, und zeigt weiterhin eine hohe Affinität zur Laurinsäure [54, 86, 93, 96]. Zusätzlich konnte sie trotz ihres pflanzlichen Ursprungs bereits erfolgreich in Kombination mit einer hefeeigenen CPR in *S. cerevisiae* exprimiert werden. Die gewählte Reduktase stammt aus *C. tropicalis*, da zwei der gewählten Monooxygenasen aus dieser Spezies stammen. Die erfolgreich beschriebene Coexpression der Monooxygenase aus Mais mit der hefeeigenen Reduktase weist auf einen erfolgreichen Ansatz mit den ausgewählten Enzymen hin. Gleiches gilt für die gewählte CPR mit der Monooxygenase aus *Candida maltosa* aufgrund ihrer relativ nahen Verwandtschaft.

Als Expressionssystem wurde das Gram-negative Bakterium *E. coli* ausgewählt. Die Aminosäuresequenzen der fünf ausgewählten Proteine wurden aus der Onlinedatenbank Uniprot ausgewählt und die

korrespondierenden Nukleotidsequenzen nach Codonoptimierung für *E. coli* mittels Gensynthese hergestellt.

### 5.2.2 Expression der ausgewählten CYPs in *E. coli*

Zunächst wurde die Expression der gewählten Enzyme im Expressionssystem *E. coli* angestrebt. Die Klonierungsstrategie beinhaltete den Expressionsvektor pACYC-Duet-1 (Novagen), welcher die Expression zweier Gene bei nur einer Antibiotikaresistenz erlaubt. Mit ähnlichen Systemen wurden bereits verschiedene CYPs erfolgreich exprimiert. Darunter waren Monooxygenasen pflanzlichen Ursprungs (z.B. CYP706B1 aus *Gossypium arboreum* [104]; CYP97A4 aus *Oryza sativa* [105]), auch in Kombination mit einer CPR aus *C. tropicalis* [104]. Mit diesem System sollten jeweils die gewählte *C. tropicalis* CPR und eine der vier CYPs coexprimiert werden. Bei der Nutzung dieser Vektoren stehen die gewünschten Gene unter der Kontrolle des starken T7 Promotors. Es muss ein Stamm verwendet werden, der den DE3 Genotyp besitzt und daher zur Expression der notwendigen T7-RNA-Polymerase fähig ist, beispielsweise BL21DE3. Bei der Wahl eines so starken Promotors kann es zu Problemen während der Expression kommen, wie zum Beispiel der Entstehung von Inclusionbodies. Daher wurde alternativ ein weiteres, in der Literatur umfangreich beschriebenes Vektorsystem verwendet, ein Derivat des pHSe5 Plasmids, der Vektor pCWori+ [70, 106]. Das Plasmid trägt eine Ampicillinresistenz, den tac-Promotor und kann zur Expression von einem einzelnen Zielprotein verwendet werden. Mit Hilfe dieses Vektors wurden bereits pflanzliche (z.B. CYP71AV1 aus *Artemisia annua* [104], CYP706B1 aus *Gossypium arboreum* [104]), tierische (z. B. CYP17 aus *Bos primigenius taurus* [70, 107], CYP3A4 aus *Homo sapiens* [108]) und auch eine CYP aus *C. maltosa* (CYP52A21, [91]) erfolgreich exprimiert. Um eine erfolgreiche Expression zu begünstigen und die Aktivität der gewünschten Enzyme nicht zu beeinflussen, wurde auf die Fusion mit einer Tag-Sequenz verzichtet.

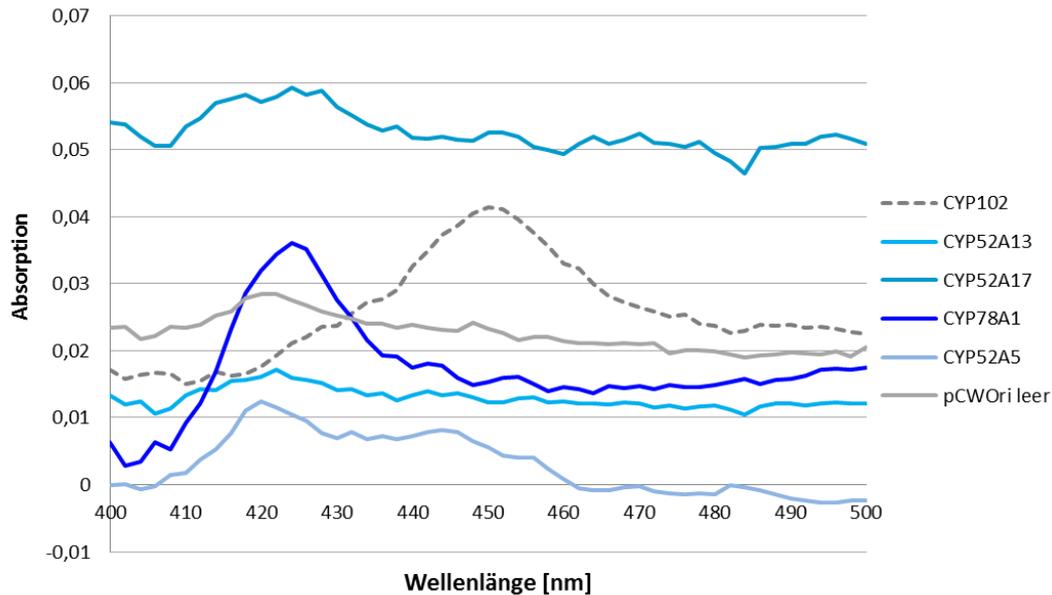
Nach erfolgreicher Klonierung der CPR-CYP Kombination in den pACYC-Duet-1 Vektor und der einzelnen Proteine in den pCWori+ Vektor wurden diese in mehreren *E. coli* Stämmen unter verschiedenen Bedingungen exprimiert (**Tab. 5.2-4**). Dies sollte die Effizienz der Expression erhöhen und somit zu funktionellen CYPs führen. Bei der Betrachtung des Proteinmusters nach dem Zellaufschluss mittels SDS-Page konnten allerdings mit keinem System eindeutige Expressionsbanden im Vergleich zur Kontrolle mit dem Leervektor identifiziert werden.

**Tab. 5.2-4: Übersicht über Expressionsbedingungen im *E. coli* System**

Expressionssystem	Medium	Temperatur	IPTG Konz	Durchmischung	Sonstiges
JM 109 + pCWOri+	Übernachtskultur in LB; danach TB	22°C 30°C 16°C	1mM	Schikanekolben oder Kolben ohne Schikanen, Rotationsschüttler bei 150 rpm	65 mg/L $\delta$ -Aminolävulin säure parallel zur Induktion; Expression über ca. 48h, 16°C Expression über 72h
BL21DE3 + pACYC-Duet-CPR	Übernachtskultur in LB; danach TB	22°C	1 mM 0,5 mM	Schikanekolben oder Kolben ohne Schikanen, Rotationsschüttler bei 150 rpm	65 mg/L $\delta$ -Aminolävulin säure parallel zur Induktion; Expression über ca. 48h
TunerDE3 + pACYC-Duet-CPR	Übernachtskultur in LB; danach TB	22°C 30°C	0,3 mM 0,1 mM	Schikanekolben oder Kolben ohne Schikanen, Rotationsschüttler bei 150 rpm	65 mg/L $\delta$ -Aminolävulin säure parallel zur Induktion; Expression über ca. 48h

### 5.2.3 Nähere Untersuchungen der in *E. coli* exprimierten Varianten

Auch wenn auf den SDS-Page Gelen keine eindeutigen Banden erkennbar waren, wurden zusätzlich CO-Spektren zum Nachweis der Expression aufgenommen. Durch die spezifische Absorption nativer CYPs während dieser Methode kann ihre Konzentration errechnet werden, unabhängig von anderen in der Probe vorhandenen Proteinen. Damit ist diese Methode deutlich selektiver als die reine Betrachtung nach Größe und Konzentration der Proteine auf dem SDS Gel. Zusätzlich liefert ein erfolgreiches CO-Spektrum weitere Informationen über den Faltungszustand der Monooxygenasen. Ein charakteristischer Peak bei 450 nm spricht für eine korrekt gefaltete Monooxygenase. Ein Peak bei 420 nm spricht für nicht intaktes Protein. Für die CO-Spektren wurde Zellaufschlussüberstand getestet, welcher nach dem Zellaufschluss mittels Ultraschall von groben Zelltrümmern mittels Zentrifugation befreit wurde. Zusätzlich wurden ganze Zellen verwendet. Als Negativkontrolle dienten Zellen die nur den Leervektor enthielten, ansonsten aber gleich wie die übrigen Proben behandelt wurden. Somit wurde sichergestellt, dass etwaige Peaks nicht unspezifisch oder durch undefinierten Zellhintergrund verursacht sind. Als Positivkontrolle diente eine Enzympräparation des *Bacillus megaterium* Proteins CYP102, sodass der korrekte Ablauf der Vorbereitungen der Aufnahme des CO-Spektrums gewährleistet werden konnte. **Abb. 5.20** zeigt beispielhaft das CO-Spektrum einer CYP-Expression mit dem Stamm *E. coli* JM109 und dem pCWOri+ Vektor. Verwendet wurde der Überstand des Ultraschallaufschlusses. Dabei ist die Absorption aller vier CYPs zu erkennen, sowie die der Leervektorkontrolle und die der Positivkontrolle. Alle CYPs (ausgenommen die Positivkontrolle) zeigen keinen signifikanten Peak bei 450 nm. Nur bei der CYP78A1 Probe ist ein signifikanter Peak bei 420 nm erkennbar, bei der CYP52A5 deutet sich ein solcher Peak an. Diese 420 nm Peaks konnten bei vielen Expressionsversuchen und bei allen Varianten beobachtet werden. Dagegen konnte während aller Expressionsversuche im bakteriellen System kein 450 nm Peak bei den untersuchten Varianten beobachtet werden, unabhängig vom verwendeten Vektor oder Stamm. Dies bedeutet, dass das Protein entweder von vorne herein nicht korrekt exprimiert wurde, oder dass es während der Isolierung Schaden genommen hat und keine signifikanten Mengen des nativen Proteins detektiert werden konnten. Auch eine Isolierung der Membranfraktion durch einen Ultrazentrifugationsschritt (100.000 g über 1 h) führte nicht zu einer Verbesserung.



**Abb. 5.20: CO-Spektrum einer CYP-Expression in JM109 mit dem Expressionsvektor pCWori+ und zusätzlicher Positivkontrolle CYP102** Untersucht wurde der Zellaufschlussüberstand nach Lysozym und Ultraschallbehandlung. Die Expression dauerte 48 h, die Temperatur lag konstant bei 30 °C und die IPTG Konzentration lag bei 1 mM. Die Positivkontrolle bestand aus einer verdünnten CYP102 Präparation und wurde parallel zu den Proben auf die gleiche Art behandelt. Sie zeigt den für native CYPs charakteristischen Peak bei 450 nm. Diesen Peak zeigt keine der untersuchten Proben. Einzig bei der CYP78A1 zeigt sich ein deutlicher Peak bei 420 nm, bei der CYP52A5 ist dieser nur angedeutet. Somit konnte keine erfolgreiche Expression auf diesem Wege detektiert werden.

Zusätzliche Aktivitätsassays wurden durchgeführt um anhand der sensitiveren Methode etwaige vorhandene aktive CYPs nachzuweisen. Hierfür wurde der Überstand des Zellaufschlusses mit NADPH und LSME versetzt und bei 30 °C für 30 min inkubiert. Die Analyse erfolgte mittels einer sehr sensitiven HPLC/MS Methode, durch welche alle Oxidationsstufen des Substrates detektiert und quantifiziert werden konnten. Dies war neben dem Methyl ester auch für Laurinsäure und ihre Oxidationsstufen bis hin zu DDS möglich. Mit dieser Methode können Konzentrationsbereiche von 5 µM bis zu 0,25 µM zuverlässig quantifiziert werden. Die Analyse der Assayproben zeigte für alle CYP-Varianten und Expressionssysteme keine Produktbildung, weder bezüglich des korrespondierenden Alkohols, dem Aldehyd noch der Säure. Da mit allen getesteten Varianten keine erfolgreiche Expression und Umsetzung des Substrates möglich war, wurde das bakterielle Expressionssystem durch ein eukaryontisches Hefesystem ersetzt.

### 5.2.4 Expression der ausgewählten CYPs im Hefesystem

Zur Expression von eukaryotischen CYPs in der Hefe *S. cerevisiae* gibt es mehrere in der Literatur beschriebene Systeme. Zunächst wurde ein kommerziell verfügbares System aus dem Shuttlevektor pAUR-123 der Firma Takara Biotech und den *S. cerevisiae* Stämmen DSM 3820 (AH22) und DSM 3797 (GRF18) verwendet. Dieses System wurde bereits von Petkova-Andonova et al. für die Expression der pflanzlichen CYP92B1 aus *Petunia hybrida* [93] und von Imaishi et al. zur Expression der ebenfalls pflanzlichen CYP76B9 aus *Petunia hybrida* [97] verwendet. Der Expressionsvektor pAUR-123 besitzt einen konstitutiven Alkoholdehydrogenasepromotor und einen Alkoholdehydrogenaseterminator. Die Ampicillinresistenz und der „Origin of replication“ ermöglichen die Selektion und Replikation in *E. coli*. Zur Selektion der erfolgreich transformierten Hefezellen trägt der Vektor ein Resistenzgen gegen das Fungizid Aureobasidin A. Zunächst wurden die Gene der CPR, CYP52A5, CYP52A13, CYP52A17 und CYP78A1 durch Einfügen der entsprechenden Restriktionsschnittstellen in den Vektor eingebracht. Anschließend folgte die Transformation in beide der ausgewählten Expressionsstämme.

Zur Evaluierung der erfolgreichen Expression wurden wiederum CO-Spektren aufgenommen. Nach 48 h Expressionsdauer wurden die Zellen geerntet um anschließend die Mikrosomen, in denen sich die membrangebundenen Monooxygenasen befinden sollten, zu isolieren. Dabei wurden verschiedene Zellaufschlussmethoden, wie Ultraschall und der mechanische Aufschluss mittels Glaskugeln angewendet. Zur Präparation der Mikrosomen wurden zwei Methoden der Literatur entnommen und modifiziert [67, 69].

Obwohl die Bedingungen der Proteinexpression und Enzymanreicherung extensiv variiert wurden, konnten für alle getesteten Stamm und Vektor Kombinationen erneut nur Peaks bei 420 nm im CO-Spektrum nachgewiesen werden. Demnach ist die rekombinante Produktion der vier CYPs zwar vorhanden, jedoch sind diese nicht korrekt gefaltet. Äquivalent zur Verfahrensweise des bakteriellen Systems wurden bei einigen Experimenten Aktivitätsassays entsprechend der *E. coli* Expressionen, durchgeführt und mittels HPLC-MS analysiert. Auch mit dem zweiten getesteten Expressionssystem konnte kein Umsatz des Substrates nachgewiesen werden.

### 5.2.5 Erweiterung des CYP-Spektrums

Um das Spektrum an potentiell geeigneten Enzymen zur effizienten selektiven Oxidation von LSME zu erweitern und aktive, charakterisierbare Enzyme zu erhalten, wurden zusätzlich zu den bisher gesuchten Hydroxylasen weitere Cytochrom P450 Enzyme aus Genbanken identifiziert. Zu diesem Zweck wurden fünf verschiedene Monooxygenasen als Referenzenzyme ausgewählt. Vier dieser Monooxygenasen stammen aus Pflanzen und wurden aufgrund ihres Substratspektrums, ihrer Spezifität und der nicht beschriebenen Überoxidation ausgewählt. Dabei lag der Fokus auf den C<sub>12</sub>-Substraten, allerdings wurden bewusst auch CYPs mit breiterem Spektrum gewählt, um zukünftig auch andere möglicherweise relevante Substrate umsetzen zu können. Die fünfte Monooxygenase war die CYP52A17 aus *C. tropicalis*. Sie wurde ebenfalls aufgrund ihrer Spezifität für die  $\omega$ -Oxidation, der Kompatibilität zum Zielorganismus und der geringen Überoxidation aliphatischer und ungesättigter Substrate ausgewählt. **Tab. 5.2-5** zeigt eine Übersicht über die Referenzenzyme.

**Tab. 5.2-5: Übersicht über die gewählten Referenzenzyme zur Erweiterung des CYP-Spektrums**

Referenz - CYP	Organismus	Substrat	Besonderheiten	Referenz
<b>CYP94A1</b>	<i>Vicia sativa</i>	C <sub>10</sub> -C <sub>16</sub> gesättigt, C <sub>18:1,2,3</sub> ungesättigte FS	Breites Substratspektrum, keine Überoxidation	[54, 86, 92, 93]
<b>CYP86A1</b>	<i>A. thaliana</i>	FS werden C <sub>16</sub> >C <sub>18:1</sub> >C <sub>18:2</sub> >C <sub>14</sub> >C <sub>12</sub> umgesetzt	Keine Überoxidation	[54, 86, 93-95]
<b>CYP92B1</b>	<i>Petunia hybrida</i>	LS, keine Umsetzung von C <sub>14,16,18</sub> FS	Auch Umsatz von C <sub>18:2</sub> und <sub>18:3</sub> aber nicht zu Hydroxy-FS, Umsatz von LS nur zu Hydroxylaurinsäure	[54, 86, 93]
<b>CYP76B9</b>	<i>Petunia hybrida</i>	Umsatz von C <sub>10</sub> und C <sub>12</sub> FS	In DSC keine weiteren Metaboliten zu erkennen, spricht gegen Überoxidation	[97]
<b>CYP52A17</b>	<i>C. tropicalis</i>	Bevorzugt C <sub>14,12,16</sub> von getesteten Substraten (C <sub>10,12,14,16,18</sub> ; 18:1,18:2,18:3,20:1)	Geringe Überoxidation stark abhängig vom Substrat; Umsatz von Methyltetradecanoat zu 14-Hydroxydecansäure [38]	[11, 12, 38, 45]

Zur Identifizierung der neuen CYPs wurde ein randomisierter, auf der Aminosäuresequenz der Referenzhydroxylasen basierender Ansatz durchgeführt. Der Sequenzabgleich erfolgte mittels des Programmes BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), welches verschiedene lokale Alignments mit Sequenzen aus Datenbanken liefert. Die Übereinstimmung der neuen Sequenzen mit den Referenzsequenzen wurde bewusst variiert um ein größeres Spektrum verschiedener Enzyme zu erzielen. Unter den Sequenzen befanden sich sowohl bereits beschriebene als auch bisher nicht näher charakterisierte Enzyme. Eine Übersicht der final ausgewählten Proteine kann **Tab. 5.2-6** entnommen werden. Anhand dieses Ansatzes wurde eine breitere Diversität geschaffen. Die ausgewählten Varianten wurden mittels Gensynthese unter Anheftung eines C-terminalen His-tags und einer Codonoptimierung für *S. cerevisiae* erstellt. Die neuen Varianten wurden fortlaufend durchnummeriert – diese Benennung steht nicht in Zusammenhang mit der gängigen Cytochrom P450 Nomenklatur, sondern dient einzig der Unterscheidung in dieser Arbeit.

**Tab. 5.2-6: Übersicht über die neuen CYP Varianten**

Benennung	Ursprungsorganismus	Vergleichssequenz	Identität (Aminosäuren)	Charakterisiert
CYPi2	<i>Vitis vinifera</i> (Traube)	CYP94A1	69%	nein
CYPi3	<i>Glycine max</i> (Sojabohne)	CYP94A1	73%	nein
CYPi5	<i>Oryza sativa subsp. Japonica</i> (Reis)	CYP94A1	48%	nein
CYPi6	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CYP86A1	100%	ja
CYPi7	<i>Glycine max</i> (Sojabohne)	CYP86A1	82%	nein
CYPi8	<i>Linum usitatissimum</i> (Flachs)	CYP86A1	84%	nein
CYPi9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CYP86A1	75%	nein
CYPi10	<i>Medicago truncatula</i> (Schneckenklee)	CYP86A1	45%	nein
CYPi12	<i>Sorghum bicolor (XXX)</i>	CYP92B1	96%	nein
CYPi17	<i>Trifolium pratense</i> (Wiesenklee)	CYP76J1	33%	nein
CYPi25	<i>Candida dubliniensis</i> ATCC MYA-646	CYP52A17	74%	nein
CYPi27	<i>Penicillium marneffeii</i> ATCC 18224	CYP52A17	63%	nein

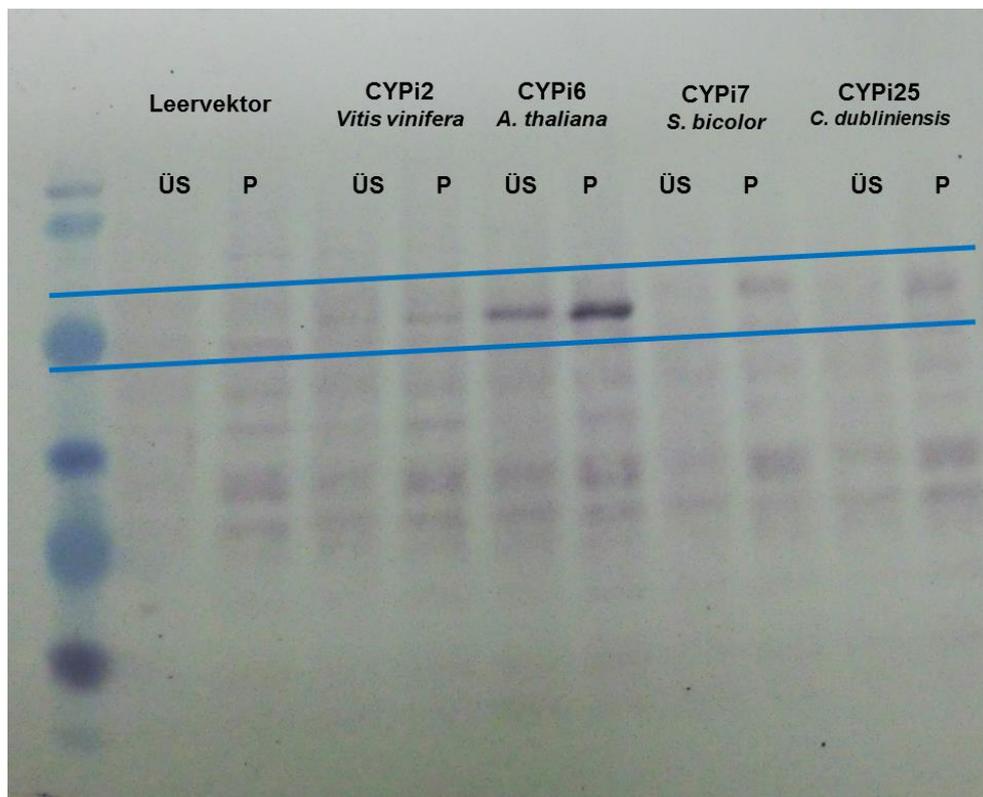
### 5.2.6 Expression der neuen CYP-Varianten

Für die Expression der neuen CYP-Varianten wurde ein weiteres Hefesystem verwendet. Die *S. cerevisiae* Stämme W(R) und WAT11 sind für die Expression von Cytochrom-P450-Proteinen besonders geeignet, da sie eine hefeeigene (W(R)) bzw. eine aus *A. thaliana* (WAT11) stammende Reduktase überexprimieren [67]. In Kombination mit dem Expressionsvektor pYeDP60 konnten bereits verschiedene CYPs exprimiert werden, darunter die Referenzenzyme CYP86A1 aus *A. thaliana* [94] und CYP94A1 aus *Vicia sativa* [92]. Die neuen CYPs wurden erfolgreich in den Expressionsvektor kloniert, womit beide neuen Expressionsstämme parallel transformiert wurden. **Tab. 5.2-7** liefert eine Übersicht der positiven Klone.

Für die positiven Klone wurden CO-Spektren aufgenommen, wobei sich erneut deutliche Peaks bei 420 nm, aber keine bei 450 nm ergaben. Um weitere Informationen über die Expression der CYPs zu erhalten, wurden diese per Western Blot untersucht. Durch den angefügten His-Tag konnte das Vorliegen der CYPi6 eindeutig bestätigt werden, bei weiteren Varianten waren die Banden zwar nicht signifikant, gaben aber ebenfalls Hinweise auf das Vorhandensein der gewünschten Proteine (**Abb. 5.21**).

**Tab. 5.2-7: Übersicht über die in verschiedene Stämme klonierten neuen CYP Varianten (alle im Expressionsvektor pYeDP60)**

CYP	<i>S. cerevisiae</i> Stamm
CYPi2	W(R)
CYPi3	W(R)
CYPi5	WAT11
CYPi6	W(R)
CYPi7	W(R)
CYPi8	WAT11
CYPi9	WAT11
CYPi10	W(R)
CYPi12	W(R)
CYPi17	W(R)
CYPi25	W(R)
CYPi27	W(R)



**Abb. 5.21: Western Blot der CYP Varianten i2, i6, i7 und i25** Der rote Rahmen kennzeichnet den Größenbereich in welchem sich die gesuchten Enzyme befinden. Variante i6 zeigt eine klare Überexpression (Spur 6 + 7). Durch den Nachweis des His-Tags der Varianten ist dieser Nachweis im Vergleich zu reinen SDS-Gelen sehr sensitiv. ÜS ist der aufgetragene Zellaufschlussüberstand, P das resuspendierte Pellet des Zellaufschlusses.

Mit den verschiedenen Varianten wurden auch Aktivitätsassays durchgeführt. Dabei zeigte sich ein geringer Umsatz von LSME zu HLS durch die CYPi27, im Überstand des Zellaufschlusses. Die isolierten Mikrosomen dagegen zeigten keine messbare Aktivität. Dies spricht dafür, dass entweder die Proteine

während der Isolierung Schaden nehmen oder nicht effizient aufgearbeitet werden können. Die beobachtete Produktbildung durch die CYP Variante i27 war allerdings sehr gering. Die Demethylierung von LSME zeigte sich im Gegensatz zur  $\omega$ -Hydroxylierung auch bei der Leervektorkontrolle und kann damit auf den Zellhintergrund zurückgeführt werden. Da nur geringe Mengen Kultur verwendet wurden (50 mL) könnte der geringe Gehalt an aktiven Monooxygenasen für die niedrige Aktivität verantwortlich sein. Daher wurde in folgenden Untersuchungen das Kulturvolumen zunächst um das Fünffache erhöht. Weiterhin wurde auf die Isolierung der Mikrosomen verzichtet und der Überstand des Zellaufschlusses vermessen. Auf CO-Spektren wurde verzichtet, da bisher auf diese Weise kein natives Protein nachgewiesen werden konnte. Bei den Versuchen mit dem erhöhten Kulturvolumen ließ sich die zuvor bereits beobachtete HLS Produktion durch die CYPi27 reproduzieren. Auch ein Ganzzellversuch, bei dem die entsprechenden Klone mit LSME versetzt wurden, zeigte bei der CYPi27 die Bildung von HLS. Die erzielten HLS-Konzentrationen betragen bei dem Ganzzellansatz allerdings weniger als  $1\mu\text{M}$ . Bei den getesteten Zellaufschlussüberständen betragen sie letztlich auch nur  $4\mu\text{M}$ , bei einer theoretischen Substratmenge von  $5\text{ mM}$ . Theoretisch deshalb, da LSME unlöslich in Wasser ist und daher unklar ist, welche Mengen tatsächlich im Assayansatz vorlagen. Um dieses Phänomen zu umgehen, wurden für nachfolgende Experimente als Substrat freie Fettsäuren verwendet, welche zuvor in DMSO gelöst wurden. Der finale DMSO Anteil im Assay betrug damit 2% (v/v). Außerdem wurde die zugesetzte Menge Substrat auf  $0,5\text{ mM}$  reduziert. Um den Gehalt an verfügbaren aktiven CYPs zu erhöhen wurde ebenfalls die Zellaufschlussmethode angepasst, indem zur Zelldisruption ein Zellhomogenisator (IUL) verwendet wurde. Dabei wurde die konzentrierte Zellsuspension in einem Durchlauf bei  $2.500\text{ bar}$  und gekühltem Kopfraum ( $5\text{ }^\circ\text{C}$ ) aufgeschlossen.

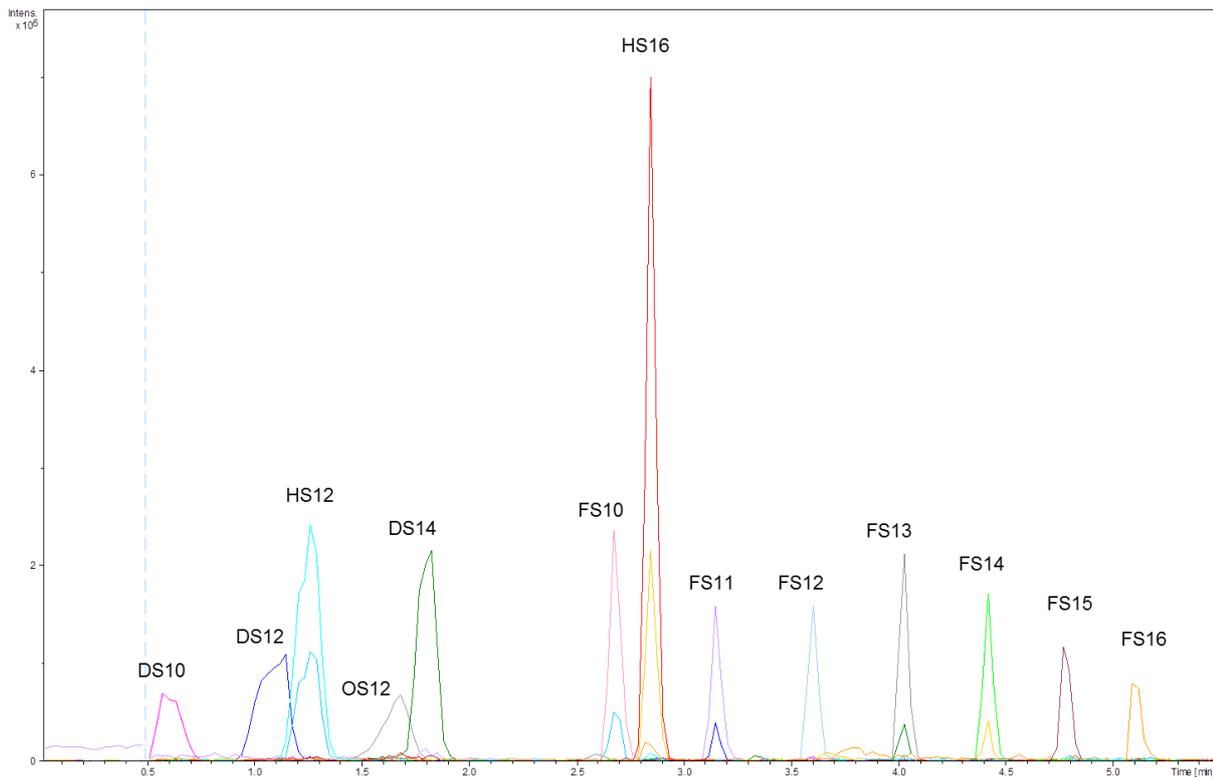
### 5.2.7 Adaptierte analytische Methode

Um die aktive Monooxygenase CYPi27 und weitere potentiell aktive Varianten hinsichtlich des Substratspektrums zu charakterisieren, musste die bestehende HPLC/MS Methode erweitert und angepasst werden. Bisher war diese auf den Nachweis von LSME sowie auf LS und die korrespondierenden Oxidationsprodukte zugeschnitten. Das zu testende Substratspektrum sollte sich über Kettenlängen zwischen  $\text{C}_{10}$  und  $\text{C}_{18}$  erstrecken. Um möglichst alle Oxidationsstufen der verschiedenen Kettenlängen nachweisen und quantifizieren zu können, wurden entsprechende Referenzsubstanzen verwendet, soweit diese verfügbar waren. Da sowohl die hydrophilste Komponente in Form der gesättigten  $\text{C}_{10}$ -Dicarbonsäure Sebacinsäure, als auch die hydrophobste Komponente in Form der gesättigten  $\text{C}_{18}$ -Fettsäure Stearinsäure zur Verfügung standen, gaben sie den Rahmen der künftigen Methode vor. Es wurde angenommen, dass sowohl alle Kettenlängen, als auch alle Oxidationszwischenstufen und Endprodukte detektiert werden können, wenn sie in ihrer Polarität zwischen der Sebacinsäure und der Stearinsäure liegen. Die verwendete Säule, die Lösungsmittel, die Flussrate sowie die angelegten Temperaturen wurden beibehalten, der Gradient und die Messdauer hingegen verändert. **Tab. 5.2-8** vergleicht die Parameter der  $\text{C}_{12}$  spezifischen und der erweiterten Methode miteinander. Mit der neuen Methode konnte allerdings nur ein Substratspektrum der Kettenlängen  $\text{C}_{10}$  bis  $\text{C}_{16}$  abgedeckt werden. Die Stearinsäure ließ sich, auch unter Optimierung der Ionisierungsbedingungen und Variation des Gradienten auf diesem Wege nicht zuverlässig detektieren. Das Spektrum wurde eingeschränkt, um die praktikable Handhabung und einen angemessenen Probendurchsatz zu ermöglichen. Mit der erhaltenen Methode konnten die verfügbaren

Referenzsubstanzen getrennt, detektiert und quantifiziert werden. **Abb. 5.22** zeigt das resultierende Chromatogramm eines Sammelstandards.

**Tab. 5.2-8: Vergleich der C<sub>12</sub> und der erweiterten C<sub>10</sub>-C<sub>16</sub> HPLC/MS Methode**

Parameter	Erweiterte Methode (C <sub>10</sub> -C <sub>16</sub> )	C <sub>12</sub> - Methode
Säule	Nucleodur Gravity C18 (Machery & Nagel) (100 x 2 mm. 1.8 mM)	Nucleodur Gravity C18 (Machery & Nagel) (100 x 2 mm. 1.8 mM)
Detektor	HCT Ionenfalle	HCT Ionenfalle
Säulentemperatur	40 °C	40 °C
Flussrate	0,7 mL/min (Splitter nach der Säule, vor dem Detektor 1:4)	0,7 mL/min (Splitter nach der Säule, vor dem Detektor 1:4)
Eluent A	Wasser + 0,1% Ameisensäure	Wasser + 0,1% Ameisensäure
Eluent B	Acetonitril + 0,1% Ameisensäure	Acetonitril + 0,1% Ameisensäure
Gemisch zu Beginn	45% A und 55% B	60% A und 40% B
Gradient	2 min bis zu 100% B, danach 2 min konstant 100% B, dann 0,5 min 55% B	5 min bis zu 100% B, danach 1 min konstant 100% B, danach 2,2 min 40% B
Messdauer	4,5 min	8,2 min



**Abb. 5.22: Ausschnitt eines Chromatogramms des erweiterten Substratspektrums** Durch Anpassung der bisher verwendeten HPLC/MS Methode konnten alle verfügbaren Referenzsubstanzen bis zu einer Kettenlänge von C<sub>16</sub> detektiert werden. FS steht jeweils für die ungesättigte Fettsäure der jeweiligen Kettenlänge, HS für die korrespondierende Hydroxysäure, OS für die korrespondierende Oxosäure und DS für die korrespondierende Dicarbonsäure. Die Sensitivität der Methode für FS10 und FS16 ist geringer, weshalb als Standards hierfür Konzentrationen von 25 µM eingesetzt wurden, HS16 führt zu einer sehr hohen Signalintensität und wurde daher in einer Konzentration von 5 µM eingesetzt, alle anderen Komponenten lagen in einer Konzentration von 5 µM vor.

### 5.2.8 Aktivitätsassays mit erweitertem Substratspektrum

Bezüglich des erweiterten Substratspektrums wurden die bereits als aktiv identifizierte CYPi27, sowie die Varianten CYPi3, i7 und i9 getestet. Als Substrate wurden die freien Fettsäuren der Kettenlänge C<sub>10-16</sub> eingesetzt. Dabei zeigten sich die Varianten CYPi3 und CYPi9 aktiv. **Tab. 5.2-9** zeigt, welche CYP welches Substrat umsetzen konnte. Bei manchen Substraten konnte keine Aussage getroffen werden, da durch Probleme während der Filtration nicht genügend Probe zur Messung vorhanden war. Diese Proben wurden mit einem grau unterlegten Fragezeichen gekennzeichnet, da die Umsetzung der Substrate nicht bestätigt oder widerlegt werden konnte. Die rot unterlegten Felder zeigten trotz erfolgreicher Messung und eindeutigem Substratnachweis keine nachweisbare Produktbildung. Die grün unterlegten Felder weisen auf einen eindeutig identifizierten Produktpeak hin.

**Tab. 5.2-9: Ergebnis des Aktivitätsassays der Varianten CYPi27, i3, i7 und i9 mit erweitertem Substratspektrum**

CYP	FS 10	FS 11	FS 12	FS 13	FS 14	FS 15	FS16
i27	?	✓	✓	✓	✓	✓	✓
i3	✗	✗	✗	?	?	?	?
i7	✗	✗	✗	?	?	✓	✓
i9	✗	✗	✓	✓	✓	✓	?

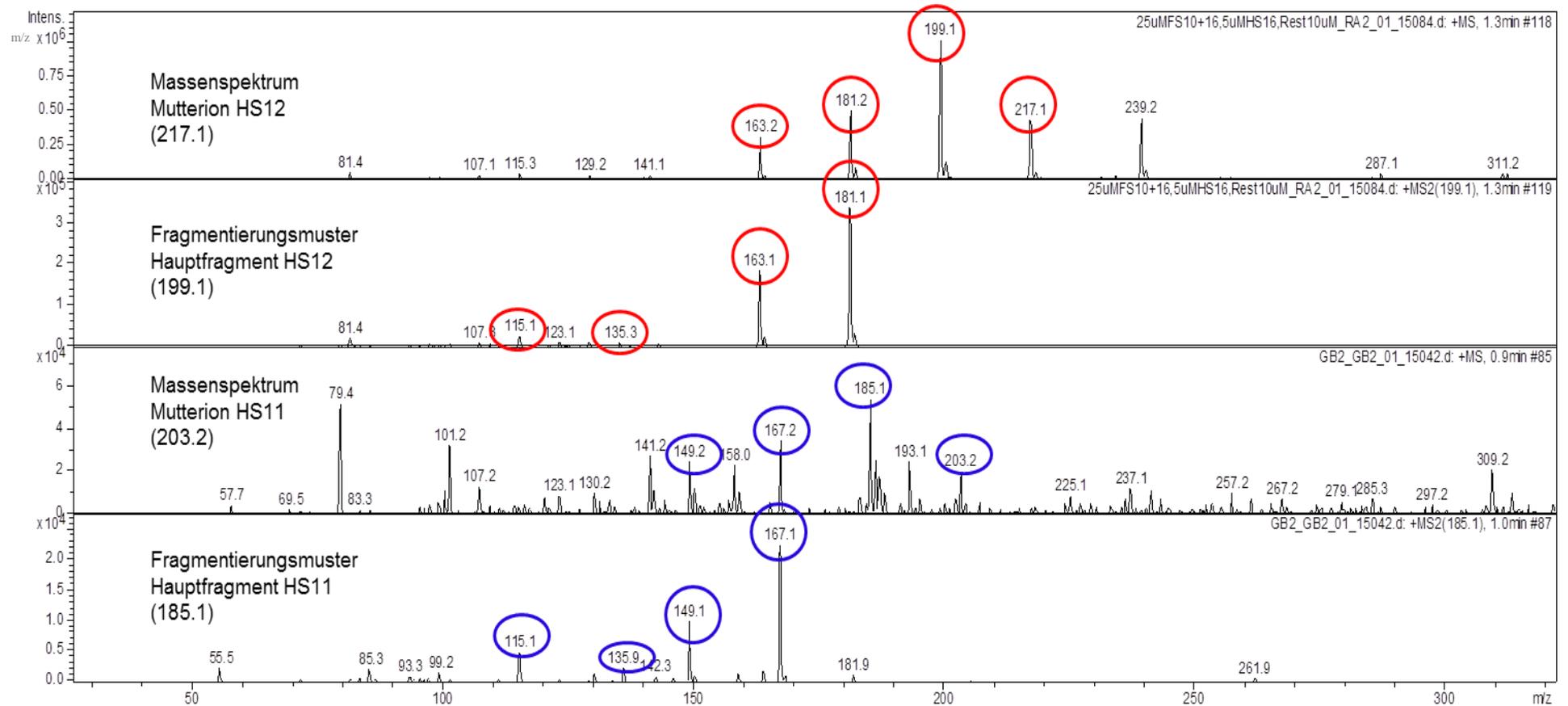
Dabei konnten keine Produkte nachgewiesen werden, welche über den korrespondierenden Alkohol hinausgingen. Bei den Hydroxysäuren konnten auch Produkte nachgewiesen werden, für die keine Referenzsubstanzen zur Verfügung standen. Darunter waren HS11, 13,14 und 15. Zur Identifizierung wurden die spezifischen Massen der Mutterionen, die logische Abfolge der Retentionszeiten sowie die charakteristischen Fragmentierungsmuster der Referenzsubstanzen herangezogen. Die Abfolge der Retentionszeiten ergibt sich aus den Kettenlängen und den Polaritäten der einzelnen Komponenten.

Innerhalb einer Kettenlänge ist die Retentionsreihenfolge: Dicarbonsäure, Hydroxysäure, Oxosäure und Fettsäure. Neben der Retentionszeit und der Masse des Mutterions gab das Fragmentierungsmuster der gesuchten Komponente Aufschluss über deren Identität. Dafür wurde das Fragmentierungsmuster von Referenzsubstanzen zum Vergleich herangezogen.

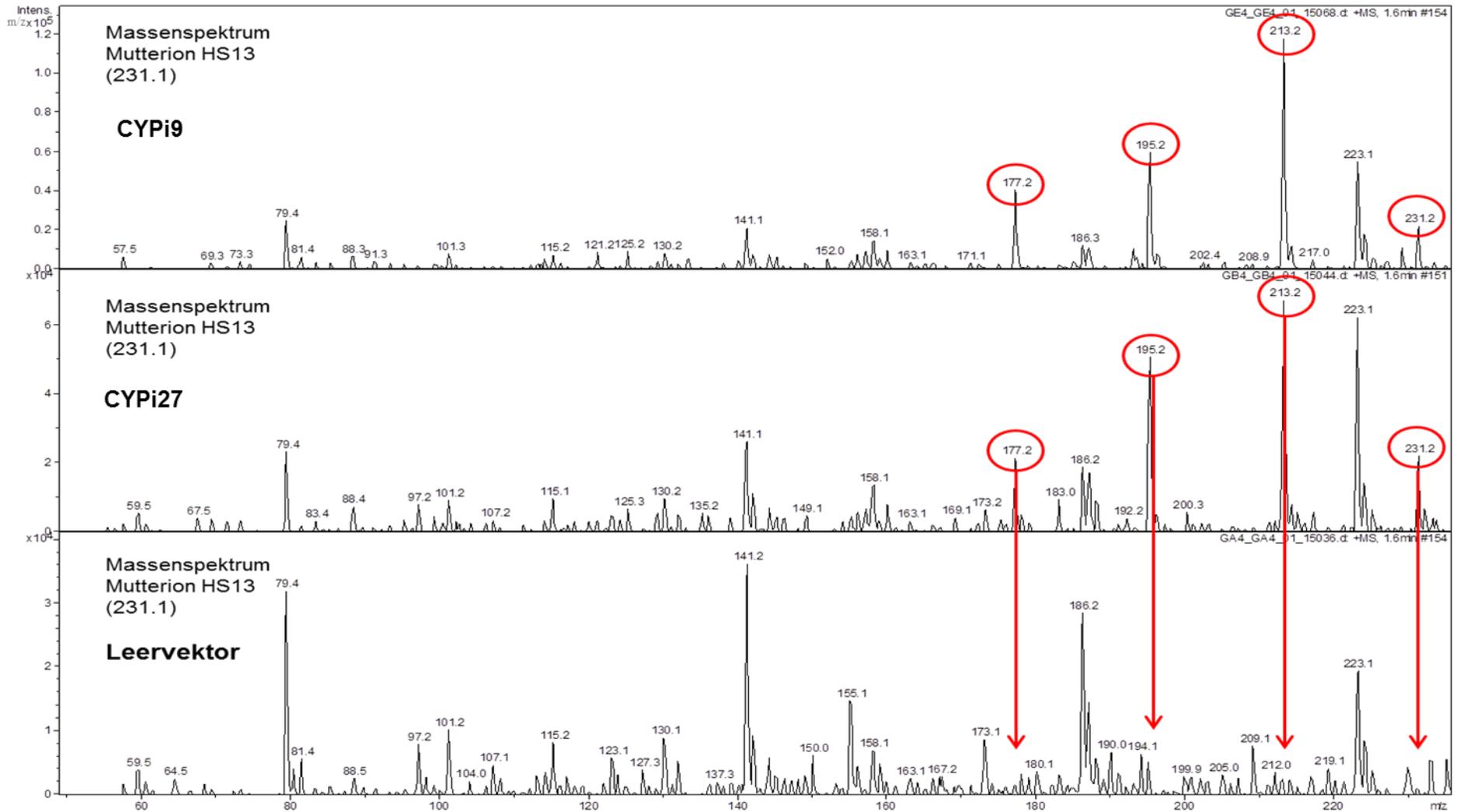
**Abb. 5.23** zeigt den Vergleich des Fragmentierungsmusters der Referenzsubstanz HS12 und der potentiellen Hydroxysäure HS11. Die relevanten Fragmente sind dabei jeweils rot (HS12) und blau (HS11) markiert. Oben ist jeweils das Massenspektrum des Mutterions zu sehen, wobei zu erkennen ist, dass es bereits ohne gezielte Fragmentierung im ersten Schritt in kleinere Fragmente zerlegt wird. Unten ist das Fragmentierungsmuster des Hauptfragments des Mutterions zu erkennen. Der jeweilige Massenunterschied der einzelnen Fragmente zeigt das identische Verteilungsmuster, was ein deutliches Zeichen dafür ist, dass es sich tatsächlich um die Hydroxysäure handelt.

**Abb. 5.24** zeigt den Vergleich zweier Spektren resultierend aus Assayansätzen der CYPs i9 und i27 mit dem Spektrum der Leervektorkontrolle. Das in diesen Ansätzen verwendete Substrat war FS13. Die für das Produkt HS13 charakteristischen Massenfragmente zeigen sich nicht bei der Leervektorkontrolle. Dies ist ein Indiz dafür, dass es sich um die gesuchte Hydroxysäure handelt und nicht um zufällige Fragmente aus dem Zellhintergrund. Auch das Fragmentierungsmuster selbst und die Retentionszeiten entsprechen den Erwartungen.

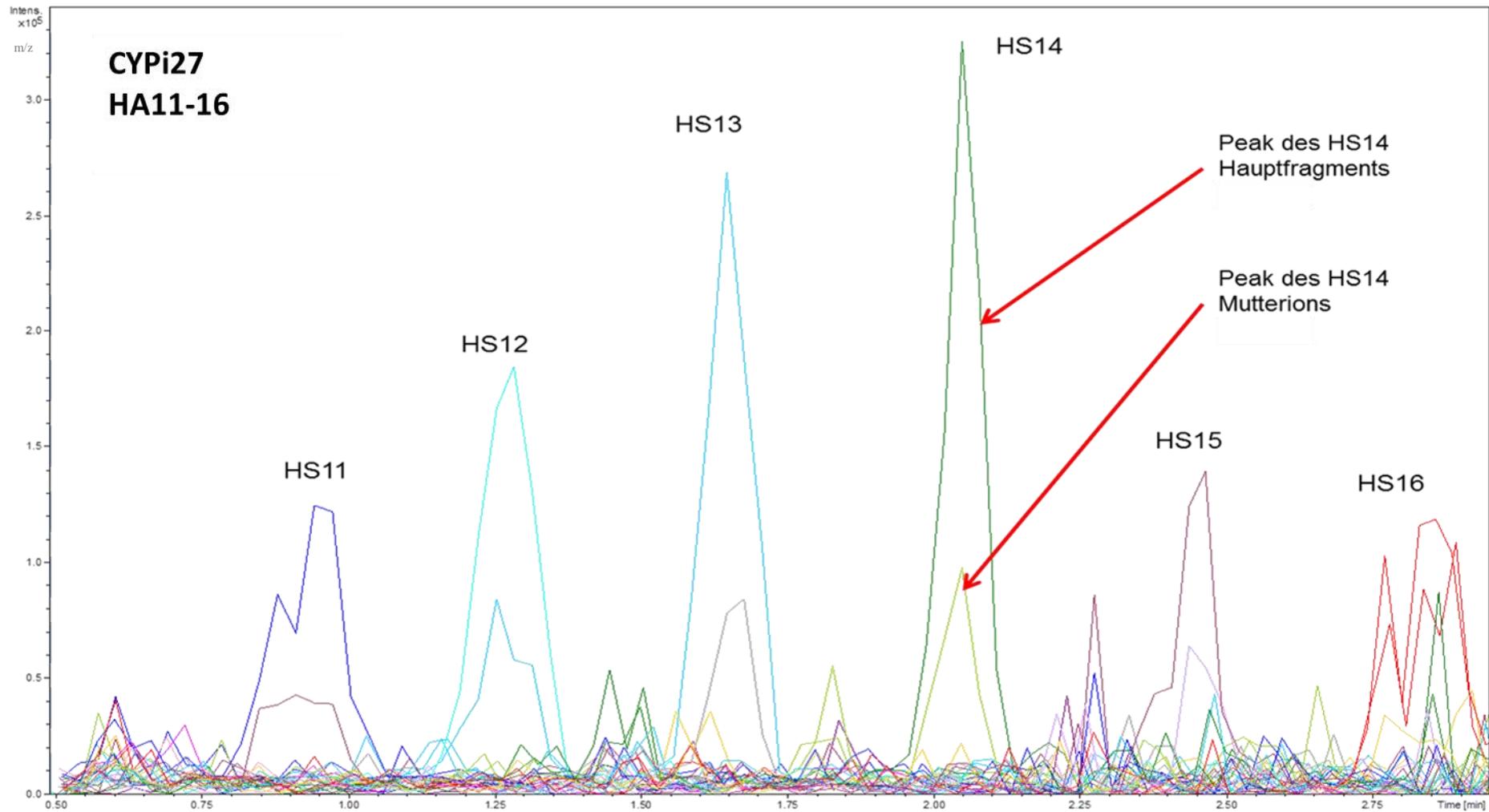
**Abb. 5.25** zeigt die Ergebnisse verschiedener Einzelexperimente mit der CYPi27 mit jeweils einer Fettsäure als Substrat, zusammengefasst in einem Chromatogramm. Es ist jeweils der Peak des Mutterions der Hydroxysäuren und der Peak des Hauptfragmentes dargestellt, welcher die deutlich höhere Intensität besitzt. Damit konnte die Produktbildung quantitativ eindeutig nachgewiesen werden.



**Abb. 5.23: Vergleich der Fragmentierungsmuster der Referenzsubstanz HS12 und der potentiellen Komponente HS11** Dargestellt ist jeweils das Massenspektrum des Mutterions und das Fragmentierungsmuster des ersten Hauptfragmentes. Die beiden oberen Spektren gehören zur Referenzsubstanz HS12, die beiden unteren zur potentiellen Komponente HS11. Vergleicht man die Muster der jeweils blau und rot markierten Fragmente, erkennt man deutlich das sich wiederholende Muster.



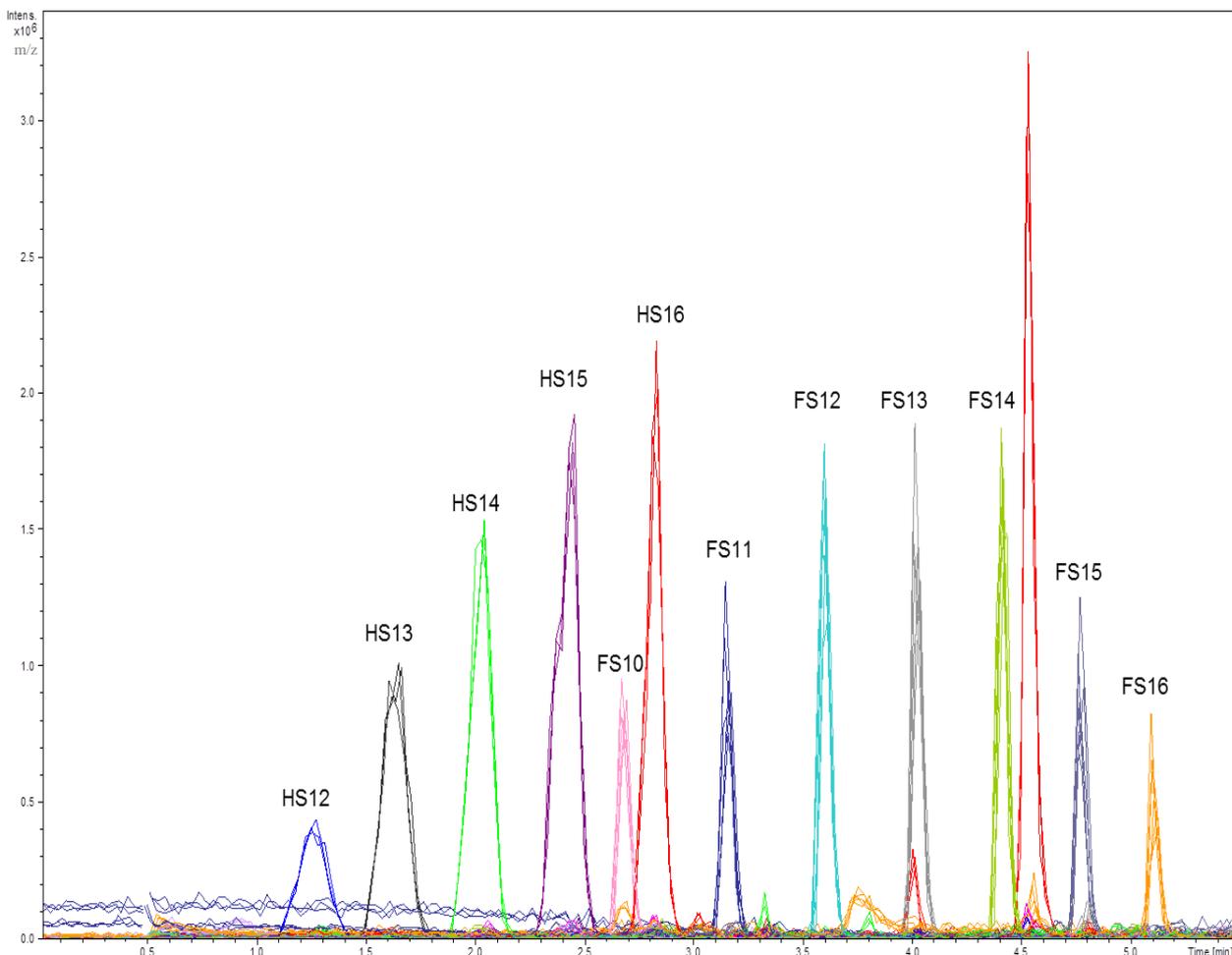
**Abb. 5.24: Vergleich zweier Spektren resultierend aus Assaysätzen der CYPs i9 und i27 mit dem Spektrum der Leervektorkontrolle** Das verwendete Substrat war FS13. Nur bei der Leervektorkontrolle fehlt das charakteristische Fragmentierungsmuster, wodurch die Produktbildung bestätigt werden kann.



**Abb. 5.25: Zusammenfassung verschiedener Einzeluntersuchungen der CYPi27 in einem Chromatogramm** Getestet wurden jeweils die einzelnen Fettsäuren der Kettenlänge  $C_{10-16}$ . Dargestellt sind das Mutterion und das erste Hauptfragment des Mutterions, welches ein signifikant stärkeres Signal zeigt. Die Abbildung zeigt deutlich die Bildung der Produkte HS11-HS16 katalysiert durch die CYPi27. Einzig HS10 kann in diesem Ansatz nicht nachgewiesen werden.

### 5.2.9 Umsetzung von Fettsäuregemischen

Da aufgrund der Änderungen der Kulturbedingungen, des Zellaufschlusses und der Assaybedingungen verstärkt aktive Varianten nachgewiesen werden konnten, wurde der Assay noch weiter verbessert, um diesen Trend eventuell auszubauen. Dazu wurde die NADPH-Konzentration im Ansatz auf 1 mM gesenkt und ein Regenerationssystem zugesetzt. Dieses basiert auf einer Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und Glucose-6-Phosphat. NADPH wird durch dieses System effektiv regeneriert und stellt somit keinen potentiellen Engpass mehr dar. Weiterhin wurde die Substratkonzentration von 500  $\mu\text{M}$  auf 200  $\mu\text{M}$  gesenkt und das Kulturvolumen auf 1 L erhöht. Unter diesen optimierten Bedingungen wurde der Umsatz von Fettsäuregemischen untersucht, wobei alle Substrate in der Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  eingesetzt wurden, unter Beibehaltung des finalen DMSO-Anteils. Dies ermöglichte den gleichzeitigen Nachweis des Umsatzes verschiedener Substrate durch alle in dieser Reihe getesteten Varianten. **Abb. 5.26** zeigt das Chromatogramm der Variante CYPi3. Alle Substrate außer FS10 und FS11 wurden zum korrespondierenden Alkohol umgesetzt.



**Abb. 5.26: Chromatogramm des Fettsäure-Mix Experiments mit der CYPi3** Bei diesem Experiment wurde die CYPi3 aus *Glycine Max* mit einem Mix aus FS der Kettenlänge C<sub>10-16</sub> inkubiert. Außer FS10 und FS11 konnten alle korrespondierenden Alkohole nachgewiesen werden. Sonstige Produkte konnten nicht detektiert werden.

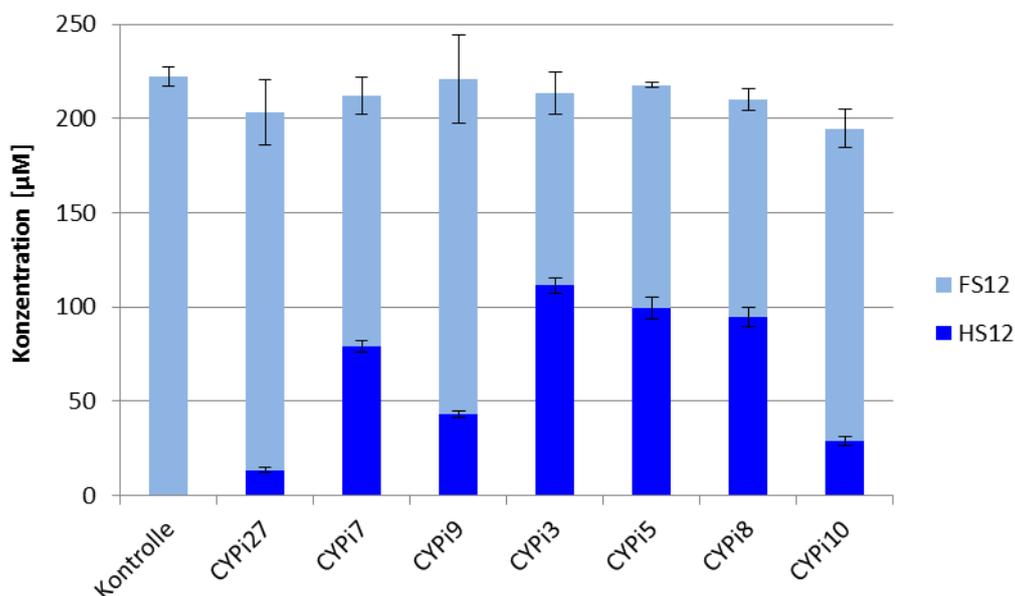
**Tab. 5.2-10** kann entnommen werden, welche CYP-Varianten sich zusätzlich aktiv zeigten, welche Substrate von ihnen umgesetzt wurden und welches voraussichtlich das bevorzugte Substrat ist. Dabei wurden HS12, HS16 und HS14 betrachtet. Die Abschätzung der Konzentrationen der Komponenten, von denen keine Referenzsubstanzen vorlagen, erfolgte durch den Mittelwert der bekannten Komponenten für die jeweilige Peakfläche.

**Tab. 5.2-10: Übersicht über aktive Varianten und deren Substratspektrum**

CYP	umgesetzte Substrate	bevorzugtes Substrat
i27	FS 11-16	FS12
i7	FS12-16	FS14+16
i9	FS 11-16	FS14+16
i3	FS12-16	FS14
i5	FS12-16	FS14
i8	FS12-16	FS14
i10	FS12-16	FS16

### 5.2.10 Untersuchungen hinsichtlich Überoxidation

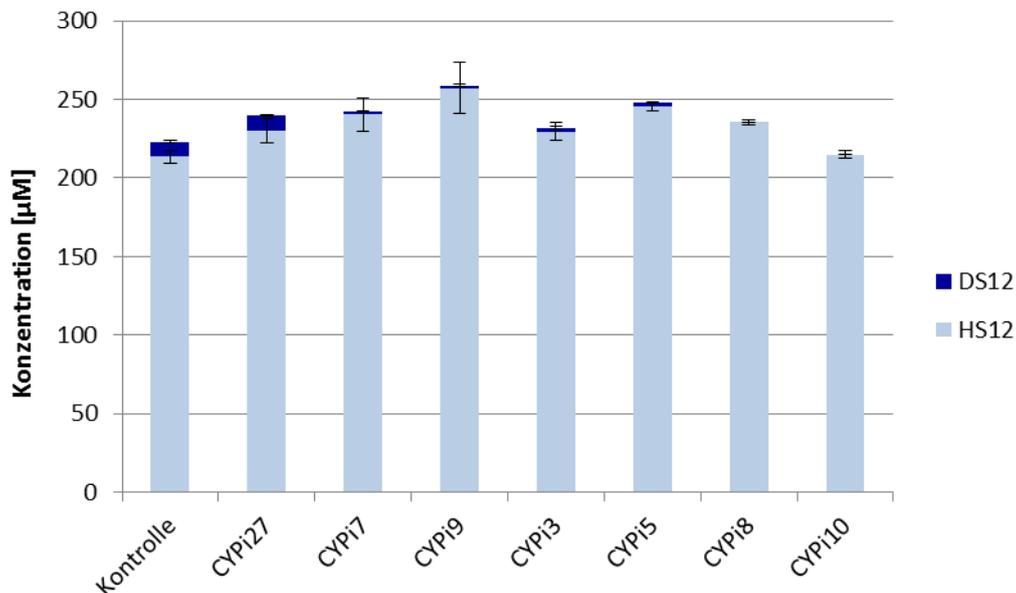
Die Substrate mit der größten Relevanz in dieser Arbeit sind LSME und LS. Ihre Umsetzung durch die neu identifizierten Varianten wurde daher näher untersucht.



**Abb. 5.27:** Quantitative Bestimmung der HS12 Bildung durch verschiedene CYP Varianten Dargestellt ist die Konzentration des Produktes und des Substrates. Alle Proben sind Triplikate basierend auf je einer Expressionskultur pro Variante. Alle getesteten Varianten zeigten Aktivität für die gewählten Substrate.

**Abb. 5.27** zeigt die erhaltene Menge HS12 und die verbleibende Menge LS nach Durchführung der optimierten Assayvariante. Dabei wurde innerhalb der zwei Stunden Inkubationsdauer maximal etwa die Hälfte des Substrates zu dem gewünschten Produkt umgesetzt. Die enthaltene Menge der aktiven Monooxygenasen konnte nicht bestimmt werden.

Um die Enzyme hinsichtlich möglicher Überoxidation zu untersuchen, wurde als Substrat die Hydroxysäure eingesetzt. Alle anderen Bedingungen wurden beibehalten. Sowohl bei den Proben der Kontrolle, als auch bei einigen der untersuchten Varianten konnte die korrespondierende Disäure nachgewiesen werden. Keine der Varianten zeigt dabei eine höhere DDS Menge als die Kontrolle, sodass keine der untersuchten Varianten aktive Überoxidation zeigt (**Abb. 5.28**).



**Abb. 5.28:** *Quantitative Bestimmung der DS12 Bildung aus HS12 durch verschiedene CYP Varianten* Dargestellt ist die Konzentration des Produktes und des Substrates. Alle Proben sind Triplikate basierend auf je einer Expressionskultur pro Variante. Bei keiner Variante konnte Überoxidation detektiert werden, die über der Kontrolle lag.

## 6 Diskussion

### 6.1 Ganzzellbiotransformation mittels *Candida tropicalis*

#### 6.1.1 Downscaling kommerzieller biotechnologischer Prozesse

Die biotechnologische Produktion von  $\alpha,\omega$ -Dicarboxylsäuren im industriellen Maßstab ist heute bereits Realität, dank dem führenden Hersteller Cathay Industrial Biotech. Diese Firma produziert in der chinesischen Provinz Chandong seit 2007 Dicarbonsäuren mit einer Produktionskapazität von ca. 15.000 t/a, darunter auch Dodecandisäure [34, 109, 110]. Auch Firmen wie Cognis und Nippon Mining Co Laboratories besitzen Kompetenzen im Bereich der mikrobiellen Dicarbonsäureherstellung [111-113]. Ende 2014 vermeldete die amerikanische Firma Verdezyne den Bau einer Produktionsanlage im Laufe des Jahres 2015 für Dicarbonsäuren in Malaysia. Diese Anlage soll ab 2017 eine Kapazität von 13.600 t/a besitzen und Pflanzenöl als Rohstoff verwenden. Durch einen engineernten *C. tropicalis* Stamm soll unter anderem auch Dodecandisäure hergestellt werden [114]. Trotz der bereits großtechnischen Umsetzung, können notwendige Anpassungen oder Probleme auftreten, deren Untersuchung im kommerziellen Maßstab sehr aufwendig und teuer ist [115]. Zudem macht eine fortlaufende Optimierung und auch eine mögliche Erweiterung diese nachhaltigen, biotechnologischen Prozesse konkurrenzfähiger gegenüber bereits seit langem etablierten petrobasierten Prozessen. Daher ist die gezielte Entwicklung von Untersuchungsplattformen im kleineren Labormaßstab, welche die großindustrielle Prozessführung möglichst realitätsnah abbilden können, ein erprobtes Mittel zur Prozessoptimierung, auch parallel zur laufenden Produktion [116]. Eine ähnliche, wie in dieser Arbeit etablierte Plattform wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben und zeigt sich anderen Untersuchungssystemen, durch die parallele Prozessführung und der damit verbundenen hohen Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit, durch den höheren Durchsatz, den geringeren Aufwand und die geringeren Kosten, überlegen.

#### 6.1.2 Optimierung der Wachstumsphase

Zur Optimierung der gleichmäßigen Biomassezunahme wurden verschiedene Parameter während der Wachstumsphase variiert. Bereits in den 1970er Jahren untersuchten Uchio und Shio den Einfluss verschiedener Wachstumsparameter auf die Disäurebildung durch verschiedene Wildtypstämme und einer *Candida cloacae* Mutante, welche nicht mehr in der Lage war Alkane als reine Kohlenstoffquelle zu nutzen [30, 85]. Bei diesem System zeigte sich eine leichte Verbesserung des Wachstums durch Saccharose als Kohlenstoffquelle, in späteren Untersuchungen wurde Saccharose allerdings nur selten verwendet. Auch in dieser Arbeit konnte in der Tendenz eine positive Wirkung auf das Wachstum der *Candida* Zellen bei der Nutzung von Saccharose als C-Quelle beobachtet werden. Da reine Saccharose in den meisten Teilen der Welt eine verhältnismäßig teure Kohlenstoffquelle darstellt, wird gerade im Hinblick auf eine zukünftige Nutzung im industriellen Maßstab, bei welchem der Bedarf bei mehreren tausend Tonnen jährlich liegt, auf günstigere Alternativen zurückgegriffen. Eine günstigere Alternative ist Melasse, ein bei der Zuckerproduktion in großen Mengen anfallendes, saccharosehaltiges Substrat, welches bereits zur fermentativen Produktion von Zitronensäure genutzt wird. Weitere Alternativen sind beispielsweise Stärkehydrolysate aus Mais, dessen Hauptbestandteil Glucose darstellt, und günstiges Glycerin, welches als Nebenprodukt bei der Biodieselherstellung in beachtlichen Mengen anfällt [117,

118]. Diese undefinierten Substrate enthalten neben der gewünschten Kohlenstoffquelle allerdings zusätzliche Komponenten, die sich im Fall von aus dem Endprodukt schwer abtrennbaren Verunreinigungen negativ auf den Downstream Prozess auswirken können. Weiterhin besitzen diese Substrate schwankende Zusammensetzungen, was eine robuste und gleichbleibende Prozessperformance erschweren kann. Glucose auf Stärkebasis stellt eine realistische, auch industriell nutzbare C-Quelle dar und wurde daher auch in dieser Arbeit für die Etablierung der Biotransformationsplattform verwendet. Um mögliche negative Auswirkungen der Kohlenstoffquelle zu vermeiden, wurden die eingesetzten Konzentrationen und verwendeten Feedmengen gering gehalten. Diese negativen Effekte können sich z. B. in der Repression einiger am Fettstoffwechsel beteiligter Enzyme zeigen [119]. Das Biotransformationsmedium wurde aufgrund eines technischen Berichts von Mobley et al aus dem Jahr 1999 ausgewählt. Dabei wurde die Wachstumsphase durch den Einsatz statistischer Methoden, basierend auf einem „Design of Experiments“-Ansatz, untersucht [26]. Die exakten Parameter und Bezugspunkte für diese Optimierung und deren Ergebnisse werden allerdings nicht genannt, führten aber zu einer deutlichen Verbesserung der Biomassezunahme. Das aus diesen Untersuchungen hervorgegangene Medium (OPT-1 Medium), wurde ebenfalls in dieser Arbeit verwendet. Abweichend wurde anstatt von Corn Steep Liquor in den hier beschriebenen Versuchen allerdings Glucose und Hefeextrakt eingesetzt, da die Trübstoffe im Corn Steep Liquor die Biomassebestimmung durch die Messung der OD<sub>600</sub> erheblich erschwerten. Durch die angestrebte Biotransformationsplattform sollte der Verlauf der Biomasse während der Wachstumsphase möglichst zeitnah und genau nachvollzogen werden können, um beispielsweise zukünftig Unterschiede bei Generationszeiten neuer Produktionsstämme schnell erfassen zu können. Es bleibt festzuhalten, dass die Optimierung der Wachstumsphase, neben einer angestrebten, maximalen Biomassekonzentration im Fermentationsmedium, hauptsächlich der Reproduzierbarkeit in den kleinskaligen Ansätzen der 1.000 mL Reaktoren diene, um eine vergleichende Optimierung der Biotransformationsphase zu etablieren.

Bei der Optimierung der Wachstumsphase wurde daher in erster Linie ein vergleichbares und reproduzierbares Wachstum angestrebt. Damit wird die Basis für einen vergleichbaren Start in die Biotransformationsphase geschaffen und die Effekte der verschiedenen Parameter auf das System können untersucht werden. Für die Etablierung einer Plattform, die die gezielte Untersuchung neuer Stämme oder die gezielte Variation bestimmter Parameter als Ziel hat, ist es unumgänglich eine vergleichbare Ausgangssituation für die Betrachtung der Biotransformation zu schaffen. Dazu mussten die beobachteten Unregelmäßigkeiten des Biomasseverlaufes unterbunden werden. Von solchen Unregelmäßigkeiten während der Wachstumsphase der *C. tropicalis* Biotransformation finden sich in der existierenden Literatur keine Berichte. Ein möglicher Grund für die Unregelmäßigkeiten könnte das Zusammenspiel aus starkem Schäumen und Flotation der Zellen sein. Bei der Kultivierung von Hefezellen ist starkes Schäumen nicht ungewöhnlich. Auf den Zusatz verhältnismäßig großer Mengen Antischaums sollte verzichtet werden, da sich besonders größere Mengen negativ auf die Zellen und die Gelöstsauerstoffkonzentration auswirken können [120, 121]. Außerdem kann es zu einer Beeinträchtigung des Massentransfers [120] und einer Verkomplizierung des Downstream Processing [122, 123] sowie Problemen bei der Analytik kommen. Auch im großtechnischen Maßstab wird auf Zusatzstoffe, die dem Prozess in relevanten Mengen zugeführt werden müssen, wenn möglich verzichtet, da diese die Betriebskosten teilweise erheblich erhöhen. Das Phänomen der Flotation bei einigen Hefen wurde bereits beschrieben [83, 124], allerdings bisher nicht im Zusammenhang mit der Dicarbonsäureproduktion durch *C. tropicalis*. Die Zellen werden

bei der Flotation durch Wechselwirkung (Adhäsion) mit den eingebrachten Luftblasen entweder an die Oberfläche des Mediums, oder an Einbauten und die Glaswandung transportiert, was durch Schaum und Ablagerungen an der Reaktorwandung beobachtet werden konnte. Bei der mikroskopischen Betrachtung der Fermentationsbrühe, waren viele kettenförmig aneinanderhängende Zellgebilde zu beobachten, das sogenannte Pseudomycel, dessen Bildung für *Candida*-Spezies bekannt ist [125, 126]. Flotation konnte somit als eine Ursache für die ungleichmäßige Zellverteilung innerhalb der kleinskaligen Fermenter identifiziert werden und durch die Einbringung von mechanischen Schaumbrechern und einer angepassten Begasungsstrategie erfolgreich verhindert werden. Somit konnte eine verlässliche Basis für die folgende Biotransformationsphase geschaffen werden.

### 6.1.3 Etablierung der Biotransformation

Die ersten Biotransformationen wurden zunächst bei einem für das Wachstum der *Candida* Zellen gut geeigneten pH Wert von 5,8 durchgeführt. Die Löslichkeit der Disäure ist bei pH 5,8 sehr gering (5,8 g/L Wasser bei pH 5 und 25 °C auf 1.000 g/L bei pH 8 und 25 °C), daher kam es zur Bildung eines buttrigen Niederschlages, welcher eine undefinierte Mischung aus Zellmasse, Substrat und Produkt darstellte. Aus der Sicht eines industriellen Prozesses, ist die *in situ* Abtrennung der Produktes oft wünschenswert, in diesem Fall musste allerdings angenommen werden, dass der Niederschlag aus einer Mischung aus DDS, LS und LSME bestand, in den zusätzlich Zellen und weitere Komponenten des Biotransformationsansatzes eingeschlossen waren. Der beobachtete Niederschlag ließ keine Bilanzierung von LSME und DDS zu. Um den Einfluss verschiedener Parameter auf das Gesamtsystem zu ermitteln, muss eine zuverlässige Bilanzierung jedoch möglich sein, um quantitative Aussagen zu treffen. Um die Löslichkeit des Produktes zu erhöhen, wurde ein pH-Shift durchgeführt, welcher vom schwach sauren in den schwach basischen Bereich erfolgte. Ein zeitlich kurzer pH-Shift wird dabei als negativ auf die Effizienz der Biotransformation verschiedener Alkane, mittels gentechnisch modifizierter und *Candida* Wildtypstämmen beschrieben [30, 85]. Dieser Effekt zeigte sich auch in dieser Arbeit für die Umsetzung von LSME mittels *C. tropicalis*. Eine schnelle Erhöhung des pH-Wertes resultierte in einer stark limitierten Zellviabilität und Konversionsrate. Für weitere Experimente wurde daher in Anlehnung an Liu et al. eine an der Produktbildung orientierte Shift-Strategie angewendet [32]. Durch die Stufenweise pH-Wert Erhöhung über 73 Stunden konnte ein homogener Reaktorinhalt bei gleichzeitig hoher Zellviabilität und Konversionsrate erreicht werden.

### 6.1.4 Temperaturlevel

Die Identifizierung der optimalen Prozesstemperatur stellt eine wichtige, ökonomische und ökologische Fragestellung dar. Bei industriellen Prozessen ist der Energiebedarf, sowohl hinsichtlich der anfallenden Kosten für das Heizen als auch für ein mögliches Kühlen bestimmter Elemente, von höchster Relevanz. Ein energieoptimiertes System nutzt vorhandene Ressourcen möglichst umfassend und vermeidet unnötige Kosten und Emissionen. Bei Fermentationsprozessen im größeren Maßstab ist bei einem Temperaturlevel von 30 °C oftmals das Kühlen der Fermenter notwendig. Durch die moderaten Temperaturbereiche reicht die Temperaturdifferenz des verfügbaren Kühlwassers zur Fermenterbrühe für ein effektives Kühlen oftmals nicht aus, eine zusätzliche, aktive Kühlung ist aber unwirtschaftlich. Daher können sich bereits geringfügig höhere Temperaturbereiche positiv auf den Energiebedarf und damit

die Kosten auswirken [127]. Um die gestellten Anforderungen bezüglich größtmöglicher Nachhaltigkeit und kleinstmöglichem Energiebedarfs zu erfüllen, wurde die Biotransformation bei 35 °C untersucht, 5 °C höher als in den meisten bisher beschriebenen Untersuchungen zur Dicarbonsäurebildung [37-40]. Während der Wachstumsphase zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen 30 °C und 35 °C. Auch zu Beginn der Biotransformation verliefen beide Varianten ähnlich. Im späteren Verlauf der Biotransformation zeigte sich aber ein deutlich negativer Einfluss der höheren Temperatur auf die Produktbildung. Eine mögliche Ursache könnte ein enges Temperaturoptimum der beteiligten Schlüsselenzyme sein. Yang et al. untersuchten ein P450 Enzymsystem zur selektiven Hydroxylierung von Steroiden aus dem Pilz *Curvularia lunata*. Diese 11- $\beta$ -Hydroxylase zeigte in diesen Untersuchungen ein sehr schmales Temperaturoptimum bei 30 °C. Bereits bei einer Differenz von  $\pm 2$  °C, zeigte sich ein negativer Einfluss auf die Enzymaktivität und damit auf die Gesamteffizienz der Biotransformation [128]. Auch die CYP52M1 aus *Starmerella bombicola* (früher *Candida bombicola*) wies ein enges Temperaturoptimum auf. So konnten Huang et al. bei unterschiedlichen Experimenten eine signifikante Abnahme der Aktivität oberhalb einer Temperatur von 30 °C feststellen [129]. Der parallele Verlauf beider Varianten zu Beginn der Biotransformation könnte durch eine zunehmende Biomassekonzentration während dieser Phase begründet sein. Nach dem Erreichen der stationären Phase ( $\sim 75$  h) konnte die potentiell verringerte Aktivität der CYPs nicht mehr durch Biomassezuwachs ausgeglichen werden und die Produktbildung der 35 °C Variante blieb hinter der niedrigeren Prozesstemperatur zurück. Die unerwünschten Auswirkungen auf die Ausbeute des Prozesses wiegen die potentiellen Energie- und Kosteneinsparungen auf, sodass die Biotransformation bei 30 °C die geeignetere Prozessvariante darstellt.

### 6.1.5 Untersuchung der Substratfeedstrategie

Selektive Biotransformationen verschiedener aliphatischer Substrate sind für industrielle Anwendungen von großem Interesse. Diese im wässrigen System schlecht löslichen Komponenten sind allerdings oftmals toxisch für die verwendeten Mikroorganismen [130]. Um zufriedenstellende Produktbildungsraten, Titer und Ausbeuten zu erreichen, wurden verschiedene Strategien bezüglich der Substrataddition entwickelt, um die inhibierenden Effekte der Substanzen zu umgehen oder zumindest abzuschwächen. Zweiphasige Systeme konnten beispielsweise die Konzentration der toxischen Komponenten verringern. Dabei muss die zweite organische Phase selbst frei von inhibierenden Effekten sein und es muss ein ausreichender Massentransfer gewährleistet sein [131, 132]. Karande et al. erreichten eine ausreichende Verfügbarkeit des toxischen Substrats Cyclohexan, indem sie es in evaporierter Form dem System zuführten [133]. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Anpassung der Substratfeedstrategie. Dabei haben Gomes et al. beispielsweise den Unterschied zwischen einer einmaligen Zugabe zu Beginn (batch), einer kontinuierlichen (fed-batch) und einer intermittierenden Zuführung des Substrates untersucht. Sie konnten im Falle der betrachteten Produktion von  $\gamma$ -Decalacton aus Rizinolsäuremethylester durch *Yarrowia lipolytica* klare Unterschiede zwischen den Feedvarianten belegen, wobei die Batchvariante die geringsten und die intermittierende Variante die höchsten Produkttiter erreichte [134]. Bisher wurde der Einfluss der gewählten Feedstrategie auf den Prozess der Dicarbonsäureproduktion durch *C. tropicalis* nicht näher untersucht. Neben der Batchvariante [23, 36] wurde das Biotransformationssubstrat portionsweise [32, 40] und kontinuierlich [17, 31, 33] über den Verlauf der Biotransfor-

mationsphase zugegeben. Aufgrund zu großer Unterschiede in der Prozessführung, wie dem verwendeten Substrat und den verwendeten *Candida* Stämmen usw., sind diese Arbeiten nicht direkt vergleichbar. Bei den meisten Untersuchungen wurden Alkane als Substrate verwendet, da diese bei Raumtemperatur in flüssiger Form vorliegen und dem System somit gut zugeführt werden können [32, 33, 35, 36, 39, 40]. Lang- oder mittelkettige Fettsäuren oder deren Methylester können aus erneuerbaren Quellen wie Pflanzenölen gewonnen werden und stellen daher grundsätzlich ebenfalls industriell attraktive Substrate dar. Freie Fettsäuren werden von Biokatalysatoren vermutlich eher als Substrat akzeptiert, da diese häufiger in der Natur vorkommen als Fettsäuremethylester. Sie haben dabei aber den Nachteil, dass sie bei Raumtemperatur fest sind und sich so schwerer kontrolliert zudosieren lassen. Mit Hilfe der zuvor etablierten, kleinskaligen Biotransformationsplattform sollte in dieser Arbeit der Einfluss der LSME-Feedstrategie auf den Gesamtprozess untersucht werden, um eine maximale Feedrate zu definieren, bei der das Substrat LSME vollständig zu DDS umgesetzt werden kann.

**Tab. 6.1-1** zeigt eine Übersicht über den in dieser Arbeit erreichten Produkttiter, die Volumetrische Produktivität, Biotrockenmassekonzentration und die gebildeten Produktmengen bezogen auf die vorhandene Biomasse im Vergleich zu weiteren Biotransformationsuntersuchungen mit *C. tropicalis*. Die höchste erreichte DDS Konzentration beschreiben Liu et al. mit einer Konzentration von 162 g/L [32]. Dieser Titer liegt weit über dem in dieser Arbeit erreichten, wobei ein anderes Substrat eingesetzt (Dodecan) und ein anderer *C. tropicalis* Stamm als in dieser Arbeit verwendet wurde. Der möglicherweise negative Einfluss des Substrates LSME könnte diesen Unterschied bewirken. Bis jetzt ist dabei unklar, ob das LSME selbst die negative Wirkung auf den Zellmetabolismus hat, oder ob die Ursache in der freien Fettsäure LS nach der Demethylierung durch die Zellen liegt. Dass die Demethylierung während des Prozesses stattfand, konnte in dieser Arbeit in Form der freien Säure LS und dem Fehlen des methylierten Produktes DDSME eindeutig nachgewiesen werden. Auch Lu et al beobachteten die aktive Demethylierung eines Fettsäuremethylesters (Methyltetradecanoat) durch *C. tropicalis*, ebenso wie Schrewe et al. bei der Biotransformation von LSME durch *E. coli* [18, 38]. Allerdings gibt es in der Literatur Hinweise darauf, dass die freie Säure die stärkere hemmende Wirkung aufweist. Bereits 1984 beschrieb J. Kabara in einem Überblick seiner eigenen Forschung und einiger weiteren Studien die antimikrobielle Wirkung von Laurinsäure. Dabei ergab sich eine „Minimale inhibierende Konzentration (MIC)“ von 2,5 mM für *C. Albicans*. Diese LS-Konzentration wurde im Laufe der Biotransformation im Rahmen dieser Arbeit wiederholt erreicht, gegen Ende auch andauernd überschritten [135]. Weiterhin untersuchte J. Kabara die Wirkung von LS und LSME auf Streptokokken. Dabei betrug die MIC für LS 0,12 mM, LSME zeigte dagegen keine signifikante Inhibierung dieser Bakterien [135]. In weiteren Studien konnten sowohl Huang et al. als auch Bergsson et al. in verschiedenen Experimenten die hemmende Wirkung von LS auf verschiedene Bakterienspezies sowie auf *C. albicans* aufzeigen, wobei diese bei der Hefe am geringsten ausgeprägt war [136-139]. Auch wenn sich diese Untersuchungen auf andere Spezies beziehen, liegt die Vermutung nahe, dass dies ebenso für *C. tropicalis* gelten könnte und LS möglicherweise die inhibierende Hauptkomponente darstellt. Lu et al. untersuchten detailliert die Oxidation von Fettsäuren und Fettsäuremethylestern mittels *C. tropicalis* [38]. Ihr angestrebtes Ziel lag dabei in der Aufschlüsselung der Oxidationskaskade und der Produktion von  $\omega$ -Hydroxysäuren, nicht von Dicarbonsäuren. Unter der Verwendung eines zu diesem Zweck optimierten Stammes und des Substrates Methyltetradecanoat erreichten sie einen  $\omega$ -Hydroxysäure-Titer von 174 g/L. Dieser Titer sowie die

sich daraus ergebende Volumetrische Produktivität liegen erneut deutlich über den in dieser Arbeit erreichten Werten, beziehen sich allerdings auf das Anfangsvolumen der 148 h dauernden Biotransformation [38]. Normalisiert man den in dieser Arbeit erreichten Titer der Disäure auf das Anfangsvolumen, erhält man statt der 66 g/L einen Titer von 162 g/L. Dieses Ergebnis liegt wesentlich näher an den auch in den anderen Untersuchungen ermittelten Werten, auch wenn bei der Vergleichbarkeit erneut das unterschiedliche Substrat, der unterschiedliche Stamm und die abweichende Prozessführung berücksichtigt werden muss. Über einen hemmenden Einfluss des Substrates auf die *Candida*-Zellen werden in dieser Untersuchung keine Angaben gemacht.

Betrachtet man den Umsatz der zugesetzten Menge des Substrates, liegt dieser beispielsweise in den verschiedenen Arbeiten von Liu et al. zu vergleichbaren Zeitpunkten der Biotransformation deutlich unterhalb des in dieser Arbeit erreichten Umsatzes [32, 35]. Nach 120 h konnten einmal 47% des eingesetzten Tridecan und einmal 58% des eingesetzten Dodecan zur korrespondierenden Disäure umgesetzt werden. In dieser Arbeit lag der Umsatz nach 120 h bei 89%, wobei das Substrat im Fall der Alkane an zwei Stellen oxidiert wurde. Aufgrund der hohen Hydrophobizität der verschiedenen Alkane kann das verbleibende Substrat nach Ende der Biotransformation ohne großen Aufwand abgetrennt werden. LSME weist eine vergleichbare Hydrophobizität wie Alkane auf und würde sich vergleichbar verhalten. Die freie Fettsäure LS, die aufgrund der aktiven Demethylierung von LSME durch die Zellen entsteht, geht dagegen bei den vorhandenen Bedingungen in Lösung, und kann den folgenden Downstream-Prozess erschweren. Die Abtrennung des Zielproduktes macht bei vielen industriellen biotechnologischen Prozessen einen hohen Anteil an den Gesamtprozesskosten aus. Besonders bei Anwendungen wie dem Einsatz als Kunststoffmonomer, müssen die Moleküle eine sehr hohe Reinheit aufweisen, um einen reibungslosen Polymerisierungsprozess zu ermöglichen, sowie ein makelloses Endprodukt zu erhalten. Im Falle von Laurinsäure könnte es beispielsweise zu einem Kettenabbruch während der Polymerisation kommen, was unbedingt zu vermeiden ist. Daher ist es sinnvoll, die Substrat-Feedstrategie weiter zu optimieren, um eine Anreicherung der freien Fettsäure und des Methylesters zu vermeiden.

Auch bei bisher beobachteten volumetrischen Produktivitäten zeigt sich der negative Trend beim Einsatz der freien Fettsäuren. Bei den Untersuchungen mit Alkanen konnten Werte von mehr als 1 g/Lh erreicht werden [32, 35, 39], enthielten die Substrate freie Fettsäure konnten maximal 0,43 g/Lh erreicht werden [16, 23]. Neben der inhibierenden Wirkung auf die Zellen wirkt sich auch der feste Aggregatzustand der mittel- und langkettigen ungesättigten Fettsäuren negativ aus und gestaltet die Prozessführung schwieriger als bei der Verwendung von flüssigen Substraten.

Der Ertrag an Dicarboxylsäuren pro Biotrockenmasse, welcher in dieser Arbeit erzielt wurde, liegt deutlich unter denen der Untersuchungen mit Alkanen [32, 35, 39]. Neben dem Einfluss der freien Säuregruppe scheint die Kettenlänge des Substrates einen Einfluss auf den Umsatz durch die *Candida* Zellen zu haben. Yang et al. verwendeten ebenfalls den *C. tropicalis* Stamm ATCC 20962 und langkettige, freie Fettsäuren, wie z.B. Ölsäure, als Substrate [23]. Ölsäure zeigt sich gegenüber diesem *C. tropicalis* Stamm nicht inhibierend, was zu höheren Biomassekonzentrationen führte. Dennoch beobachteten Yang et al. eine weniger als halb so große Menge gebildeten Produktes bei einer vergleichbaren Biotransformationsdauer als in dieser Arbeit [23]. Die geringe Löslichkeit der langkettigen Komponente stellt aufgrund der schlechteren Substratverfügbarkeit eine mögliche Ursache für die geringere Produktbildung dar [23].

Tab. 6.1-1: Übersicht einiger untersuchter Prozesskennzahlen der Biotransformation mit *C. tropicalis*

Stamm	Substrat	Titer Produkt	Volumetrische Produktivität	BTM	Menge DDS pro BTM	Referenz
20962	LSME	66 g/L (188 h)	0,35 g/Lh	26,50 g/L	2,51 g/g (188 h)	diese Arbeit
S76	Alkane (C <sub>11-16</sub> ), Fettalkohole (C <sub>12+13</sub> ) Fettsäuren (C <sub>12+13</sub> ) Diole (C <sub>12+13</sub> )	Ausbeute max.45%, keine weiteren Angaben	k. A.	13 g/L (Undecan) 19 g/L (Dodecan) 21 g/L (Tridecan) 19 g/L (Tetradecan) 19 g/L (Pentadecan) 38 g/L (Hexadecan)	k. A.	[33, 36]
DP428	Tetramethyldecanoat	174 g/L (148 h)	1,18 g/Lh	k. A.	k. A.	[37, 38]
M25	Linolensäure Sonnenblumenöl, Rapsöl, Rizinolsäure	Andere Produkte, in-chain Hydroxylierung	k. A.	k. A.	k. A.	[17, 31]
CT1-12	Tridecan	Max. 140,9 g/L (140 h)	1 g/Lh	17 g/L	8,29 g/g (140 h)	[39]
CGMCC356	Tridecan	Max. 155,4 g/L (126 h)	1,23 g/Lh	15 g/L	10,36 g/g (126 h)	[35]
CGMCC356	Alkane (C <sub>12-14</sub> )	166 g/L C <sub>12</sub> Disäure 153 g/L C <sub>13</sub> Disäure 138 g/L C <sub>14</sub> Disäure (120 h)	1,38 g/Lh (C <sub>12</sub> ) 1,28 g/Lh (C <sub>13</sub> ) 1,15 g/Lh (C <sub>14</sub> ) (120 h)	19,0 g/L	8,74 g/g (C <sub>12</sub> ) 8,05 g/g (C <sub>13</sub> ) 7,26 g/g (C <sub>14</sub> ) (120 h)	[32]
CZ-15	Tridecan	100 g/L (120 h)	k. A.	k. A.	k. A.	[40]
M20	Fettsäuren aus Reiskleie und Kokosnussöl	48 g/L aus Kokosöl 62 g/L Reiskeimöl, jeweils Disäuremischung (144 h)	0,33 g/Lh (Substrat Kokosöl 144h) 0,43 g/Lh (Substrat Reiskeimöl (144h))	3,2 - 4 g/L je nach Substrat, (48 h)	k. A.	[16]
20962	Ölsäure, Erucasäure, 9,10 Epoxystearinsäure	31 g/L ω-Carboxy-ölsäure (72 h)	0,43 g/Lh (72 h) ω-Carboxyölsäure	65 g/L (72 h)	0,48 g/g (72 h)	[23]

## 6.2 Identifizierung geeigneter Cytochrom P450 Monooxygenasen

Die Identifizierung von neuen Cytochrom P450 Enzymen zur selektiven  $\omega$ -Oxidation von LS und LSME bei gleichzeitiger Vermeidung der Überoxidation zur korrespondierenden Säure, erfolgte mittels unterschiedlicher Ansätze. Nach der Auswahl verschiedener potentiell geeigneter Enzyme erfolgte deren Expression zunächst im bakteriellen System. Aufgrund der im Folgenden weiter beschriebenen Probleme erfolgte im Anschluss der Wechsel auf ein eukaryotisches Hefesystem.

Mittels spezieller *S. cerevisiae* Stämme, die jeweils chromosomal eine pflanzliche CPR überexprimieren, konnten verschiedene Varianten aktiv exprimiert werden. Mittels angepasster analytischer Methode und geeigneter Assays konnten Informationen über das Substratspektrum sowie die Neigung zur Überoxidation der einzelnen Varianten ermittelt werden.

### 6.2.1 Auswahl geeigneter Monooxygenasen

Die Optimierung von Ganzzellbiokatalysatoren ist eine gängige Methode um die Basis für einen industriellen Prozess zu schaffen. Die Anpassung des Zielorganismus kann dabei auf verschiedenen Ebenen sowie durch verschiedene Methoden bewerkstelligt werden. Beispielsweise können einzelne Enzyme ausgetauscht, entfernt oder hinzugefügt werden, um den Metabolismus der Zelle auf die gewünschte Art und Weise zu verändern [140]. Bei Cytochrom P450 Monooxygenasen stehen oftmals „herkömmliche“ Eigenschaften, wie die Stabilität [141, 142], die Spezifität [143, 144] und das Substratspektrum [145-147] im Fokus, allerdings kommen weitere spezifischere Fragestellungen für Cytochrom P450 Proteine hinzu. Dazu gehören zum Beispiel niedrige Katalyseraten, besonders bei Häm-haltigen, NAD(P)H abhängigen CYPs [148-151], die auch in dieser Arbeit betrachtet wurden, weiterhin das Phänomen der Entkopplung [48, 52, 53] und die Verfügbarkeit von elementarem Sauerstoff [152]. In dieser Arbeit waren das Substratspektrum und das Auftreten von unerwünschter Überoxidation von besonderem Interesse. Zunächst wurden vier CYPs und eine Reduktase ausgewählt. Der Fokus lag auf Enzymen der *Candida* Spezies, um nah am angestrebten und parallel betrachteten Ganzzellsystem zu bleiben. Dabei waren besonders die CYP52A13 und CYP52A17 interessant. Eschenfeldt et al. untersuchten das Substratspektrum und die Neigung zur Überoxidation dieser Enzyme *in vitro* [12]. Beide waren in der Lage Laurinsäure umzusetzen und zeigten abhängig vom Substrat unterschiedlichen Hang zur Überoxidation. Ähnliches konnten Lu et al. im *Candida*-Ganzzellsystem zeigen [38]. Über diese beiden Monooxygenasen sollten in dieser Arbeit weitere Informationen gewonnen werden und sie sollten als Referenzenzyme dienen, um die im späteren Verlauf erstmalig rekombinant exprimierten, bisher nicht beschriebenen CYPs im Vergleich zu den in *C. tropicalis* typischen CYPs besser einordnen zu können. Die pflanzliche Hydroxylase wurde zusätzlich wegen ihrer hohen, bereits beschriebenen Affinität zum C<sub>12</sub>-Substrat ausgewählt [54, 86, 93, 96]. Darüber hinaus wurden weitere Enzyme basierend auf Sequenzhomologien ausgewählt. Das Spektrum der gewählten Varianten wurde durch zum Teil deutliche Sequenzunterschiede zu betrachteten Referenzenzymen, bewusst breit gestreut, um verschiedene, vielversprechende Varianten zu identifizieren.

## 6.2.2 Expression und Detektion der ausgewählten Monooxygenasen

Cytochrom P450 Monooxygenasen konnten bereits in sehr unterschiedlichen Expressionssystemen erfolgreich rekombinant produziert werden, darunter mittels Säuger- [153], Insekten- [100], Hefe- [97], und Bakterienzellen [91]. Bei der Wahl des Expressionssystems müssen verschiedene Faktoren berücksichtigt werden, darunter der beabsichtigte Verwendungszweck des Zielproteins, die benötigte Proteinmenge, die Klassifizierung der angestrebten Monooxygenase und die damit verbundene Komplexität (Ein- oder Mehrkomponentensysteme, Cofaktorabhängigkeit, Membranbindung) sowie der nötige Arbeitsaufwand [154-156]. Den geringsten Zeit- und Arbeitsaufwand bringt das bakterielle *E. coli*-System mit sich, daher wurde dieses zu Beginn dieser Arbeit ausgewählt. Dieses Expressionssystem führte aber mit keiner der gewählten Kombinationen aus den verschiedenen Vektoren und Stämmen zum Erfolg. Die erfolgreiche Expression von eukaryotischen CYPs im *E. coli* System hängt von verschiedenen Prozessen ab, von der korrekten Translation und Faltung, dem Einbau in die Membran, dem Einfluss von unter nativen Bedingungen vorhandenen posttranslationalen Modifikationen und der erfolgreichen Häm-Synthese [104, 157, 158]. Monooxygenasen der Klasse II weisen einen N-terminalen Membrananker auf, welcher zur Expression in Bakterien oftmals modifiziert wird [159, 160]. Der N-Terminus sollte aber im Zuge dieser Arbeit nicht entfernt oder verändert werden, da er möglicherweise die Proteinstabilität *in vivo* beeinflusst [161]. Allerdings könnte der native Membrananker die Expression auch nachteilig beeinflusst haben. Chang et al. exprimierten verschiedene pflanzliche CYPs in *E. coli*. Dabei stellten sie fest, dass sich ein und dieselbe CYP zwar nicht mit dem pETDUET-1 System, dafür aber mit dem pCWORi Vektor erfolgreich exprimieren ließ. Parallel war die Expression einer anderen pflanzlichen CYP sehr wohl im pETDUET-1 System möglich, wobei die parallel untersuchte Expression im pCWORi-System weniger effizient war [104]. Dies zeigt, dass die Expression von eukaryotischen CYPs im bakteriellen System zum Teil sehr unberechenbar ist und für die ausgewählte CYP zunächst eine geeignete Expressionsstrategie identifiziert werden muss. Die während dieser Arbeit aufgenommenen CO-Spektren der *E. coli*-CYP-Präparationen zeigten keine „450 nm Peaks“, aber Peaks bei 420 nm. Dies spricht dafür, dass zwar die Grundstruktur der P450 Enzyme vorhanden war, diese aber nicht korrekt gefaltet vorlagen [49, 50]. Entweder war das Proteingerüst bereits innerhalb der Zelle nicht korrekt gefaltet, oder die rekombinanten Varianten waren zu instabil und verloren nach dem Zellaufschluss ihre native und aktive Konformation.

Daher erfolgte der Strategiewechsel hin zum eukaryotischen Hefesystem. Die Expression in *S. cerevisiae* birgt den Vorteil, dass die vorhandenen Zellkompartimente und Membransysteme größere Ähnlichkeit zu Systemen höherer Eukaryonten zeigen [162]. Dies kann die Untersuchung rekombinanter CYPs begünstigen, wobei Zeit- und Arbeitsaufwand nur geringfügig größer ausfallen als im bakteriellen System. Nachteilig kann sich ein niedriges Expressionslevel und die damit verbundene niedrige Proteinkonzentration auswirken [155]. *S. cerevisiae* besitzt auch eigene CYPs, welche sich aufgrund der sehr geringen Konzentration nicht negativ auf die Untersuchungen rekombinant exprimierter CYPs auswirken sollten [163]. Zur Absicherung wurden in dieser Arbeit Leervektorkontrollen zum Vergleich herangezogen, welche keine CYP-bedingten Hintergrundreaktionen zeigten. Ein Vergleich der nativ vorhandenen Menge der hefeeigenen Reduktase mit menschlichen Leberzellmikrosomen gab Hinweise darauf, dass dieser Faktor sich wahrscheinlich nicht limitierend auf die Reaktion auswirkt, da die Reduktase im Verhältnis zu den rekombinant exprimierten CYPs ausreichend vorhanden ist [164]. In dieser

Arbeit wurden zusätzlich auch spezifisch modifizierte Stämme verwendet, die konstitutiv verschiedene Reduktasen überexprimieren [68, 69, 165], um einer mangelnden Verfügbarkeit der Reduktase vorzubeugen. Cabello-Hurtado et al. beobachteten zudem einen Einfluss der coexprimierten Reduktase auf die erfolgreiche Expression einer bestimmten CYP [166]. Sie verwendeten das gleiche Vektorkonstrukt in drei Stämmen, zwei davon wurden auch in dieser Arbeit verwendet (W(R) und WAT11). Dabei unterschieden sich die Expressionslevel der CYP erheblich, je nachdem welcher Stamm verwendet wurde, bzw. welche Reduktase vorlag. Sie folgerten einen stabilisierenden Einfluss der CPR auf die CYP. Vieles spricht für sehr niedrige Expressionslevel in den gennaten Stämmen während dieser Arbeit, die mangelnde Kompatibilität auf der Expressionsebene wäre ein möglicher Grund für dieses Phänomen. Die ersten Expressionsversuche dieser Arbeit in *S. cerevisiae* schlugen allerdings ebenfalls fehl. Dabei ist es erneut schwierig zu sagen, ob es an der Expression an sich, oder an der Aufarbeitung der Proben lag. Lagen die Proteine *in vivo* noch in nativem Zustand vor, können sie je nach ihrer Stabilität aufgrund zu hoher Temperaturen, eines ungünstigen pH Wertes, möglicherweise vorkommenden Proteasen oder anderen schädlichen Einflüssen während der Isolierung Schaden nehmen oder ganz zerstört werden. Die Proben wurden so weit möglich kontinuierlich durch Eis gekühlt, allerdings können beispielsweise während des Zellaufschlusses auch höhere Temperaturen auftreten, die ausreichen, um hitzeempfindlichen Proteinen zu schaden. Zudem waren die ersten Gene, mit denen die Expression mit *S. cerevisiae* versucht wurde, bezüglich des Codon-Usage auf die Expression in *E. coli* optimiert. Ist das Codon-Usage des Zielgens und des Expressionsstammes nicht aufeinander abgestimmt, kann die Expressionseffizienz erheblich eingeschränkt sein [167, 168]. Durch die Optimierung des Codon-Usage kann die Expression um ein Vielfaches gesteigert werden [169]. Dies ist möglicherweise ein Grund für den mangelnden Erfolg der ersten Expressionen im Hefesystem.

Mit weiteren Varianten, deren Gene bereits bei der Synthese für die Expression in *S. cerevisiae* optimiert wurden und einer neuen Vektor/Stamm-Kombination konnte eine erfolgreiche Expression erreicht werden. Allerdings reichte die Menge an aktiv exprimierten Proteinen nicht aus, um einen Nachweis mittels CO-Spektren oder SDS-Page zu liefern. Die aufgenommenen CO-Spektren zeigten auch weiterhin nur Peaks bei 420 nm. Dafür kommen mehrere Ursachen in Frage. Um eine große Anzahl verschiedener Proben mit möglichst hohem Durchsatz testen zu können, basierte die verwendete Methode zur Aufnahme der CO-Spektren auf denen von Otey et al. [79]. Dieser gibt eine Nachweisgrenze von 100 nM für die enthaltene Menge intakter CYPs an, damit diese zuverlässig detektiert und quantifiziert werden können. Bei der Expression humaner CYPs durch *S. cerevisiae* wurden Proteinerträge im Bereich von 2 - 3 nM beschrieben [170], die ohne weitere Aufkonzentrierung unterhalb der Nachweisgrenze in genanntem Assay liegen würden. Durch solche geringen Expressionsraten, zu geringer Aufkonzentrierung oder den Abbau der Enzyme während der Prozessierung könnte diese Grenze möglicherweise unterschritten worden sein und aktive CYPs wären mit dieser Methode nicht nachweisbar gewesen. Bei der Aufnahme des CO-Spektrums können zusätzliche Komplikationen auftreten. Beispielsweise können sich durch den Zusatz des Natriumdithionits Wasserstoffperoxid oder andere reaktive Sauerstoffspezies bilden und die nativen CYPs beschädigen [171, 172]. Daher sollte das Natriumdithionit immer erst nach der Begasung mit Kohlenstoffmonoxid zugesetzt werden, um solche negativen Effekte zu vermeiden [172]. Bei der parallelen Handhabung mehrerer Proben ist diese Reihenfolge allerdings schwieriger einzuhalten und das Natriumdithionit wurde daher in dieser Arbeit vor der Begasung mit Kohlenstoffmo-

noxid zugesetzt. Weiterhin wurden pflanzliche CYPs beschrieben, die eine geringe Affinität zu Kohlenmonoxid zeigen [173, 174] und andere eukaryotische CYPs, die von Natriumdithionit nur sehr langsam reduziert werden [175]. Ursachen für diese Phänomene können dabei in der Konformation der Monoxygenasen und der Zugänglichkeit der Häm-Gruppe liegen [172].

Das tatsächliche Vorhandensein der Proteine konnte, neben dem Hinweis des Peaks bei 420 nm im CO-Spektrum, durch einen Western Blot nachgewiesen werden, der allerdings erneut nur Informationen über die gesamte Menge des Zielproteins lieferte, nicht aber über dessen Zustand. Mittels des durchgeführten Western Blot wurde die Summe der vorhandenen Proteine nachgewiesen, die einen His-Tag aufwiesen. Da die Proteine dazu denaturiert wurden, konnte nur die Gesamtheit der CYPs nachgewiesen werden, die im CO-Spektrum sowohl den potentiellen Peak bei 450 nm und den bei 420 nm verursachten. So kann mit diesem Verfahren nicht zwischen der aktiven und der nicht-aktiven Proteinform unterschieden werden. Dass Vorliegen nativer CYPs konnte durch den Nachweis der Aktivität bestätigt werden. Die Oxidation von nicht-aktivierten Kohlenstoffatomen ist charakteristisch für CYPs, dennoch wurde bei allen Experimenten eine Leervektorkontrolle mitgeführt, um gewährleisten zu können, dass die beobachtete Aktivität nicht durch den vorhandenen Zellhintergrund verursacht wurde. Insgesamt mussten mehrere Faktoren erfüllt sein, um eine erfolgreiche *in vitro* Biokatalyse durch die neuen Varianten zu erreichen und erfolgreich und zuverlässig zu detektieren. Dazu gehörten zunächst die korrekte Transkription und Translation, dann die Faltung, inklusive der richtigen Konformation der Hämgruppe und der Einbau in das Membransystem. Zudem muss sich die funktionsfähige Reduktase ebenfalls in unmittelbarer Nähe zur CYP befinden und beide müssen kompatibel und im richtigen Mengenverhältnis zueinander vorhanden sein. Die Kompatibilität beider Enzyme kann einen enormen Einfluss auf die Aktivität des Systems haben. So konnten Chang et al. ebenfalls zeigen, dass bei der einen CYP ein Austausch der parallel exprimierten CPR eine 12-fach höhere Aktivität zur Folge hatte, bei einer anderen CYP der gleiche Austausch dagegen zu einem 1,8-fachen Abfall der Aktivität führte [104].

### 6.2.3 Analytische Methoden zur Charakterisierung der ausgewählten CYPs

Um die neuen aktiven Varianten hinsichtlich ihres Substratspektrums besser untersuchen zu können, mussten geeignete analytische Methoden etabliert werden. In der Literatur sind mehrere Methoden zur Quantifizierung von Fettsäuren und deren Derivaten beschrieben, darunter Analysen via Dünnschichtchromatografie [176], oder GC/MS [129, 177-179] und LC/MS [129] basierte Methoden. In dieser Arbeit wurde eine LC/MS Methode verwendet, da für diese keine zusätzlichen Extraktionsschritte notwendig waren, was besonders bei einem erhöhten Probendurchsatz einen Vorteil darstellt. Dies hat im Gegensatz zur gängigsten, in der Literatur beschriebenen, GC/MS Methode den Nachteil, dass für die aus einer solchen Methode resultierenden Fragmentierungsmuster der einzelnen Substanzen keine allgemeinen Datenbanken verfügbar sind, durch die die Substanzen eindeutig identifiziert werden können. Durch die große Varianz der Methoden können die Spektren einzelner Komponenten stark voneinander abweichen. Daher wurden bei der verwendeten LC/MS Methode Vergleichssubstanzen benötigt, um eine Quantifizierung zu ermöglichen. Zum sensitiven Nachweis aller Substrate und aller möglicherweise daraus resultierenden Oxidationsprodukte wurde eine einzige Analysemethode angestrebt. Dabei sollten

sowohl die polarste Komponente die Sebacinsäure und die hydrophobste Komponente die Stearinsäure detektiert werden können. Je länger die Fettsäuren waren, desto schlechter ließen sie sich detektieren, was entweder an der zunehmenden Abnahme der Ionisierbarkeit unter den gewählten Bedingungen lag oder daran, dass die Komponenten nicht mehr ausreichend von der Säule eluiert werden konnten.

#### 6.2.4 Charakterisierung der ausgewählten CYPs

Die erweiterte Analytik lieferte den Rahmen zur Untersuchung des Substratspektrums der einzelnen Varianten. Dabei wurden die freien Fettsäuren als Substrat zum Nachweis der  $\omega$ -Oxidation eingesetzt und verfügbare Hydroxysäuren zur Untersuchung von möglicher Überoxidation durch die zu charakterisierenden Varianten. Die freien Fettsäuren wurden aufgrund ihrer guten Verfügbarkeit und ihrer geringeren Hydrophobizität, die eine gleichmäßige Verteilung während des Assays begünstigt, ausgewählt. Um das Potential neuer Enzymvarianten beurteilen zu können, muss dieses für die CYP verfügbar sein, was zum Teil wegen der geringen Löslichkeit hydrophober Komponenten im wässrigen System erschwert ist [180]. Bei vielen Aktivitätsassays werden organische Lösungsmittel wie DMSO als Lösungsvermittler eingesetzt, so auch in dieser Arbeit. Dabei sollte der bestmögliche Kompromiss zwischen einer optimalen Löslichkeit und Verteilung des Substrates und den potentiell negativen Auswirkungen des Lösungsmittels auf das Enzym gefunden werden. Iwase et al. beobachteten zum Beispiel eine um 50% herabgesetzte Aktivität einer eukaryotischen CYP bei einer Konzentration von nur 1% (v/v) DMSO [181]. Hickman et al. beobachteten dagegen keine Hemmung der untersuchten CYP durch DMSO (1% (v/v)) während ihrer Experimente. Der Zusatz eines organischen Lösungsmittels als Lösungsvermittler kann negative, oder nicht beobachtbare Einflüsse auf das System haben und sollte daher in jedem Fall so gering wie möglich gehalten werden.

Der durchgeführte Enzymassay zur Ermittlung der Aktivität wies einige Herausforderungen auf. Reduktase und CYP müssen ihre native Konformation, und damit ihre Aktivität, über den Isolierungsprozess und die Dauer des Aktivitätsassays beibehalten. Weiterhin muss der benötigte Cofaktor in ausreichender Menge vorhanden sein. Dazu wurde ein geeignetes Regenerationssystem eingesetzt, wie es bereits mehrfach beschrieben wurde [182, 183]. Dies spielt eine besonders große Rolle, wenn wie in dieser Arbeit der Zellaufschlussüberstand untersucht wird, da neben den gewünschten Zielproteinen noch viele weitere unbekannte Komponenten enthalten sind, welche zu einem Verbrauch des Cofaktors führen können.

Die Versuche wurden parallel und aus der jeweils gleichen Zellpräparation heraus durchgeführt. So konnten die Reaktionen der CYPs vom vorhandenen Zellhintergrund abgegrenzt werden und beispielsweise sichergestellt werden, dass eine ausbleibende Überoxidation nicht durch grundlegend fehlende Aktivität bedingt wurde. Der beobachtete Umsatz der Substrate war bei den verschiedenen Experimenten nicht gleich. So konnte bei der Variante CYPi27 als erste Aktivität nachgewiesen werden, in darauf folgenden Experimenten aus einer neuen Expressionskultur heraus, zeigte diese Variante die geringste Produktbildung der in diesem Lauf getesteten Varianten. Dies ist sehr wahrscheinlich in einer unterschiedlichen Menge des aktiven Cytochrom P450 Proteins begründet. Unter normalen Umständen werden zunächst die Mikrosomen mit den enthaltenen CYPs und der zugehörigen CPR isoliert und anschließend die Aktivitätstests durchgeführt und das CO-Spektrum aufgenommen. Durch den charakteristi-

schen Peak bei 450 nm und dem Vergleich mit der Absorption bei 490 nm kann die Menge des enthaltenen nativen Cytochrom P450 Enzyms sehr spezifisch ermittelt werden [49, 50]. Da nur Peaks bei 420 nm beobachtet wurden (siehe 6.2.2), war eine Mengenbestimmung auf diesem Wege nicht möglich. Daher war der Vergleich der verschiedenen Varianten untereinander kaum möglich, da die jeweilige Menge der aktiven Enzyme unbekannt blieb. Huang et al. und He et al. bestimmten die Gesamtkonzentration der vorhandenen mikrosomalen Proteine mittels des Bradford Assays [129, 184]. Nachteil dieser Methode ist in beiden Fällen, dass die Aktivität nicht auf ein konkretes Enzym bezogen werden kann, sondern immer auf alle in den Mikrosomen befindlichen Proteine. Weiterhin gibt diese Methode, ebenso wie die SDS-Page oder der Western Blot, keine Informationen über den Zustand der untersuchten Proteine und weist daher eine geringere Spezifität auf und liefert weniger Informationen als die gängigere Methode zur CYP-Konzentrationsbestimmung. Aus diesen Gründen und der mangelhaften Isolierung der Mikrosomen wurden diese Methoden zur Proteinkonzentrationsbestimmung während dieser Arbeit nicht angewendet.

Die Isolierung der Mikrosomen wird in der Literatur auf verschiedene Art und Weise beschrieben. Eine gängige Methode beinhaltet die Isolierung der Mikrosomenfraktion durch einen Ultrazentrifugationsschritt aus dem Zellaufschlussüberstand [55, 185-187]. Eine weitere Methode ist die Fällung der Mikrosomen durch den Zusatz von Polyethylenglycol [92, 94, 163, 188]. Diese Maßnahme lässt auch einen Zentrifugationsschritt bei niedrigeren g-Zahlen zu. Beide Methoden führten in dieser Arbeit nicht zur Isolation von Mikrosomen mit aktiven CYPs, wobei nicht alle Varianten mit beiden Methoden isoliert wurden. Es ist unklar ob die Proteine während der Isolierungsphase denaturiert wurden oder ob die Mikrosomen an sich nicht isoliert werden konnten. Der sichere Nachweis der erfolgreichen Expression wurde in dieser Arbeit durch den Nachweis der spezifischen Oxidation der Substrate erbracht. Daher sollte neben der Messung des Zellrohextrakts aus dem gleichen Ansatz die Mikrosomenpräparation gewonnen und vermessen werden. Eine weitere Möglichkeit zur Verfolgung des Zielproteins stellt die weitere Erhöhung der Proteinkonzentration durch den Aufschluss größerer Zellmengen dar. Parallel kann der Verbleib der Proteine durch Western Blots der einzelnen Fraktionen nachverfolgt werden. Mit dieser Kombination könnte ermittelt werden, in welchen Fraktionen sich die CYPs befinden und an welcher Stelle sie möglicherweise ihre Aktivität verlieren.

**Tab. 6.2-1: Vergleich der Substratpräferenzen der Referenz CYPs und der neuen Varianten**

CYP	Referenz CYP + Substrat Spektrum (unges. FS)	Identität (Aminosäuren)	Präferenz Substrat (unges. FS) CYP	Referenz
<b>CYPi27</b> ( <i>Penicillium marneffei</i> )	CYP52A17 C <sub>14</sub> > C <sub>12</sub> > C <sub>16</sub> > C <sub>10</sub> > C <sub>18</sub>	63%	C <sub>12</sub>	[12]
<b>CYPi7</b> <i>Glycine max</i>	CYP86A1 C <sub>16</sub> > C <sub>14</sub> > C <sub>12</sub> > C <sub>18</sub> *	82%	C <sub>14+16</sub>	[94]
<b>CYPi9</b> <i>Arabidopsis thaliana</i>	CYP86A1 C <sub>16</sub> > C <sub>14</sub> > C <sub>12</sub> > C <sub>18</sub> *	75%	C <sub>14+16</sub>	[94]
<b>CYPi3</b> <i>Glycine max</i>	CYP94A1 C <sub>14</sub> > C <sub>12</sub> > C <sub>16</sub> > C <sub>10</sub> > C <sub>18</sub> *	73%	C <sub>14</sub>	[92]
<b>CYPi5</b> <i>Oryza sativa</i>	CYP94A1 C <sub>14</sub> > C <sub>12</sub> > C <sub>16</sub> > C <sub>10</sub> > C <sub>18</sub> *	48%	C <sub>14</sub>	[92]
<b>CYPi8</b> <i>Linum usitatissimum</i>	CYP86A1 C <sub>16</sub> > C <sub>14</sub> > C <sub>12</sub> > C <sub>18</sub> *	84%	C <sub>14</sub>	[94]
<b>CYPi10</b> <i>Medicago truncatula</i>	CYP86A1 C <sub>16</sub> > C <sub>14</sub> > C <sub>12</sub> > C <sub>18</sub> *	75%	C <sub>16</sub>	[94]

\*Stearinsäure wurde sowohl von der CYP94A1 als auch von der CYP86A1 nicht umgesetzt

**Tab. 6.2-1** zeigt eine Übersicht über die Substratpräferenzen der untersuchten CYPs und deren Referenz-CYPs nach deren Sequenzabgleich sie ausgewählt wurden. Die CYPi27 war die einzige der untersuchten Varianten, die Laurinsäure als Substrat bevorzugte. Eschenfeldt et al. zeigten eine deutliche Präferenz der CYP52A17 zur Myristinsäure vor Laurinsäure [12], allerdings beträgt die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz in diesem Fall nur 63%, was ein möglicher Grund für die Unterschiede im Substratspektrum sein könnte. Beim der Untersuchung der FS12-Umsetzung wies die CYPi27 die geringste Umsetzung zur Hydroxyfettsäure auf, allerdings ist die enthaltene Menge des Enzyms unbekannt, sodass die Aktivität nur bedingt vergleichbar ist. Bei den neuen Varianten, die an die Sequenz der CYP86A1 angelehnt waren, stimmte das Substratspektrum in weiten Teilen mit denen des Referenzzyms überein [94]. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei den Varianten, die an die CYP94A1 angelehnt sind. Beide zeigten eine deutliche Präferenz für das Substrat Myristinsäure, genau wie die CYP94A1 aus *Vicia sativa*, obwohl eine der beiden Varianten nur eine 48%ige Übereinstimmung mit dem Referenzzym aufweist [92].

Das Substratspektrum der untersuchten Enzyme lag insgesamt hauptsächlich im Bereich der Kettenlängen zwischen C<sub>14</sub>-C<sub>16</sub>. Die kurzkettigen Substrate der Länge C<sub>10</sub> und C<sub>11</sub> wurden in deutlich geringerem Maße umgesetzt als die langkettigen Substrate. Die Umsetzung von Caprinsäure (FS10) konnte bei keiner der aktiven Varianten nachgewiesen werden, was auch für das Referenzzym CYP86A1 gilt, an welches vier der sechs pflanzlichen Varianten angelehnt waren. Hydroxyfettsäuren werden in Pflanzen überwiegend zur Synthese von Cutin, einem wasserabweisenden Polymer der Cuticula und für Abwehrreaktionen benötigt. Die bevorzugten Kettenlängen dieser Anwendungen liegen bei C<sub>16</sub> und C<sub>18</sub> [86]. Dies könnte ein Grund für die Präferenz zu längeren Substraten sein. Weiterhin sind auch pflanzliche

CYPs beschrieben, die eine sehr große Affinität zur Laurinsäure zeigen [96]. Diese Varianten akzeptierten auch das C<sub>12</sub>-Substrat ohne Anzeichen einer Überoxidation und könnten sich daher als potentielle Hydroxylasen für den *Candida*-Ganzzellbiokatalysator eignen. Um dies abschließend beurteilen zu können, muss allerdings zunächst die Aktivität in Abhängigkeit der Enzymmenge bestimmt werden.

Die Untersuchung der CYPs bezüglich der Überoxidation ergab keine signifikante Bildung der korrespondierenden Disäure im Vergleich zur mitgeführten Leervektorkontrolle. Grundsätzlich konnte aber eine geringe Bildung der Disäure beobachtet werden. Die wahrscheinlichste Ursache ist die Oxidation des hydroxylierten Substrates durch native Enzyme des Expressionsstammes *S. cerevisiae*. Dickinson et al. untersuchten das Substratspektrum zweier *S. cerevisiae* Alkoholdehydrogenasen (ADH) und konnten dabei zeigen, dass Fettalkohole und Fettdiole mit diesen Enzymen zu den korrespondierenden Aldehyden oxidiert wurden [189]. Im Zuge einer Randfragestellung konnten sie dagegen nur eine sehr geringe Oxidation der eingesetzten C<sub>12</sub>-Hydroxysäure feststellen. Lu et al. zeigten diese Umsetzung zum C<sub>12</sub>-Fettaldehyd im Rahmen von *in vitro* Experimenten [38]. Weiterhin weist *S. cerevisiae* grundsätzlich ein hohes ADH-Expressionslevel auf [190]. Dass dennoch nur geringe Mengen der Hydroxysäure oxidiert werden, kann an der Cofaktorverfügbarkeit liegen. Für die Oxidation benötigt die ADH zum einen den oxidierten Cofaktor und zum anderen sind die durch Dickinson et al. betrachteten Beispiel-ADHs beide NADH abhängig und nicht NADPH abhängig [189]. Die weitere Oxidation des Aldehyds zur korrespondierenden Säure könnte beispielsweise durch eine möglicherweise vorhandene Aldehyddehydrogenase (ALD) oder auch durch vorhandenen Sauerstoff initiiert worden sein. Die für analytische Zwecke verwendete Oxolaurinsäure (OLS) zeigte sich bei der Lagerung als sehr empfindlich gegenüber Umgebungssauerstoff und oxidierte sehr schnell zur Dicarbonsäure. Insgesamt zeigen die exprimierten Enzyme dieser Arbeit keine signifikante Überoxidation.

### 6.3 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Biotransformationsplattform, welche den Produktionsprozess von  $\alpha$ - $\omega$ -Dicarbonsäuren reproduzierbar und zuverlässig abbildet, erfolgreich etabliert werden. Mit dem umgesetzten downscale Ansatz konnte der Einfluss verschiedener Prozessparameter, wie Temperatur und Substratfeedstrategie, auf die Produktbildung und den Prozessablauf untersucht werden. Damit wurde die Basis für eine effektive, zukünftige Prozessoptimierung geschaffen, mit der sowohl der Einfluss weiterer Prozessparameter untersucht werden kann, als auch neu geschaffene Biokatalysatoren integriert werden können. Interessante zukünftige Fragestellungen könnten die gezielte Einflussnahme auf die Biomassekonzentration sein, beispielsweise durch das gezielte Zuführen „frischer“ Zellsuspension oder durch eine Zellrezirkulation zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Biotransformation. Eine detailliertere Betrachtung und angeschlossene Optimierung aller auftretenden Transportvorgänge des Substrates und des Produktes können zukünftige Produktionsstämme weiter verbessern.

Mit einem solchen System können auch Auswirkungen auf Downstream-Prozesse untersucht werden, wie das Abtrennen des Produktes aus dem Biotransformationsmedium, oder die Menge und Beschaffenheit anfallender Abfallströme.

Für die Entwicklung zukünftiger Produktionsstämme müssen die gefundenen aktiven Cytochrom P450 (CYP)-Varianten weiter charakterisiert werden. Mit den gewonnenen Informationen über ihr jeweiliges breites Substratspektrum besitzen sie das Potential, Bestandteil eines optimierten Ganzzellbiokatalysators zu werden. Um die vielversprechendsten Varianten identifizieren zu können, werden weiterführende Informationen bezüglich verschiedener enzymkinetischer Parameter wie  $k_{cat}$  und  $K_m$ , sowie die pH und Temperaturoptima der einzelnen Enzyme benötigt. Erst diese Informationen machen die neuen Varianten untereinander und auch mit den nativ in *C. tropicalis* vorhandenen CYPs vergleichbar. Dazu sollte die erste Maßnahme in der zuverlässigen Bestimmung der Menge der aktiven CYPs liegen, was zum Beispiel durch die Anpassung der Methode zur Aufnahme des CO-Spektrums erreicht werden könnte. Weiterhin birgt die Betrachtung der zugehörigen Reduktase (CPR) ein großes Optimierungspotential, besonders im Hinblick auf die Insertion rekombinanter CYPs in den Ganzzellkatalysator. Dabei kann eine zur CYP passende Reduktase die Katalyse verbessern und die Expression des Enzyms positiv beeinflussen.

Detaillierte Informationen über das Genom, Transskriptom, Proteom und Metabolom können weitere entscheidende Hinweise über die verschiedenen, oft sehr komplexen Abläufe innerhalb des Produktionsstammes liefern und bieten weitere Ansatzpunkte zur Optimierung des Ganzzellkatalysators. So bietet die etablierte Biotransformationsplattform das Potential, durch minimierten Aufwand und kontinuierliche Optimierungen, einen industriellen Prozess effizienter und damit dauerhaft konkurrenzfähig zu gestalten.

## Literaturverzeichnis

1. Kurka, S., *Biomasse-basierte Produkte aus Konsumentensicht -ausgewählte europäische Länder im Vergleich*, in *Fakultät für Wirtschaftswissenschaften*. 2012, TU München: München. p. 186.
2. Rokka, J. and L. Uusitalo, *Preference for green packaging in consumer product choices – Do consumers care?* International Journal of Consumer Studies, 2008. **32**(5): p. 516-525.
3. Energie, B.f.W.u., *Schlaglichter der Wirtschaftspolitik Monatsbericht April 2014*. 2014.
4. Herrmann, M. *European plastics*. Available from: <http://www.plasticseurope.de/Document/plastics-the-facts-20142015.aspx?FolID=2>.
5. PlasticsEurope, *Weltweite und europäische Produktionsmenge von Kunststoff in den Jahren von 1950 bis 2013 (in Millionen Tonnen)*. 2015, Statista.
6. Hannover, I. *Global biopolymer production capacity*. 2014 12.10.2014; Available from: <http://ifbb.wp.hs-hannover.de/downloads/index.php?site=Statistics&nav=5-1-0-0-0>.
7. Schaffer, S. and T. Haas, *Biocatalytic and Fermentative Production of  $\alpha,\omega$ -Bifunctional Polymer Precursors*. Organic Process Research & Development, 2014. **18**(6): p. 752-766.
8. Sheldon, R.A., *Green and sustainable manufacture of chemicals from biomass: state of the art*. Green Chemistry, 2014. **16**(3): p. 950-963.
9. Finnerty, W.R., *Fossil resource biotechnology: Challenges and prospects*. Current Opinion in Biotechnology, 1992. **3**(3): p. 277-282.
10. Vasic-Racki, D., *History of Industrial Biotransformations – Dreams and Realities*, in *Industrial Biotransformations*. 2006, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p. 1-36.
11. Craft, D.L., et al., *Identification and characterization of the CYP52 family of Candida tropicalis ATCC 20336, important for the conversion of fatty acids and alkanes to alpha,omega-dicarboxylic acids*. Applied and environmental microbiology, 2003. **69**(10): p. 5983-91.
12. Eschenfeldt, W.H., et al., *Transformation of fatty acids catalyzed by cytochrome P450 monooxygenase enzymes of Candida tropicalis*. Applied and environmental microbiology, 2003. **69**(10): p. 5992-9.
13. Vandamme, E.J. and W. Soetaert, *Bioflavours and fragrances via fermentation and biocatalysis*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2002. **77**(12): p. 1323-1332.
14. Wagemann, K., *Herstellung von Grundchemikalien auf Basis nachwachsender Rohstoffe als Alternative zur Petrochemie? Production of Basic Chemicals on the Basis of Renewable Resources as Alternative to Petrochemistry?* Chemie Ingenieur Technik, 2014. **86**(12): p. 2115-2134.
15. Virent, *Virent BioFormPX® Paraxylene Used for World's First PET Plastic Bottle Made Entirely From Plant-Based Material*. 2015.
16. Gangopadhyay, S., S. Nandi, and S. Ghosh, *Biooxidation of fatty acid distillates to dibasic acids by a mutant of Candida tropicalis*. Journal of oleo science, 2006. **56**(1): p. 13-17.
17. Fabritius, D., H.J. Schäfer, and A. Steinbüchel, *Bioconversion of sunflower oil, rapeseed oil and ricinoleic acid by Candida tropicalis M25*. Applied microbiology and biotechnology, 1998. **50**(5): p. 573-578.
18. Schrewe, M., et al., *Direct Terminal Alkylamino-Functionalization via Multistep Biocatalysis in One Recombinant Whole-Cell Catalyst*. Advanced Synthesis & Catalysis, 2013. **355**(9): p. 1693-1697.
19. Schaffer, S., et al., *Biotechnological synthesis process of omega-functionalized carbon acids and carbon acid esters from simple carbon sources*. 2013, Google Patents.
20. Industries, E., *Alternativer Rohstoff für Polyamid 12: Evonik betreibt Pilotanlage für biobasierte  $\omega$ -Amino-Laurinsäure*. 2013.
21. Gröger, H., *Hydroxy-Funktionalisierung nichtaktiver C-H- und C=C-Bindungen: Neue Perspektiven für die Synthese von Alkoholen durch biokatalytische Verfahren*. Angewandte Chemie, 2014. **126**(12): p. 3128-3130.
22. Picataggio, S., et al., *Metabolic engineering of Candida tropicalis for the production of long-chain dicarboxylic acids*. Bio/technology, 1992. **10**(8): p. 894-8.
23. Yang, Y., et al., *Two-Step Biocatalytic Route to Biobased Functional Polyesters from  $\omega$ -Carboxy Fatty Acids and Diols*. Biomacromolecules, 2009. **11**(1): p. 259-268.
24. Green, K.D., M.K. Turner, and J.M. Woodley, *Candida cloacae oxidation of long-chain fatty acids to dioic acids*. Enzyme and Microbial Technology, 2000. **27**(3-5): p. 205-211.
25. Broadway, N.M., F.M. Dickinson, and C. Ratledge, *The enzymology of dicarboxylic acid formation by Corynebacterium sp. strain 7EIC grown on n-alkanes*. Journal of General Microbiology, 1993. **139**(6): p. 1337-1344.
26. Mobley, D.P., *Biosynthesis of long-chain dicarboxylic acid monomers from renewable resources. Final technical report*, in *Other Information: PBD: 30 Apr 1999*. 1999. p. Medium: P; Size: vp.
27. Ness, J.E. and J. Minshull, *Biotransformation using genetically modified candida*. 2010, Google Patents.

28. Schrewe, M., et al., *Whole-cell biocatalysis for selective and productive C-O functional group introduction and modification*. Chem Soc Rev, 2013. **42**(15): p. 6346-77.
29. Zhang, J. and R. Greasham, *Chemically defined media for commercial fermentations*. Applied microbiology and biotechnology, 1999. **51**(4): p. 407-421.
30. Uchio, R. and I. Shii, *Microbial Production of Long-chain Dicarboxylic Acids from n-Alkanes Part II Production by Candida cloacae Mutant Unable to Assimilate Dicarboxylic Acid*. Agricultural and Biological Chemistry, 1972. **36**(3): p. 426-433.
31. Fabritius, D., H.J. Schäfer, and A. Steinbüchel, *Biotransformation of linoleic acid with the Candida tropicalis M25 mutant*. Applied microbiology and biotechnology, 1997. **48**(1): p. 83-87.
32. Liu, S., et al., *Optimal pH control strategy for high-level production of long-chain  $\alpha,\omega$ -dicarboxylic acid by Candida tropicalis*. Enzyme and Microbial Technology, 2004. **34**(1): p. 73-77.
33. Hill, F.F., I. Venn, and K.L. Lukas, *Studies on the formation of long-chain dicarboxylic acids from puren-alkanes by a mutant of Candida tropicalis*. Applied microbiology and biotechnology, 1986. **24**(2): p. 168-174.
34. Huf, S., et al., *Biotechnological synthesis of long-chain dicarboxylic acids as building blocks for polymers*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2011. **113**(5): p. 548-561.
35. Liu, S., et al., *Intracellular pH and metabolic activity of long-chain dicarboxylic acid-producing yeast Candida tropicalis*. Journal of bioscience and bioengineering, 2003. **96**(4): p. 349-353.
36. Yi, Z.-H. and H. Rehm, *Formation of  $\alpha,\omega$ -dodecanedioic acid and  $\alpha,\omega$ -tridecanedioic acid from different substrates by immobilized cells of a mutant of Candida tropicalis*. European journal of applied microbiology and biotechnology, 1982. **16**(1): p. 1-4.
37. Gross, R.A.N.Y., NY, US), Lu, Wenhua (Brooklyn, NY, US), Ness, Jon (Redwood City, CA, US), Minshull, Jeremy (Los Altos, CA, US), *Biosynthetic routes to long-chain alpha,omega-hydroxyacids, diacids and their conversion to oligomers and polymers*. 2010: United States.
38. Lu, W., et al., *Biosynthesis of monomers for plastics from renewable oils*. Journal of the American Chemical Society, 2010. **132**(43): p. 15451-5.
39. Jiao, P., et al., *Effects and mechanisms of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on production of dicarboxylic acid*. Biotechnology and Bioengineering, 2001. **75**(4): p. 456-462.
40. Cao, Z., et al., *Engineering the acetyl-CoA transportation system of candida tropicalis enhances the production of dicarboxylic acid*. Biotechnology journal, 2006. **1**(1): p. 68-74.
41. Käppeli, O., M. Müller, and A. Fiechter, *Chemical and structural alterations at the cell surface of Candida tropicalis, induced by hydrocarbon substrate*. Journal of bacteriology, 1978. **133**(2): p. 952-958.
42. Mauersberger, S., W.-H. Schunck, and H.-G. Müller, *The induction of cytochrome P-450 in the alkane-utilizing yeast Lodderomyces elongisporus: Alterations in the microsomal membrane fraction*. Applied microbiology and biotechnology, 1984. **19**(1): p. 29-35.
43. Beopoulos, A., T. Chardot, and J.-M. Nicaud, *Yarrowia lipolytica: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation*. Biochimie, 2009. **91**(6): p. 692-696.
44. Hetteema, E.H. and H.F. Tabak, *Transport of fatty acids and metabolites across the peroxisomal membrane*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2000. **1486**(1): p. 18-27.
45. Van Bogaert, I.N., et al., *The role of cytochrome P450 monooxygenases in microbial fatty acid metabolism*. The FEBS journal, 2011. **278**(2): p. 206-21.
46. Scheller, U., et al., *Characterization of the n-alkane and fatty acid hydroxylating cytochrome P450 forms 52A3 and 52A4*. Arch Biochem Biophys, 1996. **328**(2): p. 245-54.
47. Berg, J., J. Tymoczko, and L. Stryer, *Entwicklung von Arzneistoffen*, in *Stryer Biochemie*. 2013, Springer Berlin Heidelberg. p. 1049-1075.
48. Torres Pazmiño, D.E., et al., *Monooxygenases as biocatalysts: Classification, mechanistic aspects and biotechnological applications*. Journal of Biotechnology, 2010. **146**(1-2): p. 9-24.
49. Omura, T. and R. Sato, *The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes: I. Evidence for its hemoprotein nature*. Journal of Biological Chemistry, 1964. **239**(7): p. 2370-2378.
50. Omura, T. and R. Sato, *The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes: II. Solubilization, purification, and properties*. Journal of Biological Chemistry, 1964. **239**(7): p. 2379-2385.
51. Urlacher, V.B. and M. Girhard, *Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application*. Trends in Biotechnology, 2012. **30**(1): p. 26-36.
52. Denisov, I.G., et al., *Structure and Chemistry of Cytochrome P450*. Chemical Reviews, 2005. **105**(6): p. 2253-2278.
53. Hannemann, F., et al., *Cytochrome P450 systems—biological variations of electron transport chains*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2007. **1770**(3): p. 330-344.
54. Kandel, S., et al., *Cytochrome P450-dependent fatty acid hydroxylases in plants*. Phytochemistry Reviews, 2006. **5**(2): p. 359-372.

55. Le Bouquin, R., et al., *CYP94A5, a new cytochrome P450 from Nicotiana tabacum is able to catalyze the oxidation of fatty acids to the omega-alcohol and to the corresponding diacid*. European journal of biochemistry / FEBS, 2001. **268**(10): p. 3083-90.
56. Grogan, G., *Cytochromes P450: exploiting diversity and enabling application as biocatalysts*. Current Opinion in Chemical Biology, 2011. **15**(2): p. 241-248.
57. Jennewein, S., et al., *Taxol biosynthesis: Taxane 13 $\alpha$ -hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(24): p. 13595-13600.
58. Shafiee, A. and C.R. Hutchinson, *Macrolide antibiotic biosynthesis: isolation and properties of two forms of 6-deoxyerythronolide B hydroxylase from Saccharopolyspora erythraea (Streptomyces erythreus)*. Biochemistry, 1987. **26**(19): p. 6204-6210.
59. Fujii, T., et al., *Efficient Biotransformations Using Escherichia coli with tolC acrAB Mutations Expressing Cytochrome P450 Genes*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2009. **73**(4): p. 805-810.
60. Kumar, S., *Engineering cytochrome P450 biocatalysts for biotechnology, medicine and bioremediation*. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, 2010. **6**(2): p. 115-131.
61. Houde, A., A. Kademi, and D. Leblanc, *Lipases and their industrial applications*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2004. **118**(1-3): p. 155-170.
62. Chefson, A. and K. Auclair, *Progress towards the easier use of P450 enzymes*. Molecular BioSystems, 2006. **2**(10): p. 462-469.
63. Schmid, R. and V.B. Urlacher, *Modern biooxidation : enzymes, reactions, and applications*. 2007, Weinheim: Wiley-VCH. xvii, 299 p.
64. Rollin, J.A., T.K. Tam, and Y.H.P. Zhang, *New biotechnology paradigm: cell-free biosystems for biomanufacturing*. Green Chemistry, 2013. **15**(7): p. 1708-1719.
65. Hinnen, A., J.B. Hicks, and G.R. Fink, *Transformation of yeast*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1978. **75**(4): p. 1929-1933.
66. Larionov, V., N. Kouprina, and T. Karpova, *Stability of recombinant plasmids containing the ars sequence of yeast extrachromosomal rDNA in several strains of Saccharomyces cerevisiae*. Gene, 1984. **28**(2): p. 229-235.
67. Pompon, D., et al., *[6] Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments*, in *Methods in enzymology*, F.J. Eric and R.W. Michael, Editors. 1996, Academic Press. p. 51-64.
68. Urban, P., et al., *Cloning, Yeast Expression, and Characterization of the Coupling of Two Distantly Related Arabidopsis thaliana NADPH-Cytochrome P450 Reductases with P450 CYP73A5*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(31): p. 19176-19186.
69. Urban, P., C. Cullin, and D. Pompon, *Maximizing the expression of mammalian cytochrome P-450 monooxygenase activities in yeast cells*. Biochimie, 1990. **72**(6-7): p. 463-472.
70. Henry J, B., *[1] Maximizing expression of eukaryotic cytochrome P450s in Escherichia coli*, in *Methods in enzymology*, F.J. Eric and R.W. Michael, Editors. 1996, Academic Press. p. 3-14.
71. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular cloning : a laboratory manual*. 1989, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
72. Daniel Gietz, R. and R.A. Woods, *Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method*, in *Methods in enzymology*, G. Christine and R.F. Gerald, Editors. 2002, Academic Press. p. 87-96.
73. Gietz, R.D. and R.A. Woods, *Genetic transformation of yeast*. BioTechniques, 2001. **30**(4): p. 816-20, 822-6, 828 passim.
74. Mullis, K.B. and F.A. Faloona, *[21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*, in *Methods in Enzymology*. 1987, Academic Press. p. 335-350.
75. Heckman, K.L. and L.R. Pease, *Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension*. Nat. Protocols, 2007. **2**(4): p. 924-932.
76. Laemmli, U.K., *Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-685.
77. Barnes, H.J., M.P. Arlotto, and M.R. Waterman, *Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase in Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991. **88**(13): p. 5597-5601.
78. Akiyama, R., S. Kajiwara, and K. Shishido, *Catalytic Reaction of Basidiomycete Lentinula edodes Cytochrome P450, Le.CYP1 Enzyme Produced in Yeast*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2004. **68**(1): p. 79-84.
79. Otey, C.R., *High-throughput carbon monoxide binding assay for cytochromes p450*. Methods Mol Biol, 2003. **230**: p. 137-139.
80. Borst, N., *SCHEMA-Rekombination von Cytochrom P450 Monooxygenasen der Enzymfamilie CYP101 und CYP102 zur Bereitstellung neuer Hydroxylaseaktivitäten (unveröffentlichtes Manuskript)*, in *Lehrstuhl für Chemie Biogener Rohstoffe*. 2015, TU München.

81. Han, X., K. Yang, and R.W. Gross, *Multi-dimensional mass spectrometry-based shotgun lipidomics and novel strategies for lipidomic analyses*. Mass Spectrometry Reviews, 2012. **31**(1): p. 134-178.
82. Donike, M., *N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamid, ein neues Silylierungsmittel aus der reihe der silylierten amide*. Journal of Chromatography A, 1969. **42**: p. 103-104.
83. deSousa, S.R., et al., *Yeast flotation viewed as the result of the interplay of supernatant composition and cell-wall hydrophobicity*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2003. **29**(4): p. 309-319.
84. Riedel, S.L., et al., *Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by Ralstonia eutropha in high cell density palm oil fermentations*. Biotechnology and Bioengineering, 2012. **109**(1): p. 74-83.
85. Shio, I. and R. Uchio, *Microbial Production of Long-chain Dicarboxylic Acids from n-Alkanes Part I. Screening and Properties of Microorganisms Producing Dicarboxylic Acids*. Agricultural and Biological Chemistry, 1971. **35**(13): p. 2033-2042.
86. Pinot, F. and F. Beisson, *Cytochrome P450 metabolizing fatty acids in plants: characterization and physiological roles*. The FEBS journal, 2011. **278**(2): p. 195-205.
87. Seghezzi, W., et al., *Identification and characterization of additional members of the cytochrome P450 multigene family CYP52 of Candida tropicalis*. DNA and cell biology, 1992. **11**(10): p. 767-80.
88. Seghezzi, W., D. Sanglard, and A. Fiechter, *Characterization of a second alkane-inducible cytochrome P450-encoding gene, CYP52A2, from Candida tropicalis*. Gene, 1991. **106**(1): p. 51-60.
89. Ohkuma, M., et al., *CYP52 (cytochrome P450alk) multigene family in Candida maltosa: identification and characterization of eight members*. DNA and cell biology, 1995. **14**(2): p. 163-73.
90. Zimmer, T., et al., *The CYP52 multigene family of Candida maltosa encodes functionally diverse n-alkane-inducible cytochromes P450*. Biochemical and biophysical research communications, 1996. **224**(3): p. 784-9.
91. Kim, D., et al., *Functional expression and characterization of cytochrome P450 52A21 from Candida albicans*. Archives of biochemistry and biophysics, 2007. **464**(2): p. 213-20.
92. Tijet, N., et al., *Functional expression in yeast and characterization of a clofibrate-inducible plant cytochrome P-450 (CYP94A1) involved in cutin monomers synthesis*. The Biochemical journal, 1998. **332** ( Pt 2): p. 583-9.
93. Petkova-Andonova, M., H. Imaishi, and H. Ohkawa, *CYP92B1, A cytochrome P450, expressed in petunia flower buds, that catalyzes monooxidation of long-chain fatty acids*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2002. **66**(9): p. 1819-28.
94. Benveniste, I., et al., *CYP86A1 from Arabidopsis thaliana encodes a cytochrome P450-dependent fatty acid omega-hydroxylase*. Biochemical and biophysical research communications, 1998. **243**(3): p. 688-93.
95. Hofer, R., et al., *The Arabidopsis cytochrome P450 CYP86A1 encodes a fatty acid omega-hydroxylase involved in suberin monomer biosynthesis*. Journal of experimental botany, 2008. **59**(9): p. 2347-60.
96. Imaishi, H., et al., *CYP78A1 preferentially expressed in developing inflorescences of Zea mays encoded a cytochrome P450-dependent lauric acid 12-monooxygenase*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2000. **64**(8): p. 1696-701.
97. Imaishi, H. and M. Petkova-Andonova, *Molecular cloning of CYP76B9, a cytochrome P450 from Petunia hybrida, catalyzing the omega-hydroxylation of capric acid and lauric acid*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2007. **71**(1): p. 104-13.
98. Le Bouquin, R., et al., *Cloning and functional characterization of CYP94A2, a medium chain fatty acid hydroxylase from Vicia sativa*. Biochemical and biophysical research communications, 1999. **261**(1): p. 156-62.
99. Rupasinghe, S.G., H. Duan, and M.A. Schuler, *Molecular definitions of fatty acid hydroxylases in Arabidopsis thaliana*. Proteins, 2007. **68**(1): p. 279-93.
100. Duan, H. and M.A. Schuler, *Differential expression and evolution of the Arabidopsis CYP86A subfamily*. Plant physiology, 2005. **137**(3): p. 1067-81.
101. Compagnon, V., et al., *CYP86B1 is required for very long chain omega-hydroxyacid and alpha, omega -dicarboxylic acid synthesis in root and seed suberin polyester*. Plant physiology, 2009. **150**(4): p. 1831-43.
102. Dobritsa, A.A., et al., *CYP704B1 is a long-chain fatty acid omega-hydroxylase essential for sporopollenin synthesis in pollen of Arabidopsis*. Plant physiology, 2009. **151**(2): p. 574-89.
103. Li, H., et al., *Cytochrome P450 family member CYP704B2 catalyzes the {omega}-hydroxylation of fatty acids and is required for anther cutin biosynthesis and pollen exine formation in rice*. The Plant cell, 2010. **22**(1): p. 173-90.
104. Chang, M.C., et al., *Engineering Escherichia coli for production of functionalized terpenoids using plant P450s*. Nature chemical biology, 2007. **3**(5): p. 274-7.
105. Quinlan, R.F., T.T. Jaradat, and E.T. Wurtzel, *Escherichia coli as a platform for functional expression of plant P450 carotene hydroxylases*. Archives of biochemistry and biophysics, 2007. **458**(2): p. 146-57.
106. Fisher, C.W., M.S. Shet, and R.W. Estabrook, [2] *Construction of plasmids and expression in Escherichia coli of enzymatically active fusion proteins containing the heme-domain of a P450 linked to NADPH-P450 reductase*, in *Methods in enzymology*, F.J. Eric and R.W. Michael, Editors. 1996, Academic Press. p. 15-25.
107. Jenkins, C.M., I. Pikuleva, and M.R. Waterman, *Expression of eukaryotic cytochromes P450 in E. coli*. Methods in molecular biology, 1998. **107**: p. 181-93.

108. Pritchard, M.P., L. McLaughlin, and T. Friedberg, *Establishment of functional human cytochrome P450 monooxygenase systems in Escherichia coli*. *Methods in molecular biology*, 2006. **320**: p. 19-29.
109. Waltz, E., *Cathay industrial biotech*. *Nat Biotechnol*, 2012. **30**(6): p. 480.
110. Schörken, U. and P. Kempers, *Lipid biotechnology: Industrially relevant production processes*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2009. **111**(7): p. 627-645.
111. Picataggio, S., K. Deanda, and L.D. Eirich, *Site-specific modification of the candida tropicalis genome*. 1993, Google Patents.
112. Anderson, K.W., et al., *Process for making polycarboxylic acids*. 2000, Henkel Corp.
113. *World conference Production of dicarboxylic acids by fermentation*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1987. **64**(9): p. 1236-1267.
114. Verdezyn, *Verdezyn To Build and Operate World's First Bio-Based DDDA Plant in Malaysia*. 2014.
115. Burke, F., *Scale Up and Scale Down of Fermentation Processes in Practical Fermentation Technology*, L.H.E. Brian McNeil (Editor), Editor. 2008.
116. Kurzrock T, K.K., *Downscale Upscale - Elasticity of Scales-An Approach to Forecast Future Requirements in Biotechnology*. *JSM Biotechnol Bioeng* 2014. **2**(1).
117. Yang, F., M. Hanna, and R. Sun, *Value-added uses for crude glycerol--a byproduct of biodiesel production*. *Biotechnology for Biofuels*, 2012. **5**(1): p. 1-10.
118. Tan, H.W., A.R. Abdul Aziz, and M.K. Aroua, *Glycerol production and its applications as a raw material: A review*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2013. **27**: p. 118-127.
119. Picataggio, S., K. Deanda, and J. Mielenz, *Determination of Candida tropicalis acyl coenzyme A oxidase isozyme function by sequential gene disruption*. *Molecular and Cellular Biology*, 1991. **11**(9): p. 4333-4339.
120. Junker, B., *Foam and its mitigation in fermentation systems*. *Biotechnol Prog*, 2007. **23**(4): p. 767-84.
121. Koch, V., et al., *Effect of antifoam agents on the medium and microbial cell properties and process performance in small and large reactors*. *Process Biochemistry*, 1995. **30**(5): p. 435-446.
122. N. P. Ghildyal, B.K.L.a.N.G.K., *Foam Control in Submerged Fermentation: State of the art*, in *Advances in applied microbiology*. 1988. p. 173-216.
123. Pollard, J.M., A.J. Shi, and K.E. Göklen, *Solubility and Partitioning Behavior of Surfactants and Additives Used in Bioprocesses*. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 2006. **51**(1): p. 230-236.
124. Sousa, S.R.d., et al., *Flotation of biocolloids suspended in liquid phases of different compositions and pH values*, in *Surface and Colloid Science*. 2004, Springer Berlin Heidelberg. p. 264-269.
125. Wilken, M. and B. Huchzermeyer, *Suppression of mycelia formation by NO produced endogenously in Candida tropicalis*. *European Journal of Cell Biology*, 1999. **78**(3): p. 209-213.
126. Müller, J. and W. Melchinger, *Ultrastruktur-Merkmale zur Definition der Begriffe 'Hefezelle', 'Pseudomyzel' und 'echtes Myzel' bei Candida albicans*. *Mycoses*, 2006. **49**: p. 24-30.
127. Doran, P.M., *9 - Mass Transfer*, in *Bioprocess Engineering Principles*, P.M. Doran, Editor. 1995, Academic Press: London. p. 190-217.
128. Yang, J., et al., *Microbial hydroxylation of 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -dimethyl-17 $\beta$ -(1-oxopropyl)androsta-1,4-dien-3-one to rimexolone by Curvularia lunata AS 3.4381*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2007. **47**(3-4): p. 155-158.
129. Huang, F.-C., A. Peter, and W. Schwab, *Expression and Characterization of CYP52 Genes Involved in the Biosynthesis of Sophorolipid and Alkane Metabolism from Starmerella bombicola*. *Applied and environmental microbiology*, 2014. **80**(2): p. 766-776.
130. Fiedurek, J., M. Trytek, and M. Skowronek, *Strategies for Improving the Efficiency of Bioprocesses Involving Toxic Compounds*. *Current Organic Chemistry*, 2012. **16**(24): p. 2946-2960.
131. Ütkür, F.Ö., et al., *Integrated organic-aqueous biocatalysis and product recovery for quinaldine hydroxylation catalyzed by living recombinant Pseudomonas putida*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2012. **39**(7): p. 1049-1059.
132. Kuhn, D., et al., *Systematic optimization of a biocatalytic two-liquid phase oxyfunctionalization process guided by ecological and economic assessment*. *Green Chemistry*, 2012. **14**(3): p. 645-653.
133. Karande, R., et al., *Continuous cyclohexane oxidation to cyclohexanol using a novel cytochrome P450 monooxygenase from Acidovorax sp. CHX100 in recombinant P. taiwanensis VLB120 biofilms*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015: p. n/a-n/a.
134. Gomes, N., J. Teixeira, and I. Belo, *Fed-batch versus batch cultures of Yarrowia lipolytica for  $\gamma$ -decalactone production from methyl ricinoleate*. *Biotechnology Letters*, 2012. **34**(4): p. 649-654.
135. Kabara, J., *Antimicrobial agents derived from fatty acids*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1984. **61**(2): p. 397-403.
136. Bergsson, G., et al., *Killing of Gram-positive cocci by fatty acids and monoglycerides*. *APMIS*, 2001. **109**(10): p. 670-8.

137. Bergsson, G., et al., *In Vitro Killing of Candida albicans by Fatty Acids and Monoglycerides*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001. **45**(11): p. 3209-3212.
138. Bergsson, G., O. Steingrímsson, and H. Thormar, *Bactericidal effects of fatty acids and monoglycerides on Helicobacter pylori*. Int J Antimicrob Agents, 2002. **20**(4): p. 258-62.
139. Huang, C.B., et al., *Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms*. Arch Oral Biol, 2011. **56**(7): p. 650-4.
140. Tyo, K.E., H.S. Alper, and G.N. Stephanopoulos, *Expanding the metabolic engineering toolbox: more options to engineer cells*. Trends in Biotechnology, 2007. **25**(3): p. 132-137.
141. Dickmann, L.J., et al., *Differential Roles of Arg97, Asp293, and Arg108 in Enzyme Stability and Substrate Specificity of CYP2C9*. Molecular Pharmacology, 2004. **65**(4): p. 842-850.
142. Salazar, O., P.C. Cirino, and F.H. Arnold, *Thermostabilization of a Cytochrome P450 Peroxygenase*. ChemBioChem, 2003. **4**(9): p. 891-893.
143. Oliver, C.F., et al., *A Single Mutation in Cytochrome P450 BM3 Changes Substrate Orientation in a Catalytic Intermediate and the Regiospecificity of Hydroxylation*. Biochemistry, 1997. **36**(7): p. 1567-1572.
144. Graham-Lorence, S., et al., *An Active Site Substitution, F87V, Converts Cytochrome P450 BM-3 into a Regio- and Stereoselective (14S,15R)-Arachidonic Acid Epoxygenase*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(2): p. 1127-1135.
145. Sansen, S., et al., *Structural insight into the altered substrate specificity of human cytochrome P450 2A6 mutants*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2007. **464**(2): p. 197-206.
146. Iwasaki, M., et al., *Engineering mouse P450coh to a novel corticosterone 15 alpha-hydroxylase and modeling steroid-binding orientation in the substrate pocket*. Journal of Biological Chemistry, 1993. **268**(2): p. 759-762.
147. Lentz, O., V. Urlacher, and R.D. Schmid, *Substrate specificity of native and mutated cytochrome P450 (CYP102A3) from Bacillus subtilis*. Journal of Biotechnology, 2004. **108**(1): p. 41-49.
148. Tsao, C.-C., et al., *Identification of Human CYP2C19 Residues that Confer S-Mephenytoin 4'-Hydroxylation Activity to CYP2C9?*. Biochemistry, 2001. **40**(7): p. 1937-1944.
149. Shultz, M.A., et al., *Metabolic Capabilities of CYP2F2 with Various Pulmonary Toxicants and Its Relative Abundance in Mouse Lung Subcompartments*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2001. **296**(2): p. 510-519.
150. Mancy, A., et al., *Diclofenac and Its Derivatives As Tools for Studying Human Cytochromes P450 Active Sites: Particular Efficiency and Regioselectivity of P450 2Cs*. Biochemistry, 1999. **38**(43): p. 14264-14270.
151. Bell-Parikh, L.C. and F.P. Guengerich, *Kinetics of Cytochrome P450 2E1-Catalyzed Oxidation of Ethanol to Acetic Acid via Acetaldehyde*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(34): p. 23833-23840.
152. Duetz, W.A., J.B. Van Beilen, and B. Witholt, *Using proteins in their natural environment: potential and limitations of microbial whole-cell hydroxylations in applied biocatalysis*. Current Opinion in Biotechnology, 2001. **12**(4): p. 419-425.
153. Imaoka, S., et al., *Complete cDNA Sequence and cDNA-Directed Expression of CYP4A11, a Fatty Acid  $\omega$ -Hydroxylase Expressed in Human Kidney*. DNA and Cell Biology, 1993. **12**(10): p. 893-899.
154. Crespi, C.L. and V.P. Miller, *The use of heterologously expressed drug metabolizing enzymes—state of the art and prospects for the future*. Pharmacology & Therapeutics, 1999. **84**(2): p. 121-131.
155. Schroer, K., M. Kittelmann, and S. Lütz, *Recombinant human cytochrome P450 monooxygenases for drug metabolite synthesis*. Biotechnology and Bioengineering, 2010. **106**(5): p. 699-706.
156. F J Gonzalez, a. and K.R. Korzekwa, *Cytochromes P450 Expression Systems*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 1995. **35**(1): p. 369-390.
157. Sinha, N. and S.J. Ferguson, *An Escherichia coli ccm (cytochrome c maturation) deletion strain substantially expresses Hydrogenobacter thermophilus cytochrome c552 in the cytoplasm: availability of haem influences cytochrome c552 maturation*. FEMS Microbiol Lett, 1998. **161**(1): p. 1-6.
158. Gallagher, J., N. Kaderbhai, and M. Kaderbhai, *Gene-dose-dependent expression of soluble mammalian cytochrome b5 in Escherichia coli*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1992. **38**(1): p. 77-83.
159. Guo, Z.Y., et al., *Expression of Modified Human Cytochrome P450 1A1 in Escherichia coli: Effects of 5' Substitution, Stabilization, Purification, Spectral Characterization, and Catalytic Properties*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1994. **312**(2): p. 436-446.
160. Richardson, T.H., et al., *Purification and Characterization of Recombinant-Expressed Cytochrome P450 2C3 from Escherichia coli: 2C3 Encodes the 6 $\beta$ -Hydroxylase Deficient Form of P450-3b*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1993. **300**(1): p. 510-516.
161. Larson, J.R., M.J. Coon, and T.D. Porter, *Alcohol-inducible cytochrome P-450IIE1 lacking the hydrophobic NH2-terminal segment retains catalytic activity and is membrane-bound when expressed in Escherichia coli*. Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(12): p. 7321-7324.
162. Oeda, K., T. Sakaki, and H. Ohkawa, *Expression of Rat Liver Cytochrome P-450MC cDNA in Saccharomyces cerevisiae*. DNA, 1985. **4**(3): p. 203-210.

163. Masimirembwa, C.M., et al., *Heterologous Expression and Kinetic Characterization of Human Cytochromes P-450: Validation of a Pharmaceutical Tool for Drug Metabolism Research*. Drug Metabolism and Disposition, 1999. **27**(10): p. 1117-1122.
164. Pearce, R.E., et al., *Effects of Freezing, Thawing, and Storing Human Liver Microsomes on Cytochrome P450 Activity*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1996. **331**(2): p. 145-169.
165. Truan, G., et al., *Enhanced in vivo monooxygenase activities of mammalian P450s in engineered yeast cells producing high levels of NADPH-P450 reductase and human cytochrome b5*. Gene, 1993. **125**(1): p. 49-55.
166. Cabello-Hurtado, F., et al., *Cloning, Expression in Yeast, and Functional Characterization of CYP81B1, a Plant Cytochrome P450 That Catalyzes In-chain Hydroxylation of Fatty Acids*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(13): p. 7260-7267.
167. Ernst, J.F., *Codon usage and gene expression*. Trends in Biotechnology, 1988. **6**(8): p. 196-199.
168. Gustafsson, C., S. Govindarajan, and J. Minshull, *Codon bias and heterologous protein expression*. Trends in Biotechnology, 2004. **22**(7): p. 346-353.
169. Batard, Y., et al., *Increasing Expression of P450 and P450-Reductase Proteins from Monocots in Heterologous Systems*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2000. **379**(1): p. 161-169.
170. Thomas, F., et al., *In Vivo and In Vitro Recombinant DNA Technology as a Powerful Tool in Drug Development*, in *Handbook of Drug Metabolism*. 1999, CRC Press. p. 321-362.
171. Guengerich, F.P., *Destruction of heme and hemoproteins mediated by liver microsomal reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase*. Biochemistry, 1978. **17**: p. 3633-3639.
172. Guengerich, F.P., et al., *Measurement of cytochrome P450 and NADPH-cytochrome P450 reductase*. Nat. Protocols, 2009. **4**(9): p. 1245-1251.
173. Song, W.C. and A.R. Brash, *Purification of an allene oxide synthase and identification of the enzyme as a cytochrome P-450*. Science, 1991. **253**: p. 781-784.
174. Lau, S.M.C., P.A. Harder, and D.P. O'Keefe, *Low carbon monoxide affinity allene oxide synthase is the predominant cytochrome P450 in many plant tissues*. Biochemistry, 1993. **32**: p. 1945-1950.
175. Sandhu, P., et al., *Expression of modified human cytochrome P450 1A2 in Escherichia coli: stabilization, purification, spectral characterization, and catalytic activities of the enzyme*. Arch. Biochem. Biophys., 1994. **309**: p. 168-177.
176. Bak, S., et al., *Cloning of three A-type cytochromes P450, CYP71E1, CYP98, and CYP99 from Sorghum bicolor (L.) Moench by a PCR approach and identification by expression in Escherichia coli of CYP71E1 as a multifunctional cytochrome P450 in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin*. Plant molecular biology, 1998. **36**(3): p. 393-405.
177. Durairaj, P., et al., *Fungal cytochrome P450 monooxygenases of Fusarium oxysporum for the synthesis of omega-hydroxy fatty acids in engineered Saccharomyces cerevisiae*. Microbial Cell Factories, 2015. **14**(1): p. 45.
178. Scheps, D., et al., *Regioselective omega-hydroxylation of medium-chain n-alkanes and primary alcohols by CYP153 enzymes from Mycobacterium marinum and Polaromonas sp. strain JS666*. Org Biomol Chem, 2011. **9**(19): p. 6727-33.
179. Girhard, M., et al., *Cytochrome P450 monooxygenase from Clostridium acetobutylicum: A new  $\alpha$ -fatty acid hydroxylase*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007. **362**(1): p. 114-119.
180. Di, L. and E.H. Kerns, *Biological assay challenges from compound solubility: strategies for bioassay optimization*. Drug Discovery Today, 2006. **11**(9-10): p. 446-451.
181. Iwase, M., et al., *Evaluation of the effects of hydrophilic organic solvents on CYP3A-mediated drug-drug interaction in vitro*. Human & Experimental Toxicology, 2006. **25**(12): p. 715-721.
182. Imaishi, H. and U. Ishitobi, *Molecular cloning of CYP76A3, a novel cytochrome P450 from Petunia hybrida catalyzing the  $\omega$ -hydroxylation of myristic acid*. Biologia Plantarum, 2008. **52**(2): p. 242-250.
183. Pinot, F., et al., *Methyl Jasmonate Induces Lauric Acid  $\omega$ -Hydroxylase Activity and Accumulation of CYP94A1 Transcripts but Does Not Affect Epoxide Hydrolase Activities in Vicia sativa Seedlings*. Plant Physiology, 1998. **118**(4): p. 1481-1486.
184. He, F. and Y.T. Chen, *Cloning and heterologous expression of the NADPH cytochrome P450 oxidoreductase genes from an industrial dicarboxylic acid-producing Candida tropicalis*. Yeast, 2005. **22**(6): p. 481-491.
185. Zhang, S., et al., *CYP52X1, Representing New Cytochrome P450 Subfamily, Displays Fatty Acid Hydroxylase Activity and Contributes to Virulence and Growth on Insect Cuticular Substrates in Entomopathogenic Fungus Beauveria bassiana*. Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(16): p. 13477-13486.
186. Kandel, S., et al., *Cloning, Functional Expression, and Characterization of CYP709C1, the First Sub-terminal Hydroxylase of Long Chain Fatty Acid in Plants: INDUCTION BY CHEMICALS AND METHYL JASMONATE*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(43): p. 35881-35889.
187. Haudenschild, C., et al., *Functional Expression of Regiospecific Cytochrome P450 Limonene Hydroxylases from Mint (Mentha spp.) in Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2000. **379**(1): p. 127-136.

188. Pierrel, M.A., et al., *Catalytic Properties of the Plant Cytochrome P450 CYP73 Expressed in Yeast*. European Journal of Biochemistry, 1994. **224**(3): p. 835-844.
189. Dickinson, F.M. and S. Dack, *The activity of yeast ADH I and ADH II with long-chain alcohols and diols*. Chemico-Biological Interactions, 2001. **130-132**: p. 417-423.
190. de Smidt, O., J.C. du Preez, and J. Albertyn, *The alcohol dehydrogenases of Saccharomyces cerevisiae: a comprehensive review*. FEMS Yeast Research, 2008. **8**(7): p. 967-978.

## Danksagung

Bei allen die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich herzlich bedanken, besonders bei...

Herrn Prof. Dr. Volker Sieber für die Möglichkeit, ein so spannendes Thema bearbeiten zu können, für seine wertvolle Unterstützung und die positive und konstruktive Arbeitsatmosphäre.

Herrn Prof. Dr. Wilfried Schwab für die Übernahme des Koreferats und bei Prof. Dr. Cordt Zollfrank für Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Dr. Jochen Schmid, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand, fachlich und immer wieder auch persönlich. Ich danke ihm für seine unermüdlich positive Einstellung, die in den frustrierenden Momenten immer wieder motivierend war.

Petra Lommes, Dr. Broder Rühmann und Anja Schmidt, die mir mit ihren analytischen Spezialkenntnissen und umfassender Unterstützung stets zur Seite gestanden haben.

Thomas Howe und Irmgard Urban, die mir bei jeder Fermentationspanne beigestanden haben und Irina Funk für die gute Zusammenarbeit.

Elisabeth Aichner, die jedem von uns in organisatorischen Dingen immer liebevoll auf die Sprünge geholfen hat.

Allen meinen Kollegen am Lehrstuhl für Chemie Biogener Rohstoffe für alle fachlichen Diskussionen und die resultierende Inspiration.

Meinen früheren „Büro-Mitbewohnern“ für die interessanten und erheiternden, nicht-fachlichen Gespräche.

Allen meinen Straubinger (und dahin zugereisten) Freunden, die mich die Zeit in Niederbayern nie vergessen lassen werden.

Miriam Heiming, Claudia Nowak und Markus Brammen, die mir immer wieder einen Eindruck davon gegeben haben, was echte Freundschaft heißt, mich in allen Lebenslagen unterstützt haben und die immer für jeden Spaß zu haben sind.

Meinen Eltern, denen ich alles verdanke was ich bin und was mich ausmacht. Danke, dass ihr immer für mich da seid, mich unterstützt habt und mich liebt wie ich bin!

## Anhang

### Aminosäuresequenzen der ausgewählten CYPs

**CYP52A5** aus *Candida maltosa*

A.No. P24458

MAIEQIIIEVLPYLTKWYITILFGAAFTYFLSIALRNKYYEYKLCENPPYFKTAGFVGIPLIDV  
IKAKNAGKLADYADQTFDEYPHHSFYMTVAGMLKIVLTVDPENIKAVLATQFNDFALGARH  
AHFDPLLGDGIFTLDGEGWKHSRAMLRPQFAREQIAHVKALEPHVQVLAKQIKLNKGETFDL  
QELFFRFTVDTATEFLFGESVHSLYDEKLGVPNNIPGRENFAKAFNTSQHYLATRTYSQMF  
YFLTNPKEFRDCNAKVHKLQYFVNKALDASEDEVAEKSKGGYVFLYELVKQTRDPKVLQD  
QLLNIMVAGRDTTAGLLSFAMFELARNPKIWNKLRREEIEVNFGLGEEARVDEISFETLKKCEY  
LKAVLNETLRMYPSPVNFRTATRDTTLPRGGGKDGTSPIFVPKGSSVYTVYKTHRLEEYY  
GKDAYEFRPERWFEPSTRKLGWAYVPFNGGPRICLGQQFALTEASYVITRLAQMFEHLESKD  
ETYPPNKCIHLMNHNEGVFISAK

**CYP52A13** aus *Candida tropicalis*

A.No. Q874J4

MAVHDIIATYFTKWYVIVPLALIAYRVLDYFYGRYLMYKLGAKPFFQKQTDGCFGFKAPLEL  
LKKKSDGTLIDFTLQRIHDLDRPDIFTFTFPVFSINLVNTLEPENIKAILATQFNDFSLGTRHSHF  
APLLGDGIFTLDGAGWKHSRSMRLRPQFAREQISHVKLLEPHVQVFFKHVRKAQGKTFDIQELF  
FRLTVDSATEFLFGESVESLRDESIGMSINALDFDGKAGFADAFNYSQNYLASRAVMQQLYW  
VLNGKKFKECNAKVHKFADYYVNKALDLTPEQLEKQDGYVFLYELVKQTRDKQVLRDQLL  
NIMVAGRDTTAGLLSFVFFELARNPEVTNKLREEIEDKFGLGENASVEDISFESLKSCEYLKAV  
LNETLRLYPSVPQNFVATKNTTLPRGGGKDGSLPVLVRKGQTVIYGVYAAHRNPAVYGKD  
ALEFRPERWFEPETKKLGWAFLPFNGGPRICLGQQFALTEASYVTVRLQLQEFHLSDPDTEY  
PPKKMSHLTMSLFDGANIEMY

**CYP52A17** aus *Candida tropicalis*

A.No. Q874J4

MAEQLEWYVVPVLYIIKQLLAYTKTRVLMKKLGAAPVTNKLYDNAFGIVNGWKALQF  
KKEGRAQEYNDYKFDHNSKNPSVGTYSILFGTRIVVTKDPENIKAILATQFGDFSLGKRHTLF  
KPLLGDGIFTLDGEGWKHSRAMLRPQFAREQVAHVTSLEPHFQLLKKHILKHKGEYFDIQELF  
FRFTVDSATEFLFGESVHSLKDESIGINQDDIDFAGRKDFAESFNKAQEYLAIKTLVQTFYWL  
NNKEFRDCTKSVMKFTNYYVQKALDASPEELEKQSGYVFLYELVKQTRDPNVLRDQSLNILL  
AGRDTTAGLLSFAVFELARHPEIWAKLRREEIEQQFGLGEDSRVEEITFESLKRCEYLKAFNET  
LRIYPSVPRNFRIATKNTTLPRGGGSDGTSPILIQKGEAVSYGINSTHLDPVYYGPDAAEFRPER  
WFEPSTKKLGWAYLPFNGGPRICLGQQFALTEAGYVLVRLVQEFVSHVRSDEYVPPKRLTN  
LTMCLQDGAIVKFD

**CYP78A1** aus *Zea mays*

A.No. P48420

MAMASAACSCTDGTWWVYALPALLGSDTLCAHPALLAGLIFLATVSVALLAWATSPGGPA  
 WTNGRGASASLLSWDPVVCPCSAASSRCPGAAAPRPRRDGPRRRPRAKELMAFSVGDTPAV  
 VSSCPATAREVLAHPSFADRPVKRSARELMFARAIGFAPNGEYWRRLRRVASTHLFSPRRVAS  
 HEPGRQGDAEAMLRISIAAEQSASGAVALRPHLQAAALNNIMGSVFGTRYDVTSGAGAAEAE  
 HLKSMVREGFELLGAFNWSHLPWLAHLYPDPSNVTRRCAALVPRVQTFVRGVIDEHRRRRQ  
 NSAALNDNADFVDVLLSLEGDEKLGDDDMVAILWEMVFRGTDTTALLTEWCMAELVRHPA  
 VQARVRAEVDAAVGAGGCPTDADVARMPLYQAVVKETLRAHPPGPLLSWARLATADVPLC  
 NGMVVPAGTTAMVNMWAITHDAAVWADPDAFAPERFLPSEGGADVDRGVLDLRLAPFGA  
 GRRVCPGKNLGLTTVGLWVARLVHAFQWALPDGAAAVCLDEVLKLSLEMKTPLVAAAIPT  
 A

**CPR** aus *Candida tropicalis*

A.No. P37201

MALDKLDLYVIITLVVAIAAYFAKNQFLDQQQDTGFLNTDSGDGNSRDILQALKKNNKNTLL  
 LFGSQTGTAEDYANKLSRELHSRFLKTMVADFADYDFENFGDITEDILVFFIVATYGEGET  
 DNADEFHTWLTEEADTLSTLKYTVFGLGNSTYEFFNAIGRKFDRLLGEKGGDRFAEYGEEDD  
 GTGTLDEDFLAWKDNVFDLKNLNFEEKELKYEPNVKLTERDDLSGNDPVS LGEPNVKYI  
 KSEGVDLTKGPFDHHPFLARIVKTKELFTSEDRHCVHVEFDISESNLKYTTGDHLAIWPSNSD  
 ENIKQFAKCFGLEDKLDTVIELKALDSTYSIPFPNPITYGAVIRHHLEISGPVSRQFFLSIAGFAP  
 DEETKKSFTTRIGGDKQEFASKVTRRKFNIADALLFASNRPWSDVPFEFLIENVQHLTPRYYSI  
 SSSSLSEKQTINVTAVVEAEEDGRPVTGVVTNLLKNIEIEQNKTGETPMVHYDLNGPRGKF  
 SKFRLPVHRRSNFKLPKNSTTPVILIGPGTGVAPLRGFVRERVQQVKNGVNVGKTVLFYGC  
 NSEQDFLYKQEWSEYASVLGENFEMFNAFSRQDPTKKVYVQDKILENSALVDELLSSGAIIV  
 CGDASRMARDVQAAIAKIVAKSRDIHEDKAAELVKS WKVQNR YQEDVW

**CYPi2** aus *Vitis vinifera* (Traube)

A.No. F6GXN1

MIENILLNLQLLAPFFLLFIFPVLLFFFSSSGSKKKEASITIPKPYPLIGHYLDLKG VGNRRIQW  
 LSDIVKISPAATFTLHRPLGSRQVITGNPATVEHILKTRFSNYIKGSIFINNLSDFLGTGIFNADG  
 NTWKFRQVQVASHFNTKSLRKFEHVVDVELSDRLVPVLASAAQQDQTLDFQDILQRFAFDN  
 ICKIAFGYDAEYLTPSTEQSKFAVAYEEATEISSKRFRREPLPLVWKIKRLLNIGSEKRLRIAVKE  
 VRDFAKKIVREKKKELKEKESLEQVDMLSRFLSSGHSDEDFVTDIVISFILAGKDTTSAALMW  
 FFWLLSKNPGVEKEVLKEIMEKPETPAYDEVKDMVYIHAALCESMRLYPPVSMDSKEAVDD  
 DVLPDGTVVKKGTLVTYHVYAMGRMESIWGEDWAEFKPERWLEKVETGKWKVGRDSFT  
 YPVFQAGPRICLGKEMAFMQMKRLVAGILRRFTVVPAMAKGVEPHYFAFLTSQMEGGFPVKI  
 IDREASCHHHHHH

**CYPi3** aus *Glycine max* (Sojabohne)

A.No. I1N9N7

MIENILLNLQLLAPFFLLFIFPVLLFFFSSSGSKKKEASITTIPKPYPLIGHYLDLKGVGNRRIQW  
LSDIVKISPAATFTLHRPLGSRQVITGNPATVEHILKTRFSNYIKGSIFINNLSDFLGTGIFNADG  
NTWKFQRQVASHEFNTKSLRKFVEHVVDVELSDRLVPVLASAAQQDQTLDFQDILQRFAFDN  
ICKIAFGYDAEYLTPSTEQSKFAVAYEEATEISSKRFRREPLPLVWKIKRLLNIGSEKRLRIAVKE  
VRDFAKKIVREKKKELKEKESLEQVDMLSRFLSSGHSDEDFVTDIVISFILAGKDTTSAALMW  
FFWLLSKNPGVEKEVLKEIMEKPETPAYDEVKDMVYIHAALCESMRLYPPVSMDSKEAVDD  
DVLDPDGTVVKKGTLVTYHVYAMGRMESIWGEDWAEFKPERWLEK VETGKWKVGRDSFT  
YPVFQAGPRICLGKEMAFMQMKRLVAGILRRFTVVPAMAKGVEPHYFAFLTSQMEGGFPVKI  
IDREASCHHHHHH

**CYPi5** aus *Oryza sativa subsp. Japonica* (Reis)

A.No. Q8LRA6

MKFSSTSTPLFILLPLFLLYFLYLYQDTKKQPAGSNGLKSYPPVGTLPHFANRHRFLEWST  
DVMKRSPHTMTFKALGLTGGVITANVANVEHILKTNFSNYPKGELSVSLEDLLGHGIFNSD  
GEQWLWQRKAASYEFNQSLRSFVVDTVRFEVVERLLPLEWARRDGRITLDVQDVLERFAF  
DNICHVVFHEDPACLAEDSMVSSQSAEFIRACSDAQNAIARFMSPVKSLWRVKRLFNLDPER  
RMRDALTTIHGYADRIVRERRARGEAGLARSDDFLSRFAAGGEHSDESIRDVVTFNLIAGRDS  
TSSALTWFFWLVSRRPDVEDKIVHEIRAVRSASSSGGTSSATFSFDEL RDMHYLHAAITESMRL  
YPPVHLDTHSCKEDDFLPDGTFFVGKGWLVTYCAYAMGRVEDIWGADCEEFRPERWLDEAG  
AFRPDSPFKYPIFHAGPRMCLGKEMAYIQMKSIVACVLEQFSLRYAGGDGHPGFVLWSTLRM  
EGGLPMQVTTREHHHHHH

**CYPi6** (CYP86A1) aus *Arabidopsis thaliana*

A.No. P48422

MEALNSILTGYAVAALS VYALWFYFLSRRLTGPKVLPFVGS LPYLIANRSRIHDWIADNLRAT  
GGTYQTCTMVIPFVAKAQGFYTVTCHPKNVEHILKTRFDNYPKGP MWRAAFHDLLGQGIFNS  
DGDTWLMQRKTAALFTTRTLRQAMARWVNGTIKNRLWLILDRAVQNNKPV DLQDLFLRL  
TFDNICGLTFGKDPETLSLDLPDNPFSVAFDTATEATLKRLLYTGFLWRIQKAMGIGSEDKLK  
KSLEVVETYMND AIDARKNSPDDLLSRFLKKRDVNGNVLP TDVLRQIALNFVLAGRDTSSV  
ALS WFFWLVMNNREVEVKIVNELSMVLKETRGNDQEKWTEEPLEFDEADRLVYLKAALAE T  
LRLYPSVPQDFKYVVD DDVLPDGTFFVPRGSTVTYSIYSIGRMKTIWGEDCLEFRPERWLTADG  
ERFETPKDGYKFVAFNAGPRTCLGKDLAYNQMKSVASAVLLRYRVFPVPGHRVEQKMSLTL  
FMKNGLRVYLQPRGEVLAHHHHHH

**CYPi7** aus *Glycine max* (Sojabohne)

A.No. I1MB99

METLPLLLTLVATLSAYFLWFHLLARTLTGPKPWPLVGSLPGLFRNRDRVHDWIADNLRGRG  
 GSATYQTCIIPFPFLARKKGFYTVTCHPKNLEHILKTRFDNYPKGPKWQTAFHDLGGIFNSDG  
 ETWLMQRKTAALEFTTRTLKQAMSRVWNRSIKNRLWCILDKAAKERVSVDLQDLLLLRLTFD  
 NICGLTFGKDPETLSPELPENPFAVAFDTATEATMHRFLYPGLVWRFQKLLCIGSEKKLKESLK  
 VVETYMNDVADRTEAPSDDLRSFMKKRDAAGSSFSAAVLQRIVLNFVLAGRDTSSVALT  
 WFFWLLTNHPDVEQKIVAEIATVLADTRGGDRRRWTEDPLDFGEADRLVYLKAAALAETRLR  
 YPSVPQDFKQAVADDVLPDGTEVPAGSTVYYSIYSAGR VETIWGKDCMEFKPERWLSVRGDR  
 FEPPKDGFKFVAFNAGPRTCLGKDLAYLQMKSVAASVLLRYRLSLVPGHRVEQKMSLTLFM  
 KNGLRVFLHPRKLESGPGVATSPHHHHHH

**CYPi8** aus *Linum usitatissimum* (Flachs)

A.No. I6XNF1

METQSFLFTAVAISSAYLVWFYFLARRLTGPKVWPLFGSLPHVFMNRRARFHDWIADNLRATG  
 RASTYQCTCLPLPLARTQGFYTVTCHPKNIEHILRTRFDNYPKGPQWQAAFHDLGGQIFNS  
 DGDTWLIQRKTAALEFTTRTLRQAMARVWNRTIKNRLFIILDNASKSDTAVDLQDLLLLRLTFD  
 NICGLTFGKDPETLSPELPENPFAIAFDTATEATLQRFLYPGLWRIEKLIGIRAEKRLVSSLRIV  
 QNYMDEAVAVRQEAPSDDLRSFLKKRDADGRPFTVSVLQRIALNFILAGRDTSSVALSWFF  
 WLVMMNPRVEDKIIKEIATVLRATRGGDPSSWTAEPLTFDEADKLVYLKASLAETLRLYPSV  
 EDFKYVVEDDVLDPDGTVPAGSSVTYYSIYSVGRMKSIWGEDCLEFKPERWITEDAQTGGYKM  
 ETPKDGKFKFVAFNAGPRTCLGKDLAYLQMKSVASAVLLRYRLSLEPGHRVEQKMSLTLFMK  
 NGLRVMLQPRDLSSYHHHHHH

**CYPi9** aus *Arabidopsis thaliana*

A.No. Q9CAD6

MDGSTAAIILTLIVTYIIFVSLRRSYKGPRVWPLVGSLPALITNAHRMHDFIADNLRMCGGT  
 YQTCIFPIFLAKKQGHVTVTCDPKNLEHILKTRFDNYPKGPSWQSVFHDLLGDGIFNSDGDT  
 WRFQRKTAALEFTTRTLRQAMARWVDRAIKNRLVPILESARSRAEPIDLQDVLRLTFDNICG  
 LTFGKDPRTLSPEFPENGFVAFDGATEATLQRFIMPEFIWKIRKWLRLGLEDDMSRSISHVDN  
 YLSEIINTRKLELLGQQQDESRRHDDLRSFMKKKESYSDKYLYVALNFILAGRDTSSVAMS  
 WFFWLVS LNPRVEEKIINEICTILIKTRDTNVSKWTDEPLTFDEIDQLVYLKAAALSETLRLYPSV  
 PEDSKFVVANDVLPDGTVPVSGSNVTYYSIYSVGRMKFIWGEDCLEFKPERWLEESRDEKCNQ  
 YKFAFNAGPRICLGKDLAYLQMKSITASILRHRLTVAPGHRVEQKMSLTLFMKFGLKMDV  
 HKRDLTLPVEKVVNEMRKKHHHHHH

**CYPi10** aus *Medicago truncatula* (Schneckenklee)

A.No. G7JPI5

MTKSSNINFTSSNSSSSSSSSSPLAAANFNFNMIYSISLSLLQDIQILEILIAITLFIIIHSLRQKNHH  
 GLPIWPFLGMLPSLINGLRTNLYEWITDILNKQNGTFRFKGPSFSSLNCIVTSDPRNLEHLLKTK  
 FINFPKGTYFRNMVRDLLGDGIFSADDEIWQKQRKTASIEFHSTKFRNLTTDSL FELVHSRLLP  
 VLDESVDKRAVTDLQDILLRLTFDNVCMIAFGVDPGCLSQKLPEIPFAKAFEDATEATVLRV  
 MPTCAWKFMRLNLGVERKLLKSSIKGVDEFAMNVIRTRKKELSLEVDEKKQRSDLLTVFMK  
 MKDENGSAYSKFLRDICVNFILAGRDTSSVALSWFFWLLDQNHVEVEEKILEEICKVVSQRND  
 IKKEEFENSLIFRPEEIKKMDYLHACLSETLRLYPSVPVDHKEVVEDDTFPDGTILKKGTKVIY  
 AIYAMGRMESIWGKDCREFKPERWLKGRFMSESAKFTAFNGGPRLCLGKDFAYYQMKY  
 VAASIIYRYHVKVVENHPVEPKIALTMYMKHGIKVNLYRRDAAEIQKHLIHIIHHHHH

**CYPi12** aus *Sorghum bicolor*

A.No. C5WMA2

MAMASAVSSCTDSTWWVYALPTLLGSDTLCAHPALLAGLLFLT TVTAALLAWAASPGGPA  
 WAHGRGRLGATPIVGPRGLPVFGSIFALSRGLPHRTLAAMARAAGPRAKELMAFSVGDTPAV  
 VSSCPATAREVLAHPSFADRPVKRSARELMFARAIGFAPNGEYWRRLRRVASTHLFSPRRVA  
 AHEPGRQGDAEAMLRSVAAEQSASGTVVLRLPHLQAAALNNIMGSVFGTRYDVTSGATAGAA  
 EAEQLKSMVREGFELLGAFNWSHLPWLAHLYDPSNVTRRCAALVPRVQTFVRGVIDEHRR  
 RRQNSAALDLNDNADFVYVLLSLDGEKLRDDDMVAILWEMIFRGTDTTALLTEWCMAEL  
 VRHPAVQARLRAEVDAAVGAGGRPTDADVARMPYLQAVVKETLRAHPPGPLLSWARLATA  
 DVPLSNGMVVPAGTTAMVNMWAITHDAGVWADPDAFAPERFLPSEGGADVDRGVLDLRLA  
 PFGAGRRVCPGKNLGLTTVGLWVARLVHAFEWALPDGAPPVCLDEV LKLSLEKTPLAAAAP  
 RTAHHHHHH

**CYPi17** aus *Trifolium pratense* (Wiesenklee)

A.No. Q2PEZ7

MDYVNILLGLFFTWFVLVNGLMSLRRRKISKKLPPGPFPLPIIGNLHLLGNHPHKS LAQLAKIHG  
 PIMNLKLGQLITVVISSSVVAREVLQKQDLTFSNRFVDPVVHVRNHSDFSFVWLPVNSRWRTL  
 RKIMNSSIFSGNKLDGNQHLSKQVQELIDYCQKCAKNGEAVDIGRATFGTTLNLLSNTIFSK  
 DLTNPFSDSAKEFKELVWNIMVEAWKTQFGGLLSFPLRKFDPQGIKRRMTNYFTKFLGLISGL  
 IDERLKERNLRDNANIDVLDALLNISKRTQKRLTGIKSSSCLVSLFPTPFLPFIIICPFLYLLIFHR  
 CKVSDLNGEGSYVGGRVQLNHTPLQIGCDRLTVSNKPRNYGDSYSSFRTCLQGLILHLN TLE  
 WANGRTTSRIHTLLAKKHKTISQHICTSKKIKIKKLEHFLSFGAIVKKNLPPIPPGGFSSSLFHV  
 KWRKTLSCLYIIPKDSQVLVSVWAIGRNSDLWENPLVFKPERFWESEIDIRGRDFELIPFGAG  
 RRICPGLPLAIRMIPVALGSLNLSFNWKL YGGIAPKDLDMEEKFGITLAKAQPLLAIPTPLHHH  
 HHH

**CYPi25** aus *Candida dubliniensis*

A.No. B9WKL7

MSPSLVHQILAIAPYVEYLQANFTKWYILVPGILIALNVLTFLYTKYLEYKFNAKPVTNFIQD  
YTFGVLTPLILIYYKSQGTVMFANNLWGNRFFIKNADVGTGELRIFGMHLIETKDPENIKAIL  
ATQFNDFSLGTRHGFLYSLLGDGIFTLDGAGWKHSRSMRLRPQFAREQVSHVKILEPHMQVFF  
KHVRKNKGKAFDIQELFFRLTVDSSTEFLFGSSVESLRDETIGMSPSVKNLAGRDEF AEA FNYS  
QTINAYRFLQQFYWLCNGSKFRKSIATVHKFSDFYVQRALSLSKAELDDQKGYVFLYELAK  
QTRDPKVL RDQLLNILVAGRDTTAGLLSFVFFELARNPTVYAKLKEEIYNKFGSGEDARIDEIT  
FESLKQCEYLKAVINESLRLYPSVPHNFRTATRNTTLPRGGGPDGMSPIVVKKGQSVMYTVLA  
THRDTKTYGADANDFRPERWFEPETRKLGWAYVPFNGGPRICLGQQFALTEASYVTVRLQEQE  
FGHLTMDPETCYPPKLMNSLTLSLLEGANVEMYHHHHHH

**CYPi27** aus *Penicillium marneffe*

A.No. B6QM59

MAIPPWQLILGFIATSITYSILSSIYNNIQNRRKAATRGCQPPKKNPAGFLGLGYGNFKTILQYS  
RQHKALDLINKLIRENGNTYEDVVLGTKALVTAEPENIKAMLATQFNDFGLGMRRQIFGPFL  
GDGIFTLDGAGWSHSRAMLRPQFSREQVADVGM LGSHVDQLISQLPADGTPFDIQEYFFKMT  
LDTATEFLFGESTNCLLEKSEKSSALSTIGGEEGFANAFNKSQDYVVERSRAQNLYWLV TSA  
ESRRNCKLVHDVVDYVDAALARYNHTGGDQEKFIDSANPDYVFLDAMIRETRDRRALRD  
QMLNILLAGRDTTASLLSSSFYLLARHPAVWQRLREEILSIFPPSEPADSITIARLREVRYLKHF  
LNEVLRLLPVPVNGRFATVDTTLPVGGGPDGKSPVFPKGLKVQYQVTVMHRRKDLWGPD  
AEEFRPERWEENGRHGWEYLPFNGGPRICLGQQYALTEASYVLVRLLRFDHVTNAQPEVPS  
PCMKLALTA YHARGVKVGLFCHHHHHH

**Abkürzungsverzeichnis**

ADH	Alkoholdehydrogenase
AK	Antikörper
A.No.	Accessionnumber
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
BTM	Biotrockenmasse
CIP	Cleaning in place
CPR	Cytochrom P450 Reduktase
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
CYP	Cytochrom P450 Monooxygenase
DC	Dünnschichtchromatographie
ddH <sub>2</sub> O	Demineralisiertes Wasser
DDS (DA)	Dodecandisäure (Dodecanedioic acid)
DDSME	Dodecandisäuremethylester
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DO	Dissolved Oxygen
DS	Difettsäure
DSME	Difettsäuremethylester
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIC	Extracted Ion Chromatogram
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector (Lichtstredetektor)
ESI	Elektronenspray Ionisation
EtOH	Ethanol
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAldDH	Fettaldehyddehydrogenase
FAO	Fettalkoholoxidase
FID	Flammenionisationsdetektor
FMN	Flavinmononukleotid
FS	Fettsäure
GC	Gaschromatographie
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HS	Hydroxyfettsäure
HSME	Hydroxyfettsäuremethylester
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
k.A.	Keine Angaben
KBE	Kolonien-bildende-Einheiten
KP <sub>i</sub> -Puffer	Kaliumphosphat-Puffer

---

LC/MS	Liquid Chromatography / Mass spectrometry
LS (LA)	Laurinsäure (Lauric acid)
LSME (LAME)	Laurinsäuremethylester (Lauric acid methyl ester)
MIC	Minimale inhibierende Konzentration
MS/MS	Tandem Massenspektrometrie
MSTFA	N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
MTBE	Methyltertbutylether
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
OD	Optische Dichte
OS	Oxofettsäure
OSME	Oxofettsäuremethylester
PBT	Polybutylenterephthalat
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PEF	Polyethylenfuranoat
PET	Polyethylenerephthalat
PLA	Poly lactic acid (Polymilchsäure)
PTFE	Polytetrafluoroethylen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumlaurylsulfat)

## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1: Übersicht über einige bifunktionale Moleküle basierend auf nachwachsenden Rohstoffen**  
Mittels chemischer Katalyse oder Biokatalyse können aus Pflanzenölen und zuckerhaltigen Substraten bifunktionale Basischemikalien gewonnen werden, die anschließend z. B. als Ausgangsstoff verschiedener Polymere dienen .....9
- Abb. 1.2: Prozessfenster einer Ganzzellbiotransformation** Schematische Darstellung verschiedener Faktoren, welche die Prozessgrenzen eines Biotransformationsprozesses bilden. Ziel ist es, den optimalen Bereich des Fensters zu finden um den Prozess möglichst effizient zu gestalten, Abbildung nach [28] ..... 11
- Abb. 1.3: Oxidationsschritte der Dicarbonsäurebildung mittels *Candida tropicalis*** Zunächst erfolgt die  $\omega$ -Oxidation des Substrates, katalysiert durch einen Hydroxylasekomplex. Anschließend erfolgt die zweite Oxidation durch eine Fettsäureoxidase oder alternativ durch eine Alkoholdehydrogenase zum Aldehyd und zuletzt die Oxidation zur korrespondierenden Säure mittels einer Aldehyddehydrogenase [38]..... 15
- Abb. 1.4: Schematische Übersicht über die  $\omega$ -Oxidation von Fettsäuren oder ähnlichen Substraten** ..... 16
- Abb. 1.5: Links: Schematische Darstellung der prosthetischen Gruppe einer Cytochrom P450 Monooxygenase** Sie besteht aus einem Eisen-Protohorphyrin IX-Komplex, welcher während der Oxidation den Sauerstoff bindet [48]. **Rechts: Absorptionsspektrum einer CYP Monooxygenase unter an dauernder Denaturierung mittels Schlangengift.** Durch das Schlangengift wird das Enzym zusehends denaturiert, wodurch der charakteristische Peak bei 450 nm verschwindet und der Peak bei 420 nm zunimmt [49]. ..... 17
- Abb. 1.6: Schematische Übersicht über verschiedene Klassen von P450 Monooxygenasen** A) zeigt das dreikomponenten-System der Klasse I Monooxygenasen, bestehend aus der Reduktase, Ferredoxin und der Monooxygenase; B) zeigt das zweikomponenten-System der Klasse II Monooxygenasen, bestehend aus der Reduktase und der Monooxygenase, C) zeigt das einkomponenten-System der Klasse III Monooxygenasen, bestehend aus einem Fusionsprotein aus einem reductase-ähnlichen Protein und der Monooxygenase modifiziert nach [51]. ..... 18
- Abb. 1.7: Schematische Übersicht des postulierten Oxidationsmechanismus katalysiert durch Häm-abhängige Cytochrom P450 Monooxygenasen** [52]..... 19
- Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Bioreaktorperipherie (Deckelansicht)** Dargestellt ist eine schematische Übersicht eines der verwendeten DASGIP-Bioreaktoren. Die Komponenten innerhalb des Reaktors wurden, soweit möglich, immer entsprechend dieser Abbildung angeordnet. Die vorhandenen Komponenten sind: pH und DO-Sonde; vier Feedstrecken A, B, C, D; Begasungseinheit; Ablufteinheit mit Rückflusskühler, Septum, Temperatursonde, Erdung und Energieversorgung .....56
- Abb. 5.1: Verlauf der Biomasseentwicklung während der Wachstumsphase** Es wurden verschiedene Parameter (Kohlenstoffquelle, Temperatur, Gelöstsauerstoffanteil in der Fermentationsbrühe und Menge des Inokulums) während der Wachstumsphase variiert. Als Standardvariante diente die Wachstumsphase mit folgenden Parametern: pH 5,8, 30°C, OPT-1 Medium mit Glucose als C-Quelle, DO 25% und 10% (v/v) Inokulum. Durch den unregelmäßigen Verlauf können kaum signifikante Aussagen über den Einfluss der variierten Prozessparameter getroffen werden. .... 75
- Abb. 5.2: Einblick in einen Fermenter während der Wachstumsphase** Deutlich sind die leicht gelblichen Ablagerungen an der Fermenterwand erkennbar, welche sich durch Schütteln des gesamten Fermenters allerdings wieder homogen in der Fermentationsbrühe verteilen lassen. .... 76
- Abb. 5.3: Rührwerk eines DASGIP-Fermenters mit mechanischen Schaumbrechern aus Kabelbindern nach [84].** Diese einfache Maßnahme trug zu reproduzierbaren Wachstumsphasen des Biotransformationsprozesses bei. .... 77
- Abb. 5.4: Vergleich des Biomasseverlaufs während der Wachstumsphase mit und ohne Schaumvermeidungsstrategie.** Auf der linken Seite ist der sehr unregelmäßige Verlauf der

	Biomasse ohne Schaumvermeidungsstrategie zu sehen, rechts dagegen der gleichmäßige Verlauf mit angepasster Begasungsstrategie und Verwendung von mechanischen Schaumbrechern. ....	78
<b>Abb. 5.5:</b>	<b>Sterilkontrollen von Biotransformationen mit unterschiedlichem LSME-Zusatz</b> Links sind Sterilkontrollen unmittelbar vor Beginn der Biotransformationsphase zu sehen, rechts 48 h nach Beginn. Variante 1 und 3 erhielten insgesamt doppelt so viel LSME wie 4 (Varianten 1+3 insgesamt 80 g; Variante 4 insgesamt 40 g), Variante 2 erhielt kein LSME. Der negative Einfluss des Substrates ist anhand der deutlich geringeren KBE Anzahl deutlich erkennbar. ....	79
<b>Abb. 5.6:</b>	<b>Fermenter nach Ende der Biotransformation</b> Überall im Innern des Fermenters zeigen sich schmierige, butterartige Ablagerungen. Durch die nicht vorhandene Homogenität innerhalb der Fermenter sind sichere Aussagen über den Biotransformationsverlaufes unmöglich. ....	79
<b>Abb. 5.7:</b>	<b>Löslichkeitsversuche der Fermentationsproben in verschiedenen Lösungsmitteln</b> Untersucht wurde die Löslichkeit des Niederschlags in DMSO, Acetonitril, Aceton und Ethylacetat. Die Proben wurden sechsfach mit dem entsprechenden Lösungsmittel verdünnt. Wie zu erkennen ist, löst sich die Probe vollständig in DMSO und unzureichend in den anderen Lösungsmitteln. ....	80
<b>Abb. 5.8:</b>	<b>Löslichkeitsversuche der Fermentationsproben in verschiedenen Lösungsmitteln, ge-mischt mit OPT-1 Medium im Verhältnis 1:1</b> Bei keinem der Gemische kann eine vollständige Lösung der Proben beobachtet werden, allerdings ergibt die Mischung in Ethylacetat eine relativ gleichmäßige Emulsion. ....	80
<b>Abb. 5.9:</b>	<b>Chromatogramm der gewählten GC-FID Methode zur Analyse der mit MSTFA derivatisierten Biotransformationsproben</b> Die jeweiligen Peaks des Methylsters (LSME), der freien Säure (LS) und der Disäure (DDS) sind gut erkennbar und quantifizierbar. ....	83
<b>Abb. 5.10:</b>	<b>Bilanzierung einer Biotransformation unter Anwendung der etablierten analytischen Methode</b> Der Vergleich der zugeführten „Sollmenge“ und der mit MTBE extrahierten und mit der GC-FID Methode gemessenen „Istmenge“ zeigt, dass alle Komponenten wiedergefunden werden können und die Bilanz damit geschlossen werden kann. Die DDS Konzentration betrug zu diesem Zeitpunkt etwa 30 g/L. Der angegebene Fehler (Standardabweichung) bezieht sich auf die Summe der gemessenen Menge der Komponenten LS, LSME und DDS zweier Biotransformationsansätze. ....	84
<b>Abb. 5.11:</b>	<b>Schematischer Verlauf des pH-Shiftes</b> Nach einer Wachstumsphase von 17 h wird der pH Wert schrittweise (0,13 pH Einheiten pro 2 h) bis 7,7 durch die Zudosierung von NaOH erhöht. Nach einer Biotransformationsdauer von 90 h wird ein maximaler pH Wert von 8 erreicht.....	85
<b>Abb. 5.12:</b>	<b>Vergleich der DDS-Bildung während der Biotransformation bei unterschiedlichen Temperaturleveln</b> Zu Beginn zeigte sich der Verlauf der Produktbildung bei den unterschiedlichen Temperaturen sehr ähnlich, ab 60 h im Prozessverlauf konnte bei 30 °C allerdings deutlich mehr Produkt nachgewiesen werden als bei 35 °C.....	86
<b>Abb. 5.13:</b>	<b>Beispiel des CO<sub>2</sub>-Gehaltes in der Abluft im Verlauf einer Biotransformation</b> Zu Beginn ist ein deutlicher CO <sub>2</sub> -Peak erkennbar, zu dem Zeitpunkt an dem die im Medium enthaltene Glucose von den Zellen verbraucht wurde. Mit Einsetzen des Glucosefeeds stabilisierte sich die im Abgasstrom vorhandene Menge CO <sub>2</sub> . Um den Einfluss einer Glucoselimitierung vor Beginn der Biotransformationsphase zu untersuchen, wurde dessen Startzeitpunkt variiert. ....	87
<b>Abb. 5.14:</b>	<b>Schematischer Verlauf des pH-Shifts und der LSME Feedstrategie</b> .....	88
<b>Abb. 5.15:</b>	<b>Ermittlung der maximalen Feedrate bei 30°C Biotransformation</b> A) Umsetzung des Substrates bezogen auf den zeitlichen Verlauf; B) Umsatz bezogen auf die zu diesem Zeitpunkt anliegende Feedrate. Das Fenster markiert den Bereich bei dem erstmalig eine Anreicherung von LSME und LS beobachtet wurde, was einen Rückgang des Substratumsatzes bedeutet. Die maximale Feedrate liegt daher im Bereich zwischen 0,9 und 1,4 g/Lh. ....	89
<b>Abb. 5.16:</b>	<b>Vergleich der geplanten und tatsächlich durchgeführten Substrat-Feed-Strategie</b> Die gestrichelten Kurven zeigen die geplante Feedstrategie, die massiven Linien die tatsächlich durchgeführte. ....	90
<b>Abb. 5.17:</b>	<b>Betrachtung des Umsatzes der Substrate LSME und LS</b> Substratumsatz der Varianten mit 0,9 und 1,2 g/Lh Substratfeed. Die gestrichelten Kurven zeigen den Verlauf des Substratfeeds inklusive der Zeiten ohne Zufütterung, bis keine Akkumulation mehr beobachtet wurde. Nach der ersten	

- Substratakkumulation und deren Wieder-Auflösung wurden beide Prozessvarianten bei 0,9 g/Lh gefahren. Sich überlappende Bereiche bedeuten einen gleichen Verlauf. Die Variante mit 0,9 g/Lh wurde in vierfacher Bestimmung durchgeführt, die Variante mit dem 1,2 g/Lh LSME-Feed wurde bis 96 h in dreifacher, ab dann in doppelter Bestimmung durchgeführt. ....91
- Abb. 5.18: Identifizierung der benötigten BTM-Mindestmenge zum vollständigen Substratumsatz** Der Zeitpunkt der ersten Substratakkumulation zeigt, dass pro Gramm zugeführtem LSME je 0,575 g BTM für einen vollständigen Umsatz benötigt werden. ....93
- Abb. 5.19: Vergleich einer Beispiel-Bilanzierung mit der theoretischen Menge gebildeter Disäure** Beispiel für die Bilanzierung einer der Fermenter zur Verifizierung der optimalen Feedrate Die Abweichungen werden während des späteren Verlaufs der Biotransformationen größer. Die theoretische Stoffmenge der Disäure wurde von der zudosierten Menge Natronlauge abgeleitet und mit der tatsächlich gemessenen Menge DDS und der tatsächlich zugegebenen Menge LSME verglichen. ....94
- Abb. 5.20: CO-Spektrum einer CYP-Expression in JM109 mit dem Expressionsvektor pCWori+ und zusätzlicher Positivkontrolle CYP102** Untersucht wurde der Zellaufschlussüberstand nach Lysozym und Ultraschallbehandlung. Die Expression dauerte 48 h, die Temperatur lag konstant bei 30 °C und die IPTG Konzentration lag bei 1 mM. Die Positivkontrolle bestand aus einer verdünnten CYP102 Präparation und wurde parallel zu den Proben auf die gleiche Art behandelt. Sie zeigt den für native CYPs charakteristischen Peak bei 450 nm. Diesen Peak zeigt keine der untersuchten Proben. Einzig bei der CYP78A1 zeigt sich ein deutlicher Peak bei 420 nm, bei der CYP52A5 ist dieser nur angedeutet. Somit konnte keine erfolgreiche Expression auf diesem Wege detektiert werden. ....104
- Abb. 5.21: Western Blot der CYP Varianten i2, i6, i7 und i25** Der rote Rahmen kennzeichnet den Größenbereich in welchem sich die gesuchten Enzyme befinden. Variante i6 zeigt eine klare Überexpression (Spur 6 + 7). Durch den Nachweis des His-Tags der Varianten ist dieser Nachweis im Vergleich zu reinen SDS-Gelen sehr sensitiv. ÜS ist der aufgetragene Zellaufschlussüberstand, P das resuspendierte Pellet des Zellaufschlusses. ....108
- Abb. 5.22: Ausschnitt eines Chromatogramms des erweiterten Substratspektrums** Durch Anpassung der bisher verwendeten HPLC/MS Methode konnten alle verfügbaren Referenzsubstanzen bis zu einer Kettenlänge von C<sub>16</sub> detektiert werden. FS steht jeweils für die ungesättigte Fettsäure der jeweiligen Kettenlänge, HS für die korrespondierende Hydroxysäure, OS für die korrespondierende Oxosäure und DS für die korrespondierende Dicarbonsäure. Die Sensitivität der Methode für FS10 und FS16 ist geringer, weshalb als Standards hierfür Konzentrationen von 25 µM eingesetzt wurden, HS16 führt zu einer sehr hohen Signalintensität und wurde daher in einer Konzentration von 5 µM eingesetzt, alle anderen Komponenten lagen in einer Konzentration von 5 µM vor. ....111
- Abb. 5.23: Vergleich der Fragmentierungsmuster der Referenzsubstanz HS12 und der potentiellen Komponente HS11** Dargestellt ist jeweils das Massenspektrum des Mutterions und das Fragmentierungsmuster des ersten Hauptfragmentes. Die beiden oberen Spektren gehören zur Referenzsubstanz HS12, die beiden unteren zur potentiellen Komponente HS11. Vergleicht man die Muster der jeweils blau und rot markierten Fragmente, erkennt man deutlich das sich wiederholende Muster. ....113
- Abb. 5.24: Vergleich zweier Spektren resultierend aus Assayansätzen der CYPs i9 und i27 mit dem Spektrum der Leervektorkontrolle** Das verwendete Substrat war FS13. Nur bei der Leervektorkontrolle fehlt das charakteristische Fragmentierungsmuster, wodurch die Produktbildung bestätigt werden kann. ....114
- Abb. 5.25: Zusammenfassung verschiedener Einzeluntersuchungen der CYPi27 in einem Chromatogramm** Getestet wurden jeweils die einzelnen Fettsäuren der Kettenlänge C<sub>10-16</sub>. Dargestellt sind das Mutterion und das erste Hauptfragment des Mutterions, welches ein signifikant stärkeres Signal zeigt. Die Abbildung zeigt deutlich die Bildung der Produkte HS11-HS16 katalysiert durch die CYPi27. Einzig HS10 kann in diesem Ansatz nicht nachgewiesen werden. ...115
- Abb. 5.26: Chromatogramm des Fettsäure-Mix Experiments mit der CYPi3** Bei diesem Experiment wurde die CYPi3 aus Glycine Max mit einem Mix aus FS der Kettenlänge C<sub>10-16</sub> inkubiert. Außer FS10 und

FS11 konnten alle korrespondierenden Alkohole nachgewiesen werden. Sonstige Produkte konnten nicht detektiert werden. ....	116
<b>Abb. 5.27: .Quantitative Bestimmung der HS12 Bildung durch verschiedene CYP Varianten</b> Dargestellt ist die Konzentration des Produktes und des Substrates. Alle Proben sind Triplikate basierend auf je einer Expressionskultur pro Variante. Alle getesteten Varianten zeigten Aktivität für die gewählten Substrate. ....	117
<b>Abb. 5.28: .Quantitative Bestimmung der DS12 Bildung aus HS12 durch verschiedene CYP Varianten</b> Dargestellt ist die Konzentration des Produktes und des Substrates. Alle Proben sind Triplikate basierend auf je einer Expressionskultur pro Variante. Bei keiner Variante konnte Überoxidation detektiert werden, die über der Kontrolle lag. ....	118

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1.2-1: Übersicht einiger untersuchter Prozessparameter der Biotransformation mit <i>C. tropicalis</i> .....	13
Tab. 3.6-1: Übersicht über verwendete Bakterien- und Hefestämme .....	27
Tab. 3.7-1: Übersicht über verwendete Plasmide .....	28
Tab. 4.1-1: Übersicht über Expressionsbedingungen im <i>E. coli</i> System .....	44
Tab. 4.1-2: Übersicht über Expressionsbedingungen in den <i>S. cerevisiae</i> Systemen .....	45
Tab. 4.2-1: Übersicht PCR Ablauf für Klonierungsansätze.....	46
Tab. 4.2-2: Übersicht PCR Ablauf für Kolonie-PCR .....	46
Tab. 4.3-1: Übersicht über SDS-Gel Komponenten für 14 Gele .....	49
Tab. 4.4-1: Übersicht über Fermentationsparameter zur Herstellung der Vorkultur im 2 Liter Bioreaktor .....	53
Tab. 4.4-2: Übersicht über verwendete Medien und Lösungen während 2 L-Vorkultur.....	54
Tab. 4.4-3: Übersicht über die Steuerungsmodule des Parallelfermentersystems .....	55
Tab. 4.4-4: Ausgangssituation der Prozessparameter für alle folgenden Untersuchungen (Standardvariante) .....	58
Tab. 4.5-1: Übersicht über finale Konzentrationen im Aktivitätsassay .....	62
Tab. 4.5-2: Übersicht über die wichtigsten HPLC-Parameter C <sub>12</sub> -Methode.....	64
Tab. 4.5-3: Übersicht über die MS/MS-Parameter für die einzelnen Komponenten der C <sub>12</sub> -Methode .....	64
Tab. 4.5-4: Übersicht über die allgemeinen MS/MS-Parameter der C <sub>12</sub> -Methode .....	65
Tab. 4.5-5: Übersicht über die wichtigsten HPLC-Parameter FS <sub>10-16</sub> Methode .....	66
Tab. 4.5-6: Übersicht über die allgemeinen MS/MS Parameter der C <sub>10-16</sub> -Methode.....	66
Tab. 4.5-7: Übersicht über die MS/MS Daten spezifisch für die einzelnen Komponenten .....	67
Tab. 4.5-8: Übersicht über die wichtigsten HPLC-Parameter der ELSD Methode.....	68
Tab. 4.5-9: Übersicht über die wichtigsten GC/FID-Parameter der C <sub>12</sub> -GC-Methode .....	69
Tab. 4.5-10: Übersicht über die wichtigsten GC/FID-Parameter der C <sub>12</sub> -GC-Methode .....	70
Tab. 5.1-1: Vergleich der gewählten Prozessparameter während der Untersuchung der Wachstumsphase mit der Standardvariante .....	75
Tab. 5.1-2: Vergleich der maximalen Wachstumsraten mit und ohne Schaumvermeidungsstrategie ....	78
Tab. 5.1-3: Beispiele von Analysemethoden zur Charakterisierung der Disäureproduktion durch Hefen.....	82
Tab. 5.1-4: Vergleich ausgewählter Prozessgrößen der Biotransformation bei 30° C und 35 °C Alle Parameter beziehen sich auf eine Gesamtdauer von 91 h und wurden jeweils durch Triplikate bestimmt.....	86
Tab. 5.1-5: Vergleich ausgewählter Prozessgrößen der Biotransformation bei einem LSME Feed von 0,9 g/Lh und 1,2 g/Lh Die Variante mit 0,9 g/Lh wurde in vierfacher Bestimmung durchgeführt, die Variante mit dem 1,2 g/Lh LSME-Feed wurde bis 96 h in dreifacher, ab dann in doppelter Bestimmung durchgeführt. ....	92
Tab. 5.2-1: Auswahl verschiedener Cytochrom P450 Enzyme der CYP52 Familie aus verschiedenen <i>Candida</i> Spezies .....	96
Tab. 5.2-2: Auswahl verschiedener pflanzlicher Cytochrom P450 ω-Hydroxylasen.....	99
Tab. 5.2-3: Finale Auswahl der ersten CYPs und der CPR zur Expression in <i>E. coli</i> .....	101
Tab. 5.2-4: Übersicht über Expressionsbedingungen im <i>E. coli</i> System .....	103
Tab. 5.2-5: Übersicht über die gewählten Referenzenzyme zur Erweiterung des CYP-Spektrums .....	106
Tab. 5.2-6: Übersicht über die neuen CYP Varianten.....	107
Tab. 5.2-7: Übersicht über die in verschiedene Stämme klonierten neuen CYP Varianten (alle im Expressionsvektor pYeDP60) .....	108
Tab. 5.2-8: Vergleich der C <sub>12</sub> und der erweiterten C <sub>10</sub> -C <sub>16</sub> HPLC/MS Methode.....	110
Tab. 5.2-9: Ergebnis des Aktivitätsassays der Varianten CYPi27, i3, i7 und i9 mit erweitertem Substratspektrum .....	112
Tab. 5.2-10: Übersicht über aktive Varianten und deren Substratspektrum .....	117

<b>Tab. 6.1-1: Übersicht einiger untersuchter Prozesskennzahlen der Biotransformation mit <i>C. tropicalis</i>..</b>	<b>125</b>
<b>Tab. 6.2-1: Vergleich der Substratpräferenzen der Referenz CYPs und der neuen Varianten .....</b>	<b>132</b>

## Lebenslauf



### Persönliche Daten

Nina Sandra Rimmel, geboren am 17.02.1987 in Wesel

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

### Ausbildung und beruflicher Werdegang:

Ab 03/2015	Program Manager Biochemicals bei UPM GmbH in Augsburg
11/2011-02/2015	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Chemie Biogener Rohstoffe and der TU München, Wissenschaftszentrum Straubing  Schwerpunkt: Fermentation und Enzymatik  Anfertigung einer Doktorarbeit zum Thema: „Selektive $\omega$ -Oxidation aliphatischer Substrate – Charakterisierung von Monooxygenasen und Etablierung einer Biotransformationsplattform“
10/2011	Abschluss Master of Science
04/2011-10/2011	Masterarbeit am Fraunhofer Institut für Umwelt-, Sicherheits- und Energietechnologie in Oberhausen zum Thema „Untersuchung und Optimierung der Methanogenese aus Wasserstoff und Kohlendioxid (Biomethanisierung)“
10/2009-04/2011	Masterstudium Nachwachsende Rohstoffe an der TU München
11/2009	Abschluss Bachelor of Science
04/2009-07/2009	Bachelorarbeit am Lehrstuhl für Bioverfahrenstechnik an der TU München zum Thema „Nachweis der transienten Zellperforation durch hydrodynamische Kavitation an <i>Escherichia Coli</i> “
10/2006-09/2009	Bachelorstudium Molekulare Biotechnologie an der TU München
07/2006	Allgemeine Hochschulreife
08/1997-07/2006	Städtisches Stiftsgymnasium Xanten