

Enzymatische Hydratisierung kurzkettiger Fettsäuren und Alkene

Enzymatic hydration of short-chain fatty acids and alkenes

**Von der Fakultät 4 (Energie-, Verfahrens- und Biotechnik)
der Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines Doktors
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung**

Vorgelegt von
Rebecca M. Demming
aus Bocholt

Hauptberichter: Prof. Dr. Bernhard Hauer
Mitberichter: Prof. Dr. Ralf Takors
Vorsitzender: Prof. Dr. Albert Jeltsch

Tag der mündlichen Prüfung: 19.07.2018

**Institut für Biochemie und Technische Biochemie
der Universität Stuttgart**

2018

Erklärung über die Eigenständigkeit der Dissertation

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Enzymatische Hydratisierung kurzkettiger Fettsäuren und Alkene“ selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Aus fremden Quellen entnommene Passagen und Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Darüber hinaus versichere ich, dass die hier vorgelegte Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bei einer anderen Institution zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Declaration of Authorship

I hereby certify that the dissertation entitled „Enzymatic hydration of short-chain fatty acids and alkenes“ is entirely my own work except where otherwise indicated. Passages and ideas from other sources have been clearly indicated.

Stuttgart, 22.03.2018

Rebecca M. Demming

Die vorliegende Arbeit entstand unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Bernhard Hauer in der Zeit von April 2015 bis März 2018 am Institut für Biochemie und Technische Biochemie an der Universität Stuttgart.

Die Arbeit wurde durch die Europäische Union im Rahmen des „Horizon 2020 research and innovation programme“ mit grant agreement Nummer 635536 finanziert.

Teile der Doktorarbeit wurden bereits vorab publiziert:

Demming, R.M., Fischer, M.-P., Schmid, J. & Hauer, B. “(De)hydratases - recent developments and future perspectives.” *Current Opinion in Chemical Biology* **2018**, *43*, 43–50.

Demming, R.M., Otte, K.B., Nestl, B.M. & Hauer, B. “Optimized Reaction Conditions Enable the Hydration of Non-natural Substrates by the Oleate Hydratase from *Elizabethkingia meningoseptica*.” *ChemCatChem* **2017**, *9*, 758–766.

Eine weitere Publikation befindet sich in Vorbereitung und ist in Teilen Bestandteil dieser Dissertation:

Demming, R.M., Nestl, B.M., Hammer, S.C., Fademrecht, S., Pleiss, J. & Hauer, B. “Asymmetric Enzymatic Hydration of Unactivated, Aliphatic Alkenes.” Manuskript in Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation wurden folgende Poster präsentiert:

Demming, R.M., Otte, K.B. & Hauer B. “Oleate hydratase-catalyzed hydration of short-chain fatty acids and alkenes.” 5th International conference on Novel Enzymes (Groningen, 2016)

Demming, R.M., Nestl, B.M. & Hauer, B. “Using a dummy substrate enables the hydration of alkenes by oleate hydratase from *Elizabethkingia meningoseptica*.” BioTrans 2017 (Budapest)

Demming, R.M., Nestl, B.M. & Hauer, B. “(Semi-)Rational design of an oleate hydratase for the hydration of short-chain alkenes.” Biotransformations 2017 (Dechema Summer School, Hannover)

DANKSAGUNG

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei allen Personen bedanken, die mich während der Zeit meiner Promotion unterstützt und begleitet haben.

Mein großer Dank gilt zuallererst Herrn Prof. Dr. Hauer, der mir das Vertrauen entgegen gebracht hat, mich als Doktorandin in seine Arbeitsgruppe aufzunehmen, und mir ein tolles Forschungsprojekt ans Herz gelegt hat. Ich möchte mich für die immerwährende Unterstützung und fortlaufende Motivation während meiner dreijährigen Tätigkeit hier am Institut ganz herzlich bedanken. Ich habe in dieser Zeit unglaublich viel gelernt und werde davon viel für die Zukunft mitnehmen können.

Bedanken möchte ich mich darüber hinaus bei Herrn Prof. Dr. Takors und Herrn Prof. Dr. Jeltsch für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens bzw. des Prüfungsvorsitzes.

Ganz speziell danken möchte ich Dr. Bettina Nestl für die zahlreichen Diskussionen, ausführlichen Korrekturen und hilfreichen Ratschläge. Obwohl Bettinas Schreibtisch zumeist voll liegt mit Arbeit, hat sie immer ein offenes Ohr für jeden und findet immer eine freie Minute. Vielen Dank Bettina für die tolle Unterstützung während meiner drei Jahre am ITB.

Auch bei Dr. Bernd Nebel möchte ich mich in diesem Rahmen ganz herzlich bedanken für seine Hilfe bei jeglichen Problemen technischer Art. Dies gilt im Besonderen für die entscheidende Unterstützung bei der Erstellung erstklassiger chiraler GC-Chromatogramme (z. B. im Rahmen einer tollen Publikation ;-)).

In diesem Sinne möchte ich insbesondere auch Dr. Stephan Hammer danken, der mich tatkräftig in meinem Labor-Endspurt begleitete und mir mit zahlreichen Tipps, Tricks und einer großen Schuppe an Motivation zur Seite stand. Dr. Konrad Otte danke ich für die Einführung in mein Promotionsthema und die tolle Betreuung während der ersten Monate hier am ITB.

Bedanken möchte ich mich natürlich auch bei allen aktuellen, ehemaligen oder auch wiedergekehrten Mitgliedern der ITB-Crew. Da es sich insgesamt um sehr viele Personen handelt und ich niemanden vergessen möchte, nenne ich hier keine Namen. Ich bin immer

sehr gerne zur Arbeit gegangen und jeder einzelne hat dazu beigetragen, dass ich mich als „Norddeutsche“ im Schwabenländle doch sehr wohl gefühlt habe. Ein besonderer Dank geht in diesem Sinne an die Wasentruppe, die mich mit dem tollen Brauch des „Bierbank-Tanzens“ vertraut gemacht hat und mir dadurch dazu verhalf einen ganz tollen Menschen kennen und lieben zu lernen. Dem Hydratase-Team, Max und Jens, möchte ich insbesondere für die vielen produktiven Diskussionsrunden und den regen Austausch danken. Ein großer Dank geht auch an die Chemiker des ITBs, die mir bei chemischen Fragestellungen stets unterstützend zur Seite standen. Jens und Nico möchte ich darüber hinaus im Besonderen für die Einführung in die Welt der NMR-Analyse und des Substrat-Dockings danken. Für die Unterstützung während meines Fermentationsprozesses danke ich des Weiteren Sven Richter. Dank gilt natürlich auch meinen Studenten Andreas Hunold, Samuel Kleehammer, Daniela Romeo und Michaela Weller, die mich in Teilprojekten tatkräftig und erfolgreich unterstützten.

Die Forschung der vorliegenden Dissertation war Teil des EU-Projektes EmPowerPutida und ich möchte mich in diesem Rahmen ganz herzlich für die finanzielle Unterstützung zahlreicher Projektmeetings, Tagungen und Konferenzen durch die Europäische Union bedanken.

Ein ganz spezieller Dank gilt meiner Familie, die mich nicht nur finanziell sondern auch mental in all meinen Entscheidungen immer unterstützt hat. Mit ihrer Hilfe konnte ich all meine Ziele, Träume und Wünsche verfolgen und so meinen eigenen Weg finden. Ich bin sehr stolz auf meine Eltern und auf meine Schwester mit ihrer kleinen Familie und die Besuche Zuhause geben mir immer unglaublich viel Kraft. Ihr seid mir unbeschreiblich wichtig und ich habe euch sehr lieb. In diesem Sinne möchte ich auch meinem Freund danken, der mir während der letzten drei Jahre immer unterstützend zur Seite stand. Danke Michi für die tolle gemeinsame Zeit, deine unglaubliche Geduld und Ruhe und das immer offene Ohr, das du mir schenkst.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	11
ZUSAMMENFASSUNG.....	14
ABSTRACT	17
1 EINLEITUNG.....	20
1.1 Die selektive Addition/Abspaltung von Wasser mithilfe von Hydro-Lyasen.....	22
1.2 Enzymatische Hydratisierung nicht-aktivierter C=C Bindungen.....	23
1.3 Fettsäure-Hydratasen	25
1.3.1 Substratspektrum der Fettsäure-Hydratasen.....	26
1.3.2 Funktion und Bedeutung des Flavin-Cofaktors	28
1.3.3 Strukturelle Aspekte der Fettsäure-Hydratasen.....	28
1.3.4 Ölsäure-Hydratase aus <i>E. meningoseptica</i>	29
1.3.5 Industrielle Anwendung der Fettsäure-Hydratasen.....	32
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit.....	33
2 MATERIAL UND METHODEN	35
2.1 Chemikalien.....	35
2.2 Organismen.....	35
2.3 Vektoren	35
2.4 Oligonukleotide	38
2.5 Nährmedien & Puffer	39
2.6 Molekularbiologische Methoden.....	40
2.6.1 Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> Zellen	40
2.6.2 Transformation mittels Elektroporation	41
2.6.3 Isolierung von Plasmid-DNA.....	41
2.6.4 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration.....	41
2.6.5 Sequenzierung	41
2.6.6 QuikChange Mutagenese	41
2.6.7 Agarose-Gelelektrophorese	42

2.7	Zellkultivierung	43
2.7.1	Dauerkulturen/Kryokonservierung.....	43
2.7.2	Heterologe Genexpression	43
2.7.3	Fed-Batch Kultivierung – 5 Liter Maßstab	43
2.7.4	Zellaufschluss mittels Ultraschall	44
2.8	Biochemische Methoden	44
2.8.1	BCA-Assay.....	44
2.8.2	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	44
2.9	Biotransformationen	46
2.9.1	Standard/FAD-reduzierende Bedingungen	46
2.9.2	<i>Design of experiments</i> – (DoE)	47
2.9.3	(Z)-Undec-9-ensäure-Umsetzung – 1 Liter Maßstab	48
2.9.4	1-Decen-Umsetzung unter optimierten Bedingungen.....	49
2.9.5	Molares Verhältnis von Substrat zu Dummy-Substrat.....	49
2.9.6	Präinkubationsversuche.....	49
2.9.7	Biochemische Analyse zur Umsetzung von 1-Decen	50
2.9.8	Alternative Dummy-Substrate.....	50
2.9.9	1-Octen- und 1-Dodecen-Umsetzung.....	51
2.9.10	Substratspektrum der <i>Em</i> -OAH Varianten.....	51
2.9.11	Zweiphasensystem für die Umsetzung flüchtiger Alkene (C7-C5)	52
2.9.12	Optimierte Reaktionsbedingungen für die Umsetzung flüchtiger Alkene (C7-C5) 52	
2.9.13	Hydratisierung subterminaler Alkene mit verschiedenen Dummy-Substraten..	53
2.9.14	Hydratisierung des C4-Alkens Butadien.....	53
2.9.15	Dehydratisierung kurzkettiger, sekundärer Alkohole (C6-C4)	53
2.10	Umsetzung terminal-ungesättigter Alkene im 250 bzw. 500 ml Maßstab.....	54
2.10.1	1-Decen-Hydratisierung im 250 ml Maßstab.....	54
2.10.2	1-Octen-Hydratisierung im 500 ml Maßstab	55

2.11	Chemische Methoden.....	56
2.11.1	Chemische Synthese der C11-Fettsäure (Z)-Undec-9-ensäure	56
2.11.2	Mosher-Ester Analyse	58
2.12	Analytische Methoden	58
2.12.1	GC-FID Analytik – Fettsäure-Biotransformationen	58
2.12.2	GC-MS-Analytik – (Z)-Undec-9-ensäure-Biotransformation.....	59
2.12.3	Achirale GC(-MS)-Analytik – 1-Decen-Biotransformation	60
2.12.4	Achirale GC-Analytik – C8-C5 Alkene	60
2.12.5	Chirale GC(-MS)-Analyse – Alken-Biotransformationen	61
2.12.6	GC-MS-Analytik kurzkettiger Alkene und Alkohole (C6-C4).....	62
2.12.7	Übersicht der Retentionszeiten.....	63
2.13	Bioinformatische Methoden.....	65
2.13.1	Docking-Studien.....	65
2.13.2	Identifizierung der Positionen zur gerichteten Mutagenese	65
3	ERGEBNISSE	66
3.1	Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Umsetzung kurzkettiger Substrate	66
3.1.1	Ganzzellbiotransformationen <i>versus</i> Zelllysate-Assays	66
3.1.2	Optimierung der Reaktionsbedingungen mittels DoE	68
3.1.3	Umsetzung von (Z)-Undec-9-ensäure im 1 l Maßstab	69
3.1.4	Strategien zur Umsetzung kurzkettiger Substrate	72
3.1.5	Hydratisierung von 1-Decen unter optimierten Bedingungen	73
3.2	Funktion und Bedeutung des Dummy-Substrates	76
3.2.1	1-Decen Hydratisierung bei verschiedenen Hexansäure-Konzentrationen.....	77
3.2.2	Präinkubationsversuche.....	77
3.2.3	Biochemische Analyse zur Umsetzung von 1-Decen	78
3.2.4	Analyse alternativer Dummy-Substrate	79
3.3	Analyse des Hydratisierungsmechanismus und der Substratbindung	81
3.3.1	Analyse des postulierten Hydratisierungsmechanismus	82

3.3.2	Mutagenesestudien am Eingang der Substratbindetasche.....	83
3.4	Substratspezifität des <i>Em</i> -OAH Wildtypenzym.....	84
3.5	Rationales Design der <i>Em</i> -OAH zur Umsetzung kurzkettiger Alkene	86
3.6	Hydratisierung kurzkettiger Alkene (C7-C5)	92
3.6.1	Etablierung eines Zweiphasensystems	92
3.6.2	Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Umsetzung flüchtiger Alkene ohne Zweiphasensystem	101
3.6.3	Analyse ausgewählter Mutanten mit kurzkettigen terminalen Alkenen (C7-C5) 105	
3.7	Charakterisierung der <i>Em</i> -OAH Variante A248W	108
3.7.1	Hydratisierung terminaler Alkene mit verschiedenen Dummy-Substraten	108
3.7.2	Hydratisierung subterminaler Alkene mit verschiedenen Dummy-Substraten	109
3.7.3	Hydratisierung des C4-Alkens Butadien.....	111
3.7.4	Dehydratisierung kurzkettiger, sekundärer Alkohole (C6-C4)	112
3.8	Umsetzung terminal-ungesättigter Alkene im 250 bzw. 500 ml Maßstab	112
3.8.1	1-Decen-Hydratisierung im 250 ml Maßstab.....	114
3.8.2	1-Octen-Hydratisierung im 500 ml Maßstab	115
4	DISKUSSION.....	117
4.1	Optimierung der Reaktionsbedingungen	117
4.2	Charakterisierung der 10-Hydroxyundecansäure	119
4.3	Hydratisierung des Alkens 1-Decen mithilfe eines Dummy-Substrates	120
4.4	Funktion und Bedeutung des Fettsäure-Dummy-Substrates	124
4.5	Analyse des Hydratisierungsmechanismus und der Substratbindung	127
4.6	Substratspezifität des <i>Em</i> -OAH Wildtypenzym	129
4.7	Rationales Design der <i>Em</i> -OAH zur Umsetzung kurzkettiger Alkene	130
4.8	Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Umsetzung flüchtiger Alkene mit/ohne Zweiphasensystem	134
4.9	Analyse ausgewählter Mutanten mit kurzkettigen terminalen Alkenen (C7-C5) ...	139

4.10	Charakterisierung der <i>Em</i> -OAH Variante A248W	140
4.11	Umsetzung terminal-ungesättigter Alkene im 250 bzw. 500 ml Maßstab.....	143
4.12	Abschließende Zusammenfassung.....	144
5	RESÜMEE & AUSBLICK	146
6	ANHANG	149
7	LITERATURVERZEICHNIS	176

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Äquiv.	Äquivalente
A	Amper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BEHP	Bis(2-ethylhexyl)phthalat
BSA	engl.: bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CDCl ₃	deutერიertes Chloroform
CH	Cyclohexan
CIP-Konvention	Cahn–Ingold–Prelog-Konvention
CPME	Cyclopentylmethylether
CrtC	Carotinoid-1,2-Hydratase
C _{xy} -FS	Fettsäure mit der Kettenlänge XY
d	engl.: day (Tag)
DAME	Dodecansäuremethylester
DC	Dünnschichtchromatographie
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DNA	engl.: deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleotid
DoE	engl.: design of experiments (statistische Versuchsplanung)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DS	Dummy-Substrat
DTT	Dithiothreitol
EA	Essigsäureethylester
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>ee</i>	engl.: enantiomeric excess (Enantiomerenüberschuss)
<i>E. meningoseptica</i>	<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>
<i>Em</i> -OAH	Ölsäure-Hydratase aus <i>Elizabethkingia meningoseptica</i>
etc.	<i>et cetera</i>
F	Farad
FAD	Flavinadenindinukleotid
FID	Flammenionisationsdetektor
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie–Massenspektrometrie
Gew.-%	Gewichtsprozent
GZBT	Ganzzellbiotransformation
h	engl.: hour (Stunde)
HD	Hexadecan
HFam	Hydratase-Familie

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

HyED	engl.: <i>Hydratase Engineering Database</i> (Hydratase-Datenbank)
HMN	2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan
Hz	Hertz
Injektionsvol.	Injektionsvolumen
Injektortemp.	Injektortemperatur
insg.	insgesamt
Interakt.	Interaktion
IPM	Isopropylmyristat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IS	interner Standard
IBTB	Institut für Biochemie und Technische Biochemie
K	Kelvin
Kan	Kanamycin
Kat.	Katalysator
kDa	Kilodalton
K _m -Wert	Substrataffinität
konst.	konstant
Konz.	konzentrierte
l	Liter
LAH	Linolsäure-Hydratase
LB	Lysogeny broth
LinD	Linalool-Dehydratase-Isomerase
LM	Lösemittel
M	Mol pro Liter
m	Milli, Meter
MCRA	engl.: myosin-cross-reactive antigen
MD	engl.: molecular dynamics
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
min	Minute
MSD	engl.: mass selective detector (massenselektiver Detektor)
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
m/z	engl.: mass-to-charge ratio (Masse-Ladungsverhältnis)
n	Nano
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NMR	engl.: nuclear magnetic resonance spectroscopy (Kernspinresonanzspektroskopie)
OAH	Ölsäure-Hydratase
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
Opt.	Optimierung
Pa	Pascal
PCR	engl.: polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pmol	Pikomol
Pos.	Position

ppm	engl.: parts per million
rac	racemisch
rcf	engl.: relative centrifugal force (relative Zentrifugalkraft)
rel.	relativ
R_f	Retentionsfaktor
S-(+)-MTPA-Cl	(S)-(+)- α -Methoxy- α -trifluormethylphenylacetylchlorid
SDS	engl.: sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	engl.: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)
sec	Sekunde
Seq.-Primer 1-4	Sequenzierungsprimer 1-4
SDP	engl.: specificity-determined position (Spezifität-bestimmende Position)
TB	Terrific Broth
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Temp.	Temperatur
TMSH	Trimethylsulfoniumhydroxid Lösung
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	engl.: units ($\mu\text{mol}/\text{min}$)
üN	über Nacht
Upm	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	engl.: volume per volume (Volumen pro Volumen)
V_{max}	Reaktionsgeschwindigkeit
w/v	engl.: weight per volume (Gewicht pro Volumen)
μ	Mikro
Ω	Ohm

ZUSAMMENFASSUNG

Die natürliche Reaktion der Ölsäure-Hydratase aus *Elizabethkingia meningoseptica* (*Em*-OAH) ist die stereoselektive Hydratisierung von Ölsäure (C18) zu *R*-10-Hydroxystearinsäure. Darüber hinaus katalysiert das Enzym die Umsetzung von Palmitinsäure (C16), Myristoleinsäure (C14) und der chemisch synthetisierten C11-Fettsäure (*Z*)-Undec-9-ensäure zum entsprechenden 10-Hydroxyprodukt. Die Charakterisierung des Substratspektrums der *Em*-OAH zeigte jedoch, dass die Hydrataseaktivität mit der Verkürzung der Fettsäure-Kettenlänge stark abnimmt. Darüber hinaus wurde keine Hydratisierung der C10-Fettsäure Dec-9-ensäure beobachtet, welche eine terminale C=C Bindung besitzt. Ziel der hier vorliegenden Doktorarbeit war eine Erweiterung des Substratspektrums und die Steigerung der enzymatischen Aktivität der *Em*-OAH im Hinblick auf die Hydratisierung kurzkettiger nicht-natürlicher Substrate.

Die *Em*-OAH katalysierte Hydratisierung der nicht-natürlichen C11-Fettsäure wurde durch eine Optimierung der Reaktionsbedingungen mithilfe einer statistischen Versuchsplanung deutlich gesteigert. Die optimierten Bedingungen resultierten in einer 2,8-fachen Zunahme der Produktbildung in nur einem Viertel der Inkubationszeit (0,32 mM 10-Hydroxyundecansäure; 64 % Umsatz in 28 Stunden). Das optimierte System wurde daraufhin für ein *Upscaling* der (*Z*)-Undec-9-ensäure Hydratisierung im präparativen Maßstab eingesetzt (1 L, 1 mM Substrat) und das Biotransformationsprodukt wurde mithilfe einer Mosher-Ester Analyse als (*S*)-10-Hydroxyundecansäure identifiziert (132 mg Produkt, 66 % isolierte Ausbeute, >95 % Reinheit). Eine nachfolgende Analyse des Reaktionsgleichgewichtes zeigte, dass unter den gewählten Bedingungen keine Dehydratisierung der 10-Hydroxyundecansäure erhalten wurde.

Da die enzymatische Hydratisierung des kurzkettigen Substrates Dec-9-ensäure mithilfe der *Em*-OAH auch unter optimierten Bedingungen nicht erfolgreich war, wurde eine zweite Strategie für die Umsetzung nicht-natürlicher kurzkettiger Substrate verfolgt. Hierbei sollte 1-Decen als Substrat und Hexansäure als Fettsäure-Dummy-Substrat dienen. Das Dummy-Substrat nimmt selber nicht an der Katalyse teil, hat jedoch eine wichtige Funktion im Hinblick auf die Organisation des aktiven Zentrums und die Positionierung des eigentlichen Substrates. Während die stereoselektive Wasser-Addition eine große Herausforderung für die synthetische organische Chemie darstellt, resultierte die biokatalytische Umsetzung mithilfe der *Em*-OAH unter optimierten Bedingungen in einer erfolgreichen Hydratisierung des nicht-natürlichen Substrates 1-Decen zu (*S*)-2-Decanol mit exzellenter Stereoselektivität (>99 % *ee*)

und 50 % Umsatz (250 μM) nach viertägiger Inkubation. Die enzymatische Hydratisierung des Alkens durch das *Em*-OAH Wildtypenzym zeigte eine starke Abhängigkeit vom Dummy-Substrat und die höchste Produktkonzentration wurde durch ein äquimolares Verhältnis von Alken und Fettsäure erhalten. Darüber hinaus ergab die Analyse alternativer Dummy-Substrate, wie zum Beispiel Fettsäureester oder funktionalisierte Derivate, dass die Carboxylgruppe und eine Kettenlänge von sechs bis sieben Kohlenstoffatomen essentiell sind für eine effektive Hydratisierung von 1-Decen.

Für ein besseres Verständnis des Hydratisierungsmechanismus wurden nachfolgend *Em*-OAH Varianten zur Identifizierung/Verifizierung katalytisch-relevanter Aminosäuren und zur Analyse der Substratbindung generiert. Die Mutagenese des Tyrosins 241, der Glutaminsäure 122, des Methionins 123 und des Threonins 511 resultierte in eine deutliche Abnahme der enzymatischen Aktivität und bestätigte somit die Relevanz dieser Positionen für die *Em*-OAH-katalysierte Hydratisierung verschiedener Substrate. Für die Analyse der Substrat-Erkennung mithilfe der Aminosäuren am Eingang des Substratkanals wurden verschiedene Varianten des Histidins 442 und des Asparagins 438 generiert. Die Bedeutung dieser beiden Aminosäurepositionen für die katalytische Aktivität der *Em*-OAH wurde bestätigt. Die AS-Substitutionen zeigten jedoch in Abhängigkeit der Substrat-Kettenlänge unterschiedliche Auswirkungen. Darüber hinaus war die Hydratisierung des Alkens 1-Decen mit Hexansäure als Dummy-Substrat in geringerem Maße von den Mutationen betroffen. Eine Unabhängigkeit der Katalyse vom Fettsäure-Dummy-Substrat wurde jedoch durch keine der vorgenommenen Substitutionen erreicht.

Eine Analyse des Alken-Substratspektrums zeigte, dass das *Em*-OAH Wildtypenzym neben 1-Decen auch 1-Octen als Substrat akzeptiert. Da die Aktivität mit dem verkürzten Alken jedoch sehr gering war, wurde nachfolgend eine (semi-)rationale Mutagenese-Strategie verfolgt. Ziel der Mutagenese war die Verkleinerung der Alkyl-Substratbindetasche zur besseren Stabilisierung nicht-natürlicher Substrate wie der C11-Fettsäure (*Z*)-Undec-9-ensäure und kurzkettiger Alkene. Als Ergebnis der strukturellen und sequenziellen Analyse wurden Phenylalanin 227 und Alanin 248 als vielversprechende Mutagenesepositionen identifiziert. Während der Austausch des F227 gegen die größeren aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan einen positiven Effekt auf die Hydratisierung der C11-Fettsäure (*Z*)-Undec-9-ensäure zeigte, resultierte die Sättigungsmutagenese der Spezifitätsbestimmenden Position A248 im Vergleich zum Wildtyp in eine bis zu 7-fache Steigerung der 1-Octen Hydratisierung. 160 μM (*S*)-2-Octanol und ein exzellenter Enantiomerenüberschuss

von >99 % wurden mithilfe der besten *Em*-OAH Variante A248L nach sechstägiger Inkubation erhalten.

Die vielversprechendsten *Em*-OAH Varianten wurden nachfolgend für die Hydratisierung noch kleinerer Alkene ausgewählt (C5-C7). Aufgrund der hohen Volatilität dieser Substrate wurde jedoch zunächst ein Zweiphasensystem etabliert, wobei langkettige, verzweigte, unpolare Lösemittel wie Dodecansäuremethylester (DAME), Isopropylmyristat (IPM) und Bis(2-ethylhexyl)phthalat (BEHP) die besten Ergebnisse lieferten. Nach zahlreichen Optimierungsrunden zeigte sich, dass der Einsatz hoher Alken-Konzentrationen (300 mM) essentiell ist für hohe Umsatzraten im Zweiphasensystem. Neben der Etablierung eines Zweiphasensystems wurde eine zweite Strategie für die Hydratisierung kurzkettiger Alkene verfolgt. Dabei lag der Fokus auf einer Optimierung der Reaktionsbedingungen im Hinblick auf den Umsatz flüchtiger Substrate ohne Verwendung eines Lösemittels. Auch in diesem Fall wurde die Substratverfügbarkeit als kritischer Parameter identifiziert. Mithilfe der beiden Systeme wurden die Alkene 1-Hepten, 1-Hexen und 1-Penten stereoselektiv (>99 % *ee*) zu den entsprechenden sekundären Alkoholen hydratisiert. 3 mM (*S*)-2-Heptanol, 125 μ M (*S*)-2-Hexanol und 20 μ M (*S*)-2-Pentanol wurden nach fünftägiger Inkubation mit den besten *Em*-OAH Varianten A248L bzw. A248W und Heptansäure als Dummy-Substrat im Zweiphasensystem mit BEHP als organisches Lösemittel und 300 mM Substrat erhalten.

Die anschließende Charakterisierung der *Em*-OAH A248W zeigte eine deutliche Steigerung der Produktkonzentrationen (200 μ M (*S*)-2-Hexanol, 38 μ M (*S*)-2-Pentanol) durch die Verwendung des C6-Dummy-Substrates Hexansäure. Darüber hinaus ermöglichte die Kombination von Pentansäure und *cis*-2-Hexen die selektive Hydratisierung des subterminalen Alkens zum sekundären Alkohol 3-Hexanol mithilfe dieser Mutante. Ein weiteres interessantes Substrat ist das zweifach ungesättigte Alken 1,3-Butandien. Es wurde jedoch unter den gewählten Bedingungen keine Hydratisierung des C4-Derivates beobachtet.

Um die Anwendbarkeit der *Em*-OAH hinsichtlich der Hydratisierung terminaler Alkene zu demonstrieren, wurden 1-Decen und 1-Octen als Modellssubstrate für ein *Upscaling* im semi-präparativen Maßstab ausgewählt. Die sekundären Alkohole *S*-2-Decanol und *S*-2-Octanol wurden nach sechstägiger Inkubation mit einer isolierten Ausbeute von 44 % (35 mg) bzw. 22 % (14 mg) und einem exzellenten Enantiomerenüberschuss von >99 % gewonnen.

ABSTRACT

The oleate hydratase from *Elizabethkingia meningoseptica* (*Em*-OAH) catalyzes the stereoselective hydration of oleic acid (C18) to (*R*)-10-hydroxystearic acid. Moreover, the enzyme converts palmitoleic acid (C16), myristoleic acid (C14) and chemically synthesized (*Z*)-undec-9-enoic acid (C11) to the corresponding 10-hydroxy products. However, hydratase activity was strongly reduced with decreasing chain length of the fatty acid substrates. Furthermore, no activity was observed towards the C10-fatty acid dec-9-enoic acid possessing a terminal C=C double bond. The aim of the present PhD thesis was to broaden the substrate scope and to increase the enzymatic activity of the *Em*-OAH with regard to the hydration of short-chain non-natural substrates.

Product formation in the hydration of the truncated non-natural C11 substrate was improved by optimizing the reaction conditions applying statistical experiment design. Optimized reaction conditions resulted in a 2.8-fold increase in product formation in just one quarter of the time (0.32 mM 10-hydroxyundecanoic acid; 64 % conversion in 28 h). The applicability has been assessed in the upscaling of (*Z*)-undec-9-enoic acid conversion in a preparative scale (1 L, 1 mM substrate) and the product was identified as (*S*)-10-hydroxyundecanoic acid (132 mg product, 66 % isolated yield, >95 % purity) by Mosher ester analysis. The subsequent analysis of the reaction equilibrium did not result in any dehydration of the hydrated product.

As the enzymatic hydration of short-chain dec-9-enoic acid by *Em*-OAH wildtype enzyme was not successful applying optimized reaction conditions, a second strategy for the conversion of non-natural substrates was pursued using a short-chain alkene and a fatty acid dummy substrate. The dummy substrate is not part of the catalysis itself but has an important function regarding the organization of the active site and the positioning of the substrate. While the stereoselective addition of water is a great challenge in synthetic organic chemistry, non-natural 1-decene was successfully hydrated to (*S*)-2-decanol by *Em*-OAH wildtype enzyme with excellent stereoselectivity (>99 % *ee*) and 50 % conversion (250 μ M) after four days of incubation using hexanoic acid as a dummy substrate. The biocatalytic hydration of 1-decene showed a strong dependency on the dummy substrate and was best with an equimolar ratio of the alkene and the fatty acid. Moreover, analysis of alternative dummy substrates, such as fatty acid ester or functionalized derivatives, revealed the carboxylic group of the dummy substrate and a chain length of six to seven carbon atoms to be essential for effective hydration of 1-decene.

ABSTRACT

For a better understanding of the hydration mechanism *Em*-OAH variants were generated to identify catalytically relevant amino acids and to analyze substrate recognition. The mutagenesis of tyrosine 241, glutamic acid 122, methionine 123 and threonine 511 resulted in a strong decrease of enzymatic activity and therefore confirmed the relevance of these positions for *Em*-OAH catalyzed hydration. For the analysis of substrate recognition by amino acids at the entrance of the substrate channel variants of histidine 442 and asparagine 438 were generated. The importance of these two positions for catalytic activity of *Em*-OAH was confirmed. However, the amino acid substitutions showed a different effect on hydration activity depending on the substrate chain length. Moreover, hydration of the alkene 1-decene with hexanoic acid dummy substrate was effected to a lesser extent by the introduced mutations. However, an independency of catalysis from the fatty acid dummy substrate was not achieved.

A further analysis of the alkene-substrate specificity revealed a low activity of *Em*-OAH wildtype enzyme towards 1-octene. To increase the conversion of the truncated alkene and the C11-fatty acid, (semi-)rational mutagenesis based on structure and sequence analysis was applied, aiming at a better stabilization of short-chain non-natural substrates by shortening the alkyl substrate binding pocket. As a result, phenylalanine 227 and alanine 248 were identified as promising positions for mutagenesis. While the substitution of F227 against the bulkier aromatic residues tyrosine and tryptophan showed a positive effect on (*Z*)-undec-9-enoic acid hydration, site-saturation mutagenesis of specificity determined position A248 led to a 7-fold increase in 1-octene hydration compared to the wildtype enzyme. 160 μ M (*S*)-2-octanol and an excellent *ee*-value of >99% were obtained after six days of incubation using the best *Em*-OAH variant A248L.

The most promising *Em*-OAH variants were selected for the hydration of even smaller alkenes (C5-C7). However, due to the high volatility of these substrates a two-phase system was established. Best results were obtained with long chain, bulky, non-polar solvents such as dodecanoic acid methyl ester (DAME), isopropyl myristate (IPM) and bis(2-ethylhexyl) phthalate (BEHP). After several rounds of optimization, high alkene concentrations (300 mM) turned out to be crucial for high conversion rates in a two-phase system. Apart from the two-phase system, a second strategy for the conversion of short-chain alkenes was pursued by optimizing the reaction conditions focusing on the hydration of volatile substrates without using a solvent. Again, substrate availability turned out as a crucial parameter of the optimization. As a result of the two systems, 1-heptene, 1-hexene and 1-pentene were stereoselectively (>99 % *ee*) hydrated to the corresponding secondary alcohols. 3 mM (*S*)-2-

heptanol, 125 μM (*S*)-2-hexanol and 20 μM (*S*)-2-pentanol were obtained after five days of incubation with the best *Em*-OAH variants A248L and A248W, respectively, and heptanoic acid as a dummy substrate employing BEHP as organic solvent and 300 mM substrate.

The subsequent characterization of *Em*-OAH A248W revealed a strong increase in product concentrations (200 μM (*S*)-2-hexanol, 38 μM (*S*)-2-pentanol) by using the C6-dummy substrate hexanoic acid. Moreover, the combination of pentanoic acid and *cis*-2-hexene enabled the selective hydration of the subterminal alkene to the secondary alcohol 3-hexanol by this mutant. Another interesting molecule is the twofold unsaturated alkene 1,3-butadiene. However, no hydration of the C4-derivative was observed by *Em*-OAH A248W under the applied conditions.

To demonstrate the applicability of the oleate hydratase with respect to the hydration of terminal alkenes, 1-decene and 1-octene were selected as model substrates for semi-preparative upscaling experiments. The secondary alcohols *S*-2-decanol and *S*-2-octanol were obtained with an isolated yield of 44% (35 mg) and 22% (14 mg), respectively, and an excellent enantiomeric excess of >99% after six days of incubation.

1 EINLEITUNG

Die organische Chemie ermöglicht mit ihren zahlreichen Reaktionen eine große Vielfalt verschiedenster Modifizierungen, Funktionalisierungen und Synthesen.¹ Während unzählige Prozesse bereits vollständig etabliert sind und in jahrzehntelanger Erfahrung ausgeführt werden (z. B. Haber-Bosch-Verfahren²), stellt die selektive chirale Synthese neuer Pharmazeutika, Naturstoffe und Polymere die Chemie regelmäßig vor große Herausforderungen. Um mögliche Nebenprodukte zu verhindern und die Ausbeute zu erhöhen, werden daher häufig Schutzgruppen eingesetzt. Dieses Verfahren ist jedoch zumeist aufwendig und bedingt je nach Komplexität des Substrates zahlreiche zusätzliche Synthesestufen. Darüber hinaus erfordert die geringe Reaktivität der eingesetzten Moleküle in vielen Fällen den Einsatz harscher Reaktionsbedingungen, wie zum Beispiel hohe Temperaturen und Drücke, saure oder alkalische Bedingungen oder aber die Verwendung nicht grüner Lösemittel.¹

Besonders interessante sowie wertvolle Basischemikalien und Vorstufen für die Produktion Enantiomer-reiner Pharmazeutika, Feinchemikalien und Naturstoffe sind chirale Alkohole und Hydroxyfettsäuren.³⁻⁷ Darüber hinaus besitzen hydroxylierte Fettsäuren ein großes Potenzial als Bausteine für die Polymerchemie und für die Synthese cyclischer Lactone zur Herstellung verschiedener Antibiotika und Aromastoffe.^{6,8-11} Ein interessanter Nebenaspekt für eine Anwendung in der Lebensmittelindustrie ist des Weiteren die antifungielle Wirkung monohydroxylierter Fettsäuren.¹²⁻¹⁴ Die asymmetrische Hydratisierung der nicht-aktivierten C=C Bindung von Alkenen und ungesättigten Fettsäuren zur Synthese dieser Komponenten stellt für die Chemie jedoch eine große Herausforderung dar.^{15,16} Ein Grund hierfür liegt insbesondere in der geringen Reaktivität des Wassers unter neutralen Bedingungen, da es sich hierbei sowohl um ein schwaches Nukleophil als auch Elektrophil handelt. Aus diesem Grund bedarf die chemische Hydratisierung einer Aktivierung des im Wasser stabilen Alkens beispielsweise unter Einsatz starker Säuren oder Basen.¹ Methoden zur Funktionalisierung von Alkenen sind unter anderem die Palladium-katalysierte Hydrosilylierung^{17,18} und die Rhodium-katalysierte Hydroborierung¹⁹ oder aber Hydratisierungsreaktionen mithilfe von Woll-Palladium Komplexen²⁰⁻²² und ionischen Flüssigkeiten²³. Entscheidende Nachteile der chemischen Aktivierung sind jedoch beispielsweise die zeitaufwändige Vorbereitung des Katalysators, die Notwendigkeit zahlreicher Reaktionsschritte und/oder die Bildung schädlicher und gefährlicher Nebenprodukte. Ein weiteres Problem ist insbesondere die Kontrolle der Selektivität. So zeigt beispielsweise die asymmetrische Hydratisierung

verschiedener Styren-Derivate mithilfe von Woll-Palladium Komplexen eine Stereoselektivität von 47 % bis 94,4 % für das *R*-Enantiomer des hydratisierten Produktes.²⁰ Die einfache stereoselektive Addition von Wasser an Alkenen unter milden Reaktionsbedingungen in einer sowohl atomökonomischen²⁴ als auch Redox-neutralen²⁵ Reaktion bezeichnet hingegen einen Traum der synthetischen organischen Chemie.^{26,27} Stattdessen werden die wertvollen chiralen Alkohole bislang in zweistufigen Oxidations-Reduktions-Verfahren oder mithilfe einer racemischen Auflösung gewonnen.^{27,28} Die wenigen beschriebenen Katalysatoren für die Addition von Wasser zeigen darüber hinaus häufig eine nur moderate Stereoselektivität und sind limitiert auf aktivierte Alkene wie Enone oder Hydroxystyrene.^{29,30} So katalysieren beispielsweise verschiedene Decarboxylasen die Hydratisierung von 4-Hydroxystyren-Derivaten zum entsprechenden Alkohol mit einem Enantiomerenüberschuss von bis zu 71 %.³⁰ Die Hydratisierung nicht-aktivierter, aliphatischer Alkene stellt infolge der inerten Natur, des limitierten sterischen und elektronischen Effektes und des hohen Grades konformativer Flexibilität eine besondere Herausforderung dar.³¹ Während der synthetischen organischen Chemie für dieses Problem bislang keine direkte Lösung zur Verfügung steht, katalysieren Hydro-Lyasen (EC 4.2.1.) sowohl die regio- und stereoselektive Addition und Abspaltung von Wasser an isolierten als auch konjugierten C=C Bindungen (α,β -ungesättigte Carbonsäuren). Unter milden Reaktionsbedingungen entsteht der entsprechende Alkohol als finales Produkt, wobei der Natur eine Vielzahl verschiedener Cofaktor-abhängiger als auch -unabhängiger Enzyme zur Verfügung steht.^{26,32} Wie die saure Katalyse, verläuft die enzymatische Hydratisierung der Olefine dabei gemäß der Regel von Markovnikov³³ (Abbildung 1): durch die Bildung des stabilsten Carbokations infolge der Protonierung der C=C Bindung bindet die Hydroxylgruppe am Kohlenstoffatom mit den meisten Substituenten.

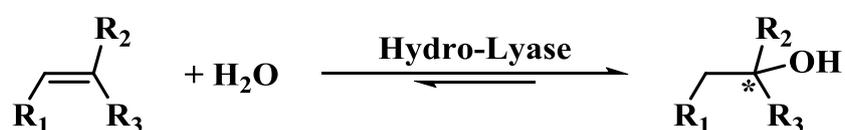


Abbildung 1: Die enzymatische Wasseraddition an isolierten C=C Bindungen mithilfe von Hydro-Lyasen verläuft gemäß der Regel von Markovnikov³³, verändert nach Demming *et al.*³⁴

Die Anwendung von Biokatalysatoren in der synthetischen organischen Chemie ist von großem ökologischen und ökonomischen Interesse und hat in den vergangenen Jahren deutlich an Bedeutung gewonnen.^{35,36} Neben den bereits aufgeführten Vorteilen (u. a. die exzellente Selektivität) bietet die Verwendung von Mikroorganismen und Enzymen eine

große Bandbreite verschiedener Optimierungsmöglichkeiten. Während zum Beispiel bakterielle Stämme mithilfe von *metabolic engineering* häufig sehr einfach und gezielt modifiziert werden können, erlaubt das rationale Proteindesign, das *de novo* Design und die gerichtete Evolution sowohl die spezifische Verbesserung gewünschter enzymatischer Eigenschaften als auch die Umsetzung neuer Substrate und Reaktionen.³⁷⁻⁴¹

1.1 Die selektive Addition/Abspaltung von Wasser mithilfe von Hydro-Lyasen

Während die chemische (De)Hydratisierung zumeist durch eine geringe Selektivität, das Auftreten von Nebenreaktionen und harsche Reaktionsbedingungen limitiert wird, bietet die biokatalytische Addition und Abspaltung von Wasser eine umweltfreundliche und selektive Alternative. Das große Potential der enzymatischen Katalyse wird insbesondere am Beispiel der Acrylamid-Produktion ersichtlich. Hergestellt wird dieses Produkt beispielsweise durch die Nitto Chemical Industry mit einer Produktionskapazität von 30.000 Tonnen pro Jahr.⁴² Für die Addition des Wassers an das entsprechende Nitril (Abbildung 2) werden typischerweise immobilisierte *Rhodococcus rhodochrous* Zellen eingesetzt. Dass dieser Prozess im Vergleich zur chemischen Kupfer-basierten Katalyse ökonomischer und somit erfolgreicher ist, liegt insbesondere an der hohen Reinheit und der damit verbundenen vereinfachten Aufbereitung des isolierten Produktes.^{32,42} Ein weiteres Beispiel für einen etablierten Prozess stellt die biotechnologische Herstellung von (*S*)-2-Hydroxybutan-1,4-disäure (auch Apfelsäure genannt) mithilfe der Fumarat-Hydratase dar (Abbildung 2). Auch dieses Verfahren wird im Multi-Tonnen Maßstab durchgeführt und bietet den Vorteil, dass das Reaktionsgleichgewicht durch die Präzipitation der Apfelsäure in Richtung des Produktes verschoben werden kann. Während die AMINO GmbH für diese Reaktion suspendierte *Corynebacterium glutamicum* Zellen einsetzt, verwendet Tanabe Seiyaku Co., Ltd. einen immobilisierten *Brevibacterium flavum* Ganzzell-Katalysator.^{32,43-46}

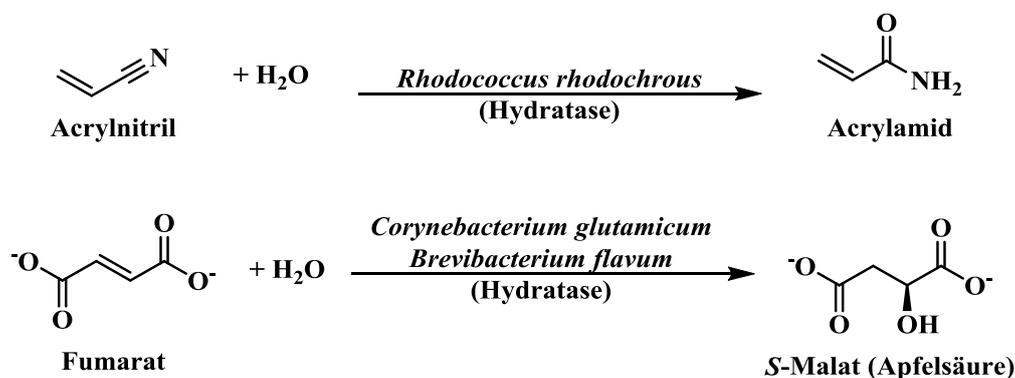


Abbildung 2: Biokatalytische Hydratisierungsreaktionen im industriellen Maßstab, verändert nach Hiseni *et al.*³²

Bei den aufgeführten Beispielen handelt es sich um Hydratisierungsreaktionen an aktivierten C=C Bindungen. Besonders interessant ist jedoch auch die selektive Addition und Abspaltung von Wasser an nicht-aktivierten C=C Bindungen, da dies unter anderem die wertvolle Interkonvertierung funktioneller Gruppen ermöglicht. Da eine solche Reaktion die Chemie vor eine große Herausforderung stellt, lag der Fokus der biotechnologischen Forschung in den vergangenen Jahren insbesondere auf der Identifizierung und Charakterisierung geeigneter Hydratasen.

1.2 Enzymatische Hydratisierung nicht-aktivierter C=C Bindungen

Die selektive Hydratisierung nicht-aktivierter C=C Bindungen bezeichnet ein fortlaufendes Problem in der synthetischen organischen Chemie. Seit geraumer Zeit steigt daher das Interesse am Potential entsprechender Hydratasen im Hinblick auf eine Anwendung in industriellen Prozessen. Von besonderer Bedeutung ist in dieser Hinsicht die Entwicklung von Biokatalysatoren zur Umsetzung nicht-natürlicher Substrate. Dabei ist aus industrieller Sicht der Einsatz von Enzymen ohne Cofaktor-Aktivierung wünschenswert. Darüber hinaus präsentieren die Enzyme einen direkten Ansatz für die (De)Hydratisierung der Zielmoleküle ohne die Bildung phosphorylierter Intermediate.⁴⁷ Ein Beispiel für eine entsprechende Cofaktor-unabhängige Dehydratase ist die Linalool-Dehydratase-Isomerase (LinD) aus *Castellaniella defragrans*.⁴⁸⁻⁵¹ Das Enzym katalysiert die Isomerisierung von Geraniol zu Linalool und ebenso die anschließende Dehydratisierung von Linalool zu Myrcen (Abbildung 3).⁴⁸

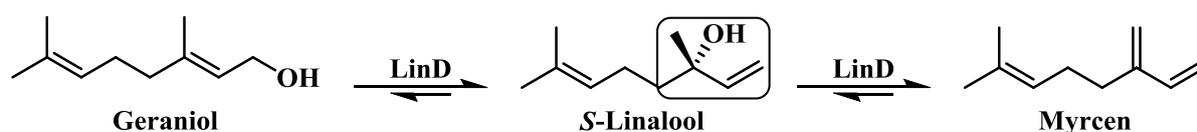


Abbildung 3: LinD-katalysierte Isomerisierung von Geraniol zu Linalool mit anschließender Dehydratisierung zu Myrcen, verändert nach Demming *et al.*⁵²

Identifiziert und charakterisiert wurde das bifunktionale Enzym zum ersten Mal durch Brodkorb und Kollegen in 2010. Im Rahmen der biochemischen Studien wurde für das isolierte Enzym ein Temperatur-Optimum von 35 °C mit einer hohen Aktivität bei leicht basischem pH-Wert ermittelt. Eine Analyse der Aminosäuresequenz lässt darüber hinaus vermuten, dass es sich bei der LinD um ein periplasmatisches Protein handelt.⁴⁸ In 2016 wurde in zwei unabhängigen Studien die Kristallstruktur des Enzyms gelöst.^{50,51} Das Homopentamer besteht hauptsächlich aus α -Helices und das aktive Zentrum ist an der

Grenzfläche zweier benachbarter Monomere lokalisiert. Mithilfe von Mutagenesestudien wurden darüber hinaus katalytisch-wichtige Aminosäuren identifiziert und zwei hypothetische Reaktionsmechanismen postuliert. Während der erste Mechanismus die Bildung eines kovalenten Intermediats umfasst, verläuft die zweite Säure-Base-katalysierte (De)Hydratisierung/Isomerisierung über ein tertiäres Carbokation.⁵⁰ Eine Analyse der Spezifität zeigte, dass die LinD eine große Vielzahl verlängerter als auch verkürzter aliphatischer und aromatischer tertiärer Alkohole (C5-C15) als Substrat akzeptiert. Nicht dehydratisiert wurden hingegen Moleküle, denen das notwendige α -Methylallyl-Alkohol-Erkennungsmotiv fehlte (Abbildung 3, mit einem Kästchen markiert).⁵⁰ Nichtsdestotrotz handelt es sich bei der LinD um einen sehr interessanten Kandidaten für die Synthese verschiedener Alkene und tertiärer Alkohole. So sind beispielsweise die industriell wertvollen chiralen (De)Hydratisierungsprodukte von Terpenoiden (u.a. (S)-(+)-Linalool (auch Coriandrol)) häufig nicht kommerziell erhältlich und auch Geraniol und Myrcen stellen interessante Produkte dar.⁴⁹

Ein weiteres Beispiel für eine Cofaktor-unabhängige Hydratase stellt die Carotinoid-1,2-Hydratase (EC 4.2.1.131) dar.⁵³⁻⁵⁷ Die enzymatische Hydratisierung der terminalen C=C Bindung der Carotinoide resultiert dabei in die Bildung des entsprechenden tertiären Alkohols (Abbildung 4). In Abhängigkeit des Substratspektrums wird derzeit zwischen zwei verschiedenen Carotinoid-Hydratasen unterschieden: Während die CruF (z. B. aus *Deinococcus radiodurans* R1) zyklische Carotinoide wie γ -Carotin als Substrat akzeptiert, katalysieren CrtCs die Addition von Wasser an azyklischen Molekülen wie zum Beispiel Lycopin oder Neurosporin.^{54,55,57} Biochemisch charakterisiert wurden bislang die CrtCs aus *Rubrivivax gelatinosus* und *Thiocapsa roseopersicina*.⁵⁶ Die Analyse der Spezifität zeigte, dass die Enzyme ein enges, auf Carotinoide begrenztes Substratspektrum aufweisen.⁵³ Während jedoch eine Hydratisierung des verkürzten Substrates Geranylgeraniol (C20) beobachtet wurde, waren die Enzyme mit mittel- und kurzkettigen Molekülen wie Farnesol (C15), 2-Methyl-2-penten (C6) und 2-Methyl-2-buten (C5) trotz des vorhandenen „2-Methyl-2-en“-Motivs (Abbildung 4, mit einem Kästchen markiert) inaktiv.⁵⁶ In 2016 wurden darüber hinaus anhand eines Homologie-Modells und mithilfe von Mutagenesestudien katalytisch wichtige Aminosäuren identifiziert und ein hypothetischer Reaktionsmechanismus postuliert.⁵⁷ Da der beschriebene Protonierungs-Mechanismus über eine besonders saure Asparaginsäure verläuft, wurde ein Vergleich zur Squalen-Hopen-Cyclase aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* vorgenommen: ein hoch promiskuitives Enzym, welches eine Vielzahl verschiedener Säure-katalysierter Reaktionen ermöglicht.^{57,58}

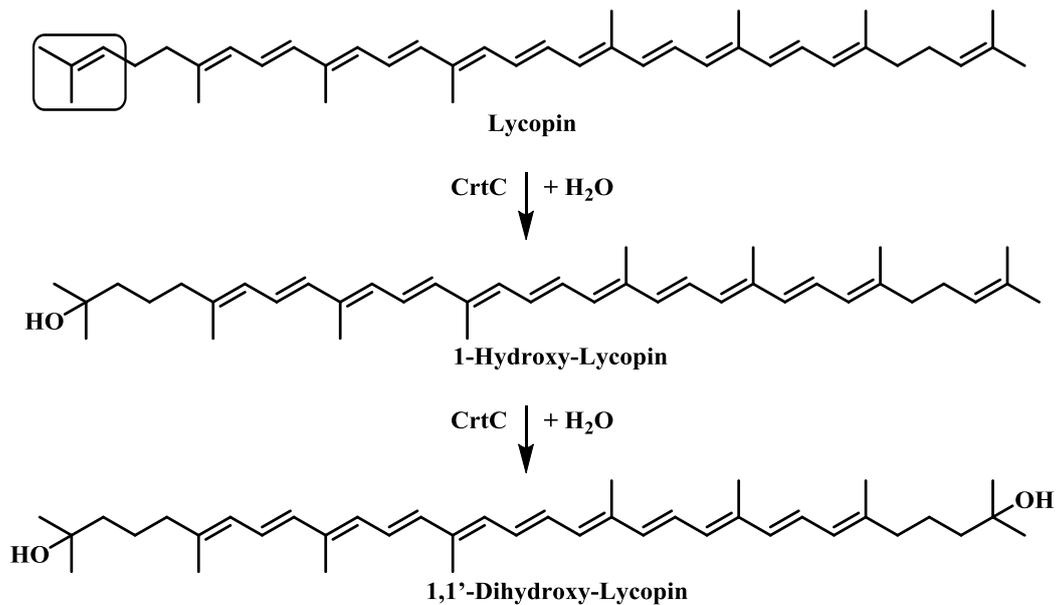


Abbildung 4: CrtC-katalysierte (Di)Hydratisierung von Lycopin zu 1-Hydroxy-Lycopin bzw. 1,1'-Dihydroxy-Lycopin, verändert nach Demming *et al.*⁵²

Neben der LinD und den Carotinoid-Hydratase ist infolge eines breiten Substratspektrums darüber hinaus eine weitere Subgruppe der Hydro-Lyasen von besonderem Interesse für die industrielle Anwendung: die Fettsäure-Hydratase.

1.3 Fettsäure-Hydratase

Die Hydratisierung von Ölsäure zu 10-Hydroxyoctadecansäure wurde zum ersten Mal im Jahre 1962 beschrieben als Wallen und Kollegen einen von fettigem Material isolierten Pseudomonaden analysierten.⁵⁹ Das entsprechende Enzym von *Elizabethkingia meningoseptica* (zuvor *Pseudomonas* sp. strain 3266) wurde jedoch erst 2009 identifiziert und biochemisch charakterisiert.⁶⁰ Bis heute wurde eine Vielzahl an Enzymen aus einer großen Bandbreite Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien (*Bifidobacterium animalis*⁶¹, *B. breve*⁶², *Chryseobacterium gleum*⁶³, *Desulfomicrobium baculatum*⁶³, *E. meningoseptica*^{60,63}, *Gemella morbillorum*⁶³, *Lactobacillus acidophilus*^{61,63-68}, *L. hammesii*¹², *L. plantarum*^{12,61,69,70}, *L. reuteri*¹², *L. rhamnosus*⁶¹, *L. spicheri*¹², *Lysinibacillus fusiformis*⁷¹, *Macrocooccus caseolyticus*⁷², *Rhodococcus erythropolis*⁷³, *Stenotrophomonas maltophilia*⁷⁴, *S. nitritireducens*⁷⁵, *Streptococcus pyogenes*⁷⁶) rekombinant exprimiert, charakterisiert und als Ölsäure-Hydratase (OAH), Linolsäure-Hydratase (LAH) oder allgemeine Fettsäure-Hydratase identifiziert. In 2016 wurde darüber hinaus eine Hydratase Datenbank (*Hydratase Engineering Database*; URL: <https://hyed.biocatnet.de/>) mit 2046 Sequenzen bekannter oder aber putativer Hydratase erstellt. Bei der Mehrzahl dieser

Hydratasen handelt es sich um bakterielle Proteine, es wurden aber auch 103 bzw. 24 Sequenzen aus Pilzen und Archaeen aufgenommen. Die Sequenzen wurden in elf homologe Familien (HFam1 bis 11) eingeteilt, wobei die durchschnittliche Sequenzidentität innerhalb der einzelnen Familien bei ca. 62 % liegt. Die größte Familie stellt mit 1188 Sequenzen die HFam2 dar, gefolgt von der HFam1 (436 Sequenzen), der HFam3 (191) und der HFam11 (116), während alle anderen homologen Hydratase-Familien jeweils maximal 50 Sequenzen umfassen. Darüber hinaus wurden in die Datenbank die bis dato einzigen gelösten Kristallstrukturen der LAH aus *L. acidophilus* NCFM⁷⁷ (HFam2) und der OAH aus *E. meningoseptica*⁷⁸ (HFam11) aufgenommen (siehe auch Absatz 1.3.3).⁶³

Trotz des ubiquitären Vorkommens der Fettsäure-Hydratasen, ist wenig bekannt über die biochemische und physiologische Funktion dieser Proteine. Da ungesättigte Fettsäuren unter anderem infolge ihres Zellmembran-permeabilisierenden Effektes toxisch auf viele Bakterien wirken,^{79–81} wird vermutet, dass es sich bei der Hydratisierungsreaktion um einen zusätzlichen bakteriellen Detoxifizierungsmechanismus handelt.^{70,76} So wurde beispielsweise für die Hydratase-Knockout-Mutante des Bakterienstammes *S. pyogenes* M49 eine zweifach erhöhte Sensitivität gegenüber Ölsäure ermittelt.⁷⁶ Darüber hinaus inhibieren ungesättigte Fettsäuren die Enoyl-acyl Carrier Protein Reduktase und beeinträchtigen somit die Fettsäure-Biosynthese.⁸² Die Hydratisierung ungesättigter Fettsäuren stellt somit eventuell einen essentiellen Schutzmechanismus für die bakterielle Besiedelung und das Überleben in fettsäurereichen Umgebungen dar (z. B. die Haut oder entzündetes Gewebe).⁷⁶ Bei der Hydratisierung von Linolsäure durch Milchsäurebakterien wie *L. plantarum* handelt es sich beispielsweise um den ersten Schritt der Biohydrogenierung zur Umwandlung dieser toxischen Verbindung in wertvolle konjugierte Produkte.^{70,81,83,84} MCRA-Proteine (*Myosin-cross-reactive antigen*), welche infolge ihrer enzymatischen Aktivität als Hydratasen klassifiziert wurden, spielen darüber hinaus möglicherweise eine wichtige Rolle im Rahmen der bakteriellen Zelladhäsion, Virulenz und Stresstoleranz.^{12,62,76,85}

1.3.1 Substratspektrum der Fettsäure-Hydratasen

Die natürliche Reaktion der Ölsäure-Hydratase (EC 4.2.1.53) ist die Cofaktor-unabhängige regio- und stereoselektive Hydratisierung von Ölsäure (*cis*-9-Octadecensäure) zu (*R*)-10-Hydroxyoctadecensäure (Abbildung 5).^{32,60,71–73,78} Die Linolsäure-Hydratase hingegen weist die höchste Aktivität mit Linolsäure ((*cis,cis*)-Octadeca-9,12-diensäure) auf, mit dem Resultat des 10- bzw. 13-Hydroxyproduktes.^{12,65,67} Darüber hinaus katalysieren die verschiedenen

Hydratasen in Abhängigkeit des jeweiligen Substratspektrums die Addition und Eliminierung von Wasser an zahlreichen weiteren (mehrfach-)ungesättigten Fettsäuren mit 14 bis 18 Kohlenstoffatomen.^{12,60–65,69,72,73,76} Während mit allen charakterisierten Enzymen nur Monohydroxy-Produkte erhalten wurden, führten Hydratasen aus *M. caseolyticus* und *S. pyogenes* bei Inkubation mit Linolsäure, α -Linolsäure bzw. γ -Linolsäure ein zweites Wassermolekül ein.^{72,76} Darüber hinaus wurde in 2015 eine neue regioselektive Hydratase aus *L. acidophilus* identifiziert, welche die Hydratisierung langkettiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren (C16-C22) zu den entsprechenden 10-, 12-, 13-, 14- und 15-Monohydroxy-Produkten katalysiert.⁶⁶

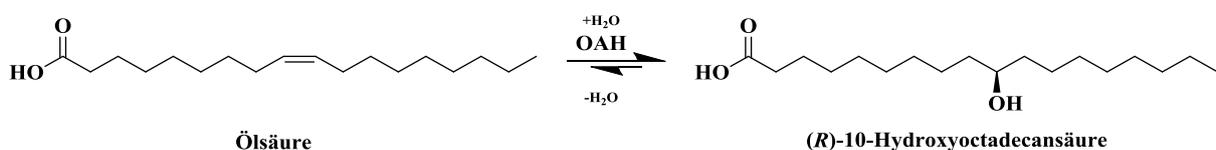


Abbildung 5: OAH-katalysierte Hydratisierung von Ölsäure zu (R)-10-Hydroxyoctadecansäure, verändert nach Demming *et al.*⁵²

Obwohl eine Mindestkettenlänge von 14 Kohlenstoffatomen als essentieller Faktor für die enzymatische Hydratisierung beschrieben wurde,³² beobachteten J. Schmid und Kollegen eine geringe Aktivität der Wildtyp-Hydratasen aus *G. morbillorum*, *C. gleum* und *E. meningoseptica* (*Em*-OAH) mit der chemisch-synthetisierten C11-Fettsäure (*Z*)-Undec-9-ensäure.⁶³ Die Hydratisierung der Dec-9-ensäure (C10), welche als einziges der getesteten Substrate eine terminale C=C Bindung aufwies, war jedoch nicht erfolgreich. Darüber hinaus zeigten die bislang charakterisierten Hydratasen keine Hydratisierungsaktivität mit Methyl- und Ethyl-Fettsäureestern.^{62,66,69,76,77} Die Ergebnisse der verschiedenen Studien deuten darauf hin, dass die Aktivität der Hydratasen von mehreren Faktoren abhängig ist:

- a) einem Abstand von mindestens neun Kohlenstoffatomen zwischen der C=C Bindung und der Carboxylgruppe,
- b) einer *cis*-Konformation der adressierten Doppelbindung,
- c) einer subterminalen Position der C=C Bindung und
- d) einer Carboxylgruppe für die Substrat-Erkennung.⁵²

Interessanterweise beschreiben Patente von Marlière⁸⁶ und Atsumi⁸⁷ die Produktion kurzkettiger Alkene und Alkohole wie zum Beispiel Isobuten bzw. Ethanol mithilfe der (De)Hydratisierungsaktivität der Ölsäure-Hydratase. Dabei liefern die Dokumente jedoch nur

wenige Informationen im Hinblick auf die Enzyme, die experimentelle Ausführung und die Produktausbeute.

1.3.2 Funktion und Bedeutung des Flavin-Cofaktors

Für die meisten (De)Hydratasen wurde eine Abhängigkeit von Cofaktoren wie Metallionen^{88,89}, Eisen-Schwefel-Clustern^{90,91} oder Reduktionsäquivalenten^{92,93} (NAD(P)H⁺, FADH₂) beschrieben, welche sowohl an der Substratbindung und -orientierung als auch an der Stabilisierung von Intermediaten oder aber der Bildung von Radikalen beteiligt sein können.³² Die Hydratisierungsreaktion mithilfe der Fettsäure-Hydratasen verläuft im Endeffekt ohne eine Veränderung des Netto-Redoxzustandes. Interessanterweise besitzen dennoch alle derzeit charakterisierten Fettsäure-Hydratasen einen Flavin-Cofaktor (FAD/FMN), dessen genaue Funktion jedoch bislang ungeklärt ist.^{12,61,62,64–66,69,72–74,76,78}

Mithilfe eines Sequenzalignments wurde ein konserviertes N-terminales FAD-Bindemotiv GxGxxG_{(S/A/N)(X)}₁₅E_{(K/D)(X)}₅E_(D/G/S) (dabei repräsentiert ein x eine beliebige Aminosäure) identifiziert, welches die bereits bekannte Rossmann-Faltung (GxGxxG) beinhaltet.³²

Flavoproteine katalysieren typischerweise Reaktionen mit einer Veränderung des Netto-Redoxzustandes wie Reduktionen, Oxidationen oder Oxygenierungen.^{94,95} Beschrieben sind jedoch auch Katalysen ohne Netto-Redox-Veränderung, darunter sowohl Beispiele für eine zwei-Elektronen und freie Radikalchemie als auch Reaktionen ohne direkte Beteiligung des Flavin-Cofaktors.⁹⁶ Die Analyse der Kristallstruktur der Linolsäure-Hydratase (LAH) aus *L. acidophilus* NCFM zeigte, dass das Protein eine strukturelle Ähnlichkeit zu anderen Flavoproteinen wie zum Beispiel den Amin-Oxidoreduktasen aufweist.^{77,97} Interessanterweise gehören die bekannten Flavoproteine ohne Redox-Beteiligung des Flavins zu den Carbon-Carbon-Lyasen (EC 4.1.). Diese Enzymklasse evolvierte vermutlich aus den Oxidoreduktasen (EC 1), wobei die Notwendigkeit des Cofaktors bestehen blieb.⁹⁶ Die genaue Rolle des Flavin-Cofaktors im Hinblick auf die Hydratisierungsreaktion durch die Fettsäure-Hydratasen bleibt jedoch zu klären. Da der Cofaktor nicht an der enzymatischen Katalyse beteiligt zu sein scheint, übernimmt er möglicherweise eine wichtige strukturelle oder ladungsstabilisierende Rolle in dieser Enzymklasse.^{61,64,69,72,76,78}

1.3.3 Strukturelle Aspekte der Fettsäure-Hydratasen

Die ersten strukturellen und mechanistischen Informationen einer Fettsäure-Hydratase wurden in 2013 von Volkov und Kollegen nach erfolgreicher Kristallisation der LAH aus *L. acidophilus* NCFM (*La*-LAH, HFam2) veröffentlicht.⁷⁷ Dabei wurde die Kristallstruktur

des Apoenzyms und der LAH mit gebundener Linolsäure mit einer Auflösung von 2,3 bzw. 1,8 Å erhalten (PDB: 4ia5 & 4ia6). Die Analyse zeigte, dass es sich bei der *La*-LAH um ein Homodimer handelt, dessen Protomere jeweils aus vier Domänen bestehen. Während drei der Domänen die FAD- und Substrat-Bindestelle definieren und strukturelle Ähnlichkeit zu weiteren Flavin-abhängigen Enzymen aufweisen (1.3.2), verdeckt die vierte Domäne den Eingang zum hydrophoben Substratkanal. Die Anwesenheit des Substrates Linolsäure bewirkt eine Konformationsänderung der vierten Domäne und öffnet somit den Zugang zum Substratkanal des jeweils anderen Protomers. Darüber hinaus erleichtern möglicherweise positiv-geladene Aminosäuren an der Oberfläche der Domäne IV durch Interaktion mit der Carboxylgruppe die Erkennung des Fettsäure-Substrates.⁷⁷ Unterstützt wird diese Vermutung durch die Inaktivität verschiedener Hydratasen im Hinblick auf die Umsetzung von Methyl- und Ethyl-Fettsäureestern (1.3.1).^{62,66,69,76,77}

Die erste Kristallstruktur einer Ölsäure-Hydratase, der *Em*-OAH aus der HFam11, wurde 2015 von Engleder und Kollegen veröffentlicht (PDB: 4uir).⁷⁸ Die Ergebnisse dieser Studie werden jedoch im nachfolgenden Kapitel (1.3.4) ausführlich dargestellt und dementsprechend hier nicht weiter behandelt. In 2017 wurde darüber hinaus die Kristallstruktur einer Ölsäure-Hydratase aus *R. erythropolis* (*Re*-OAH) im Apo-Zustand, d.h. ohne Bindung des FAD-Cofaktors, publiziert (PDB: 5odo; Auflösung: 2,64 Å).⁷³ Das Enzym gehört zur Hydratase Familie 3 und weist eine nur sehr geringe Sequenzidentität von 35 % bzw. 34 % zu den beiden strukturell bereits charakterisierten Proteinen *La*-LAH⁷⁷ und *Em*-OAH⁷⁸ auf.⁷³ Dennoch ergab die Analyse eine generelle Übereinstimmung im Hinblick auf die 4-Domänen-Struktur mit einer Beteiligung der Domänen I bis III an der Definierung der FAD- und Substratbindetasche. Die vierte, C-terminale Domäne des in diesem Fall monomeren Enzyms ist hingegen im Vergleich zu den anderen beiden Hydratasen deutlich verkürzt. Eine Überlagerung der drei verfügbaren Strukturen deutet darauf hin, dass die Anwesenheit bzw. Abwesenheit der C- und N-terminalen Sequenzverlängerungen einen entscheidenden Einfluss auf den oligomeren Zustand der Hydratasen hat. Mithilfe einer Sequenz-basierten Mutagenese wurden darüber hinaus katalytisch-relevante Aminosäuren identifiziert.⁷³

1.3.4 Ölsäure-Hydratase aus *E. meningoseptica*

Die best-charakterisierte Fettsäure-Hydratase ist die Ölsäure-Hydratase aus *E. meningoseptica* (*Em*-OAH, GQ144652).^{34,60,63,78,98–100} Das Protein besteht aus einem Homodimer mit einem Molekulargewicht von ca. 73 kDa pro Monomer und besitzt ein katalytisch-unbedeutendes

Calcium-Atom je Untereinheit.^{60,78} Kinetische Studien mit dem rekombinanten Enzym und dem natürlichen Substrat Ölsäure ergaben eine maximale Aktivität bei pH 6 und 25 °C und eine optimale Salzkonzentration von 50 mM NaCl.^{60,78} Die *Em*-OAH katalysiert die regioselektive Hydratisierung von Linolsäure (C18:2), Ölsäure (C18:1), Palmitinsäure (C16:1), Myristoleinsäure (C14:1) und (*Z*)-Undec-9-ensäure (C11:1) zum entsprechenden 10-Hydroxyprodukt. Auffällig ist dabei ein mit der Verkürzung der Substratkettenlänge einhergehender deutlicher Aktivitätsverlust des Enzyms. So wurde eine Konzentration von 500 µM des natürlichen Substrates Ölsäure unter Verwendung von 0,15 mg/ml Zellysats innerhalb von fünf Minuten fast vollständig umgesetzt, während für die verkürzte chemisch-synthetisierte C11-Fettsäure mit 4 mg/ml *E. coli* Lysat nur 23 % Produktbildung nach fünftägiger Inkubation erhalten wurde. Darüber hinaus wurde keine Aktivität mit der C10-FS Dec-9-ensäure beobachtet (siehe auch 1.3.1).⁶³

In 2015 wurde durch Engleder und Kollegen die Kristallstruktur der *Em*-OAH in Anwesenheit des nicht kovalent-gebundenen FAD-Cofaktors gelöst (Auflösung: 2,75 Å, Abbildung 6a).⁷⁸ Die Substratbindetasche weist demnach eine V-förmige Struktur auf (Abbildung 6b) und besteht hauptsächlich aus hydrophoben Aminosäureresten. Docking Studien zeigten darüber hinaus, dass die C=C Bindung des Substrates Ölsäure an der Krümmung der Bindetasche in räumlicher Nähe zum Isoalloxazinring des FADs und den katalytisch-aktiven Aminosäuren lokalisiert ist. So wurden mithilfe einer strukturbasierten Analyse und einer positionsgerichteten Mutagenese das Glutamat an Position 122 und das Tyrosin 241 der Aminosäuresequenz als essentiell für die Hydratisierungsaktivität des Enzyms identifiziert. Der postulierte strukturbasierte Reaktionsmechanismus (Abbildung 6c) beschreibt die Protonierung der C=C Bindung am C₉-Atom der Ölsäure durch das Y241 mit dem Resultat eines sekundären Carbokations am C₁₀-Atom. Durch die Glutaminsäure-basierte Aktivierung (E122) eines Wassermoleküls kommt es anschließend zu einem rückseitigen nukleophilen Angriff auf das Carbokation-Intermediat. Die Ergebnisse der Docking-Kalkulationen ließen darüber hinaus auf eine Interaktion des Ölsäure-Carboxylats mit den Aminosäuren am Eingang der Substratbindetasche schließen (Q265, T436, N438, H442). Die Bedeutung dieser Aminosäuren für die enzymatische Hydratisierung wurde durch eine nachfolgende Mutagenesestudie bestätigt. So wurde für die entsprechenden Alanin-Mutanten ein deutlich verringerter Umsatz des natürlichen Substrates Ölsäure beobachtet.⁷⁸

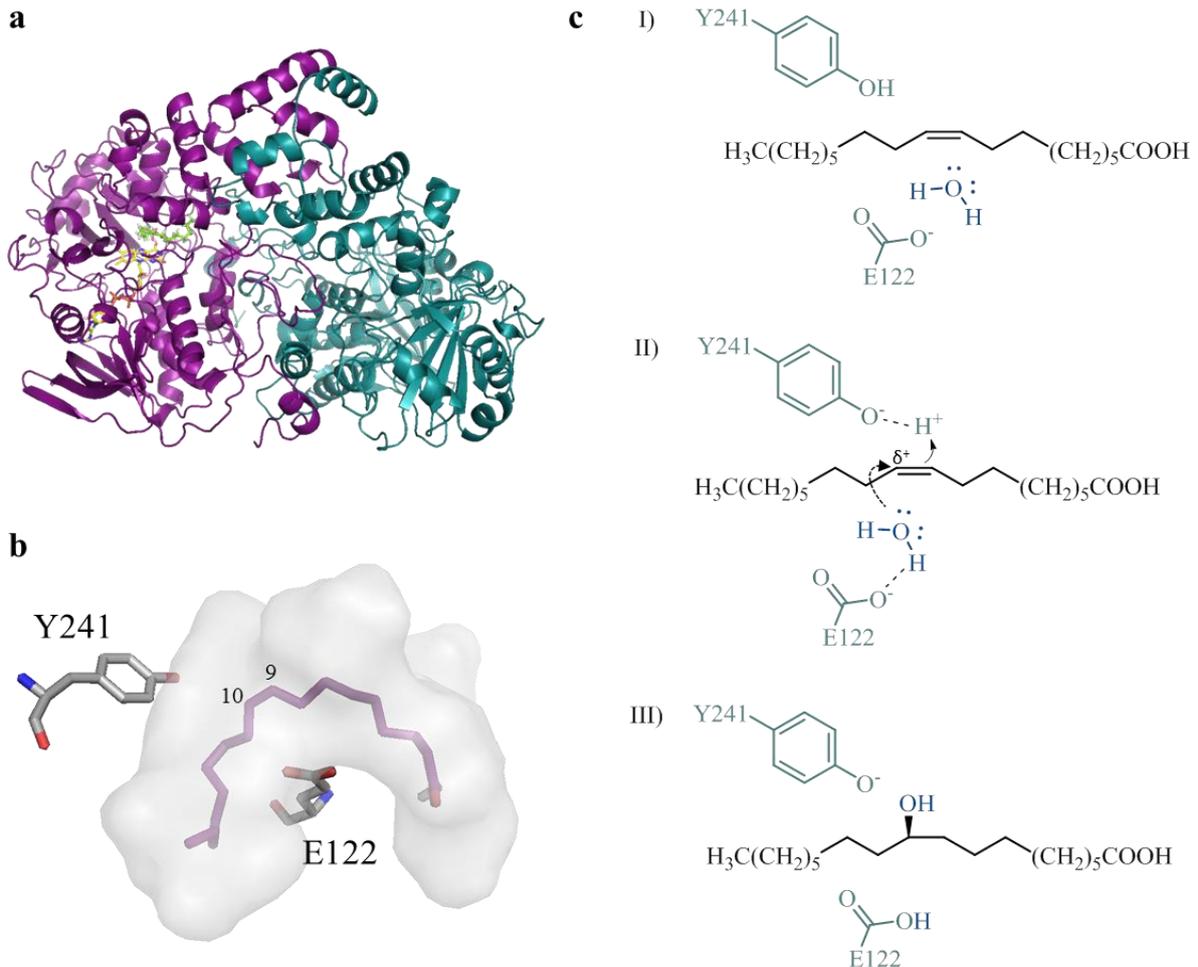


Abbildung 6: Strukturelle und mechanistische Charakterisierung der *Em*-OAH

a) Bändermodell der dimeren Ölsäure-Hydratase aus *E. meningoseptica* (*Em*-OAH) mit gebundenem FAD-Cofaktor (gelb). Das ins aktive Zentrum gedockte natürliche Substrat Ölsäure ist grün dargestellt. (verändert nach Engleder *et al.*⁷⁸)

b) V-förmige Substratbindetasche mit den katalytisch-relevanten Aminosäuren Y241 und E122. Das gedockte Substrat Ölsäure ist in Magenta dargestellt und die Atome der C=C Bindung sind mit den Nummern 9 und 10 gekennzeichnet. (übernommen aus Demming *et al.*⁵²)

c) Postulierter Reaktionsmechanismus: Protonierung der C=C Bindung am C₉-Atom der Ölsäure durch das Y241 und nukleophiler Angriff eines Glutaminsäure-aktivierten (E122) Wassermoleküls. (verändert nach Engleder *et al.*⁷⁸)

Eine kinetische Analyse des *Em*-OAH Holo- und Apoenzyms zeigte des Weiteren, dass der Flavin-Cofaktor eine entscheidende Rolle für die enzymatische Aktivität spielt. So verlor das Enzym infolge der FAD-Abwesenheit fast vollständig seine Funktionalität, während hingegen eine Inkubation des Apoenzyms mit dem Cofaktor in eine Wiederherstellung der Aktivität resultierte. Darüber hinaus führte sowohl eine Photoreduktion als auch die chemische Reduktion des FADs mithilfe von DTT zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung.⁷⁸ Während mit dem gereinigten Enzym (86 % FAD-Cofaktor Beladung) und Ölsäure als Substrat zuvor eine scheinbare maximale Aktivität von $1,0 \pm 0,1 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ und ein scheinbarer K_m -Wert von $0,11 \pm 0,06 \text{ mM}$ erhalten wurden, lagen diese Werte nach Photoreduktion des FAD-Cofaktors bei $2,1 \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ bzw. $0,07 \pm 0,05 \text{ mM}$. Da im bakteriellen Cytoplasma ein

reduzierendes Milieu vorliegt,^{101,102} ist vermutlich die reduzierte Form des FADs an der *Em*-OAH katalysierten Hydratisierung beteiligt.⁷⁸ Aufgrund der leicht sauren Eigenschaften des Isoalloxazinrings und der hohen Wahrscheinlichkeit im Hinblick auf das Vorliegen einer negativen Ladung infolge der gewählten Bedingungen, ist das FADH₂ somit wohlmöglich maßgeblich für die Stabilisierung des Carbokation-Intermediats verantwortlich.^{78,103} Darüber hinaus besitzt der reduzierte Isoalloxazinring möglicherweise das Potential zur direkten Protonierung der C=C Bindung.¹⁰³ Da jedoch während der Katalyse keine Änderung des Redoxzustandes beobachtet wurde, ist eine direkte Beteiligung am Reaktionsmechanismus eher unwahrscheinlich. Auch eine Enzym-stabilisierende Wirkung des FADs wurde mithilfe einer Schmelzpunktbestimmung und einer Circular dichroismus Spektroskopie ausgeschlossen. Auffällig war jedoch, dass ein flexibler Loop mit der katalytisch-wichtigen Aminosäure E122 bei Cofaktor-Bindung besser geordnet war. Das FAD hat somit wohlmöglich eine wichtige strukturelle Bedeutung im Hinblick auf die richtige Orientierung des Substrates und die Positionierung der katalytisch-relevanten Aminosäuren. In der *Em*-OAH kommt dem FAD-Cofaktor dementsprechend scheinbar eine duale Rolle zu: erstens, die korrekte Organisation des aktiven Zentrums und zweites, die Stabilisierung der positiven Ladung des putativen Übergangszustandes. Die strukturelle Analyse deutete darüber hinaus darauf hin, dass auch das Ende einer C-terminalen Helix (Aminosäuren N218 bis F227) an der Stabilisierung der positiven Ladung beteiligt sein könnte.⁷⁸

1.3.5 Industrielle Anwendung der Fettsäure-Hydratasen

Infolge der exzellenten Regio- und Stereoselektivität und insbesondere Cofaktor-Unabhängigkeit der Katalyse handelt es sich bei den Fettsäure-Hydratasen um hochinteressante Biokatalysatoren für die Produktion verschiedener hydroxylierter Fettsäuren. Während für (Di)Hydroxysterinsäure^{71,74,75,104–106} volumetrische Produktivitäten von bis zu 16 g/(l*h)⁷¹ erreicht wurden, wurde Hydroxyoctadecensäure^{67,68,75,107} (Ricinolsäure) sogar mit bis zu 26,3 g/(l*h)⁶⁷ hergestellt. Ein großer Vorteil der biotechnologischen Produktion ist darüber hinaus die Möglichkeit der Prozessoptimierung mithilfe permeabilisierter Zellen^{108,109}, periplasmatisch exprimierter Ganzzell-Biokatalysatoren¹¹⁰ oder immobilisierter Enzyme⁹⁹. Letzteres resultiert beispielsweise häufig in einer verbesserten operativen Stabilität und erlaubt unter anderem die Wiederverwendung des Katalysators. Von besonderem Interesse ist des Weiteren die Anwendung von Hydratasen in Enzymkaskaden für die

Produktion industriell-relevanter Carbonsäuren (z. B. α,ω -Tridec-9-ensäure) und Lactone (γ -dodecelactone).^{68,100,111,112}

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Ölsäure-Hydratase aus *E. meningoseptica* katalysiert die regioselektive Hydratisierung von Ölsäure (C18), Palmitinsäure (C16) und Myristoleinsäure (C14) zum entsprechenden 10-Hydroxyprodukt. Darüber hinaus wurde eine geringe Aktivität des Enzyms mit der chemisch-synthetisierten C11-Fettsäure (*Z*)-Undec-9-ensäure beobachtet.⁶³ Der Umsatz dieses nicht-natürlichen Substrates war jedoch mit 23 % Produktbildung nach fünftägiger Inkubation mit 4 mg/ml Zellysate sehr gering. Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Optimierung der Reaktionsbedingungen vorgenommen werden. Da die Produktivität verschiedener Hydratasen in bereits erfolgten Studien durch eine Optimierung der jeweiligen Bedingungen deutlich gesteigert wurde,^{67,71,74,108,109,113} lag der Fokus der Analyse insbesondere auf den bereits identifizierten Optimierungsparametern. Mithilfe der optimierten Reaktionsbedingungen sollte nachfolgend ein *Upscaling* der (*Z*)-Undec-9-ensäure-Hydratisierung zur präparativen Aufreinigung und Charakterisierung der 10-Hydroxyundecansäure erfolgen.

Neben der Produktion hydroxylierter Fettsäuren ist insbesondere die selektive Funktionalisierung nicht-aktivierter Alken C=C Bindungen von großem Interesse. Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Substratspektrum der *Em*-OAH im Hinblick auf die Hydratisierung kurzkettiger Alkene erweitert werden. Da für die Substrat-Erkennung durch die OAHs scheinbar die Anwesenheit einer Carboxylgruppe essentiell ist,^{62,66,69,76-78} bedingt die Umsetzung von Alkenen möglicherweise den Einsatz eines Dummy-Substrates.^{86,114} Die Aufgabe eines solchen Moleküls liegt dabei sowohl in der notwendigen Interaktion mit den Aminosäuren der Substratbindetasche als auch darin die aktive Tasche räumlich zu füllen. Es nimmt jedoch nicht an der eigentlichen Katalyse teil. Neben der Identifizierung geeigneter Substrate und Dummy-Substrate sollte darüber hinaus der Umsatz der nicht-natürlichen Alkene gesteigert werden. Eine Herausforderung ist in diesem Zusammenhang insbesondere die Stabilisierung und Positionierung der kurzkettigen Moleküle in der großen hydrophoben Substratbindetasche. Eine Lösung hierfür bietet eventuell eine Sequenz- und Struktur-basierte positionsgerichtete Mutagenese des *Em*-OAH Wildtypenzym, mit dem Ziel die Substratbindetasche räumlich zu verkleinern. Problematisch ist darüber hinaus die hohe Volatilität der kurzkettigen Alkene. Um den Verlust der Substrate in die Gasphase zu verhindern, sollte dementsprechend ein geeignetes Zweiphasensystem etabliert werden.

In einem weiteren Teilprojekt dieser Arbeit sollte darüber hinaus der von Engleder und Kollegen postulierte Reaktionsmechanismus der Hydratisierungsreaktion und die Bedeutung der Aminosäuren am Eingang des Substratkanals analysiert werden.⁷⁸ Der gezielte Austausch der an der Substrat-Erkennung beteiligten Aminosäuren ermöglicht des Weiteren eventuell die Umsetzung der nicht-natürlichen Alkene ohne den Einsatz eines Dummy-Substrates. Schlussendlich liefern alle zusammengetragenen Erkenntnisse weitere generelle Informationen zur *Em*-OAH-basierten Katalyse und tragen somit zu einem besseren Verständnis dieses interessanten Enzyms bei. Darüber hinaus ermöglicht die Studie möglicherweise die enzymatische Synthese wichtiger industrieller Produkte wie reine chirale Alkohole und Hydroxyfettsäuren, welche chemisch nur schwer zugänglich sind.

2 MATERIAL UND METHODEN

Materialien und Methoden, welche im Rahmen der Dissertation verwendet bzw. durchgeführt wurden, werden im folgenden Kapitel erläutert.

2.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Lösungen und Pufferkomponenten wurden, wenn nicht anders angegeben, stets in der höchsten Reinheit von Acros Organics (Geel, Belgien), Alfa Aesar (Karlsruhe, Deutschland), Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland), Macherey-Nagel (Düren, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Peqlab (Erlangen, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) und VWR (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Die nicht kommerziell erhältliche Fettsäure (Z)-Undec-9-ensäure wurde wie beschrieben (2.11.1) synthetisiert.

2.2 Organismen

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Bakterienstämme verwendet (Tabelle 1). *E. coli* Dh5 α wurde unter anderem aufgrund einer hohen Replikationsrate für Klonierungsarbeiten und die Amplifikation der Plasmide eingesetzt. Für die heterologe Genexpression wurde hingegen der *E. coli* Stamm BL21 (DE3) verwendet.

Tabelle 1: Bakterienstämme zur Plasmid-Amplifikation und Genexpression

Stamm	Relevanter Phäno-/Genotyp ^{a)}	Referenz
<i>E. coli</i> Dh5 α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ -	IBTB Stuttgart
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3[lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	IBTB Stuttgart

2.3 Vektoren

Für die heterologe Genexpression wurde ein pET-Vektorsystem verwendet. Die Transkription des Zielgens erfolgt hierbei durch die T7-RNA-Polymerase nach Induktion der Genexpression durch die Zugabe von IPTG. Die Plasmidkarte des *Em*-OAH Wildtypenzym ist in Abbildung 7 dargestellt. Tabelle 2 präsentiert darüber hinaus eine Übersicht der verwendeten Plasmide.

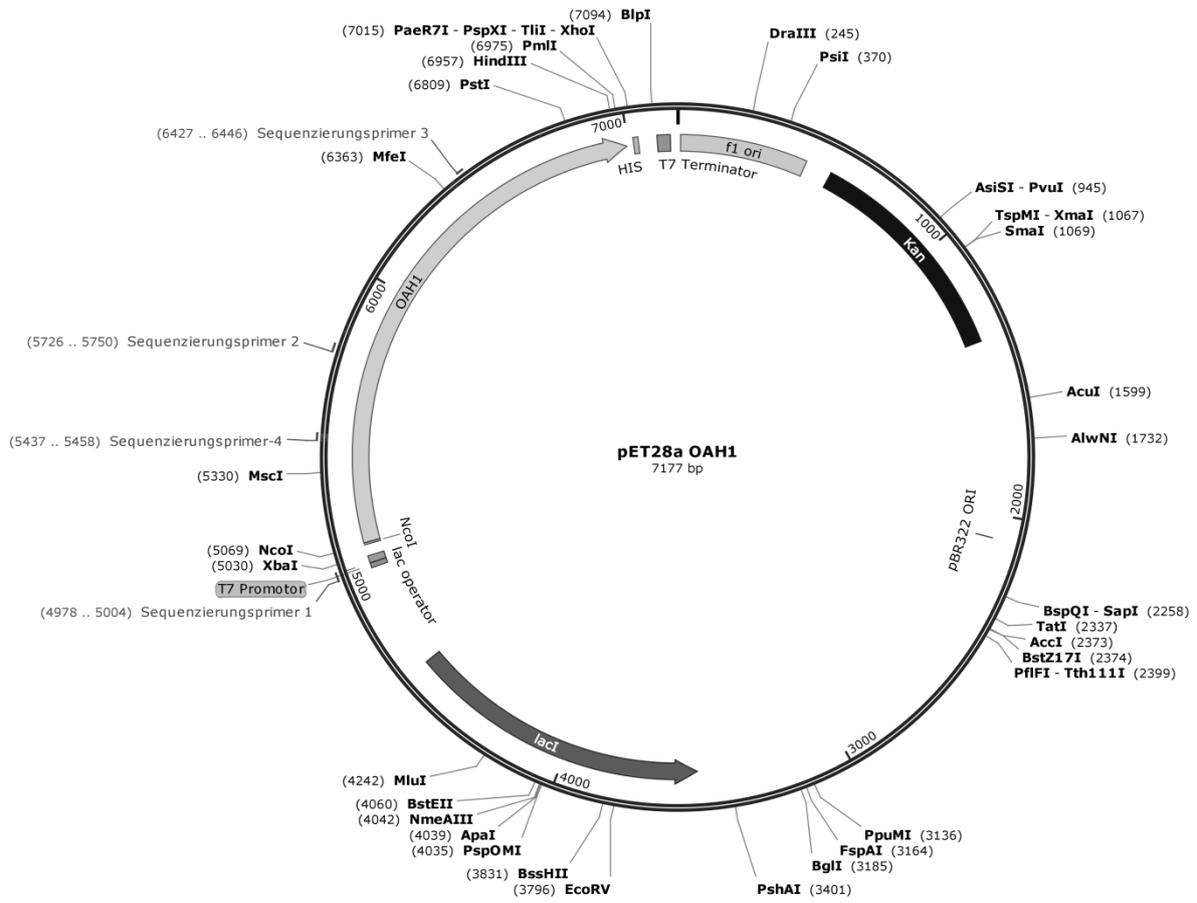


Abbildung 7: Vektorkarte des Plasmids pET28a(+)::Em-OAH

Tabelle 2: Für die Genexpression verwendete pET28a(+) Plasmide

ITB-Nr.	Name	Quelle
pITB1877	pET28a(+)::Em-OAH	Masterarbeit J. Schmid (ITB)
pITB1878	pET28a(+)::Em-OAH-E122M	Bachelorarbeit S. Kleehammer (ITB)
pITB1879	pET28a(+)::Em-OAH-E122S	Masterarbeit A.Hunold (ITB)
pITB1880	pET28a(+)::Em-OAH-E122D	Masterarbeit A.Hunold (ITB)
pITB1881	pET28a(+)::Em-OAH-E122R	Masterarbeit A.Hunold (ITB)
pITB1882	pET28a(+)::Em-OAH-M123L	Bachelorarbeit S. Kleehammer (ITB)
pITB1883	pET28a(+)::Em-OAH-F227L	Diese Arbeit
pITB1884	pET28a(+)::Em-OAH-F227W	Bachelorarbeit S. Kleehammer (ITB)
pITB1885	pET28a(+)::Em-OAH-F227Y	Bachelorarbeit S. Kleehammer (ITB)
pITB1886	pET28a(+)::Em-OAH-Y241C	Masterarbeit A.Hunold (ITB)
pITB1887	pET28a(+)::Em-OAH-Y241H	Masterarbeit A.Hunold (ITB)

pITB1888	pET28a(+):: <i>Em</i> -OAH-A248G	Diese Arbeit
pITB1889	pET28a(+):: <i>Em</i> -OAH-A248V	Diese Arbeit
pITB1890	pET28a(+):: <i>Em</i> -OAH-A248L	Bachelorarbeit S. Kleehammer (ITB)
pITB1891	pET28a(+):: <i>Em</i> -OAH-A248I	Diese Arbeit
pITB1892	pET28a(+):: <i>Em</i> -OAH-A248M	Diese Arbeit
pITB1893	pET28a(+):: <i>Em</i> -OAH-A248F	Diese Arbeit
pITB1894	pET28a(+):: <i>Em</i> -OAH-A248W	Diese Arbeit
pITB1895	pET28a(+):: <i>Em</i> -OAH-A248P	Diese Arbeit
pITB1896	pET28a(+):: <i>Em</i> -OAH-A248S	Diese Arbeit
pITB1897	pET28a(+):: <i>Em</i> -OAH-A248T	Diese Arbeit
pITB1898	pET28a(+):: <i>Em</i> -OAH-A248C	Diese Arbeit
pITB1899	pET28a(+):: <i>Em</i> -OAH-A248Y	Diese Arbeit
pITB1900	pET28a(+):: <i>Em</i> -OAH-A248N	Diese Arbeit
pITB1901	pET28a(+):: <i>Em</i> -OAH-A248Q	Diese Arbeit
pITB1902	pET28a(+):: <i>Em</i> -OAH-A248D	Diese Arbeit
pITB1903	pET28a(+):: <i>Em</i> -OAH-A248E	Bachelorarbeit S. Kleehammer (ITB)
pITB1904	pET28a(+):: <i>Em</i> -OAH-A248K	Diese Arbeit
pITB1905	pET28a(+):: <i>Em</i> -OAH-A248R	Diese Arbeit
pITB1906	pET28a(+):: <i>Em</i> -OAH-A248H	Bachelorarbeit S. Kleehammer (ITB)
pITB1907	pET28a(+):: <i>Em</i> -OAH-N438V	Bachelorarbeit S. Kleehammer (ITB)
pITB1908	pET28a(+):: <i>Em</i> -OAH-N438Q	Bachelorarbeit S. Kleehammer (ITB)
pITB1909	pET28a(+):: <i>Em</i> -OAH-N438H	Bachelorarbeit S. Kleehammer (ITB)
pITB1910	pET28a(+):: <i>Em</i> -OAH-H442L	Masterarbeit A.Hunold (ITB)
pITB1911	pET28a(+):: <i>Em</i> -OAH-H442M	Masterarbeit A.Hunold (ITB)
pITB1912	pET28a(+):: <i>Em</i> -OAH-H442Q	Bachelorarbeit S. Kleehammer (ITB)
pITB1913	pET28a(+):: <i>Em</i> -OAH-H442R	Masterarbeit A.Hunold (ITB)
pITB1914	pET28a(+):: <i>Em</i> -OAH-T511D	Masterarbeit A.Hunold (ITB)
pITB1915	pET28a(+):: <i>Em</i> -OAH-E122M/M123L	Bachelorarbeit S. Kleehammer (ITB)

2.4 Oligonukleotide

Für die QuikChange Mutagenese des pET28a(+):*Em*-OAH Wildtyp-Plasmides wurden degenerierte Primer verwendet (Tabelle 3). Die Analyse der Mutagenese erfolgte mithilfe der Sequenzierungsprimer 1-4. Alle Primer sind in 5′-3′ Richtung angegeben und die gegenüber der Wildtyp-Sequenz ausgetauschten Nukleotide sind in Kleinbuchstaben dargestellt.

Tabelle 3: Für QuikChange Mutagenese und Sequenzierung verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz
rdm-OAH1-F227Y-fw	CCTTTTGGCGTACCATGTaTGCCTTTGAAAATTG
rdm-OAH1-F227Y-rv	CAATTTTCAAAGGCAtACATGGTACGCCAAAAGG
rdm-OAH1-A248G-fw	GCATCGTTTTCTGCATGgCATTGATGGTCTGAATGATC
rdm-OAH1-A248G-rv	GATCATTCAGACCATCAATGcCATGCAGAAAACGATGC
rdm-OAH1-A248V-fw	GCATCGTTTTCTGCATGtgATTGATGGTCTGAATGATC
rdm-OAH1-A248V-rv	GATCATTCAGACCATCAATcaCATGCAGAAAACGATGC
rdm-OAH1-A248I-fw	GCATCGTTTTCTGCATatCATTGATGGTCTGAATGATC
rdm-OAH1-A248I-rv	GATCATTCAGACCATCAATGatATGCAGAAAACGATGC
rdm-OAH1-A248M-fw	GCATCGTTTTCTGCATatgATTGATGGTCTGAATGATC
rdm-OAH1-A248M-rv	GATCATTCAGACCATCAATcatATGCAGAAAACGATGC
rdm-OAH1-A248F-fw	GCATCGTTTTCTGCATttCATTGATGGTCTGAATGATC
rdm-OAH1-A248F-rv	GATCATTCAGACCATCAATGaaATGCAGAAAACGATGC
rdm-OAH1-A248W-fw	GCATCGTTTTCTGCATtggATTGATGGTCTGAATGATC
rdm-OAH1-A248W-rv	GATCATTCAGACCATCAATccaATGCAGAAAACGATGC
rdm-OAH1-A248P-fw	GCATCGTTTTCTGCATcCgATTGATGGTCTGAATGATC
rdm-OAH1-A248P-rv	GATCATTCAGACCATCAATcGgATGCAGAAAACGATGC
rdm-OAH1-A248S-fw	GCATCGTTTTCTGCATtCCATTGATGGTCTGAATGATC
rdm-OAH1-A248S-rv	GATCATTCAGACCATCAATGGaATGCAGAAAACGATGC
rdm-OAH1-A248T-fw	GCATCGTTTTCTGCATaCCATTGATGGTCTGAATGATC
rdm-OAH1-A248T-rv	GATCATTCAGACCATCAATGGtATGCAGAAAACGATGC
rdm-OAH1-A248C-fw	GCATCGTTTTCTGCATtgCATTGATGGTCTGAATGATC
rdm-OAH1-A248C-rv	GATCATTCAGACCATCAATGcaATGCAGAAAACGATGC
rdm-OAH1-A248Y-fw	GCATCGTTTTCTGCATtaCATTGATGGTCTGAATGATC
rdm-OAH1-A248Y-rv	GATCATTCAGACCATCAATGtaATGCAGAAAACGATGC
rdm-OAH1-A248N-fw	GCATCGTTTTCTGCATaaCATTGATGGTCTGAATGATC
rdm-OAH1-A248N-rv	GATCATTCAGACCATCAATGttATGCAGAAAACGATGC
rdm-OAH1-A248Q-fw	GCATCGTTTTCTGCATcagATTGATGGTCTGAATGATC

rdm-OAH1-A248Q-rv	GATCATTCAGACCATCAATctgATGCAGAAAACGATGC
rdm-OAH1-A248D-fw	GCATCGTTTTCTGCATGaCATTGATGGTCTGAATGATC
rdm-OAH1-A248D-rv	GATCATTCAGACCATCAATGtCATGCAGAAAACGATGC
rdm-OAH1-A248K-fw	GCATCGTTTTCTGCATaaaATTGATGGTCTGAATGATC
rdm-OAH1-A248K-rv	GATCATTCAGACCATCAATtttATGCAGAAAACGATGC
rdm-OAH1-A248R-fw	GCATCGTTTTCTGCATcgCATTGATGGTCTGAATGATC
rdm-OAH1-A248R-rv	GATCATTCAGACCATCAATGcgATGCAGAAAACGATGC
Seq.-Primer 1	CGAAATTAATACGACTCACTATAGGGG
Seq.-Primer 2	GCAACTTTTGGACCTTTTGGCGTAC
Seq.-Primer 3	CTGGTTCTGTGGGTTTATGC
Seq.-Primer 4	CGTGAAATGGATATGACCTATG

2.5 Nährmedien & Puffer

Die Sterilisation der Nährmedien erfolgte über einen Zeitraum von 20 min bei einer Temperatur von 121 °C und einem Druck von 2×10^5 Pa. Feste Nährmedien wurden durch Zusatz von 1 % (w/v) Agar entsprechend zur Nährlösung hergestellt. Zur Aufrechterhaltung des Selektionsdruckes wurden die Medien bei Bedarf nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C mit Kanamycin (Tabelle 4) komplementiert.

LB-Medium (Lysogeny broth)

1 % (w/v)	NaCl
1 % (w/v)	Trypton
0,5 % (w/v)	Hefeextrakt

TB-Medium (Terrific Broth)

1,2 % (w/v)	Trypton
2,4 % (w/v)	Hefeextrakt
0,4 % (w/v)	Glycerin

Nach dem Autoklavieren: Zugabe von sterilem TB-Puffer

TB-Puffer (10x)

0,17 M	KH ₂ PO ₄
0,72 M	K ₂ HPO ₄

Spurenelementlösung

0,38 g l ⁻¹	CaCl ₂ x 2 H ₂ O
0,18 g l ⁻¹	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O
0,1 g l ⁻¹	MnSO ₄ x H ₂ O
20,1 g l ⁻¹	Na ₂ -ETDA
16,7 g l ⁻¹	FeCl ₃ x 6 H ₂ O
0,15 g l ⁻¹	CuSO ₄ x 5 H ₂ O
0,18 g l ⁻¹	CoCl ₂ x 6 H ₂ O

Citratpuffer

50 mM Zitronensäure

Der pH-Wert wurde mit Natriumhydroxid auf pH 6 eingestellt.

Eingesetzte Antibiotika

Für die Kultivierung der Expressionsstämme wurde Kanamycin eingesetzt.

Tabelle 4: Kanamycin-Stammlösung und Endkonzentration

Antibiotikum	Stammlösung [mg/ml]	Endkonzentration [µg/ml]
Kanamycin	30 in ddH ₂ O	30

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen

Die *E. coli* Stämme wurden ausgehend von Glycerinkulturen auf LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert. 5 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie inokuliert und üN bei 37 °C und 180 Upm inkubiert. 200 ml LB-Medium (1 l Kolben ohne Schikanen) wurden am darauffolgenden Tag mit einer OD₆₀₀ von 0,04 angeimpft und bei 37 °C und 180 Upm kultiviert. Nach Erreichen einer OD von 0,5-0,7 wurden die Kulturen für 15-30 min auf Eiswasser abgekühlt. Die Zellen wurden in vorgekühlten 50 ml Zentrifugenbechern geerntet (3220 rcf, 10 min, 4 °C) und vorsichtig in 2-5 ml sterilem, eisgekühltem Wasser aufgenommen. Das Volumen wurde auf 50 ml aufgefüllt und die Zellen erneut geerntet. Der Waschschritt wurde einmal wiederholt. Die Pellets wurden anschließend in 50 ml Glycerin (10 %-ig (v/v), eisgekühlt) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die elektrokompetenten Zellen wurden in insgesamt 4 ml Glycerin

aufgenommen, zu je 50 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.6.2 Transformation mittels Elektroporation

50 µl elektrokompente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit ca. 100 ng Plasmid-DNA (Re-Transformation) bzw. 5 µl aufgereinigtem QuikChange PCR-Ansatz versetzt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Als Negativkontrolle diente 1 µl steriles Wasser. Die Elektroporation wurde bei 2,5 V, 200 Ω und 25 µF durchgeführt. Die Zellen wurden in 2 ml LB-Medium aufgenommen und eine Stunde bei 37 °C und 180 Upm regeneriert. 5 µl (Re-Transformation) bzw. 100 µl (nach QuikChange Mutagenese) der Zellsuspension wurden auf LB-Agarplatten mit Kanamycin-Zusatz ausplattiert und üN bei 37 °C inkubiert.

2.6.3 Isolierung von Plasmid-DNA

5 ml LB^{Kan}-Medium wurden ausgehend von einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 Upm inkubiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mithilfe des „ZyppyTM Plasmid Miniprep Kits“ (Zymo Research Corp., Irvine, USA) gemäß der Anleitung des Herstellers. 30 µl lauwarmes MilliQ-Wasser dienten zur Elution.

2.6.4 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

1 µl der isolierten Plasmid-DNA wurde zur Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration bei 260 nm mithilfe des NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, USA) eingesetzt. Das Gerät wurde zuvor mit MilliQ-Wasser justiert.

2.6.5 Sequenzierung

Auftragssequenzierungen erfolgten durch die GATC Biotech AG (Konstanz, Germany). 20 µl Plasmid-DNA (60-100 ng/µl) wurden zur Analyse gegeben und mithilfe ausgewählter Sequenzierungsprimer (20 µl, 10 pmol/µl, Tabelle 3) sequenziert.

2.6.6 QuikChange Mutagenese

Positionsgerichtete Mutagenese erfolgte mithilfe degenerierter Primer (Tabelle 3) und der KOD-Hot Start Polymerase (Merck Millipore, USA) in einem PCR-ähnlichen Verfahren (Mastercycler gradient, Eppendorf AG, Deutschland). Der Reaktionsmix und das Temperaturprogramm sind nachfolgend dargestellt:

MATERIAL UND METHODEN

PCR-Ansatz:	5 µl	KOD-Puffer (10x)
	4,5 µl	25 mM MgSO ₄
	1 µl	Forward-Primer (10 µM)
	1 µl	Reverse-Primer (10 µM)
	5 µl	dNTPs (2 mM each dNTP)
	0,5 µl	pET28a(+):: <i>Em</i> -OAH (200 ng/µl)
	1 µl	KOD-Hot Start Polymerase (200 units)
	ad 50 µl	MilliQ

PCR-Programm:	Zyklus	Temperatur	Zeit
	1	95 °C	2 min
	20	95 °C	30 sec
		50 °C	45 sec
		70 °C	3 min
	1	70 °C	7 min

Die PCR-Ansätze wurden abzentrifugiert und zum Verdau der methylierten Template-DNA mit 1 µl *DpnI* (rekombinant aus *E. coli*, Gen aus *Diplococcus pneumoniae* G41, 10 U/µl, Thermo Scientific, Waltham, USA) versetzt. Nach 1h-Inkubation bei 37 °C wurden 10 µl der Ansätze mittels MilliQ-Dialyse (MFTM-Membrane Filters, 0,025 µm VSWP, Merck Millipore Ltd., Irland) über 30 min aufgereinigt. 5 µl der aufgereinigten Ansätze wurden zur Transformation elektrokompenter *E. coli* Dh5α Zellen eingesetzt. Ausgewählte Klone wurden kultiviert und die Plasmid-DNA wurde isoliert. Die Analyse des Mutagenese-Ergebnisses erfolgte mittels Sequenzierung.

2.6.7 Agarose-Gelelektrophorese

1% (w/v) Agarose wurde in 1x TAE-Puffer gelöst, zur Visualisierung der DNA unter UV-Licht mit PeqGREEN (0,1 µl/ml, Peqlab, Erlangen, Deutschland) versetzt und in die Gelkammer gefüllt. Die DNA-Proben wurden mit 6x Ladepuffer (Thermo Scientific, Waltham, USA) gemischt und in die Geltaschen pipettiert. 5 µl 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, Waltham, USA) dienen als Größenstandard. Die Elektrophorese erfolgte in horizontalen Gelsystemen (PerfectBlue Mini, PeqLab, Erlangen, Germany) mit 1x TAE-Puffer bei einer Spannung von 120 V (Power Pac 300, Bio-Rad, Hercules, USA) über ca. 60

min. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht visualisiert und dokumentiert (Gelimager, Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Germany).

TAE-Puffer (1x, pH 8,3)

40 mM	Tris
20 mM	Essigsäure (konz.)
1,3 mM	EDTA

2.7 Zellkultivierung

2.7.1 Dauerkulturen/Kryokonservierung

5 ml LB-Medium (mit Kanamycin-Zusatz) wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 Upm kultiviert. 1 ml der Zellsuspension wurde 1:1 mit 50 %-iger (v/v) steriler Glycerinlösung versetzt und zur Lagerung bei -80 °C eingefroren.

2.7.2 Heterologe Genexpression

5 ml LB^{Kan}-Medium wurden mit einer Einzelkolonie frisch-transformierter *E. coli* BL21 (DE3) Zellen inokuliert und üN bei 37 °C und 180 Upm kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurden 400 ml TB^{Kan}-Medium (2 l Schikanekolben) mit 800 µl der üN-Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 100 Upm inkubiert. Die Induktion der heterologen Genexpression erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 durch Zugabe von IPTG (0,5 mM finale Konzentration). Nach 20-stündiger Inkubation bei 20 °C und 180 Upm wurden die Zellen geerntet (8000 rcf, 8 min, 4 °C) und einmal in 100 ml Citratpuffer (50 mM, pH 6) gewaschen. Die Zellpellets wurden direkt weiter verwendet bzw. zur Lagerung bei -20 °C eingefroren.

Die heterologe Genexpression im kleinen Maßstab erfolgte in 100 ml TB^{Kan} Medium in 500 ml Erlenmeyerkolben ohne Schikanen. Die Kulturen wurden mit 200 µl der üN-Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 180 Upm inkubiert. Die Induktion der Genexpression und die nachfolgende Kultivierung der Zellen wurden wie oben beschrieben vorgenommen.

2.7.3 Fed-Batch Kultivierung – 5 Liter Maßstab

5 l TB^{Kan}-Medium wurden mit 200 ml einer *E. coli* BL21 (DE3) pET28a(+):*Em-OAH*-Vorkultur zu einer OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 800 Upm mit einer Belüftungsrate von 8 l pro Minute. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von Ammoniumhydroxid (28 % (w/v)) und Phosphorsäure (10 % (v/v)) konstant auf 7,2 gehalten. Die Induktion der heterologen Genexpression erfolgte nach Reduzierung der Kultivierungs-

MATERIAL UND METHODEN

temperatur auf 30 °C durch Zugabe von 0,5 mM IPTG bei einer OD₆₀₀ von 5,5. 25 ml Magnesiumsulfat-Lösung (1 M), 2,5 ml Spurenelementlösung und 150 ml Diammoniumhydrogenphosphat-Lösung (2,5 M) wurden dem Kultivierungsmedium hinzugefügt. 86 %-ige (v/v) Glycerin-Lösung diente als Kohlenstoffquelle mit einer Fütterungsrate von 15 g/h, welche 10 Stunden nach Induktion auf 22 g/h erhöht wurde. Nach 23-stündiger Inkubation wurden die Zellen mit einer finalen OD₆₀₀ von 44 geerntet und die Pellets bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.7.4 Zellaufschluss mittels Ultraschall

Die Expressionskulturen wurden auf Eis aufgetaut und in eisgekühltem Citratpuffer (50 mM, pH 6) resuspendiert (100 mg/ml). Die Zellsuspensionen wurden während des Ultraschall-Aufschlusses (Tabelle 5) kontinuierlich auf Eis gehalten und anschließend bei 16000 rcf und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Die Zellysate wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und die Pellets in Citratpuffer resuspendiert. Die Proteinkonzentration der 1:10 bzw. 1:100 verdünnten Proben wurde mithilfe des BCA-Assays (2.8.1) ermittelt.

Tabelle 5: Parameter für den Zellaufschluss mittels Ultraschall*

Volumen [ml]	Reaktionsgefäß	Duty cycle [%]	Output	Zeit [min]
≥5	50 ml Falcon Tube	35	4	5
2-4	5 ml Reaktionsgefäß	35	3	3
1	1,5 ml Reaktionsgefäß	35	2	1,5

* Sonifier 250 (Branson, Danbury, USA)

2.8 Biochemische Methoden

2.8.1 BCA-Assay

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mithilfe des „Pierce BCA Protein Assay Kits“ (Thermo Scientific, Waltham, USA) gemäß der Anleitung des Herstellers. BSA diente als Vergleichsstandard im Konzentrationsbereich von 2000 µg/ml bis 25 µg/ml.

2.8.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die heterologe Überexpression der Zielgene wurde mithilfe einer SDS-PAGE analysiert. Für die Zellysat- und Pelletproben wurden 10 µg Protein pro *slot* eingesetzt. Bei Zellsuspensionen in Citratpuffer ohne Ultraschallaufschluss wurde das Volumen anhand einer OD-Messung mittels NanoDrop abgeschätzt. Es wurden 12 µl einer Zellsuspension mit einer

OD₆₀₀ von 0,5 aufgetragen. Die Proben wurden 1:5 mit 6x SDS-PAGE-Ladepuffer versetzt und 10 min bei 95 °C aufgeköcht. Nach kurzer Zentrifugation wurden die Proben vollständig in die Taschen des SDS-Gels überführt.

Die Elektrophorese erfolgte in Vorrichtungen der Firma Peqlab (PerfectBlue Dual, Peqlab, Erlangen, Deutschland) gefüllt mit SDS-Laufpuffer bei 15 und 25 mA (Power Pac 300, Bio-Rad, Hercules, USA) im Sammel- bzw. Trenngel. 5 µl PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Waltham, USA) diente als Größenstandard zur Bestimmung des Molekulargewichts (siehe Anhang, Abbildung A 1). Die Gele wurden eine Stunde in Coomassie-Färbelösung inkubiert und nachfolgend bis zur gewünschten Intensität entfärbt.

6x SDS-PAGE-Ladepuffer

350 mM	TRIS/HCl pH 8
600 mM	DTT
30 % (v/v)	Glycerin
10 % (w/v)	SDS
0,12 % (w/v)	Bromphenolblau

SDS-Laufpuffer

25 mM	Tris
200 mM	Glycin
0,1 % (w/v)	SDS

Sammelgel (5 %)		Trenngel (12 %)	
0,33 ml	2,0 ml		30 % Acrylamid/Bis Solution
0,25 ml	-		1 M TRIS/HCl pH 6,8
-	1,3 ml		1,5 M TRIS/HCl pH 8,8
0,02 ml	0,05 ml		10 % (w/v) SDS
1,4 ml	1,6 ml		ddH ₂ O
0,02 ml	0,05 ml		10 % (w/v) APS
0,002 ml	0,002 ml		TEMED

Färbelösung

2,5 g	Coomassie-Brillant-Blau
10 % (v/v)	Essigsäure
20 % (v/v)	Ethanol
70 % (v/v)	ddH ₂ O

Entfärbelösung

10 % (v/v)	Essigsäure
30 % (v/v)	Ethanol
60 % (v/v)	ddH ₂ O

2.9 Biotransformationen

Im Rahmen dieser Dissertation wurden verschiedene Aktivitätsanalysen vorgenommen. Alle Biotransformationen wurden in 50 mM Citratpuffer (pH 6) durchgeführt. In Abhängigkeit des jeweiligen Substrates (Löslichkeit, Membrangängigkeit, Volatilität, Umsatzrate etc.) wurden jedoch unterschiedliche Bedingungen (Reaktionsgefäße, Temperatur, Additive, Phasensysteme etc.) gewählt und je nach Versuchsansatz sowohl ganze Zellen als auch Zelllysate eingesetzt. *E. coli* BL21 (DE3) pET28a(+) Zellsuspensionen bzw. Zelllysate dienten jeweils als Negativkontrolle. Während die Fettsäure-Biotransformationen in 1,5 ml Plastik-Reaktionsgefäßen durchgeführt wurden, wurden für die Alken-Umsätze luftdicht-verschließbare 2 ml GC-Glas-Vials eingesetzt.

2.9.1 Standard/FAD-reduzierende Bedingungen

Biotransformationen wurden im 500 µl Maßstab in 1,5 ml Reaktionsgefäßen unter Verwendung von 50 mg/ml Zellsuspension bzw. 4 mg/ml Protein durchgeführt. Ganzzellbiotransformationen wurden mit 50 mM Glucose komplementiert und 0,2 mM FAD, 5 mM DTT und 5 mM NADH wurden als Additive für die Gewährleistung FAD-reduzierender Bedingungen eingesetzt. Reaktionen wurden durch Substratzugabe (0,5 mM (Z)-Undec-9-ensäure, 1 % (v/v) finale DMSO-Konzentration) gestartet und bei 25 °C und 800 Upm (Thermomixer comfort, Eppendorf, Deutschland) inkubiert. Nach fünf Tagen wurden die Biotransformationen mit 20 µl 1 M HCl gequench und zweimal mit 500 µl Methyl-*tert*-butylether (MTBE) plus internem Standard (100 µM Dodecansäure) extrahiert. Jeweils 300 µl organische Phase (insg. 600 µl) wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und *in vacuo* aufkonzentriert (EZ-2 Plus, GeneVac, Ipswich, England). Die Fettsäuren

wurden in 40 μl *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) mit 1 % Chlortrimethylsilan aufgenommen und 30 min bei 70 °C derivatisiert. Die Analyse der Produktbildung erfolgte mittels GC-FID (2.12.1).

2.9.2 *Design of experiments – (DoE)*

Die Optimierung der Reaktionsbedingungen für die Umsetzung von (*Z*)-Undec-9-ensäure erfolgte mittels statistischer Versuchsplanung unter Verwendung von MODDE (Version 11; MKS Umetrics AB, Schweden). Alle Biotransformationen wurden als Ganzzellansätze (50 mg/ml) im 500 μl Maßstab in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die Zusammensetzung der Ansätze erfolgte durch MODDE gemäß des gewählten Interaktionsmodells (FracFac Res V+, Full Fac (2 Level)). Bis zu fünf Bedingungen wurden zeitgleich in vier Optimierungsrounden analysiert (Tabelle 6). Die folgenden Komponenten und Konzentrationen wurden getestet: Glucose (0-100 mM), NaCl (0-100 mM), FAD (0-0,5 mM), DTT (0-5 mM), NADH (0-5 mM), Glutathion (0-5 mM) und BSA (0-0,5 mg/ml). Glucose-, NADH-, FAD-, DTT- und Glutathion-Konzentrationen wurden in der ersten Runde analysiert. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurde Glutathion nachfolgend nicht mehr berücksichtigt und die Glucosekonzentration auf 100 mM festgesetzt, während die Parameter NADH, FAD und DTT einer zweiten Optimierungsrunde unterzogen wurden. In einem dritten Versuch wurde der Einfluss des DTTs bei konstanter Glucose-, NADH- und FAD-Konzentration analysiert. Alle vier Parameter wurden in einer letzten Optimierungsrunde festgesetzt, in welcher die Bedeutung verschiedener NaCl- und BSA-Konzentrationen auf die Enzymaktivität bei 25 °C, 30 °C und 37 °C ermittelt wurde. Die Biotransformationen wurden durch Substratzugabe (0,5 mM (*Z*)-Undec-9-ensäure, 1 % (v/v) finale DMSO-Konzentration) gestartet und nach 28-stündiger Inkubation bei 800 Upm (Thermomixer comfort, Eppendorf, Deutschland) wie oben beschrieben (2.9.1) aufbereitet. Substratumsatz und Produktbildung wurden mittels GC (2.12.1) analysiert und das Ergebnis der einzelnen Optimierungsrounden über die MODDE Software ausgewertet.

Tabelle 6: Übersicht der vier Optimierungsrounden

Opt.-Runde	Interakt.-Modell	Glucose [mM]	NADH [mM]	FAD [mM]	DTT [mM]	Glutathion [mM]	NaCl [mM]	BSA [mg/ml]	Temp. [°C]
I	FracFac Res V+	0-100	0-5	0-0,5	0-5	0-5			
II	Full Fac (2 levels)	100	0-5	0-0,5	0-5				
III	/	100	3	0,3	0-5				
IV	Full Fac (2 levels)	100	3	0,3	2		0-100	0-0,5	25-37

2.9.3 (Z)-Undec-9-ensäure-Umsetzung – 1 Liter Maßstab

Die Umsetzung von (Z)-Undec-9-ensäure im 1 Liter Maßstab erfolgte in einer 2 l Schottflasche bei optimierten Bedingungen (50 mg/ml Biofeuchtmasse, 100 mM Glucose, 0,3 mM FAD und 3 mM NADH) unter Verwendung von 200 mg Fettsäure-Substrat (1 mM (Z)-Undec-9-ensäure, 1 % (v/v) finale DMSO-Konzentration). Nach zwei- und dreitägiger Inkubation bei 30 °C und 180 Upm wurden 500 µl Proben zur Überprüfung der Produktbildung entnommen und wie oben beschrieben (2.9.1) für die GC-Analyse aufbereitet. Nach drei Tagen wurde der Ansatz mit 40 ml 5 M HCl abgestoppt und mit einem äquivalenten Volumen MTBE extrahiert. Die organische Phase wurde in einen Rundkolben überführt. Die wässrige Phase wurde drei weitere Male mit jeweils 600 ml MTBE extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereint, *in vacuo* aufkonzentriert und bei 4 °C gelagert.

Das Extrakt wurde in der mobilen Phase (98 Anteile Dichlormethan mit zwei Anteilen Methanol und ein Anteil Essigsäure als Additiv) gelöst und mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (40 cm Länge, 5 cm Durchmesser, 300 g Silicagel 60). Die einzelnen Fraktionen wurden über Dünnschichtchromatographie (pre-coated TLC-sheets ALUGRAM® Xtra SIL G/UV₂₅₄; 0,2 mm, Silicagel 60) analysiert. Die DC-Platten wurden in Phosphormolybdänsäure-Hydrat (5 g in 50 ml Ethanol) gefärbt und durch nachfolgendes Erhitzen entwickelt. Darüber hinaus wurde von jeder Fraktion eine Probe aufbereitet (2.9.1) und mittels GC-MS (2.12.1) analysiert. Die Produktfraktionen wurden vereint und *in vacuo* aufkonzentriert. Es wurden 132 mg eines hellbraunen Pulvers mit einer Reinheit von >95 % als Produkt erhalten ($Y_{P/S} = 66 \%$, $Y_{P/B} = 0,0024$). 10 mg der extrahierten und gereinigten 10-Hydroxyundecansäure wurden in 600 µl deuteriertem Chloroform (CDCl₃) gelöst und zur NMR-Analyse gegeben (¹H, ¹³C). Die Auswertung der NMR-Ergebnisse (siehe Anhang, Abbildung A 10) erfolgte mittels TopSpin 3.0 (Bruker BioSpin GmbH, Deutschland).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.18$ (s, 1H, 11-H), 1.19 (s, 2H, 11-H), 1.30-1.47 (m, 12H, 4-H, 5-H, 6-H, 7-H, 8-H, 9-H), 1.60-1.66 (m, 2H, 3-H), 2.34 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, 2-H), 3.77-3.83 (sext, $J = 6$ Hz, 1H, 10-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 23.4, 24.7, 25.7, 29, 29.1, 29.3, 29.5, 34, 39, 68, 179$ ppm.

2.9.4 1-Decen-Umsetzung unter optimierten Bedingungen

1-Decen-Biotransformationen wurden im 500 μl Maßstab in 2 ml Glas-Vials unter Verwendung von 50 mg/ml Zellsuspension bzw. 3,8 mg/ml Protein durchgeführt. 100 mM Glucose, 0,3 mM FAD, 3 mM NADH und 2 mM DTT wurden zur detaillierten Analyse der MODDE-optimierten Reaktionsbedingungen eingesetzt. Der direkte Vergleich von Ganzzellansätzen und Zellysate-Assays bei optimierten und nicht-optimierten Bedingungen erfolgte nur unter Zugabe von 100 mM Glucose und 0,3 mM FAD. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Substrat und Dummy-Substrat (0,5 mM 1-Decen bzw. 0,5 mM Hexansäure, 1 % (v/v) finale DMSO-Konzentration) gestartet und bei 25 °C und 180 Upm inkubiert. Die Ansätze wurden mit 20 μl 1 M NaOH abgestoppt und zweimal mit 500 μl MTBE plus internem Standard (500 μM 1-Octanol) extrahiert. Jeweils 300 μl organische Phase (insg. 600 μl) wurden in ein GC-Vial überführt bzw. mit Essigsäureanhydrid derivatisiert (2.12.3) und mittels (chiraler) GC-FID/GC-MS analysiert.

2.9.5 Molares Verhältnis von Substrat zu Dummy-Substrat

Die Biotransformationen wurden im 500 μl Maßstab in 2 ml Glas-Vials mit 50 mg/ml Biofeuchtmasse, 100 mM Glucose und 0,3 mM FAD durchgeführt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Substrat (0,5 mM) und Dummy-Substrat (0; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5 mM) mit 1 % (v/v) finaler DMSO-Konzentration gestartet. Nach dreitägiger Inkubation bei 25 °C und 180 Upm wurden die Biotransformationen mit 20 μl 1 M HCl gequenchet und mit 800 μl MTBE plus internem Standard (500 μM 1-Octanol) extrahiert. 600 μl organische Phase dienten zur Analyse der Produktbildung mittels GC-FID (2.12.3).

2.9.6 Präinkubationsversuche

Die Präinkubationsversuche wurden in gasdichten GC-*Headspace* Vials im 10 ml Maßstab unter optimierten Bedingungen (50 mg/ml Biofeuchtmasse, 100 mM Glucose, 0,3 mM FAD) durchgeführt. Um die Vergleichbarkeit bezüglich des Transports von Substrat bzw. Dummy-Substrat zu erhöhen und eine schnelle Aufnahme der Substanzen zu gewährleisten, wurden die Zellen mittels Ultraschall permeabilisiert (2.7.4). Der Rohextrakt wurde ohne

Zentrifugationsschritt direkt für die Biotransformationen eingesetzt. Es wurden drei Ansätze vorgenommen:

1. Zugabe von 0,5 mM 1-Decen (Substrat)
2. Zugabe von 0,5 mM Hexansäure (Dummy-Substrat)
3. Keine Zugabe von Substrat- und Dummy-Substrat.

Die verschiedenen Ansätze wurden 24 Stunden bei 25 °C und 180 Upm präinkubiert, bevor die Reaktionen über eine Spritze durch das Septum der Vial-Deckel mit Substrat, Dummy-Substrat bzw. beiden Komponenten komplementiert wurden (1 % (v/v) finale DMSO-Konzentration). Bei dem dritten Ansatz handelte es sich somit um die Kontrolle mit gleichzeitiger Substrat- und Dummy-Substrat Zugabe. Nach 0, 15, 30, 60 und 120 Minuten Inkubation (25 °C und 180 Upm) erfolgte die Probenahme mithilfe einer Spritze ebenfalls durch das Septum der Vial-Deckel. Die Proben (Triplikate, je 500 µl) wurden mit 20 µl HCl versetzt und mit 800 µl MTBE plus internem Standard (500 µM 1-Octanol) extrahiert. 600 µl organische Phase dienten zur Analyse der Produktbildung mittels GC-FID (2.12.3).

2.9.7 Biochemische Analyse zur Umsetzung von 1-Decen

Die Analyse der scheinbaren maximalen Reaktionsgeschwindigkeit ($V_{\max(\text{app})}$) und der scheinbaren Substrataffinität ($K_{\text{m}(\text{app})}$) erfolgte für 1-Decen Konzentrationen zwischen 0,125 mM und 2,5 mM (5-100 mM DMSO Stocklösungen) und einer jeweils äquimolaren Konzentration des Dummy-Substrates Hexansäure (25-500 mM DMSO Stocklösungen). Aufgrund der geringen Löslichkeit von 1-Decen in DMSO wurden 3 % (v/v) finale DMSO-Konzentration eingesetzt. Die Biotransformationen wurden wie oben beschrieben (2.9.5) durchgeführt und nach 16 Stunden Inkubation für die GC-Analyse (2.12.3) aufbereitet.

2.9.8 Alternative Dummy-Substrate

1-Decen Biotransformationen mit alternativen Dummy-Substraten wurden wie oben beschrieben (2.9.5) durchgeführt. Substrat und Dummy-Substrat-Stocklösungen (100 mM) wurden in DMSO angesetzt, mit Ausnahme von 6-Aminohexansäure und 1,6-Hexandiol, welche in Puffer gelöst wurden. Die Reaktionen wurden durch Substrat- und Dummy-Substrat-Zugabe (je 0,5 mM finale Konzentration) mit 1 % (v/v) finaler DMSO-Konzentration gestartet. Nach zweitägiger Inkubation wurden die Ansätze wie oben beschrieben (2.9.5) aufbereitet und mittels GC (2.12.3) analysiert.

2.9.9 1-Octen- und 1-Dodecen-Umsetzung

1-Octen und 1-Dodecen Biotransformationen wurden wie oben beschriebenen (2.9.5) unter 1-Decen optimierten Bedingungen durchgeführt (500 µl Maßstab, 2 ml Glas-Vials, 50 mg/ml Biofeuchtmasse, 100 mM Glucose, 0,3 mM FAD). Aufgrund der geringen Löslichkeit von 1-Dodecen in DMSO wurde eine 100 mM Stocklösung in Ethanol hergestellt, sodass in diesem Ansatz eine finale DMSO- bzw. Ethanol-Konzentration von 0,5 % (v/v) vorlag. Hexansäure und Heptansäure (jeweils 100 mM DMSO-Stocklösungen) dienten als Dummy-Substrat. Nach vier Tagen Inkubation bei 25 °C und 180 Upm wurden die Ansätze wie oben beschrieben (2.9.5) aufbereitet und mittels GC-FID (2.12.3) analysiert.

2.9.10 Substratspektrum der *Em*-OAH Varianten

Fettsäure-Biotransformationen (Ölsäure, Palmitinsäure, Myristoleinsäure, (*Z*)-Undec-9-ensäure, Dec-9-ensäure) und Alken-Biotransformationen (1-Decen, 1-Octen) wurden im 500 µl Maßstab in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bzw. 2 ml Glas-Vials durchgeführt. Die Assay-Bedingungen für die jeweiligen Substrate sind in Tabelle 7 dargestellt. Die Reaktionen wurden durch Substratzugabe (0,5 mM, 1 % (v/v) finale DMSO Konzentration) gestartet. Für die Alkene wurde Heptansäure als Dummy-Substrat eingesetzt. Nach erfolgter Inkubation wurden die Ansätze mit 20 µl 1 M HCl abgestoppt und mit 800 µl MTBE plus internem Standard (Tabelle 9, Tabelle 12) extrahiert. Für die Fettsäure-Derivatisierung wurden 600 µl organische Phase *in vacuo* aufkonzentriert, wie oben beschrieben (2.9.1) derivatisiert und mittels GC (2.12.1) analysiert. Für die Auswertung der Alken-Biotransformationen wurden 600 µl organische Phase direkt per GC vermessen bzw. zur Analyse der Stereoselektivität zuvor mit Essigsäureanhydrid derivatisiert (2.12.3).

Tabelle 7: Reaktionsbedingungen für die Fettsäure- und Alken-Hydratisierung durch das *Em*-OAH Wildtypenzym und die generierten Mutanten

Substrat*	<i>Em</i> -OAH	Additive**	Temperatur & Schüttelfrequenz	Inkubationszeit
Ölsäure	0,15 mg/ml Lysat	/	Raumtemperatur	2,5 min
Palmitinsäure	0,15 mg/ml Lysat	/	Raumtemperatur	5 min
Myristoleinsäure	50 mg/ml GZBT	Glucose	30 °C & 800 Upm	1 h
(<i>Z</i>)-Undec-9-ensäure	50 mg/ml GZBT	Glucose, FAD & NADH	30 °C & 800 Upm	1 d
Dec-9-ensäure	50 mg/ml GZBT	Glucose, FAD & NADH	30 °C & 800 Upm	4 d
1-Decen + Dummy	50 mg/ml GZBT	Glucose & FAD	25 °C & 180 Upm	2 d
1-Octen + Dummy	50 mg/ml GZBT	Glucose & FAD	25 °C & 180 Upm	3 d

* 100 mM bzw. 50 mM Stocklösungen in DMSO (1% (v/v) finale DMSO-Konz.)

** 100 mM Glucose, 3 mM NADH, 0,3 mM FAD

2.9.11 Zweiphasensystem für die Umsetzung flüchtiger Alkene (C7-C5)

Für die Analyse der 1-Hepten, 1-Hexen und 1-Penten Hydratisierung mithilfe eines Zweiphasensystems wurden die Zellpellets der Expressionskulturen nicht eingefroren sondern direkt weiter verwendet. Biotransformationen wurden im 500 µl Maßstab in 2 ml Glas-Vials mit 100 mg/ml Biofeuchtmasse, 200 mM Glucose, 0,6 mM FAD und 100 µl Bis(2-ethylhexyl)phthalat (BEHP) als organische Phase durchgeführt. Substrat (300 mM Alkene) und Dummy-Substrat (5 mM Heptansäure) wurden direkt ohne DMSO als Cosolvens hinzugegeben. Nach erfolgter Inkubation bei 25 °C und 180 Upm wurden die Reaktionen mit 800 µl MTBE plus internem Standard (Tabelle 12) extrahiert. 600 µl der organischen Phase wurden direkt für die GC Analyse weiter verwendet (2.12.4) oder aber zur Analyse der Stereoselektivität zuvor mit Essigsäureanhydrid derivatisiert (2.12.3).

2.9.12 Optimierte Reaktionsbedingungen für die Umsetzung flüchtiger Alkene (C7-C5)

Biotransformationen mit flüchtigen Alkenen (Hepten, Hexen und Penten) wurden unter optimierten Reaktionsbedingungen im 2 ml Maßstab in 2 ml Glas Vials mit 100 mg/ml Biofeuchtmasse, 200 mM Glucose, 0,6 mM FAD, 30 mM Substrat und 10 mM Dummy-Substrat ohne Verwendung von DMSO als Cosolvens durchgeführt. Die Reaktionsgefäße wurden waagrecht liegend bei 25 °C und 180 Upm inkubiert. Je 500 µl der Ansätze wurden nach erfolgter Inkubation mit 800 µl MTBE plus internem Standard (Tabelle 11) extrahiert.

600 µl der organischen Phase wurden direkt mittels GC-FID analysiert (2.12.4) oder zuvor mit Essigsäureanhydrid derivatisiert (2.12.5).

2.9.13 Hydratisierung subterminaler Alkene mit verschiedenen Dummy-Substraten

Die Hydratisierung der subterminalen Alkene *cis-/trans*-2-Hexen und *cis-/trans*-2-Penten erfolgte mithilfe des oben beschriebenen Zweiphasensystems (2.9.11). Heptansäure, Hexansäure, Pentansäure bzw. Butansäure (jeweils 5 mM) dienten als Fettsäure-Dummy-Substrate und wurden direkt zum Reaktionsansatz gegeben (kein DMSO als Cosolvens). Zur Verifizierung der *cis*-2-Hexen-Hydratisierung wurden darüber hinaus unter Verwendung von Pentansäure drei verschiedene Substratkonzentrationen getestet (0,3-1 M). Die Biotransformationen wurden mit 800 µl MTBE plus internem Standard (Tabelle 11) extrahiert und die Analyse der Produktbildung erfolgte mittels GC-FID (2.12.4) und GC-MS (2.12.6).

2.9.14 Hydratisierung des C4-Alkens Butadien

Die Experimente zur enzymatischen Hydratisierung des C4-Derivates 1,3-Butadien erfolgten unter Verwendung des oben beschriebenen Zweiphasensystems (2.9.11). Das Heptansäure- bzw. Hexansäure-Dummy-Substrat wurde mit einer Konzentration von 5 mM direkt, ohne DMSO als Cosolvens, zu den Reaktionsansätzen gegeben. Als Substrat diente eine 1,3-Butadienlösung (20 Gew.-% in Toluol) und getestet wurden Substratkonzentrationen von 60 bzw. 300 mM. Die Biotransformationen wurden mit 800 µl Cyclohexan plus internem Standard (500 µM 1-Pentanol) extrahiert und die Analyse der Produktbildung erfolgte mithilfe eines GC-MS-Systems (2.12.6).

2.9.15 Dehydratisierung kurzkettiger, sekundärer Alkohole (C6-C4)

Die Biotransformationen zur Dehydratisierung der sekundären Alkohole (*S*)-2-Hexanol, *rac*-2-Pentanol und *rac*-3-Buten-2-ol erfolgten unter Verwendung verschiedener Zweiphasensysteme mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen (Tabelle 8). Hexansäure diente als Dummy-Substrat (DS). Nach erfolgter Inkubation wurden die Ansätze 1 und 2 mit 800 µl Cyclohexan (CH) und internem Standard (Tabelle 13) extrahiert. Die Ansätze 3 und 4 wurden direkt mittels GC-MS (2.12.6) analysiert.

Tabelle 8: Reaktionsbedingungen für die enzymatische Dehydratisierung sekundärer Alkohole

Ansatz	Reaktions-Vol.	Lösemittel	[Substrat] & [DS]
1	500 µl	100 µl BEHP	1 mM
2	500 µl	100 µl BEHP	5 mM
3	500 µl	100 µl BEHP mit 900 µl CH	10 mM
4	1000 µl	900 µl CH	10 mM

2.10 Umsetzung terminal-ungesättigter Alkene im 250 bzw. 500 ml Maßstab

Für die Hydratisierung der Alkene 1-Decen und 1-Octen im 250 bzw. 500 ml Maßstab wurden das *Em*-OAH Wildtypenzym bzw. die A248L-Variante ausgewählt. Um einen guten Kompromiss zwischen hoher Umsatzrate und ausreichender Produktkonzentration zu finden, wurden in einem Vorversuch Substratkonzentrationen von 0,5 mM bis 4 mM bei einem DMSO-Anteil von 1 % (v/v) bis 8 % (v/v) analysiert. Angewendet wurden die bereits optimierten Reaktionsbedingungen (2.9.12) ohne Verwendung eines organischen Lösemittels als zweite Phase (100 mg/ml Biofeuchtmasse, 200 mM Glucose, 0,6 mM FAD). Nach viertägiger Inkubation bei 25 °C und 180 Upm wurden die Biotransformationen mit MTBE und internem Standard (500 µM 1-Octanol bzw. 1-Decanol) extrahiert und die Produktbildung wurde mittels GC-FID quantifiziert (2.12.3 & 2.12.4). Die Auswahl der jeweils geeigneten Substrat-Konzentration erfolgte anhand der erhaltenen Ergebnisse.

2.10.1 1-Decen-Hydratisierung im 250 ml Maßstab

Die Umsetzung des Alkens 1-Decen durch das *Em*-OAH Wildtypenzym erfolgte im 250 ml Maßstab in einem 250 ml Rundkolben mit 100 mg/ml Biofeuchtmasse, 200 mM Glucose und 0,6 mM FAD. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Substrat (2 mM 1-Decen) und Dummy-Substrat (2 mM Heptansäure) bei einer finalen DMSO-Konzentration von 4 % (v/v) gestartet. Nach sechstägiger Inkubation bei 25 °C unter langsamem Rühren wurde der Ansatz zweimal mit 200 ml MTBE extrahiert. Die beiden Fraktionen wurden vereint, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und *in vacuo* aufkonzentriert.

Das Extrakt (280 mg) wurde in 10:1 Cyclohexan/Essigsäureethylester (CH/EA) gelöst und mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (30 cm Länge, 2,5 cm Durchmesser, 28 g Silicagel 60). Als mobile Phase diente ein 5:1 Gemisch aus CH/EA. Die einzelnen Fraktionen wurden über Dünnschichtchromatographie (2:1 CH/EA; Produkt-R_f = 0,49; pre-coated TLC-sheets ALUGRAM[®]Xtra SIL G/UV₂₅₄; 0,2 mm, Silicagel 60) analysiert. Die DC-Platten

wurden in Phosphormolybdänsäure-Hydrat (5 g in 50 ml Ethanol) gefärbt und durch nachfolgendes Erhitzen entwickelt. Die Produktfraktionen wurden vereint und *in vacuo* aufkonzentriert (75 mg). Aufgrund einer im Rahmen der DC-Analyse sichtbaren Verunreinigung wurde die Säulenchromatographie wie oben beschrieben wiederholt (20 cm Länge, 1,5 cm Durchmesser, 7,5 g Silicagel 60). Es wurden 51 mg eines gelblichen Öls erhalten. 10 mg des extrahierten und gereinigten Produktes wurden in 600 µl deuteriertem Chloroform (CDCl₃) gelöst und zur NMR-Analyse gegeben (¹H, ¹³C). Die Auswertung der NMR-Spektren zeigte, dass immer noch Reste einer Verunreinigung (vermutlich Heptansäure) vorlagen. Aus diesem Grund wurde das Extrakt in 20 ml CH/EA (5:1) aufgenommen, viermal mit dem gleichen Volumen einer gesättigten NaHCO₃-Lösung und abschließend mit Wasser extrahiert. Der Erfolg der Aufreinigung wurde mittels DC analysiert. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und *in vacuo* aufkonzentriert (35 mg). 10 mg des Extraktes wurden in 600 µl deuteriertem Chloroform (CDCl₃) gelöst und erneut mittels NMR analysiert (¹H, ¹³C). Die Auswertung der NMR-Ergebnisse (siehe Anhang, Abbildung A 2) erfolgte mittels MestreNova (Mnova, Mestrelab Research). Für die Überprüfung der Stereoselektivität wurden 0,5 µl des gereinigten Produktes in 600 µl MTBE gelöst und für eine chirale GC-Analyse mit Essigsäureanhydrid derivatisiert (2.12.5).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 0.88 (t, ³J_{H-H} = 6.6 Hz, 3H), 1.19 (d, J_{H-H} = 6.2 Hz, 3H), 1.28 – 1.44 (m, 15H), 3.80 (m, 1H) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 14.26, 22.82, 23.64, 25.93, 29.42, 29.74, 29.81, 32.03, 39.54, 68.37 ppm.

2.10.2 1-Octen-Hydratisierung im 500 ml Maßstab

Die Umsetzung des Alkens 1-Octen durch die *Em*-OAH Variante A248L erfolgte im 500 ml Maßstab in einem 500 ml Rundkolben mit 100 mg/ml Biofeuchtmasse, 200 mM Glucose und 0,6 mM FAD. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Substrat (1 mM 1-Octen) und Dummy-Substrat (1 mM Hexansäure) bei einer finalen DMSO-Konzentration von 2 % (v/v) gestartet. Nach sechstägiger Inkubation bei 25 °C unter langsamem Rühren wurde der Ansatz dreimal mit 400 ml MTBE extrahiert. Die organischen Fraktionen wurden vereint, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und *in vacuo* aufkonzentriert. Das Extrakt (532 mg) wurde direkt in DCM/MeOH (98:2) gelöst und zweimal mithilfe einer Flash-Chromatographie aufgereinigt (20 cm Länge, 1 cm Durchmesser, 2,5 g Aluminiumoxid; 98:2 DCM/MeOH). Die organische

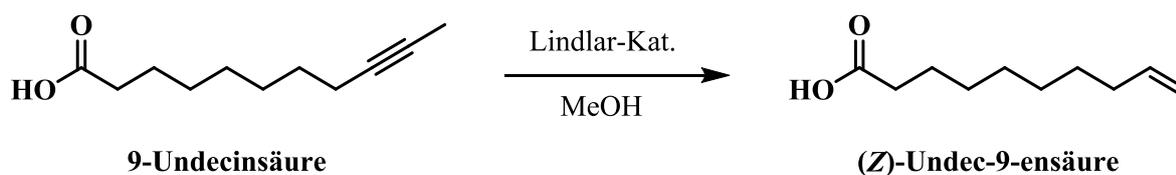
Phase wurde *in vacuo* aufkonzentriert (200 mg), in CH/EA (10:1) gelöst und nachfolgend mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (30 cm Länge, 2 cm Durchmesser, 20 g Silicagel 60; 6:1 CH/EA). Die einzelnen Fraktionen wurden über Dünnschichtchromatographie (2:1 CH/EA; Produkt- $R_f = 0,55$; pre-coated TLC-sheets ALUGRAM[®]Xtra SIL G/UV₂₅₄; 0,2 mm, Silicagel 60) analysiert. Die DC-Platten wurden in Phosphormolybdänsäure-Hydrat (5 g in 50 ml Ethanol) gefärbt und durch nachfolgendes Erhitzen entwickelt. Die Produktfraktionen wurden vereint (ca. 100 ml) und einmal mit 40 ml einer gesättigten NaHCO₃-Lösung und abschließend mit Wasser extrahiert. Die organische Phase wurde im Anschluss an die basische/wässrige Extraktion über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und *in vacuo* aufkonzentriert. Es wurden 30 mg eines gelblichen Öls erhalten. 10 mg des extrahierten und gereinigten Produktes wurden in 600 µl deuteriertem Chloroform (CDCl₃) gelöst und zur NMR-Analyse gegeben (¹H, ¹³C). Die Auswertung der NMR-Spektren zeigte, dass immer noch Reste einer Verunreinigung vorlagen. Aus diesem Grund wurde das Extrakt erneut mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (20 cm Länge, 1 cm Durchmesser, 3 g Silicagel 60; 5:1 *n*-Hexan/EA). Die einzelnen Fraktionen wurden wie oben beschrieben mittels DC analysiert. Produktfraktionen wurden vereint und *in vacuo* aufkonzentriert (14 mg). 10 mg des Extraktes wurden in 600 µl CDCl₃ gelöst und mittels NMR analysiert (¹H, ¹³C). Die Auswertung der NMR-Ergebnisse (siehe Anhang, Abbildung A 3) erfolgte mittels MestreNova (Mnova, Mestrelab Research). Für die Überprüfung der Stereoselektivität wurden 0,5 µl des gereinigten Produktes in 600 µl MTBE gelöst und für eine chirale GC-Analyse mit Essigsäureanhydrid derivatisiert (2.12.5).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.88$ (t, ³ $J_{H-H} = 6.6$ Hz, 3H), 1.18 (d, $J_{H-H} = 6.2$ Hz, 3H), 1.24 – 1.37 (m, 11H), 3.79 (m, 1H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): $\delta = 14.22, 22.76, 23.62, 25.88, 29.46, 31.96, 39.53, 68.36$.

2.11 Chemische Methoden

2.11.1 Chemische Synthese der C11-Fettsäure (Z)-Undec-9-ensäure



Für die Hydrierung des Alkins 9-Undecinsäure wurde ein modifizierter Katalysator, ein sogenannter Lindlar-Katalysator, eingesetzt. Statt mit einer Platin- oder Palladium-Aktivkohle-Suspension erfolgt die Hydrierung hierbei mithilfe eines auf Calciumcarbonat niedergeschlagenen Palladiums, welches mit Bleiacetat und Chinolin behandelt wurde. Dieses System bietet infolge der weniger aktiven Konfiguration der Metalloberfläche den Vorteil, dass nur eine π -Bindung hydriert wird. Da die Hydrierung stereoselektiv *syn* verläuft, handelt es sich um eine Methode zur selektiven Synthese von *cis*-Alkenen.¹

60 mg Lindlar-Katalysator wurden zu 480 mg 9-Undecinsäure (2,64 mmol) gegeben und in einem trockenen 50 ml Schlenkkolben in 15 ml trockenem Methanol (3 Å Molekularsieb) gelöst. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gerührt und die Atmosphäre mittels zehnmalem Fluten und Evakuieren mit Wasserstoffgas gesättigt. Der Kolben wurde mit Septen verschlossen und die Reaktion 20 Stunden gerührt. Über einen Wasserstoff-gefüllten Ballon wurde eine kontinuierliche Wasserstoffzufuhr in die Lösung gewährleistet. Die Überprüfung der Produktbildung erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (pre-coated TLC-sheets ALUGRAM[®]Xtra SIL G/UV₂₅₄; 0,2 mm, Silicagel 60) unter Verwendung eines Cyclohexan-Ethylacetat-Gemisches (1:1, Substrat-R_f = 0,5; Produkt-R_f = 0,68). Die Platten wurden in einer Vanillin-Schwefelsäurelösung (0,3 g Vanillin, 25 ml Ethanol, 30 ml ddH₂O, 4 ml konz. Schwefelsäure) gefärbt und durch nachfolgendes Erhitzen entwickelt. Nach Ablauf der Reaktion wurde das Gemisch über Celite filtriert, mit Methanol gewaschen und *in vacuo* aufkonzentriert. Das resultierende gelbliche Öl wurde über eine Säulenchromatographie (30 cm Länge, 2,5 cm Durchmesser, 60 g Silicagel 60) mithilfe eines 5:1 Gemisches aus Cyclohexan und MTBE aufgereinigt. Fraktionen mit einem deutlichen Produktpot (Analyse per DC) wurden vereint und erneut *in vacuo* aufkonzentriert. 10 mg des aufgereinigten Produktes wurden in 600 µl deuteriertem Chloroform (CDCl₃) gelöst und zur NMR-Analyse gegeben (¹H, ¹³C). Die Auswertung der NMR-Ergebnisse (siehe Anhang, Abbildung A 4) erfolgte mittels TopSpin 3.0 (Bruker BioSpin GmbH, Deutschland). Es wurden 394 mg farbloses, öliges (*Z*)-Undec-9-ensäure-Produkt mit einer Reinheit von >95 % erhalten (2,14 mmol, 81 % Ausbeute).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1.32-1.35 (m, 8H, 4-H, 5-H, 6-H, 7-H), 1.60 (d, J = 6.3 Hz, 3H, 11-H), 1.62-1.65 (m, 2H, 3-H), 2.00-2.04 (m, 2H, 8-H), 2.35 (t, J = 7.5 Hz, 2H, 2-H), 5.36-5.40 (m, 2H, 9-H, 10-H) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 12.8, 24.7, 26.8, 29.0, 29.0, 29.1, 29.5, 33.9, 123.7, 130.8, 179.6 ppm.

2.11.2 Mosher-Ester Analyse

25 mg (0,125 mmol) der aufgereinigten 10-Hydroxyundecansäure (2.9.3) wurden für die Derivatisierung der freien Carboxylgruppe in 1 ml Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH, 0,25 M in Methanol) gelöst. Nach einer Stunde Inkubation bei 40 °C und 800 Upm (Thermomixer comfort, Eppendorf, Deutschland) wurde der TMSH-Überschuss durch Zugabe von 5 µl Ameisensäure (>98 %, 46 g/mol, ~ 0,125 mmol) und 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und 300 Upm entfernt. Die Lösung wurde in einen 5 ml Spitzkolben überführt und flüchtige Komponenten wurden mithilfe des Rotationsverdampfers abgedampft.

Die Stereoselektivität der (Z)-Undec-9-ensäure-Hydratisierung (2.9.3) wurde über ein modifiziertes Protokoll der Mosher-Ester-Analyse von Hoyer *et al.*¹¹⁵ evaluiert. 5 mg des TMSH-derivatisierten Produktes (~ 0,025 mmol) wurden in einem 2 ml Glas-Vial in 1 ml deuteriertem Chloroform (Natriumsulfat getrocknet) gelöst, mit 40 µl wasserfreiem Pyridin (~ 0,5 mmol, 20 Äquiv.) und 74 µl (S)-(+)- α -Methoxy- α -trifluormethylphenylacetylchlorid (S-(+)-MTPA-Cl, ~ 0,4 mmol, 16 Äquiv.) versetzt und drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Für die Derivatisierung des hydratisierten Produktes mit R-(-)-MTPA-Cl wurde analog verfahren. 600 µl beider Reaktionsansätze wurden nachfolgend zur NMR-Analyse gegeben (500 Hz, ¹H). Die Auswertung der NMR-Ergebnisse (siehe Anhang, Abbildung A 5) erfolgte mittels TopSpin 3.0 (Bruker BioSpin GmbH, Deutschland).

2.12 Analytische Methoden

Die Quantifizierung der Produktbildung erfolgte mithilfe von Kalibrierungskurven entsprechender Standards. Die verwendeten Chemikalien wurden dafür, wenn kommerziell verfügbar, stets in der höchsten Reinheit bezogen. (Z)-Undec-9-ensäure und 10-Hydroxyundecansäure wurden chemisch synthetisiert (2.11.1) bzw. biosynthetisch hergestellt (2.9.3) und nachfolgend gereinigt. Für die Erstellung der Kalibrierungskurven wurden die Standard-Ansätze den jeweiligen Biotransformationen entsprechend behandelt und aufbereitet (2.9). Der Bereich der gewählten Konzentration wurde der Substratkonzentration und dem zu erwartenden Umsatz angepasst.

2.12.1 GC-FID Analytik – Fettsäure-Biotransformationen

Derivatisierte Fettsäuren wurden mithilfe eines Shimadzu GC2010 Plus Gaschromatographen (Shimadzu, Kyōto, Japan) analysiert, ausgestattet mit einer DB-5 Säule (Polyphenylmethylsiloxan, 30 m, 0,25 mm, 0,25 µm; Agilent Technologies, Santa Clara,

USA), einem AOC 20s Autosampler und einem AOC 20i Autoinjector. Das Injektionsvolumen betrug 1 µl mit einem Splitverhältnis von 1:10 bei einer Injektortemperatur von 250 °C. Wasserstoff mit einer Lineargeschwindigkeit von 30 cm pro Sekunde diente als Trägergas und die Temperatur des Flammenionisationsdetektors (FID) betrug 320 °C. In Abhängigkeit des jeweiligen Substrates wurden verschiedene Temperaturprogramme und interne Standards verwendet (Tabelle 9).

Tabelle 9: Temperaturprogramm derivatisierter Fettsäure-Biotransformationen

Fettsäure	Interner Standard (100 µM)	Heizrate [K/min]	Temp. [°C]	Haltezeit [min]
Ölsäure	Heptadecansäure (100 mM DMSO-Stocklösung)		180	0
		5	250	0
		10	300	0
Palmitinsäure	Heptadecansäure (100 mM DMSO-Stocklösung)		180	0
		5	240	0
		50	300	1
Myristoleinsäure (Z)-Undec-9-ensäure Dec-9-enoic acid	Dodecansäure (100 mM DMSO-Stocklösung)		160	0
		10	220	0
		20	260	0
		40	320	2,5

2.12.2 GC-MS-Analytik – (Z)-Undec-9-ensäure-Biotransformation

Die GC-MS-Analyse der derivatisierten Proben erfolgte über eine ZB-5-Säule (Polyphenylmethylsiloxan, 30 m, 0,25 mm, 0,25 µm; Zebron-Phenomenex, Torrance, USA) unter Verwendung eines Shimadzu GC2010 Systems (Shimadzu, Kyōto, JP) ausgestattet mit einem GCMS-QP2010 MSD (Elektronenstoßionisation, 70 eV) und einem AOC 5000 Autosampler/Autoinjector. Das Injektionsvolumen betrug 1 µl mit einem Splitverhältnis von 1:10 bei einer Injektortemperatur von 250 °C. Wasserstoff mit einer Lineargeschwindigkeit von 30 cm pro Sekunde diente als Trägergas. Die Detektion erfolgte bei 320 °C. Die Temperatur der MS-Ionenquelle betrug 250 °C mit einer *Interphase*-Temperatur von 270 °C. Das Temperaturprofil der (Z)-Undec-9-ensäure Analyse entsprach dem GC-FID Programm wie oben dargestellt (Tabelle 9).

2.12.3 Achirale GC(-MS)-Analytik – 1-Decen-Biotransformation

Die achirale Analyse der Decen-Biotransformationen erfolgte mithilfe eines Shimadzu GC2010 Gaschromatographen (Shimadzu, Kyōto, Japan) ausgestattet mit einer HP-1-Säule (Dimethylpolysiloxan, 30 m, 0,25 mm, 0,25 μm ; Agilent Technologies, Santa Clara, USA), einem AOC 20s Autosampler und einem AOC 20i Autoinjector. Das Injektionsvolumen betrug 1 μl mit einem Splitverhältnis von 1:5 bei einer Injektortemperatur von 250 °C. Wasserstoff diente als Trägergas (Lineargeschwindigkeit: 30 cm/sec) bei einer Detektortemperatur von 330 °C. Das Temperaturprofil der GC-FID Analyse ist in Tabelle 10 dargestellt.

Die GC-MS-Analyse erfolgte über eine DB-5-Säule ((5 %-Phenyl)-methylpolysiloxan, 30 m, 0,25 mm, 0,25 μm ; Agilent Technologies, Santa Clara, USA) unter Verwendung eines Agilent 7890A GC/MS Systems (Santa Clara, USA) ausgestattet sowohl mit einem Flammenionisationsdetektor als auch einem massenselektiven Detektor (Agilent 5975C inert MSD, Santa Clara, USA). Helium diente als Trägergas (konst. Druck von 16,5 psi) und die Detektortemperatur betrug 320 °C. 1 μl der Proben wurde mit einem Splitverhältnis von 1:10 bei einer Injektortemperatur von 250 °C injiziert. Tabelle 10 präsentiert das für die GC-MS Analyse verwendete Temperaturprogramm.

Tabelle 10: 1-Decen Analyse mittels GC-FID und GC-MS

Analyse	Interner Standard (500 μM)	Heizrate [K/min]	Temp. [°C]	Haltezeit [min]
GC-FID	1-Octanol		80	0
		10	160	0
		50	320	4
GC-MS	1-Octanol		80	0
		15	140	0
		40	310	5

2.12.4 Achirale GC-Analytik – C8-C5 Alkene

Die achirale GC-Analyse der Alken-Biotransformationen (C8-C5) wurde mithilfe eines Shimadzu GC2010 Systems (AOC 20s Autosampler, AOC 20i Autoinjector, Shimadzu, Kyōto, Japan) unter Verwendung einer DB-Wax Säule (30 m, 0,25 mm, 0,25 μm ; Agilent Technologies, Santa Clara, USA) durchgeführt. 1 μl der extrahierten 600 μl Proben wurde mit einem Splitverhältnis von 1:5 bei einer Injektortemperatur von 200 °C injiziert. Als Trägergas

diente Wasserstoff (Lineargeschwindigkeit 33 cm pro Sekunde) und die Detektortemperatur betrug 260 °C. In Abhängigkeit des jeweiligen Substrates wurden verschiedene Temperaturprogramme und interne Standards verwendet (Tabelle 11). Als finaler Schritt der einzelnen Programme wurde die Säule für drei Minuten bei 220 °C ausgeheizt (50 K/min).

Tabelle 11: Temperaturprogramm nicht-derivatisierter Alken-Biotransformationen

Alken	Interner Standard (500 µM)	Heizrate [K/min]	Temp. [°C]	Haltezeit [min]
1-Octen	1-Decanol		130	3
		10	180	0
1-Hepten	1-Pentanol		110	5
		15	150	0
1-Hexen <i>cis-/trans-2-Hexen</i>	1-Pentanol		90	5
		10	120	0
1-Penten <i>cis-/trans-2-Penten</i>	3-Hexanol		70	6
		20	120	0

2.12.5 Chirale GC(-MS)-Analyse – Alken-Biotransformationen

Für die chirale GC-Analyse der Alken-Biotransformationen wurden 600 µl organische Phase mit 250 µl Essigsäureanhydrid und einer katalytischen Menge von 2 mg 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP) versetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 25 °C und 800 Upm (Thermomixer comfort, Eppendorf, Deutschland) wurde die Derivatisierung durch Zugabe von 300 µl Wasser abgestoppt und die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet. Die Analyse der Stereoselektivität erfolgte über eine CP-Chirasil-Dex CB-Säule (25 m, 0,25 mm, 0,25 µm; Agilent Technologies, Santa Clara, USA). In Abhängigkeit des Substrates wurden verschiedene Temperaturprogramme und interne Standards verwendet (Tabelle 12). Als finaler Schritt wurde die Säulenofen-Temperatur auf 180 °C erhöht (50 K/min) und die Säule für drei Minuten ausgeheizt.

Die GC-FID-Analyse wurde unter Verwendung eines Shimadzu GC2010 (Shimadzu, Kyōto, Japan) ausgestattet mit einem AOC 20s Autosampler und AOC 20i Autoinjector vorgenommen. Das Injektionsvolumen betrug 1 µl mit einem Splitverhältnis von 1:20 und

MATERIAL UND METHODEN

einer Injektortemperatur von 220 °C. Wasserstoff mit einer Lineargeschwindigkeit von 40 cm pro Sekunde diente als Trägergas bei einer Detektortemperatur von 230 °C.

Die GC-MS-Analyse erfolgte mithilfe eines 7820A GC/MS Systems (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) ausgestattet mit einem massenselektiven Detektor (5977B MSD) und einem PAL RSI 120 Autosampler. Helium diente als Trägergas (konst. Druck von 7,9 psi) und die Detektortemperatur betrug 230 °C. 1 µl der Proben wurde mit einem Splitverhältnis von 1:5 bis 1:20 bei einer Injektortemperatur von 220 °C injiziert. In Abhängigkeit der zu analysierenden Produkte wurden verschiedene SIM-Modi gewählt.

Tabelle 12: Temperaturprogramm derivatisierter Alken-Biotransformationen

Alken	Interner Standard (500 µM)	GC-MS (SIM-Modus)	Heizrate [K/min]	Temp. [°C]	Haltezeit [min]
1-Decen, 1-Dodecen	1-Octanol			100	1
			10	120	3,5
			10	150	0
1-Octen	1-Decanol			100	0
			2	112	0
1-Hepten	1-Pentanol			65	0
			5	100	0
1-Hexen <i>cis-/trans</i> -2-Hexen	1-Pentanol	2-Hexanol (84,1 m/z) 3-Hexanol (84,1 m/z, 101,1 m/z, 115,1 m/z)		55	8
			5	65	0
			10	80	0
1-Penten <i>cis-/trans</i> -2-Penten	3-Hexanol	2-Pentanol (87,1 m/z)		55	4
			20	85	0

2.12.6 GC-MS-Analytik kurzkettiger Alkene und Alkohole (C6-C4)

Die GC-MS-Analytik der kurzkettigen Alkohole und Alkene erfolgte mithilfe des oben beschriebenen Shimadzu GC2010 Systems ausgestattet mit einem GCMS-QP2010 MSD (2.12.2). Die initiale Säulentemperatur von 40 °C wurde für 4 Minuten gehalten und nachfolgend mit einer Heizrate von 40 K/min auf 300 °C erhöht. Die Säule wurde bei dieser Temperatur für 3 Minuten ausgeheizt. In Abhängigkeit des jeweiligen Substrates wurden verschiedene interne Standards und spezifische SIM-Modi verwendet (Tabelle 13).

Tabelle 13: GC-MS-Temperaturprogramm nicht-derivatisierter Alken-Biotransformationen

Alken (SIM-Modus)	Alkohol (SIM-Modus)	Interner Standard (500 µM)
1-Hexen (41 & 56 m/z)	1-Hexanol (56 m/z)	1-Pentanol
<i>cis-/trans</i> -2-Hexen (55 m/z)	2-Hexanol (45 m/z) 3-Hexanol (59 m/z)	
1-Penten (42 & 55 m/z)	1-Pentanol (42 m/z)	3-Hexanol
<i>cis-/trans</i> -2-Penten (55 m/z)	2-Pentanol (45 m/z) 3-Pentanol (59 m/z)	
1,3-Butadien (54 m/z)	3-Buten-1-ol (42 m/z) 3-Buten-2-ol (57 m/z) 2,3-Butandiol (45 m/z)	1-Pentanol

2.12.7 Übersicht der Retentionszeiten

Tabelle 14 präsentiert eine Übersicht der relevanten Retentionszeiten in Abhängigkeit des jeweils verwendeten GC-Systems. Da sich die Retentionszeiten mit andauernder Verwendung der Säulen (z. B. durch das Schneiden der Säulen, Performance-Verlust etc.) teilweise deutlich nach vorne verschoben, wurden jeweils entsprechende Standards mitgeführt. Bei den hier angegebenen Retentionszeiten (Tabelle 14) handelt es sich um die zuletzt erhaltenen Werte.

Tabelle 14: Übersicht der Retentionszeiten in Abhängigkeit des jeweils verwendeten GC-Systems

Molekül	Verweis zur GC-Methodik	Retentionszeit[min]
Ölsäure	2.12.1	12,6
10-Hydroxyoctadecansäure	2.12.1	15,7
Palmitinsäure	2.12.1	7,9
10-Hydroxyhexadecansäure	2.12.1	11,1
Myristoleinsäure	2.12.1	7,0
10-Hydroxytetradecansäure	2.12.1	8,6
(Z)-Undec-9-ensäure	2.12.1 2.12.2	4,0 4,0
10-Hydroxyundecansäure	2.12.1 2.12.2	6,0 6,0
Dec-9-ensäure	2.12.1	4,0
10-Hydroxydecansäure	2.12.1	6,8

MATERIAL UND METHODEN

(S)-2-Dodecanol	2.12.5	9,1
1-Decen	2.12.3	4,1 (GC-FID)
	2.12.3	3,6 (GC-MS)
2-Decanol	2.12.3	6,4 (GC-FID)
	2.12.3	5,1 (GC-MS)
(S)-2-Decanol	2.12.5	5,6
2-Octanol	2.12.4	4,5
(S)-2-Octanol	2.12.5	3,5
2-Heptanol	2.12.4	5,3
(S)-2-Heptanol	2.12.5	5,2
1-Hexen	2.12.6	1,8
<i>cis</i> -2-Hexen	2.12.6	1,9
<i>trans</i> -2-Hexen	2.12.6	1,8
2-Hexanol	2.12.4	5,9
	2.12.6	3,9
(S)-2-Hexanol	2.12.5	8,1
3-Hexanol	2.12.4	5,5
	2.12.6	3,8
(S)-3-Hexanol	2.12.5	8,3
1-Penten	2.12.6	1,6
<i>cis</i> -2-Penten	2.12.6	1,6
<i>trans</i> -2-Penten	2.12.6	1,6
2-Pentanol	2.12.4	6,6
	2.12.6	2,4
(S)-2-Pentanol	2.12.5	4,2
3-Pentanol	2.12.4	6,4
(S)-3-Pentanol	2.12.5	4,7
1,3-Butadien	2.12.6	1,5
3-Buten-1-ol	2.12.6	2,0
3-Buten-2-ol	2.12.6	1,7
2,3-Butandiol	2.12.6	3,6

2.13 Bioinformatische Methoden

Strukturelle Analysen des *Em*-OAH Wildtypenzym und der generierten Mutanten erfolgten auf Basis der von Engleder *et al.* veröffentlichten Kristallstruktur (PDB ID: 4UIR).⁷⁸

2.13.1 Docking-Studien

Molekulare Docking-Studien wurden mithilfe der YASARA Software nach erfolgter Energieminimierung durchgeführt. Für das Docking der Ölsäure wurde eine Simulationszelle mit einem Radius von 20 Å um das N5-Atom des FAD-Cofaktors gewählt. Das Docking-Ergebnis der C11-Fettsäure ((*Z*)-Undec-9-ensäure) wurde mithilfe einer Simulationszelle von 10 Å um das Sauerstoffatom der Carboxylgruppe des katalytisch-aktiven Glutamats 122 erhalten. Die Docking-Resultate wurden unter Verwendung von PyMol bearbeitet und visualisiert.

2.13.2 Identifizierung der Positionen zur gerichteten Mutagenese

Die Auswahl der Mutanten wurde in Kooperation mit der Bioinformatikgruppe des IBTB vorgenommen. Die Identifizierung des Alanins 248 als *specificity determined position* (SDP) erfolgte durch eine systematische Analyse der *Hydratase Engineering Database* (HyED)⁶³ unter Verwendung des Programms *SDPlight*. Phenylalanin 227 wurde durch eine strukturelle Analyse des *Em*-OAH Wildtypenzym als interessante Mutagenese-position identifiziert. *In silico* Mutationsstudien wurden mithilfe von PyMol durchgeführt und visualisiert.

3 ERGEBNISSE

3.1 Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Umsetzung kurzkettiger Substrate

Die Ölsäure-Hydratase aus *Elizabethkingia meningoseptica* (*Em-OAH*) wurde im Rahmen der Masterarbeiten von Lisa Steiner und Jens Schmid als vielversprechendes Enzym für die Hydratisierung kurzkettiger Fettsäuren identifiziert.^{63,116,117} Es wurde gezeigt, dass das Wildtypenzym die chemisch-synthetisierte C11-Fettsäure (*Z*)-Undec-9-ensäure regioselektiv zu 10-Hydroxyundecansäure hydratisiert (Abbildung 8), obwohl eine Mindestkettenlänge von 14 Kohlenstoffatomen als essentiell galt.³² Der Umsatz dieses nicht-natürlichen Substrates (0,5 mM) war jedoch mit 23 % Produktbildung nach fünf Tagen Inkubation unter Verwendung von 4 mg/ml *E. coli* Lysat sehr gering, während das natürliche Substrat Ölsäure bei gleicher Konzentration innerhalb von fünf Minuten fast vollständig umgesetzt wurde (0,15 mg/ml Zelllysate). Aufgrund der geringen Aktivität wurde eine Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Umsetzung kurzkettiger nicht-natürlicher Substrate vorgenommen.

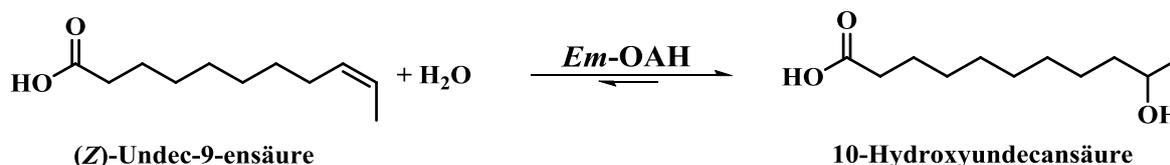


Abbildung 8: *Em-OAH* katalysierte Hydratisierung von (*Z*)-Undec-9-ensäure zu 10-Hydroxyundecansäure, verändert nach Demming *et al.*³⁴

3.1.1 Ganzzellbiotransformationen versus Zelllysate-Assays

Da bereits erfolgte Studien auf eine geringe Stabilität des *Em-OAH* Zelllysates hinwiesen,^{63,112} erfolgte zunächst der Vergleich von *E. coli* Ganzzellbiotransformationen und Zelllysate-Assays. Die Verwendung ganzer Zellen ermöglicht neben einer erhöhten operativen Stabilität unter anderem eine erleichterte Handhabung und die Vermeidung zeitintensiver Schritte wie Zellaufschluss und Proteinaufreinigung. Darüber hinaus wurde der effiziente Umsatz hydrophober Substrate unter Verwendung von Ganzzellsystemen bereits mehrfach beschrieben.^{68,111,118,119} Da Engleder und Kollegen für die Hydratisierung von Ölsäure eine erhöhte Aktivität des Enzyms mit FADH₂ anstelle des oxidierten Cofaktors beobachteten,⁷⁸ wurden reduzierende Bedingungen (Zugabe von FAD, DTT und NADH) mit Standard-Reaktionsbedingungen (Citratpuffer ohne Additive) verglichen (2.9.1). Darüber hinaus wurden die Ganzzellansätze mit Glucose komplementiert. Die heterologe Expression der

Ölsäure-Hydratase erfolgte im Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) (2.7.2) und wurde mithilfe einer SDS-PAGE überprüft (2.8.2). Für die Lysat-Assays wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen (2.7.4) und die Proteinkonzentration wurde bestimmt (2.8.1). Ganzzellbiotransformationen mit 0,5 mM (Z)-Undec-9-ensäure als Substrat wurden unter reduzierenden Bedingungen und Standard-Reaktionsbedingungen mit entsprechenden Zelllysate-Assays verglichen. Die Analyse der Produktbildung erfolgte mittels GC-FID (siehe Anhang, Abbildung A 6) und GC-MS (siehe Anhang, Abbildung A 7) und das Ergebnis des Lysat-Assays unter Standardbedingungen wurde auf 100 % gesetzt (Abbildung 9). Während durch die Zugabe von FAD, DTT und NADH (FAD-reduzierende Bedingungen) mit Zelllysate eine Verdoppelung der Produktkonzentration erreicht wurde, wurde die Produktbildung unter Verwendung ganzer Zellen mit einem Umsatz von 78 % (0,39 mM 10-Hydroxyundecansäure) nach fünf Tagen Inkubation sogar vervierfacht. Verglichen mit dem Ausgangspunkt von 23 %⁶³ entsprach dieses Ergebnis einer 3,4-fachen Produktsteigerung. Die Verwendung ganzer Zellen erhöhte darüber hinaus die Wiederfindungsrate des eingesetzten Substrates und hydratisierten Produktes bei langen Inkubationszeiten, während die Bildung eines weißen Präzipitats in Zelllysate-Assays auf eine Agglomeration mit denaturiertem Protein hindeutete. Es wurden keine Hintergrundreaktionen beobachtet und die pET28a(+)-Negativkontrolle zeigte keine Produktbildung.

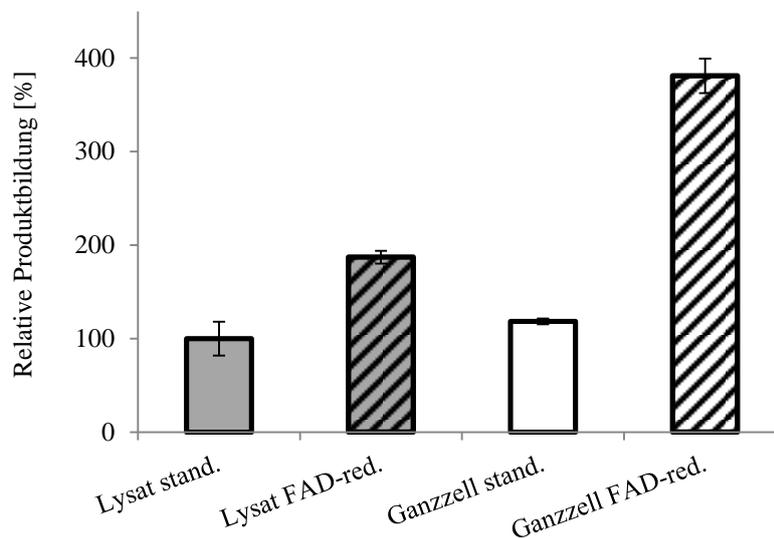


Abbildung 9: Direkter Vergleich von *Em*-OAH Ganzzellbiotransformationen und Zelllysate-Assays

Die Hydratisierung der C11-Fettsäure (Z)-Undec-9-ensäure (0,5 mM) wurde unter Standard-Reaktionsbedingungen (stand.: 50 mM Citratpuffer (pH 6) ohne Additive) und FAD-reduzierenden Bedingungen (FAD-red.: Zugabe von FAD, DTT und NADH) analysiert. Ganzzellansätze wurden mit Glucose komplementiert. Nach fünf Tagen Inkubation wurde die Produktbildung in den Ganzzellbiotransformationen (50 mg/ml Feuchtmasse) und Zelllysate-Assays (4 mg/ml Protein) mittels GC-FID analysiert. Das Ergebnis des Lysate-Assays unter Standardbedingungen wurde auf 100 % gesetzt. (verändert nach Demming *et al.*³⁴)

3.1.2 Optimierung der Reaktionsbedingungen mittels DoE

Die nachfolgende Optimierung der Reaktionsbedingungen erfolgte über eine statistische Versuchsplanung (design of experiments, DoE) unter Verwendung von MODDE.^{120–124} Die gleichzeitige Analyse verschiedener Faktoren ermöglicht dabei mithilfe einer statistischen Auswertung die Identifizierung kritischer Parameter, synergistischer Effekte und geeigneter operativer Bedingungen.

In bereits erfolgten Studien wurden verschiedenste Parameter mit einem Einfluss auf die Hydrataseaktivität und die Produktbildung identifiziert.^{60,62,65–67,69,71,72,74,76} Bis zu fünf Bedingungen, darunter Glucosekonzentration, Cofaktor-Zugabe (NADH, FAD), reduzierende Agenzien (DTT, Glutathion), Salzkonzentration, Enzymstabilität und Inkubationstemperatur wurden zeitgleich in vier Optimierungsrunden analysiert, wobei die Zusammensetzung der Biotransformationen durch MODDE vorgegeben wurde (2.9.2). Während Glutathion (bis zu 5 mM) und BSA (bis zu 0,5 mg/ml) keinen Einfluss auf den Substratumsatz zeigten, sank die Produktbildung durch die Zugabe von Natriumchlorid (bis zu 100 mM). Eine Steigerung der Hydrataseaktivität wurde hingegen durch die Zugabe von Glucose (bis zu 100 mM), FAD (bis zu 0,5 mM), NADH (bis zu 5 mM) und DTT (bis zu 5 mM) und eine Erhöhung der Inkubationstemperatur (25–37 °C) erreicht (nicht dargestellt).

In einem finalen Experiment mit 0,5 mM (Z)-Undec-9-ensäure als Substrat wurden diese Parameter aufeinander aufbauend analysiert, wobei die durch MODDE optimierten Konzentrationen eingesetzt wurden (Abbildung 10). Die Zugabe von Glucose (100 mM) resultierte in eine 7-fache Steigerung der Produktbildung und erwies sich als essentiell für die Durchführung der Ganzzellansätze, da ohne die zusätzliche Kohlenstoffquelle keine ausgeglichene Substrat- und Produktbilanz erhalten wurde. Der Umsatz wurde mithilfe der Cofaktoren FAD (0,3 mM) und NADH (3 mM) weiter auf 50 % gesteigert. Die Verwendung von DTT (2 mM) zeigte in diesem Versuch keinen Einfluss auf die Enzymaktivität, könnte aber bei Langzeitexperimenten für die Aufrechterhaltung der reduzierenden Bedingungen in Anwesenheit von Sauerstoff eine Rolle spielen. Während die Produktbildung durch eine Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 30 °C bei gleichzeitiger Zugabe aller Additive weiter gesteigert wurde, hatte eine Temperatur von 37 °C einen negativen Einfluss auf die Produktbildung und die Substrat-Wiederfindungsrate (nicht dargestellt). *E. coli* pET28a(+) Ganzzellansätze mit Glucose, FAD, NADH, DTT und 0,5 mM Substrat dienten als Negativkontrolle und zeigten keine Hydratisierungsaktivität. Die Optimierung der Reaktionsbedingungen mithilfe einer statistischen Versuchsplanung resultierte in 64 % Produktbildung (0,32 mM 10-Hydroxyundecansäure) nach 28 Stunden Inkubation. Dies

entspricht einer 2,8-fachen Steigerung des Umsatzes in nur einem Viertel der Zeit verglichen mit dem Startpunkt von 23 % Produktbildung nach fünf Tagen Inkubation.⁶³

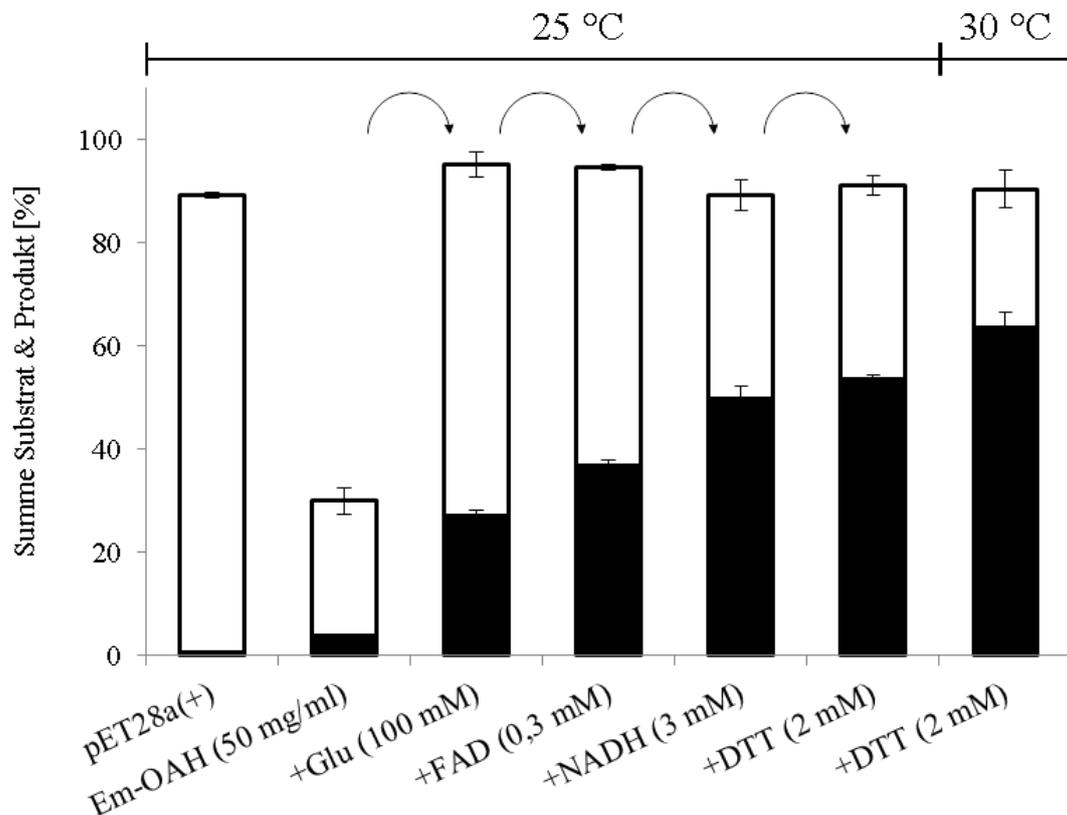


Abbildung 10: Optimierung der Reaktionsbedingungen für die Hydratisierung von (Z)-Undec-9-ensäure (0,5 mM)
 Die Analyse der Reaktionsbedingungen mithilfe von MODDE resultierte in optimierte Konzentrationen der Additive Glucose (Glu, 100 mM), FAD (0,3 mM), NADH (3 mM) und DTT (2 mM). Diese Konzentrationen wurden in einem finalen Experiment aufeinander aufbauend (durch Pfeile angedeutet) unter Verwendung von 50 mg/ml *Em-OAH* Biofeuchtmasse bei 25 °C analysiert. Darüber hinaus wurde die Produktbildung unter Einfluss dieser Additive bei 30 °C untersucht. Die Quantifizierung des Substrates (Z)-Undec-9-ensäure (□) und des Produktes 10-Hydroxyundecansäure (■) nach 28-stündiger Inkubation erfolgte mittels GC-FID. (verändert nach Demming *et al.*³⁴)

3.1.3 Umsetzung von (Z)-Undec-9-ensäure im 1 l Maßstab

Die optimierten Reaktionsbedingungen wurden nachfolgend in einem *Upscaling* für die Isolierung der 10-Hydroxyundecansäure eingesetzt (2.9.3). Der Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) pET28a(+):*Em-OAH* wurde für die Produktion der benötigten Biomasse in einem 5 Liter Fed-Batch-Verfahren kultiviert (2.7.3). Die Induktion der Genexpression erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 5,5 und nach 23-stündiger Inkubation mit kontinuierlicher Glycerinzufuhr wurden die Zellen mit einer finalen OD₆₀₀ von 44 geerntet. Die Überprüfung der heterologen Genexpression erfolgte mittels SDS-PAGE (2.8.2) und die Enzymaktivität wurde in Biotransformationen mit Ölsäure und (Z)-Undec-9-ensäure bestätigt. Das *Upscaling* wurde im 1 Liter Maßstab mit 50 mg/ml Biofeuchtmasse, 100 mM Glucose, 0,3 mM FAD und 3 mM NADH durchgeführt. Als Substrat diente 1 mM C11-Fettsäure (200 mg, 1 % (v/v)

finale DMSO-Konzentration), da bei dieser Konzentration aufgrund von Vorversuchen ein gutes Verhältnis von Produktkonzentration und Substratumsatz erwartet wurde. Nach dreitägiger Inkubation bei 30 °C und 180 Upm wurde die Reaktion durch Zugabe von Salzsäure abgestoppt (ca. 90 % Umsatz). Die Biotransformation wurde extrahiert und mittels Säulenchromatographie aufgereinigt. Die Identifizierung der Produktfraktion erfolgte über eine Dünnschichtchromatographie (siehe Anhang, Abbildung A 8). Die Fraktion wurde aufkonzentriert und die Reinheit des hydratisierten Produktes mittels GC-MS (siehe Anhang, Abbildung A 9) und NMR-Analyse (siehe Anhang, Abbildung A 10) überprüft.

Der Arbeitsablauf des 10-Hydroxyundecansäure-*Upscalings* von der Biomasseproduktion bis hin zum aufgereinigten hydratisierten Fettsäureprodukt ist in Abbildung 11 dargestellt. Es wurden 132 mg hellbraune, pulverige 10-Hydroxyundecansäure mit einer Reinheit von >95 % als Produkt erhalten ($Y_{P/S} = 66 \%$, $Y_{P/B} = 0,0024$).

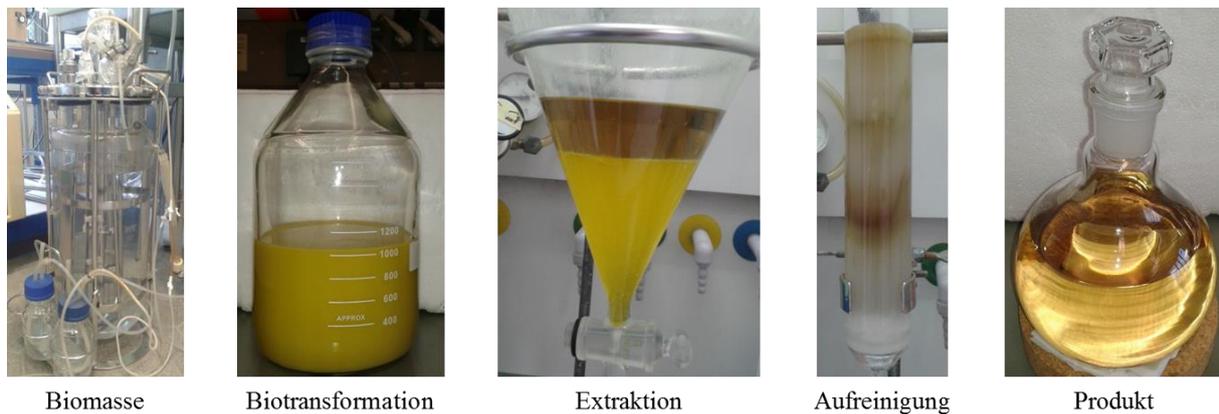


Abbildung 11: Upscaling der 10-Hydroxyundecansäure Produktion

Die Produktion der Biomasse erfolgte im 5 L Maßstab mithilfe einer Fed-Batch-Kultivierung. Die Biotransformation wurde im 1 L Maßstab unter optimierten Bedingungen (50 mg/ml Biofeuchtmasse, 100 mM Glucose, 0,3 mM FAD und 3 mM NADH) mit 200 mg C11-Fettsäure Substrat durchgeführt. Nach dreitägiger Inkubation wurde das Biotransformationsprodukt extrahiert und mittels Säulenchromatographie aufgereinigt. Die Produktfraktion wurde mittels DC identifiziert und *in vacuo* aufkonzentriert. (verändert nach Demming *et al.*³⁴)

Zur Überprüfung der Stereoselektivität der (*Z*)-Undec-9-ensäure Hydratisierung durch das *Em*-OAH Wildtypenzym wurde eine Mosher-Ester Analyse durchgeführt (2.11.2). Tabelle 15 präsentiert die Auswertung des ¹H-NMR-Spektrums des jeweiligen *S*- und *R*-Ester Derivates (siehe Anhang, Abbildung A 5). Für die Bestimmung der absoluten Konfiguration wurde der Differenzwert ($\Delta\delta^{SR}$) der einzelnen chemischen Verschiebungen ermittelt. Die Auswertung der Mosher-Ester Analyse ist in Abbildung 12 dargestellt. Durch die Einführung der Phenylgruppe kommt es zu einem Abschirmungseffekt, welche eine Hochfeldverschiebung des abgeschirmten Restes zur Folge hat. Dabei entspricht ein positiver Differenzwert dem Rest, der im Vergleich zum *S*-Ester beim *R*-Ester abgeschirmt wird, während ein negativer

$\Delta\delta^{\text{SR}}$ -Wert eine Entschirmung anzeigt. Wie aus Tabelle 15 hervor geht, wurde für die Protonen des C₁₀- und C₁₁-Atoms ein negativer Differenzwert ermittelt. Die Protonen der Kohlenstoffatome <10 wiesen hingegen einen positiven Wert auf. Anhand der Differenzwerte wurde das Biotransformationsprodukt mithilfe der Cahn–Ingold–Prelog-Konvention (CIP-Konvention) somit als (*S*)-10-Hydroxyundecansäure identifiziert.

Tabelle 15: Mosher-Ester Analyse der 10-Hydroxyundecansäure

Dargestellt sind die im ¹H-NMR ermittelten chemischen Verschiebungen des jeweiligen *S*- und *R*-MTPA-Chlorid Mosher-Ester Derivates. Der Differenzwert ($\Delta\delta^{\text{SR}}$) der chemischen Verschiebung dient zur Evaluierung der absoluten Konfiguration des hydratisierten Produktes. Abkürzungen: qi, Quintett; m, Multiplett; t, Triplett; sext, Sextett; d, Dublett.

Kohlenstoffatom		δ <i>S</i> -Ester (ppm)	δ <i>R</i> -Ester (ppm)	$\Delta\delta^{\text{SR}} (= \delta_S - \delta_R)$	
				ppm	Hz (500 Mhz)
C ₃ (qi)	CH2	1,70	1,61	0,09	45
C ₄ -C ₈ (m)	CH2	1,28	1,2	0,08	40
C ₉ (m)	CH2	1,55	1,51	0,04	20
C ₂ (t)	CH2	2,48	2,48	0	0
C ₁₀ (sext)	CHR	5,13	5,15	-0,02	-10
C ₁₁ (d)	CH3	1,25	1,33	-0,08	-40
		1,26	1,34	-0,08	-40

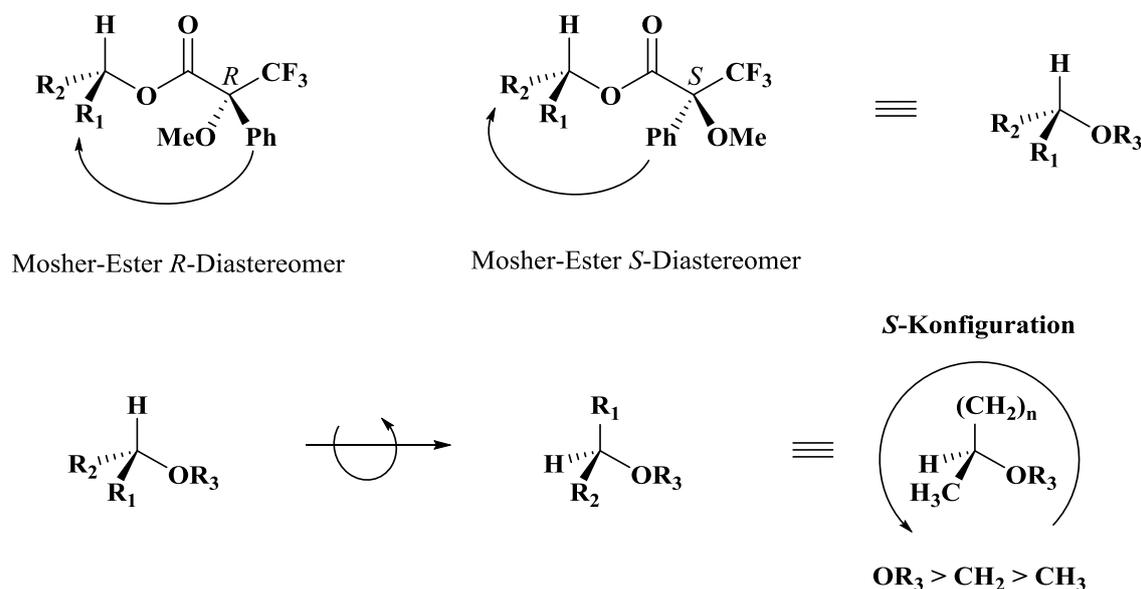


Abbildung 12: Auswertung der Mosher-Ester Analyse mithilfe der Cahn–Ingold–Prelog-Konvention

Anhand der im ¹H-NMR ermittelten chemischen Verschiebungen wurde die absolute Konfiguration der 10-Hydroxyfettsäure bestimmt. Der Grund für die Verschiebung ist die Phenylgruppe des verwendeten Reagenzes, welche eine Abschirmung spezifischer Reste zur Folge hat. Mithilfe der berechneten Differenzwerte wurde das hydratisierte Biotransformationsprodukt als (*S*)-10-Hydroxyundecansäure identifiziert. (verändert nach Demming *et al.*³⁴)

Die aufgereinigte (*S*)-10-Hydroxyundecansäure (0,5 mM) diente anschließend zur Analyse des Reaktionsgleichgewichtes der (*Z*)-Undec-9-ensäure-Hydratisierung unter optimierten Bedingungen. Es wurde keine nennenswerte Rückreaktion, d.h. Dehydratisierung, beobachtet

und das Reaktionsgleichgewicht lag nach 40-stündiger Inkubation mit 99:1 auf der Seite der hydratisierten Fettsäure (siehe Anhang, Abbildung A 11).

3.1.4 Strategien zur Umsetzung kurzkettiger Substrate

Die Hydratisierungsaktivität des *Em*-OAH Wildtypenzym gegenüber der kurzkettigen C11-Fettsäure (*Z*)-Undec-9-ensäure wurde durch die Optimierung der Reaktionsbedingungen deutlich gesteigert. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden die optimierten Bedingungen nachfolgend für die Hydratisierung kleinerer C10-Substrate eingesetzt. Neben der Fettsäure Dec-9-ensäure, welche in bereits erfolgten Studien von der Ölsäure-Hydratase nicht als Substrat akzeptiert wurde,⁶³ wurde das Alkene 1-Decen für Biotransformationen mit dem *Em*-OAH Wildtypenzym ausgewählt.

Um eine Hydratisierung des Alkens zu gewährleisten, wurde die Substratbindetasche des Enzyms im Hinblick auf potentielle Bindestellen analysiert. Abbildung 13 präsentiert eine schematische Darstellung der V-förmigen Substratbindetasche der *Em*-OAH mit dem Docking-Ergebnis für das natürliche Substrat Ölsäure. Die C=C Bindung liegt an der Biegung der vornehmlich hydrophoben Tasche in räumlicher Nähe zu den katalytischen Aminosäuren Y241 und E122.⁷⁸ Bereits erfolgte Studien verschiedener OAHs deuten darauf hin, dass der Substratumsatz von der Carboxygruppe der Fettsäure-Substrate anhängig ist, da diese vermutlich der Substraterkennung durch hydrophile/positiv-geladene Aminosäuren (Q265, T436, N438, H442) am Eingang der Bindetasche dient (angedeutet durch B⁺).³² Aufgrund dieser Annahme und der Hydrophobizität der Tasche wurde vermutet, dass die Fettsäuren (*Z*)-Undec-9-ensäure und Dec-9-ensäure ähnlich dem natürlichen Substrat Ölsäure in der Carboxy-Bindetasche gebunden werden (Abbildung 13, links unten bzw. mittig unten). Das unpolare Molekül 1-Decen hingegen bindet vermutlich in der Alkyl-Substratbindetasche und füllt somit den Raum aus, welcher normalerweise durch die C₉- bis C₁₈-Atome des natürlichen Substrates Ölsäure besetzt wäre (Abbildung 13, rechts unten). Aufgrund der Größe der Substratbindetasche wurde darüber hinaus angenommen, dass die gleichzeitige Bindung eines Fettsäure-Dummy-Substrates in der Carboxy-Bindetasche möglich wäre. Dieses würde durch Interaktion mit den Aminosäuren des Substrat-Eingangskanal eine Hydratisierung des kurzkettigen Alkens ermöglichen. Hexansäure wurde als Dummy-Substrat für die Hydratisierung des Alkens 1-Decen ausgewählt, da es neben der benötigten Carboxygruppe eine passende Kettenlänge für die gleichzeitige Bindung zweier Moleküle aufweist. Während länger-kettige Fettsäuren vermutlich eine sterische Hinderung in der

Substratbindetasche zur Folge hätten, wären kürzere Fettsäuren möglicherweise zu klein für eine effektive Positionierung des Alkens.

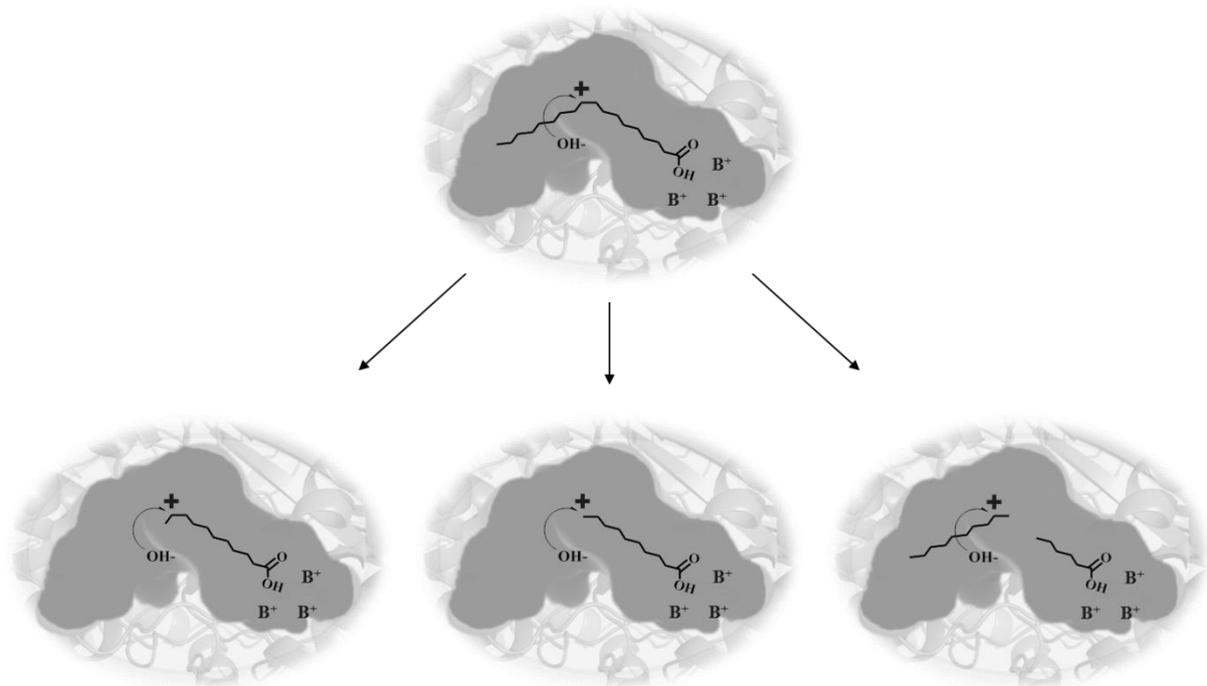


Abbildung 13: Strategien zum Umsetzungsmechanismus von kurzgeketteten Molekülen durch die *Em*-OAH

Abgebildet ist eine schematische Darstellung der Substratbindetasche mit dem natürlichen Substrat Ölsäure (mittig oben). Die C=C Bindung liegt an der Biegung der vornehmlich hydrophoben Tasche in räumlicher Nähe zu den katalytischen Aminosäuren Y241 und E122.⁷⁸ Der von Engleder *et al.* vorgeschlagene Mechanismus beschreibt die Bildung eines Carbokations (mit einem Kreuz angedeutet) am C₁₀-Atom der Fettsäure, gefolgt von einem nukleophilen Angriff eines aktivierten Wassermoleküls (OH⁻). Die Substrat-Erkennung erfolgt vermutlich über hydrophile/positiv geladene Aminosäuren (Q265, T436, N438, H442) am Eingang der Substratbindetasche (mit B⁺ angedeutet). Während die Bindung der C11-FS (Z)-Undec-9-ensäure (links unten) und der C10-FS Dec-9-ensäure (mittig unten) wahrscheinlich ähnlich wie bei der Ölsäure verläuft, bindet das Alken 1-Decen vermutlich in der Alkyl-Bindetasche (rechts unten). Eine kurzgekettete Fettsäure (Hexansäure) gebunden in der Carboxy-Bindetasche soll als Dummy-Substrat der Substraterkennung dienen. Die theoretische Position des jeweiligen Carbokations ist mit einem Kreuz markiert. (verändert nach Demming *et al.*³⁴)

3.1.5 Hydratisierung von 1-Decen unter optimierten Bedingungen

Die Analyse zur Hydratisierung der beiden C10-Substrate mit dem *Em*-OAH Wildtypenzym erfolgte in Ganzzellbiotransformationen unter C11-FS optimierten Bedingungen (100 mM Glucose, 0,3 mM FAD, 3 mM NADH, 2 mM DTT) bei 25 und 30 °C (2.9.4). Während für die Fettsäure Dec-9-ensäure kein Umsatz beobachtet wurde, wurde 1-Decen mit Hexansäure als Dummy-Substrat erfolgreich zum sekundären Alkohol 2-Decanol hydratisiert (siehe Anhang, Abbildung A 12 & Abbildung A 13). Während der viertägigen Inkubation wurden ca. 50 % des Alkens (0,5 mM) zum hydratisierten Produkt umgesetzt (Abbildung 14). Die Bildung des primären Alkohols 1-Decanol wurde nicht beobachtet und *E. coli* pET28a(+) Kontrollansätze zeigten keine Produktbildung. Obwohl verschlossene GC Vials als Reaktionsgefäße verwendet wurden, gingen 20-30 % des Alkens im Laufe der Reaktion ohne entsprechende

Zunahme der Produktkonzentration durch Evaporation verloren. Der Verlust des Substrates über die Gasphase wurde mittels GC-MS-*Headspace* Messungen bestätigt (nicht dargestellt). Eine zuvor erfolgte Analyse verschiedener Reaktionsgefäße (Plastik, „Cyclase“-Vials, Schraubgläschen, GC-Vials) hatte jedoch gezeigt, dass mithilfe der luftdichten GC-Vials die höchsten Produktkonzentrationen erhalten werden (nicht dargestellt). Aus diesem Grund wurden auch für alle nachfolgenden Alken-Biotransformationen GC-Glas-Vials als Reaktionsgefäße eingesetzt.

Die Bedeutung des Fettsäure-Dummy-Substrates für die Umsetzung des Alkens 1-Decen wurde in Biotransformationen mit und ohne Zugabe von Hexansäure analysiert (Abbildung 14). Das Ergebnis des Ansatzes mit Zugabe des Fettsäure-Dummy-Substrates wurde auf 100 % gesetzt. Die relative Produktbildung war ohne Verwendung der Hexansäure mit nur 7 % deutlich verringert.

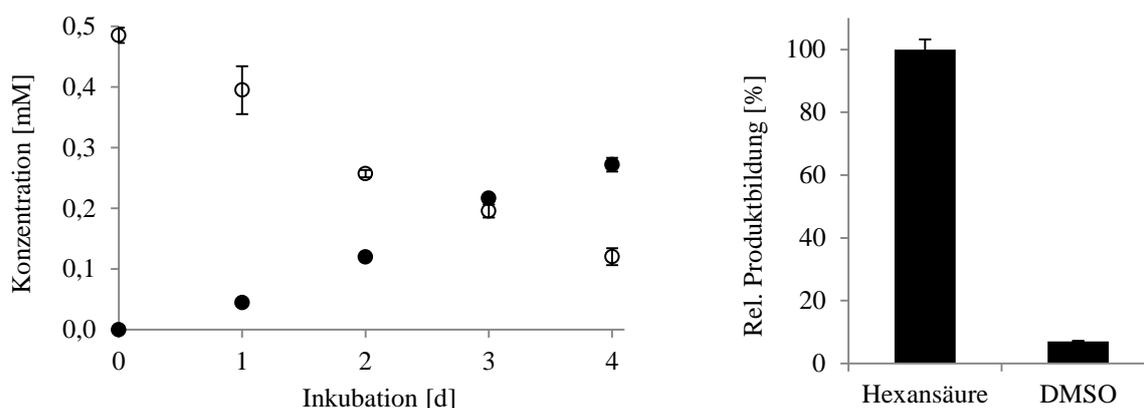


Abbildung 14: 1-Decen Hydratisierung des *Em*-OAH Wildtypenzym unter optimierten Bedingungen mit und ohne Hexansäure-Dummy-Substrat, verändert nach Demming *et al.*³⁴

Links: Hydratisierung des Alkens 1-Decen (0,5 mM) unter optimierten Bedingungen (50 mg/ml Biofeuchtmasse, 100 mM Glucose, 0,3 mM FAD, 3 mM NADH, 2 mM DTT) bei 25 °C und 180 Upm mit Hexansäure-Dummy-Substrat (0,5 mM). In regelmäßigen Abständen wurde über eine GC-FID Analyse die Abnahme des Substrates 1-Decen (○) und die Zunahme des sekundären Alkohols 2-Decanol (●) quantifiziert.

Rechts: Hydratisierung des Alkens 1-Decen (0,5 mM) unter optimierten Bedingungen mit und ohne Hexansäure-Dummy-Substrat. Nach viertägiger Inkubation wurde über eine GC-FID Analyse die Produktkonzentration bestimmt. Dargestellt ist die relative Produktbildung. Das Ergebnis des Ansatzes mit Zugabe des Fettsäure-Dummy-Substrates wurde auf 100 % gesetzt.

Für die Analyse der Stereoselektivität der 1-Decen Hydratisierung durch das *Em*-OAH Wildtypenzym wurde eine chirale GC-Methode etabliert (2.12.5). Biotransformationen ohne Zugabe von 1-Decen dienten als Kontrollreaktionen. Obwohl diesen Ansätzen kein Substrat zugesetzt wurde, wurde ein kleiner Peak zur Retentionszeit des *R*-Produkt-Enantiomers detektiert. Für die Berechnung des Enantiomerenüberschusses (*ee*-Wert) wurde dieses Hintergrundrauschen von dem Ergebnis der Enzym-katalysierten Hydratisierung abgezogen.

Die Auswertung der Selektivität mit und ohne Zugabe des Dummy-Substrates ergab einen ausgezeichneten *ee*-Wert von >99 % für *S*-2-Decanol (Abbildung 15).

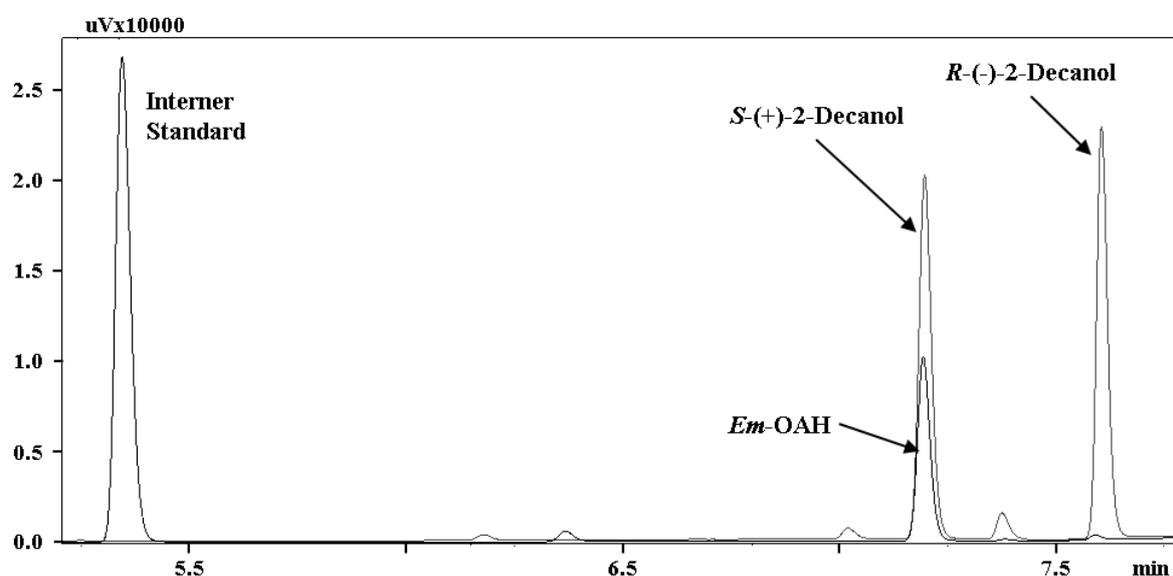


Abbildung 15: Chirale GC-FID-Analyse der 1-Decene Hydratisierung durch das *Em*-OAH Wildtypenzym

Die Analyse der Stereoselektivität der 1-Decene Hydratisierung erfolgte mittels chiraler GC-FID. Racemisches 2-Decanol und *R*-2-Decanol dienten als Produktstandards zur Identifizierung der beiden Isomere. Hintergrundrauschen wurde vor der Berechnung des *ee*-Wertes von dem Ergebnis der Enzym-katalysierten Hydratisierung abgezogen. Das Biotransformationsprodukt wurde mit einem Enantiomerenüberschuss von >99 % als *S*-2-Decanol identifiziert. (verändert nach Demming *et al.*³⁴)

Aufgrund der chemischen Unterschiede zwischen Fettsäuren und Alkenen wurde der Einfluss der C11-FS optimierten Bedingungen im Hinblick auf die Hydratisierung von 1-Decen mit Hexansäure als Dummy-Substrat im Detail analysiert (siehe Anhang, Abbildung A 14). Ca. 15 % Substratumsatz wurden in den Ganzzellansätzen nach dreitägiger Inkubation ohne Zugabe der Additive erhalten. Die Produktbildung wurde durch den Einsatz von 100 mM Glucose verdoppelt und durch gleichzeitige Verwendung von Glucose und FAD (0,3 mM) auf 40 % (200 mM 2-Decanol) gesteigert. Die Zugabe von DTT (2 mM) und NADH (3 mM) und die Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 30 °C zeigten hingegen keinen positiven Einfluss auf die Hydratisierungsaktivität. Da die Substrat- und Produkt-Wiederfindungsrate infolge der verstärkten Evaporation des Alkens bei 30 °C auf 70 % sank, wurden alle nachfolgenden Experimente zur Alken-Hydratisierung bei 25 °C durchgeführt. Darüber hinaus wurde auf die Zugabe von NADH und DTT verzichtet.

Als abschließender Versuch zur Analyse der Reaktionsbedingungen wurde ein Vergleich von Ganzzellbiotransformationen und Zellysate-Assays mit 0,5 mM 1-Decen und Hexansäure-Dummy-Substrat vorgenommen (Abbildung 16). Wie bereits für die C11-Fettsäure beobachtet, war die Hydrataseaktivität bei Verwendung von Zellysate deutlich verringert (ca. 10 % relative Produktbildung im Vergleich zu den GZBT). Darüber hinaus hatte der Einsatz

des Lysates einen negativen Effekt auf die Substrat-Wiederfindungsrate. So war der Verlust des Alkens ohne entsprechende Produktbildung unter Verwendung von Zelllysat deutlich erhöht. Während bei den GZBT in Summe 0,43 mM Substrat und Produkt erhalten wurden (86 % Wiederfindungsrate), betrug dieser Wert im Falle der Lysat-Assays durch Evaporation des Alkens in die Gasphase nur 0,31 mM (62 % Wiederfindungsrate).

Kontrollexperimente mit Puffer, BSA und *E. coli* Zellen bestätigten den unterschiedlichen Einfluss der Protein- und Biomassekonzentration auf die 1-Decen-Evaporation. Während das Substrat im reinen Puffer bereits nach einem Tag fast vollständig verloren ging und mit 1 mg/ml BSA nur 26 % 1-Decen detektiert wurden, wurde mit 50 mg/ml Biofeuchtmasse immerhin eine Wiederfindungsrate von 75 % erreicht (nicht dargestellt).

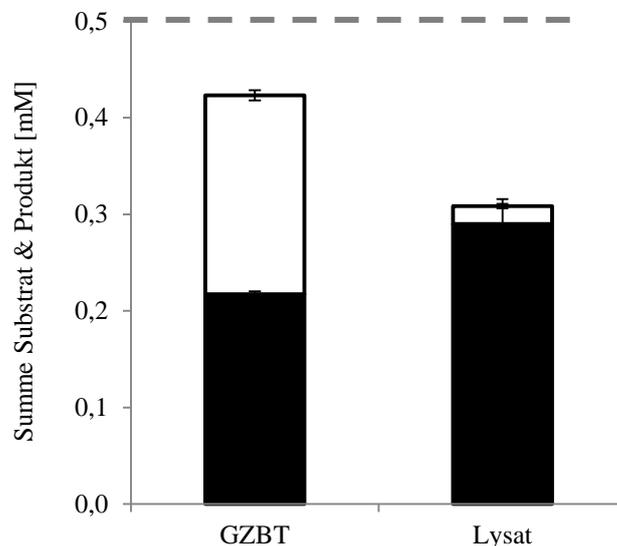


Abbildung 16: 1-Decen Hydratisierung in Ganzzellbiotransformationen und Zelllysat-Assays

Die Hydratisierung des Alkens 1-Decen (0,5 mM) erfolgte unter optimierten Bedingungen (100 mM Glucose, 0,3 mM FAD) bei 25 °C und 180 Upm mit 0,5 mM Hexansäure-Dummy-Substrat. Ganzzellbiotransformationen wurden mit 50 mg/ml Biofeuchtmasse und Zelllysat-Assays mit 4 mg/ml Protein durchgeführt. Nach dreitägiger Inkubation erfolgte über eine GC-FID Analyse die Quantifizierung des Substrates 1-Decen (■) und des Produktes 2-Decanol (□). Die in Summe zu erwartende Gesamtkonzentration von 0,5 mM ist mit einer gestrichelten Linie angedeutet.

3.2 Funktion und Bedeutung des Dummy-Substrates

Die Hydratisierung des Alkens 1-Decen unter Verwendung von Hexansäure als Dummy-Substrat war erfolgreich. Da die Katalyse eine starke Abhängigkeit von dem Dummy-Substrat zeigte, wurde nachfolgend eine detaillierte Analyse zur Funktion und Bedeutung der Fettsäure im Hinblick auf die Enzymaktivität vorgenommen.

3.2.1 1-Decen Hydratisierung bei verschiedenen Hexansäure-Konzentrationen

Der Umsatz des Alkens 1-Decen wurde bei unterschiedlichen Hexansäure-Konzentrationen analysiert, wobei das Ergebnis der Produktbildung bei äquimolarer Konzentration (0,5 mM) auf 100 % gesetzt wurde (Abbildung 17). Die höchste Produktkonzentration (0,25 mM 2-Decanol) wurde mit einem 1:1 Verhältnis (äquimolar) von Substrat und Dummy-Substrat erhalten. Bei stark erniedrigten bzw. erhöhten Hexansäure-Konzentrationen (0,2 bzw. 5 Äquivalente) war die Produktbildung hingegen deutlich reduziert. Wie bereits beobachtet, war das Enzym ohne Zugabe des Dummy-Substrates nahezu inaktiv. Eine chirale GC-Analyse zeigte eine exzellente Stereoselektivität von >99 % für *S*-2-Decanol unabhängig von der jeweiligen Hexansäure-Konzentration.

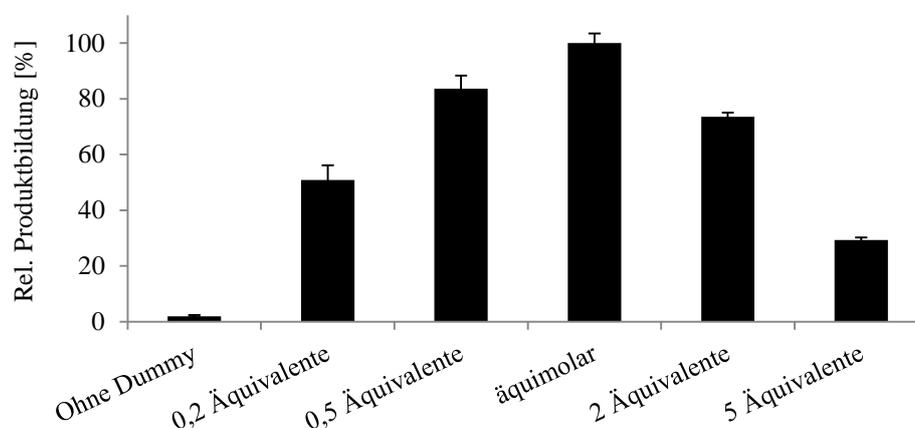


Abbildung 17: 1-Decen Hydratisierung bei unterschiedlicher Hexansäure-Konzentration

Die Reaktionen wurden als Ganzzellbiotransformationen (50 mg/ml) unter optimierten Bedingungen (100 mM Glucose, 0,3 mM FAD) durchgeführt und durch Zugabe von Substrat (0,5 mM 1-Decen) und Dummy-Substrat (0 mM; 0,1 mM; 0,25 mM; 0,5 mM; 1 mM; 2,5 mM Hexansäure) gestartet (1 % (v/v) finale DMSO-Konz.). Nach dreitägiger Inkubation bei 25 °C und 180 Upm wurde die Produktbildung mittels GC-FID analysiert. Dargestellt ist die relative Produktbildung, wobei das Ergebnis des Ansatzes mit einer äquimolaren Hexansäure-Konzentration (0,25 mM 2-Decanol) auf 100 % gesetzt wurde.

3.2.2 Präinkubationsversuche

Das Vorliegen eines inhibierenden/aktivierenden Effektes des Fettsäure-Dummy-Substrates wurde nachfolgend in Präinkubationsversuchen analysiert (2.9.6). Die *Em*-OAH Biotransformationen wurden hierfür 24 Stunden mit 1-Decen (0,5 mM) bzw. Hexansäure (0,5 mM) unter Verwendung gasdichter GC-*Headspace* Vials präinkubiert. Um die Vergleichbarkeit bezüglich des Transportes von Substrat bzw. Dummy-Substrat zu erhöhen und eine schnelle Aufnahme der Substanzen zu gewährleisten, wurden die Zellen mittels Ultraschall permeabilisiert. Die lysierten Zellen wurden nachfolgend ohne Zentrifugationsschritt direkt für die Biotransformationen eingesetzt. Die Produktbildung wurde relativ zur Produktbildung eines Kontrollansatzes mit gleichzeitiger Zugabe von 1-

Decen und Hexansäure bestimmt, dessen Resultat auf 100 % gesetzt wurde. Es wurde sowohl für die 1-Decen- als auch die Hexansäure-Präinkubation ein negativer Effekt auf die enzymatische Aktivität ermittelt (ca. 80 % relative Produktbildung), sodass die höchste Produktkonzentration in den Biotransformationen mit gleichzeitiger Substrat- und Dummy-Substrat-Zugabe vorlag (nicht dargestellt). Da das experimentelle Setup recht komplex war und die Produktkonzentrationen sehr gering waren, gestaltete sich die Verifizierung der Ergebnisse generell schwierig.

3.2.3 Biochemische Analyse zur Umsetzung von 1-Decen

Das *Em*-OAH Wildtypenzym wurde nachfolgend im Hinblick auf die Substrataffinität und maximale Umsatzrate der 1-Decen Hydratisierungsreaktion analysiert (2.9.7). Die initiale Hydratisierungsrate wurde bei einer Substratkonzentration von 0,125 mM bis 2,5 mM ermittelt. Das Dummy-Substrat Hexansäure wurde aufgrund der obigen Ergebnisse (3.2.1) in äquimolaren Konzentrationen eingesetzt. Infolge der geringen Löslichkeit von 1-Decen in DMSO betrug die finale DMSO-Konzentration in diesem Experiment 3 % (v/v). Die Hydratisierungsrate stieg zunächst mit zunehmender Substratkonzentration an, bevor die Kurve schließlich ab einer Konzentration von 1 mM 1-Decen abflacht (Abbildung 18). Die Auswertung der Daten mithilfe der Michaelis-Menten Gleichung (als Fit angedeutet) ergab einen scheinbaren $K_{m(\text{app})}$ -Wert von 0,55 mM (angedeutet mit gestrichelten Linien) und eine scheinbare maximale Umsatzrate $V_{\text{max}(\text{app})}$ von 3,9 mU pro Milligramm Biofeuchtmasse. Die Parameter wurden mit dem Begriff „scheinbar“ (app = apparent) gekennzeichnet, da unsicher ist, ob die 1-Decen Hydratisierung mit einer klassischen Michaelis-Menten Kinetik übereinstimmt. Es wurde keine Substratinhibition beobachtet.

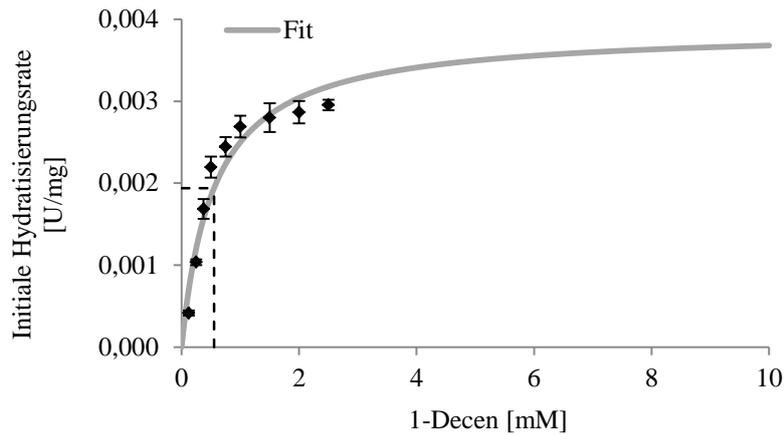


Abbildung 18: Initiale Hydratisierungsrate der *Em*-OAH Ganzzellbiotransformationen mit 1-Decen

Die Biotransformationen wurden unter optimierten Bedingungen (50 mg/ml Biofeuchtmasse, 100 mM Glucose, 0,3 mM FAD) mit Substratkonzentrationen zwischen 0,125 mM und 2,5 mM (5-100 mM DMSO Stocklösungen) durchgeführt. Das Dummy-Substrat Hexansäure wurde in äquimolarer Konzentration eingesetzt (25-500 mM DMSO Stocklösungen). Aufgrund der geringen Löslichkeit von 1-Decen in DMSO betrug die finale DMSO-Konzentration 3 % (v/v). Nach 13-stündiger Inkubation wurde die Produktbildung mittels GC-FID analysiert.

3.2.4 Analyse alternativer Dummy-Substrate

Die oben dargestellten Resultate beschreiben eindeutig eine Abhängigkeit der 1-Decen Hydratisierung von Hexansäure als Fettsäure-Dummy-Substrat. Darüber hinaus scheint eine erfolgreiche Katalyse die gleichzeitige Bindung von Substrat und Dummy-Substrat in der Substratbindetasche zu bedingen. Um die tatsächliche Bindestelle des Dummy-Substrates und die Bedeutung der Carboxylgruppe für die Substrat-Erkennung, Enzymaktivierung und/oder Substratpositionierung zu analysieren, wurden nachfolgend verschiedene Fettsäuren und (funktionalisierte) Fettsäurederivate als alternative Dummy-Substrate getestet (Abbildung 19).

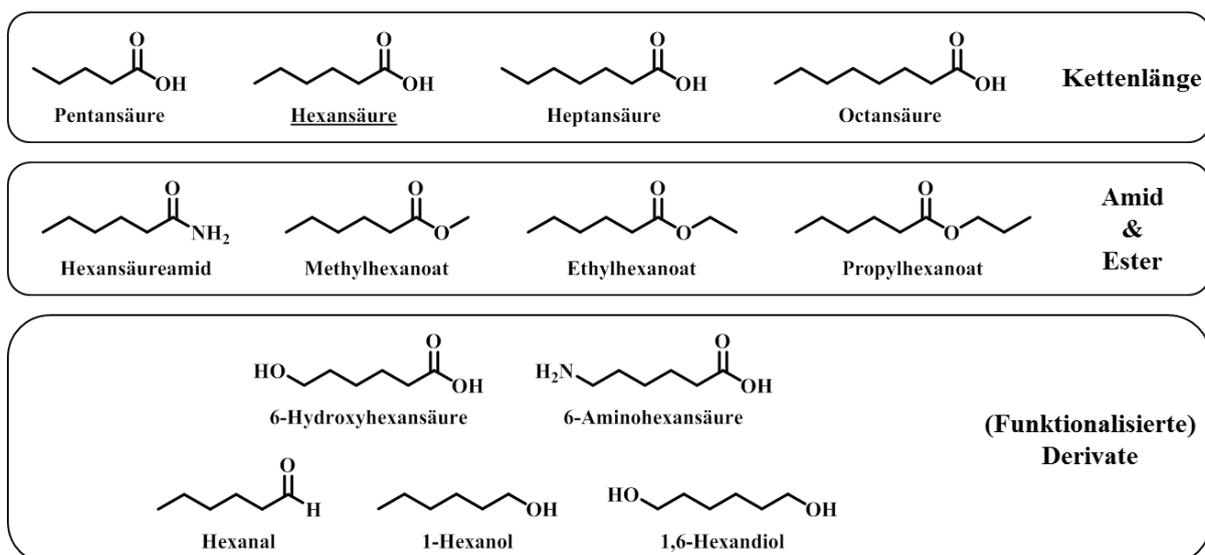


Abbildung 19: Alternative Dummy-Substrate für die Hydratisierung des Alkens 1-Decen

Bisher diente Hexansäure (C6) als Dummy-Substrat, da es neben der scheinbar notwendigen Carboxylgruppe eine geeignete Kettenlänge zur zeitgleichen Aufnahme zweier Moleküle in die Substratbindetasche aufweist. Um diese Hypothese zu bestätigen und die Problematik sterischer Hinderungen im aktiven Zentrum zu analysieren, wurden gesättigte Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge (C5-C8) als alternative Dummy-Substrate ausgewählt. Darüber hinaus sollte die Analyse von Hexansäureestern, Hexansäureamid, Hexanal und Hexanol eine Aussage über die Bedeutung der Carboxylgruppe für den Umsatz von Alkenen ermöglichen. Die Verwendung funktionalisierter Hexansäurederivate (6-Hydroxy- und 6-Aminohexansäure, 1,6-Hexandiol) erlaubt schlussendlich eventuell Rückschlüsse auf die tatsächliche Bindestelle des Dummy-Substrates. Zum einen wäre es denkbar, dass die Funktion des Fettsäure-Dummy-Substrates einzig auf der Interaktion mit den Aminosäuren am Eingang der Substratbindetasche beruht. Darüber hinaus wäre es aber auch möglich, dass die gleichzeitige Bindung der gesättigten Kohlenwasserstoffkette in der Carboxy-Bindestasche von Bedeutung ist. Die Aufnahme der aliphatischen Kette in die überwiegend hydrophobe Bindestasche könnte durch die terminale Funktionalisierung der Hexansäurederivate verhindert werden.

Die Analyse der 1-Decen Hydratisierung durch das *Em*-OAH Wildtypenzym mithilfe alternativer Dummy-Substrate erfolgte unter optimierten Reaktionsbedingungen nach zweitägiger Inkubation. Dargestellt ist die relative Produktbildung, wobei das Hexansäure-Ergebnis auf 100 % gesetzt wurde (Abbildung 20). Der höchste Substratumsatz wurde mit Heptansäure (113 ±4 % rel. Produktbildung) als Dummy-Substrat beobachtet. Der Einsatz längererkettiger (C8, Octansäure) bzw. kürzerer (C5, Pentansäure) gesättigter Fettsäuren resultierte hingegen mit 36 % bzw. 18 % in eine deutlich verringerte relative Produktbildung. Eine chirale GC-Analyse zeigte eine exzellente Stereoselektivität von >99 % für *S*-2-Decanol unabhängig vom jeweiligen Dummy-Substrat. Unter Verwendung von Hexansäureamid, 6-Hydroxyhexansäure, 6-Aminohexansäure und 1,6-Hexandiol entsprach das Ergebnis der 1-Decen Hydratisierung dem Resultat der Negativkontrolle ohne Zugabe von Dummy-Substrat (gestrichelte Linie). Während die Fettsäure-Dummy-Substrate, das Hexansäureamid und 1,6-Hexandiol nach zweitägiger Inkubation erfolgreich extrahiert wurden, blieb die Identifizierung der wasserlöslichen Dummy-Substrate 6-Hydroxyhexansäure und 6-Aminohexansäure mithilfe einer GC-Analyse ohne Erfolg.

Der Einsatz von Methyl-, Ethyl- und Propylhexanoat resultierte in einer erfolgreichen Hydratisierung von 1-Decen zu 2-Decanol (bis zu 100 % relative Produktbildung, siehe Anhang, Abbildung A 15). Die GC-Analyse zeigte jedoch, dass die Fettsäureester im Laufe

der Inkubation durch zelluläre Enzyme zu Hexansäure hydrolysiert wurden. Mit Hexanal und 1-Hexanol als alternative Dummy-Substrate wurden relative Werte von 25 % bzw. 12 % Produktbildung erhalten (siehe Anhang, Abbildung A 15). Jedoch wurden auch in diesen Ansätzen nach zweitägiger Inkubation infolge einer Oxidation durch zelluläre Enzyme geringe Hexansäure-Konzentrationen detektiert. Darüber hinaus wurde Hexanal fast vollständig zu 1-Hexanol reduziert.

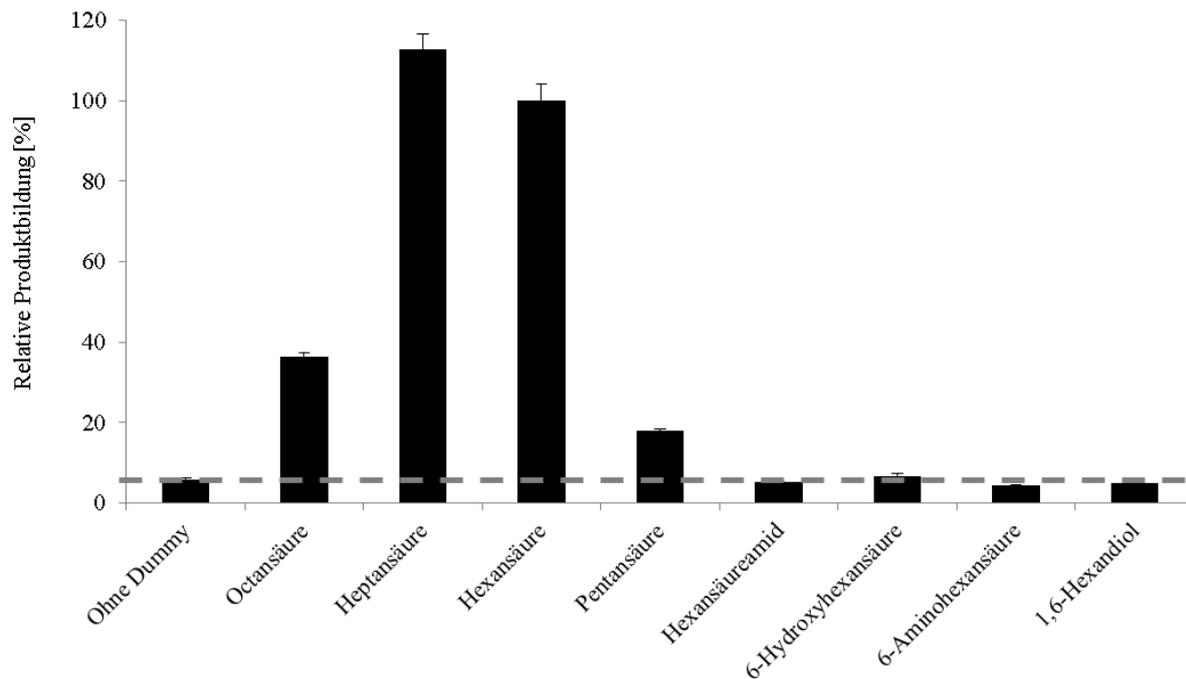


Abbildung 20: 1-Decen Hydratisierung durch das *Em*-OAH Wildtypenzym mithilfe alternativer Dummy-Substrate

Die Biotransformationen wurden unter optimierten Bedingungen (50 mg/ml Biofeuchtmasse, 100 mM Glucose, 0,3 mM FAD) mit 0,5 mM Substrat und 0,5 mM Dummy-Substrat und einer finalen DMSO-Konzentration von 1 % (v/v) durchgeführt. Die Stocklösungen (100 mM) wurden mit Ausnahme von 6-Aminohexansäure und 1,6-Hexandiol (jeweils in Puffer) in DMSO angesetzt. Nach zweitägiger Inkubation wurde die Produktbildung mittels GC-FID analysiert. Dargestellt ist die relative Produktbildung, wobei das Ergebnis des Hexansäure-Ansatzes auf 100 % gesetzt wurde. Die relative Produktbildung des Ansatzes ohne Dummy-Substrat (ohne Dummy) ist mit einer gestrichelten Linie gekennzeichnet.

3.3 Analyse des Hydratisierungsmechanismus und der Substratbindung

Für ein besseres Verständnis des Hydratisierungsmechanismus wurden im Rahmen der Masterarbeit von Andreas Hunold¹²⁵ und der Bachelorarbeit von Samuel Kleehammer¹²⁶ in einem rationalen Mutageneseansatz ausgewählte *Em*-OAH Varianten generiert. Neben einer Analyse des katalytischen Mechanismus stand dabei die Substrat-Erkennung bzw. -Bindung mithilfe der Aminosäuren am Eingang des Substratkanals im Fokus der Mutagenesestudien. Ausführliche Informationen zur Auswahl der einzelnen Mutanten sind in der jeweiligen Abschlussarbeit dargestellt. Alle Varianten wurden mittels QuikChange Mutagenese generiert, über eine Auftragssequenzierung verifiziert und heterolog in *E. coli* BL21 DE3

exprimiert. Das Ergebnis der heterologen Genexpression wurde über eine SDS-PAGE analysiert. Alle Mutanten wurden erfolgreich exprimiert.^{125,126} Je nach Intention wurden für das nachfolgende Aktivitätsscreening verschiedene Substrate eingesetzt (3.3.1 & 3.3.2).

3.3.1 Analyse des postulierten Hydratisierungsmechanismus

Die Aminosäuren Tyrosin 241 (Y241), Glutaminsäure 122 (E122), Methionin 123 (M123) und Threonin 511 (T511) wurden aufgrund des von Engleder und Kollegen postulierten Reaktionsmechanismus und infolge einer Sequenz- und Struktur-basierten Analyse für die Verifizierung katalytisch-relevanter Positionen ausgewählt. Tabelle 16 präsentiert eine Übersicht der generierten Mutanten und des erfolgten Aktivitätsscreenings. Dargestellt ist jeweils die relative Produktbildung im direkten Vergleich zum *Em*-OAH Wildtypenzym.

Während die Varianten Y241H, E122S, E122D und E122R mit allen ausgewählten Substraten (Ölsäure, Linolsäure, Myristoleinsäure und 1-Decen mit Hexansäure-Dummy-Substrat) inaktiv waren, zeigte die *Em*-OAH Y241C eine (geringe) Restaktivität mit Ölsäure, Linolsäure und 1-Decen. Interessanterweise wurde darüber hinaus mit den Einzelmutanten E122M und M123L eine schwache Aktivität mit Ölsäure und (*Z*)-Undec-9-ensäure ermittelt; die Doppelmutante E122M/M123L war jedoch inaktiv. Auffällig ist das Ergebnis der T511D-Variante. Während diese Mutante mit Ölsäure (500 mM) eine nur sehr geringe Hydratisierungsaktivität aufwies (<1 % Umsatz), wurde beispielsweise mit 1-Decen und Hexansäure-Dummy-Substrat im Vergleich zum Wildtyp eine relative Produktbildung von 85 % erreicht. Neben den in Tabelle 16 dargestellten Molekülen wurden darüber hinaus 10-Undecensäure (nur mit den Varianten Y241C, Y241H, E122S, E122D, E122R, T511D) und 9-Decensäure (mit allen Varianten) als Substrat eingesetzt. Es wurde jedoch kein Hydratisierungsprodukt identifiziert. Biotransformationen mit Methyl-Oleat waren nicht erfolgreich, da der Ester unter Verwendung von Zellysät zu Ölsäure hydrolysiert wurde.

Tabelle 16: Aktivitätsscreening der *Em*-OAH Mutanten zur Verifizierung katalytisch-relevanter Positionen

Die vorliegende Tabelle präsentiert eine Zusammenstellung der Ergebnisse aus der Masterarbeit von Andreas Hunold¹²⁵ und der Bachelorarbeit von Samuel Kleehammer¹²⁶. Informationen zur experimentellen Ausführung finden sich in der jeweiligen Arbeit.

<i>Em</i> -OAH Variante	Ölsäure	Linolsäure	Myristoleinsäure	(Z)-Undec-9-ensäure	1-Decen
Y241C	Spuren	Spuren	n. d.	n. a.	+
Y241H	n. d.	n. d.	n. d.	n. a.	n. d.
E122S	n. d.	n. d.	n. d.	n. a.	n. d.
E122D	n. d.	n. d.	n. d.	n. a.	n. d.
E122R	n. d.	n. d.	n. d.	n. a.	n. d.
E122M	+	n. a.	n. a.	+	n. a.
M123L	+	n. a.	n. a.	+	n. a.
E122M/M123L	Spuren	n. a.	n. a.	Spuren	n. a.
T511D	Spuren	++	Spuren	n. a.	+++

n. d.: nicht detektierbar

n. a.: nicht analysiert

Spuren: relative Produktbildung im Vergleich zum Wildtyp < 5 %

+: relative Produktbildung im Vergleich zum Wildtyp 5-20 %

++: relative Produktbildung im Vergleich zum Wildtyp 20-50 %

+++: relative Produktbildung im Vergleich zum Wildtyp >50 %

3.3.2 Mutagenesestudien am Eingang der Substratbindetasche

Für die Analyse der Substrat-Erkennung mithilfe polarer bzw. positiv-geladener Aminosäurereste am Eingang des Substratkanals wurden die Aminosäurepositionen Histidin 442 (H442) und Asparagin 438 (N438) ausgewählt. Tabelle 17 präsentiert eine Übersicht der generierten Mutanten und des erfolgten Aktivitätsscreenings. Dargestellt ist jeweils die relative Produktbildung im direkten Vergleich zum *Em*-OAH Wildtypenzym.

Der Austausch des Histidins 442 resultierte in einen schwachen bis starken Aktivitätsverlust der generierten Mutanten mit allen ausgewählten Substraten (Ölsäure, Linolsäure, Myristoleinsäure und 1-Decen mit Hexansäure-Dummy-Substrat). Auffällig war hierbei, dass die Hydratisierung der C14-Fettsäure Myristoleinsäure stärker betroffen war als die der langkettigen Substrate Ölsäure und Linolsäure. Darüber hinaus war die *Em*-OAH Variante H442R mit allen Fettsäure-Substraten inaktiv, zeigte jedoch eine hohe Hydratisierungsaktivität mit dem Alken 1-Decen und Hexansäure als Dummy-Substrat. Auch die Analyse der N438-Varianten resultierte in einer erfolgreichen Hydratisierung des Alkens unter Verwendung von Hexansäure, während hingegen mit Ölsäure nur minimale

Produktspuren identifiziert wurden. Darüber hinaus wurden die *Em*-OAH Varianten H442Q, N438V, N438Q und N438H hinsichtlich einer Aktivität mit 1-Decen ohne Verwendung des Hexansäure-Dummy-Substrates analysiert. Die relative Produktbildung war jedoch ohne Zugabe der Fettsäure deutlich verringert (<10 %) und es wurde kein Unterschied zum *Em*-OAH Wildtypenzym ermittelt.

Tabelle 17: Aktivitätsscreening der *Em*-OAH Mutanten zur Analyse der Substrat-Erkennung

Die vorliegende Tabelle präsentiert eine Zusammenstellung der Ergebnisse aus der Masterarbeit von Andreas Hunold¹²⁵ und der Bachelorarbeit von Samuel Kleehammer¹²⁶. Informationen zur experimentellen Ausführung finden sich in der jeweiligen Arbeit.

<i>Em</i> -OAH Variante	Ölsäure	Linolsäure	Myristoleinsäure	1-Decen + DS
H442L	+	+	Spuren	+
H442M	++	++	Spuren	+
H442Q	++	n. a.	n. a.	+++
H442R	Spuren	Spuren	Spuren	++
N438V	Spuren	n. a.	n. a.	+
N438Q	Spuren	n. a.	n. a.	+
N438H	Spuren	n. a.	n. a.	++

n. d.: nicht detektierbar

n. a.: nicht analysiert

Spuren: relative Produktbildung im Vergleich zum Wildtyp < 5 %

+: relative Produktbildung im Vergleich zum Wildtyp 5-20 %

++: relative Produktbildung im Vergleich zum Wildtyp 20-50 %

+++ : relative Produktbildung im Vergleich zum Wildtyp >50 %

3.4 Substratspezifität des *Em*-OAH Wildtypenzyms

Die Hydratisierung des Alkens 1-Decen unter Verwendung kurzkettiger gesättigter Fettsäuren als Dummy-Substrat war erfolgreich. Eine Unabhängigkeit der Katalyse vom Fettsäure-Dummy-Substrat mithilfe einer positionsgerichteten Mutagenese wurde jedoch nicht erreicht. Um das Substratspektrum des *Em*-OAH Wildtypenzyms und die Bindung der Alkene in der Alkyl-Bindetasche genauer zu untersuchen, wurden 1-Dodecen und 1-Octen als Substrate ausgewählt. Während 1-Octen zwei Kohlenstoffatome kürzer ist als 1-Decen und somit in die Alkyl-Bindetasche passen sollte, könnte 1-Dodecen die maximale Kettenlänge der *Em*-OAH Substrate überschreiten (Abbildung 21).

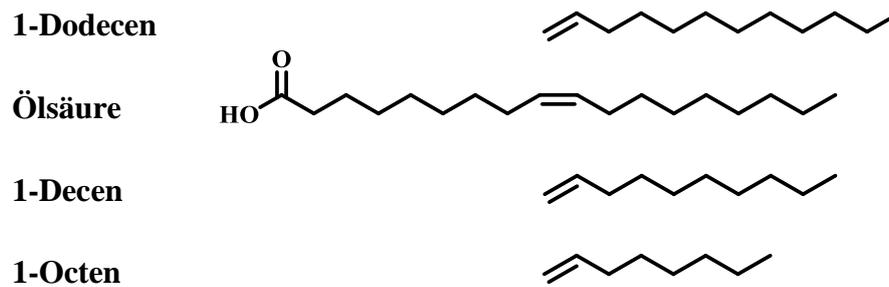


Abbildung 21: Struktur des natürlichen Substrates der *Em*-OAH (Ölsäure) und ausgewählter Alkene

Der Umsatz der beiden Alkene 1-Dodecen (0,5 mM) und 1-Octen (0,5 mM) wurde unter optimierten Bedingungen (3.1.5) bei 25 °C mit einer äquimolaren Konzentration des Hexansäure-Dummy-Substrates analysiert. *E. coli* BL21 (DE3) pET28a(+) Ganzzellbiotransformationen dienten als Negativkontrolle und zeigten keine Produktbildung. In den Ansätzen des *Em*-OAH Wildtypenzym hingegen wurde ein sehr kleiner *S*-2-Dodecanol bzw. *S*-2-Octanol Peak identifiziert (siehe Anhang, Abbildung A 16). Jedoch war die Produktkonzentration auch nach viertägiger Inkubation sehr gering. Wie bereits im Rahmen der Analyse zur 1-Decen Hydratisierung beobachtet (Abbildung 20), wurde der Alkenumsatz durch die Verwendung von Heptansäure als Dummy-Substrat anstelle von Hexansäure leicht erhöht (siehe Anhang, Abbildung A 16). Auffällig war der große Substratverlust (ca. 50 %) in den 1-Octen Biotransformationen, welcher nicht mit einer entsprechenden Produktzunahme (0,025 mM 2-Octanol, 5 % Umsatz) einherging. Ein Vergleich der 1-Decen, 1-Dodecen und 1-Octen Biotransformationen mit 0,5 mM Alken bestätigte eine Abhängigkeit des Substratverlusts von der Alken-Kettenlänge (Abbildung 22). So betrug die Wiederfindungsrate des Alkens in pET28a(+)-Kontrollansätzen bei 1-Octen nur 56 %, während hingegen in den 1-Decen- und 1-Dodecen-Kontrollen 82 % bzw. 94 % des jeweiligen Alkens detektiert wurden.

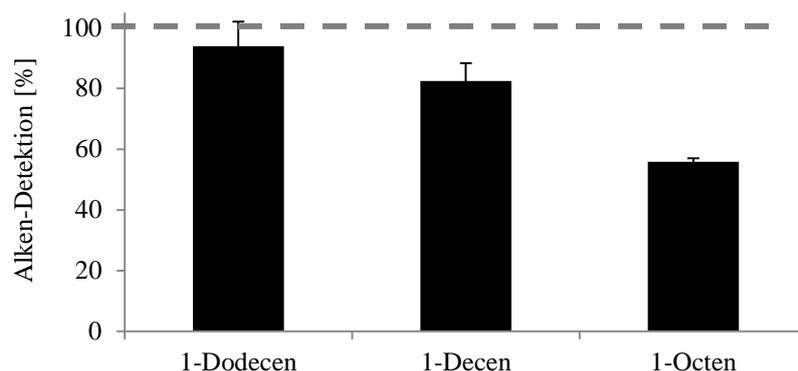


Abbildung 22: Alken-Wiederfindungsrate in pET28a(+)-Kontrollansätzen

Die Kontrollansätze zur Wiederfindungsrate der Alkene 1-Dodecen, 1-Decen und 1-Octen erfolgten unter optimierten Bedingungen mit 50 mg/ml *E. coli* BL21 (DE3) pET28a(+) und einer äquimolaren Konzentration des Hexansäure-Dummy-Substrates. Nach viertägiger Inkubation bei 25 °C und 180 Upm wurde mittels GC-FID die Alken-Wiederfindungsrate ermittelt.

3.5 Rationales Design der *Em*-OAH zur Umsetzung kurzkettiger Alkene

Das C8-Alkene 1-Octen wurde mithilfe des *Em*-OAH Wildtypenzym erfolgreich zu 2-Octanol hydratisiert. Aufgrund der im Vergleich zur 1-Decen-Biotransformation niedrigen Umsatzrate wurde ein (semi-)rationaler Mutagenese-Ansatz zur Verkleinerung der Alkyl-Substratbindetasche gewählt. Ziel dieser Strategie war eine effizientere Stabilisierung/Positionierung des kurzkettigen Alkens 1-Octen im aktiven Zentrum zu gewährleisten.

In Zusammenarbeit mit der Bioinformatikgruppe des IBTB wurde mithilfe einer systematischen Analyse der Hydratase-Datenbank (*Hydratase Engineering Database, HyED*)⁶³ die Aminosäureposition 248 als Spezifität-bestimmende Position (*specificity-determined position, SDP*) identifiziert. Bei SDPs handelt es sich um Positionen, welche sich deutlich zwischen Subfamilien, in diesem Fall homologe Hydratase-Familien, unterscheiden. Während die Hydratase-Familien 1 und 2 (HFam 1 und HFam2) an Position 248 der Aminosäuresequenz eine Glutaminsäure (E) bzw. ein Histidin/Glutamin (H/Q) aufweisen, wurde bei der Ölsäure-Hydratase aus *E. meningoseptica* (HFam11) an entsprechender Stelle ein Alanin identifiziert (Abbildung 23 A). Andere Mitglieder derselben Hydratase-Familie weisen an Position 248 hingegen ein Leucin auf. Aufgrund der großen Unterschiede der identifizierten Aminosäuren im Hinblick auf ihre Größe und chemischen Eigenschaften wurde das Alanin der *Em*-OAH an Position 248 für eine Sättigungsmutagenese ausgewählt.

Durch eine Analyse der *Em*-OAH Kristallstruktur (PDB Code: 4UIR) wurde darüber hinaus Aminosäure 227 (F227) als vielversprechende Position zur Verkleinerung der Substratbindetasche identifiziert (Abbildung 23 B). Das Phenylalanin ist Teil eines C-

terminalen Endes einer alpha-Helix, welche in die Richtung der C=C Bindung zeigt, und ist möglicherweise an der Stabilisierung einer positiven Ladung im Rahmen des katalytischen Mechanismus beteiligt.⁷⁸ Die Aminosäure wurde gegen die beiden ebenfalls aromatischen Aminosäuren Tryptophan (F227W) und Tyrosin (F227Y) ausgetauscht, da dies eventuell durch Kation- π -Interaktionen zwischen dem Aromaten und dem katalytischen Intermediat die Stabilisierung eines primären Carbokations und somit den Umsatz des kurzkettigen Substrates Dec-9-ensäure ermöglicht. Die Hydratisierung der C10-Fettsäure, welche eine terminale C=C Bindung besitzt, war bisher nicht erfolgreich (siehe Kapitel 3.1.5). Neben den beiden oben genannten Mutanten wurde darüber hinaus die *Em*-OAH Variante F227L ausgewählt, da die verzweigte Aminosäure Leucin in 1 % der Wildtyp-Sequenzen (HFam6, HFam7, HFam8 und HFam9) an Position 227 des Alignments identifiziert wurde. Das Phenylalanin ist hingegen in 98 % aller Sequenzen konserviert.⁶³

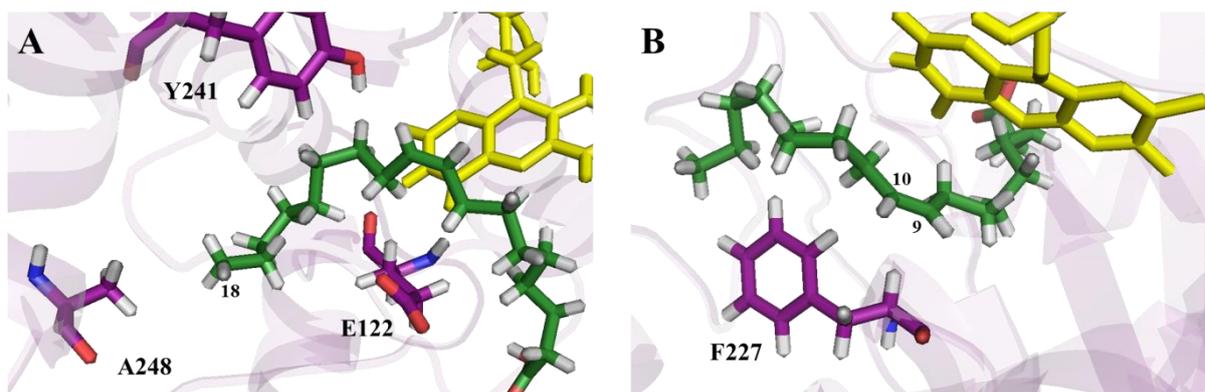


Abbildung 23: Die Aminosäurepositionen A248 und F227 wurden für eine (semi-)rationale Mutagenese ausgewählt
 Dargestellt ist die Substratbindetasche des *Em*-OAH Wildtypenzym mit dem gebundenen Cofaktor FAD (gelb) und dem Docking-Ergebnis für das natürliche Substrat Ölsäure (grün). **A:** Alanin 248 (lila) wurde als Spezifität-bestimmende Position identifiziert und für eine Sättigungsmutagenese ausgewählt. Das terminale Kohlenstoffatom der Ölsäure zeigt in die Richtung des A248 (4 Å Abstand) und ist mit der Nummer 18 gekennzeichnet. Die katalytischen Aminosäuren Y241 und E122 sind ebenfalls in lila dargestellt. **B:** Phenylalanin 227 (lila) ist Teil eines C-terminalen Endes einer α -Helix, welche in die Richtung der C=C Bindung zeigt (3,5 Å Abstand). Die Kohlenstoffatome der C=C Bindung sind mit den Zahlen 9 und 10 nummeriert.

Die *Em*-OAH Varianten A248L, A248E, A248H, F227Y und F227L wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Samuel Kleehammer generiert und bereits hinsichtlich einer Hydratisierungsaktivität mit ausgewählten Substraten analysiert (3.3).¹²⁶ Alle verbleibenden Varianten wurden ebenfalls mittels QuikChange Mutagenese (2.6.6) generiert, über eine Auftragssequenzierung (2.6.5) verifiziert und heterolog in *E. coli* BL21 DE3 exprimiert (2.7.2). Das Ergebnis der heterologen Genexpression aller Mutanten wurde über eine SDS-PAGE (2.8.2) analysiert. Der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (siehe Anhang, Abbildung A 1) diente für die Identifizierung des ca. 70 kDa Proteins (nicht dargestellt). Die

Stärke der OAH-Proteinbande aller 22 generierter Einzelmutanten war vergleichbar mit der Bandenstärke des *Em*-OAH Wildtypenzym (Abbildung 24).

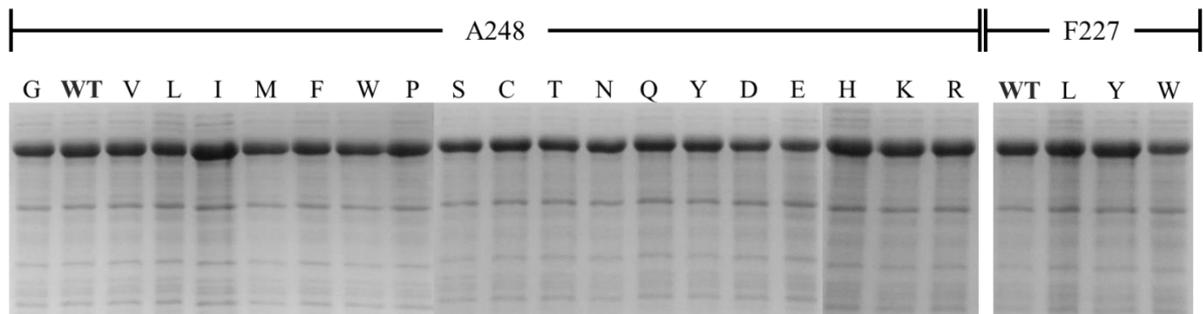


Abbildung 24: SDS-PAGE des *Em*-OAH Wildtypenzym und der generierten Mutanten (10 µg Protein, Lysat)

Die Induktion der heterologen Genexpression der 400 ml Hauptkulturen erfolgte bei einer OD_{600} von 0,5-0,7 durch Zugabe von IPTG (0,5 mM finale Konzentration). Nach 20-stündiger Inkubation wurden die Zellen geerntet, in 50 mM Citratpuffer (pH 6) gewaschen und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mithilfe des Pierce BCA Protein Assay Kits gemäß der Anleitung des Herstellers. Nach erfolgter Probenvorbereitung wurden 10 µg Protein der Lysatfraktionen mithilfe einer SDS-PAGE analysiert.

Die von Samuel Kleehammer charakterisierten *Em*-OAH Varianten wurden im nachfolgenden Aktivitätsscreening erneut mitgeführt. Dies ermöglichte neben einer Verifizierung der erhaltenen Ergebnisse einen direkten Vergleich aller Mutanten. Darüber hinaus wurde im Rahmen der Bachelorarbeit nur eine Auswahl bestimmter Substrate getestet (3.3).¹²⁶

Die enzymatische Aktivität und das Substratspektrum aller generierter Varianten wurden in Ganzzellbiotransformationen im Hinblick auf die Hydratisierung der Alkene 1-Decen und 1-Octen und ausgewählter Fettsäuren (Ölsäure, Palmitinsäure, Myristoleinsäure, (*Z*)-Undec-9-ensäure, Dec-9-ensäure) analysiert. Aufgrund der zuvor erhaltenen Ergebnisse (Abbildung 20) wurde für die Alken-Hydratisierung Heptansäure als Fettsäure-Dummy-Substrat eingesetzt. Reaktionsbedingungen, Inkubationszeit, Probenaufbereitung und GC-Analyse wurden auf das jeweilige Substrat angepasst (2.9.10 & 2.12). Die Aktivität des Wildtypenzym mit den verschiedenen Substraten wurde jeweils auf 100 % gesetzt. Abbildung 25 präsentiert die Ergebnisse zur enzymatischen Hydratisierung von Ölsäure, (*Z*)-Undec-9-ensäure, 1-Decen und 1-Octen unter Verwendung der drei *Em*-OAH F227-Varianten. Die Resultate zur Hydratisierung von Palmitinsäure (C16) und Myristoleinsäure (C14) sind im Anhang unter Abbildung A 17 dargestellt.

Der Austausch des Phenylalanins 227 gegen ein Leucin, Tyrosin und Tryptophan zeigte einen großen Einfluss auf die enzymatische Aktivität der Ölsäure-Hydratase. Die relative Produktbildung mit Ölsäure (C18; bis zu 2 % rel. Produktbildung), 1-Decen (C10; bis zu 11 %) und 1-Octen (C8; bis zu 37 %) war im Vergleich zum Wildtyp deutlich verringert. Auch im Hinblick auf die Hydratisierung der mittelkettigen Fettsäuren Palmitinsäure (C16;

bis zu 6 %) und Myristoleinsäure (C14; bis zu 72 %) zeigte sich ein deutlicher Aktivitätsverlust (siehe Anhang, Abbildung A 17). Mit der kurzkettigen C11-Fettsäure (Z)-Undec-9-ensäure hingegen wurde für die *Em*-OAH Varianten F227Y und F227W eine 2,5- bzw. 2-fache Aktivitätssteigerung ermittelt (Abbildung 25). Die Hydratisierung der C10-Fettsäure Dec-9-ensäure mit terminaler C=C Bindung wurde jedoch mit keiner der generierten Mutanten beobachtet.

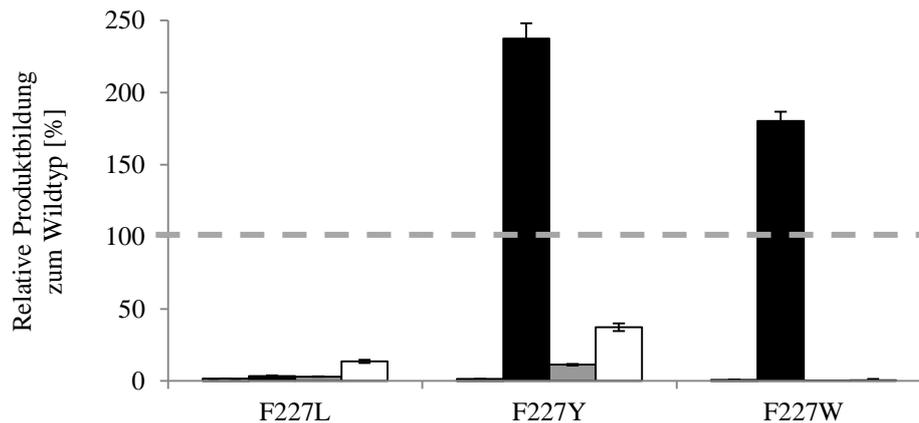


Abbildung 25: Fettsäure (Ölsäure & (Z)-Undec-9-ensäure) und Alken (1-Decen & 1-Octen) Hydratisierung der *Em*-OAH F227-Varianten

Fettsäure- und Alken-Biotransformationen wurden im 500 µl Maßstab in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bzw. 2 ml Glas-Vials durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen, Inkubationszeit und Probenaufbereitung wurden auf das jeweilige Substrat angepasst. Die Reaktionen wurden durch Substratzugabe (0,5 mM, 1 % (v/v) finale DMSO Konzentration) gestartet. Für die Alkene wurde Heptansäure (0,5 mM) als Dummy-Substrat eingesetzt. Nach erfolgter Inkubation wurde die Produktbildung mittels GC-FID analysiert. Dargestellt ist die relative Produktbildung, wobei das Ergebnis des Wildtyp-Ansatzes auf 100 % gesetzt wurde (gestrichelte Linie).

10-Hydroxyoctadecansäure (■); 10-Hydroxyundecansäure (■); 2-Decanol (■); 2-Octanol (□)

Das Ergebnis des Aktivitätsscreenings zur Sättigungsmutagenese des Alanins 248 lässt auf eine große Bedeutung dieser Aminosäureposition für die Substratspezifität der Ölsäure-Hydratase schließen. Für eine bessere Übersicht wurden die Resultate auf verschiedene Abbildungen aufgeteilt. Abbildung 26 präsentiert die enzymatische Hydratisierung von Ölsäure, (Z)-Undec-9-ensäure, 1-Decen und 1-Octen unter Verwendung der *Em*-OAH A248-Varianten mit einer hydrophoben Aminosäuresubstitution. Der Effekt des Aminosäureaustausches wurde bei dieser Mutantengruppe am deutlichsten und wird daher hier hervorgehoben. Das Ergebnis des Aktivitätsscreenings aller A248-Mutanten mit allen Substraten ist im Anhang unter Abbildung A 18 (C18-C14-Fettsäuren) und Abbildung A 19 (C11-FS & Alkene) aufgeführt.

In Abhängigkeit der Substratkettenlänge wurden generelle Tendenzen hinsichtlich der Hydrataseaktivität der Varianten beobachtet. Um nicht jede Mutante mit jedem Substrat im Einzelnen zu diskutieren, wurde stattdessen für jedes Substrat der Mittelwert der relativen

Produktbildung alle Mutanten im Vergleich zum Wildtyp bestimmt. Während die Hydrataseaktivität mit den langkettigen Fettsäuren Ölsäure (C18; Ø28 % rel. Produktbildung) und Palmitinsäure (C16; Ø40 %) für die meisten Varianten der Sättigungsmutagenese stark verringert war, wurde der Umsatz der mittelkettigen C14-Fettsäure Myristoleinsäure (Ø80 %) durch die eingeführte Mutation in deutlich geringerem Maße beeinflusst (siehe Anhang, Abbildung A 18). Im Falle des kurzkettigen Substrates (Z)-Undec-9-ensäure (C11; Ø114 %) wurde für viele Varianten sogar eine Aktivitätszunahme beobachtet, welche in eine Steigerung der relativen Produktbildung von bis zu 300 % resultierte (siehe Anhang, Abbildung A 19). Eine Hydratisierung der C10-Fettsäure Dec-9-ensäure mit terminaler C=C Bindung wurde jedoch für keine der generierten Mutanten ermittelt. Der Einfluss der Substrat-Kettenlänge auf die enzymatische Hydratisierung wurde auch im Rahmen der Alken-Biotransformationen mit Heptansäure als Dummy-Substrat beobachtet. Während die Aktivität mit 1-Decen (C10; Ø25 %) für die meisten A248-Varianten deutlich verringert war, wurde hingegen für das C8-Alken 1-Octen (Ø190 %) eine deutliche Umsatzsteigerung ermittelt, welche in einer bis zu 7-fach erhöhten relativen Produktbildung resultierte (siehe Anhang, Abbildung A 19).

Die Analyse des Aktivitätsscreenings im Hinblick auf die Eigenschaften und die Struktur der jeweils eingeführten Aminosäure zeigt, dass die Aktivität bzw. Substratspezifität eindeutig mit der Größe des Aminosäurerestes korreliert (Abbildung 26). Es scheint, dass insbesondere größere (hydrophobe) Aminosäuren an Position 248 die Hydratisierung kurzkettiger nicht-natürlicher Substrate begünstigen. Beispiele hierfür sind unter anderem die *Em*-OAH Varianten A248V, A248L und A248I im Falle von 1-Octen mit Heptansäure-Dummy-Substrat und die Varianten A248I, A248F und A248Q im Hinblick auf den Umsatz der C11-Fettsäure (Z)-Undec-9-ensäure. Sehr kleine und langkettige Aminosäuren wie zum Beispiel Glycin bzw. Tryptophan und Arginin wirken sich hingegen negativ auf die Hydrataseaktivität mit 1-Octen bzw. (Z)-Undec-9-ensäure aus. Besonders auffällig ist das Ergebnis der Tryptophan-Mutante (A248W), da es sich hierbei um die einzige Variante handelt, welche im Vergleich zum Wildtyp mit der C11-Fettsäure eine höhere relative Produktbildung aufwies aber gleichzeitig mit 1-Octen und Heptansäure-Dummy-Substrat weniger aktiv war als der Wildtyp (Abbildung 26).

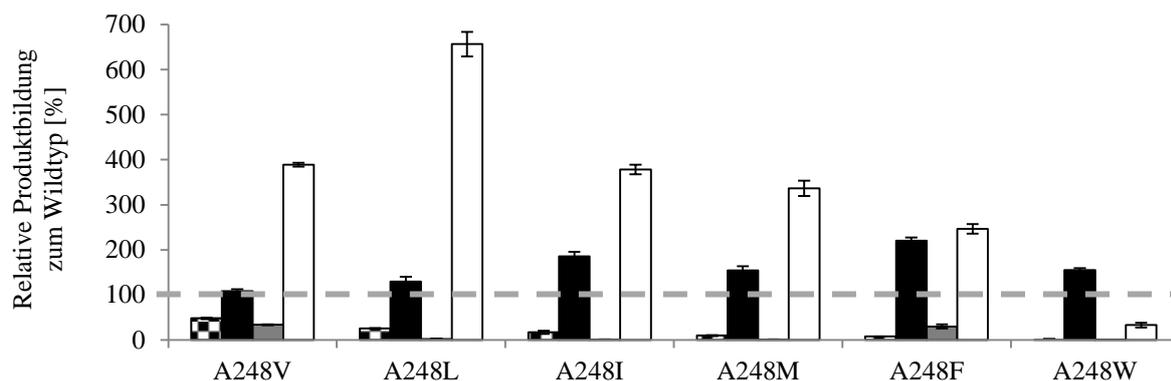


Abbildung 26: Fettsäure (Ölsäure & (Z)-Undec-9-ensäure) und Alken (1-Decen & 1-Octen) Hydratisierung ausgewählter *Em*-OAH A248-Varianten

Fettsäure- und Alken-Biotransformationen wurden im 500 μ l Maßstab in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bzw. 2 ml Glas-Vials durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen wurden auf das jeweilige Substrat angepasst. Die Assays wurden durch Substratzugabe (0,5 mM, 1 % (v/v) finale DMSO Konzentration) gestartet. Für die Alkene wurde Heptansäure (0,5 mM) als Dummy-Substrat eingesetzt. Nach erfolgter Inkubation wurde die Produktbildung mittels GC-FID analysiert. Dargestellt ist die relative Produktbildung, wobei das Ergebnis des Wildtyp-Ansatzes auf 100 % gesetzt wurde (gestrichelte Linie).

10-Hydroxyoctadecansäure (▨); 10-Hydroxyundecansäure (■); 2-Decanol (■); 2-Octanol (□)

Die (semi-)rationale Mutagenese der *Em*-OAH resultierte in einige Varianten mit einer im Vergleich zum Wildtypenzym deutlich erhöhten Aktivität im Hinblick auf die Hydratisierung des Alkens 1-Octen mit Heptansäure als Dummy-Substrat. Die drei besten Mutanten (A248V/L/I) wurden nachfolgend für eine Quantifizierung des Produktes 2-Octanol ausgewählt (Abbildung 27). Die Produktkonzentration stieg mit zunehmender Inkubationszeit zunächst stetig an, bevor nach fünf bis sechs Tagen ein Plateau erreicht wurde. Mit der besten Mutante (A248L) wurde mit 500 μ M 1-Octen und äquimolarer Heptansäure-Konzentration ein maximaler Substratumsatz von 32 % (160 μ M 2-Octanol) erreicht. Alle Mutanten zeigten eine exzellente Stereoselektivität mit einem Enantiomerenüberschuss von >99 % (siehe Anhang, Abbildung A 20).

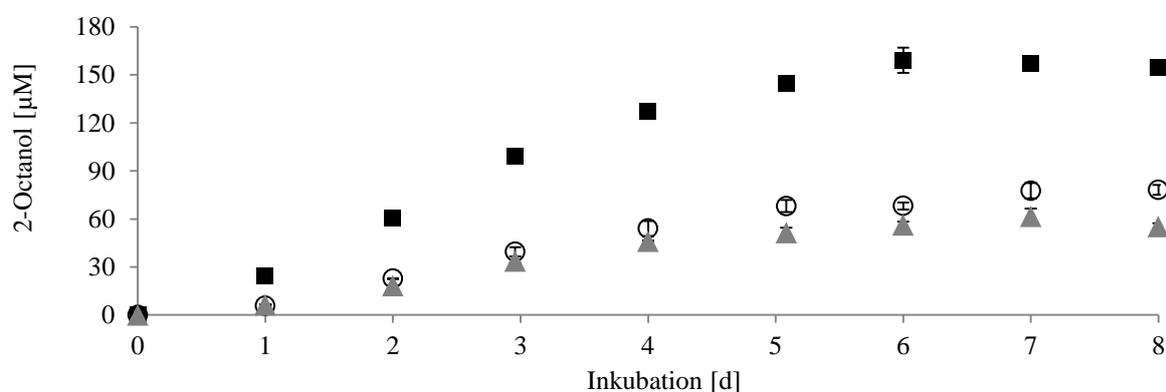


Abbildung 27: 1-Octen Hydratisierung zu 2-Octanol durch die *Em*-OAH Variante A248L/I/V

Die 1-Octen Biotransformationen erfolgten im 500 μ l Maßstab in 2 ml Glas-Vials unter optimierten Bedingungen über acht Tage bei 25 °C und 180 Upm. Heptansäure (0,5 mM) diente als Fettsäure-Dummy-Substrat und die Reaktionen wurden durch Substratzugabe (0,5 mM, 1 % (v/v) finale DMSO Konzentration) gestartet. Nach erfolgter Inkubation wurde die Produktbildung mittels GC-FID quantifiziert.

A248L (■); A248I (○); A248V (▲)

3.6 Hydratisierung kurzkettiger Alkene (C7-C5)

Durch die (semi-)rationale Mutagenese des *Em*-OAH Wildtypenzym an Position A248 und F227 und das anschließende Aktivitätsscreening wurden interessante Varianten im Hinblick auf die Hydratisierung kurzkettiger Alkene identifiziert. Hierbei handelt es sich beispielsweise um alle Mutanten mit einer erhöhten Aktivität in Bezug auf das Substrat 1-Octen (u. a. A248V/L/I). Von besonderem Interesse ist die *Em*-OAH Variante A248W, welche im Vergleich zum Wildtyp mit der C11-Fettsäure eine höhere relative Produktbildung aufwies aber gleichzeitig mit 1-Octen weniger aktiv war als der Wildtyp. Gleiches gilt auch für die Mutanten F227Y und F227W. Die Verwendung sehr kleiner Substrate und kurzkettiger Fettsäure-Dummy-Substrate, wie zum Beispiel Pentansäure, könnte in diesem Fall in die Bildung neuer Produkte resultieren. Sieben Alkene mit einer Kettenlänge zwischen sieben und fünf Kohlenstoffatomen wurden ausgewählt um nachfolgend das Substratspektrum vielversprechender Varianten weiter zu analysieren (Abbildung 28). Darunter neben den terminalen Alkene 1-Hepten, 1-Hexen und 1-Penten auch die subterminal-ungesättigten Moleküle *cis/trans*-2-Hexen und *cis/trans*-2-Penten.

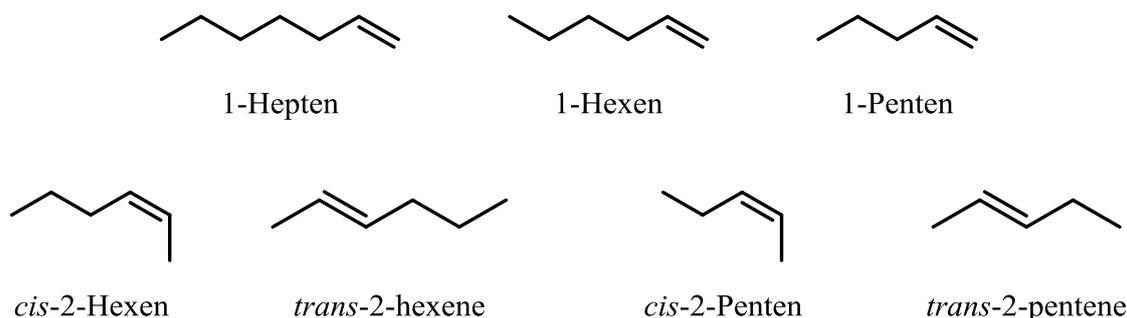


Abbildung 28: Auswahl kurzkettiger Alkene für die Hydratisierung mithilfe der generierten *Em*-OAH Varianten

3.6.1 Etablierung eines Zweiphasensystems

Aufgrund der hohen Volatilität der ausgewählten Alkene (Abbildung 28) wurde zunächst ein Zweiphasensystem etabliert. Dieses sollte den Verlust der flüchtigen Substrate in die Gasphase reduzieren und somit die Verfügbarkeit für den enzymatischen Umsatz steigern. Das kurzkettige Alken 1-Octen mit Heptansäure-Dummy-Substrat und die *Em*-OAH Variante mit dem höchsten 1-Octenumsatz (A248L) dienten als Modellsubstrat bzw. Biokatalysator. Da der Fokus des Zweiphasensystems auf einer Steigerung der Produktbildung lag, wurde jeweils die relative Produktbildung im Vergleich zum Kontrollansatz analysiert ohne eine entsprechende Quantifizierung der Produktkonzentration vorzunehmen.

Die 1-Octen Hydratisierung wurde unter Verwendung von sechs verschiedenen Lösemitteln (LM; Cyclohexan, Toluol, CPME, MTBE, MIBK und *p*-Xylol) analysiert und mit Biotransformationen ohne LM-Zugabe verglichen. Es wurde jedoch bei 10 % (v/v) Solvensanteil im Reaktionsansatz auch nach viertägiger Inkubation keine Produktbildung beobachtet. Stattdessen zeigten die Biotransformationen eine deutliche Trübung, welche in den Kontroll-Ansätzen ohne LM nicht auftrat. Aufgrund dieser Beobachtung wurden für die weitere Analyse „frische“ Expressionskulturen der *Em*-OAH A248L verwendet, während bisher mit eingefrorenen Zellpellets gearbeitet worden war. Im Anschluss an die heterologe Genexpression im *E. coli* Expressionsstamm BL21 (DE3) wurden die Zellen somit gewaschen und direkt, d.h. ohne Gefrierschritt, für die Biotransformation eingesetzt (2.7.2). Die „frischen“ Zellkulturen wurden in einem Zweiphasensystem mit dem gängigen Lösemittel Cyclohexan (CH) und dem LM Cyclopentylmethylether (CPME), welches bereits erfolgreich in Biotransformationen mit Imin Reduktasen¹²⁷ eingesetzt wurde, analysiert. Es wurden zwei verschiedene LM-Volumina (10 %, 50 % (v/v)) und Substratkonzentrationen (0,5 mM, 1,5 mM) eingesetzt. Während die Cyclohexan-Biotransformationen am Ende der Inkubation eine klare Phasentrennung aufwiesen, zeigten die Ansätze mit CPME-Zugabe bereits nach einem Tag eine deutliche Trübung. Eine Hydrataseaktivität wurde jedoch in keinem der Zweiphasensysteme beobachtet. Die Etablierung eines Zweiphasensystems zur Hydratisierung kurzkettiger flüchtiger Alkene war somit unter den gewählten Bedingungen nicht erfolgreich. Da sich die verwendeten Lösemittel möglicherweise inhibierend auf die Aktivität der Ölsäure-Hydratase auswirken, wurden mithilfe einer Literaturrecherche weitere organische Lösemittel mit einer Anwendung in Zweiphasensystemen ermittelt.^{118,127–132} Abbildung 29 präsentiert eine Übersicht der ausgewählten Lösemittel.

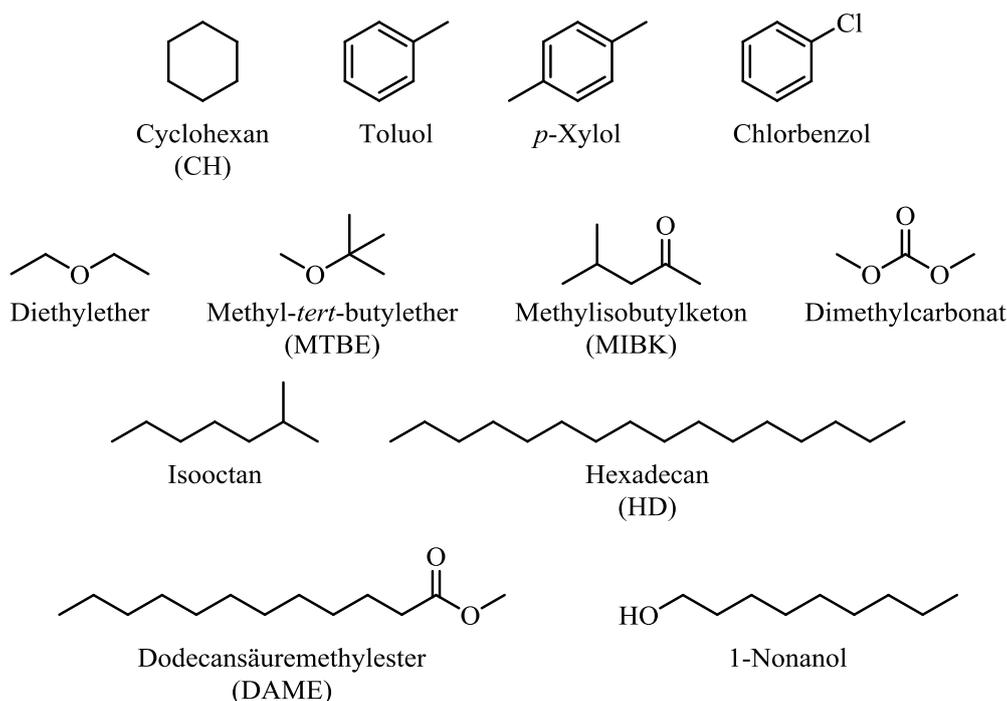


Abbildung 29: Organische Lösemittel mit Anwendung in Zweiphasensystemen

Neben der Wahl der organischen Phase könnte auch die geringe Löslichkeit des Alkens in der wässrigen Phase und somit die Substratverfügbarkeit ein Problem für die Anwendung eines Zweiphasensystems darstellen. Die oben abgebildeten Lösemittel (Abbildung 29) wurden daher in Biotransformationen mit einer deutlich erhöhten Substratkonzentration eingesetzt. Um eine finale Substrat- und Dummy-Substrat-Konzentration von 5 mM zu gewährleisten, wurden Ethanol-Stocks anstelle von DMSO-Stocklösungen verwendet. Ein Kontrollansatz ohne Zweiphasensystem zeigte jedoch, dass die Hydrataseaktivität bei einem Anteil von 5 % (v/v) Ethanol als Cosolvens im Vergleich zum Standardansatz (1 % (v/v) DMSO) stark verringert war (17 % relative Produktbildung, nicht dargestellt). Ethanol eignete sich somit nicht als Cosolvens für *Em*-OAH Biotransformationen.

Stattdessen wurde in einem zweiten Ansatz die direkte Zugabe von 10 mM 1-Octen und Heptansäure-Dummy-Substrat ohne Verwendung eines Cosolvens analysiert. Dieses Vorgehen ermöglicht hohe Substratkonzentrationen ohne die Gefahr inhibierender Effekte durch eine hohe Cosolvens-Konzentration. Als Kontrollansatz dienten Standardbedingungen (0,5 mM Substrat- und Dummy-Substrat, 1 % (v/v) DMSO) und Biotransformationen mit direkter Zugabe von 10 mM 1-Octen und Heptansäure ohne Lösemittelzusatz. Das Ergebnis des Aktivitätsscreenings der *Em*-OAH Variante A248L nach viertägiger Inkubation ist in Abbildung 30 dargestellt. Es handelt sich um Mittelwerte aus Doppelbestimmungen, wobei

das Resultat des Kontrollansatzes unter Standardbedingungen auf 100 % gesetzt wurde. Während die beiden Kontrollansätze ohne Zugabe eines Lösemittels eine vergleichbare Produktbildung aufwiesen, war die Hydrataseaktivität in den Zweiphasensystemen mit 10 % (v/v) Solvenszusatz deutlich verringert (max. 15 % relative Produktbildung). Die besten Ergebnisse wurden mit Dodecansäuremethylester (DAME), Hexadecan (HD), Chlorbenzol und 1-Nonanol erhalten.

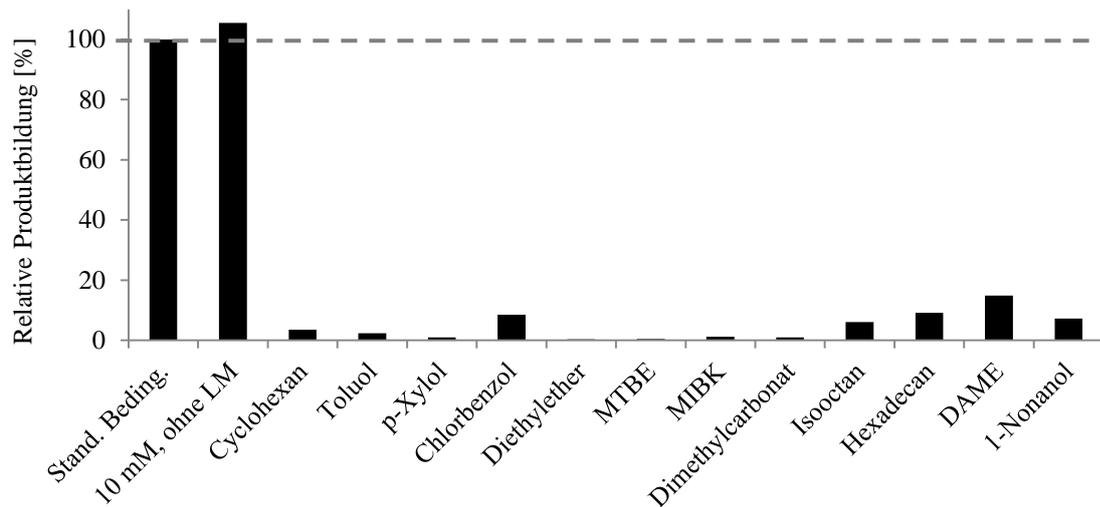


Abbildung 30: 1-Octen Hydratisierung in Zweiphasensystemen mit 10 mM Substrat und Dummy-Substrat

Die Biotransformationen wurden im 500 µl Maßstab in 2 ml Glas-Vials unter optimierten Bedingungen mit der *Em*-OAH Variante A248L durchgeführt. Heptansäure (10 mM) diente als Fettsäure-Dummy-Substrat und die Reaktionen wurden durch Substratzugabe (10 mM 1-Octen) gestartet. Als Kontrollansatz dienen Biotransformationen unter Standardbedingungen (0,5 mM Substrat und Dummy-Substrat, 1 % (v/v) finale DMSO-Konzentration). Für die Analyse der Zweiphasensysteme wurden 10 % (v/v) (50 µl) organisches Lösemittel hinzugegeben. Nach viertägiger Inkubation bei 25 °C und 180 Upm wurde die Produktbildung mittels GC-FID analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen, wobei das Resultat des Kontrollansatzes unter Standardbedingungen auf 100 % gesetzt wurde.

Die Anwendung eines Zweiphasensystems resultierte für viele der ausgewählten organischen Lösemittel in einem Aktivitätsverlust der *Em*-OAH Variante A248L mit dem Alken 1-Octen und Heptansäure-Dummy-Substrat (Abbildung 30). Nichtsdestotrotz wurde durch die direkte Zugabe einer hohen Substratkonzentration mit langkettigen, unpolaren Lösemitteln eine relative Produktbildung von bis zu 15 % erreicht. Aufgrund der obigen Ergebnisse wurde die Etablierung eines Zweiphasensystems unter Verwendung von DAME, HD und 1-Nonanol fortgeführt. Darüber hinaus wurden mit 2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan (HMN), Isopropylmyristat (IPM) und Bis(2-ethylhexyl)phthalat (BEHP) drei weitere langkettige/verzweigte/unpolare Lösemittel in die Analyse aufgenommen (Abbildung 31).

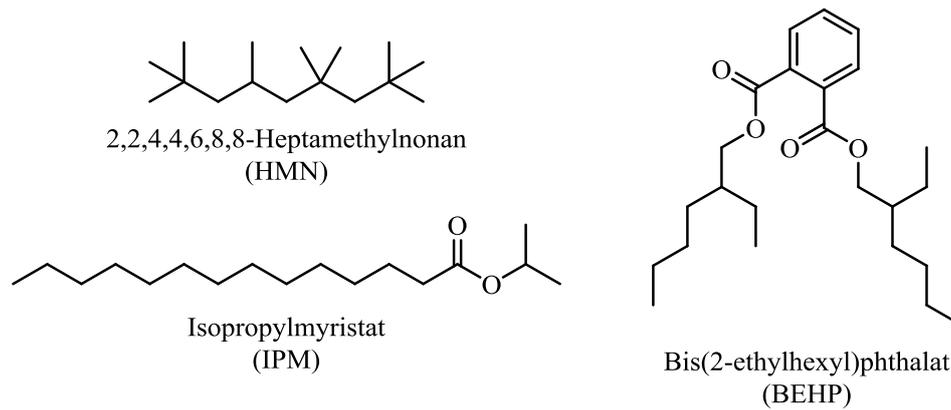


Abbildung 31: Weitere langkettige/verzweigte/unpolare Lösemittel für die Etablierung eines Zweiphasensystems

Um das mögliche Problem der Substratverfügbarkeit weiter zu analysieren, wurden die sechs ausgewählten Lösemittel in Biotransformationen mit 10 mM bzw. 30 mM Substrat- und Dummy-Substrat eingesetzt. Wie bereits zuvor beobachtet, war die Hydrataseaktivität der *Em*-OAH A248L bei Zusatz von 10 % (v/v) organischem Lösemittel (deutlich) verringert (Abbildung 32). Die höchste relative Produktbildung wurde nach siebentägiger Inkubation in Zweiphasensystemen mit DAME (38 % rel. Produktbildung), IPM (79 %) und BEHP (73 %) erhalten. Die Steigerung der Substrat- und Dummy-Substrat-Konzentration auf 30 mM zeigte zumeist keinen positiven Einfluss auf die Produktbildung, resultierte aber in geringere Standardabweichungen.

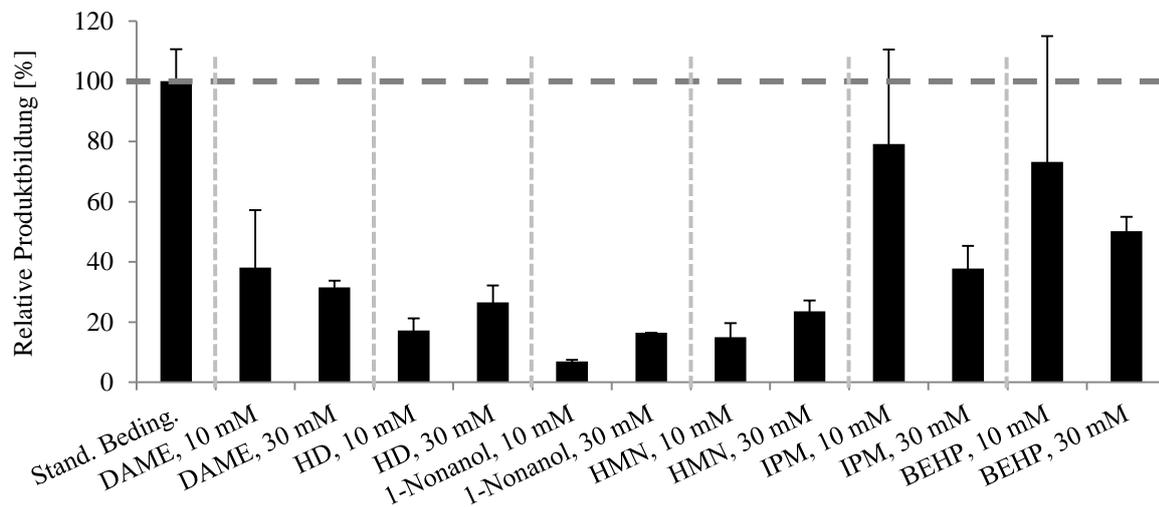


Abbildung 32: 1-Octen Hydratisierung im Zweiphasensystem mit 10 mM und 30 mM Substrat und Dummy-Substrat
Die Biotransformationen wurden im 500 µl Maßstab in 2 ml Glas-Vials unter optimierten Bedingungen mit der *Em*-OAH Variante A248L durchgeführt. Heptansäure (10 mM bzw. 30 mM) diente als Fettsäure-Dummy-Substrat und die Reaktionen wurden durch Substratzugabe (10 mM bzw. 30 mM 1-Octen) gestartet. Als Kontrollansatz dienen Biotransformationen unter Standardbedingungen (0,5 mM Substrat und Dummy-Substrat, 1 % (v/v) finale DMSO-Konzentration). Für die Analyse der Zweiphasensysteme wurden 10 % (v/v) (50 µl) organisches Lösemittel hinzugegeben. Nach siebentägiger Inkubation bei 25 °C und 180 Upm wurde die Produktbildung (Triplikate) mittels GC-FID analysiert. Das Ergebnis des Kontrollansatzes unter Standardbedingungen wurde auf 100 % gesetzt.

Aufgrund der obigen Ergebnisse (Abbildung 32) wurden DAME, BEHP und IPM als vielversprechendste Lösemittel für die Etablierung des Zweiphasensystems ausgewählt. Um die erhaltenen Resultate zu verifizieren, wurde die relative Produktbildung bei drei verschiedenen Substratkonzentrationen (10 mM, 20 mM, 30 mM) analysiert (siehe Anhang, Abbildung A 21). Wie zuvor beobachtet, hatte eine weitere Erhöhung der Substratkonzentration keinen großen Einfluss auf die Produktkonzentration. Da mit bis zu 100 % relativer Produktbildung die höchste enzymatische Aktivität bei Verwendung von BEHP erhalten wurde, wurde die Etablierung des Zweiphasensystems zur Hydratisierung kurzkettiger Alkene mit diesem Solvens fortgeführt. Es zeigte sich, dass eine Erhöhung des Lösemittelvolumens auf 100 µl die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse verbesserte. Darüber hinaus war die relative Produktbildung deutlich verringert, wenn die Biotransformationen während der Inkubation nicht geschüttelt wurden (nicht dargestellt). Um den Substratumsatz weiter zu steigern, wurde sowohl die Bedeutung des Lösemittelvolumens (100-200 µl) als auch der Einfluss der Biofeuchtmasskonzentration (50-100 mg/ml) und der Additive Glucose (100-200 mM) und FAD (0,3-0,6 mM) analysiert (Abbildung 33). Das Ergebnis des Kontrollansatzes unter Standard-Reaktionsbedingungen (50 mg/ml Biofeuchtmasse, 100 mM Glucose, 0,3 mM FAD) mit 100 µl BEHP wurde auf 100 % gesetzt. Während sich die Erhöhung des BEHP-Volumens auf 150 µl und 200 µl negativ auf die Hydrataseaktivität der *Em-OAH A248L* auswirkte, war die Bildung des Produktes 2-Octanol bei Verdopplung der Biofeuchtmasskonzentration auf 100 mg/ml leicht erhöht. Die relative Produktbildung wurde darüber hinaus durch die Verdoppelung der Glucose- und FAD-Konzentration weiter gesteigert (200 mM bzw. 0,6 mM).

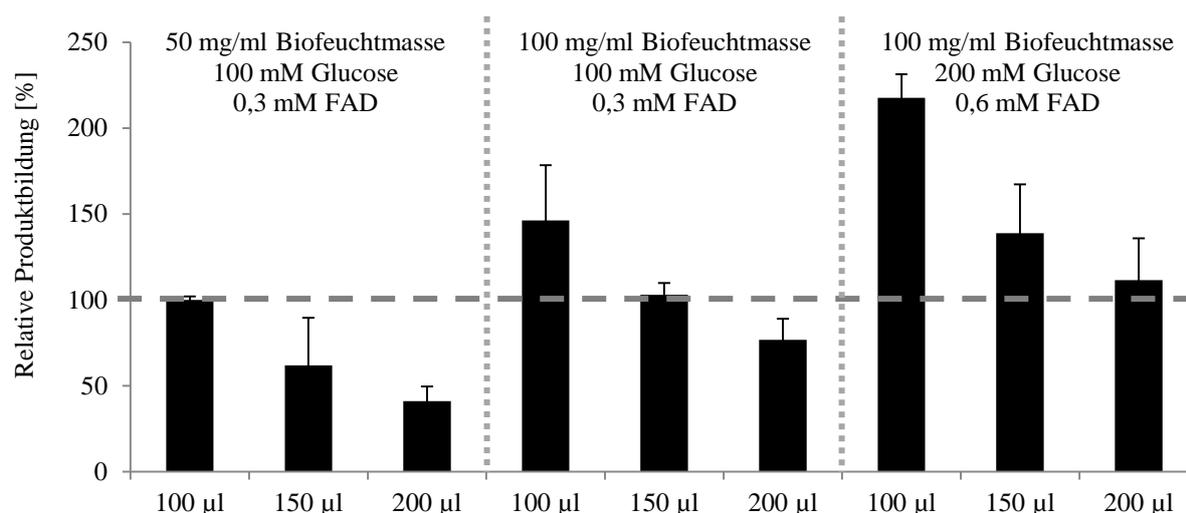


Abbildung 33: 1-Octen Hydratisierung im Zweiphasensystem (100-200 µl BEHP) mit verschiedenen Biomasse-, Glucose- und FAD-Konzentrationen

Die Biotransformationen wurden im 500 µl Maßstab in 2 ml Glas-Vials unter optimierten Bedingungen mit der *Em*-OAH Variante A248L durchgeführt. Heptansäure (10 mM) diente als Fettsäure-Dummy-Substrat und die Reaktionen wurden durch Substratzugabe (10 mM 1-Octen) gestartet. Als Kontrollansatz dienten Biotransformationen unter Standardbedingungen (50 mg/ml Biofeuchtmasse, 100 mM Glucose, 0,3 mM FAD, 100 µl BEHP). Für die Analyse der Zweiphasensysteme wurden 100, 150 bzw. 200 µl organisches Lösemittel hinzugegeben. Nach fünftägiger Inkubation bei 25 °C und 180 Upm wurde die Produktbildung (Triplikate) mittels GC-FID analysiert. Das Ergebnis des Kontrollansatzes unter Standardbedingungen wurde auf 100 % gesetzt.

Im Rahmen der Optimierung des Zweiphasensystems mit BEHP als organisches Lösemittel wurde die höchste relative Produktbildung mit 100 mg/ml Biofeuchtmasse, 200 mM Glucose, 0,6 mM FAD und 100 µl BEHP ermittelt. Eine Steigerung der Substrat- und Dummy-Substrat-Konzentration zeigte hingegen keinen positiven Einfluss auf die Hydratisierung des Alkens 1-Octen durch die *Em*-OAH A248L. Bisher unbeachtet blieb jedoch das Verhältnis von Substrat zu Dummy-Substrat. Aus diesem Grund wurde nachfolgend der Einfluss eines Substrat- bzw. Dummy-Substrat-Überschusses analysiert (Abbildung 34). Das Ergebnis eines Kontrollansatzes mit einer äquimolaren Substrat- und Dummy-Substrat-Konzentration (1:1, jeweils 10 mM) wurde auf 100 % gesetzt. Während die Erhöhung der Heptansäure-Konzentration (1:2, 1:3 & 1:4) in eine Verringerung der relativen Produktbildung resultierte (45-92 %), wurde die enzymatische Hydratisierung durch einen 1-Octen-Überschuss (2:1, 3:1, 4:1, 6:1 & 8:1) deutlich gesteigert. Die höchste relative Produktbildung (550 %) wurde mit 80 mM 1-Octen und 10 mM Heptansäure (8:1) erhalten. Während zuvor ein äquimolares Verhältnis von Substrat und Dummy-Substrat entscheidend war (Abbildung 17), gilt dies im Falle des Zweiphasensystems somit nicht. Bereits erfolgte Versuche zeigten darüber hinaus, dass sich eine Erhöhung des Lösemittelvolumens negativ auf die Produktbildung auswirkt (Abbildung 33). In einem abschließenden Experiment wurde überprüft, ob dies auch der Fall ist, wenn sich das Verhältnis von Biotransformation und organischer Phase dabei nicht

verändert. Dafür wurden 1000 µl und 1500 µl Reaktionsansätze mit 200 µl bzw. 300 µl BEHP überschichtet, während die Standardbedingungen (500 µl Biotransformation, 100 µl organische Phase) als Kontrolle dienten. Es zeigte sich jedoch, dass die relative Produktbildung bei Vergrößerung des Gesamtansatzes selbst bei achtfachem Substratüberschuss sehr gering war (siehe Anhang, Abbildung A 22).

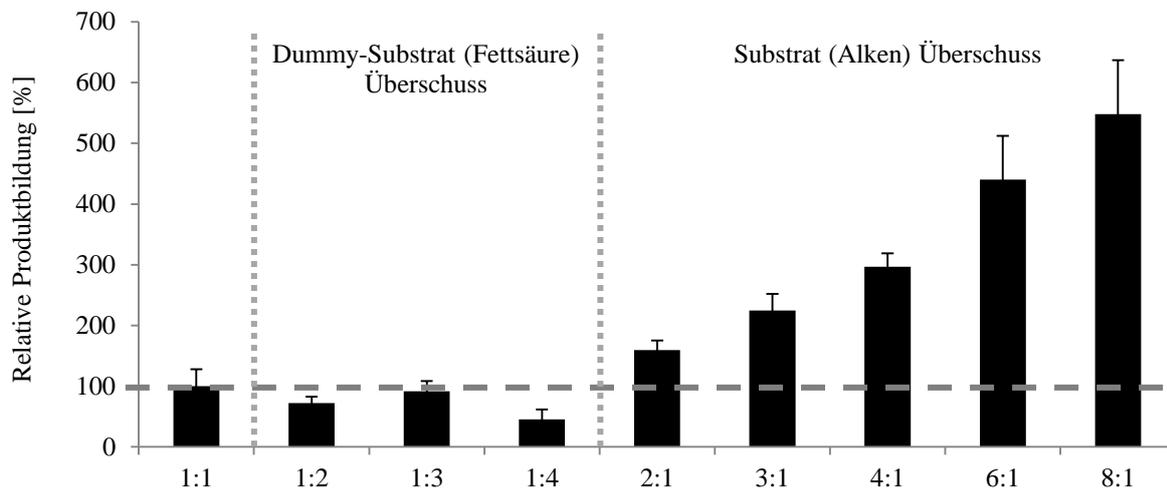


Abbildung 34: 1-Octen Hydratisierung im Zweiphasensystem mit Dummy-Substrat-Überschuss bzw. Substrat-Überschuss

Die Biotransformationen wurden im 500 µl Maßstab in 2 ml Glas-Vials unter optimierten Bedingungen (100 mg/ml Biofeuchtmasse, 200 mM Glucose, 0,6 mM FAD und 100 µl BEHP) mit der *Em*-OAH Variante A248L durchgeführt. Heptansäure (10-40 mM) diente als Fettsäure-Dummy-Substrat und die Reaktionen wurden durch Substratzugabe (10-80 mM 1-Octen) gestartet. Als Kontrollansatz dienten Biotransformationen mit einem äquimolaren Verhältnis von Substrat und Dummy-Substrat (1:1). Nach viertägiger Inkubation bei 25 °C und 180 Upm wurde die Produktbildung (Triplikate) mittels GC-FID analysiert. Das Ergebnis des Kontrollansatzes mit einem äquimolaren Verhältnis wurde auf 100 % gesetzt. Bei der Angabe der Verhältnisse bezieht sich die erste Zahl jeweils auf das Substrat und die zweite Zahl auf das Dummy-Substrat (Bsp. 1:2, 10 mM 1-Octen und 20 mM Heptansäure).

Die Etablierung eines Zweiphasensystems zur Hydratisierung des Alkens 1-Octen mit der *Em*-OAH Variante A248L zeigte, dass insbesondere das Verhältnis von Substrat zu Dummy-Substrat eine entscheidende Rolle für eine hohe Produktbildung spielt. Da das Zweiphasensystem letztendlich für die Hydratisierung kurzkettiger Alkene (<C8) eingesetzt werden sollte und die *Em*-OAH Mutante A248L eine schwache Aktivität mit 1-Hepten aufwies (siehe Anhang, Abbildung A 23), wurde die Analyse nachfolgend mit diesem verkürzten Substrat fortgesetzt. Da der Alken-Überschuss als wichtigster Parameter für die Etablierung des Zweiphasensystems identifiziert wurde, wurde die Produktbildung noch einmal unter optimierten Bedingungen unter Verwendung der vielversprechendsten Lösemittel (Abbildung 32) verglichen. Das Ergebnis des *Em*-OAH A248L Kontrollansatzes unter Standardbedingungen (50 mg/ml Biofeuchtmasse, 100 mM Glucose, 0,3 mM FAD, 0,5 mM Substrat und Dummy-Substrat, 1 % (v/v) finale DMSO-Konzentration) ohne Zweiphasensystem wurde auf 100 % gesetzt. Die schrittweise Erhöhung des Substrat-zu-

Dummy-Substrat Verhältnisses von 10:1 auf 20:1 resultierte unabhängig vom jeweiligen Lösemittel in eine deutliche Steigerung der 2-Heptanol-Bildung (Abbildung 35). Die höchsten Produktkonzentrationen wurden wie auch im Falle von 1-Octen mit BEHP erreicht. Der 20-fache Überschuss des Substrates 1-Hepten resultierte, verglichen mit dem Kontrollansatz, in eine 25-fache Steigerung der relativen Produktbildung.

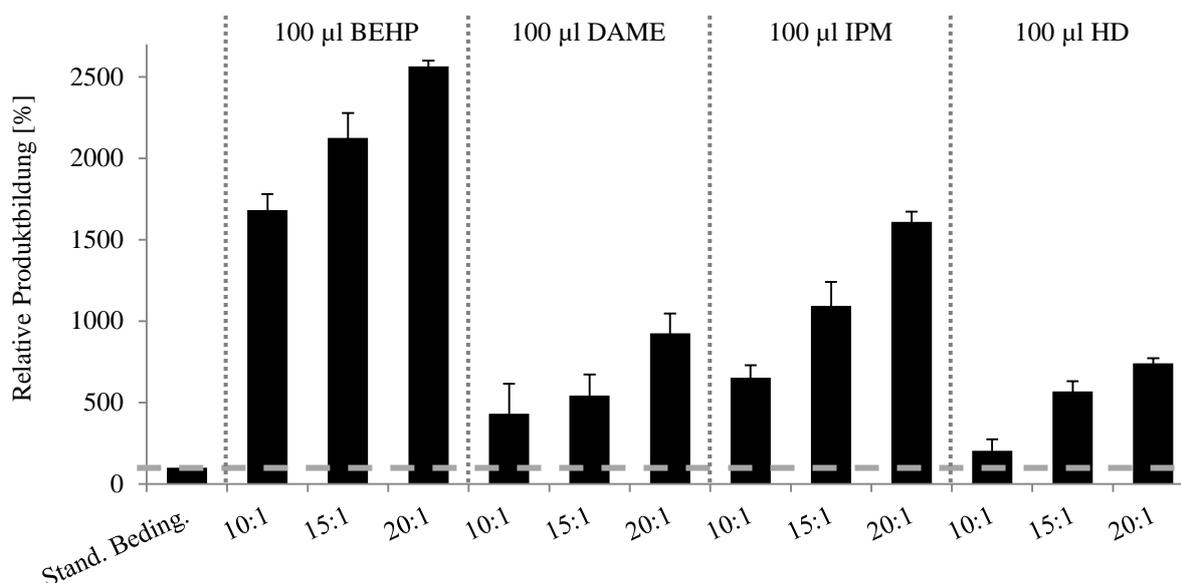


Abbildung 35: 1-Hepten Hydratisierung im Zweiphasensystem mit Substrat-Überschuss (10:1, 15:1, 20:1)

Die Biotransformationen erfolgten im 500 µl Maßstab in 2 ml Glas-Vials unter optimierten Bedingungen (100 mg/ml Biofeuchtmasse, 200 mM Glucose, 0,6 mM FAD) mit der *Em-OAH* Variante A248L. Heptansäure (10 mM) diente als Fettsäure-Dummy-Substrat und die Reaktionen wurden durch Substratzugabe (100-200 mM 1-Octen) gestartet. Für die Analyse des Zweiphasensystems wurden die Ansätze mit 100 µl BEHP/DAME/IPM/HD überschichtet. Als Kontrollansatz dienten Biotransformationen unter Standardbedingungen (50 mg/ml Biofeuchtmasse, 100 mM Glucose, 0,3 mM FAD, 0,5 mM Substrat und Dummy-Substrat, 1 % (v/v) finale DMSO-Konzentration) ohne Zweiphasensystem. Nach fünftägiger Inkubation bei 25 °C und 180 Upm wurde die Produktbildung (Triplikate) mittels GC-FID analysiert. Das Ergebnis des Kontrollansatzes unter Standardbedingungen wurde auf 100 % gesetzt. Bei der Angabe der Verhältnisse bezieht sich die erste Zahl jeweils auf das Substrat und die zweite Zahl auf das Dummy-Substrat (Bsp. 10:1, 100 mM 1-Octen und 10 mM Heptansäure).

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wurde BEHP endgültig für die Anwendung im Zweiphasensystem zur Hydratisierung kurzkettiger Alkene ausgewählt. In einem abschließenden Experiment wurde die Substratkonzentration auf bis zu 300 mM erhöht, während die Dummy-Substrat-Konzentration auf 5 mM bzw. 2,5 mM erniedrigt wurde (siehe Anhang, Abbildung A 24). Wie zuvor beobachtet, resultierte die Erhöhung der 1-Hepten-Konzentration in eine deutliche Zunahme der Hydrataseaktivität der *Em-OAH* A248L. Die höchste relative Produktbildung wurde mit einem Substrat-zu-Dummy-Substrat Verhältnis von 60:1 (300 mM zu 5 mM) erhalten. Das Ergebnis entsprach einer 52-fachen Steigerung der Produktkonzentration, während hingegen ein Verhältnis von 100:1 (250 mM zu 2,5 mM) verglichen mit dem Kontrollansatz in eine nur 47-fache Steigerung resultierte.

3.6.2 Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Umsetzung flüchtiger Alkene ohne Zweiphasensystem

Neben der Etablierung eines Zweiphasensystems wurde eine zweite Strategie für die Hydratisierung kurzkettiger Alkene verfolgt. In diesem Fall sollte die enzymatische Aktivität, d. h. die Produktbildung, durch eine Optimierung der Reaktionsbedingungen mit Fokus auf die Umsetzung flüchtiger Substrate gesteigert werden. Das C7-Alken 1-Hepten und die *Em*-OAH Variante A248L wurden als Modellsubstrat bzw. Biokatalysator ausgewählt. Wie für das Zweiphasensystem wurde jeweils die relative Produktbildung im Vergleich zum Kontrollansatz analysiert ohne eine Quantifizierung der Produktkonzentration vorzunehmen. In einem ersten Versuchsansatz wurde der Einfluss der Substratkonzentration und des finalen Cosolvensanteil analysiert (Abbildung 36). Das Dummy-Substrat Heptansäure wurde jeweils in äquimolarer Konzentration eingesetzt. Das Ergebnis eines *Em*-OAH A248L Kontrollansatzes unter Standardbedingungen (50 mg/ml Biofeuchtmasse, 100 mM Glucose, 0,3 mM FAD, 0,5 mM Substrat und Dummy-Substrat, 1 % (v/v) finale DMSO-Konzentration) wurde auf 100 % gesetzt. Es zeigte sich, dass eine Erhöhung der Substratkonzentration auf 2,5 mM mit 5 % (v/v) finaler DMSO-Konzentration in eine deutliche Steigerung der relativen Produktbildung resultierte (250 %). Ein ähnliches Ergebnis wurde auch durch die direkte Zugabe von 10 mM 1-Hepten ohne Cosolvens erreicht. Mit 5 mM Substrat und 10 % (v/v) DMSO im Ansatz war die Produktbildung hingegen deutlich verringert (54 %). Einen negativen Einfluss auf die enzymatische Aktivität hatte auch der Einsatz von Ethanol als Cosolvens. Bereits eine finale Konzentration von 5 % (v/v) führte zu einem fast vollständigen Aktivitätsverlust des Enzyms.

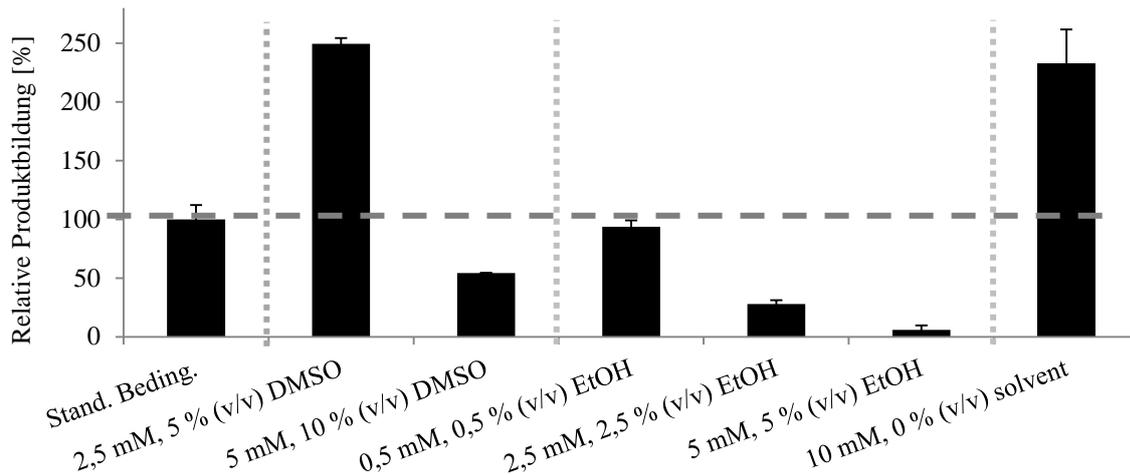


Abbildung 36: 1-Hepten Hydratisierung bei unterschiedlicher Substrat- und Cosolvens-Konzentration

Die Biotransformationen erfolgten im 500 µl Maßstab in 2 ml Glas-Vials mit 100 mM Glucose, 0,3 mM FAD und 50 mg/ml *Em*-OAH Variante A248L. Heptansäure (0,5-10 mM) diente als Fettsäure-Dummy-Substrat und die Reaktionen wurden durch Substratzugabe (0,5-10 mM 1-Hepten) gestartet. Substrat und Dummy-Substrat wurden in äquimolarer Konzentration eingesetzt (DMSO/Ethanol-Stocklösungen). Als Kontrollansatz dienten Biotransformationen unter Standardbedingungen mit 0,5 mM Substrat und Dummy-Substrat und 1 % (v/v) finale DMSO-Konzentration. Nach viertägiger Inkubation bei 25 °C und 180 Upm wurde die Produktbildung (Triplikate) mittels GC-FID analysiert. Das Ergebnis des Kontrollansatzes unter Standardbedingungen wurde auf 100 % gesetzt.

Ein weiteres Experiment zeigte, dass auch „sekundäre“ Parameter wie das Waschen der *Em*-OAH A248L Expressionskulturen, das Schütteln der Reaktionsansätze und insbesondere das Gasvolumen über den Biotransformationen eine wichtige Rolle für die enzymatische Hydratisierung spielen. So wurde die relative Produktbildung durch das „Upscaling“ des Reaktionsvolumens auf 2 ml und die damit verbundene Eliminierung der Gasphase im Vergleich zum Kontrollansatz auf das 6-fache gesteigert (nicht dargestellt). Um die erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren und synergistische Effekte zu überprüfen, wurde die 1-Hepten Hydratisierung nachfolgend mithilfe einer statistischen Versuchsplanung unter Verwendung von MODDE analysiert. Die ausgewählten Parameter wurden wie in Tabelle A 1 (siehe Anhang) dargestellt definiert und die Zusammensetzung der Biotransformationen durch MODDE vorgegeben (Full Fac (2 levels), interaction model). Die enzymatische Aktivität wurde mittels GC-FID analysiert und unter Verwendung der MODDE Software ausgewertet (siehe Anhang, Abbildung A 26). Die höchste Produktbildung wurde mit gewaschenen Zellen, 2 ml Biotransformationsvolumen und 4 mM Substrat und Dummy-Substrat (8 % (v/v) finale DMSO-Konzentration) erhalten. Das Schütteln der Reaktionsansätze hatte unter diesen Bedingungen keinen großen Einfluss auf die 1-Hepten Hydratisierung durch die *Em*-OAH A248L.

Auffällig war, dass eine Erhöhung der Substrat- und Dummy-Substrat-Konzentration auf 4 mM (8 % (v/v) DMSO) bei Eliminierung der Gasphase keine negative Auswirkung auf die

Produktbildung zeigte, während zuvor bei 500 µl Reaktionsvolumen mit 5 mM 1-Hepten und Heptansäure (10 % (v/v) DMSO) eine deutliche Verringerung der Hydrataseaktivität beobachtet worden war (Abbildung 36). Aus diesem Grund wurde nachfolgend der Einfluss der Substrat- und DMSO-Konzentration unter Anwendung des optimierten Reaktionsvolumens (2 ml) analysiert. Das Dummy-Substrat wurde jeweils in äquimolarer Konzentration eingesetzt und das Ergebnis eines Kontrollansatzes mit 0,5 mM 1-Hepten und Heptansäure (1 % (v/v) finaler DMSO-Anteil) wurde auf 100 % gesetzt. Verglichen wurde die Produktbildung unter Verwendung von DMSO-Stocklösungen und bei direkter Zugabe von 1-Hepten und Heptansäure mit schrittweiser Erhöhung der DMSO-Konzentration als Additiv (Abbildung 37). Die relative Produktbildung stieg zunächst mit Substrat-Konzentrationen von bis zu 6 mM und 12 % (v/v) DMSO-Anteil deutlich an. Eine weitere Erhöhung der 1-Hepten- bzw. DMSO-Konzentration (8-10 mM, 16-20 % (v/v)) resultierte hingegen in einer Verringerung der Hydrataseaktivität der *Em*-OAH A248L. Das beste Ergebnis wurde durch die direkte Zugabe von 10 mM 1-Hepten ohne Verwendung eines Cosolvens erreicht (730 % rel. Produktbildung). Die Zugabe von DMSO als Additiv resultierte in eine deutliche Verringerung der relativen Produktbildung um 60-70 %. Auffällig war hierbei, dass mit 4-12 % (v/v) DMSO-Anteil bessere Ergebnisse erhalten wurden als mit 1 % (v/v) finaler DMSO-Konzentration.

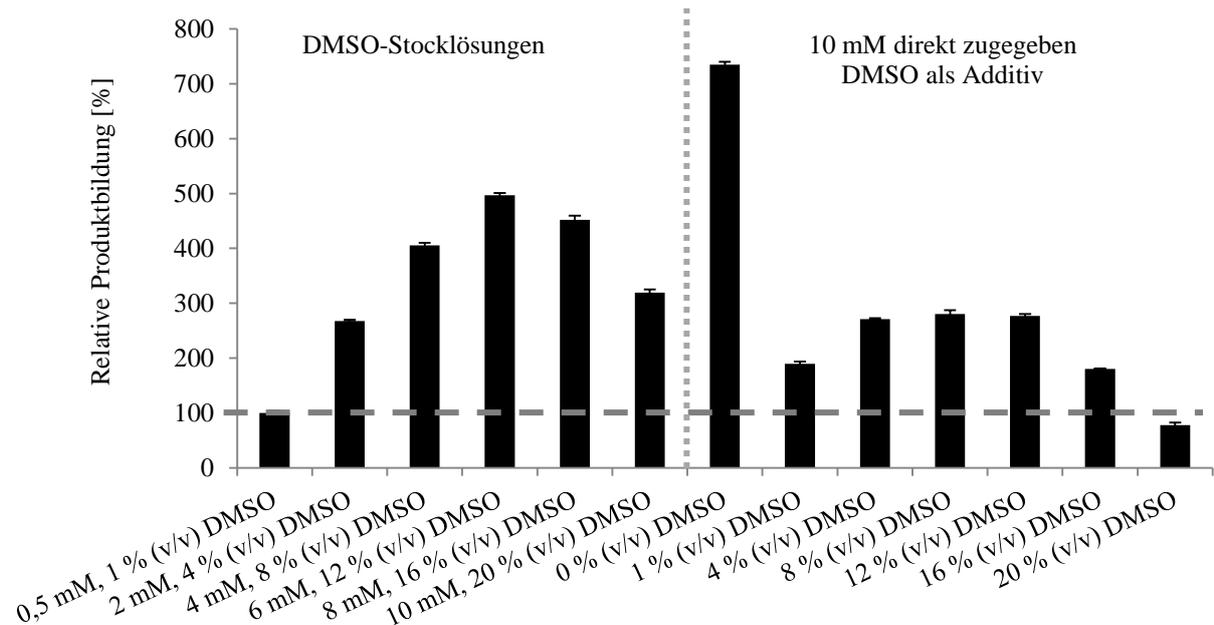


Abbildung 37: 1-Hepten Hydratisierung bei verschiedenen Substrat- und DMSO-Konzentrationen

Die Biotransformationen erfolgten im 2 ml Maßstab in 2 ml Glas-Vials mit 100 mM Glucose, 0,3 mM FAD und 50 mg/ml *Em*-OAH A248L. Heptansäure (0,5-10 mM) diente als Dummy-Substrat und die Reaktionen wurden durch Substratzugabe (0,5-10 mM 1-Hepten) gestartet. Substrat und Dummy-Substrat wurden in äquimolarer Konzentration eingesetzt. Während für den ersten Versuchsteil DMSO-Stocklösungen verwendet wurden, wurden die Substanzen für die zweite Analyse direkt ohne Cosolvens zugegeben und DMSO (1-20 % (v/v) finale Konzentration) wurde als Additiv zugesetzt. Nach dreitägiger Inkubation bei 25 °C wurde die Produktbildung (Triplikate) mittels GC-FID analysiert. Das Ergebnis eines Kontrollansatzes mit 0,5 mM Substrat und Dummy-Substrat und 1 % (v/v) finale DMSO-Konzentration wurde auf 100 % gesetzt.

Aufgrund der obigen Ergebnisse wurde nachfolgend auf DMSO als Cosolvens verzichtet. Stattdessen wurden für eine weitere Optimierung der Reaktionsbedingungen verschiedene Substrat- und Dummy-Substrat-Konzentrationen durch direkte Zugabe der Komponenten analysiert. Darüber hinaus wurde der Einfluss der Biomasse-, Glucose- und FAD-Konzentration untersucht. Während die relative Produktbildung durch eine Verdopplung der Biofeuchtmasse und der Additive (Glucose, FAD) mit 10 mM 1-Hepten und Heptansäure auf 160 % gesteigert wurde, resultierte eine Erhöhung der Substrat- und Dummy-Substrat-Konzentration auf 20-30 mM in eine leichte Verringerung der Hydrataseaktivität der *Em*-OAH A248L (siehe Anhang, Abbildung A 27).

Die Reaktionsbedingungen für die Hydratisierung kurzkettiger, flüchtiger Alkene wurden erfolgreich optimiert. In einem finalen Experiment wurden die einzelnen Parameter noch einmal aufeinander aufbauend Schritt für Schritt analysiert (Abbildung 38). Als Vergleichsansatz dienten *Em*-OAH A248L-Biotransformationen unter Standardbedingungen (500 µl Reaktionsvolumen, 50 mg/ml Biofeuchtmasse, 100 mM Glucose, 0,3 mM FAD, 0,5 mM Substrat & Dummy-Substrat, 1 % (v/v) finale DMSO-Konzentration), deren Ergebnis auf 100 % gesetzt wurde. Im direkten Vergleich zum Kontrollansatz war die Bildung des Produktes 2-Heptanol unter Anwendung aller Optimierungsschritte (2 ml Reaktionsvolumen,

100 mg/ml *Em*-OAH A248L, 200 mM Glucose, 0,6 mM FAD, 30 mM 1-Hepten, 10 mM Heptansäure, kein DMSO) 33-fach erhöht. Der Einsatz eines größeren Substrat-Überschusses (5:1, 10:1) resultierte in keine weitere Verbesserung der Produktbildung (nicht dargestellt).

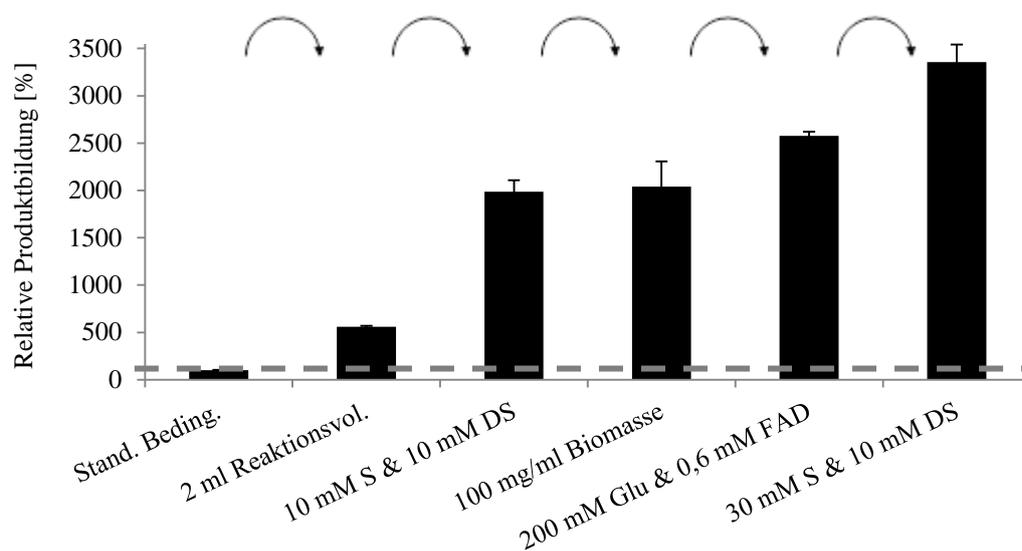


Abbildung 38: Zusammenfassung der Optimierung zur 1-Hepten Hydratisierung ohne Zweiphasensystem

Die Analyse der Reaktionsbedingungen resultierte in eine Optimierung des Reaktionsvolumens (2 ml), der Substrat- und Dummy-Substrat-Konzentration (10 mM, ohne DMSO als Cosolvens), der Biofeuchtmasse-Konzentration (100 mg/ml), der Konzentration der Additive Glucose (200 mM) und FAD (0,6 mM) und des Substrat-zu-Dummy-Substrat-Verhältnisses (3:1). Diese Bedingungen wurden in einem finalen Experiment aufeinander aufbauend (durch Pfeile angedeutet) unter Verwendung der *Em*-OAH Variante A248L analysiert. Die Biotransformationen erfolgten in 2 ml Glas-Vials bei 25 °C und 180 Upm. Als Startpunkt der Optimierung dienten Biotransformationen unter Standardbedingungen (500 µl Reaktionsvolumen, 50 mg/ml Biofeuchtmasse, 100 mM Glucose, 0,3 mM FAD, 0,5 mM Substrat & Dummy-Substrat, 1% (v/v) finale DMSO-Konzentration), deren Ergebnis auf 100 % gesetzt wurde. Nach zweitägiger Inkubation wurde die Produktbildung (Triplikate) mittels GC-FID analysiert.

3.6.3 Analyse ausgewählter Mutanten mit kurzkettigen terminalen Alkenen (C7-C5)

Sowohl die Etablierung eines Zweiphasensystems (siehe Anhang, Abbildung A 25) als auch die Optimierung der Reaktionsbedingungen ohne organische Phase (siehe Anhang, Abbildung A 28) resultierten in einer deutlichen Steigerung der Produktbildung und erhöhen somit die Chance zur Identifizierung aktiver *Em*-OAH Varianten im Hinblick auf die Hydratisierung der kurzkettigen terminalen Alkene 1-Hepten, 1-Hexen und 1-Penten. Infolge des Aktivitätsscreenings mit verschiedenen Fettsäuren und den Alkenen 1-Decen und 1-Octen (Abbildung 25 & Abbildung 26) wurden neben dem Wildtypenzym die *Em*-OAH Varianten A248L, A248I, A248F, A248W, F227Y und F227W für die Hydratisierung der C7-C5 Alkene ausgewählt. Der Umsatz der drei Substrate wurde unter Standardbedingungen (2.9.10), im Zweiphasensystem (2.9.11) und unter optimierten Reaktionsbedingungen (2.9.12) analysiert. *E. coli* BL21 (DE3) pET28a(+) Ganzzellbiotransformationen dienten als Negativkontrolle.

Abbildung 39 präsentiert das Ergebnis zur 1-Hepten Hydratisierung mithilfe der *Em*-OAH Variante A248L unter Anwendung der drei verschiedenen Bedingungen. Die höchste Produktbildung wurde im Zweiphasensystem mit BEHP erhalten. Auch die optimierten Reaktionsbedingungen (Opt. Beding.) ohne Einsatz eines organischen Lösemittels resultierten in einer hohen Produktkonzentration, während unter Standardbedingungen (Stand. Beding.) nur wenig Produkt detektiert wurde. Da diese Beobachtungen ebenso auf alle anderen Biotransformationen zuträfen, werden im Folgenden nur die Resultate des jeweiligen Zweiphasensystems dargestellt. Der Versuch zeigte darüber hinaus, dass die Optimierung der Reaktionsbedingungen eine entscheidende Rolle für die Identifizierung aktiver Mutanten spielt. So wurde in einigen Fällen im Zweiphasensystem eine Produktbildung beobachtet, während die Variante mit demselben Substrat unter Standardbedingungen inaktiv war (nicht dargestellt).

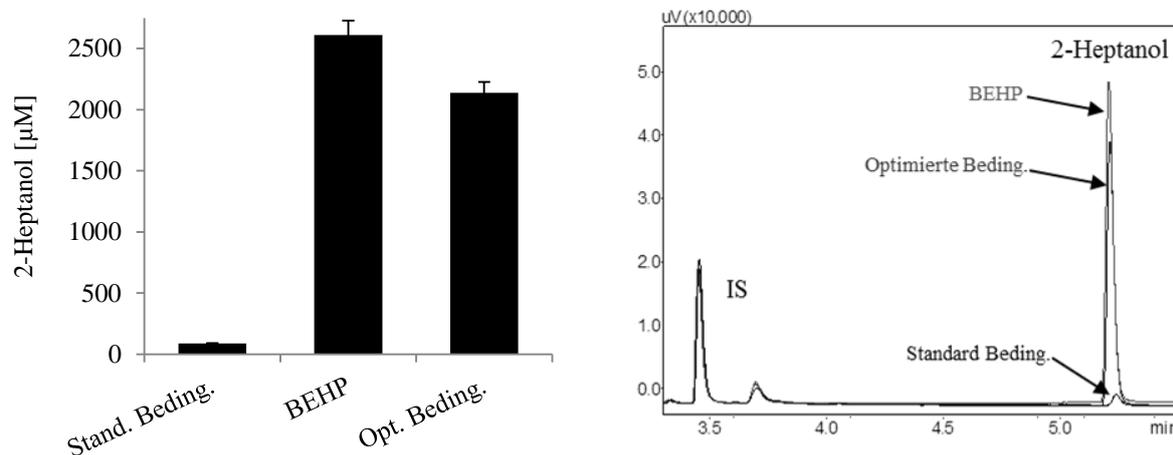


Abbildung 39: 1-Hepten Hydratisierung der *Em*-OAH Variante A248L unter Standardbedingungen, im Zweiphasensystem (BEHP) und mit optimierten Reaktionsbedingungen

Die Biotransformationen wurden in 2 ml Glas-Vials unter Standardbedingungen (500 μl Reaktionsvolumen, 50 mg/ml Biofeuchtmasse, 100 mM Glucose, 0,3 mM FAD, 0,5 mM S & DS, 1% (v/v) finale DMSO-Konzentration), im BEHP-Zweiphasensystem (100 mg/ml Biofeuchtmasse, 200 mM Glucose, 0,6 mM FAD, 100 μl BEHP, 300 mM 1-Hepten, 5 mM Heptansäure) und unter optimierten Reaktionsbedingungen (2 ml Reaktionsvolumen, 100 mg/ml Biofeuchtmasse, 200 mM Glucose, 0,6 mM FAD, 30 mM 1-Hepten, 10 mM Heptansäure) durchgeführt. Nach sieben-tägiger Inkubation bei 25 °C und 180 Upm wurde die Produktbildung (Triplikate) mittels GC-FID analysiert.

Aufgrund der obigen Ergebnisse (Abbildung 39) werden im Folgenden nur die Resultate zur enzymatischen Hydratisierung im Zweiphasensystem präsentiert. Da für dieses System der Einsatz einer hohen Substratkonzentration (300 mM) notwendig war, wurden anstelle des Substratumsatzes die absoluten Produktkonzentrationen verglichen. Das Ergebnis des Aktivitätsscreenings ist in Abbildung 40 dargestellt. Die terminalen Alkene 1-Hepten, 1-Hexen und 1-Penten wurden mithilfe der ausgewählten *Em*-OAH Varianten erfolgreich zum jeweiligen sekundären Alkohol hydratisiert. Der höchste Umsatz des C7-Alkens 1-Hepten

wurde mithilfe der besten 1-Octen-Mutante A248L erreicht und resultierte in Produktkonzentrationen von bis zu 2,7 mM 2-Heptanol (schwarz). Auffällig ist das Ergebnis der A248W-Variante. Während im Vergleich zu den anderen A248-Varianten eine deutlich geringere Aktivität mit 1-Hepten ermittelt wurde, zeigte diese Mutante den höchsten Umsatz von 1-Hexen zu 2-Hexanol (grau). Darüber hinaus handelte es sich hierbei um die einzige Variante, welche 1-Penten erfolgreich zu 2-Pentanol (weiß) hydratisierte. Die Produktkonzentrationen waren jedoch auch nach siebentägiger Inkubation mit 120 μM 2-Hexanol und 20 μM 2-Pentanol ausgehend von 300 mM Substrat sehr gering. Die *Em*-OAH Varianten F227Y und F227W zeigten nur sehr geringe bzw. keine Hydrataseaktivität mit den ausgewählten Substraten. Für alle Mutanten wurde eine ausgezeichnete Stereoselektivität mit einem Enantiomerenüberschuss größer 99 % für das *S*-Enantiomer ermittelt. Die Ergebnisse der chiralen GC-Analyse für die *Em*-OAH A248L mit 1-Hepten und die *Em*-OAH A248W mit 1-Hexen bzw. 1-Penten ist im Anhang unter Abbildung A 29 dargestellt.

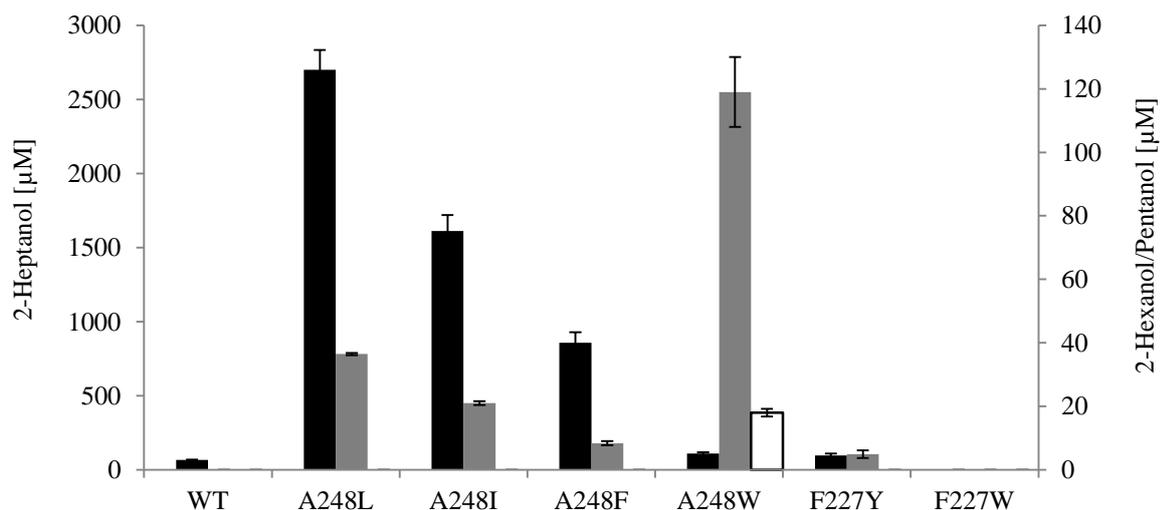


Abbildung 40: Quantifizierung der Hydratisierungsprodukte unter Verwendung des Zweiphasensystems

Die Biotransformationen wurden in 2 ml Glas-Vials im optimierten BEHP-Zweiphasensystem (100 mg/ml Biofeuchtmasse, 200 mM Glucose, 0,6 mM FAD, 100 μl BEHP, 300 mM Alken, 5 mM Heptansäure) durchgeführt. Analysiert wurde die Hydrataseaktivität des Wildtypenzym und der *Em*-OAH Varianten A248L, A248I, A248F, A248W, F227Y und F227W mit 1-Hepten, 1-Hexen und 1-Penten. Nach siebentägiger Inkubation bei 25 °C und 180 Upm wurde die Produktbildung (Triplikate) mittels GC-FID quantifiziert.

2-Heptanol (■); 2-Hexanol (■); 2-Pentanol (□)

In einem abschließenden Versuch wurde die Zeitabhängigkeit der Hydratisierungsreaktion mit der jeweils besten Variante für jedes Substrat (300 mM) über einen Zeitraum von sieben Tagen analysiert (siehe Anhang, Abbildung A 30). Die Produktkonzentration stieg in den ersten vier Tagen zunächst deutlich an, bevor nach fünftägiger Inkubation ein Plateau erreicht wurde. Mit ca. 3 mM 2-Heptanol, 125 μM 2-Hexanol und 20 μM 2-Pentanol nach sieben Tagen entsprach das Ergebnis dem Resultat des oben dargestellten Aktivitätsscreenings.

3.7 Charakterisierung der *Em*-OAH Variante A248W

Die terminalen Alkene 1-Hepten, 1-Hexen und 1-Penten wurden mithilfe der ausgewählten *Em*-OAH Varianten mit ausgezeichneter Stereoselektivität zum jeweiligen sekundären Alkohol hydratisiert. Da die Tryptophan-Mutante A248W den höchsten Umsatz von 1-Hexen zeigte und vor allem als einzige Variante auch mit 1-Penten aktiv war (Abbildung 40), handelt es sich hierbei um einen interessanten Kandidaten für die Hydratisierung industriell-relevanter kurzkettiger C4-Derivate wie Butadien. Darüber hinaus könnte der Einsatz von *cis*- und *trans*-Alkenen in Kombination mit Fettsäure-Dummy-Substraten unterschiedlicher Kettenlänge in neue Produkte resultieren.

3.7.1 Hydratisierung terminaler Alkene mit verschiedenen Dummy-Substraten

Da bisher keine Analyse des Fettsäure-Dummy-Substrates mit der *Em*-OAH Variante A248W und unter den Bedingungen des Zweiphasensystems erfolgt war, wurde in einem ersten Versuchsansatz die Aktivität mit den terminalen Alkenen 1-Hepten, 1-Hexen und 1-Penten unter Verwendung von Heptansäure, Hexansäure, Pentansäure und Butansäure als Dummy-Substrate analysiert. Die Biotransformationen wurden im optimierten Zweiphasensystem (2.9.11) durchgeführt und *E. coli* BL21 (DE3) pET28a(+) diente als Negativkontrolle. Die Aktivität der Variante mit den ausgewählten Substraten wurde bestätigt (Abbildung 41) und die entsprechenden Produkte wurden mithilfe einer GC-FID (2.12.4) und GC-MS Analyse (2.12.6) als sekundäre Alkohole (2-Heptanol, 2-Hexanol und 2-Pentanol) identifiziert (nicht dargestellt). Mit 215 μM 2-Heptanol, 200 μM 2-Hexanol und 38 μM 2-Pentanol wurden die höchsten Produktkonzentrationen jeweils mit Hexansäure als Dummy-Substrat ermittelt, während mit Butansäure für alle drei Substrate nur sehr geringe Umsatzraten erhalten wurden (16 μM 2-Heptanol, 14 μM 2-Hexanol, 3 μM 2-Pentanol). Der Substratumsatz durch die *Em*-OAH A248W wurde somit unter Verwendung von Hexansäure im Vergleich zum Heptansäure-Dummy-Substrat noch einmal verdoppelt. Das Resultat des C5-Dummy-Substrates Pentansäure war hingegen vergleichbar mit dem der Heptansäure.

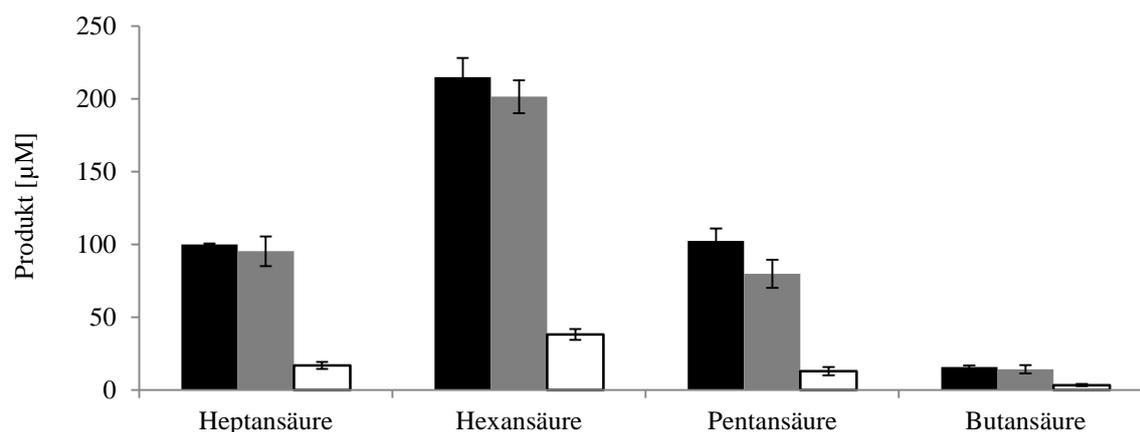


Abbildung 41: 1-Hepten, 1-Hexen und 1-Penten Hydratisierung durch die *Em*-OAH Variante A248W mit verschiedenen Fettsäure-Dummy-Substraten

Die Biotransformationen wurden in 2 ml Glas-Vials im optimierten BEHP-Zweiphasensystem (100 mg/ml Biofeuchtmasse, 200 mM Glucose, 0,6 mM FAD, 100 µl BEHP, 300 mM 1-Hepten, 5 mM Dummy-Substrat) durchgeführt. Heptansäure, Hexansäure, Pentansäure bzw. Butansäure dienten als Fettsäure-Dummy-Substrat und die Reaktionen wurden durch Substratzugabe gestartet. Nach viertägiger Inkubation bei 25 °C und 180 Upm wurde die Produktbildung (Triplikate) mittels GC-FID quantifiziert.

2-Heptanol (■); 2-Hexanol (▒); 2-Pentanol (□)

3.7.2 Hydratisierung subterminaler Alkene mit verschiedenen Dummy-Substraten

Die *Em*-OAH Variante A248W wurde anhand der vorgenommenen Analysen als interessantester Kandidat für die Hydratisierung kurzkettiger Alkene (C6-C4) identifiziert. Da die Produktkonzentrationen jedoch auch nach siebentägiger Inkubation sehr gering waren (Abbildung 40), wurde nachfolgend eine weitere Optimierung des Zweiphasensystems unter Verwendung von 1-Penten als Substrat vorgenommen. Neben einer Erhöhung der Substratkonzentration und des Lösemittelvolumens wurden mit BEHP, IPM und DAME auch die vielversprechendsten organischen LM erneut analysiert. Es zeigte sich jedoch, dass mithilfe der ausgewählten Parameter keine weitere Optimierung der Reaktionsbedingungen erreicht wurde.

Die Analyse der *Em*-OAH Variante A248W mit den subterminalen Alkenen *cis*-/*trans*-2-Hexen und *cis*-/*trans*-2-Penten (Abbildung 42) erfolgte dementsprechend unter Verwendung des bereits etablierten Zweiphasensystems (2.9.11) mit Heptansäure, Hexansäure, Pentansäure bzw. Butansäure als Fettsäure-Dummy-Substrat. *E. coli* BL21 (DE3) pET28a(+) diente als Negativkontrolle und die Analyse der Produktbildung erfolgte mittels GC-FID (2.12.4) und GC-MS (2.12.6).

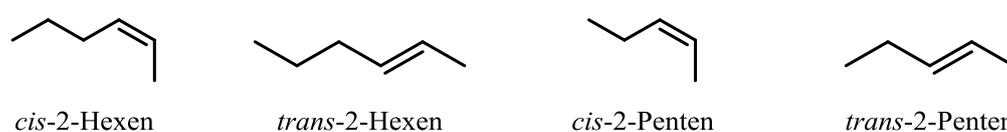


Abbildung 42: Subterminale Alkene für die Hydratisierung durch die *Em*-OAH Varianten A248W, F227Y & F227W

Die gaschromatographische Auswertung der Biotransformationen wurde durch viele zusätzliche Signale erschwert. Da jedoch keines dieser Signale spezifisch für die *Em*-OAH Biotransformationen war, wurde für die A248W-Variante keine Aktivität mit *trans*-2-Hexen und *cis*-/*trans*-2-Penten ermittelt. Möglicherweise resultierte jedoch die Verwendung des Pentansäure-Dummy-Substrates mit *cis*-2-Hexen in der Bildung des sekundären Alkohols 3-Hexanol. In diesem Reaktionsansatz war das Signal bei der entsprechenden Retentionszeit etwas stärker als bei der pET28a(+)-Negativkontrolle (nicht dargestellt). Zur Verifizierung dieses Ergebnisses wurde die Hydratisierung des C6-Alkens *cis*-2-Hexen mithilfe der *Em*-OAH A248W und Heptansäure, Hexansäure bzw. Pentansäure als Dummy-Substrat (jeweils 5 mM) erneut analysiert. Darüber hinaus wurden unter Verwendung von Pentansäure drei verschiedene Substratkonzentrationen eingesetzt (0,3-1 M *cis*-2-Hexen). Während mit Heptansäure und Hexansäure im Vergleich zur pET28a(+)-Negativkontrolle keine bzw. nur geringe Unterschiede in der Intensität des scheinbaren 3-Hexanol-Signals erhalten wurden, wurde mit Pentansäure insbesondere bei erhöhter Substratkonzentration eine deutliche Zunahme der Peakstärke beobachtet (siehe Anhang, Abbildung A 31). Die anschließende Analyse der Proben im SIM-Modus (84,1 m/z, 101,1 m/z & 115,1 m/z) bestätigte geringe Spuren des sekundären Alkohols 3-Hexanol. Abbildung 43 präsentiert das GC-Chromatogramm der *Em*-OAH Biotransformation mit 1 M *cis*-2-Hexen als Substrat im direkten Vergleich zum *S*-/*R*-2-Hexanol und *S*-/*R*-3-Hexanol-Standard. Aufgrund der geringen Produktkonzentration und eines racemischen 3-Hexanol-Standards, kann jedoch keine Aussage über die Stereoselektivität erfolgen. Das ebenfalls mögliche Hydratisierungsprodukt 2-Hexanol wurde nicht detektiert.

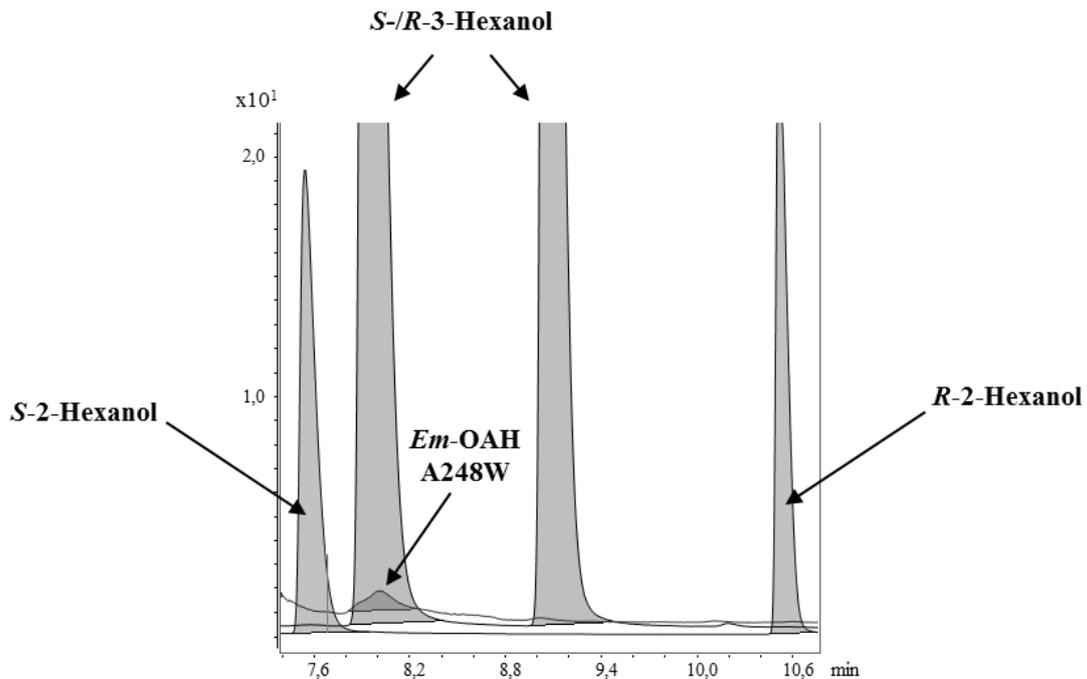


Abbildung 43: GC-MS Analyse der *Cis*-2-Hexen Hydratisierung durch die *Em*-OAH A248W

Die Biotransformationen wurden in 2 ml Glas-Vials im optimierten BEHP-Zweiphasensystem (100 mg/ml Biofeuchtmasse, 200 mM Glucose, 0,6 mM FAD, 100 μ l BEHP, 1 M *cis*-2-Hexen, 5 mM Dummy-Substrat) durchgeführt. Pentansäure diente als Fettsäure-Dummy-Substrat und die Reaktionen wurden durch Substratzugabe gestartet. Nach viertägiger Inkubation bei 25 °C und 180 Upm wurde die Produktbildung mittels chiraler GC-MS analysiert.

Neben der *Em*-OAH A248W handelt es sich auch bei den beiden Varianten F227Y und F227W um interessante Kandidaten für die Hydratisierung kurzkettiger subterminaler Alkene (Abbildung 42). Die Analyse der Hydrataseaktivität erfolgte ebenfalls im Zweiphasensystem (2.9.11) unter Verwendung von Heptansäure, Hexansäure, Pentansäure bzw. Butansäure als Fettsäure-Dummy-Substrat. Es wurde jedoch auch nach siebentägiger Inkubation keine entsprechende Produktbildung ermittelt.

3.7.3 Hydratisierung des C4-Alkens Butadien

Die *Em*-OAH A248W zeigte die höchste Aktivität der ausgewählten Mutanten mit 1-Hexen und 1-Penten (Abbildung 40). In einem weiteren Experiment wurde die Hydrataseaktivität der Variante im Zweiphasensystem (2.9.11) mit dem C4-Derivat 1,3-Butadien analysiert. Aufgrund der obigen Ergebnisse (Abbildung 41) wurden Heptansäure und Hexansäure als Fettsäure-Dummy-Substrate ausgewählt. Darüber hinaus wurden zwei verschiedene Substratkonzentrationen (60 mM bzw. 300 mM) bei einer konstanten Dummy-Substrat-Konzentration von 5 mM eingesetzt. *E. coli* BL21 (DE3) pET28a(+) diente als Negativkontrolle und die Auswertung erfolgte nach fünftägiger Inkubation mithilfe eines GC-MS-Systems (2.12.6). Erneut wurde die gaschromatographische Analyse durch das Problem

vieler Hintergrundsignale erschwert. Da keines dieser Signale spezifisch für die OAH-Biotransformationen war, wurde weder im Scan-Modus noch im SIM-Modus eine Hydratisierung des C4-Alkens zu 3-Buten-2-ol, 3-Buten-1-ol bzw. 2,3-Butandiol (Abbildung 44) beobachtet (nicht dargestellt).



Abbildung 44: Mögliche Produkte der 1,3-Butadien Hydratisierung

3.7.4 Dehydratisierung kurzkettiger, sekundärer Alkohole (C6-C4)

Alle bisher vorgenommenen Studien erfolgten mit Fokus auf die Hydrataseaktivität der *Em-OAH* A248W. Da die Hydratisierung der kurzkettigen Alkene 1-Hexen und 1-Penten zu 2-Hexanol und 2-Pentanol unter Verwendung dieser Variante erfolgreich war, wurde in einem abschließenden Experiment die Dehydratisierung dieser beiden sekundären Alkohole analysiert. Darüber hinaus wurde das C4-Derivat 3-Buten-2-ol als weiteres interessantes Substrat ausgewählt. Da die entsprechenden Dehydratisierungsprodukte (Alkene) mit abnehmender Kettenlänge eine steigende Volatilität aufweisen, ermöglicht die Verwendung der kurzkettigen Alkoholsubstrate eventuell durch eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes eine erfolgreiche Dehydratisierung. Neben dem etablierten Zweiphasensystem wurden drei weitere Reaktionsbedingungen getestet (2.9.15). *E. coli* BL21 (DE3) pET28a(+) diente als Negativkontrolle und die Auswertung erfolgte erneut mithilfe eines GC-MS-Systems (2.12.6). Es wurden jedoch im Scan- und SIM-Modus auch nach fünftägiger Inkubation keine Dehydratisierungsprodukte identifiziert (nicht dargestellt).

3.8 Umsetzung terminal-ungesättigter Alkene im 250 bzw. 500 ml Maßstab

1-Decen und 1-Octen wurden als Modellssubstrate für die Alken-Hydratisierung durch das *Em-OAH* Wildtypenzym bzw. die A248L-Variante im semi-präparativen Maßstab ausgewählt. Ziel der Analyse war eine Bestimmung der isolierten Ausbeute, der Stereoselektivität und des NMR-Spektrums. Um für die verschiedenen Analysen ausreichend Produkt zu erhalten und gleichzeitig eine hohe Umsatzrate zu erzielen, wurde zunächst in einem Vorversuch ein Kompromiss zwischen Umsatzrate und Produktkonzentration gesucht. Unter optimierten Reaktionsbedingungen (2.9.12) wurden Substratkonzentrationen von 0,5 mM bis 4 mM bei einem DMSO-Anteil von 1 % (v/v) bis 8 % (v/v) analysiert. Aufgrund der Ergebnisse zur 1-

Decen-Hydratisierung durch das *Em*-OAH Wildtypenzym mithilfe alternativer Dummy-Substrate (3.2.4, Abbildung 19) wurde Heptansäure als Dummy-Substrat ausgewählt. Da bisher keine Analyse der *Em*-OAH A248L-Variante mit verschiedenen Dummy-Substraten erfolgt war, wurde im Falle der 1-Octen-Hydratisierung sowohl Heptansäure als auch Hexansäure als Dummy-Substrat getestet. Tabelle 18 präsentiert die Auswertung der 1-Decen-Hydratisierung durch das *Em*-OAH Wildtypenzym mit Heptansäure-Dummy-Substrat und der 1-Octen-Hydratisierung durch die *Em*-OAH A248L mit Hexansäure. Die Ergebnisse der A248L-Variante mit Heptansäure sind im Anhang in der Tabelle A 2 dargestellt. Im Hinblick auf die 1-Decen-Hydratisierung wurde mit einem Umsatz von 56 % die höchste Produktkonzentration (1,12 mM) unter Verwendung von 2 mM Substrat und Dummy-Substrat erreicht. Der höchste Umsatz (93 %) wurde mit 0,5 mM 1-Decen und Heptansäure beobachtet, während die Produktkonzentration mit 0,46 mM 2-Decanol in diesem Fall entsprechend verringert war. Die 1-Octen-Biotransformationen resultierten in hohe Umsatzraten (84-79 %) bei Substrat- und Dummy-Substrat-Konzentrationen von 0,5 mM bis 1,5 mM. Die höchsten Produktkonzentrationen (1,19-1,27 mM 2-Octanol) wurden mit 1,5 mM bis 2,5 mM 1-Octen und Hexansäure erreicht. Da mit Hexansäure im Vergleich zur Heptansäure (siehe Anhang, Tabelle A 2) generell etwas höhere Umsatzraten und Produktkonzentrationen erhalten wurden, wurde das C6-Dummy-Substrat für die 1-Octen-Hydratisierung im semi-präparativen Maßstab ausgewählt.

Tabelle 18: Vorversuch zur 1-Decen- und 1-Octen-Hydratisierung im semi-präparativen Maßstab

Substratkonzentrationen von 0,5 mM bis 4 mM Alken bei äquimolarer Konzentration des Fettsäure-Dummy-Substrates (1-8 % (v/v) DMSO) wurden analysiert. Angewandt wurden die optimierten Reaktionsbedingungen ohne Verwendung eines organischen Lösemittels (2 ml Reaktionsvolumen, 100 mg/ml Biofeuchtmasse, 200 mM Glucose, 0,6 mM FAD). Die 1-Decen Biotransformationen erfolgten mit dem *Em*-OAH Wildtypenzym, 1-Octen-Assays wurden mithilfe der A248L-Variante vorgenommen. Nach viertägiger Inkubation bei 25 °C und 180 Upm wurde die Produktbildung mittels GC-FID quantifiziert (2.12.3 & 2.12.4).

1-Decen [mM]	Heptansäure [mM]	DMSO (v/v)	2-Decanol [mM]	Umsatz [%]
0,5	0,5	1 %	0,46	93
1	1	2 %	0,75	75
2	2	4 %	1,12	56
3	3	6 %	0,96	32
4	4	8 %	0,63	16

1-Octen [mM]	Hexansäure [mM]	DMSO (v/v)	2-Octanol [mM]	Umsatz [%]
0,5	0,5	1 %	0,42	84
1	1	2 %	0,86	86
1,5	1,5	3 %	1,19	79
2,0	2,0	4 %	1,19	59
2,5	2,5	5 %	1,27	51

3.8.1 1-Decen-Hydratisierung im 250 ml Maßstab

Infolge der oben dargestellten Ergebnisse (Tabelle 18) erfolgte die Umsetzung des Alkens 1-Decen durch das *Em*-OAH Wildtypenzym im 250 ml Maßstab unter optimierten Bedingungen (100 mg/ml Biofeuchtmasse, 200 mM Glucose, 0,6 mM FAD) mit 2 mM 1-Decen und 2 mM Heptansäure-Dummy-Substrat bei einer finalen DMSO-Konzentration von 4 % (v/v) (2.10.1). Nach sechstägiger Inkubation wurde die Biotransformation extrahiert (ca. 70 % Umsatz, 1,4 mM 2-Decanol) und mittels Säulenchromatographie aufgereinigt. Die Identifizierung der Produktfraktionen erfolgte über eine Dünnschichtchromatographie. Es zeigte sich, dass auch nach zweifacher Säulenchromatographie eine leichte Verunreinigung des Produktextraktes vorlag. Die Auswertung der NMR-Spektren (nicht dargestellt) deutete darauf hin, dass es sich bei der Verunreinigung um das Heptansäure-Dummy-Substrat handelt. Aus diesem Grund erfolgte die weitere Aufreinigung des Biotransformationsproduktes über eine basische und wässrige Extraktion. Die Reinheit des hydratisierten Produktes wurde anschließend erneut mittels NMR (siehe Anhang, Abbildung A 2) analysiert. Es wurden 35 mg 2-Decanol mit

einer Reinheit von >95 % als Produkt erhalten ($Y_{P/S} = 44$ %). Die Stereoselektivität der 1-Decen-Hydratisierung durch das *Em*-OAH Wildtypenzym im 250 ml Maßstab wurde nachfolgend mithilfe einer chiralen GC-Analyse überprüft. Es wurde eine exzellente Stereoselektivität mit einem Enantiomerenüberschuss von >99 % für *S*-2-Decanol ermittelt (Abbildung 45).

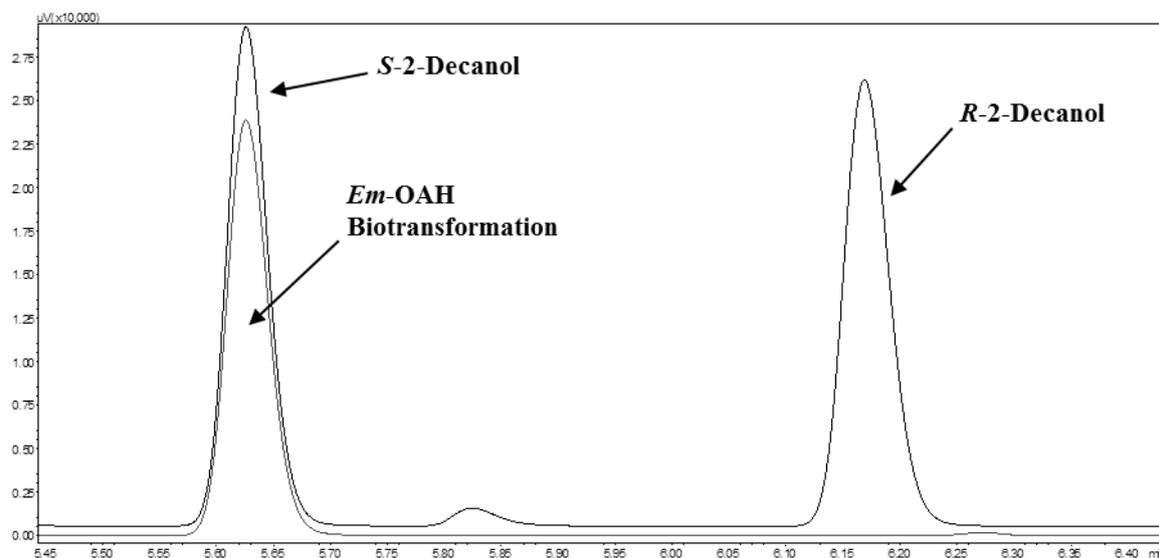


Abbildung 45: Chirale GC-Analyse des gereinigten 1-Decen-Biotransformationsproduktes

Die Umsetzung des Alkens 1-Decen durch das *Em*-OAH Wildtypenzym erfolgte im 250 ml Maßstab unter optimierten Bedingungen (100 mg/ml Biofeuchtmasse, 200 mM Glucose, 0,6 mM FAD) mit 2 mM 1-Decen und 2 mM Heptansäure-Dummy-Substrat bei einer finalen DMSO-Konzentration von 4 % (v/v). Die Stereoselektivität der 1-Decen-Hydratisierung wurde mittels chiraler GC-FID analysiert. Racemisches 2-Decanol und *R*-2-Decanol dienen als Produktstandards zur Identifizierung der beiden Isomere. Das Biotransformationsprodukt wurde mit einem Enantiomerenüberschuss von >99 % als *S*-2-Decanol identifiziert.

3.8.2 1-Octen-Hydratisierung im 500 ml Maßstab

Die Hydratisierung des Alkens 1-Octen durch die *Em*-OAH A248L erfolgte aufgrund der obigen Ergebnisse (Tabelle 18) im 500 ml Maßstab unter optimierten Bedingungen (100 mg/ml Biofeuchtmasse, 200 mM Glucose, 0,6 mM FAD) mit 1 mM 1-Octen und 1 mM Hexansäure-Dummy-Substrat bei einer finalen DMSO-Konzentration von 2 % (v/v) (2.10.2). Nach sechstägiger Inkubation wurde die Biotransformation extrahiert (ca. 50 % Umsatz) und das Extrakt zunächst mithilfe einer Flash-Chromatographie und nachfolgend über eine Säulenchromatographie aufgereinigt. Da das Produkt weiterhin leichte Verunreinigungen aufwies, wurden anschließend eine basischen/wässrigen Extraktion und eine weitere Säulenchromatographie vorgenommen. Die Reinheit des hydratisierten Produktes wurde nachfolgend mittels NMR (siehe Anhang, Abbildung A 3) analysiert. Es wurden 14 mg 2-Octanol mit einer Reinheit von >95 % als Produkt erhalten ($Y_{P/S} = 22$ %). Die Stereoselektivität der 1-Octen-Hydratisierung durch die *Em*-OAH A248L-Variante im 500 ml

ERGEBNISSE

Maßstab wurde mithilfe einer chiralen GC-Analyse überprüft. Es wurde eine exzellente Stereoselektivität mit einem Enantiomerenüberschuss von >99 % für *S*-2-Octanol ermittelt (Abbildung 46).

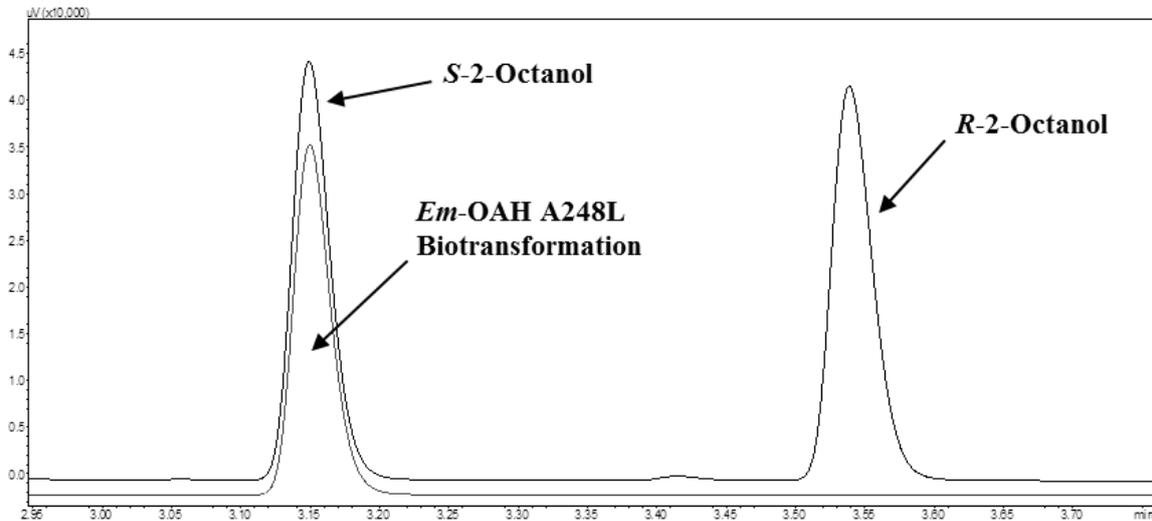


Abbildung 46: Chirale GC-Analyse des gereinigten 1-Octen-Biotransformationsproduktes

Die Umsetzung des Alkens 1-Octen durch die *Em*-OAH A248L erfolgte im 500 ml Maßstab unter optimierten Bedingungen (100 mg/ml Biofeuchtmasse, 200 mM Glucose, 0,6 mM FAD) mit 1 mM 1-Octen und 1 mM Hexansäure-Dummy-Substrat bei einer finalen DMSO-Konzentration von 2 % (*v/v*). Die Stereoselektivität der 1-Octen-Hydratisierung wurde mittels chiraler GC-FID analysiert. Racemisches 2-Octanol und *S*-2-Octanol dienten als Produktstandards zur Identifizierung der beiden Isomere. Das Biotransformationsprodukt wurde mit einem Enantiomerenüberschuss von >99 % als *S*-2-Octanol identifiziert.

4 DISKUSSION

Die selektive Hydratisierung nicht-aktivierter C=C Bindungen von Alkenen und ungesättigten Fettsäuren stellt eine sehr interessante Reaktion zur Synthese wertvoller Basischemikalien, Pharmazeutika und Naturstoffe dar.³⁻⁷ Hydroxylierte Fettsäuren besitzen darüber hinaus ein großes Potenzial als Bausteine für die Polymerchemie und für die Synthese verschiedener Antibiotika und Aromastoffe.^{6,8-11} In der Chemie bezeichnet die Hydratisierungsreaktion jedoch unter anderem infolge einer geringen Selektivität, dem Auftreten von Nebenreaktionen und der Notwendigkeit harscher Reaktionsbedingungen ein fortlaufendes Problem. Während die einfache direkte stereoselektive Addition von Wasser an Alkenen unter milden Reaktionsbedingungen in einer sowohl atomökonomischen²⁴ als auch Redox-neutralen²⁵ Reaktion bislang einen Traum der synthetischen organischen Chemie darstellt,^{26,27} bietet die biokatalytische Addition und Abspaltung von Wasser eine umweltfreundliche und selektive Alternative. Hydro-Lyasen (EC 4.2.1.) katalysieren sowohl die regio- und stereoselektive Hydratisierung an isolierten als auch konjugierten C=C Bindungen (α,β -ungesättigte Carbonsäuren). Aufgrund der bereits erfolgten biochemischen Charakterisierung^{60,63,78} und der Verfügbarkeit einer Kristallstruktur⁷⁸ wurde die Ölsäure-Hydratase aus *Elizabethkingia meningoseptica* als vielversprechender Kandidat für die Hydratisierung kurzkettiger nicht-natürlicher Substrate ausgewählt.

4.1 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Obwohl eine Mindestkettenlänge von 14 Kohlenstoffatomen als essentieller Faktor für die enzymatische Hydratisierung von Fettsäuren beschrieben wurde,³² beobachteten Jens Schmid und Lisa Steiner im Rahmen ihrer Masterarbeit eine Aktivität der *Em*-OAH mit der chemisch-synthetisierten C11-Fettsäure (*Z*)-Undec-9-ensäure.^{63,116,117} Aufgrund der sehr geringen Hydrataseaktivität der *Em*-OAH gegenüber der kurzkettigen C11-Fettsäure wurde zunächst eine Optimierung der Reaktionsbedingungen vorgenommen. Mithilfe einer Literaturrecherche wurden zahlreiche Faktoren mit einem Einfluss auf die Hydrataseaktivität und die Produktausbeute identifiziert.^{60,62,65-67,69,71,72,74,76} Die Verwendung eines Ganzzellsystems und reduzierender Bedingungen resultierte in eine deutliche Steigerung der Produktbildung im Vergleich zu Zellysat-Assays. Begründen lässt sich dies vermutlich durch eine verbesserte Enzymstabilität^{63,112} und operative Stabilität und die Aufrechterhaltung reduzierender Bedingungen in der Zelle. Darüber hinaus werden durch Ganzzellbiotransformationen zeitintensive Schritte wie zum Beispiel der Zellaufschluss und die Proteinaufreinigung

umgangen. Der effiziente Umsatz hydrophober Substrate unter Verwendung von Ganzzellsystemen wurde mehrfach beschrieben^{68,111,118,119} und resultierte beispielsweise in die erfolgreiche Produktion von 10-Hydroxystearinsäure^{74,104,106} und Hydroxyoctadecensäure^{67,107}. Bei der Analyse der (Z)-Undec-9-ensäure Hydratisierung mithilfe von Ganzzellbiotransformationen wurde Glucose als wichtiger Parameter identifiziert, da die C11-Fettsäure ohne Zugabe der zusätzlichen Kohlenstoffquelle nicht vollständig zurückgewonnen wurde. Der Verlust des Substrates lässt sich vermutlich durch die Verstoffwechslung der Fettsäure im Rahmen der β -Oxidation erklären.^{133–138} Darüber hinaus trägt die Glucose-Zugabe zur Regeneration des NAD(P)H-Cofaktors und zur generellen Lebensfähigkeit der Zellen bei.

Die Optimierung der Reaktionsbedingungen für die Hydratisierung nicht-natürlicher Substrate mithilfe von MODDE als Tool statistischer Versuchsplanung resultierte in einer 2,8-fachen Steigerung des C11-Fettsäure Umsatzes in nur einem Viertel der Zeit. Analysiert wurden unter anderem Parameter wie Cofaktor-Zugabe, reduzierende Agenzien, Inkubationstemperatur und Salzkonzentration. Im Rahmen der biochemischen Charakterisierung der *Em*-OAH in 2009 wurde für die Hydratisierung des natürlichen Substrates Ölsäure mit aufgereinigtem Enzym eine optimale Salzkonzentration von 50 mM ermittelt.⁶⁰ Eine maximale Aktivität bei 500 mM Natriumchlorid wurde für die Linolsäure-Hydratase aus *L. plantarum* beobachtet.⁶⁹ Im Hinblick auf den Umsatz der C11-Fettsäure (Z)-Undec-9-ensäure in *Em*-OAH Ganzzellbiotransformationen hatte die Salz-Zugabe jedoch einen negativen Einfluss auf die Produktbildung. Die positive bzw. negative Wirkung des Natriumchlorids auf die Enzymaktivität scheint somit von einem Zusammenspiel verschiedenster Parameter wie zum Beispiel den vorliegenden Reaktionsbedingungen, dem verwendeten Enzym und dem jeweiligen Substrat abhängig zu sein.

Eine deutliche Steigerung der 10-Hydroxyuncensäure-Produktion wurde durch Zugabe der Cofaktoren FAD und NADH beobachtet. Die Ölsäure-Hydratase aus *E. meningoseptica* sowie alle bisher charakterisierten Hydratasen besitzt einen Flavin Cofaktor. Da in der Bilanz der Hydratisierungsreaktion jedoch keine Veränderung des Redoxzustandes stattfindet, ist die genaue Funktion des Cofaktors noch unklar.^{12,32,61,62,64–66,69,72,74,76,78} Eine Analyse der Hydratasen aus *M. caseolyticus*⁷² und *S. pyogenes*⁷⁶ deutet auf eine stabilisierende, strukturelle Rolle des Cofaktors hin, welche bereits für andere FAD-aufweisende Enzyme beschrieben wurde.^{139–141} In der *Em*-OAH kommt dem FAD-Cofaktor mit der korrekten Organisation des aktiven Zentrums und der Stabilisierung der positiven Ladung des putativen Übergangszustandes wohlmöglich eine duale Rolle zu.⁷⁸ Der Flavin-Cofaktor der *Em*-OAH

ist nicht-kovalent gebunden und das Enzym zeigte in bereits erfolgten Studien eine unvollständige Cofaktor-Beladung.⁷⁸ Die Zugabe von FAD begünstigt somit möglicherweise eine bis zu 100 %-ige Cofaktor-Sättigung mit dem Resultat maximaler Enzymaktivität, während hingegen das Apoenzym eine deutlich verringerte spezifische Aktivität aufweist.⁷⁸ Die FAD-Abhängigkeit der Hydrataseaktivität wurde auch für die Linolsäure- Δ 9-Hydratase von *L. plantarum* beschrieben.⁶⁹ Wie in der hier vorliegenden Arbeit wurde die Enzymaktivität durch die Zugabe von NAD(P)H deutlich gesteigert. Das Ergebnis lässt auf eine aktivierende Rolle des Nicotinamid-Cofaktors durch eine Reduktion des FADs schließen.⁶⁹ In Übereinstimmung hiermit wurde auch nach Photoreduktion und chemischer Reduktion des Flavin-Cofaktors eine Steigerung der spezifischen Aktivität der *Em*-OAH beobachtet.⁷⁸ Problematisch ist in diesem Zusammenhang wohlmöglich der Einfluss von Sauerstoff, da der FAD-Cofaktor unter aeroben Bedingungen leicht oxidiert wird.^{69,78}

Die in der Literatur beschriebenen Hydratisierungsreaktionen wurden je nach Enzym und Substrat bei Temperaturen zwischen 25 °C^{61–63,72,78,113} und 40 °C^{66,67,69,109} durchgeführt. Mit der C11-Fettsäure wurde für die Ölsäure-Hydratase aus *E. meningoseptica* bei 30 °C die höchste Produktbildung (0,32 mM 10-Hydroxyundecansäure, 64 % Umsatz nach 28 h) ermittelt. Die Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 37 °C resultierte in einen Verlust des Substrates ohne entsprechende Produktzunahme. Erklären lässt sich dies vermutlich durch eine erhöhte metabolische Aktivität der Zellen.

4.2 Charakterisierung der 10-Hydroxyundecansäure

Das *Upscaling* der (*Z*)-Undec-9-ensäure Hydratisierung durch die *Em*-OAH unter optimierten Bedingungen resultierte ausgehend von 200 mg Substrat in 132 mg 10-Hydroxyundecansäure mit einer Reinheit von >95 %. Trotz der in diesem Fall niedrigen Produktausbeute ($Y_{P/S} = 66\%$, $Y_{P/B} = 0,0024$) besitzen die Ölsäure-Hydratasen ein hohes Potential für die Hydroxyfettsäureproduktion^{67,74,104,106,107} und die Anwendung in Kaskadenreaktionen^{68,100,111}. Die aufgereinigte 10-Hydroxyundecansäure diente zur Überprüfung der Stereoselektivität der C11-Fettsäure-Hydratisierung. Mithilfe einer Mosher-Ester Analyse wurde für das Biotransformationsprodukt eine *S*-Konfiguration ermittelt. Bei der natürlichen Reaktion der *Em*-OAH handelt es sich jedoch um die regioselektive Hydratisierung von Ölsäure zu (*R*)-10-Hydroxyoctadecansäure.⁷⁸ Die Veränderung der Selektivität lässt sich möglicherweise durch Unterschiede in der Orientierung der beiden Substrate im aktiven Zentrum erklären. Begünstigt wird dies vermutlich durch die Abwesenheit der langen Alkylkette auf der Omega-Seite der adressierten C=C Bindung im Falle der kurzkettigen C11-Fettsäure. Diese

Hypothese wird durch ein Docking-Ergebnis unterstützt, welches mit dem Docking-Resultat des natürlichen Substrates Ölsäure übereinandergelegt wurde (Abbildung 47). Die generelle Bindung der verkürzten Fettsäure (*Z*)-Undec-9-ensäure (blau) entspricht prinzipiell der Orientierung der Ölsäure (grün). Die C=C Bindung ist jedoch um fast 180 Grad gedreht und würde somit die inverse Stereoselektivität erklären. Die Ergebnisse zeigen, dass die Stereoselektivität vom jeweiligen Substrat und dessen Bindung im aktiven Zentrum abhängig ist. Dies gilt scheinbar auch für das Reaktionsgleichgewicht der verschiedenen Hydratasereaktionen. Während für die Umsetzung von Ölsäure durch die *Em*-OAH ein Gleichgewicht von 85:15 zu Gunsten des hydratisierten Produktes beschrieben wurde,¹⁴² wurde mit dem gereinigten Biotransformationsprodukt (*S*)-10-Hydroxyundecansäure keine Dehydratisierungsreaktion beobachtet. Gründe hierfür sind möglicherweise unter anderem die verkürzte Kettenlänge, die inverse Konfiguration oder aber insbesondere die gewählten Reaktionsbedingungen.

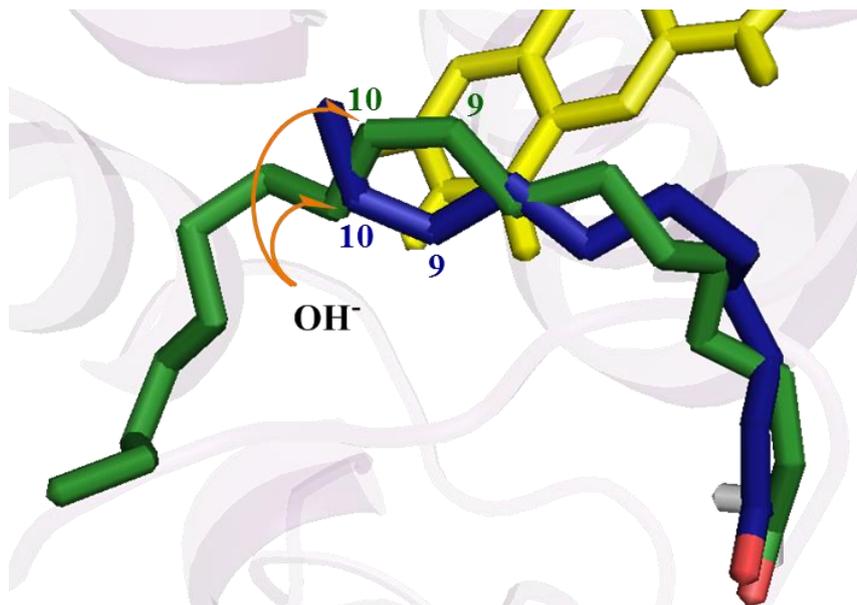


Abbildung 47: Docking-Ergebnis des *Em*-OAH Wildtypenzym mit Ölsäure (grün) und (*Z*)-Undec-9-ensäure (blau)
 Die Docking-Studie der C11-Fettsäure (*Z*)-Undec-9-ensäure (blau) erfolgte nach Energieminimierung mithilfe einer Simulationszelle von 10 Å um das Sauerstoffatom der Carboxylgruppe des katalytisch-aktiven Glutamats 122. Das Docking-Ergebnis wurde mithilfe von PyMol visualisiert und mit dem Resultat für die Ölsäure (grün) übereinander gelegt. Bei der C18-FS wurde die Simulationszelle mit einem Radius von 20 Å um das N5-Atom des FAD-Cofaktors gewählt. Die Atome der Carboxylgruppen sind in Rot (Sauerstoff) und Weiß (Wasserstoff) dargestellt, die Atome der C=C Bindungen sind mit 9 und 10 gekennzeichnet. Der nukleophile Angriff des aktivierten Wassermoleküls ist in orange angedeutet und das FAD ist gelb eingefärbt.

4.3 Hydratisierung des Alkens 1-Decen mithilfe eines Dummy-Substrates

Die C11-Fettsäure (*Z*)-Undec-9-ensäure war das bisher kürzeste Substrat, welches vom *Em*-OAH Wildtypenzym zur Hydratisierung akzeptiert wurde. Auch unter optimierten Bedingungen wurde kein Umsatz der C10-Fettsäure Dec-9-ensäure beobachtet. Studien von

Engleder und Kollegen deuten darauf hin, dass die Hydratisierung der Ölsäure über ein sekundäres Carbokation am C₁₀-Atom verläuft.⁷⁸ Im Falle der C10-Fettsäure würde dies aufgrund der terminalen C=C Bindung die Bildung eines primären Carbokation-Intermediates voraussetzen. Dieses ist jedoch infolge fehlender induktiver Effekte deutlich weniger stabil, sodass vermutlich die Abwesenheit der Methylgruppe auf der Omega-Seite der Doppelbindung für die Inaktivität des Enzyms verantwortlich ist.¹⁴³ Da darüber hinaus auch kein 9-Hydroxyprodukt identifiziert wurde, ist für die enzymatische Aktivität scheinbar, wie bereits beschrieben, ein gewisser Abstand zwischen der Carboxylgruppe und der C=C Bindung essentiell,³² welcher jedoch bei der Fettsäure Dec-9-ensäure für die C₉-Hydratisierung nicht ausreicht.

Neben der Hydroxylierung von Fettsäuren ist insbesondere auch die Funktionalisierung von Alkenen von großem industriellen Interesse. Da die selektive Synthese der entsprechenden Produkte für die organische Chemie eine große Herausforderung darstellt, wurde im Rahmen dieser Arbeit das Potenzial der *Em*-OAH im Hinblick auf die Hydratisierung terminaler Alkene analysiert. Die Hydratisierung des Alkens 1-Decen verläuft bei korrekter Positionierung in der Alkyl-Bindetasche über ein sekundäres Carbokation (Abbildung 48), wie es für das natürliche Substrat Ölsäure und die verkürzte C11-Fettsäure der Fall ist. Darüber hinaus unterstützt die Verwendung eines Fettsäure-Dummy-Substrates vermutlich die Substrat-Erkennung und/oder die Reorganisation der Aminosäuren des aktiven Zentrums und somit die Aktivierung des Enzyms für die Katalyse. Die generelle Wirkungsweise eines Dummy-Substrates liegt unter anderem darin die aktive Tasche zu füllen, sodass das tatsächliche Substrat in einer konsistenten Orientierung gebunden wird. Es nimmt jedoch nicht an der eigentlichen Katalyse teil und dient selber nicht als Substrat. Die Idee zur Verwendung eines Dummy-Substrates (auch Decoy-Molekül genannt) für die fälschliche Substrat-Erkennung ist nicht neu. Der Einsatz perfluorierter Carbonsäuren resultierte beispielsweise in die erfolgreiche P450-vermittelte Hydroxylierung gasförmiger Alkane.^{114,144-147}

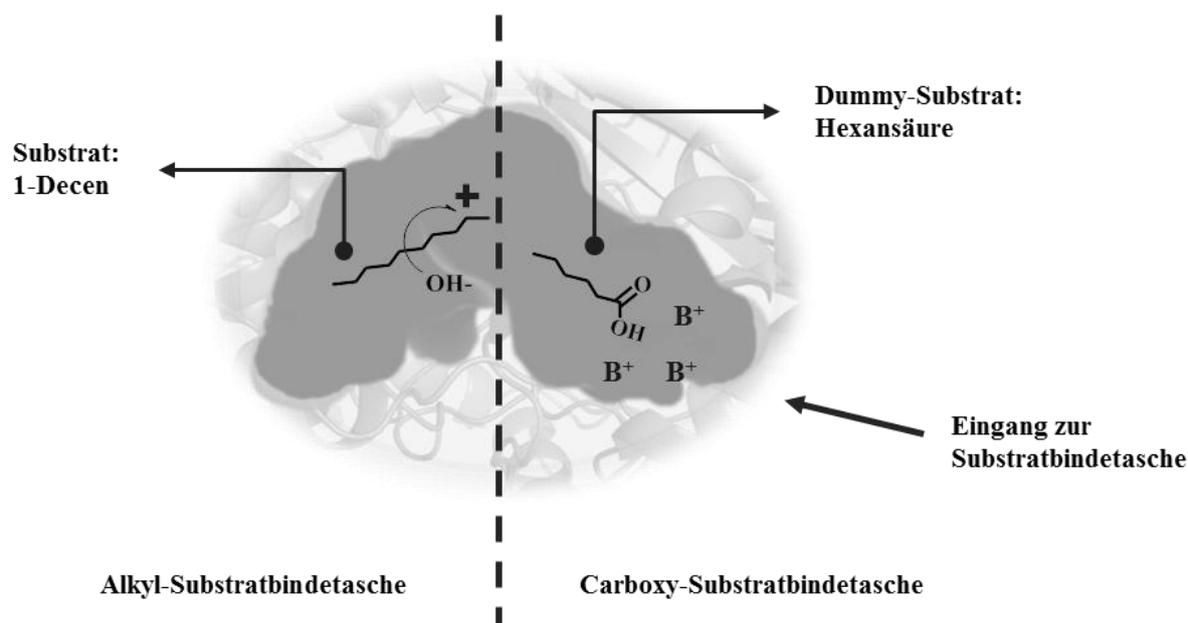


Abbildung 48: Schematische Darstellung der Substratbindetasche des *Em*-OAH Wildtypenzym

Die V-förmige Substratbindetasche kann in zwei theoretische Teile eingeteilt werden (angedeutet durch die gestrichelte Linie): das Substrat 1-Decen wird in der Alkyl-Bindetasche gebunden, während das Dummy-Substrat Hexansäure in die Carboxy-Bindetasche aufgenommen wird. Die Doppelbindung des Alkens liegt an der Krümmung der Bindetasche in räumlicher Nähe zu den katalytisch aktiven Aminosäuren (Y241 & E122) und die Reaktion verläuft infolge dieser Positionierung über die Bildung eines sekundären Carbokations (angedeutet durch das Plus). Die Bindung des Fettsäure-Dummy-Substrates wird durch die polaren und positiv-geladenen Aminosäuren Q265, T436, N438 und H442 am Eingang der Substratbindetasche unterstützt (angedeutet mit B⁺).

Die Hydratisierung des Alkens 1-Decen durch das *Em*-OAH Wildtypenzym unter optimierten Bedingungen und Verwendung von Hexansäure als Dummy-Substrat war erfolgreich. Die Bildung des primären Alkohols 1-Decanol wurde infolge der gewünschten Positionierung und der Instabilität des entsprechenden Carbokation-Intermediates nicht beobachtet. Die Identifizierung des verzweigten Isomers 2-Decanol korreliert darüber hinaus mit dem zu erwartenden Ergebnis einer Markovnikov Addition.³³ Jedoch verlief die Reaktion mit 50 % Produktbildung (0,25 mM 2-Decanol) nach vier Tagen Inkubation sehr langsam. Ein Grund hierfür ist vermutlich unter anderem die hohe Flüchtigkeit des gewählten Substrates. So gingen bis zu 30 % des Alkens trotz der Verwendung fest verschlossener Reaktionsgefäße im Laufe der Inkubationszeit verloren. Darüber hinaus verlangt die erfolgreiche Umsetzung eine stabile Positionierung des 1-Decen in der Alkyl-Bindetasche und die gleichzeitige Bindung des Fettsäure-Dummy-Substrates. Die Katalyse zeigte eine starke Abhängigkeit von der Hexansäure, da ohne das Dummy-Substrat bis zu 90 % weniger Produkt erhalten wurde. Die Funktion und Bedeutung einer Carboxygruppe zur Substrat-Erkennung durch polare und positiv geladene Aminosäuren am Eingang der Substratbindetasche wurde bereits mehrfach analysiert und diskutiert. Unterstützt wird die Hypothese zur Carbonsäure-Abhängigkeit der Katalyse durch die Inaktivität verschiedener OAHs mit Substraten wie beispielsweise Methyl-

und Ethylfettsäureestern.^{62,66,69,76,77} Auch Docking-Ergebnisse und Mutagenesestudien der *Em*-OAH von Engleder und Kollegen lassen auf eine Interaktion des Fettsäure-Carboxylates mit Aminosäuren am Eingang der Substratbindetasche schließen.⁷⁸ Dass das Alken 1-Decen in sehr geringem Maße (ca. 7 % rel. Produktbildung) auch ohne Verwendung des Hexansäure-Dummy-Substrates hydratisiert wurde, zeigt jedoch, dass die Hydratisierung auch ohne Interaktion des Substrates mit den Aminosäuren am Eingang der Bindetasche stattfinden kann, aber deutlich ineffektiver verläuft.

Die 1-Decen-Hydratisierung durch das *Em*-OAH Wildtypenzym verlief mit einer exzellenten Stereoselektivität von >99 % und das Biotransformationsprodukt wurde mithilfe einer chiralen GC-Analyse als *S*-2-Decanol identifiziert. Die inverse Produkt-Konfiguration lässt sich in diesem Fall durch eine Veränderung der Priorität bei Anwendung der Cahn–Ingold–Prelog-Konvention erklären, so wie bereits für die Hydratisierung von 12-Oxooleat zu *S*-10-Hydroxy-12-Oxostearinsäure beschrieben.¹¹² Die ermittelte Konfiguration des 1-Decen Biotransformationsproduktes stimmt somit mit dem, gemäß der natürlichen Reaktion, zu erwartenden Ergebnis überein.

Die Analyse der 1-Decen-Hydratisierung erfolgte unter C11-Fettsäure optimierten Bedingungen. Aufgrund der beträchtlichen chemischen Unterschiede zwischen Fettsäuren und Alkenen wurde der Einfluss der optimierten Parameter auf die Produktbildung noch einmal im Detail analysiert. Wie zuvor im Fall der (*Z*)-Undec-9-ensäure Hydratisierung zeigte die Zugabe von Glucose und FAD eine positive Auswirkung im Hinblick auf die Enzymaktivität. Gründe hierfür liegen vermutlich wie oben beschrieben in der Aufrechterhaltung des Metabolismus und dem damit verbundenen Fortbestand reduzierender Bedingungen sowie der Sättigung des Enzyms mit dem essentiellen Cofaktor FAD. Die Verwendung von NADH und DTT zeigte hingegen keinen Einfluss auf den Substratumsatz. Erklären lässt sich dies eventuell durch die Unterschiede zwischen den beiden Substraten. Während Fettsäuren von *E. coli* metabolisiert werden, besitzt der Organismus keine Fähigkeit zum Abbau von Alkenen. Die Zugabe von NADH (und DTT) hat vermutlich infolge einer Sättigung der oxidativen Zellmaschinerie mit Reduktionsäquivalenten einen entscheidenden Einfluss auf den Zellmetabolismus. Während dies für die Hydratisierung von 1-Decen keine Rolle zu spielen scheint, ist es für den Umsatz der C11-Fettsäure (*Z*)-Undec-9-ensäure scheinbar sehr wichtig, da diese Verbindung ansonsten im Rahmen des Zellmetabolismus verstoffwechselt werden würde. Die Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 30 °C wirkte sich infolge einer verstärkten Evaporation des Alkens negativ auf die Produktbildung aus. Die Ergebnisse zeigen, dass die Optimierung von Reaktionsbedingungen nicht nur vom Enzym

selber sondern ebenso vom jeweiligen Substrat abhängig ist. Optimierte Reaktionsbedingungen ermöglichen eventuell den Umsatz weiterer nicht-natürlicher Substrate, sind aber nicht zwangsläufig optimal für das jeweilige Molekül. Nichtsdestotrotz unterstreichen die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse die Bedeutung verbesserter Reaktionsbedingungen und den Erfolg statistischer Versuchsplanung für den enzymatischen Umsatz nicht-natürlicher Substrate.

4.4 Funktion und Bedeutung des Fettsäure-Dummy-Substrates

Die Analyse zum Einfluss verschiedener Hexansäure-Konzentrationen auf die Hydratisierung des Alkens 1-Decen durch das *Em*-OAH Wildtypenzym bestätigt die starke Abhängigkeit der Katalyse vom Fettsäure-Dummy-Substrat. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass das Verhältnis von Substrat und Dummy-Substrat entscheidend ist. Ein Überschuss an Hexansäure scheint die Produktbildung zu inhibieren. Begründen lässt sich dies möglicherweise mit der Bindung des Dummy-Substrates am Eingang der Substratbindetasche (Carboxy-Bindetasche), da dies eventuell den Zugang zur Alkyl-Bindetasche blockiert und somit eine Bindung des Alkens verhindert. Die Erniedrigung der Hexansäure-Konzentration zeigte jedoch ebenfalls einen negativen Effekt auf den Substratumsatz. Die Notwendigkeit äquimolarer Konzentrationen deutet somit auf einen aktivierenden, Enzym-stabilisierenden und/oder strukturellen Effekt des Fettsäure-Dummy-Substrates hin. Die Stereoselektivität der Hydratisierungsreaktion zeigte jedoch keine Abhängigkeit von der Hexansäure-Konzentration.

Die Analyse eines inhibierenden/aktivierenden Effektes des Dummy-Substrates mithilfe von Präinkubationsversuchen war nicht erfolgreich. Es wurde keine starke Interaktion der Hexansäure mit der aktiven Tasche bzw. dauerhafte Bindung am Eingang der Substratbindetasche beobachtet. Stattdessen scheint die Diffusion des Substrates sowie des Dummy-Substrates in die Bindetasche und wieder heraus sehr schnell zu verlaufen und die Bindung hoch-reversible zu sein. Eine gleichzeitige Zugabe und somit Verfügbarkeit des Substrates- und Dummy-Substrates scheint jedoch vorteilhaft zu sein, da sowohl eine Präinkubation mit 1-Decen als auch mit Hexansäure in leicht verringerte Produktkonzentrationen resultierte. Dies deutet daraufhin, dass das Dummy-Substrat nicht nur am Eingang der Substratbindetasche gebunden wird sondern als zweite Komponente in die Bindetasche aufgenommen wird. Ein generelles Problem stellt die Vergleichbarkeit der verschiedenen Ansätze dar. Während das Substrat 1-Decen im Laufe der 24-stündigen Präinkubation infolge der hohen Flüchtigkeit zum Teil in die Gasphase verloren geht, wird die Hexansäure möglicherweise im Rahmen der β -Oxidation von den Zellen metabolisiert.

Darüber hinaus wird 1-Decen, wie vorherige Versuche gezeigt haben, bereits während der Präinkubation ohne Fettsäure-Dummy-Substrat zu einem geringen Prozentsatz hydratisiert. Da die Umsatzraten bei diesem Experiment sehr gering waren, zeigten bereits kleine Unterschiede einen großen Einfluss auf die relative Produktbildung. Nichtsdestotrotz unterstützen die Präinkubationsversuche die Ergebnisse zum Einfluss verschiedener Hexansäure-Konzentrationen: sowohl die gleichzeitige Zugabe als auch äquimolare Konzentrationen von Substrat und Dummy-Substrat erhöhen die Wahrscheinlichkeit, dass beide Moleküle für eine erfolgreiche Katalyse gemeinsam in der Bindetasche vorliegen.

Die Flüchtigkeit des Substrates 1-Decen und die Abhängigkeit der Katalyse von Hexansäure als Dummy-Substrat stellte auch für die biochemische Analyse ein Problem dar. Zum einen ist es denkbar, dass der Übergang des Alkens in die Gasphase von der Konzentration selber beeinflusst wird. Darüber hinaus ist die Funktion und Rolle des Fettsäure-Dummy-Substrates noch nicht geklärt. Dennoch war es möglich die Ergebnisse in eine Michaelis-Menten Kinetik zu fitten. Da es jedoch fraglich ist, ob die Hydratisierungsreaktion mit dem klassischen Model übereinstimmt, wurden die Parameter mit dem Zusatz „scheinbar“ gekennzeichnet. Es wurde für die 1-Decen Hydratisierung ein scheinbarer $K_{M(\text{app})}$ -Wert von 0,55 mM und eine scheinbare maximale Umsatzrate $v_{\text{max}(\text{app})}$ von 3,9 mU pro Milligramm Biofeuchtmasse ermittelt. Die kinetische Analyse von Engleder und Kollegen zur Hydratisierung von Ölsäure mit dem aufgereinigten Enzym und 86 % FAD-Cofaktor Beladung ergab eine scheinbare maximale Aktivität von $1,0 \pm 0,1$ U/mg und einen scheinbaren K_M -Wert von $0,11 \pm 0,06$ mM.⁶⁰ Diese Werte entsprechen dabei in etwa dem Resultat von Bevers und Kollegen zur erstmaligen *Em*-OAH Charakterisierung aus dem Jahre 2009 ($v_{\text{max}(\text{app})}$: $0,39 \pm 0,7$ U/mg, $K_{M(\text{app})}$: $0,3 \pm 0,26$ mM).⁶⁰ Die maximale Umsatzrate für das nicht-natürliche kurzkettige Alken 1-Decen war erwartungsgemäß deutlich erniedrigt. Gründe hierfür liegen unter anderem in der Flüchtigkeit und der geringen Löslichkeit des Substrates, einer infolge des fehlenden Carboxy-„Ankers“ unzulänglichen Stabilisierung/Positionierung des Alkens und der Notwendigkeit eines Fettsäure-Dummy-Substrates.

Die tatsächliche Bindestelle der Fettsäure und die Bedeutung der Carboxygruppe für die Katalyse wurden mithilfe alternativer Dummy-Substrate analysiert. Der Einsatz gesättigter Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge (C8-C5) als Dummy-Substrate war erfolgreich. Während mit Heptansäure gefolgt von Hexansäure die höchste 2-Decanol Konzentration ermittelt wurde, war die relative Produktbildung bei dem Einsatz von Octansäure und Pentansäure jedoch deutlich verringert. Heptansäure (C7) und Hexansäure (C6) ermöglichen somit scheinbar unter Verwendung von 1-Decen als Substrat die zeitgleiche Bindung zweier

Moleküle in der Substratbindetasche. Die Verwendung von Octansäure (C8) führt hingegen vermutlich zu sterischen Hinderungen im aktiven Zentrum. Kurzkettige Fettsäuren wie Pentansäure (C5) sind möglicherweise zu klein für eine effektive Enzymaktivierung und/oder Alkenstabilisierung. Hexansäureamid diente nicht als alternatives Dummy-Substrat für die Hydratisierung von 1-Decen. Die relative Produktbildung war genauso niedrig wie ohne Zugabe eines Dummy-Substrates. Da das Amid ein nur schwacher Wasserstoffbrücken-Akzeptor ist, lässt sich dieses Ergebnis vermutlich durch den Verlust des Wasserstoffbrücken-Netzwerks mit den Aminosäuren am Eingang der Substratbindetasche (Q265, T436, N438 und H442) erklären. Auch der Einsatz funktionalisierter Hexansäure-Derivate wie 6-Hydroxyhexansäure, 6-Aminohexansäure und 1,6-Hexandiol war nicht erfolgreich. Dieses Resultat unterstützt die Hypothese, dass die aliphatische Kette des Dummy-Substrates für die Katalyse in der Carboxy-Substratbindetasche gebunden werden muss. Die terminale polare Funktionalisierung der Hexansäure-Derivate verhindert möglicherweise die produktive Bindung in der überwiegend hydrophoben Bindetasche.⁷⁸ Darüber hinaus könnten die geringen Umsatzraten bei Einsatz der funktionalisierten Hexansäurederivate das Resultat sterischer Hinderungen innerhalb der Substratbindetasche sein. Die erhaltenen Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass für eine erfolgreiche Katalyse neben der Interaktion der Carboxylgruppe die Bindung des Dummy-Substrates in der Carboxy-Substratbindetasche notwendig ist. Die Verwendung von Hexansäureestern als alternative Dummy-Substrate resultierte in einer selektiven Hydratisierung des Substrates 1-Decen mit bis zu 100 % relativer Produktbildung. Die GC-Analyse zeigte jedoch, dass die Ester infolge der Ganzzellbiotransformationen im Laufe der Inkubation durch zelluläre Esterasen des *E. coli* Wirtsorganismus hydrolysiert wurden. Die erfolgreiche Katalyse war somit nicht das Ergebnis der Akzeptanz alternativer Dummy-Substrate sondern beruhte auf einer steigenden Hexansäure-Konzentration. Aus diesem Telexperiment wurde dementsprechend keine Information zur Akzeptanz von Fettsäureestern bezüglich der Substrat-Erkennung und/oder Enzymaktivierung gewonnen. Die Charakterisierung verschiedener OAHs deutet jedoch darauf hin, dass die Carboxygruppe der Interaktion mit polaren und positiv-geladenen Aminosäuren (Threonin, Asparagin, Glutamin, Arginin, Leucin, Histidin) am Eingang der Substratbindetasche dient und somit essentiell für die Hydrataseaktivität der Enzyme ist.^{64,77,78} Darüber hinaus wurde für die Hydratasen bisher keine Aktivität mit Substraten wie Methyl- und Ethylfettsäureestern beobachtet, denen eine entsprechende funktionelle Gruppe fehlt.^{62,66,69,76,77} Auch die Analyse von Hexanal und 1-Hexanol als alternative Dummy-Substrate war infolge der Verwendung ganzer Zellen nicht erfolgreich. Die GC-Analyse

zeigte, dass die Hexansäurederivate im Laufe der Inkubation durch zelluläre Enzyme zu Hexansäure oxidiert wurden. Die Produktbildung war somit vermutlich das Ergebnis geringer Hexansäure-Konzentrationen, sodass keine Information über die Akzeptanz von Alkohol- und Ketofunktionen zur Substraterkennung gewonnen wurde.

Die Analyse zur Funktion und Bedeutung der Hexansäure für die Hydratisierung des Alkens 1-Decen durch das *Em*-OAH Wildtypenzym bestätigt eindeutig die Abhängigkeit der Katalyse vom Fettsäure-Dummy-Substrat. Neben einem äquimolaren Verhältnis von Substrat und Dummy-Substrat ist insbesondere die Verfügbarkeit der Carboxygruppe für eine erfolgreiche Umsetzung essentiell. Darüber hinaus scheint die aliphatische Kette der Fettsäure in die Carboxy-Substratbindetasche aufgenommen zu werden, sodass tatsächlich zwei Moleküle zeitgleich in der Substratbindetasche gebunden werden. Die Stereoselektivität der Katalyse war exzellent und wurde durch die obigen Parameter nicht beeinflusst. Beim generellen Mechanismus der Dummy-Substrat-Abhängigkeit handelt es sich vermutlich um ein Zusammenspiel aus Substrat-Erkennung und Alkenpositionierung. Darüber hinaus könnte das Dummy-Substrat an der Formausbildung der aktiven Tasche und somit entscheidend an der Enzymaktivierung beteiligt sein.

4.5 Analyse des Hydratisierungsmechanismus und der Substratbindung

Für ein besseres Verständnis des Hydratisierungsmechanismus wurden im Rahmen der Masterarbeit von Andreas Hunold¹²⁵ und der Bachelorarbeit von Samuel Kleehammer¹²⁶ weitere *Em*-OAH Varianten generiert. Ziel dieser Mutagenese war sowohl die Identifizierung bzw. Verifizierung katalytisch-relevanter Positionen als auch die Analyse der Substrat-Erkennung bzw. -Bindung mithilfe der Aminosäuren am Eingang des Substratkanals (Abbildung 49). Der von Engleder und Kollegen postulierte Reaktionsmechanismus zur Hydratisierung des natürlichen Substrates Ölsäure beschreibt die Y241-basierte Protonierung der C=C Bindung mit dem anschließenden nukleophilen Angriff eines E122-aktivierten Wassermoleküls.⁷⁸ Die Relevanz dieser beiden Aminosäurepositionen für die *Em*-OAH-katalysierte Hydratisierung wurde im Rahmen dieser Arbeit bestätigt. So zeigten fast alle generierten Mutanten einen vollständigen Aktivitätsverlust mit den ausgewählten Substraten. Auch der konservative Austausch der Glutaminsäure gegen eine Asparaginsäure (E122D) resultierte in einer Inaktivität des Enzyms. Es scheint somit, dass keine Flexibilität hinsichtlich des Abstandes zwischen der aktivierenden Säure, dem Wassermolekül und der C=C Bindung besteht.

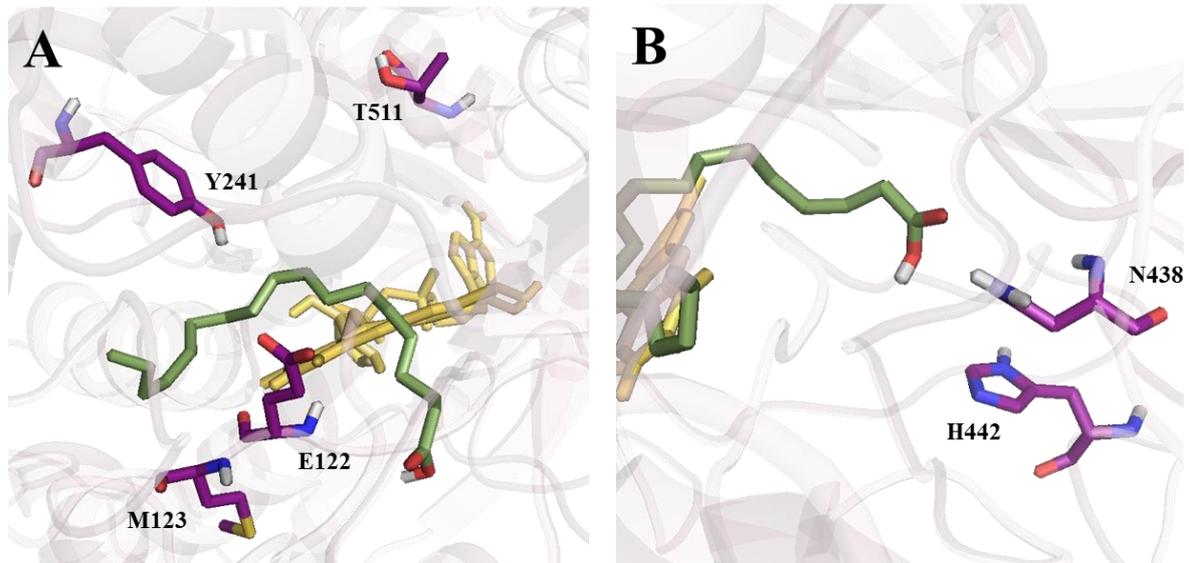


Abbildung 49: Mutagenesepositionen zur Analyse des Hydratisierungsmechanismus

Dargestellt ist die Substratbindetasche des *Em*-OAH Wildtypenzym mit dem gebundenen Cofaktor FAD (gelb) und dem Docking-Ergebnis für das natürliche Substrat Ölsäure (grün). **A:** Tyrosin 241 (Y241), Glutaminsäure 122 (E122), Methionin 123 (M123) und Threonin 511 (T511) wurden aufgrund des von Engleder und Kollegen postulierten Reaktionsmechanismus und infolge einer Sequenz- und Struktur-basierten Analyse für die Verifizierung katalytisch-relevanter Positionen ausgewählt. **B:** Für die Analyse der Substrat-Erkennung mithilfe polarer bzw. positiv-geladener Aminosäurereste am Eingang des Substratkanals wurden die Aminosäurepositionen Histidin 442 (H442) und Asparagin 438 (N438) ausgewählt.

In vielen Sequenzen der Hydratase-Datenbank⁶³ ist die Glutaminsäure direkt neben einem Methionin konserviert (u. a. HFam2 und HFam11), andere OAHs weisen hingegen an entsprechender Position ein Methionin-Leucin-Motiv auf (z. B. HFam1). Interessanterweise wurde für die Einzelmutanten E122M und M123L mit Ölsäure bzw. (*Z*)-Undec-9-ensäure als Substrat eine relative Produktbildung zwischen 5 und 20 % ermittelt, die Doppelmutante E122M/M123L war jedoch inaktiv. Die Ergebnisse zeigen, dass auch das Methionin eine entscheidende katalytische, stabilisierende oder aber strukturelle Rolle spielt. Darüber hinaus scheint die Glutaminsäure eine sehr wichtige aber keine essentielle Funktion zu übernehmen. Möglich wäre somit die Beteiligung weiterer Aminosäuren am katalytischen Mechanismus. Studien von Lorenzen und Kollegen deuten darauf hin, dass beispielsweise die Ölsäure-Hydratasen der Hydratase-Familie 3 einen individuellen alternativen Mechanismus aufweisen.⁷³ Ein entsprechender Reaktionsmechanismus wurde jedoch nicht postuliert.

Im Hinblick auf die Analyse der Substrat-Erkennung bzw. -Bindung wurden verschiedene rationale Varianten des Histidins 442 und des Asparagins 438 generiert. Die beiden Positionen wurden von Engleder und Kollegen im Rahmen der Struktur-basierten Untersuchungen und infolge eines Alanin-Screenings als kritische Aminosäuren identifiziert.⁷⁸ Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse bestätigen die Bedeutung der beiden Aminosäurepositionen. Es scheint jedoch, dass das Asparagin 438 eine entscheidendere Rolle spielt als das Histidin 442. So wurde für die N438-Varianten im Gegensatz zu den Histidin-

Mutanten keine Hydrataseaktivität mit Ölsäure, Linolsäure und Myristoleinsäure identifiziert. Wohlmöglich handelt es sich um ein komplexes Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, welches bereits durch geringfügige (polare oder auch sterische) Veränderungen negativ beeinflusst wird. Interessanterweise scheinen sich die Aminosäuresubstitutionen in Abhängigkeit von der Substrat-Kettenlänge unterschiedlich auf die enzymatische Aktivität auszuwirken. Die Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass neben der Carboxy-Funktion auch die aliphatische Kette der Fettsäure-Substrate eine wichtige Rolle für die Substrat-Bindung bzw. -Stabilisierung spielt. Darüber hinaus war der Umsatz des Alkens 1-Decen im Zweikomponentensystem mit dem Dummy-Substrat im Vergleich zu den Fettsäure-Biotransformationen zumeist im geringeren Maße von der jeweiligen Mutation betroffen. Erklären lässt sich dies möglicherweise durch die flexiblere Bindung/Positionierung der kurzkettigen Fettsäure Hexansäure im Vergleich zu den langkettigen Substraten wie Ölsäure und Myristoleinsäure. Eine Unabhängigkeit der Katalyse vom Hexansäure-Dummy-Substrat wurde jedoch durch keine der vorgenommenen Mutationen erreicht. Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen die Relevanz der Carboxygruppe und die Bedeutung der Substrat-Interaktion mit den Aminosäuren am Eingang des Substratkanals. Dabei übernimmt die Carboxy-Funktionalität möglicherweise neben einer Positionierung des Substrates eine wichtige Enzym-aktivierende Funktion.

4.6 Substratspezifität des *Em*-OAH Wildtypenzym

1-Decen (C10) wurde infolge einer erfolgreichen Positionierung in der Alkyl-Bindetasche (Abbildung 48) stereoselektiv zu *S*-2-Decanol hydratisiert. Eine Unabhängigkeit der Katalyse vom Fettsäure-Dummy-Substrat mithilfe einer positionsgerichteten Mutagenese wurde jedoch nicht erreicht. Um das Substratspektrum des *Em*-OAH Wildtypenzym und die Bindung der Alkene genauer zu analysieren, wurde mit 1-Dodecen (C12) und 1-Octen (C8) ein jeweils längeres und kürzeres Substrat ausgewählt. Beide Alkene wurden stereoselektiv zum entsprechenden sekundären Alkohol hydratisiert, jedoch war die Produktbildung im Vergleich zum 1-Decen-Umsatz um das 10-fache verringert. Während die Bindung des Alkens 1-Decen in der Alkyl-Bindetasche vermutlich perfekt der Bindung des natürlichen Substrates Ölsäure entspricht, scheint die Hydratisierung des 1-Dodecen durch sterische Hinderungen am „Ende“ der Alkyl-Bindetasche limitiert zu werden. Dies wiederum hätte eine katalytisch ineffiziente Positionierung der C=C Bindung im aktiven Zentrum zur Folge und würde die niedrige Umsatzrate erklären. 1-Octen hingegen ist vermutlich zu kurz und wird somit in der großen Substratbindetasche für eine hohe Umsatzrate nicht ausreichend stabilisiert. Problematisch ist

darüber hinaus die hohe Flüchtigkeit dieses Alkens, welche in einen Verlust des Substrates in die Gasphase ohne entsprechende Produktbildung resultiert. Nichtsdestotrotz wurde die Umsatzrate beider Hydratisierungsreaktionen (1-Dodecen & 1-Octen) durch die Verwendung von Heptansäure als Dummy-Substrat um 30 % gesteigert. Wie bereits für 1-Decen beobachtet, scheint Heptansäure somit einen positiven Effekt auf die Positionierung/Stabilisierung der Alkene in der großen Substratbindetasche zu haben.

4.7 Rationales Design der *Em*-OAH zur Umsetzung kurzkettiger Alkene

Die stereoselektive Hydratisierung der Alkene 1-Dodecen und 1-Octen zum entsprechenden sekundären Alkohol war erfolgreich. Jedoch wurden im Vergleich zum 1-Decen nur sehr geringe Umsatzraten erhalten. Da 1-Octen zwei Kohlenstoffatome kürzer ist als 1-Decen, ist das Molekül vermutlich zu klein um in der großen Alkyl-Substratbindetasche ausreichend stabilisiert zu werden. Da das Ziel dieser Arbeit die Hydratisierung kurzkettiger nicht-natürlicher Substrate war, wurde ein (semi-)rationaler Mutageneseansatz zur Verkleinerung der Alkyl-Substratbindetasche gewählt. Dies sollte eine bessere Positionierung und Stabilisierung und somit den Umsatz kurzkettiger Alkene ermöglichen.

Mithilfe der *Em*-OAH Kristallstruktur⁷⁸ wurde Phenylalanin 227 der Aminosäuresequenz als interessante Position zur Verkürzung der Alkyl-Substratbindetasche identifiziert. Es liegt in räumlicher Nähe zur C=C Bindung des natürlichen Substrates Ölsäure und ist Teil eines C-terminalen Endes einer α -Helix. Da der Phenylring der Aminosäure möglicherweise an der Stabilisierung einer positiven Ladung im Rahmen des katalytischen Mechanismus beteiligt ist,⁷⁸ wurden für die Substitution die beiden ebenfalls aromatischen Aminosäuren Tryptophan (F227W) und Tyrosin (F227Y) ausgewählt. Die Analyse des Substratspektrums der beiden generierten Mutanten F227W und F227Y im Hinblick auf die Hydratisierung verschiedener Fettsäuren (C18-C10) und Alkene (C10 & C8) deutet darauf hin, dass der Zugang zur Alkyl-Bindetasche durch die Einführung der größeren Aminosäuren erfolgreich blockiert wird. So wurden die lang- und mittelkettigen Fettsäuren (C18-C14) im Vergleich zum Wildtypenzym nicht mehr bzw. nur noch in sehr geringem Maße hydratisiert, während hingegen die Aktivität mit der verkürzten C11-FS sogar um das bis zu 2,5-fache gesteigert war. Darüber hinaus zeigten die beiden Varianten auch mit den Alkenen 1-Decen und 1-Octen, welche infolge der Dummy-Substrat-Strategie in der Alkyl-Bindetasche gebunden würden, keine bzw. kaum Aktivität. Das Ergebnis des Aktivitätsscreenings zeigt, dass die Inaktivität der Varianten nicht auf eine generelle Inaktivierung des Enzyms sondern auf eine starke Veränderung des Substratspektrums infolge sterischer Hinderungen zurückzuführen ist. Eine Analyse der *Em*-

OAH Kristallstruktur unterstützt diese Experiment-basierte Hypothese (Abbildung 50), wobei zu beachten ist, dass es sich hierbei um eine statische *in silico* Betrachtung handelt. Während beim Wildtypenzym ein Abstand von 3,6 Å zwischen dem Phenylring des Phenylalanins 227 und dem C₁₃-Atom der Ölsäure vorliegt, beträgt die Distanz bei der F227W-Variante lediglich 1,4 Å. Die Einführung der größeren Aminosäuren führt dementsprechend in der Substratbindetasche zu sterischen Hinderungen mit langkettigen Fettsäuren (>C₁₂) und Dummy-Substrat-abhängigen Alkenen, während der Umsatz der C₁₁-Fettsäure nicht betroffen ist. Stattdessen resultierte die Verkleinerung der Substratbindetasche sogar in einer Steigerung der C₁₁-Fettsäure Hydratisierung, was möglicherweise auf eine bessere Stabilisierung des Substrates zurückzuführen ist. Trotz dieses positiven Ergebnisses im Hinblick auf die kurzkettige C₁₁-FS wurde kein Umsatz der C₁₀-Fettsäure Dec-9-ensäure mit terminaler C=C Bindung beobachtet. Die Hydratisierung dieses Substrates würde gemäß des von Engleder und Kollegen beschriebenen Mechanismus⁷⁸ die Bildung eines primären Carbokations voraussetzen. Die Inaktivität der generierten Varianten mit der Dec-9-ensäure ist vermutlich das Resultat der geringen Stabilität der positiven Ladung infolge fehlender induktiver Effekte.¹⁴³

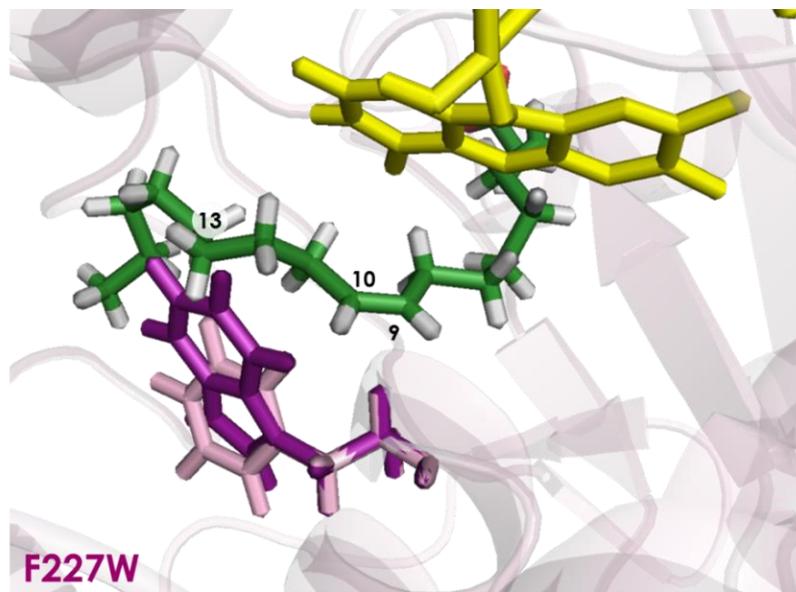


Abbildung 50: *In silico*-Analyse der *Em*-OAH Variante F227W basierend auf der Kristallstruktur des Wildtypenzym. Dargestellt ist ein Ausschnitt der Kristallstruktur des *Em*-OAH Wildtypenzym (Cartoon-Ansicht) mit dem Docking-Ergebnis nach Energieminimierung für das natürliche Substrat Ölsäure (grün, Stabmodell). Die C=C Bindung ist mit den Zahlen 9 und 10 gekennzeichnet. Darüber hinaus ist das Kohlenstoffatom 13 der Ölsäure markiert. Der nicht-kovalent gebundene Cofaktor FAD ist gelb und als Stabmodell dargestellt. Phenylalanin (rosa) an Position 227 der Aminosäuresequenz ist ebenfalls als Stabmodell hervorgehoben und wurde *in silico* gegen ein Tryptophan (lila) ausgetauscht. Durch diese Substitution verringert sich der Abstand zwischen der Aminosäure an Position 227 und dem C₁₃-Atom der Ölsäure von 3,6 Å auf 1,4 Å.

Neben den beiden aromatischen Substitutionen F227W und F227Y wurde darüber hinaus die *Em*-OAH Variante F227L generiert. Obwohl ca. 1 % der Wildtyp-OAHs (HFam6, HFam7, HFam8 und HFam9) tatsächlich ein Leucin an dieser Aminosäureposition aufweisen, zeigte diese *Em*-OAH Mutante eine nur sehr geringe Restaktivität mit allen ausgewählten Substraten, darunter auch die kurzkettige C11-Fettsäure. Das Aktivitätsscreening deutet somit darauf hin, dass für die Ölsäure-Hydratase aus *E. meningoseptica* eine aromatische Aminosäure an Position 227 der Aminosäuresequenz eine essentielle Rolle für den katalytischen Mechanismus spielt. So ist das Phenylalanin 227, welches in 98 % der Sequenzen konserviert ist,⁶³ möglicherweise durch Kation- π -Interaktionen zwischen dem aromatischen Aminosäurerest und dem katalytischen Intermediat an der Stabilisierung des sekundären Carbokations beteiligt.⁷⁸ Ölsäure-Hydratasen mit der nicht-aromatischen Aminosäure Leucin an entsprechender Position besitzen hingegen möglicherweise ein differenziertes Substratspektrum, kompensieren den stabilisierenden Effekt mithilfe anderer aromatischer Aminosäuren oder aber verwenden einen alternativen Reaktionsmechanismus.

In Zusammenarbeit mit der Bioinformatikgruppe des IBTB wurde neben der Strukturanalyse auch ein Sequenzalignment basierend auf der Hydratase-Datenbank durchgeführt. Im Rahmen dieser systematischen Analyse wurde die Aminosäure 248 als Spezifität-bestimmende Position (*specificity-determined position*, SDP) identifiziert. Dies bedeutet, dass sich die homologen Hydratase-Familien in dieser Aminosäureposition deutlich voneinander unterscheiden. So weisen die Hydratase-Familien 1 und 2 (HFam1 und HFam2) an entsprechender Position eine Glutaminsäure (E) bzw. ein Histidin/Glutamin (H/Q) auf, während bei der HFam11 die hydrophoben Aminosäuren Alanin und Leucin vorliegen. Aus der Kristallstruktur der *Em*-OAH geht darüber hinaus hervor, dass das Alanin 248 am Ende der Substratbindetasche liegt und in Richtung des C₁₈-Atoms des natürlichen Substrates Ölsäure gerichtet ist. Die Einführung größerer Aminosäuren könnte somit in eine erfolgreiche Verkleinerung der Alkyl-Substratbindetasche resultieren. Infolge der großen Diversität der vorliegenden Aminosäuren an dieser Position wurde das Alanin 248 der *Em*-OAH für eine Sättigungsmutagenese ausgewählt.

Das Aktivitätsscreening der generierten A248-Mutanten bestätigt die Bedeutung dieser Position für die Substratspezifität der Ölsäure-Hydratase. Die Einführung der verschiedenen Aminosäuren resultierte in eine deutliche Verschiebung des Substratspektrums. Auffällig ist insbesondere der Zusammenhang zwischen der Größe des Aminosäurerestes und der akzeptierten Substratkettlänge, welcher bei den hydrophoben Aminosäuren am stärksten ausgeprägt ist. Während die enzymatische Hydratisierung lang- und mittelkettiger Fettsäuren

(C18-C14) und des Alkens 1-Decen (C10) bei fast allen Mutanten deutlich verringert war, wurde für die kurzkettige Fettsäure (Z)-Undec-9-ensäure (C11) und 1-Octen (C8) zumeist eine Aktivitätssteigerung beobachtet. Die Ergebnisse deuten auf sterische Hinderungen des Protein-Backbones mit langkettigen Substraten am Ende der Alkyl-Substratbindetasche hin, resultierend aus der Einführung größerer Aminosäuren. Diese Hypothese wird auch durch eine Analyse der *Em*-OAH Kristallstruktur unterstützt (Abbildung 51). Während der Abstand zwischen dem Alanin 248 und dem C₁₈-Atom der Ölsäure im Wildtypenzym 4 Å beträgt, wird diese Distanz beispielsweise infolge der Substitution mit einem Tryptophan (A248W) auf 2,3 Å reduziert. Der Tryptophanrest würde dementsprechend mit der aliphatischen Kette von Ölsäure und Palmitinsäure und den Alkenen 1-Decen und 1-Octen in der Alkyl-Bindetasche interferieren, während die Bindung von Myristoleinsäure und (Z)-Undec-9-ensäure nicht betroffen wäre. Das Ergebnis der bioinformatischen Analyse würde somit den experimentell ermittelten Daten entsprechen. Es ist jedoch zu beachten, dass es sich bei der strukturellen Analyse um eine statische *in silico* Betrachtung handelt, da keine Kristallstruktur der *Em*-OAH A248W-Variante zur Verfügung steht und das Substrat Ölsäure lediglich in das Wildtypenzym gedockt wurde.

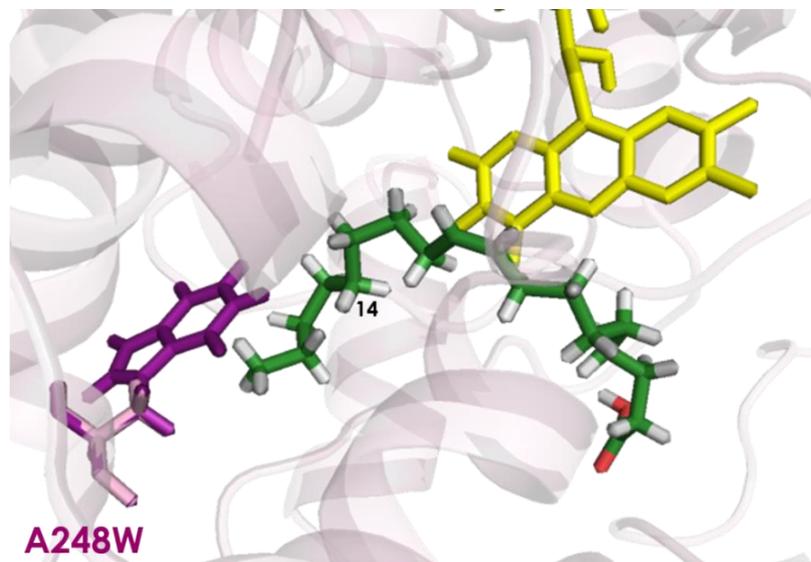


Abbildung 51: *In silico*-Analyse der *Em*-OAH Variante A248W basierend auf der Kristallstruktur des Wildtypenzyms

Dargestellt ist ein Ausschnitt der Kristallstruktur des *Em*-OAH Wildtypenzyms (Cartoon-Ansicht) mit dem Docking-Ergebnis nach Energieminimierung für das natürliche Substrat Ölsäure (grün, Stabmodell). Das Kohlenstoffatom 14 der Ölsäure ist gekennzeichnet. Der nicht-kovalent gebundene Cofaktor FAD ist gelb und als Stabmodell dargestellt. Alanin (rosa) an Position 248 der Aminosäuresequenz ist ebenfalls als Stabmodell hervorgehoben und wurde *in silico* gegen ein Tryptophan (lila) ausgetauscht. Durch diese Substitution verringert sich der Abstand zwischen der Aminosäure an Position 248 und dem C₁₈-Atom der Ölsäure von 4 Å auf 2,3 Å.

Nichtsdestotrotz zeigen die erhaltenen Ergebnisse, dass es sich bei dem Alanin 248 der *Em*-OAH tatsächlich um eine Spezifität-bestimmende Position handelt: die Einführung einer

Einzelmutation resultierte in einer drastischen Veränderung des Substratspektrums. Darüber hinaus scheint die Stabilisierung und Positionierung der nicht-natürlichen kurzkettigen Substrate (Z)-Undec-9-ensäure und 1-Octen ein Kernaspekt zur erfolgreichen Hydratisierung durch die *Em*-OAH zu sein. Hierbei handelt es sich offensichtlich um eine Feinabstimmung zwischen Aminosäurekettenlänge und Substratkettenlänge. Während kleine Aminosäurereste an Position 248 scheinbar eine hohe Flexibilität und Beweglichkeit ermöglichen, resultieren sehr große Reste wiederum in sterische Hinderungen. Besonders deutlich wird dies bei der Tryptophan Mutante A248W. Da diese Mutante mit der C11-FS eine im Vergleich zum Wildtyp 1,5-fach erhöhte relative Produktbildung aufwies, gleichzeitig mit 1-Octen aber weniger aktiv war als der Wildtyp, scheint das Tryptophan bereits zu groß für eine effektive Umsetzung des C8-Alkens. Es handelt sich bei dieser Variante somit um einen besonders interessanten Kandidaten für die Hydratisierung noch kleinerer Moleküle (Kettenlänge <C8). Die Hypothese, dass die Aminosäureposition 248 des OAH-Sequenzalignments einen Einfluss auf die Substratspezifität hat, wird auch durch Studien von Jens Schmid zum Substratspektrum verschiedener OAH-Wildtypenzyme unterstützt.⁶³ So zeigten die Ölsäure-Hydratasen aus *G. morbillorum* (*Gm*-OAH) und *L. acidophilus* (*La*-OAH) hohe Hydratisierungsraten mit mittelkettigen Fettsäuren wie Palmitinsäure (C16) und Myristoleinsäure (C14), während die Aktivität mit Ölsäure (C18) und der kurzkettigen C11-FS (Z)-Undec-9-ensäure deutlich geringer war. Interessanterweise entspricht das Substratspektrum der *Em*-OAH A248H-Mutante der Spezifität der *Gm*-OAH und *La*-OAH (HFam2), welche ebenfalls ein Histidin an Aminosäureposition 248 des Sequenzalignments aufweisen.

4.8 Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Umsetzung flüchtiger Alkene mit/ohne Zweiphasensystem

Die (semi-)rationale Mutagenese des *Em*-OAH Wildtypenzyms an Position A248 und F227 resultierte in einige Varianten mit einer deutlichen Aktivitätssteigerung hinsichtlich der kurzkettigen nicht-natürlichen Substrate (Z)-Undec-9-ensäure und 1-Octen. Bei diesen Mutanten (u.a. A248V/L/I/W und F227Y/W) handelt es sich um interessante Kandidaten in Bezug auf die Hydratisierung noch kleinerer Alkene (1-Hepten, 1-Hexen und 1-Penten). Bereits erfolgte Studien mit 1-Dodecen, 1-Decen und 1-Octen zeigten jedoch, dass die Volatilität der Alkene mit abnehmender Kettenlänge deutlich zunimmt und somit ein Problem für die Biotransformationen darstellen könnte. Um den Verlust der flüchtigen Substrate in die Gasphase zu reduzieren und somit die Verfügbarkeit für den enzymatischen Umsatz zu

steigern, wurde zunächst ein Zweiphasensystem etabliert. Als Modellsubstrat wurde das bisher kürzeste Alken-Substrat 1-Octen ausgewählt, mit welchem die *Em*-OAH Variante A248L die höchste Umsatzrate zeigte. Da der Fokus auf einer Steigerung der Produktbildung lag, wurden jeweils die relativen Werte verglichen ohne eine entsprechende Quantifizierung der Produktkonzentration vorzunehmen.

Der erste Versuch zur Etablierung eines Zweiphasensystems mit sechs verschiedenen Lösemitteln war jedoch nicht erfolgreich. Die deutliche Trübung der Biotransformationen am Ende der Inkubation deutet auf eine Denaturierung der Proteine hin. Begründen lässt sich dies vermutlich durch die Anwendung aufgetauter Expressionskulturen, deren Zellen infolge des Gefrierens eine permeabilisierte Membran und somit reduzierte Zellstabilität aufweisen.^{148,149} So resultierte die Verwendung „frischer“ Kulturen (d.h. ohne Gefrierschritt) zumindest im Fall von Cyclohexan in einer klaren Phasentrennung. Eine Hydrataseaktivität wurde dennoch nicht beobachtet. Dies lässt darauf schließen, dass die *Em*-OAH Variante A248L unter den gewählten Bedingungen möglicherweise keine Lösemitteltoleranz besitzt. Ein Problem bei der Etablierung eines Zweiphasensystems ist jedoch die Wahl des organischen Lösemittels selber. So führte die Verwendung von Cyclohexan möglicherweise zu einer Inhibierung der Ölsäure-Hydratase. Darüber hinaus spielt auch die Substratkonzentration bzw. der Verteilungskoeffizient des Substrates in der wässrigen und organischen Phase eine wichtige Rolle. Eine Substrat- und Dummy-Substrat-Konzentration von 0,5-1,5 mM ist dementsprechend vermutlich zu gering für eine erfolgreiche Katalyse im Zweiphasensystem. Mithilfe einer Literaturrecherche wurden nachfolgend zahlreiche kurzkettige, zyklische, lineare und verzweigte Lösemittel mit Anwendungen in Zweiphasensystemen identifiziert.^{118,127-132} Darüber hinaus sollte die Substratkonzentration deutlich erhöht werden. Da dies mithilfe der DMSO-Stocklösung infolge von Löslichkeitsproblemen nicht realisierbar war, wurde Ethanol als Cosolvens eingesetzt. Die Zugabe des Alkohols resultierte jedoch in einen deutlichen Aktivitätsverlust der *Em*-OAH. Vermutlich handelt es sich auch hierbei um einen inhibierenden Effekt durch die Bindung des kurzkettigen Alkohols in der Substratbindetasche. Infolge der geringen Löslichkeit des Alkens 1-Octen in DMSO und des inaktivierenden Effektes von Ethanol wurde letztendlich auf die Verwendung eines Cosolvens verzichtet. Stattdessen wurden das Substrat und das Dummy-Substrat in hoher Konzentration direkt zu den Biotransformationen gegeben. Dies ermöglicht hohe Substratkonzentrationen ohne die Gefahr Protein-inhibierender oder Zell-permeabilisierender Effekte durch eine hohe Cosolvens-Konzentration, hat aber eine verringerte Löslichkeit des Alkens im Reaktionsansatz zur Folge.^{150,151} Während die direkte Zugabe von 10 mM 1-Octen und

Heptansäure im Kontrollansatz ohne Lösemittel in eine hohe Produktbildung resultierte, führte die Anwendung eines Zweiphasensystems zumeist zu einem Aktivitätsverlust der Ölsäure-Hydratase. Da die besten Ergebnisse mit langkettigen/verzweigten/unpolaren Lösemitteln wie Dodecansäuremethylester, Isopropylmyristat und Bis(2-ethylhexyl)phthalat erhalten wurden, handelt es sich vermutlich um inhibitorische Effekte der kleinen, kurzkettigen Moleküle (u. a. *p*-Xylol, Cyclohexan, Toluol, Diethylether). Problematisch ist darüber hinaus möglicherweise auch die Toxizität dieser Lösemittel, die Interaktion mit der Zellmembran oder der Proteinoberfläche, die Substratverfügbarkeit infolge eines ungünstigen Verteilungskoeffizienten oder vielmehr ein Zusammenspiel aus den genannten Komponenten.^{132,151–156} Eine Studie zur Membranpermeabilität und Zellyse verschiedener *E. coli* Stämme zeigte, dass der Stamm BL21 durch die Inkubation mit Styroloxid deutlich stärker beeinträchtigt wird als beispielsweise *E. coli* JM101.¹⁵²

Die besten Eigenschaften der getesteten Lösemittel für die Etablierung eines Zweiphasensystems zur Hydratisierung kurzkettiger Alkene mithilfe der *Em*-OAH besitzt scheinbar das verzweigte, unpolare Lösemittel Bis(2-ethylhexyl)phthalat. Erfolgte Studien charakterisieren BEHP als sehr gut biokompatibel^{152,157} und die erfolgreiche Anwendung in Zweiphasensystemen wurde bereits mehrfach beschrieben.^{128,152,153,157–159} So wurden beispielsweise in einem zehnstündigen Prozess mithilfe rekombinanter *E. coli* Zellen ausgehend von dem cyclischen Alken Styrol 11 g Enantiomer-reines (*S*)-Styroloxid gewonnen (volumetrische Aktivität 300 U/L).¹²⁸ Der Einsatz von BEHP in Biotransformationen mit der *Em*-OAH Variante A248L und 10 mM 1-Octen resultierte in eine relative Produktbildung von bis zu 100 %. Da eine Steigerung der Substrat- und Dummy-Substrat-Konzentration keinen positiven Einfluss auf die enzymatische Aktivität hatte, schien die Substratverfügbarkeit in diesem System zunächst kein Problem darzustellen. Es zeigte sich jedoch, dass die Biotransformationen für eine ausreichende Substratverfügbarkeit während der Inkubation geschüttelt werden müssen. Darüber hinaus verbesserte die Verdopplung des Lösemittelvolumens die Reproduzierbarkeit der Experimente. Erklären lässt sich dies vermutlich durch die vereinfachte Handhabung des sehr viskosen Lösemittels infolge des vergrößerten Pipettierolumens. Das Zweiphasensystem wurde nachfolgend durch die Analyse der Biomasse-, Glucose- und FAD-Konzentration weiter optimiert. Allerdings zeigten auch diese Parameter keinen großen Effekt auf die relative Produktbildung.

Es schien, dass mithilfe des gewählten Zweiphasensystems keine weitere Verbesserung der Alken-Hydratisierung möglich war. Auffällig war jedoch, dass die enzymatische Aktivität durch eine weitere Erhöhung des BEHP-Volumens deutlich verringert war. Dieses Resultat

ließ nun doch auf eine mögliche Substrat-Limitierung schließen. Bisher hatte die Steigerung der Substrat- und Dummy-Substrat-Konzentration jedoch keine Verbesserung der Produktbildung bewirkt. Aufgrund der bereits erfolgten Studien war ein äquimolares Verhältnis von Alken und Fettsäure-Dummy-Substrat eingesetzt worden. Im Falle des Zweiphasensystems ist jedoch der jeweilige Verteilungskoeffizient der beiden Verbindungen in der wässrigen und organischen Phase zu beachten. Während Heptansäure bei Raumtemperatur eine Wasserlöslichkeit von ca. 2,4 g/l (≈ 18 mM) aufweist, ist die Löslichkeit des Alkens 1-Octen mit 0,0041 g/l ($\approx 0,037$ mM) deutlich geringer. Das Dummy-Substrat ist somit in der Biotransformation vollständig gelöst, während 1-Octen hauptsächlich in der organischen Phase vorliegt. Eine Erhöhung der Substrat- und Dummy-Substrat-Konzentration in einem äquimolaren Verhältnis hat infolge der schlechten Substratverfügbarkeit somit keinen großen Einfluss auf die relative Produktbildung. Vielmehr wirkt sich die hohe Dummy-Substrat-Konzentration in der wässrigen Phase vermutlich inhibierend auf die enzymatische Aktivität aus, da der Zugang zur Alkyl-Bindetasche durch den Überschuss der Fettsäure-Moleküle blockiert wird. Diese Hypothese wird durch die experimentellen Daten gestützt. So resultierte ein Überschuss an Heptansäure in eine Verringerung der relativen Produktbildung, während ein Alken-Überschuss im Zweiphasensystem zu einer Steigerung der Hydrataseaktivität führte. Wie bereits zuvor beobachtet, ist somit das Verhältnis von Substrat zu Dummy-Substrat entscheidend für eine hohe enzymatische Aktivität der *Em*-OAH. Während zuvor jedoch ein äquimolares Verhältnis optimal war, gilt dies für die Anwendung eines Zweiphasensystems nicht. Das Problem der Substratverfügbarkeit spielt vermutlich auch eine entscheidende Rolle bei der Erhöhung des Lösemittelvolumens bzw. der Vergrößerung des Gesamtansatzes. Während ein größeres Lösemittelvolumen eine erniedrigte Substratkonzentration in der organischen Phase zur Folge hat, erschwert die Vergrößerung des Gesamtansatzes zusätzlich die effektive Durchmischung der Reaktionsansätze unter den gewählten Inkubationsbedingungen.

Da das Zweiphasensystem für die Hydratisierung kurzkettiger Alkene (<C8) eingesetzt werden sollte, wurde die Optimierung nachfolgend mit 1-Hepten fortgesetzt. Die Resultate bestätigen die Wahl von BEHP als vielversprechendstes Lösemittel. Es zeigte sich allerdings, dass nicht direkt das Verhältnis von Substrat zu Dummy-Substrat entscheidend ist, sondern vielmehr eine hohe Konzentration des Alkens. So wurde die höchste relative Produktbildung mit 300 mM 1-Hepten und 5 mM Heptansäure (60:1) ermittelt, während ein Verhältnis von 100:1 mit 250 mM Substrat und 2,5 mM Dummy-Substrat in eine etwas geringere relative Produktbildung resultierte. Die Substratverfügbarkeit wurde somit im Rahmen der Analyse

zur Etablierung und Optimierung des Zweiphasensystems als wichtigster Parameter identifiziert. Eine weitere Erhöhung der Substratkonzentration würde eventuell eine weitere Steigerung der Produktbildung ermöglichen. Da jedoch ein Kompromiss zwischen Kosten und Nutzen gefunden werden musste, wurde auf eine weitere Analyse verzichtet.

Neben der Etablierung eines Zweiphasensystems wurde parallel eine zweite Strategie zur Optimierung der Hydratisierung flüchtiger Substrate verfolgt. Aufgrund der bereits vorhandenen schwachen Aktivität der *Em*-OAH Variante A248L mit 1-Hepten wurde das C7-Alken als Modellsubstrat ausgewählt. Wie bereits bei der Etablierung des Zweiphasensystems beobachtet wurde, hatte der Einsatz von Ethanol als Cosolvens, vermutlich infolge einer Enzyminhibierung, einen negativen Einfluss auf die Hydrataseaktivität. Einen positiven Effekt zeigte hingegen eine Erhöhung der Substratkonzentration auf 2,5 mM (5 % (v/v) DMSO), während der Einsatz von 5 mM 1-Hepten und 10 % (v/v) DMSO in eine deutliche Abnahme der relativen Aktivität resultierte. Neben einem inhibierenden Effekt des Cosolvens DMSO könnte es sich in diesem Fall auch um das Problem einer Substratinhibition handeln. Die Zugabe einer hohen Substratkonzentration (10 mM) ohne Verwendung eines Cosolvens hat infolge der geringen Löslichkeit des Alkens in Wasser (0,0182 g/l, 0,185 mM) vermutlich keinerlei inhibitorische Wirkung, bringt dafür allerdings das Problem der Substratverfügbarkeit mit sich.

Neben der Substratkonzentration wurde das Volumen der Gasphase über den Biotransformationen als kritischer Parameter für die Optimierung der Reaktionsbedingungen identifiziert. So lässt sich der positive Effekt der Vergrößerung des Ansatzes auf 2 ml vermutlich durch die Reduktion der Gasphase erklären, welche den Verlust des flüchtigen Substrates verringert. Darüber hinaus könnte in diesem Zusammenhang auch der Sauerstoffeintrag eine wichtige Rolle spielen. So ermöglicht die Reduktion der Gasphase eventuell eine bessere Stabilisierung des FAD-Cofaktors, welcher unter aeroben Bedingungen leicht oxidiert wird.^{69,78} Bereits erfolgte Analysen der Linolsäure-Hydratase aus *L. plantarum* zeigten beispielsweise eine deutliche Inaktivierung des Enzyms unter aeroben Bedingungen.⁶⁹ Während die Bedeutung des Reaktionsvolumens bzw. der Verringerung der Gasphase im Rahmen einer statistischen Versuchsplanung bestätigt wurde, zeigte die Erhöhung der Substrat- und DMSO-Konzentration auf 4 mM bzw. 8 % (v/v) keinen negativen Einfluss auf die Produktbildung. Eine nachfolgende detaillierte Analyse unter Anwendung des optimierten Reaktionsvolumens zeigte drei Effekte: erstens, eine Erhöhung der Substratkonzentration hat einen positiven Einfluss auf die Produktbildung; zweitens, ein hoher DMSO-Anteil im Reaktionsansatz hat einen negativen Effekt auf die enzymatische Aktivität; drittens, moderate

DMSO-Konzentrationen resultieren, vermutlich infolge der verbesserten Substratlöslichkeit, in einer Steigerung der Produktbildung. Während der positive Effekt der Substratverfügbarkeit bei Konzentrationen von bis zu 6 mM 1-Hepten bzw. 12 % (v/v) DMSO überwog, dominierte scheinbar die negative Wirkung des DMSO auf die enzymatische Aktivität bei höheren Konzentrationen. Der negative Einfluss des Cosolvens wurde insbesondere durch die Verwendung als Biotransformations-Additiv bei direkter Substratzugabe ersichtlich. Die Tatsache dass mit 4-12 % (v/v) DMSO-Anteil bessere Ergebnisse erhalten wurden als mit 1 % (v/v) Cosolvens-Additiv, lässt sich möglicherweise durch die verbesserte Substratverfügbarkeit bei erhöhter DMSO-Konzentration oder aber einen Pipettierfehler im Ansatz mit 1 % (v/v) DMSO erklären.

Wie im Falle des Zweiphasensystems wurde die Produktbildung durch die Verdopplung der Biofeuchtmasse-, Glucose und FAD-Konzentration weiter gesteigert. Eine Erhöhung der Substrat- und Dummy-Substrat-Konzentration auf 20-30 mM bzw. der Einsatz eines hohen Alken-Überschusses (5- bzw. 10-fach) hatte hingegen keinen großen Einfluss auf die enzymatische Aktivität. Begründen lässt sich dies durch die geringe Löslichkeit des Alkens ohne Verwendung eines Cosolvens. Während im Zweiphasensystem der Alken-Überschuss als wichtigster Parameter identifiziert wurde, spielt für das optimierte System ohne Verwendung eines Lösemittels die Löslichkeit des Substrates und das Gasvolumen über der Biotransformation eine entscheidende Rolle. Beiden Systemen gemein ist somit das generelle Problem der Substratverfügbarkeit.

4.9 Analyse ausgewählter Mutanten mit kurzkettigen terminalen Alkenen (C7-C5)

Sowohl das Zweiphasensystem als auch die optimierten Reaktionsbedingungen ohne Verwendung einer organischen Phase erhöhen die Chance zur Identifizierung einer Hydrataseaktivität mit kurzkettigen flüchtigen Substraten. Ausgewählt für das Screening mit den terminalen Alkenen 1-Hepten, 1-Hexen und 1-Penten wurden neben dem Wildtypenzym Varianten mit einer erhöhten Aktivität im Hinblick auf die Hydratisierung von 1-Octen (A248L, A248I, A248F). Besonders interessant war darüber hinaus die *Em*-OAH Variante A248W. Diese Mutante war mit der C11-Fettsäure aktiver als der Wildtyp, während hingegen mit 1-Octen geringere relative Produktkonzentrationen erhalten wurden. Gleiches gilt auch für die Mutanten F227Y und F227W, welche aus diesem Grund ebenfalls im Aktivitätsscreening mitgeführt wurden.

Während unter Standardbedingungen zum Teil nur sehr geringe Produktkonzentrationen erhalten wurden bzw. keine Aktivität der Mutanten mit den ausgewählten Substraten ermittelt wurde, lieferte insbesondere das optimierte Zweiphasensystem hohe Produktkonzentrationen. 1-Hepten, 1-Hexen und 1-Penten wurden mithilfe der *Em*-OAH Varianten A248L, A248I, A248F und A248W mit ausgezeichneter Stereoselektivität zum jeweiligen sekundären Alkohol hydratisiert (bis zu 3 mM 2-Heptanol, 125 μ M 2-Hexanol und 20 μ M 2-Pentanol). Die beste 1-Octen-Mutante A248L zeigte auch den höchsten Umsatz von 1-Hepten. Die A248W-Variante hingegen war die beste Mutante für die Hydratisierung von 1-Hexen und das einzige Enzym, welches auch mit 1-Penten Aktivität aufwies. Während das Tryptophan somit zu groß für eine effektive Hydratisierung der Alkene 1-Octen und 1-Hepten ist, ermöglicht es die beste Stabilisierung/Positionierung der kurzkettigen Substrate 1-Hexen und 1-Penten. Die Ergebnisse bestätigen somit die Hypothese, dass insbesondere größere hydrophobe Aminosäuren an Position 248 der Aminosäuresequenz eine Hydratisierung kurzkettiger terminaler Alkene ermöglichen. Darüber hinaus handelt es sich scheinbar bei jedem neuen Substrat um eine Feinabstimmung zwischen der Aminosäuregröße bzw. der daraus resultierenden Größe der Alkylbindetasche und der Alken-Kettenlänge.

Die *Em*-OAH Varianten F227W und F227Y waren (fast) inaktiv mit den terminalen Alkenen 1-Hepten, 1-Hexen und 1-Penten. Das Ergebnis des Aktivitätsscreenings unterstützt somit die Hypothese, dass durch den Austausch des Phenylalanins gegen die beiden größeren aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin der Zugang zur Alkyl-Bindestelle blockiert wird.

4.10 Charakterisierung der *Em*-OAH Variante A248W

Die *Em*-OAH A248W wurde als beste Variante für die Hydratisierung kurzkettiger Alkene identifiziert. Da bisher keine Analyse des Fettsäure-Dummy-Substrates mit dieser Variante und unter den Bedingungen des Zweiphasensystems erfolgt war, wurden zunächst gesättigte Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge als Dummy-Substrate getestet. Die Analyse der Mutante mit den terminalen Alkenen 1-Hepten, 1-Hexen und 1-Penten unter Verwendung von Heptansäure, Hexansäure, Pentansäure bzw. Butansäure als Fettsäure-Dummy-Substrat zeigte, dass die höchste Produktkonzentration jeweils mit Hexansäure (C6) erreicht wurde. Die bereits erfolgte Charakterisierung des Wildtypenzym mit 1-Dodecen, 1-Decen und 1-Octen hatte hingegen ergeben, dass sich die Verwendung von Heptansäure (C7) positiv auf die Produktbildung auswirkt. Es scheint somit, dass die optimale Kettenlänge des Fettsäure-Dummy-Substrates von der Kombination der OAH-Variante und des Alkens abhängig ist.

Darüber hinaus könnten auch die jeweiligen Reaktionsbedingungen eine entscheidende Rolle spielen. So wurde der Einfluss des Dummy-Substrates zuvor nur unter Standardbedingungen und nicht in dem nun angewandten Zweiphasensystem analysiert.

Die nachfolgende Analyse der Hydrataseaktivität mit den subterminalen Alkenen *cis*-/*trans*-2-Hexen und *cis*-/*trans*-2-Penten unter Verwendung der C4-C7 Fettsäure-Dummy-Substrate wurde durch viele zusätzliche Signale erschwert. Es scheint, dass nur mit *cis*-2-Hexen und Pentansäure eine schwache Aktivität ermittelt wurde. Der identifizierte 3-Hexanol-Peak entspricht dabei infolge der hypothetischen Positionierung des Substrates in der Alkyl-Bindetasche dem erwarteten Produkt (Abbildung 52). Während Pentansäure (C5) somit scheinbar eine effektive Positionierung der subterminalen C=C Bindung ermöglicht, resultiert die Verwendung von Hexansäure (C6) und Heptansäure (C6) in diesem Fall möglicherweise in sterische Hinderungen. Es ist nicht auszuschließen, dass die *Em*-OAH A248W auch mit *trans*-2-Hexen und *cis*-/*trans*-2-Penten eine schwache Aktivität aufweist, dies infolge geringer Produktkonzentrationen jedoch nicht beobachtet wurde. Besonders interessant ist die Frage, ob die bereits beschriebene Abhängigkeit der Katalyse von der *cis*-Konformation der Doppelbindung³² auch bei den kurzkettigen Alkenen weiterhin gegeben ist. Die erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass dies tatsächlich der Fall ist. Aufgrund der sehr geringen enzymatischen Aktivität und der Problematik vieler zusätzlicher Signale bei der GC-Analyse lässt sich diese Frage jedoch nicht endgültig beantworten.

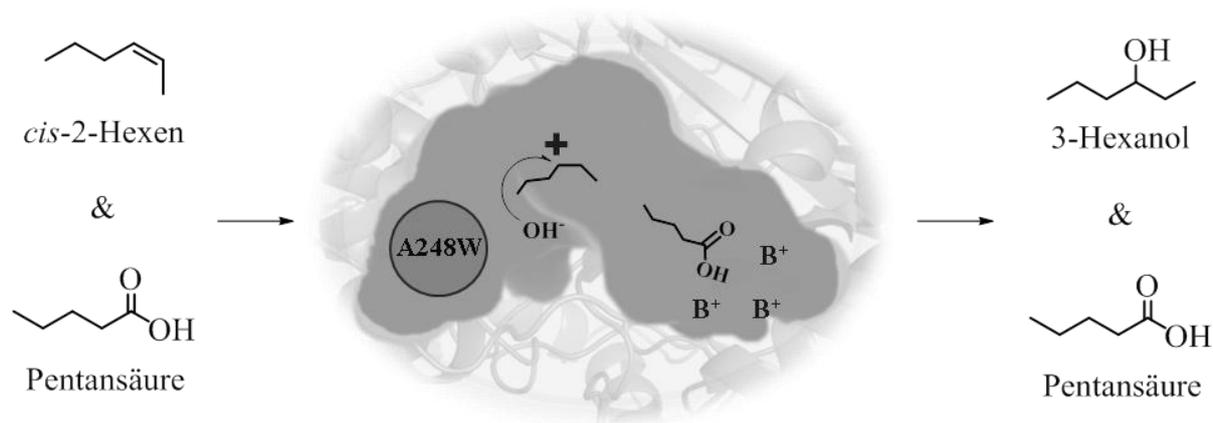


Abbildung 52: Hypothetische Positionierung des subterminalen Alkens *cis*-2-Hexen mit Pentansäure-Dummy-Substrat

Die Abbildung präsentiert eine schematische Darstellung der Substratbindetasche. Die Mutagenese A248 ist mit einem Kreis angedeutet. Das subterminale Alken 2-Hexen wird in der Alkyl-Bindetasche der *Em*-OAH A248W infolge der *cis*-Konformation der C=C Bindung vermutlich so positioniert, dass die Bildung des sekundären Carbokations (angedeutet mit einem Plus) mit dem anschließenden nukleophilen Angriff des aktivierten Wassermoleküls am C₃-Atom des Substrates stattfindet. Das kurzkettige Dummy-Substrat Pentansäure interagiert hingegen vermutlich mit den positiv-geladenen/polaren Aminosäuren am Eingang des Substratkanals (B⁺) und ist somit in der Carboxy-Bindetasche positioniert.

Neben der *Em*-OAH A248W handelte es sich bei den beiden Varianten F227Y und F227W um interessante Kandidaten für die Hydratisierung kurzkettiger subterminaler Alkene. Es wurde jedoch unabhängig vom Fettsäure-Dummy-Substrat keine Aktivität mit *cis*-/*trans*-2-Hexen und *cis*-/*trans*-2-Penten ermittelt. In bereits erfolgten Analysen wurde eine hohe Aktivität der beiden Varianten mit der C11-Fettsäure (*Z*)-Undec-9-ensäure beobachtet. Die Verwendung eines kurzkettigen Alkens und sehr kurzer Dummy-Substrate, wie zum Beispiel Pentansäure oder Butansäure, sollte theoretisch die gleichzeitige Bindung zweier Moleküle in der Carboxy-Bindetasche ermöglichen. Das Ergebnis des Aktivitätsscreenings mit den *cis*-/*trans*-Alkenen deutet jedoch auf sterische Hinderungen in der Substratbindetasche hin. Darüber hinaus ist die Bindung der kurzkettigen Dummy-Substrate möglicherweise nicht ausreichend für eine effektive Stabilisierung und Positionierung der Alken C=C Bindung. Ein weiteres Problem ist die schlechte Qualität der GC-Chromatogramme infolge vieler zusätzlicher Signale, welche eine Identifizierung geringer Produktkonzentrationen erschwert. Die Problematik der GC-Analyse spielte auch im Hinblick auf die Auswertung der 1,3-Butadien-Hydratisierung durch die *Em*-OAH A248W eine entscheidende Rolle. Da diese Variante bereits mit 1-Hexen und 1-Penten sehr geringe Umsatzraten zeigte, war dies auch im Falle der Butadien-Hydratisierung zu erwarten. Trotz einer Optimierung der gaschromatographischen Analyse wurde weder im Scan noch im SIM-Modus ein entsprechendes Produkt identifiziert. Das C4-Derivat Butadien wird somit möglicherweise infolge der geringen Molekülgröße oder aber einer zu starren Struktur nicht ausreichend im aktiven Zentrum der *Em*-OAH A248W stabilisiert bzw. positioniert. Ein großes Problem ist darüber hinaus wohlmöglich der verwendete Substratstock. Da das C4-Alken bei Raumtemperatur gasförmig ist, wurde eine in Toluol-gelöste Stocklösung (20 % (v/v) Butadien) verwendet. Versuche zur Etablierung eines Zweiphasensystems zeigten jedoch eine negative Wirkung dieses Lösemittels auf die *Em*-OAH katalysierte Hydratisierung von 1-Octen. Mit Zugabe des Substrates wurde somit möglicherweise ebenfalls ein kompetitiver Inhibitor in die Biotransformation eingebracht.

Während für die Hydratisierungsreaktion die Volatilität der verwendeten Alkene und die damit verbundene Substratverfügbarkeit die größte Herausforderung darstellte, sollte dieser Aspekt für die Dehydratisierung der sekundären Alkohole 2-Hexanol, 2-Pentanol und 3-Buten-2-ol durch die *Em*-OAH A248W infolge einer hohen Löslichkeit keine Rolle spielen. Dass die Dehydratisierung dennoch nicht erfolgreich war, lässt sich möglicherweise durch die generell sehr geringe Aktivität der Variante in Kombination mit den gewählten Reaktionsbedingungen erklären. Darüber hinaus liegt das Reaktionsgleichgewicht infolge des

wässrigen Milieus wohlmöglich deutlich auf der Seite der Hydratisierungsreaktion. Während das Gleichgewicht für das natürliche Substrat Ölsäure mit 85:15 auf Seiten der Hydratisierung liegt,¹⁴² wurde beispielsweise im Falle der verkürzten Fettsäure (*Z*)-Undec-9-ensäure ebenfalls keine Dehydratisierung beobachtet. Ein weiteres Problem für die Dehydratisierung der Alkohole liegt vermutlich in der effektiven Stabilisierung bzw. Positionierung der kurzkettigen Moleküle in der zumeist hydrophoben Substratbindetasche und im Zugang der hydrophilen Verbindungen zum aktiven Zentrum.

4.11 Umsetzung terminal-ungesättigter Alkene im 250 bzw. 500 ml Maßstab

1-Decen und 1-Octen wurden als Modellssubstrate für die Hydratisierungsreaktion im semi-präparativen Maßstab ausgewählt. Die Umsetzung der Alkene mithilfe des *Em*-OAH Wildtypenzym bzw. der A248L-Variante im 250 ml bzw. 500 ml Maßstab war erfolgreich und ermöglichte die Identifizierung und Charakterisierung der entsprechenden Hydratisierungsprodukte *S*-2-Decanol und *S*-2-Octanol. Während die Vergrößerung des Volumens von 2 ml auf 250 ml im Falle von 1-Decen keinen negativen Einfluss auf die Umsatzrate zeigte, war der Umsatz des Alkens 1-Octen im 500 ml Maßstab mit nur 50 % um ein Drittel verringert. Erklären lässt sich dies vermutlich, durch die höhere Volatilität des C8-Alkens 1-Octen. Während im 2 ml Maßstab keine Gasphase über der Biotransformation vorlag, ging im 500 ml Maßstab infolge des geringen aber vorhandenen Gasvolumens vermutlich ein Teil des Substrates durch Evaporation verloren.

Die selektive Hydratisierung nicht-aktivierter C=C Bindungen stellt für die synthetische organische Chemie eine große Herausforderung dar. In dieser Arbeit wurden nun erstmals die sekundären Alkohole 2-Decanol und 2-Octanol biokatalytisch durch die Hydratisierung terminaler Alkene mit einer isolierten Ausbeute von 44 % bzw. 22 % gewonnen (Tabelle 19). Darüber hinaus zeigte die Analyse der Stereoselektivität einen exzellenten Enantiomerenüberschuss von >99 % für das *S*-Enantiomer.

Tabelle 19: Übersicht zur Hydratisierung von 1-Decen und 1-Octen im semi-präparativen Maßstab

	Substrat-Konz.	Volumen	Umsatz	Produkt	Selektivität	Isolierte Ausbeute	Produktivität
1-Decen	2 mM	250 ml	70 %	<i>S</i> -2-Decanol	>99 % <i>ee</i>	44 % (35 mg)	0,97 mg/(l*h)
1-Octen	1 mM	500 ml	50 %	<i>S</i> -2-Octanol	>99 % <i>ee</i>	22 % (14 mg)	0,19 mg/(l*h)

4.12 Abschließende Zusammenfassung

Die Ölsäure-Hydratase aus *E. meningoseptica* wurde im Rahmen dieser Arbeit als promiskuitives Enzym mit einer exzellenten Selektivität identifiziert. Durch die Optimierung der Reaktionsbedingungen und mithilfe einer rationalen Mutagenese-Strategie (Abbildung 50 & Abbildung 51) wurde das Substratspektrum von der langkettigen C18-Fettsäure Ölsäure in Richtung kurzkettiger Alkene verschoben. Tabelle 20 präsentiert eine abschließende Übersicht der jeweils besten Mutante für die verschiedenen Substrate. Angegeben ist des Weiteren die in dieser Arbeit höchste beobachtete Produktkonzentration. Dabei ist zu beachten, dass je nach Substrat unterschiedliche Reaktionsbedingungen eingesetzt und getestet wurden. Darüber hinaus haben die Studien gezeigt, dass das beste Dummy-Substrat von einer Kombination aus *Em*-OAH Variante, Substrat und den gewählten Reaktionsbedingungen abhängig ist. Da eine solche Analyse nicht für jede Enzym-Variante mit jedem Substrat unter allen Reaktionsbedingungen vorgenommen wurde, lässt sich die Produktausbeute möglicherweise durch eine entsprechende Studie weiter erhöhen. Dargestellt ist darüber hinaus ein weiteres Beispiel einer biokatalytischen und chemischen Hydratisierungsreaktion.

Tabelle 20: Zusammenfassende Übersicht der jeweils besten *Em-OAH* Variante für die verschiedenen Substrate

Substrat	Dummy-Substrat ^{a)}	Katalysator	Reaktionsbedingungen	Substratkonzentration	Produkt	Produktkonzentration ^{b)}	Stereoselektivität
Ölsäure	-	<i>Em-OAH</i> Wildtyp	Absatz 2.9.10	0,5 mM	<i>R</i> -10-Hydroxyoctadecansäure	0,45 mM	≥98 % <i>ee</i> ^{c)}
(<i>Z</i>)-Undec-9-ensäure	-	<i>Em-OAH</i> Wildtyp <i>Em-OAH</i> F227Y & A248Q	Absatz 2.9.2 Absatz 2.9.10	0,5 mM	<i>S</i> -10-Hydroxyundecansäure	0,32 mM n. q. ^{d)}	n. a.
1-Decen	Heptansäure	<i>Em-OAH</i> Wildtyp	Absatz 2.10.	2 mM	<i>S</i> -2-Decanol	1,12 mM	>99 % <i>ee</i>
1-Octen	Hexansäure	<i>Em-OAH</i> A248L	Absatz 2.10.	2,5 mM	<i>S</i> -2-Octanol	1,27 mM	>99 % <i>ee</i>
1-Hepten	Heptansäure	<i>Em-OAH</i> A248L	Absatz 2.9.11	300 mM	<i>S</i> -2-Heptanol	3 mM	>99 % <i>ee</i>
1-Hexen	Hexansäure	<i>Em-OAH</i> A248W	Absatz 2.9.11	300 mM	<i>S</i> -2-Hexanol	0,2 mM	>99 % <i>ee</i>
<i>cis</i> -2-Hexen	Pentansäure	<i>Em-OAH</i> A248W	Absatz 2.9.13	1 M	3-Hexanol	Spuren (n. q.)	n. a.
1-Penten	Hexansäure	<i>Em-OAH</i> A248W	Absatz 2.9.11	300 mM	<i>S</i> -2-Pentanol	0,04 mM	>99 % <i>ee</i>
2-Methyl-4-vinylphenol	-	Ferulasäure-Decarboxylase aus <i>Enterobacter</i> sp.	Ref. 30	10 mM	<i>S</i> -4-(1-Hydroxyethyl)-2-methylphenol	3,4 mM	71 % <i>ee</i>
2-Methoxystyren	-	Woll-Palladium Komplex	Ref. 20	3 mmol	<i>R</i> -1-(2-Methoxyphenyl)ethanol	2,7 mmol	94 % <i>ee</i>

a) Es gilt zu beachten, dass nicht für jede Variante das unter den gewählten Bedingungen beste Dummy-Substrat analysiert wurde.

b) Dargestellt ist die in dieser Arbeit unter den gewählten Bedingungen höchste beobachtete Produktkonzentration.

c) Der Enantiomerenüberschuss wurde in Studien von Engleder und Kollegen ermittelt (Ref. 78).

d) Der Umsatz der *Em-OAH* F227Y und A248Q wurde nicht quantifiziert. Die Mutanten zeigten allerdings im Vergleich zum Wildtyp eine 2,5-fache bzw. 3-fache Steigerung der relativen Produktbildung.

n. q. nicht quantifiziert

n. a. nicht analysiert

5 RESÜMEE & AUSBLICK

Das Ziel dieser Doktorarbeit war eine Erweiterung des Substratspektrums und die Steigerung der enzymatischen Aktivität der Ölsäure-Hydratase aus *Elizabethkingia meningoseptica* im Hinblick auf die Hydratisierung kurzkettiger nicht-natürlicher Substrate. Der Fokus der Arbeit lag dabei auf einer Optimierung der Reaktionsbedingungen, der Analyse des katalytischen Mechanismus und einer rationalen Mutagenese-Strategie zur Verkleinerung der Substrat-Bindetasche.

Die Optimierung der Reaktionsbedingungen resultierte in eine deutliche Aktivitätssteigerung der *Em*-OAH im Hinblick auf die Hydratisierung kurzkettiger nicht-natürlicher Fettsäure- und Alken-Substrate. Als entscheidender Faktor für die enzymatische Hydratisierung wurde die Stabilität des Carbokations identifiziert, welches im Rahmen des katalytischen Mechanismus durch die Protonierung der C=C Bindung am C₁₀-Atom gebildet wird. So wurde keine Aktivität des Enzyms mit der C10-Fettsäure Dec-9-ensäure beobachtet, da die Katalyse in diesem Fall aufgrund der terminalen Doppelbindung die Bildung eines instabilen primären Carbokations voraussetzt. Da darüber hinaus auch mit Undec-10-ensäure (C11) kein Hydroxyprodukt identifiziert wurde, ist für die enzymatische Aktivität scheinbar ein gewisser Abstand zwischen der Carboxylgruppe und der C=C Bindung essentiell. Um eine Hydratisierung kurzkettiger (\leq C11) und möglicherweise terminal-ungesättigter Fettsäuren an der subterminalen Position zu erreichen, müsste vermutlich der „Abstand“ zwischen dem katalytischen Zentrum und der Substrat-Bindestelle, zum Beispiel durch gerichtete Mutagenese oder iterative Sättigungsmutagenese, angepasst werden. Interessant ist in dieser Hinsicht insbesondere die (erneute) detaillierte Analyse der bereits generierten bzw. weiterer *Em*-OAH Varianten mit einer Mutation im Eingangsbereich des Substratkanals. Die Einführung zusätzlicher aromatischer Reste in unmittelbarer Nähe des katalytischen Zentrums könnte darüber hinaus möglicherweise die Stabilisierung eines primären Carbokations gewährleisten. In diesem Zusammenhang wäre auch eine detaillierte Analyse des Reaktionsmechanismus von Interesse. So wurden im Rahmen dieser Arbeit mit Methionin 123 und Threonin 511 weitere katalytisch-relevante Aminosäuren identifiziert. Darüber hinaus deuten Studien von Lorenzen und Kollegen auf einen alternativen Hydratisierungsmechanismus der Ölsäure-Hydratasen der HFam3 hin. Ein Reaktionsmechanismus wurde jedoch bisher nicht postuliert.

Ein weiterer kritischer Parameter für die Umsetzung nicht-natürlicher Substrate mithilfe der *Em*-OAH ist die Notwendigkeit einer Carboxylgruppe. So ermöglichte nur die Verwendung

eines Fettsäure-Dummy-Substrates die effektive Hydratisierung kurzkettiger Alkene. Die genaue Bedeutung und Wirkungsweise der Carboxylgruppe für die Substrat-Erkennung, die Aktivierung des Enzyms und/oder den katalytischen Mechanismus ist jedoch weiterhin unklar und bedarf zusätzlicher Analysen. Eine Co-Kristallisation des *Em*-OAH Wildtypenzym mit dem natürlichen Substrat Ölsäure würde möglicherweise im direkten Vergleich mit der von Engleder und Kollegen veröffentlichten Kristallstruktur zur Identifizierung genereller Konformationsänderungen beitragen. Interessant wäre darüber hinaus eine Ko-Kristallisation des Enzyms mit einem Alken-Substrat und dem Fettsäure-Dummy-Substrat. Auch ein Vergleich der Absorptionsspektren des aufgereinigten Enzyms mit und ohne Zugabe einer gesättigten Fettsäure liefert eventuell Hinweise auf eine Änderung der Enzymstruktur. So können bereits kleine Umlagerungen im Enzym große Auswirkungen auf das Absorptionsverhalten des FAD-Cofaktors haben. Deutlich aufwendiger aber dafür möglicherweise auch sehr viel aufschlussreicher und detaillierter wäre eine MD-basierte (*molecular dynamics*) Simulation der Molekülbewegungen bei Bindung eines Fettsäure-Substrates. Ein kritischer Parameter ist in diesem Zusammenhang insbesondere die Simulationszeit, da diese einen entscheidenden Faktor für den Umfang der zu beobachtenden Bewegungen darstellt.

Das Fettsäure-Dummy-Substrat scheint neben einer möglichen Aktivierung des Enzyms eine wichtige Bedeutung für die Stabilisierung/Positionierung der Alken-Substrate zu spielen. Dabei unterscheidet sich die optimale Fettsäurekettenlänge je nach Kombination der *Em*-OAH Variante und des Substrates. Eine Unabhängigkeit der Alken-Hydratisierung vom Fettsäure-Dummy-Substrat könnte eventuell durch eine weitere positionsgerichtete Mutagenesestudie am Eingang der Substratbindetasche erreicht werden. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Analyse der 1-Decen Hydratisierung durch die bereits generierten *Em*-OAH Varianten unter Verwendung alternativer Dummy-Substrate.

Die Analyse des *Em*-OAH Wildtypenzym und der Mutanten zeigte, dass insbesondere die Stabilisierung/Positionierung der kurzkettigen Substrate in der großen Substratbindetasche eine essentielle Rolle für eine effektive enzymatische Hydratisierung spielt. Hierbei scheint es sich um eine Feinabstimmung zwischen der Größe der Bindetasche und der Kettenlänge bzw. Struktur des jeweiligen Fettsäure- bzw. Alken-Substrates zu handeln. Eine Struktur-basierte positionsgerichtete Mutagenese ermöglicht eventuell die Umsetzung weiterer verkürzter, linearer, verzweigter, zirkulärer, terminal- oder auch subterminal-ungesättigter Alkene und Fettsäuren. Die Analyse subterminal-ungesättigter Alkene beantwortet dabei möglicherweise die Frage, ob die bereits beschriebene Abhängigkeit der Katalyse von der *cis*-Konformation

der Doppelbindung auch bei den kurzkettigen Alkenen weiterhin gegeben ist. Abgesehen von der Zweikomponenten-Strategie bestehend aus Substrat und Dummy-Substrat wäre generell auch ein Dreikomponenten-System unter Verwendung zweier Substrate denkbar. Neben der Hydratisierungsreaktion ist insbesondere auch die Addition alternativer Nukleophile von großem Interesse.

Problematisch ist die geringe Aktivität der *Em*-OAH Varianten mit den kurzkettigen nicht-natürlichen Substraten. Zwar wurde die enzymatische Hydratisierung durch die Optimierung der Reaktionsbedingungen und die Etablierung eines Zweiphasensystems deutlich gesteigert, dennoch gestaltete sich die Identifizierung der Biotransformationsprodukte mithilfe einer gaschromatographischen Analyse in einigen Fällen schwierig. Darüber hinaus wurden mit 1-Hexen, *cis*-2-Hexen und 1-Penten und der besten *Em*-OAH Variante nur sehr geringe Produktkonzentrationen erhalten, welche auch durch eine weitere Optimierungsrunde nicht gesteigert wurden. Interessant wäre dementsprechend die Etablierung eines Hochdurchsatz Screenings, welches eine gerichtete Evolution der *Em*-OAH mithilfe einer Zufallsmutagenese ermöglicht. Ziel der Mutagenese wäre eine Steigerung der enzymatischen Aktivität bei gleichzeitiger Beibehaltung der exzellenten Selektivität. Anbieten würde sich hierfür beispielsweise der Einsatz einer Oxidase oder sekundären Alkohol-Dehydrogenase mit direkter Analyse des Cofaktors oder aber die Kombination der enzymatischen Aktivität mit einem Farbassay.

Die Optimierung der Reaktionsbedingungen erwies sich als wichtiger Kernaspekt für die Identifizierung aktiver *Em*-OAH Varianten im Hinblick auf die Hydratisierung nicht-natürlicher Substrate. Darüber hinaus unterschieden sich die einzelnen Optimierungsparameter teilweise deutlich in Abhängigkeit des jeweiligen Substrates. Ein generelles Problem der Alken-Hydratisierung war die Substratverfügbarkeit. Interessant wäre in diesem Zusammenhang eventuell der Einsatz des Alken-Substrates selber als organische Phase im Zweiphasensystem.

Trotz der oben genannten Herausforderungen wurden, unter anderem durch die Etablierung eines Zweiphasensystems mit BEHP, sehr stabile Bedingungen geschaffen, welche eine enzymatische Aktivität mit verschiedensten Substraten über einen Zeitraum von bis zu sechs Tagen ermöglichten. Die Ölsäure-Hydratase aus *E. meningoseptica* wurde somit im Rahmen dieser Arbeit als promiskuitives Enzym mit einer exzellenten Regio- und Stereoselektivität identifiziert.

6 ANHANG

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis zum Anhang

Abbildung A 1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Waltham, USA).....	151
Abbildung A 2: ¹ H- und ¹³ C-NMR Analyse des gereinigten 1-Decen-Biotransformationsproduktes.....	152
Abbildung A 3: ¹ H- und ¹³ C-NMR Analyse des gereinigten 1-Octen-Biotransformationsproduktes.....	153
Abbildung A 4: ¹ H- und ¹³ C-NMR Analyse der synthetisierten und gereinigten (Z)-Undec-9-ensäure.....	154
Abbildung A 5: Auswertung der Mosher-Ester Analyse mittels NMR.....	155
Abbildung A 6: GC-FID Analyse der (Z)-Undec-9-ensäure Hydratisierung durch die <i>Em</i> -OAH.....	156
Abbildung A 7: Massenspektrum des hydratisierten Produktes 10-Hydroxyundecansäure...156	
Abbildung A 8: Ergebnis der DC zur Identifizierung der Produktfraktionen.....	157
Abbildung A 9: Analyse der Produktreinheit des (Z)-Undec-9-ensäure <i>Upscalings</i> mittels GC-MS.....	158
Abbildung A 10: ¹ H- und ¹³ C-NMR Analyse des gereinigten Biotransformationsproduktes 10-Hydroxyundecansäure.....	159
Abbildung A 11: Dehydratisierung der (S)-10-Hydroxyundecansäure.....	160
Abbildung A 12: GC-FID Analyse der 1-Decen Biotransformationen mit dem <i>Em</i> -OAH Wildtypenzym.....	160
Abbildung A 13: Massenspektrum des <i>Em</i> -OAH Biotransformationsproduktes im direkten Vergleich zu 2-Decanol.....	161
Abbildung A 14: Analyse der C11-FS optimierten Bedingungen im Hinblick auf die Hydratisierung von 1-Decen.....	161
Abbildung A 15: 1-Decen Hydratisierung durch das <i>Em</i> -OAH Wildtypenzym mithilfe alternativer Dummy-Substrate.....	162
Abbildung A 16: Chirale GC-Analyse der 1-Dodecen (oben) bzw. 1-Octen (unten) <i>Em</i> -OAH Biotransformationen.....	163
Abbildung A 17: Palmitinsäure (C16) und Myristoleinsäure (C14) Hydratisierung der <i>Em</i> -OAH F227-Varianten.....	164
Abbildung A 18: Fettsäure-Hydratisierung (C18-C14) der <i>Em</i> -OAH A248-Varianten.....	164

Abbildung A 19: Fettsäure (C11) und Alken (C10-C8) Hydratisierung der <i>Em</i> -OAH A248-Varianten.....	165
Abbildung A 20: Chirale GC-FID Analyse der <i>Em</i> -OAH A248L Biotransformationen mit 1-Octen.....	166
Abbildung A 21: 1-Octen-Hydratisierung in Zweiphasensystemen mit 10-30 mM Substrat und Dummy-Substrat.....	167
Abbildung A 22: 1-Octen-Hydratisierung in Zweiphasensystemen mit Substrat-Überschuss bei vergrößertem Reaktionsvolumen.....	168
Abbildung A 23: 1-Hepten Hydratisierung durch die <i>Em</i> -OAH A248L unter Standardbedingungen.....	168
Abbildung A 24: 1-Hepten Hydratisierung im Zweiphasensystem mit Substrat-Überschuss.....	169
Abbildung A 25: 1-Hepten Hydratisierung durch die <i>Em</i> -OAH A248L unter Standardbedingungen und im optimierten Zweiphasensystem.....	170
Tabelle A 1: Parameter zur Anwendung einer statistischen Versuchsplanung mithilfe von MODDE.....	170
Abbildung A 26: 4D-Plot der MODDE-basierten Analyse zur 1-Hepten-Hydratisierung.....	171
Abbildung A 27: Optimierung der Biomasse-, Glucose-, FAD- und Substrat/Dummy-Substrat-Konzentration zur Hydratisierung von 1-Hepten.....	172
Abbildung A 28: 1-Hepten Hydratisierung durch die <i>Em</i> -OAH A248L unter Standardbedingungen und nach Optimierung der Reaktionsbedingungen.....	173
Abbildung A 29: Chirale GC-MS-Analyse zur Stereoselektivität der 1-Hepten, 1-Hexen und 1-Penten Hydratisierung.....	174
Abbildung A 30: Zeitabhängige Hydratisierung der Alkene 1-Hepten, 1-Hexen und 1-Penten mit den besten <i>Em</i> -OAH Varianten.....	174
Abbildung A 31: Cis-2-Hexen Hydratisierung durch die <i>Em</i> -OAH A248W.....	175
Tabelle A 2: Vorversuch zur 1-Octen-Hydratisierung im semi-präparativen Maßstab.....	175

Der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Abbildung A 1) diente als Größenstandard zur Bestimmung des Molekulargewichtes nach erfolgter SDS-Gelelektrophorese.

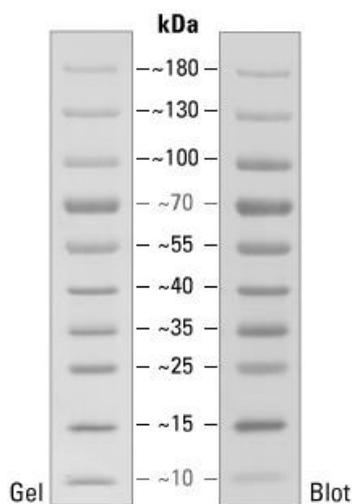


Abbildung A 1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Waltham, USA)

10 mg des gereinigten 1-Decen-Biotransformationsproduktes wurden mit 600 μ l deuteriertem Chloroform (CDCl_3) gemischt und zur NMR-Analyse gegeben (^1H , ^{13}C , Abbildung A 2). Die Auswertung der NMR-Ergebnisse erfolgte mittels MestreNova (Mnova).

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.88$ (t, $^3J_{\text{H-H}} = 6.6$ Hz, 3H), 1.19 (d, $J_{\text{H-H}} = 6.2$ Hz, 3H), 1.28 – 1.44 (m, 15H), 3.80 (m, 1H) ppm.

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 14.26, 22.82, 23.64, 25.93, 29.42, 29.74, 29.81, 32.03, 39.54, 68.37$ ppm.

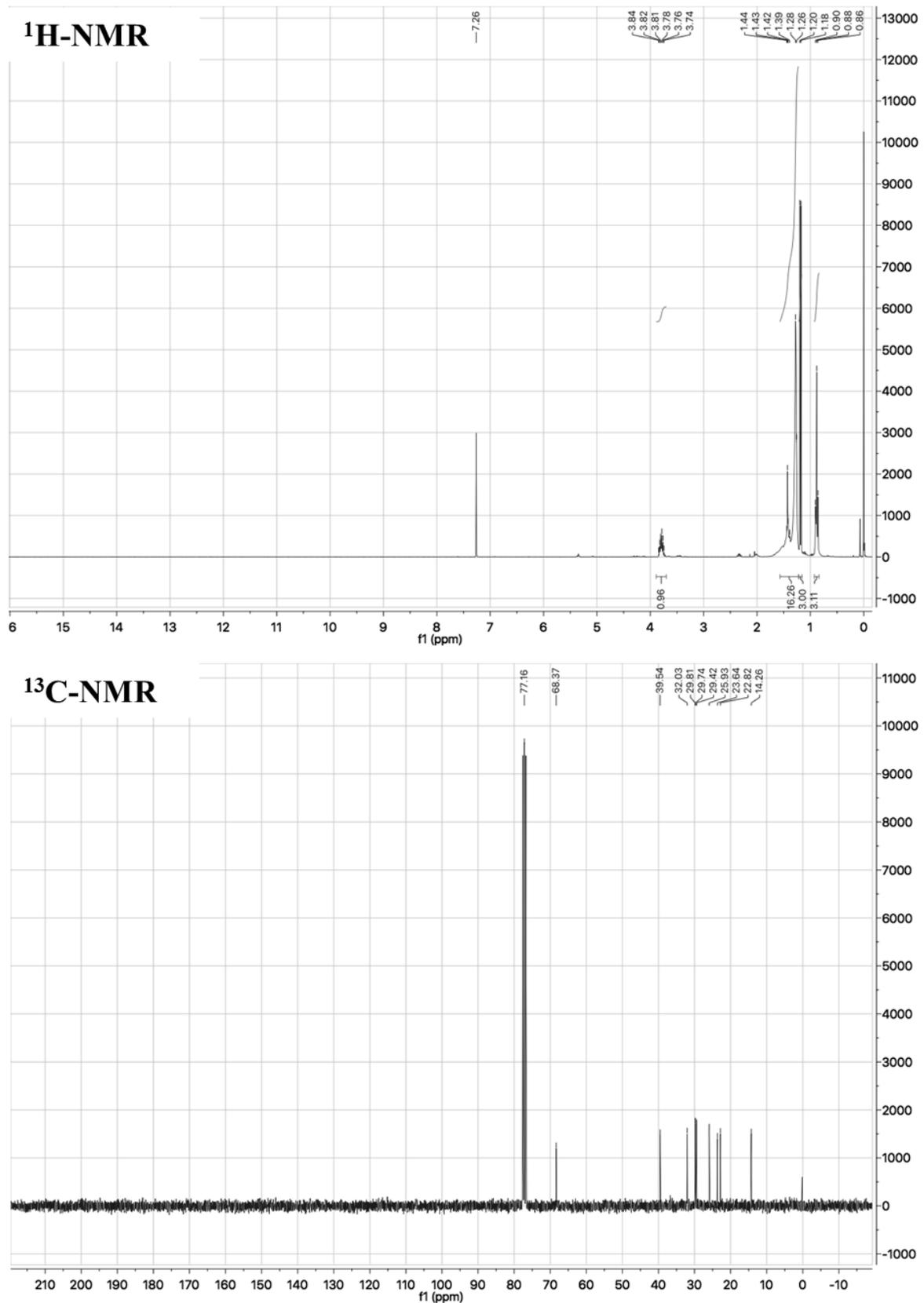


Abbildung A 2: ¹H- und ¹³C-NMR Analyse des gereinigten 1-Decen-Biotransformationsproduktes

10 mg des gereinigten 1-Decen-Biotransformationsproduktes wurden mit 600 µl deuteriertem Chloroform (CDCl₃) gemischt und zur NMR-Analyse gegeben (¹H, ¹³C). Die Auswertung der NMR-Ergebnisse erfolgte mittels MestreNova (Mnova).

10 mg des gereinigten 1-Octen-Biotransformationsproduktes wurden mit 600 μl deuteriertem Chloroform (CDCl_3) gemischt und zur NMR-Analyse gegeben (^1H , ^{13}C , Abbildung A 3). Die Auswertung der NMR-Ergebnisse erfolgte mittels MestreNova (Mnova).

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.88$ (t, $^3J_{\text{H-H}} = 6.6$ Hz, 3H), 1.18 (d, $J_{\text{H-H}} = 6.2$ Hz, 3H), 1.24 – 1.37 (m, 11H), 3.79 (m, 1H).

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 14.22, 22.76, 25.88, 29.46, 31.96, 39.53, 68.36$.

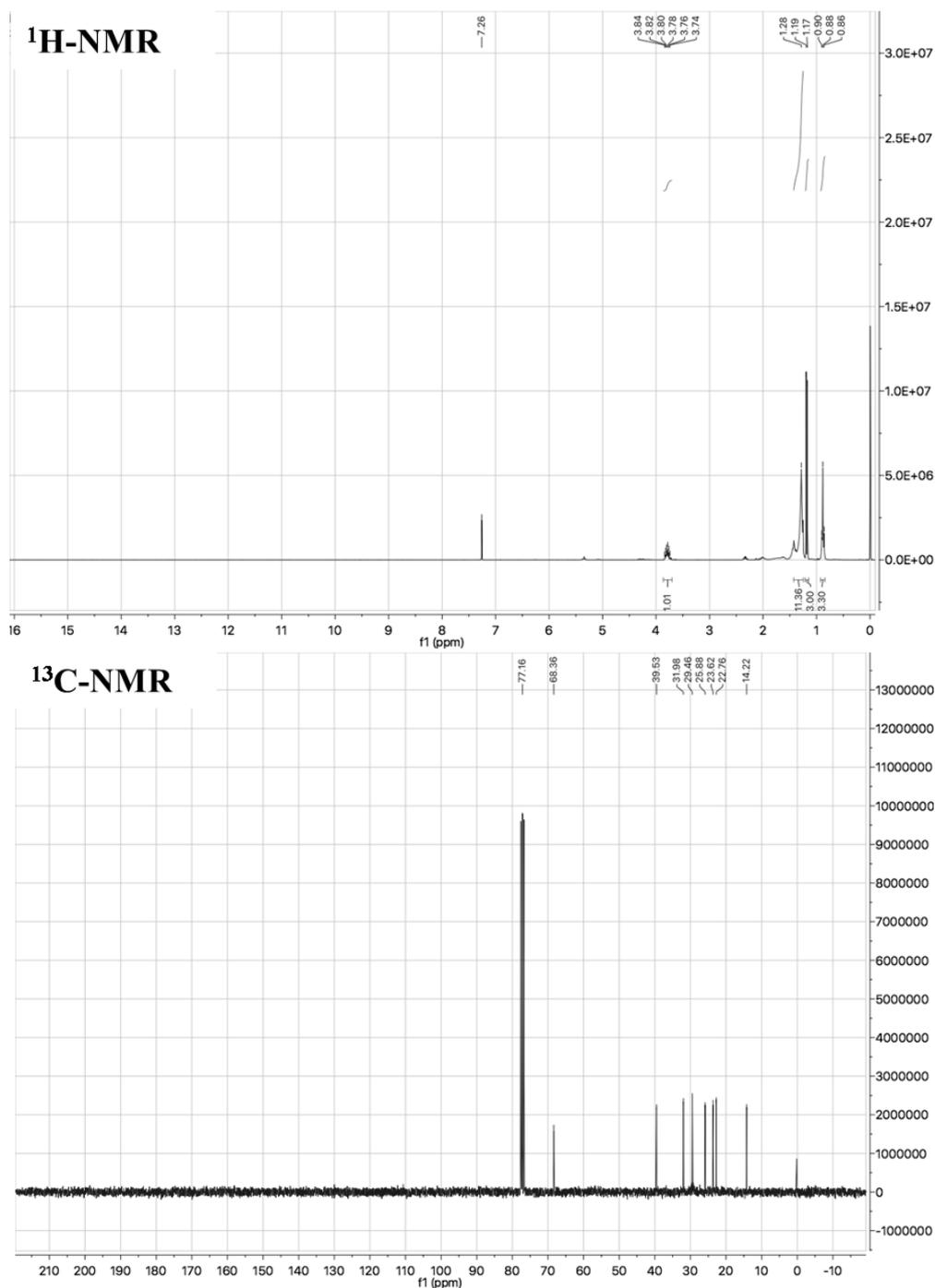


Abbildung A 3: ^1H - und ^{13}C -NMR Analyse des gereinigten 1-Octen-Biotransformationsproduktes

10 mg des gereinigten 1-Octen-Biotransformationsproduktes wurden mit 600 μl deuteriertem Chloroform (CDCl_3) gemischt und zur NMR-Analyse gegeben (^1H , ^{13}C). Die Auswertung der NMR-Ergebnisse erfolgte mittels MestreNova (Mnova).

10 mg der synthetisierten und gereinigten (Z)-Undec-9-ensäure wurden mit 600 µl deuteriertem Chloroform (CDCl₃) gemischt und zur NMR-Analyse gegeben (¹H, ¹³C, Abbildung A 4). Die Auswertung der NMR-Ergebnisse erfolgte mittels TopSpin 3.0.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 1.32-1.35 (m, 8H, 4-H, 5-H, 6-H, 7-H), 1.60 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, 11-H), 1.62-1.65 (m, 2H, 3-H), 2.00-2.04 (m, 2H, 8-H), 2.35 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, 2-H), 5.36-5.40 (m, 2H, 9-H, 10-H) ppm.

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 12.8, 24.7, 26.8, 29.0, 29.0, 29.1, 29.5, 33.9, 123.7, 130.8, 179.6 ppm.

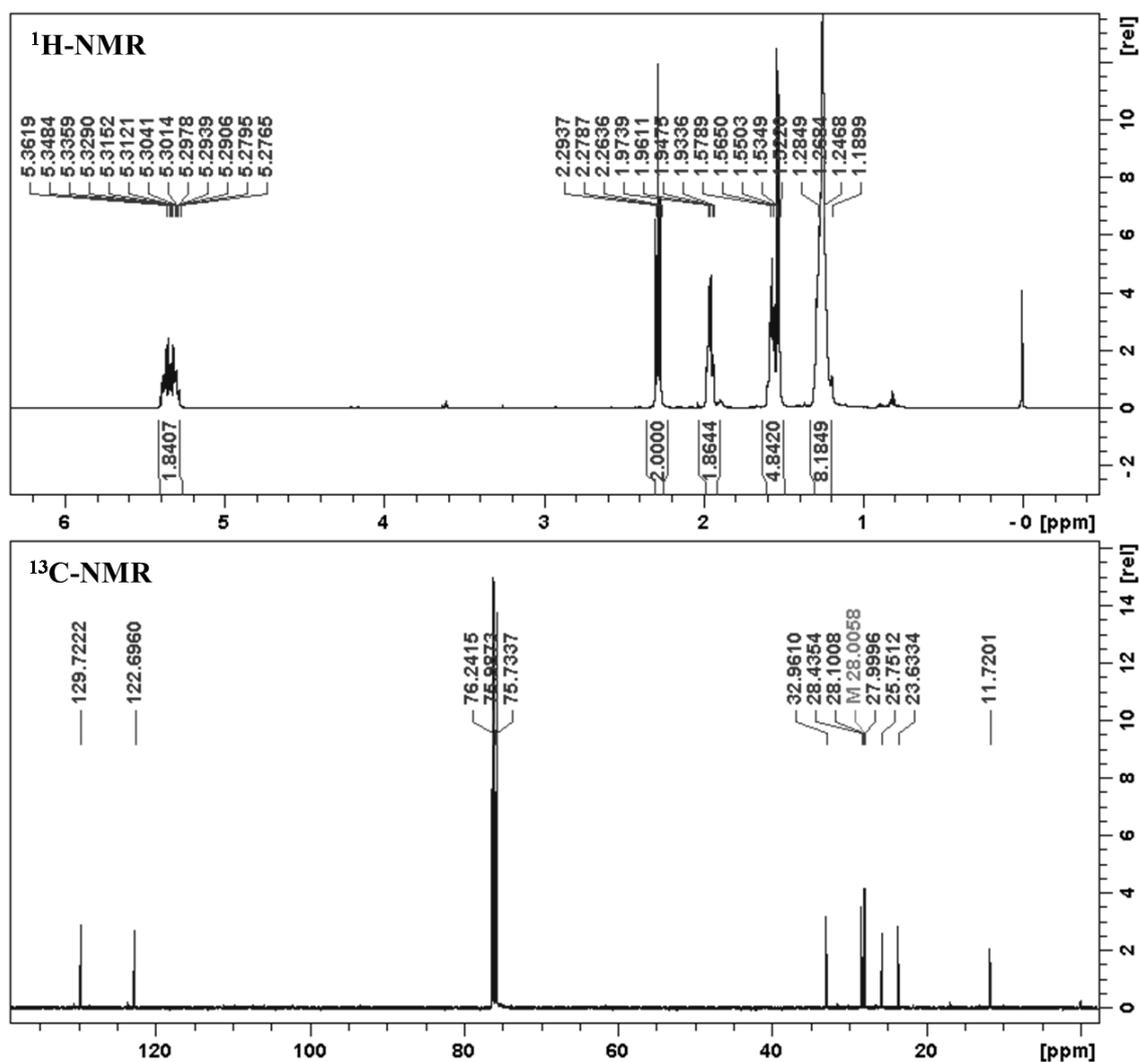


Abbildung A 4: ¹H- und ¹³C-NMR Analyse der synthetisierten und gereinigten (Z)-Undec-9-ensäure
 10 mg der gereinigten (Z)-Undec-9-ensäure wurden in 600 µl deuteriertem Chloroform (CDCl₃) gelöst und zur NMR-Analyse gegeben (¹H, ¹³C). Die Auswertung der NMR-Ergebnisse erfolgte mittels TopSpin 3.0.

Die Stereoselektivität der (*Z*)-Undec-9-ensäure-Hydratisierung (2.9.3) wurde über ein modifiziertes Protokoll der Mosher-Ester-Analyse von Hoyer *et al.*¹¹⁵ evaluiert. Die Auswertung der NMR-Ergebnisse (Abbildung A 5) erfolgte mittels TopSpin 3.0 (Bruker BioSpin GmbH, Deutschland).

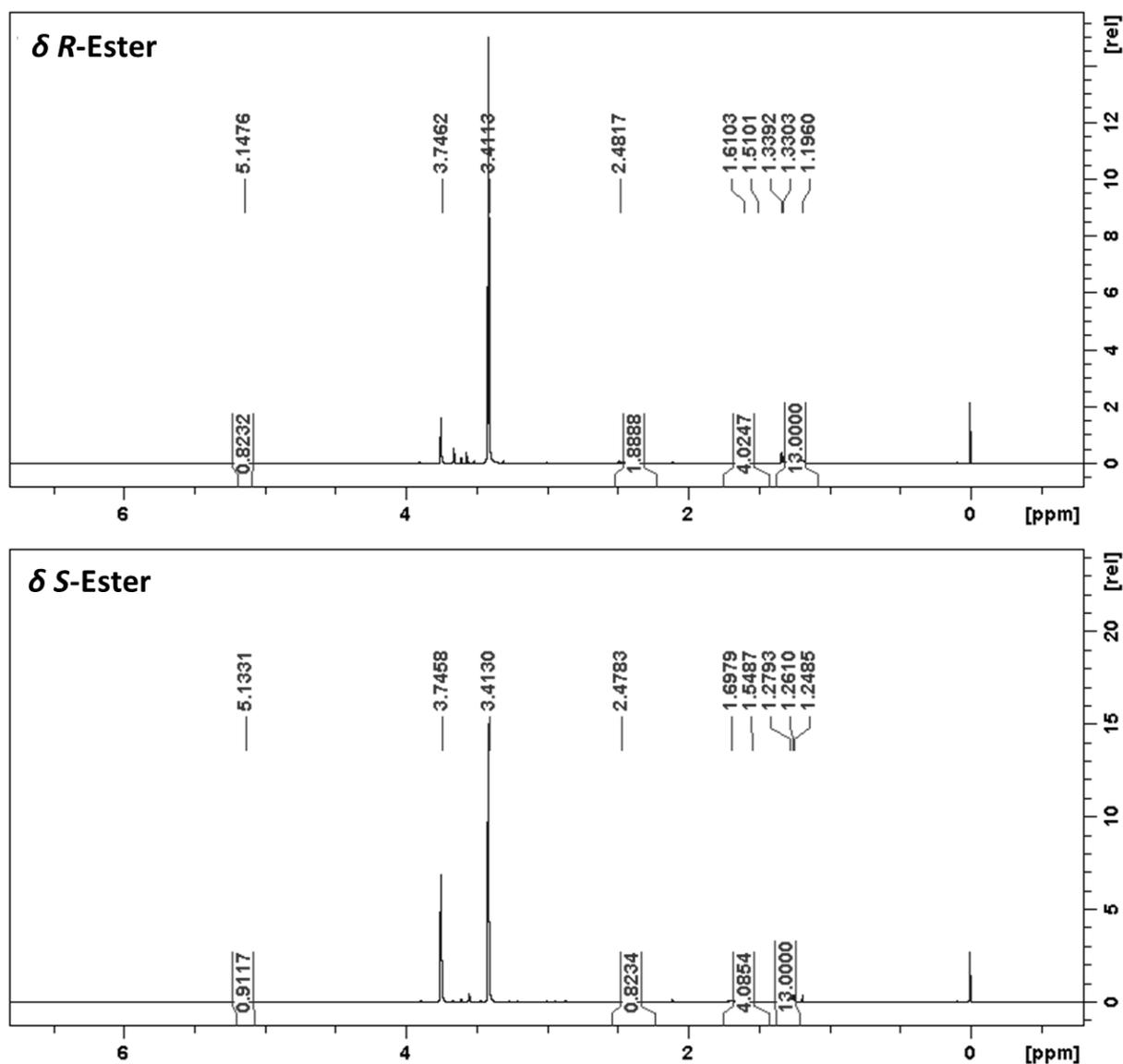


Abbildung A 5: Auswertung der Mosher-Ester Analyse mittels NMR

600 µl der Mosher-Ester-Derivate wurden zur NMR-Analyse gegeben (500 Hz, ¹H). Die Auswertung der NMR-Ergebnisse erfolgte mittels TopSpin 3.0.

Die Analyse der Hydratisierung der C11-Fettsäure (Z)-Undec-9-ensäure durch die *Em*-OAH erfolgte mittels GC-FID. Dargestellt ist ein Beispiel-Chromatogramm der GC-Analyse (Abbildung A 6). Dodecansäure diente als interner Standard zur Quantifizierung. Retentionszeiten: (Z)-Undec-9-ensäure (4,0 min), 10-Hydroxyundecansäure (6,0 min).

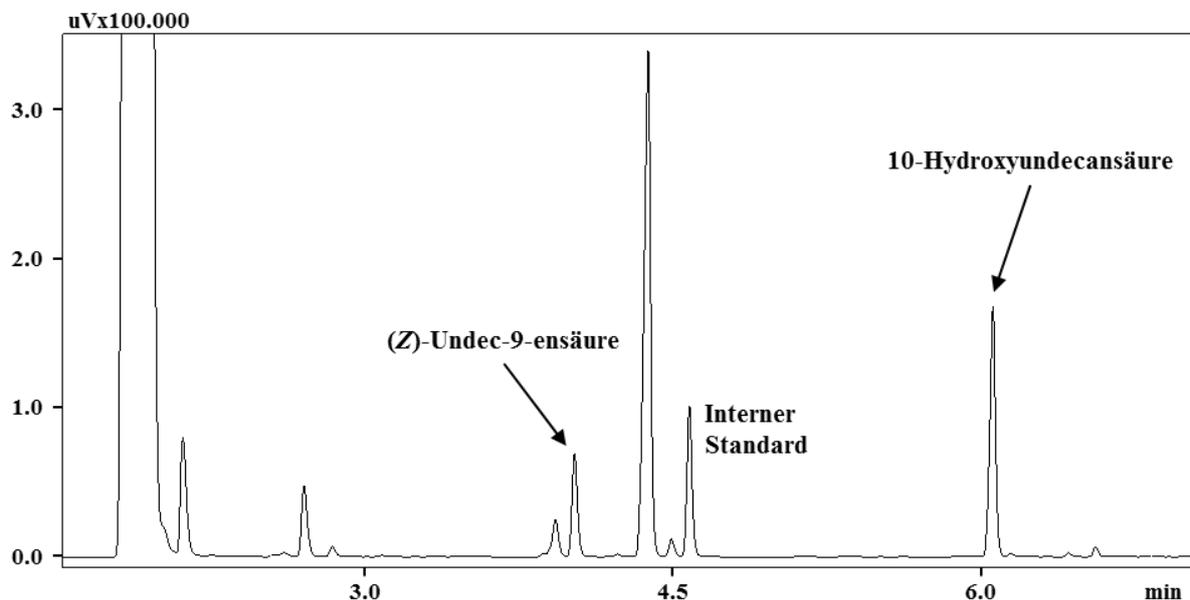


Abbildung A 6: GC-FID Analyse der (Z)-Undec-9-ensäure Hydratisierung durch die *Em*-OAH

Die Hydratisierung der C11-Fettsäure (Z)-Undec-9-ensäure wurde unter Standard-Reaktionsbedingungen und FAD-reduzierenden Bedingungen analysiert. Ganzzellansätze wurden mit Glucose komplementiert. Nach fünf Tagen Inkubation wurde die Produktbildung in den Ganzzellbiotransformationen und Zellysat-Assays mittels GC-FID analysiert. Dargestellt ist ein Beispiel-Chromatogramm der GC-Analyse. (verändert nach Demming *et al.*³⁴)

Die Hydratisierungsreaktion wurde darüber hinaus mithilfe einer GC-MS Analyse bestätigt (Abbildung A 7). Es wurde das charakteristische 117 m/z Signal und ein kleines 331 m/z Signal erhalten.

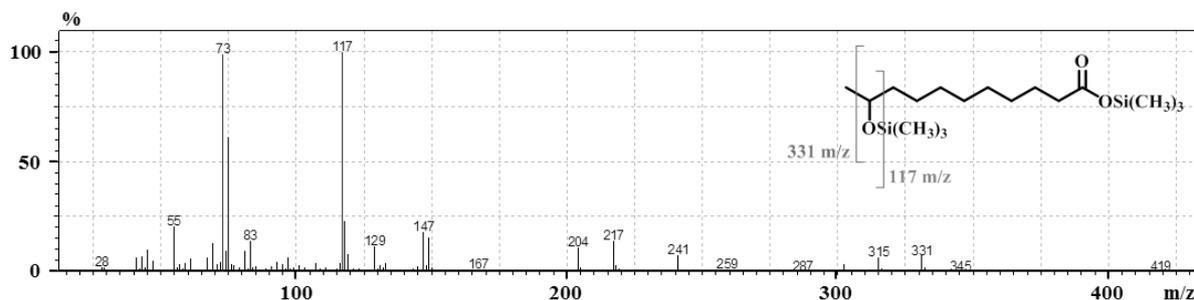


Abbildung A 7: Massenspektrum des hydratisierten Produktes 10-Hydroxyundecansäure

Die Hydratisierung der C11-Fettsäure (Z)-Undec-9-ensäure wurde mittels GC-MS analysiert. Dargestellt ist das Fragmentierungsmuster des Produktsignals. Es wurde das charakteristische 117 m/z Signal und ein kleines 331 m/z Signal erhalten. (übernommen aus Demming *et al.*³⁴)

Für die Isolierung der 10-Hydroxyundecansäure wurde ein *Upscaling* durchgeführt. Das Biotransformationsprodukt wurde extrahiert und mittels Säulenchromatographie aufgereinigt. Die Identifizierung der bei der Aufreinigung erhaltenen Fraktionen erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (Abbildung A 8). Das Substrat (S) und eine Probe der Biotransformation (B) dienten als Referenzen. Während die Fraktionen 1 und 2 Substratreste aufwiesen (R_f -Wert 0,45), wurde das hydratisierte Produkt in Fraktion 3 identifiziert (R_f -Wert 0,22).

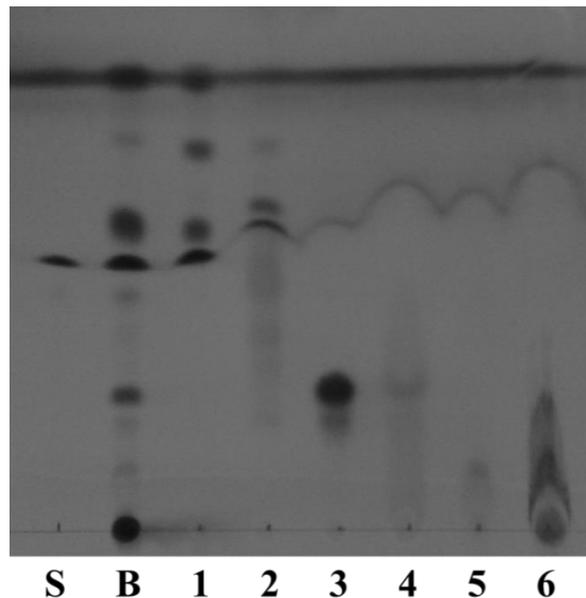


Abbildung A 8: Ergebnis der DC zur Identifizierung der Produktfraktionen

Die Fraktionen der Aufreinigung (1-6) wurden über Dünnschichtchromatographie analysiert. Die DC-Platten wurden in Phosphormolybdänsäure Hydrat gefärbt und durch nachfolgendes Erhitzen entwickelt. Das Substrat (S) und eine Probe der Biotransformation (B) dienten als Referenzen. (übernommen aus Demming *et al.*³⁴)

Fraktion 3 der Aufreinigung (Abbildung A 8) wurde *in vacuo* aufkonzentriert. Zur Überprüfung der Reinheit wurde eine Probe derivatisiert und mittels GC-MS analysiert (Abbildung A 9). Die derivatisierte Produktprobe wies eine hohe Reinheit von 95 % auf und das Massenspektrum zeigte die charakteristischen Signale der hydratisierten C11-Fettsäure (nicht dargestellt). Eine GC-MS Analyse der Fraktionen 1, 2, 4, 5 und 6 (Abbildung A 8) zeigte darüber hinaus, dass es sich bei den nicht-identifizierten Spots um Verunreinigungen durch verschiedenste Fettsäuren handelte (nicht dargestellt).

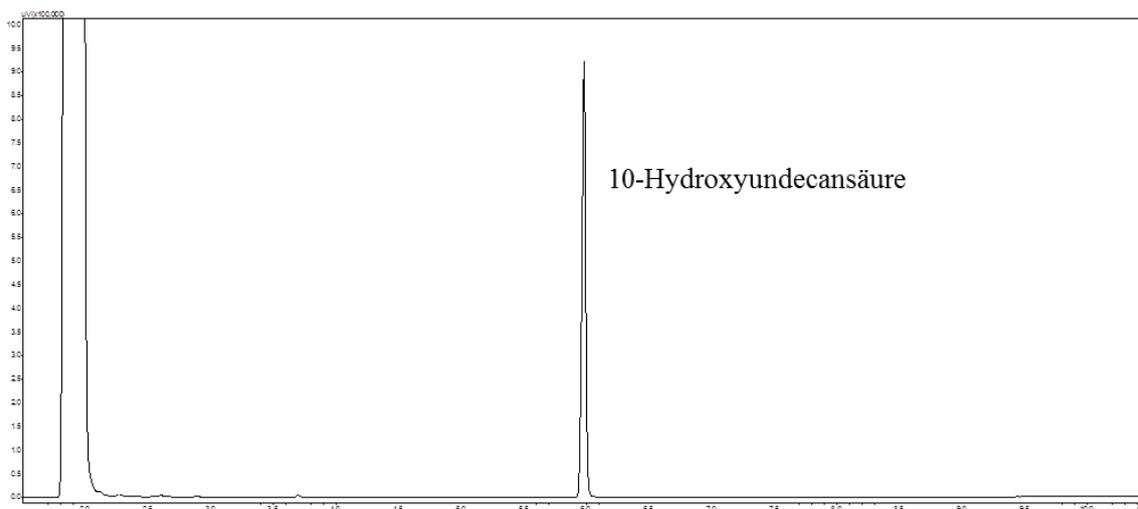


Abbildung A 9: Analyse der Produktreinheit des (Z)-Undec-9-ensäure Upscalings mittels GC-MS

Die verschiedenen Fraktionen der Säulenchromatographie wurden zur Überprüfung der Reinheit und zur Identifizierung der isolierten Verbindungen mittels GC-MS analysiert. Dargestellt ist das GC-Chromatogramm der Produktfraktion. (verändert nach Demming *et al.*⁵⁴)

10 mg der extrahierten und gereinigten 10-Hydroxyundecansäure wurden mit 600 μl deuteriertem Chloroform (CDCl_3) gemischt und zur NMR-Analyse gegeben (^1H , ^{13}C , Abbildung A 10). Das ^{13}C -NMR-Spektrum stimmte sehr gut mit dem erwarteten Spektrum des hydratisierten Produktes überein. Die ^1H -NMR Analyse wies im Bereich der niedrigen ppm-Werte (1.18-1.19 ppm) kleine Unterschiede zum erwarteten Spektrum auf, welche durch MTBE-Lösemittelreste zu erklären sind.¹⁶⁰ Darüber hinaus wurde für die Hydroxylgruppe ein nur schwaches Signal erhalten, während die Carboxygruppe überhaupt nicht detektiert wurde. Die Verschiebung des C_{10} -Protons (10-H) im Vergleich zum Spektrum des Substrates (Z)-Undec-9-ensäure (Abbildung A 4) bestätigt jedoch die Hydratisierungsreaktion.

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.18$ (s, 1H, 11-H), 1.19 (s, 2H, 11-H), 1.30-1.47 (m, 12H, 4-H, 5-H, 6-H, 7-H, 8-H, 9-H), 1.60-1.66 (m, 2H, 3-H), 2.34 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, 2-H), 3.77-3.83 (sext, $J = 6$ Hz, 1H, 10-H) ppm.

^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 23.4, 24.7, 25.7, 29, 29.1, 29.3, 29.5, 34, 39, 68, 179$ ppm.

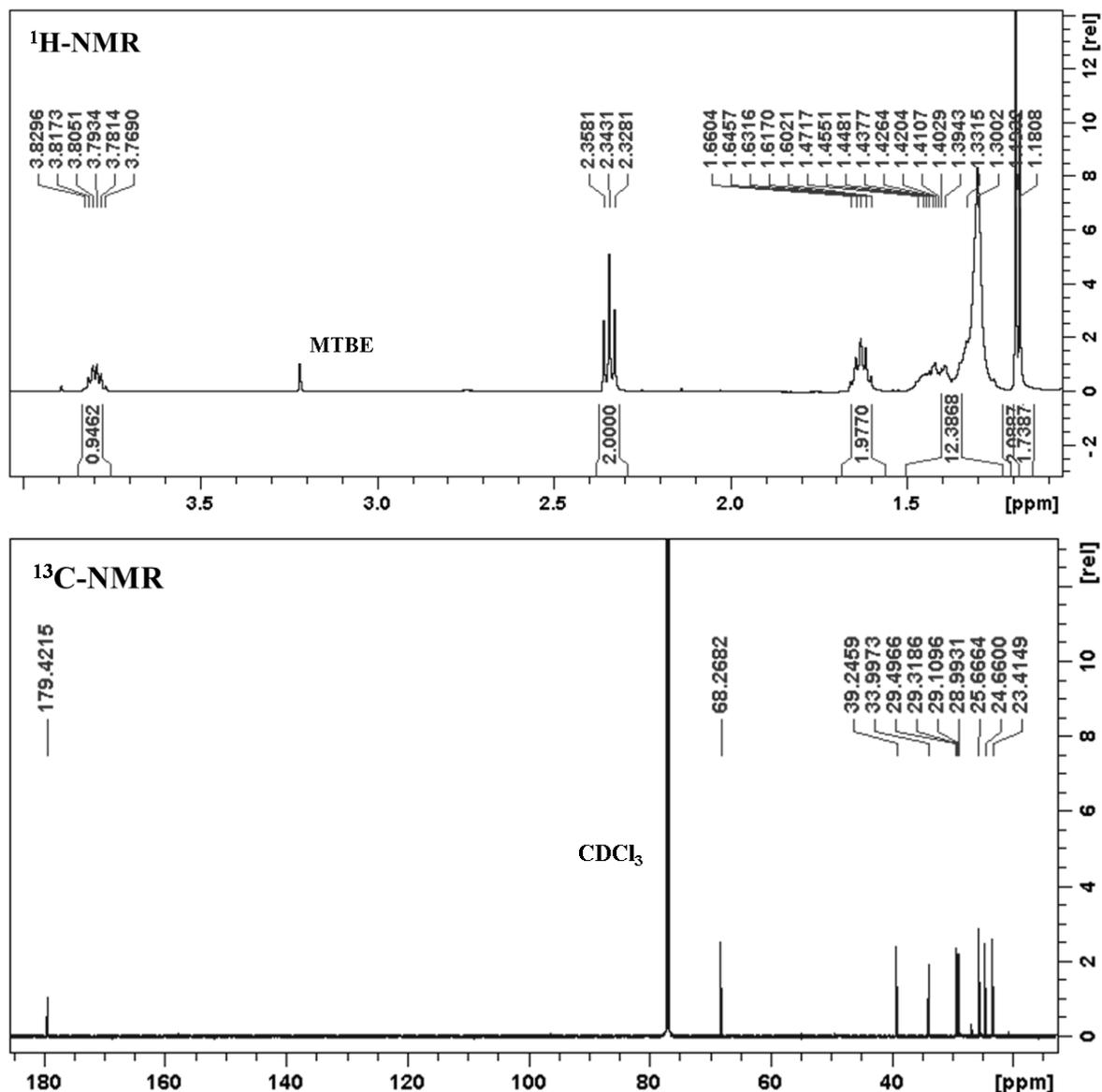


Abbildung A 10: ^1H - und ^{13}C -NMR Analyse des gereinigten Biotransformationsproduktes 10-Hydroxyundecansäure
 10 mg der extrahierten und gereinigten 10-Hydroxyundecansäure wurden in 600 μl deuteriertem Chloroform (CDCl_3) gelöst und zur NMR-Analyse gegeben (^1H , ^{13}C). Die Auswertung der NMR-Ergebnisse erfolgte mittels TopSpin 3.0. (verändert nach Demming *et al.*³⁴)

Die isolierte (*S*)-10-Hydroxyundecansäure diente zur Analyse des Reaktionsgleichgewichtes der (*Z*)-Undec-9-ensäure-Hydratisierung unter optimierten Bedingungen. Es wurde keine nennenswerte Dehydratisierung beobachtet und das Reaktionsgleichgewicht lag nach 40-stündiger Inkubation mit 99:1 auf der Seite der hydratisierten Fettsäure (Abbildung A 11).

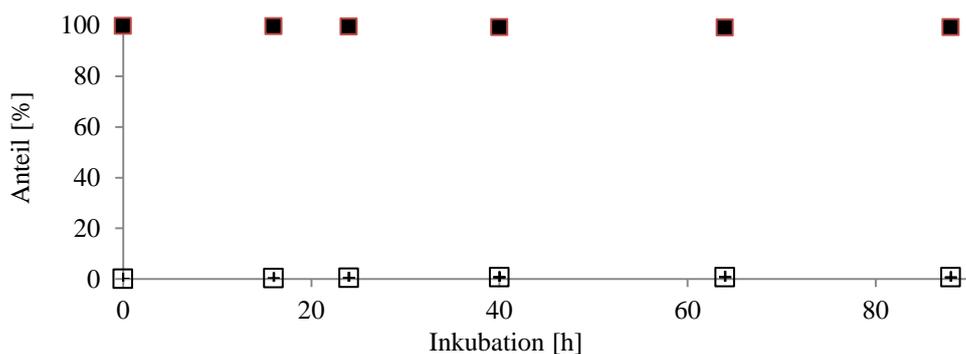


Abbildung A 11: Dehydratisierung der (S)-10-Hydroxyundecansäure

Die Biotransformationen erfolgten im 1,5 ml Maßstab unter optimierten Bedingungen (50 mg/ml Biofeuchtmasse, 100 mM Glucose, 0,3 mM FAD und 3 mM NADH) mit 0,5 mM (S)-10-Hydroxyundecansäure als Substrat (1 % (v/v) finale DMSO-Konzentration). Die Quantifizierung des Substrates und des Produktes erfolgte in regelmäßigen Abständen mittels GC-FID. (S)-10-Hydroxyundecansäure (■); Undec-9-ensäure (□)

1-Decen-Biotransformationen mit dem *Em*-OAH Wildtypenzym wurden mittels GC-FID analysiert und mit 1-Octanol als internem Standard quantifiziert. Dargestellt ist ein Beispiel-Chromatogramm der GC-Analyse (Abbildung A 12). Retentionszeiten: 1-Decen (4,1 min) und 2-Decanol (6,4 min).

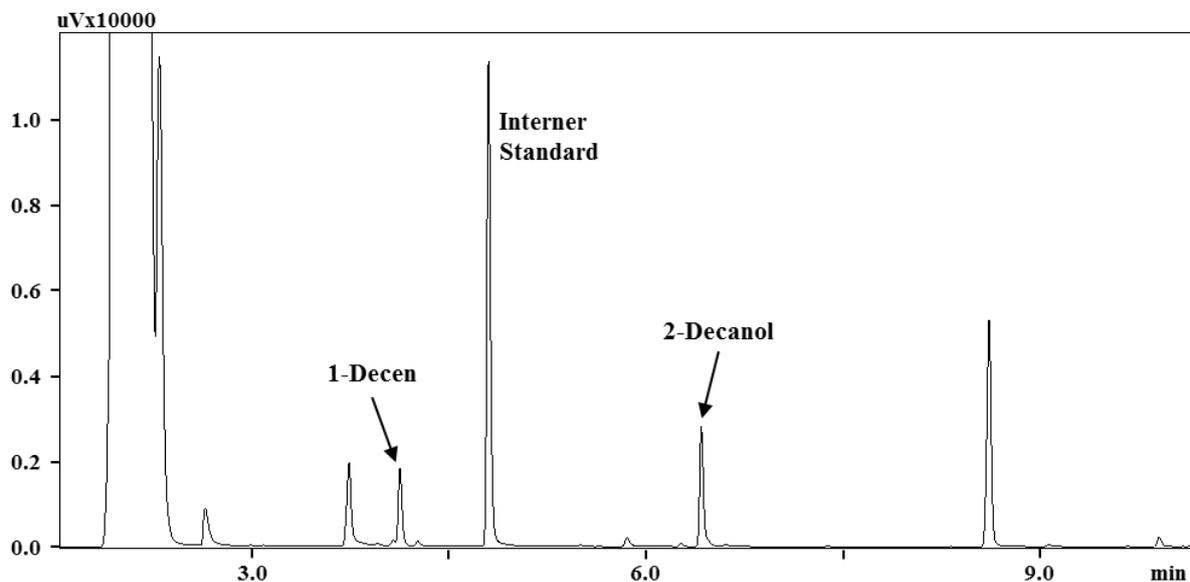


Abbildung A 12: GC-FID Analyse der 1-Decen Biotransformationen mit dem *Em*-OAH Wildtypenzym

Die Hydratisierung des Alkens 1-Decen wurde unter optimierten Bedingungen analysiert. In regelmäßigen Abständen wurde über GC-FID die Abnahme des Substrates 1-Decen und die Zunahme des sekundären Alkohols 2-Decanol quantifiziert. Dargestellt ist ein Beispiel-Chromatogramm der GC-Analyse. (verändert nach Demming *et al.*³⁴)

Die Hydratisierung des Alkens 1-Decen zum sekundären Alkohol 2-Decanol wurde über eine GC-MS-Analyse bestätigt (Abbildung A 13). Das Massenspektrum des Biotransformationsproduktes zeigte eine sehr große Übereinstimmung zu dem des 2-Decanol Standards.

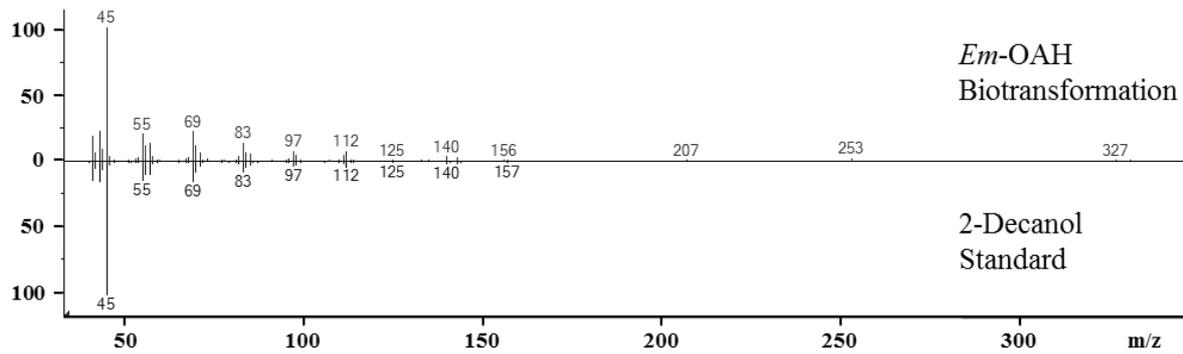


Abbildung A 13: Massenspektrum des *Em*-OAH Biotransformationsproduktes im direkten Vergleich zu 2-Decanol
Die Hydratisierung des Alkens 1-Decen wurde unter optimierten Bedingungen analysiert und über GC-FID quantifiziert. Darüber hinaus wurde die Bildung des sekundären Alkohols 2-Decanol über eine GC-MS-Analyse bestätigt. Dargestellt ist das Massenspektrum des Biotransformationsproduktes und des 2-Decanol Standards. (verändert nach Demming *et al.*³⁴)

Aufgrund der chemischen Unterschiede zwischen Fettsäuren und Alkenen wurden die C11-FS-optimierten Bedingungen im Hinblick auf die Hydratisierung von 1-Decen analysiert (Abbildung A 14). Der Einfluss der einzelnen Additive wurde aufeinander aufbauend untersucht (angedeutet durch Pfeile). In einem abschließenden Ansatz wurde darüber hinaus die Zugabe von Glucose, FAD, NADH und DTT bei einer Reaktionstemperatur von 30 °C analysiert.

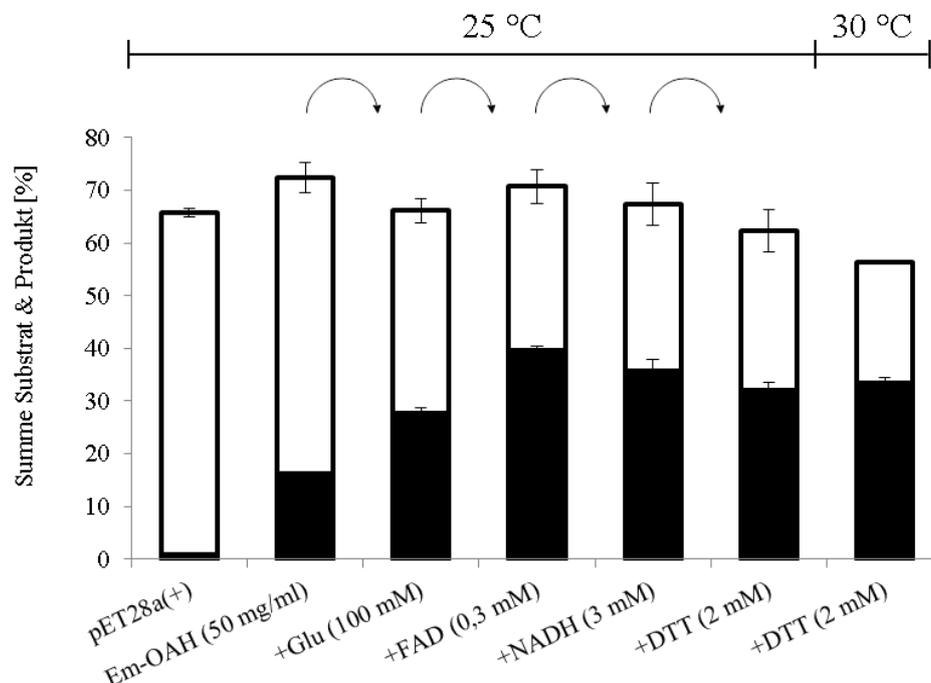


Abbildung A 14: Analyse der C11-FS optimierten Bedingungen im Hinblick auf die Hydratisierung von 1-Decen
Die Analyse zum Einfluss der verschiedenen Additive auf die Hydratisierung von 1-Decene erfolgte aufeinander aufbauend (durch Pfeile angedeutet) unter Verwendung von 50 mg/ml *Em*-OAH Biofeuchtmasse bei 25 °C. Darüber hinaus wurde die Produktbildung unter Zugabe aller Komponenten bei 30 °C untersucht. Die Quantifizierung des Substrates 1-Decen (□) und des Produktes 2-Decanol (■) nach dreitägiger Inkubation erfolgte mittels GC-FID. (verändert nach Demming *et al.*³⁴)

Die Verwendung von Methyl-, Ethyl- und Propylhexanoat sowie Hexanal und 1-Hexanol als alternative Dummy-Substrate resultierte in einer erfolgreichen Hydratisierung von 1-Decen zu 2-Decanol (Abbildung A 15). Die GC-Analyse zeigte jedoch, dass die Fettsäureester im Laufe der Inkubation durch zelluläre Enzyme vollständig zu Hexansäure hydrolysiert wurden und auch in den Hexanal und 1-Hexanol Ansätzen wurden infolge einer Oxidation geringe Hexansäure-Konzentrationen detektiert.

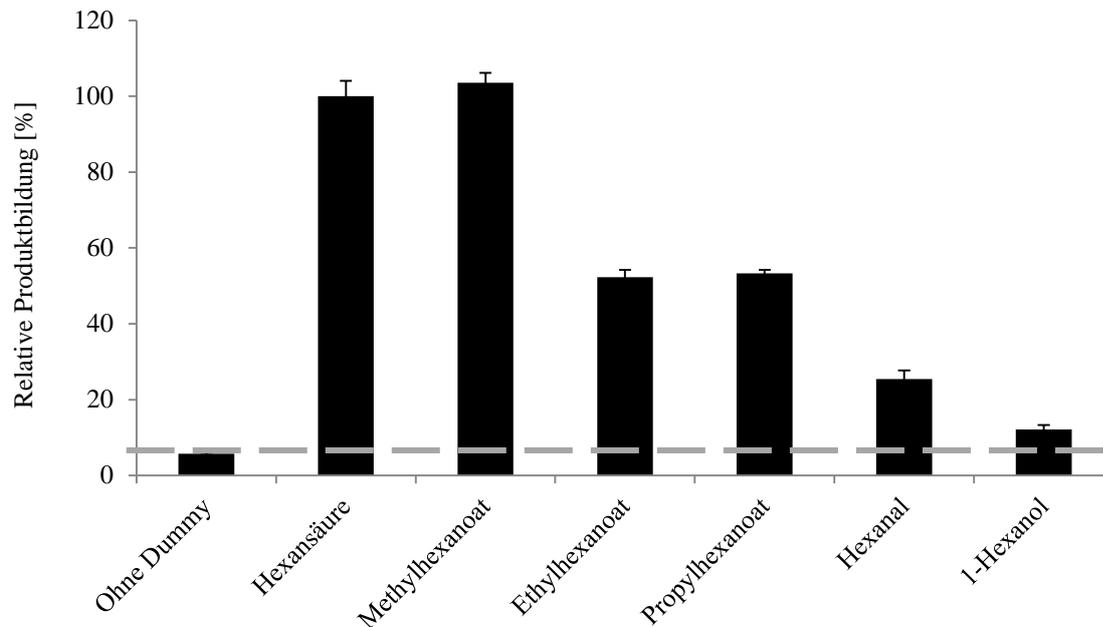


Abbildung A 15: 1-Decen Hydratisierung durch das *Em*-OAH Wildtypenzym mithilfe alternativer Dummy-Substrate
Die Biotransformationen wurden unter optimierten Bedingungen (50 mg/ml Biofeuchtmasse, 100 mM Glucose, 0,3 mM FAD) mit 0,5 mM Substrat und 0,5 mM Dummy-Substrat und einer finalen DMSO-Konzentration von 1 % (v/v) durchgeführt. Nach zweitägiger Inkubation wurde die Produktbildung mittels GC-FID analysiert. Dargestellt ist die relative Produktbildung, wobei das Ergebnis des Hexansäure-Ansatzes auf 100 % gesetzt wurde. Die relative Produktbildung des Ansatzes ohne Dummy-Substrat (ohne Dummy) ist mit einer gestrichelten Linie gekennzeichnet.

Die Hydratisierung der Alkene 1-Dodecen und 1-Octen durch das *Em*-OAH Wildtypenzym erfolgte unter optimierten Bedingungen bei 25 °C. Nach viertägiger Inkubation wurden die Ansätze extrahiert und mittels chiraler GC analysiert. Es wurde ein sehr kleiner *S*-2-Dodecanol bzw. *S*-2-Octanol Peak identifiziert, welcher in den pET28a(+) Kontrollansätzen nicht auftrat (Abbildung A 16). Der Einsatz von Heptansäure als Dummy-Substrat anstelle von Hexansäure resultierte bei beiden Substraten in eine leichte Steigerung der Produktbildung.

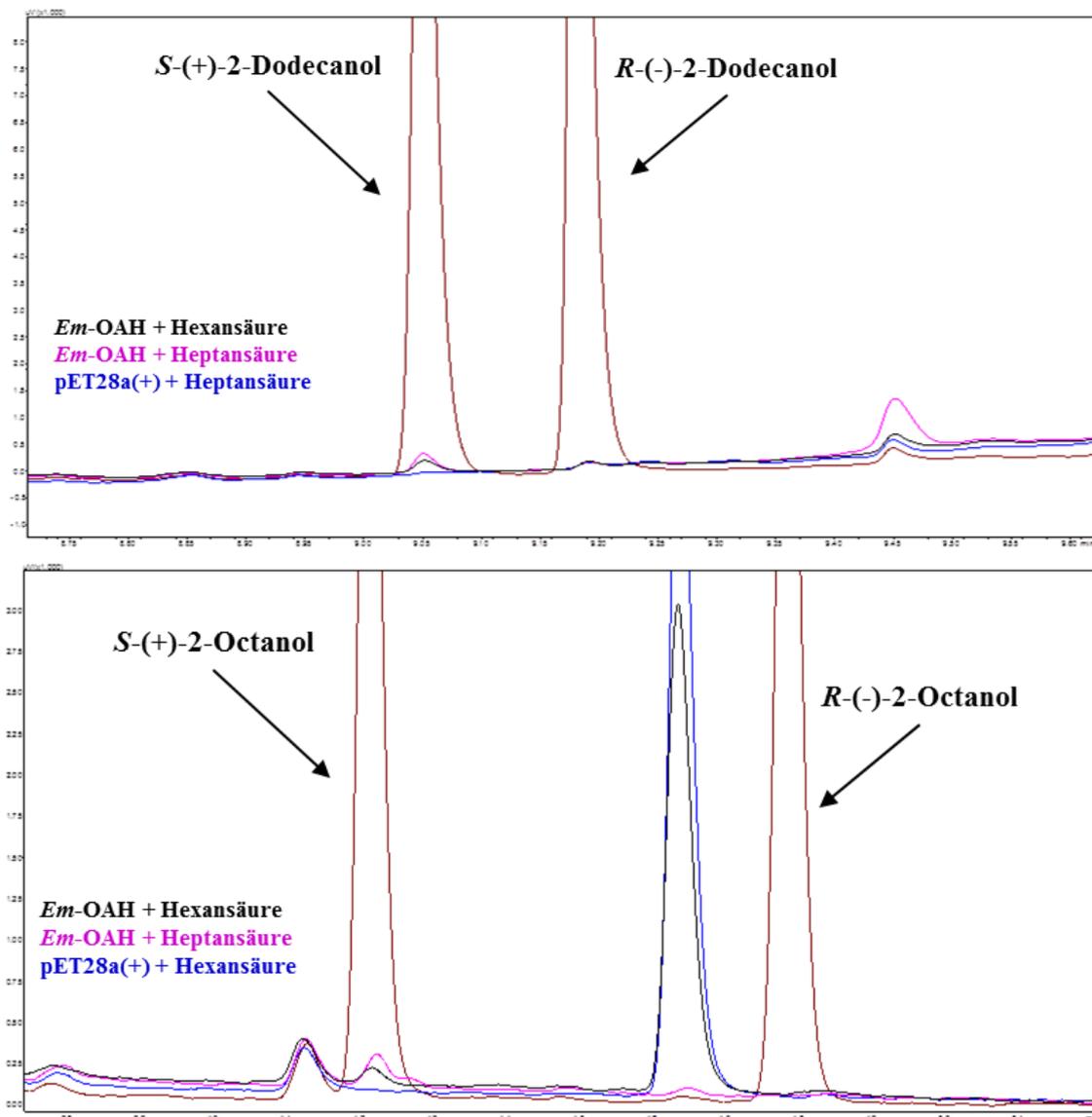


Abbildung A 16: Chirale GC-Analyse der 1-Dodecan (oben) bzw. 1-Octen (unten) *Em*-OAH Biotransformationen

Der Umsatz der beiden Alkene 1-Dodecan und 1-Octen wurde unter optimierten Bedingungen mit einer äquimolaren Konzentration des Hexansäure- bzw. Heptansäure-Dummy-Substrates analysiert. *E. coli* BL21 (DE3) pET28a(+) Ganzzellbiotransformationen mit dem jeweiligen Substrat und Hexansäure/Heptansäure-Dummy-Substrat dienten als Negativkontrolle. Die Auswertung der Stereoselektivität erfolgte mithilfe einer chiralen GC-Analyse.

Die *Em*-OAH Mutanten wurden hinsichtlich ihres Substratspektrums analysiert. Reaktionsbedingungen, Inkubationszeit, Probenaufbereitung und GC-Analyse wurden auf das jeweilige Substrat angepasst. Die Aktivität des Wildtypenzym mit den verschiedenen Substraten wurde jeweils auf 100 % gesetzt (gestrichelte Linie).

Abbildung A 17 präsentiert das Ergebnis der *Em*-OAH F227-Varianten im Hinblick auf die Hydratisierung von Palmitinsäure (C16) und Myristoleinsäure (C14). Der Umsatz der beiden Fettsäuren wurde im Vergleich zum Wildtypenzym durch die Einführung der Aminosäuren Leucin, Tyrosin und Tryptophan (deutlich) reduziert.

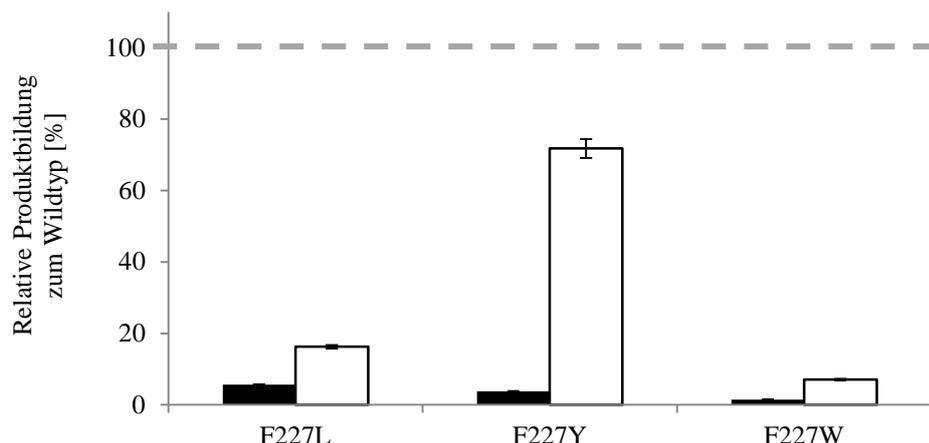


Abbildung A 17: Palmitinsäure (C16) und Myristoleinsäure (C14) Hydratisierung der *Em*-OAH F227-Varianten

Fettsäure-Biotransformationen wurden im 500 µl Maßstab in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen, Inkubationszeit und Probenaufbereitung wurden auf das jeweilige Substrat angepasst. Die Reaktionen wurden durch Substratzugabe (0,5 mM, 1 % finale DMSO Konzentration) gestartet. Nach erfolgter Inkubation wurde die Produktbildung mittels GC-FID analysiert. Dargestellt ist die relative Produktbildung, wobei das Ergebnis des Wildtyp-Ansatzes auf 100 % gesetzt wurde (gestrichelte Linie).

10-Hydroxyhexadecansäure (■); 10-Hydroxytetradecansäure (□)

Die Sättigungsmutagenese des Alanins 248 bestätigt die große Bedeutung dieser Aminosäureposition für die Substratspezifität. Abbildung A 18 präsentiert das Ergebnis des Aktivitätsscreenings mit den C18-C14 Fettsäuren Ölsäure, Palmitinsäure und Myristoleinsäure. Während die Aktivität fast aller Varianten mit den langkettigen Substraten Ölsäure und Palmitinsäure deutlich verringert war, zeigte die Mutation zumeist keinen großen Einfluss auf die Hydratisierung der mittelkettigen C14-Fettsäure Myristoleinsäure.

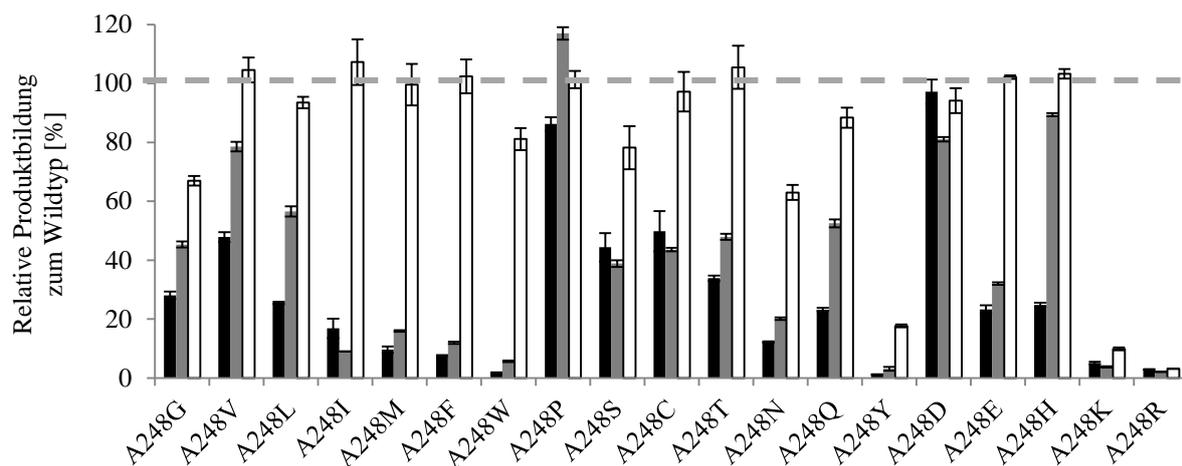


Abbildung A 18: Fettsäure-Hydratisierung (C18-C14) der *Em*-OAH A248-Varianten

Fettsäure-Biotransformationen wurden im 500 µl Maßstab in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen, Inkubationszeit und Probenaufbereitung wurden auf das jeweilige Substrat angepasst. Die Reaktionen wurden durch Substratzugabe (0,5 mM, 1 % finale DMSO Konzentration) gestartet. Nach erfolgter Inkubation wurde die Produktbildung mittels GC-FID analysiert. Dargestellt ist die relative Produktbildung, wobei das Ergebnis des Wildtyp-Ansatzes auf 100 % gesetzt wurde (gestrichelte Linie).

10-Hydroxyoctadecansäure (■); 10-Hydroxyhexadecansäure (■); 10-Hydroxytetradecansäure (□)

Abbildung A 19 präsentiert das Ergebnis des Aktivitätsscreenings der A248-Sättigungsmutagenese mit der C11-Fettsäure (Z)-Undec-9-ensäure, und den Alkenen 1-Decen und 1-Octen. Während die Hydrataseaktivität mit dem Alken 1-Decen bei fast allen Mutanten deutlich verringert war, wurde im Falle der kurzkettigen C11-Fettsäure und des 1-Octens für viele Varianten im Vergleich zum Wildtyp eine Steigerung der relativen Produktbildung beobachtet.

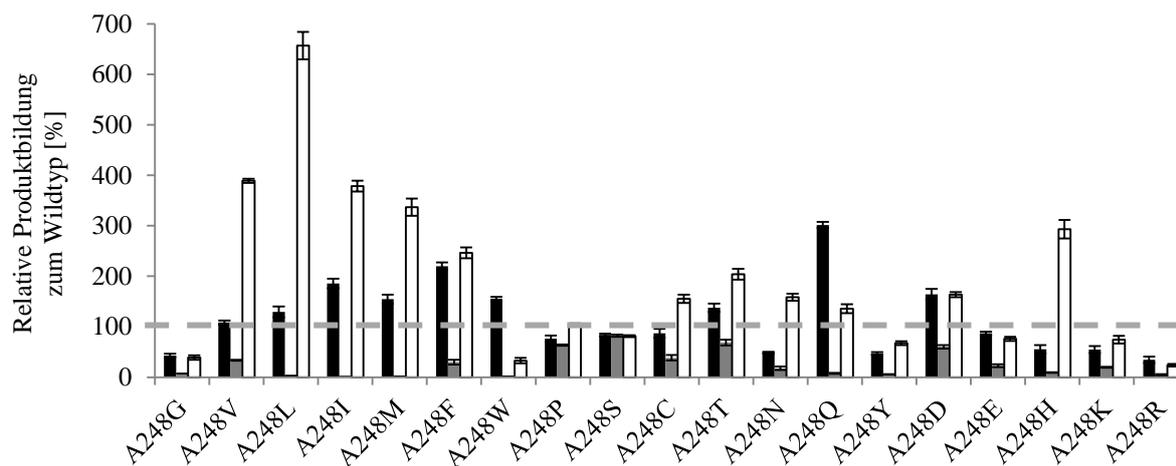


Abbildung A 19: Fettsäure (C11) und Alken (C10-C8) Hydratisierung der *Em*-OAH A248-Varianten

Fettsäure- und Alken-Biotransformationen wurden im 500 µl Maßstab in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bzw. 2 ml Glas-Vials durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen, Inkubationszeit und Probenaufbereitung wurden auf das jeweilige Substrat angepasst. Die Reaktionen wurden durch Substratzugabe (0,5 mM, 1 % finale DMSO Konzentration) gestartet. Für die Alkene wurde Heptansäure als Dummy-Substrat eingesetzt. Nach erfolgter Inkubation wurde die Produktbildung mittels GC-FID analysiert. Dargestellt ist die relative Produktbildung, wobei das Ergebnis des Wildtyp-Ansatzes auf 100 % gesetzt wurde (gestrichelte Linie).

10-Hydroxyundecansäure (■); 2-Decanol (■); 2-Octanol (□)

Die drei besten 1-Octen-Mutanten (A248V/L/I) wurden für eine Quantifizierung des Produktes 2-Octanol und eine Analyse der Selektivität ausgewählt. Alle Mutanten zeigten eine exzellente Stereoselektivität mit einem Enantiomerenüberschuss von >99 % für das *S*-Enantiomer. Dargestellt ist ein Beispiel-Chromatogramm der *Em*-OAH A248L Biotransformation (Abbildung A 20).

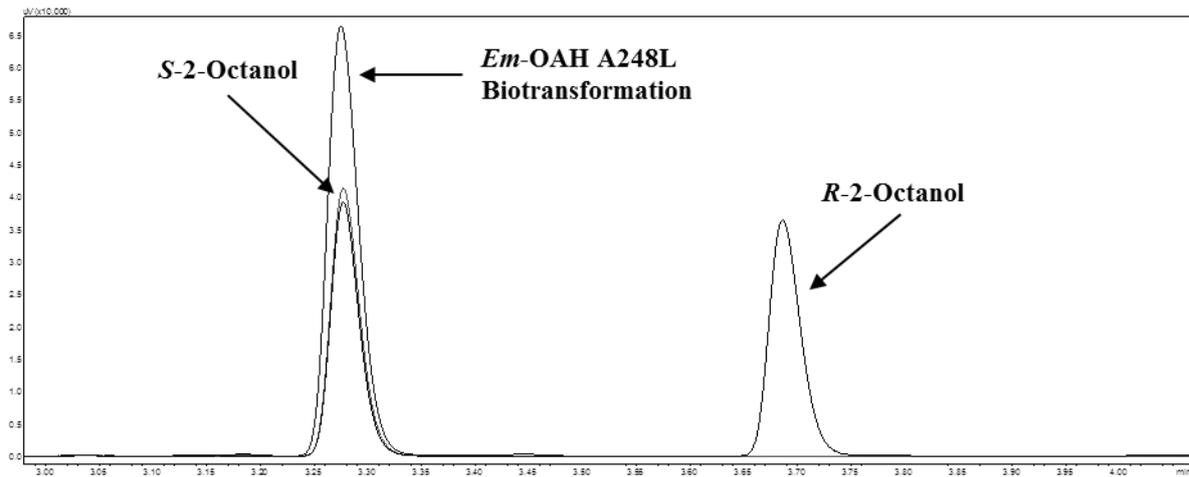


Abbildung A 20: Chirale GC-FID Analyse der *Em*-OAH A248L Biotransformationen mit 1-Octen

Die 1-Octen Biotransformationen erfolgten im 500 μ l Maßstab in 2 ml Glas-Vials unter optimierten Bedingungen über acht Tage bei 25 $^{\circ}$ C und 180 Upm. Heptansäure (0,5 mM) diente als Fettsäure-Dummy-Substrat und die Reaktionen wurden durch Substratzugabe (0,5 mM, 1 % (v/v) finale DMSO Konzentration) gestartet. In regelmäßigen Abständen wurde über GC-FID die Zunahme des sekundären Alkohols 2-Octanol quantifiziert. Die Analyse der Stereoselektivität erfolgte mithilfe einer chiralen GC. Dargestellt ist ein Beispiel-Chromatogramm.

Die Etablierung des Zweiphasensystems wurde mit den langkettigen/verzweigten/unpolaren Lösemitteln Dodecansäuremethylester (DAME), Bis(2-ethylhexyl)phthalat (BEHP) und Isopropylmyristat (IPM) fortgeführt. Die relative Produktbildung wurde bei drei verschiedenen Substratkonzentrationen (10 mM, 20 mM, 30 mM) ermittelt (Abbildung A 21). Der höchste Substratumsatz wurde unter Verwendung von BEHP mit 10 mM und 20 mM 1-Octen und Heptansäure (Dummy-Substrat) beobachtet.

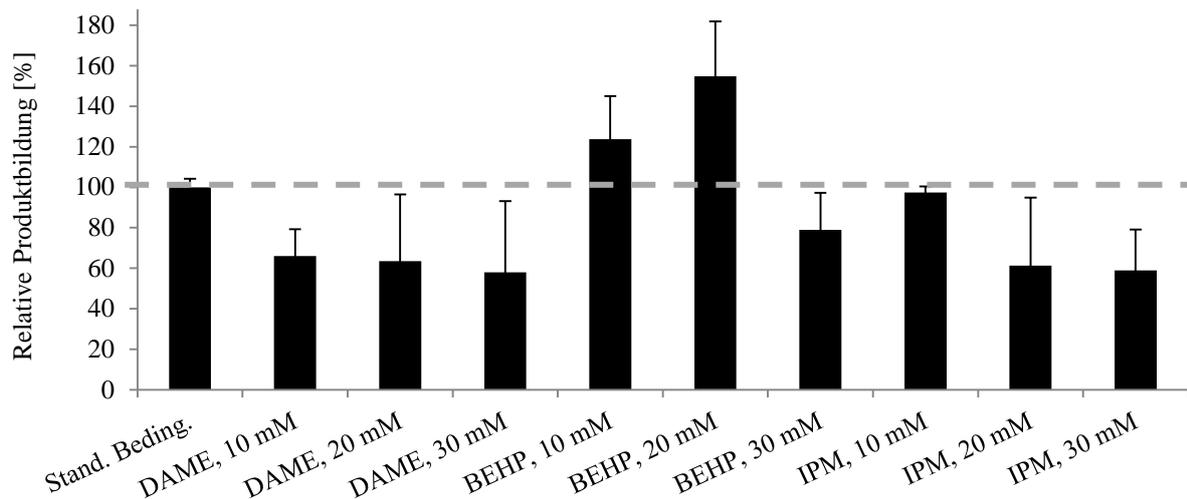


Abbildung A 21: 1-Octen-Hydratisierung in Zweiphasensystemen mit 10-30 mM Substrat und Dummy-Substrat

Die Biotransformationen wurden im 500 μ l Maßstab in 2 ml Glas-Vials unter optimierten Bedingungen mit der *Em*-OAH Variante A248L durchgeführt. Heptansäure (10-30 mM) diente als Fettsäure-Dummy-Substrat und die Reaktionen wurden durch Substratzugabe (10-30 mM 1-Octen) gestartet. Als Kontrollansatz dienen Biotransformationen unter Standardbedingungen (0,5 mM Substrat und Dummy-Substrat, 1 % finale DMSO-Konzentration). Für die Analyse der Zweiphasensysteme wurden 10 % (50 μ l) organisches Lösemittel hinzugegeben. Nach fünftägiger Inkubation bei 25 °C und 180 Upm wurde die Produktbildung (Triplikate) mittels GC-FID analysiert. Das Ergebnis des Kontrollansatzes unter Standardbedingungen wurde auf 100 % gesetzt. DAME, Dodecansäuremethylester; BEHP, Bis(2-ethylhexyl)phthalat; IPM, Isopropylmyristat

Da sich eine Erhöhung des Lösemittelvolumens negativ auf die Produktbildung auswirkte, wurde überprüft, ob das Verhältnis von Biotransformation zu organischer Phase hierbei entscheidend ist. 1000 μ l und 1500 μ l Reaktionsansätze wurden mit 200 μ l bzw. 300 μ l BEHP überschichtet, während die Standardbedingungen (500 μ l Biotransformation, 100 μ l organische Phase) als Kontrolle dienten. Somit wurde das Lösemittelvolumen in diesem Versuch erhöht ohne das Verhältnis von wässriger zu organischer Phase zu verändern. Es zeigte sich jedoch, dass die relative Produktbildung bei Vergrößerung des Gesamtansatzes selbst bei achtfachem Substratüberschuss sehr gering war (Abbildung A 22).

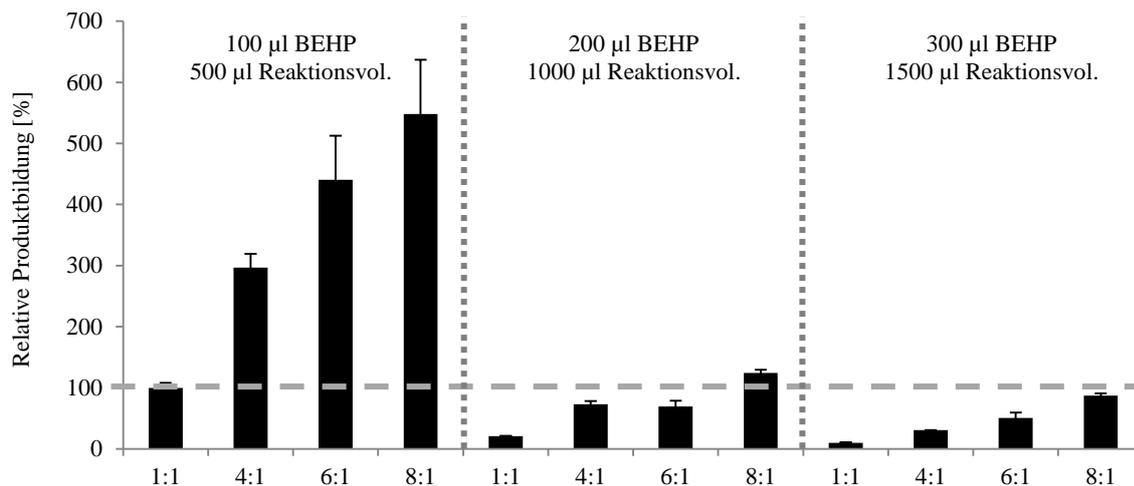


Abbildung A 22: 1-Octen-Hydratisierung in Zweiphasensystemen mit Substrat-Überschuss bei vergrößertem Reaktionsvolumen

Die Biotransformationen erfolgten im 500, 1000 bzw. 1500 µl Maßstab in 2 ml Glas-Vials unter optimierten Bedingungen (100 mg/ml Biofeuchtmasse, 200 mM Glucose, 0,6 mM FAD) mit der *Em*-OAH Variante A248L. Die Reaktionsansätze wurden mit 100, 200 bzw. 300 µl BEHP überschichtet. Heptansäure (10 mM) diente als Fettsäure-Dummy-Substrat und die Reaktionen wurden durch Substratzugabe (10-80 mM 1-Octen) gestartet. Als Kontrollansatz dienten Biotransformationen mit einem äquimolaren Verhältnis von Substrat und Dummy-Substrat (1:1, jeweils 10 mM). Nach viertägiger Inkubation bei 25 °C und 180 Upm wurde die Produktbildung (Triplikate) mittels GC-FID analysiert. Das Ergebnis des 500 µl-Kontrollansatzes mit einem äquimolaren Verhältnis wurde auf 100 % gesetzt. Bei der Angabe der Verhältnisse bezieht sich die erste Zahl jeweils auf das Substrat und die zweite Zahl auf das Dummy-Substrat (Bsp. 4:1, 40 mM 1-Octen und 10 mM Heptansäure).

Die *Em*-OAH Variante A248L wurde hinsichtlich eine Hydrataseaktivität mit dem C7-Alken 1-Hepten analysiert. Es wurden 1-Decen-optimierte Bedingungen eingesetzt und Heptansäure diente als Dummy-Substrat. Dargestellt ist ein Ausschnitt des Chromatogramms der GC-Analyse (Abbildung A 23).

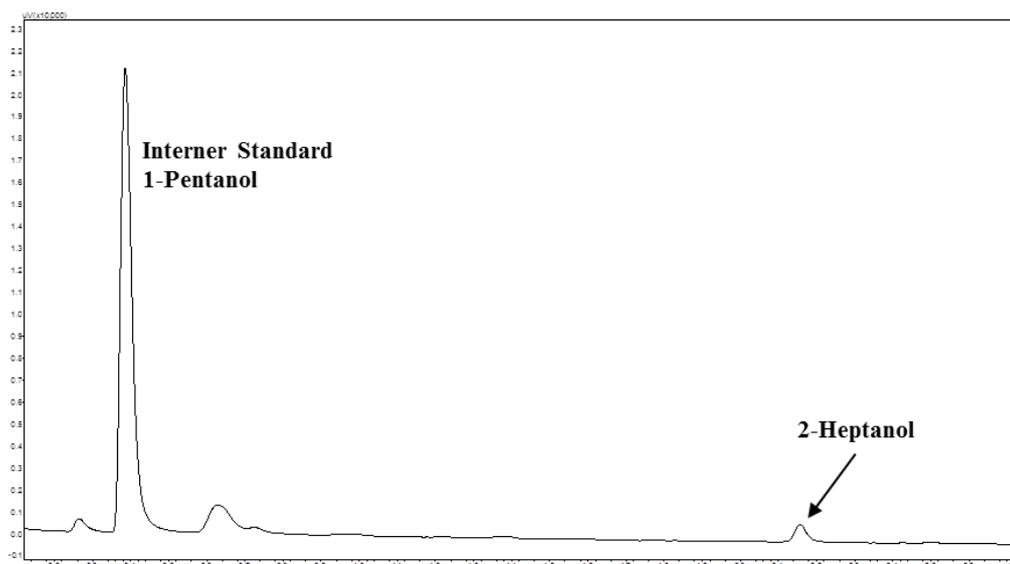


Abbildung A 23: 1-Hepten Hydratisierung durch die *Em*-OAH A248L unter Standardbedingungen

Die Reaktionen wurden als Ganzzellbiotransformationen (50 mg/ml) unter 1-Decen-optimierten Bedingungen (100 mM Glucose, 0,3 mM FAD) durchgeführt und durch Zugabe von Substrat (0,5 mM 1-Hepten) und Dummy-Substrat (0,5 mM Heptansäure) gestartet. Nach viertägiger Inkubation bei 25 °C und 180 Upm wurde die Produktbildung mittels GC-FID analysiert. Dargestellt ist ein Ausschnitt des GC-Chromatogramms.

Die Hydratisierung des Alkens 1-Heptene durch die *Em*-OAH Variante A248L im Zweiphasensystem mit BEHP wurde mit Substrat zu Dummy-Substrat Verhältnissen von 20:1 bis 100:1 analysiert. Im Rahmen dieser Experimente wurde die Heptansäure-Konzentration auf 5 mM bzw. 2,5 mM erniedrigt. Biotransformationen unter Standardbedingungen (50 mg/ml Biofeuchtmasse, 100 mM Glucose, 0,3 mM FAD, 0,5 mM Substrat und Dummy-Substrat, 1 % finale DMSO-Konzentration) ohne Zweiphasensystem dienten als Kontrollansatz. Die höchste relative Produktbildung wurde mit 300 mM 1-Hepten und 5 mM Heptansäure (Verhältnis von 60:1) ermittelt (Abbildung A 24).

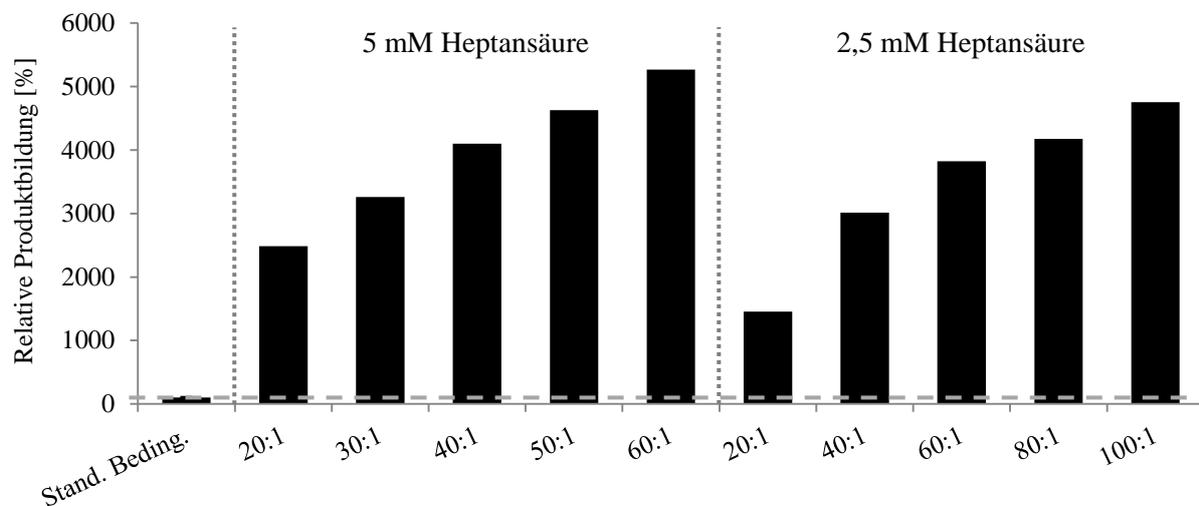


Abbildung A 24: 1-Hepten Hydratisierung im Zweiphasensystem mit Substrat-Überschuss

Die Biotransformationen erfolgten im 500 µl Maßstab in 2 ml Glas-Vials unter optimierten Bedingungen (100 mg/ml Biofeuchtmasse, 200 mM Glucose, 0,6 mM FAD) mit der *Em*-OAH Variante A248L. Die Ansätze wurden mit 100 µl BEHP überschichtet. Heptansäure (5 mM bzw. 2,5 mM) diente als Fettsäure-Dummy-Substrat und die Reaktionen wurden durch Substratzugabe (100-300 mM 1-Hepten) gestartet. Als Vergleich dienten Biotransformationen unter Standardbedingungen (50 mg/ml Biofeuchtmasse, 100 mM Glucose, 0,3 mM FAD, 0,5 mM Substrat und Dummy-Substrat, 1 % finale DMSO-Konzentration) ohne Zweiphasensystem. Nach vier tägiger Inkubation bei 25 °C und 180 Upm wurde die Produktbildung (Duplikate) mittels GC-FID analysiert. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Doppelbestimmung. Das Ergebnis des Kontrollansatzes unter Standardbedingungen wurde auf 100 % gesetzt. Bei der Angabe der Verhältnisse bezieht sich die erste Zahl jeweils auf das Substrat und die zweite Zahl auf das Dummy-Substrat (Bsp. 20:1, 100 mM 1-Hepten und 5 mM Heptansäure).

Die Hydratisierung des Alkens 1-Hepten wurde durch die Etablierung und Optimierung eines Zweiphasensystems mit BEHP deutlich verbessert. Die höchste relative Produktbildung wurde mit einem 60:1 Verhältnis von Substrat (300 mM 1-Hepten) zu Dummy-Substrat (5 mM Heptansäure) ermittelt. Abbildung A 25 präsentiert den direkten Vergleich der Produktbildung (2-Heptanol) unter „Standardbedingungen“ (50 mg/ml Biofeuchtmasse, 100 mM Glucose, 0,3 mM FAD, 0,5 mM 1-Hepten, 0,5 mM Heptansäure, 1 % finale DMSO-Konzentration) und im optimierten Zweiphasensystem (100 mg/ml Biofeuchtmasse, 200 mM Glucose, 0,6 mM FAD, 100 µl BEHP, 300 mM 1-Hepten, 5 mM Heptansäure). Dargestellt ist ein Ausschnitt der übereinandergelegten GC-Chromatogramme.

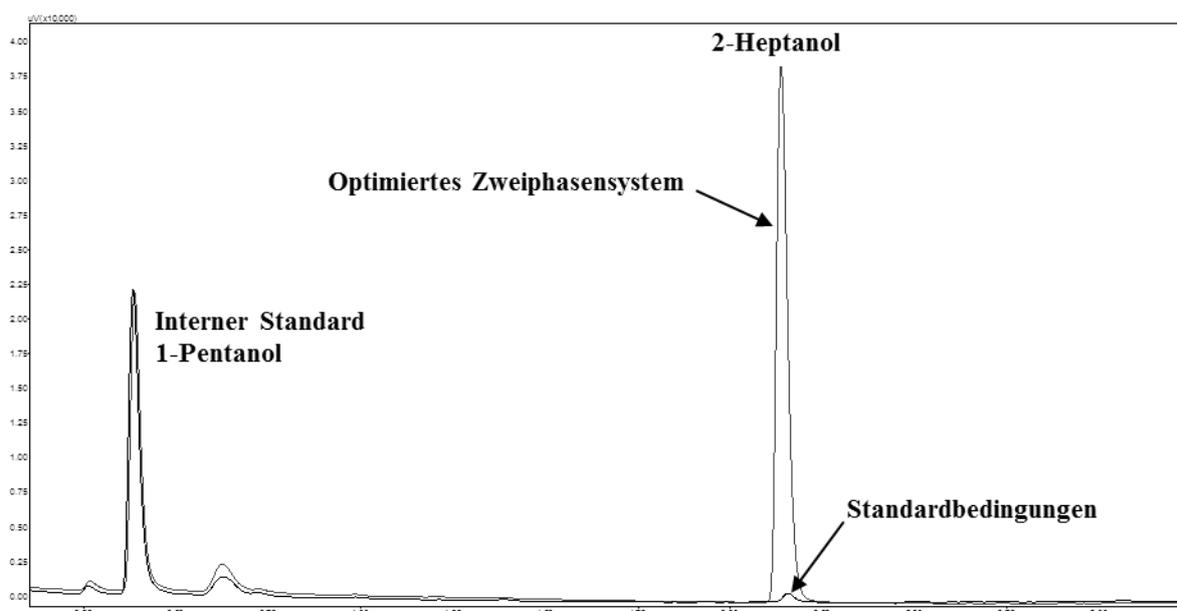


Abbildung A 25: 1-Hepten Hydratisierung durch die *Em*-OAH A248L unter Standardbedingungen und im optimierten Zweiphasensystem

Die Biotransformationen wurden unter „Standardbedingungen“ (50 mg/ml Biofeuchtmasse, 100 mM Glucose, 0,3 mM FAD, 0,5 mM 1-Hepten, 0,5 mM Heptansäure, 1 % finale DMSO-Konzentration) und im optimierten Zweiphasensystem (100 mg/ml Biofeuchtmasse, 200 mM Glucose, 0,6 mM FAD, 100 μ l BEHP, 300 mM 1-Hepten, 5 mM Heptansäure) durchgeführt. Nach viertägiger Inkubation bei 25 °C und 180 Upm wurde die Produktbildung mittels GC-FID analysiert. Dargestellt ist ein Ausschnitt der übereinandergelegten GC-Chromatogramme im Bereich des internen Standards und des 2-Heptanol Produkt-Signals.

1-Hepten diente als Modellsubstrat für die Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Hydratisierung kurzkettiger Alkene ohne Anwendung eines Zweiphasensystems. Verschiedenste Parameter (u. a. Substrat-/DMSO-Konzentration und Assay-Volumen) zeigten einen deutlichen Einfluss auf die enzymatische Aktivität. Um die Resultate zu bestätigen und synergistische Effekte zu überprüfen, wurde die Hydratisierung mithilfe einer statistischen Versuchsplanung unter Verwendung von MODDE analysiert. Die Parameter wurden wie unten dargestellt definiert (Tabelle A 1) und die Zusammensetzung der Biotransformationen durch MODDE vorgegeben (Full Fac (2 levels), interaction model). Die Auswertung erfolgte anhand der GC-Daten mithilfe der MODDE-Software (Abbildung A 26).

Tabelle A 1: Parameter zur Anwendung einer statistischen Versuchsplanung mithilfe von MODDE

Parameter	Grenze A	Grenze B
DMSO	1 % = 0,5 mM Substrat & Dummy	8 % = 4 mM Substrat & Dummy
Waschschritt	ja	nein
Schütteln	ja	nein
Volumen der Gasphase	0 ml	1,5 ml

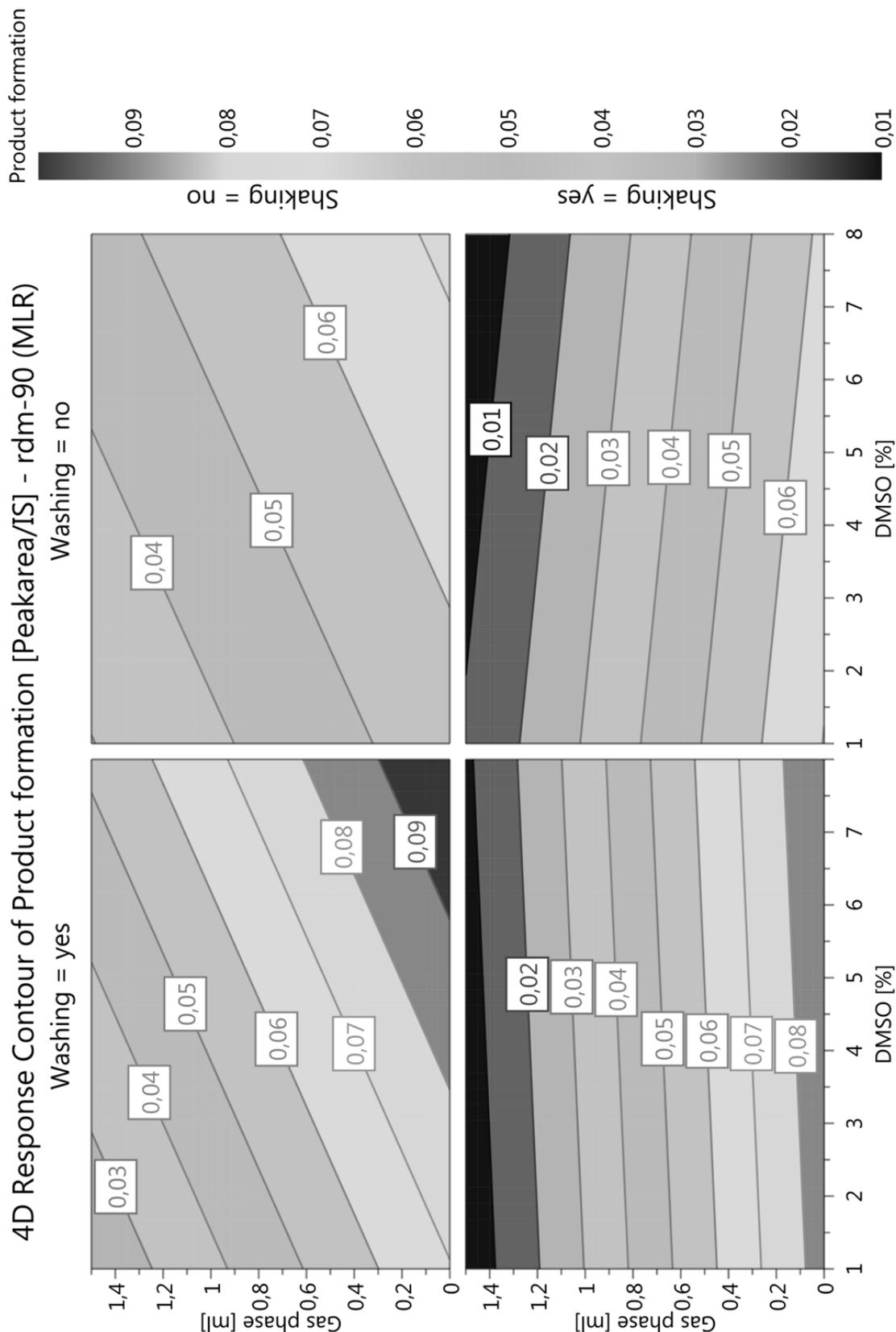


Abbildung A 26: 4D-Plot der MODDE-basierten Analyse zur 1-Hepten-Hydratisierung

Die Biotransformationen erfolgten im 500 µl Maßstab in 2 ml Glas-Vials mit 100 mM Glucose, 0,3 mM FAD und 50 mg/ml *Em-OAH* Variante A248L. Heptansäure (0,5-4 mM) diente als Fettsäure-Dummy-Substrat und die Reaktionen wurden durch Substratzugabe (0,5-4 mM 1-Hepten) gestartet. Nach dreitägiger Inkubation bei 25 °C (und 180 Upm) wurde die Produktbildung (Produktfläche geteilt durch interner Standard) mittels GC-FID analysiert und mithilfe der MODDE-Software ausgewertet.

Für eine weitere Optimierung der Reaktionsbedingungen wurden verschiedene Biomasse-, Glucose- und FAD-Konzentrationen bei direkter Zugabe von 10-30 mM 1-Hepten und Heptansäure analysiert (Abbildung A 27). Die Produktbildung eines Kontrollansatzes mit 50 mg/ml Biofeuchtmasse, 100 mM Glucose, 0,3 mM FAD und 10 mM Substrat- und Dummy-Substrat-Konzentration wurde auf 100 % gesetzt. Die höchste relative Produktbildung wurde mit 100 mg/ml Biofeuchtmasse, 200 mM Glucose, 0,6 mM FAD und 10 mM 1-Hepten und Heptansäure erhalten.

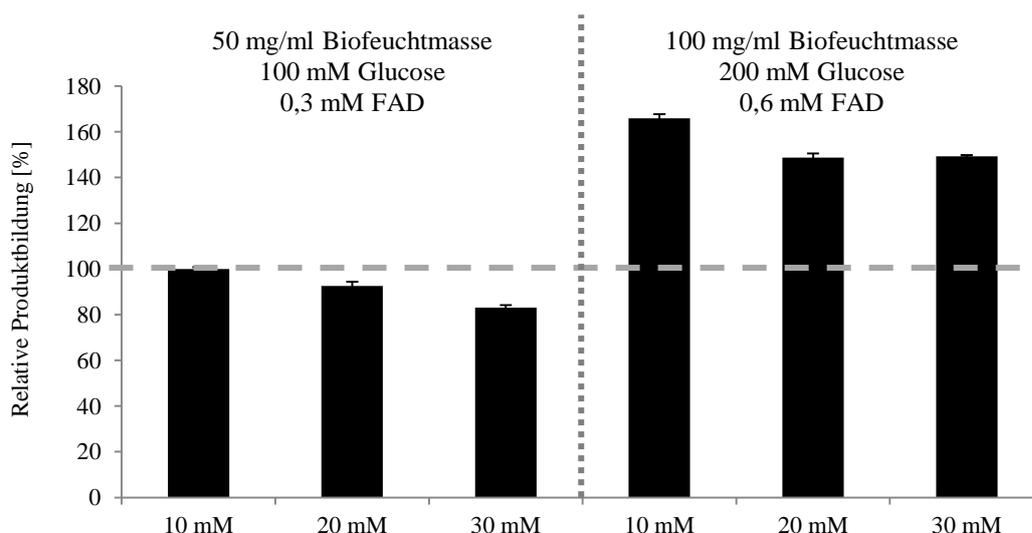


Abbildung A 27: Optimierung der Biomasse-, Glucose-, FAD- und Substrat/Dummy-Substrat-Konzentration zur Hydratisierung von 1-Hepten

Die Biotransformationen erfolgten im 2 ml Maßstab in 2 ml Glas-Vials mit 100/200 mM Glucose, 0,3/0,6 mM FAD und 50/100 mg/ml *Em-OAH* Variante A248L. Heptansäure (10-30 mM) diente als Fettsäure-Dummy-Substrat und die Reaktionen wurden durch Substratzugabe (10-30 mM 1-Hepten) gestartet. Substrat und Dummy-Substrat wurden in äquimolarer Konzentration ohne DMSO-Cosolvens eingesetzt. Nach zweitägiger Inkubation bei 25 °C und 180 Upm wurde die Produktbildung (Triplikate) mittels GC-FID analysiert. Das Ergebnis eines Kontrollansatzes unter Standardbedingungen (50 mg/ml Biofeuchtmasse, 100 mM Glucose, 0,3 mM FAD) mit 10 mM Substrat und Dummy-Substrat wurde auf 100 % gesetzt.

Die Hydratisierung des Alkens 1-Hepten wurde durch die Optimierung der Reaktionsbedingungen auch ohne Verwendung einer organischen Phase deutlich verbessert. Die höchste relative Produktbildung wurde mit 2 ml Reaktionsvolumen, 100 mg/ml Biofeuchtmasse, 200 mM Glucose, 0,6 mM FAD, 30 mM 1-Hepten und 10 mM Heptansäure ohne das Cosolvens DMSO erhalten. Im Vergleich zum Kontrollansatz war die Bildung des Produktes 2-Heptanol unter Anwendung der Optimierungsschritte 33-fach erhöht. Abbildung A 28 präsentiert den direkten Vergleich der Produktbildung unter „Standardbedingungen“ (500 µl Reaktionsvolumen, 50 mg/ml Biofeuchtmasse, 100 mM Glucose, 0,3 mM FAD, 0,5 mM 1-Hepten, 0,5 mM Heptansäure, 1 % finale DMSO-Konzentration) und nach

Optimierung der Reaktionsbedingungen. Dargestellt ist ein Ausschnitt der übereinander gelegten GC-Chromatogramme.

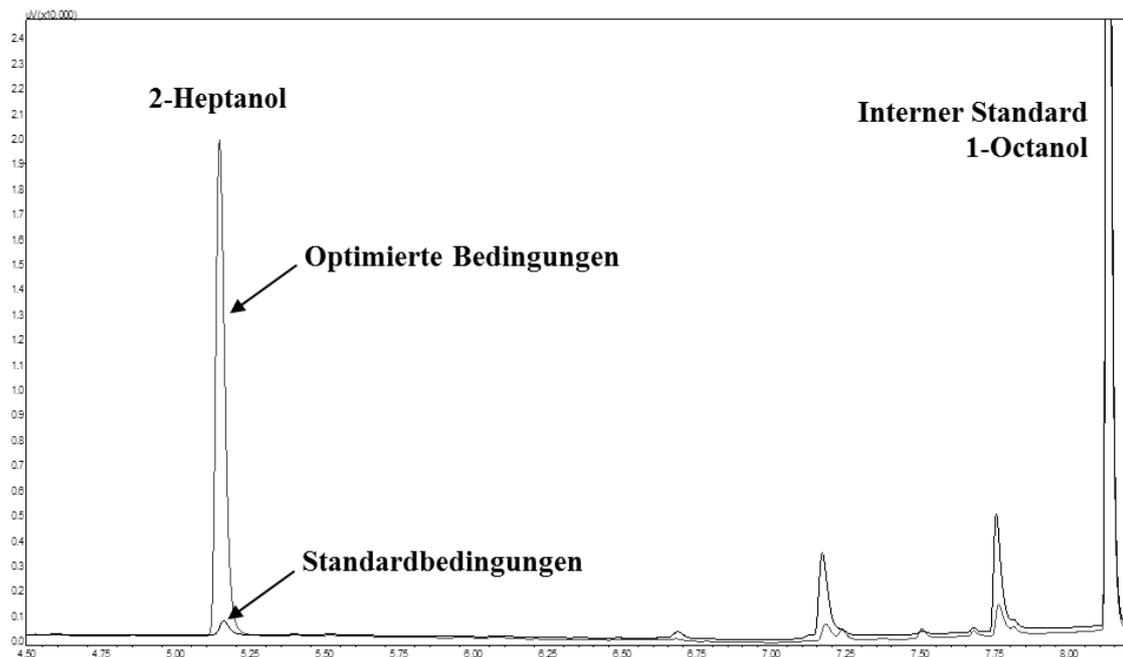


Abbildung A 28: 1-Hepten Hydratisierung durch die *Em*-OAH A248L unter Standardbedingungen und nach Optimierung der Reaktionsbedingungen

Die Biotransformationen wurden unter „Standardbedingungen“ (500 μ l Reaktionsvolumen, 50 mg/ml Biofeuchtmasse, 100 mM Glucose, 0,3 mM FAD, 0,5 mM Substrat & Dummy-Substrat, 1% finale DMSO-Konzentration) und optimierten Bedingungen (2 ml Reaktionsvolumen, 100 mg/ml Biofeuchtmasse, 200 mM Glucose, 0,6 mM FAD, 30 mM 1-Hepten, 10 mM Heptansäure, kein DMSO) durchgeführt. Nach zweitägiger Inkubation bei 25 °C und 180 Upm wurde die Produktbildung mittels GC-FID analysiert. Dargestellt ist ein Ausschnitt der übereinandergelegten GC-Chromatogramme im Bereich des internen Standards und des 2-Heptanol Produkt-Signals.

1-Hepten, 1-Hexen und 1-Penten wurden mithilfe der generierten *Em*-OAH Mutanten erfolgreich zum jeweiligen sekundären Alkohol hydratisiert. Für alle Mutanten wurde eine ausgezeichnete Stereoselektivität mit einem Enantiomerenüberschuss größer 99 % für das *S*-Enantiomer ermittelt. Abbildung A 29 präsentiert die Ergebnisse der chiralen GC-Analyse für die *Em*-OAH A248L mit 1-Hepten und die *Em*-OAH A248W mit 1-Hexen bzw. 1-Penten.

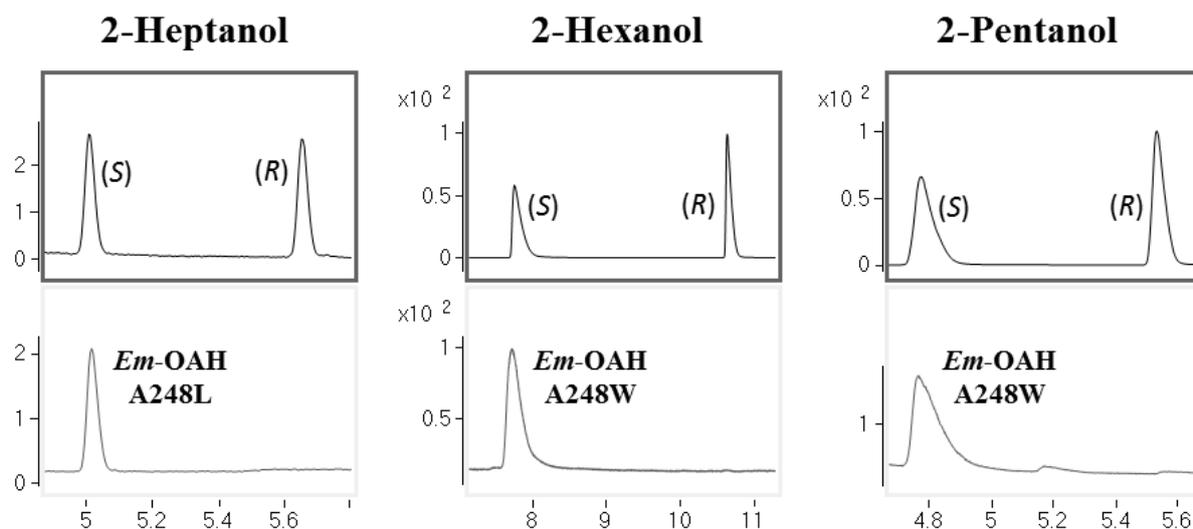


Abbildung A 29: Chirale GC-MS-Analyse zur Stereoselektivität der 1-Hepten, 1-Hexen und 1-Penten Hydratisierung
Die Biotransformationen wurden in 2 ml Glas-Vials im optimierten BEHP-Zweiphasensystem (100 mg/ml Biofeuchtmasse, 200 mM Glucose, 0,6 mM FAD, 100 μ l BEHP, 300 mM Substrat, 5 mM Heptansäure) durchgeführt. Nach sieben-tägiger Inkubation bei 25 °C und 180 Upm erfolgte die Analyse der Stereoselektivität mittels chiraler GC-MS. Die Messung der 1-Hepten-Biotransformationen wurde im Scan-Modus vorgenommen, die 1-Hexen- und 1-Penten-Assays wurden im SIM-Modus (84,1 m/z bzw. 87,1 m/z) analysiert. Entsprechende Standards (oben) dienen zur Identifizierung der verschiedenen Produkte (unten).

Die Hydratisierung der Alkene 1-Hepten, 1-Hexen und 1-Penten mithilfe der generierten *Em*-OAH Mutanten war erfolgreich. Um die Zeitabhängigkeit der Hydratisierungsreaktion zu analysieren, wurde die Produktbildung mit der besten Variante für jedes Substrat über sieben Tage quantifiziert (Abbildung A 30).

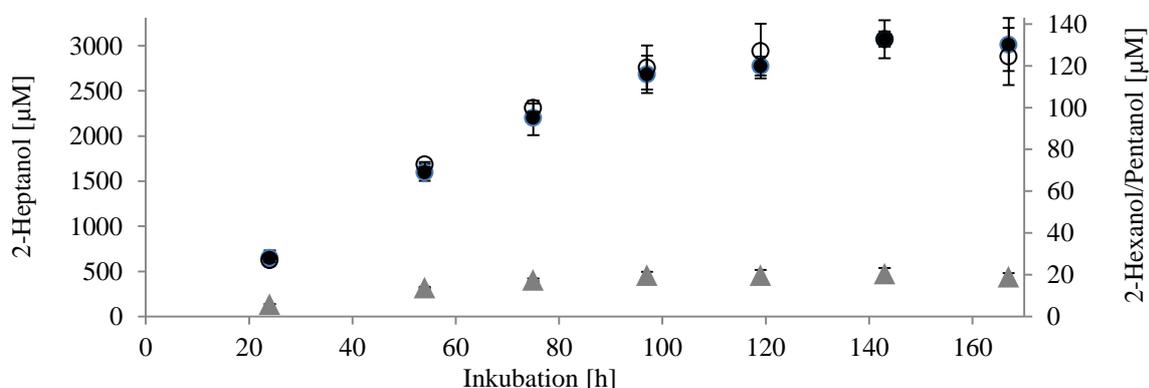


Abbildung A 30: Zeitabhängige Hydratisierung der Alkene 1-Hepten, 1-Hexen und 1-Penten mit den besten *Em*-OAH Varianten

Die Biotransformationen wurden in 2 ml Glas-Vials im optimierten BEHP-Zweiphasensystem (100 mg/ml Biofeuchtmasse, 200 mM Glucose, 0,6 mM FAD, 100 μ l BEHP, 300 mM 1-Hepten, 5 mM Heptansäure) durchgeführt. Analysiert wurde die Hydrataseaktivität der *Em*-OAH Variante A248L mit 1-Hepten und der Variante A248W mit 1-Hexen bzw. 1-Penten. Die Ansätze wurden bei 25 °C und 180 Upm inkubiert und in regelmäßigen Abständen wurde über eine GC-FID die Zunahme des sekundären Alkohols quantifiziert.

2-Heptanol (●); 2-Hexanol (○); 2-Pentanol (▲)

Die Verifizierung der *cis*-2-Hexen Hydratisierung mithilfe der *Em*-OAH A248W erfolgte mit Heptansäure, Hexansäure bzw. Pentansäure als Dummy-Substrat (jeweils 5 mM). Darüber hinaus wurden drei verschiedene Substratkonzentrationen eingesetzt (0,3-1 M *cis*-2-Hexen).

Die Analyse der Produktbildung erfolgte nach viertägiger Inkubation mittels GC-FID. Mit dem Pentansäure-Dummy-Substrat wurde insbesondere bei erhöhter Substratkonzentration eine deutliche Zunahme der Peakstärke beobachtet (Abbildung A 31).

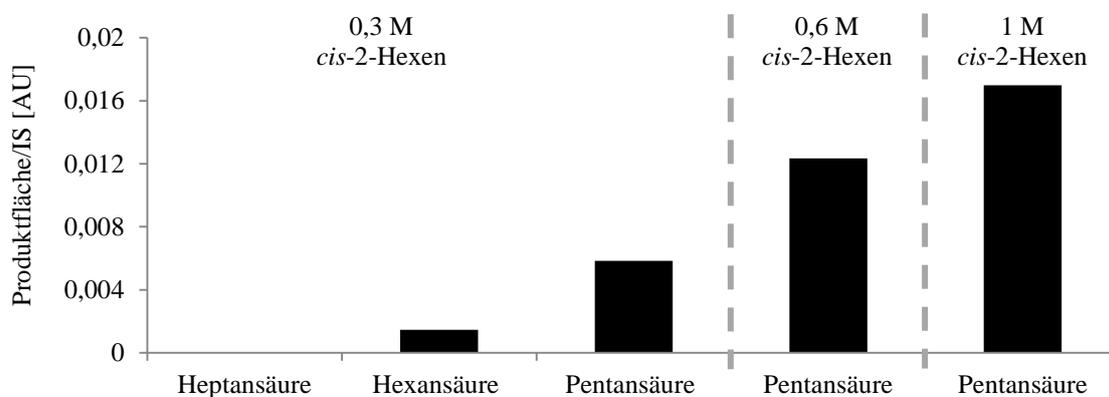


Abbildung A 31: *Cis*-2-Hexen Hydratisierung durch die *Em*-OAH A248W

Die Biotransformationen wurden in 2 ml Glas-Vials im optimierten BEHP-Zweiphasensystem (100 mg/ml Biofeuchtmasse, 200 mM Glucose, 0,6 mM FAD, 100 µl BEHP, X mM *cis*-2-Hexen, 5 mM Dummy-Substrat) durchgeführt. Heptansäure, Hexansäure bzw. Pentansäure dienten als Fettsäure-Dummy-Substrat und die Reaktionen wurden durch Substratzugabe gestartet. Nach viertägiger Inkubation bei 25 °C und 180 Upm wurde die Produktbildung (Duplikate) mittels GC-FID quantifiziert.

1-Octen wurde als Modells substrat für die Alken-Hydratisierung durch die *Em*-OAH A248L-Variante im semi-präparativen Maßstab ausgewählt. Da für die Analyse der isolierten Ausbeute, der Stereoselektivität, des NMR-Spektrums und der exakten Masse mindestens 20 mg Produkt benötigt wurden, wurde in einem Vorversuch ein Kompromiss zwischen einer hohen Umsatzrate und einer ausreichenden Produktkonzentration gesucht. Tabelle A 2 präsentiert die Ergebnisse zur 1-Octen-Hydratisierung der *Em*-OAH A248L mit Heptansäure-Dummy-Substrat.

Tabelle A 2: Vorversuch zur 1-Octen-Hydratisierung im semi-präparativen Maßstab

1-Octen-Konzentrationen von 0,5 mM bis 2,5 mM bei äquimolarer Konzentration des Heptansäure-Dummy-Substrates (1-5 % (v/v) DMSO) wurden analysiert. Angewandt wurden die optimierten Reaktionsbedingungen ohne Verwendung eines organischen Lösemittels (2 ml Reaktionsvolumen, 100 mg/ml Biofeuchtmasse (*Em*-OAH A248L), 200 mM Glucose, 0,6 mM FAD). Nach viertägiger Inkubation bei 25 °C und 180 Upm wurde die Produktbildung mittels GC-FID quantifiziert (2.12.4).

1-Octen [mM]	Heptansäure [mM]	DMSO (v/v)	2-Octanol [mM]	Umsatz [%]
0,5	0,5	1 %	0,43	86
1	1	2 %	0,78	78
1,5	1,5	3 %	0,71	48
2,0	2,0	4 %	0,74	37
2,5	2,5	5 %	0,77	31

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Vollhardt, P. K. C. & Schore, N. E. *Organische Chemie, 4. Auflage*. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005).
2. Max Appl 'Ammonia'. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (2005).
3. Faber, K. & Franssen, M. C. R. Prospects for the increased application of biocatalysts in organic transformations. *Trends Biotechnol.* **11**, 461–470 (1993).
4. Öhrner, N., Orrenius, C., Mattson, A., Norin, T. & Hult, K. Kinetic resolutions of amine and thiol analogues of secondary alcohols catalyzed by the *Candida antarctica* lipase B. *Enzyme Microb. Technol.* **19**, 328–331 (1996).
5. Panke, S. & Wubbolts, M. Advances in biocatalytic synthesis of pharmaceutical intermediates. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9**, 188–194 (2005).
6. Schneider, S., Wubbolts, M. G., Sanglard, D. & Witholt, B. Production of chiral hydroxy long chain fatty acids by whole cell biocatalysis of pentadecanoic acid with an *E. coli* recombinant containing cytochrome P450BM-3 monooxygenase. *Tetrahedron: Asymmetry* **9**, 2832–2844 (1998).
7. Otte, K. B. & Hauer, B. Enzyme engineering in the context of novel pathways and products. *Curr. Opin. Biotechnol.* **35**, 16–22 (2015).
8. Pagot, Y., Endrizzi, A., Nicaud, J. M. & Belin, J. M. Utilization of an auxotrophic strain of the yeast *Yarrowia lipolytica* to improve gamma-decalactone production yields. *Lett. Appl. Microbiol.* **25**, 113–116 (1997).
9. Dietrich, M., Do, T. A., Schmid, R. D., Pleiss, J. & Urlacher, V. B. Altering the regioselectivity of the subterminal fatty acid hydroxylase P450 BM-3 towards γ - and δ -positions. *J. Biotechnol.* **139**, 115–117 (2009).
10. Waché, Y. *et al.* Role of β -Oxidation Enzymes in γ -Decalactone Production by the Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5700–5704 (2001).
11. Hou, C. T. Biotechnology for fats and oils: new oxygenated fatty acids. *N. Biotechnol.* **26**, 2–10 (2009).
12. Chen, Y. Y., Liang, N. Y., Curtis, J. M. & Gänzle, M. G. Characterization of Linoleate 10-Hydratase of *Lactobacillus plantarum* and Novel Antifungal Metabolites. *Front. Microbiol.* **7**, 1–11 (2016).
13. Black, B. A., Zannini, E., Curtis, J. M. & Gänzle, M. G. Antifungal hydroxy fatty acids produced during sourdough fermentation: Microbial and enzymatic pathways, and antifungal activity in bread. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 1866–1873 (2013).

14. Prost, I. *et al.* Evaluation of the Antimicrobial Activities of Plant Oxylipins Supports Their Involvement in Defense against Pathogens. *Plant Physiol.* **139**, 1902–1913 (2005).
15. Beller, M., Seayad, J., Tillack, A. & Jiao, H. Catalytic Markovnikov and anti-Markovnikov functionalization of alkenes and alkynes: Recent developments and trends. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **43**, 3368–3398 (2004).
16. Hintermann, L. Recent Developments in Metal-Catalyzed Additions of Oxygen Nucleophiles to Alkenes and Alkynes. *Top. Organomet. Chem.* **31**, 123–155 (2010).
17. Hayashi, T. Chiral monodentate phosphine ligand MOP for transition-metal-catalyzed asymmetric reactions. *Acc. Chem. Res.* **33**, 354–362 (2000).
18. Tietze, L. F., Ila, H. & Bell, H. P. Enantioselective palladium-catalyzed transformations. *Chem. Rev.* **104**, 3453–3516 (2004).
19. Demay, Â., Volant, F. & Knochel, P. Efficient Rhodium-Catalyzed Asymmetric Hydroboration of Styrene Derivatives. **8**, 1235–1238 (2001).
20. Wang, S. *et al.* Asymmetric hydration of ortho- or para-substituted styrenes catalyzed by biopolymer-metal complex wool-Pd. *React. Funct. Polym.* **68**, 424–430 (2008).
21. Xue, L. *et al.* Asymmetric hydration of alkenes catalyzed by wool-palladium complex. *Polym. Adv. Technol.* **15**, 346–349 (2004).
22. Wang, X., Sui, D., Huang, M. & Jiang, Y. Highly effective hydration of olefins using a wool-palladium complex as a catalyst. *Polym. Adv. Technol.* **17**, 163–167 (2006).
23. Davey, P. N. *et al.* Selective hydration of dihydromyrcene in ionic liquids. *Green Chem.* **12**, 628 (2010).
24. Trost, B. M. The Atom Economy - A Search for Synthetic Efficiency. *Science* **254**, 1471 (1991).
25. Burns, N. Z., Baran, P. S. & Hoffmann, R. W. Redox economy in organic synthesis. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **48**, 2854–2867 (2009).
26. Jin, J. & Hanefeld, U. The selective addition of water to C=C bonds; enzymes are the best chemists. *Chem. Commun.* **47**, 2502–2510 (2011).
27. Sato, H., Hummel, W. & Gröger, H. Cooperative Catalysis of Noncompatible Catalysts through Compartmentalization: Wacker Oxidation and Enzymatic Reduction in a One-Pot Process in Aqueous Media. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **54**, 4488–4492 (2015).
28. Breuer, M. *et al.* Industrial methods for the production of optically active intermediates. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **43**, 788–824 (2004).
29. Boersma, A. J. *et al.* Catalytic enantioselective syn hydration of enones in water using

- a DNA-based catalyst. *Nat. Chem.* **2**, 991–995 (2010).
30. Wuensch, C. *et al.* Asymmetric enzymatic hydration of hydroxystyrene derivatives. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **52**, 2293–2297 (2013).
31. Coombs, J. R. & Morken, J. P. Catalytic Enantioselective Functionalization of Unactivated Terminal Alkenes. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **55**, 2636–2649 (2016).
32. Hiseni, A., Arends, I. W. C. E. & Otten, L. G. New Cofactor-Independent Hydration Biocatalysts: Structural, Biochemical, and Biocatalytic Characteristics of Carotenoid and Oleate Hydratases. *ChemCatChem* **7**, 29–37 (2015).
33. Jones, G. The Markovnikov Rule. *J. Chem. Educ.* **38**, 297–300 (1961).
34. Demming, R. M., Otte, K. B., Nestl, B. M. & Hauer, B. Optimized Reaction Conditions Enable the Hydration of Non-natural Substrates by the Oleate Hydratase from *Elizabethkingia meningoseptica*. *ChemCatChem* **9**, 758–766 (2017).
35. Bornscheuer, U. T. *et al.* Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* **485**, 185–94 (2012).
36. Nestl, B. M., Hammer, S. C., Nebel, B. A. & Hauer, B. New generation of biocatalysts for organic synthesis. *Angew. Chemie Int. Ed.* **53**, 3070–95 (2014).
37. Nestl, B. M., Nebel, B. a. & Hauer, B. Recent progress in industrial biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **15**, 187–193 (2011).
38. Bornscheuer, U. T. & Pohl, M. Improved biocatalysis by directed evolution and rational protein design. **5**, 137–143 (2001).
39. Bornscheuer, U. T. The fourth wave of biocatalysis is approaching. *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.* **376**, 20170063 (2018).
40. Kreß, N. & Hauer, B. Enzymdiversität als Basis für die Entwicklung artifizieller Biosynthesen. *BioSpektrum* **23**, 836–838 (2017).
41. Hammer, S. C., Nestl, B. M. & Hauer, B. Biokatalyse: Schlummerndes Synthesepotenzial in Enzymen: Wie können wir es wecken? *BioSpektrum* **19**, 574–576 (2013).
42. Yamada, H. & Kobayashi, M. Nitrile Hydratase and Its Application to Industrial Production of Acrylamide. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**, 1391–1400 (1996).
43. Liese, A., Seelbach, K., Buchholz, A. & Haberland, J. in *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim, 447–503 (2006).
44. H. J. Daneel, M. Busse, R. F. Fumarate hydratase from *Corynebacterium glutamicum*-process related optimization of enzyme productivity for biotechnical L-malic acid synthesis. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent* **61**, 1333–1340 (1996).

45. A. Tanaka, T. Tosa, T. K. *Industrial Application of Immobilized Biocatalysts*. (1993).
46. Liese, A., K. Seelbach & Wandrey, C. *Industrial Biotransformations; Second, Completely Revised and Extended Edition*. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006).
47. Yang, J., Nie, Q., Liu, H., Xian, M. & Liu, H. A novel MVA-mediated pathway for isoprene production in engineered E. coli. *BMC Biotechnol.* **16**, 5 (2016).
48. Brodkorb, D., Gottschall, M., Marmulla, R., Lüddeke, F. & Harder, J. Linalool dehydratase-isomerase, a bifunctional enzyme in the anaerobic degradation of monoterpenes. *J. Biol. Chem.* **285**, 30436–30442 (2010).
49. Lüddeke, F. & Harder, J. Enantiospecific (S)-(+)-Linalool Formation from β -Myrcene by Linalool Dehydratase-isomerase. *Zeitschrift für Naturforsch.* **66c**, 409–412 (2011).
50. Nestl, B. M. *et al.* Structural and functional insights into asymmetric enzymatic dehydration of alkenols. *Nat. Chem. Biol.* **13**, 275–281 (2017).
51. Weidenweber, S., Marmulla, R., Ermler, U. & Harder, J. X-ray structure of linalool dehydratase/isomerase from *Castellaniella defragrans* reveals enzymatic alkene synthesis. *FEBS Lett.* **590**, 1375–1383 (2016).
52. Demming, R. M., Fischer, M.-P., Schmid, J. & Hauer, B. (De)hydratases — recent developments and future perspectives. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **43**, 43–50 (2018).
53. Steiger, S., Mazet, A. & Sandmann, G. Heterologous expression, purification, and enzymatic characterization of the acyclic carotenoid 1,2-hydratase from *Rubrivivax gelatinosus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **414**, 51–58 (2003).
54. Maresca, J. A., Graham, J. E. & Bryant, D. A. The biochemical basis for structural diversity in the carotenoids of chlorophototrophic bacteria. *Photosynth. Res.* **97**, 121–140 (2008).
55. Sun, Z. *et al.* A novel carotenoid 1,2-hydratase (CruF) from two species of the non-photosynthetic bacterium *Deinococcus*. *Microbiology* **155**, 2775–2783 (2009).
56. Hiseni, A., Arends, I. W. C. E. & Otten, L. G. Biochemical characterization of the carotenoid 1,2-hydratases (CrtC) from *Rubrivivax gelatinosus* and *Thiocapsa roseopersicina*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91**, 1029–1036 (2011).
57. Hiseni, A., Otten, L. G. & Arends, I. W. C. E. Identification of catalytically important residues of the carotenoid 1,2-hydratases from *Rubrivivax gelatinosus* and *Thiocapsa roseopersicina*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 1275–1284 (2016).
58. Hammer, S. C., Syrén, P. O., Seitz, M., Nestl, B. M. & Hauer, B. Squalene hopene cyclases: Highly promiscuous and evolvable catalysts for stereoselective CC and CX

- bond formation. *Current Opinion in Chemical Biology* **17**, 293–300 (2013).
59. Wallen, L. L., Benedict, R. G. & Jackson, R. W. The microbiological production of 10-hydroxystearic acid from oleic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* **99**, 249–253 (1962).
60. Bevers, L. E., Pinkse, M. W. H., Verhaert, P. D. E. M. & Hagen, W. R. Oleate hydratase catalyzes the hydration of a nonactivated carbon-carbon bond. *J. Bacteriol.* **191**, 5010–5012 (2009).
61. Yang, B. *et al.* Myosin-cross-reactive antigens from four different lactic acid bacteria are fatty acid hydratases. *Biotechnol. Lett.* **35**, 75–81 (2013).
62. Rosberg-Cody, E. *et al.* Myosin-cross-reactive antigen (MCRA) protein from *Bifidobacterium breve* is a FAD-dependent fatty acid hydratase which has a function in stress protection. *BMC Biochem.* **12**, 9 (2011).
63. Schmid, J. *et al.* Biocatalytic study of novel oleate hydratases. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **133**, S243–S249 (2016).
64. Fibinger, M. P. C., Freiherr von Saß, J. G., Herrfurth, C., Feussner, I. & Bornscheuer, U. T. A directed mutational approach demonstrates that a putative linoleate isomerase from *Lactobacillus acidophilus* does not hydrate or isomerise linoleic acid. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **118**, 841–848 (2016).
65. Kim, K.-R. *et al.* Unveiling of novel regio-selective fatty acid double bond hydratases from *Lactobacillus acidophilus* involved in the selective oxyfunctionalization of mono- and di-hydroxy fatty acids. *Biotechnol. Bioeng.* **112**, 2206–2213 (2015).
66. Hirata, A. *et al.* A novel unsaturated fatty acid hydratase toward C16 to C22 fatty acids from *Lactobacillus acidophilus*. *J. Lipid Res.* **56**, 1340–50 (2015).
67. Park, J.-Y., Lee, S.-H., Kim, K.-R., Park, J.-B. & Oh, D.-K. Production of 13S-hydroxy-9(Z)-octadecenoic acid from linoleic acid by whole recombinant cells expressing linoleate 13-hydratase from *Lactobacillus acidophilus*. *J. Biotechnol.* **208**, 1–10 (2015).
68. Oh, H. J. *et al.* Biotransformation of linoleic acid into hydroxy fatty acids and carboxylic acids using a linoleate double bond hydratase as key enzyme. *Adv. Synth. Catal.* **357**, 408–416 (2015).
69. Takeuchi, M. *et al.* Characterization of the linoleic acid $\Delta 9$ hydratase catalyzing the first step of polyunsaturated fatty acid saturation metabolism in *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a. *J. Biosci. Bioeng.* **119**, 636–641 (2015).
70. Ortega-Anaya, J. & Hernández-Santoyo, A. Functional characterization of a fatty acid double-bond hydratase from *Lactobacillus plantarum* and its interaction with

- biosynthetic membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1848**, 3166–3174 (2015).
71. Kim, B. N., Joo, Y. C., Kim, Y. S., Kim, K. R. & Oh, D. K. Production of 10-hydroxystearic acid from oleic acid and olive oil hydrolyzate by an oleate hydratase from *Lysinibacillus fusiformis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **95**, 929–937 (2012).
 72. Joo, Y. C. *et al.* Biochemical characterization and FAD-binding analysis of oleate hydratase from *Macrococcus caseolyticus*. *Biochimie* **94**, 907–915 (2012).
 73. Lorenzen, J. *et al.* Rhodococcus erythropolis Oleate Hydratase: a New Member in the Oleate Hydratase Family Tree - Biochemical and Structural Studies. *ChemCatChem* 1–9 (2017). doi:10.1002/cctc.201701350
 74. Joo, Y. C. *et al.* Production of 10-hydroxystearic acid from oleic acid by whole cells of recombinant *Escherichia coli* containing oleate hydratase from *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Biotechnol.* **158**, 17–23 (2012).
 75. Kang, W.-R., Seo, M.-J., Shin, K.-C., Park, J.-B. & Oh, D.-K. Gene cloning of an efficiency oleate hydratase from *Stenotrophomonas nitritireducens* for polyunsaturated fatty acids and its application in the conversion of plant oils to 10-hydroxy fatty acids. *Biotechnol. Bioeng.* **9999**, 1–9 (2016).
 76. Volkov, A. *et al.* Myosin cross-reactive antigen of *Streptococcus pyogenes* M49 encodes a fatty acid double bond hydratase that plays a role in oleic acid detoxification and bacterial virulence. *J. Biol. Chem.* **285**, 10353–10361 (2010).
 77. Volkov, A. *et al.* Crystal structure analysis of a fatty acid double-bond hydratase from *Lactobacillus acidophilus*. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **69**, 648–657 (2013).
 78. Engleder, M. *et al.* Structure-Based Mechanism of Oleate Hydratase from *Elizabethkingia meningoseptica*. *ChemBioChem* **16**, 1730–1734 (2015).
 79. Greenway, D. L. & Dyke, K. G. Mechanism of the inhibitory action of linoleic acid on the growth of *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* **115**, 233–245 (1979).
 80. Raychowdhury, M. K., Goswami, R. & Chakrabarti, P. Effect of unsaturated fatty acids in growth inhibition of some penicillin-resistant and sensitive bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **59**, 183–188 (1985).
 81. Maia, M. R. G., Chaudhary, L. C., Figueres, L. & Wallace, R. J. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie Van Leeuwenhoek* **91**, 303–314 (2007).
 82. Zheng, C. J. *et al.* Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of

- unsaturated fatty acids. *FEBS Lett.* **579**, 5157–5162 (2005).
83. Kishino, S. *et al.* Novel multi-component enzyme machinery in lactic acid bacteria catalyzing C=C double bond migration useful for conjugated fatty acid synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **416**, 188–193 (2011).
84. Kishino, S., Ogawa, J., Yokozeki, K. & Shimizu, S. Linoleic Acid Isomerase in *Lactobacillus plantarum* AKU1009a Proved to Be a Multi-Component Enzyme System Requiring Oxidoreduction Cofactors. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**, 318–322 (2011).
85. O’Flaherty, S. J. & Klaenhammer, T. R. Functional and phenotypic characterization of a protein from *Lactobacillus acidophilus* involved in cell morphology, stress tolerance and adherence to intestinal cells. *Microbiology* **156**, 3360–3367 (2010).
86. Marliere, P. Method for producing an alkene comprising the step of converting an alcohol by an enzymatic dehydration step. *EP Patent 0879946A2* **1**, 1–14 (2011).
87. Atsumi, S. *et al.* Bacteria engineered for conversion of ethylene to n-butanol. *US 2017/0137846* (2017).
88. Zhang, X., van Eldik, R., Koike, T. & Kimura, E. Kinetics and Mechanism of the Hydration of CO₂ and Dehydration of HCO₃⁻ Catalyzed by a Zn(II) Complex of 1,5,9-Triazacyclododecane as a Model for Carbonic Anhydrase. *Inorg. Chem.* **32**, 5749–5755 (1993).
89. Pflieger, B. F. *et al.* Structural and functional analysis of AsbF: origin of the stealth 3,4-dihydroxybenzoic acid subunit for petrobactin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 17133–17138 (2008).
90. Werst, M. M., Kennedy, M. C., Houseman, A. L. P., Beinert, H. & Hoffman, B. M. Characterization of the iron-sulfur [4Fe-4S]⁺ cluster at the active site of aconitase by iron-57, sulfur-33, and nitrogen-14 electron nuclear double resonance spectroscopy. *Biochemistry* **29**, 10533–10540 (1990).
91. van Vugt-Lussenburg, B. M. A., van der Weel, L., Hagen, W. R. & Hagedoorn, P. L. Identification of two [4Fe-4S]-cluster-containing hydro-lyases from *Pyrococcus furiosus*. *Microbiology* **155**, 3015–3020 (2009).
92. He, X., Thorson, J. S. & Liu, H. W. Probing the coenzyme and substrate binding events of CDP-D-glucose 4,6-dehydratase: mechanistic implications. *Biochemistry* **35**, 4721–4731 (1996).
93. Müh, U., Çinkaya, I., Albracht, S. P. J. & Buckel, W. 4-Hydroxybutyryl-CoA dehydratase from *Clostridium aminobutyricum*: Characterization of FAD and iron-

- sulfur clusters involved in an overall non- redox reaction. *Biochemistry* **35**, 11710–11718 (1996).
94. Müller, F. *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*. (CRC Press, 1991).
 95. Palfey, B. & Massey, V. *Flavin-dependent enzymes. in Comprehensive Biological Catalysis*. (Academic Press, 1998).
 96. Bornemann, S. Flavoenzymes that catalyse reactions with no net redox change. *Nat. Prod. Rep.* **19**, 761–772 (2002).
 97. Pawelek, P. D. *et al.* The structure of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site. *EMBO J.* **19**, 4204–4215 (2000).
 98. Hiseni, A., Medici, R., Arends, I. W. C. E. & Otten, L. G. Enzymatic hydration activity assessed by selective spectrophotometric detection of alcohols: A novel screening assay using oleate hydratase as a model enzyme. *Biotechnol. J.* **9**, 814–821 (2014).
 99. Todea, A. *et al.* Increase of stability of oleate hydratase by appropriate immobilization technique and conditions. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **119**, 40–47 (2015).
 100. Otte, K. B. *et al.* Synthesis of Sebacic Acid Using a De Novo Designed Retro-Aldolase as a Key Catalyst. *ChemCatChem* **9**, 1378–1382 (2017).
 101. Prinz, W. A., Åslund, F., Beckwith, J. & Holmgren, A. The Role of the Thioredoxin and Glutaredoxin Pathways in Reducing Protein Disulfide Bonds in the Escherichia coli Cytoplasm. *J. Biol. Chem.* **272**, 15661–15667 (1997).
 102. Stewart, E. J., Åslund, F. & Beckwith, J. Disulfide bond formation in the Escherichia coli cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. *EMBO J.* **17**, 5543–5550 (1998).
 103. Macheroux, P., Ghisla, S., Sanner, C., Rüterjans, H. & Müller, F. Reduced flavin: NMR investigation of N(5)-H exchange mechanism, estimation of ionisation constants and assessment of properties as biological catalyst. *BMC Biochem.* **6**, 1–11 (2005).
 104. Jeon, E. Y. *et al.* Bioprocess engineering to produce 10-hydroxystearic acid from oleic acid by recombinant Escherichia coli expressing the oleate hydratase gene of Stenotrophomonas maltophilia. *Process Biochem.* **47**, 941–947 (2012).
 105. Seo, M.-H., Kim, K.-R. & Oh, D.-K. Production of a novel compound, 10,12-dihydroxystearic acid from ricinoleic acid by an oleate hydratase from Lysinibacillus fusiformis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 8987–8995 (2013).
 106. Kim, B. N., Yeom, S. J. & Oh, D. K. Conversion of oleic acid to 10-hydroxystearic acid by whole cells of Stenotrophomonas nitritireducens. *Biotechnol. Lett.* **33**, 993–997

- (2011).
107. Takeuchi, M. *et al.* Efficient enzymatic production of hydroxy fatty acids by linoleic acid Δ^9 hydratase from *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a. *J. Appl. Microbiol.* **120**, 1282–1288 (2016).
 108. Oh, H. J., Shin, K. C. & Oh, D. K. Production of 10-hydroxy-12,15(Z,Z)-octadecadienoic acid from alpha-linolenic acid by permeabilized cells of recombinant *Escherichia coli* expressing the oleate hydratase gene of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Biotechnol. Lett.* **35**, 1487–1493 (2013).
 109. Kang, W.-R., Park, C.-S., Shin, K.-C., Kim, K.-R. & Oh, D.-K. 13-Hydroxy-9Z,15Z-Octadecadienoic Acid Production by Recombinant Cells Expressing *Lactobacillus acidophilus* 13-Hydratase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **93**, 649–655 (2016).
 110. Jung, S.-M., Seo, J.-H., Lee, J.-H., Park, J.-B. & Seo, J.-H. Fatty acid hydration activity of a recombinant *Escherichia coli*-based biocatalyst is improved through targeting the oleate hydratase into the periplasm. *Biotechnol. J.* **10**, 1887–1893 (2015).
 111. Song, J. W. *et al.* Multistep enzymatic synthesis of long-chain alpha, omega-Dicarboxylic and omega-hydroxycarboxylic acids from renewable fatty acids and plant oils. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **52**, 2534–2537 (2013).
 112. Otte, K. B. Enzymatischer Zugang zu mittelkettigen Dicarbonsäuren. *PhD Thesis, Unpubl. data* (2014). doi:10.18419/opus-1424
 113. Sim, D.-H., Shin, K.-C. & Oh, D.-K. 13-Hydroxy-9Z,11E-Octadecadienoic Acid Production by Recombinant Cells Expressing *Burkholderia thailandensis* 13-Lipoxygenase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **92**, 1259–1266 (2015).
 114. Kawakami, N., Shoji, O. & Watanabe, Y. Use of perfluorocarboxylic acids to trick cytochrome P450BM3 into initiating the hydroxylation of gaseous alkanes. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **50**, 5315–5318 (2011).
 115. Hoye, T. R., Jeffrey, C. S. & Shao, F. Mosher ester analysis for the determination of absolute configuration of stereogenic (chiral) carbinol carbons. *Nat. Protoc.* **2**, 2451–2458 (2007).
 116. Steiner, L. Biocatalytic Dehydration of Alcohols using Oleate Hydratases. (Universität Stuttgart, 2014).
 117. Schmid, J. Investigation of the substrate specificity of oleate hydratases. (Universität Stuttgart, 2014).
 118. Otte, K. B., Kittelberger, J., Kirtz, M., Nestl, B. M. & Hauer, B. Whole-cell one-pot biosynthesis of azelaic acid. *ChemCatChem* **6**, 1003–1009 (2014).

119. Kishimoto, N. *et al.* Two Distinct Pathways for the Formation of Hydroxy FA from Linoleic Acid by Lactic Acid Bacteria. *Lipids* **38**, 1269–1274 (2003).
120. <http://umetrics.com/product/modde-go>. MKS Umetrics AB, Sweden
121. Pezzini, J. *et al.* Antibody capture by mixed-mode chromatography: A comprehensive study from determination of optimal purification conditions to identification of contaminating host cell proteins. *J. Chromatogr. A* **1218**, 8197–8208 (2011).
122. Fricke, J. *et al.* Designing a fully automated multi-bioreactor plant for fast DoE optimization of pharmaceutical protein production. *Biotechnol. J.* **8**, 738–747 (2013).
123. Tye, H. & Whittaker, M. Use of a Design of Experiments approach for the optimisation of a microwave assisted Ugi reaction. *Org. Biomol. Chem.* **2**, 813–815 (2004).
124. Stütze, M., Moll, A., Handrick, R. & Schindowski, K. Optimized fermentation conditions for improved antibody yield in hybridoma cells. *BMC Proc.* **7**, 74 (2013).
125. Hunold, A. Active-site investigation of the oleate hydratase OAH1 from *Elizabethkingia meningoseptica*. (Universität Stuttgart, 2016).
126. Kleehammer, S. Engineering der Oleat Hydratase aus *Elizabethkingia meningoseptica*. (Universität Stuttgart, 2016).
127. Maugeri, Z. & Rother, D. Application of Imine Reductases (IREDs) in Micro-Aqueous Reaction Systems. *Adv. Synth. Catal.* **358**, 2745–2750 (2016).
128. Panke, S., Held, M., Wubbolts, M. G., Witholt, B. & Schmid, A. Pilot-scale production of (S)-styrene oxide from styrene by recombinant *Escherichia coli* synthesizing styrene monooxygenase. *Biotechnol. Bioeng.* **80**, 33–41 (2002).
129. Mahanty, B., Pakshirajan, K. & Venkata Dasu, V. Biodegradation of pyrene by *Mycobacterium frederiksbergense* in a two-phase partitioning bioreactor system. *Bioresour. Technol.* **99**, 2694–2698 (2008).
130. Daugulis, A. J. Two-phase partitioning bioreactors: A new technology platform for destroying xenobiotics. *Trends Biotechnol.* **19**, 457–462 (2001).
131. Osborne, S. J., Leaver, J., Turner, M. K. & Dunnill, P. Correlation of biocatalytic activity in an organic-aqueous two-liquid phase system with solvent concentration in the cell membrane. *Enzyme Microb. Technol.* **12**, 281–291 (1990).
132. Cruz, A., Fernandes, P., Cabral, J. M. S. & Pinheiro, H. M. Whole-cell bioconversion of β -sitosterol in aqueous – organic two-phase systems. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **11**, 579–585 (2001).
133. Hughes, K. T., Simons, R. W. & Nunn, W. D. Regulation of Fatty-Acid Degradation in *Escherichia-Coli* - Fadr Superrepressor Mutants Are Unable to Utilize Fatty-Acids as

- the Sole Carbon Source. *J. Bacteriol.* **170**, 1666–1671 (1988).
134. Nunn, W. D. & Simons, R. W. Transport of long-chain fatty acids by *Escherichia coli*: mapping and characterization of mutants in the *fadL* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **75**, 3377–3381 (1978).
135. Clark, D. Regulation of fatty acid degradation in *Escherichia coli*: analysis by operon fusion. *J. Bacteriol.* **148**, 521–526 (1981).
136. Kamp, F., Zakim, D., Zhang, F., Noy, N. & Hamilton, J. A. Fatty Acid Flip-Flop in Phospholipid Bilayers Is Extremely Fast. *ACS Biochem.* **34**, 11928–11937 (1995).
137. Kamp, F. & Hamilton, J. A. How fatty acids of different chain length enter and leave cells by free diffusion. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* **75**, 149–159 (2006).
138. Black, P. N. & DiRusso, C. C. Transmembrane Movement of Exogenous Long-Chain Fatty Acids: Proteins, Enzymes, and Vectorial Esterification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 454–472 (2003).
139. Vargo, D., Pokora, a., Wang, S. W. & Jorns, M. S. Formation of epoxide intermediates in the reaction of enzyme-bound 5-deazaflavin with peroxides. *J. Biol. Chem.* **256**, 6027–6033 (1981).
140. Cromartie, T. H. & Walsh, C. T. *Escherichia coli* glyoxalate carbonylase. Properties and reconstitution with 5-deazaFAD and 1,5-dihydrodeazaFADH₂. *J. Biol. Chem.* **251**, 329–333 (1976).
141. Duggleby, R. G. & Pang, S. S. Acetohydroxyacid Synthase. *J. Biochem. Mol. Biol.* **33**, 1–36 (2000).
142. Niehaus, W. G., Kisic, A., Torkelson, A., Bednarczyk, D. J. & Schroepfer, G. J. Stereospecific Hydration of the Δ^9 Double Bond of Oleic Acid. *J. Biol. Chem.* **245**, 3790–3797 (1970).
143. Wallen, L. L., Davis, E. N., Wu, Y. V. & Rohwedder, W. K. Stereospecific hydration of unsaturated fatty acids by bacteria. *Lipids* **6**, 745–750 (1971).
144. Kawakami, N., Shoji, O. & Watanabe, Y. Direct hydroxylation of primary carbons in small alkanes by wild-type cytochrome P450BM3 containing perfluorocarboxylic acids as decoy molecules. *Chem. Sci.* **4**, 2344 (2013).
145. Shoji, O., Kunimatsu, T., Kawakami, N. & Watanabe, Y. Highly Selective Hydroxylation of Benzene to Phenol by Wild-type Cytochrome P450BM3 Assisted by Decoy Molecules. *Angew. Chemie Int. Ed.* **52**, 6606–6610 (2013).
146. Shoji, O. & Watanabe, Y. Bringing out the potential of wild-type Cytochrome p450s using decoy molecules: Oxygenation of nonnative substrates by bacterial Cytochrome

- p450s. *Isr. J. Chem.* **55**, 32–39 (2015).
147. Zilly, F. E. *et al.* Tuning a P450 Enzyme for Methane Oxidation. *Angew. Chemie* **123**, 2772–2776 (2011).
148. Souzu, H. Studies on the damage to Escherichia coli cell membrane caused by different rates of freeze-thawing. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **603**, 13–26 (1980).
149. Calcott, P. H. & MacLeod, R. A. The survival of Escherichia coli from freeze-thaw damage: permeability barrier damage and viability. *Can. J. Microbiol.* **21**, 1724–1732 (1975).
150. Julsing, M. K. *et al.* Outer membrane protein alkL boosts biocatalytic oxyfunctionalization of hydrophobic substrates in Escherichia coli. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 5724–5733 (2012).
151. Sikkema, J., de Bont, J. A. & Poolman, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev* **59**, 201–222 (1995).
152. Park, J.-B. *et al.* The efficiency of recombinant Escherichia coli as biocatalyst for stereospecific epoxidation. *Biotechnol. Bioeng.* **95**, 501–512 (2006).
153. Schrewe, M., Julsing, M. K., Bühler, B. & Schmid, A. Whole-cell biocatalysis for selective and productive C-O functional group introduction and modification. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 6346–77 (2013).
154. Sangster, J. Octanol-Water Partition Coefficients of Simple Organic Compounds. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **18**, 1111–1229 (1989).
155. Carrea, G. Biocatalysis in water-organic solvent two-phase systems. *Trends Biotechnol.* **2**, 102–106 (1984).
156. Cremonesi, P. & Carrea, G. Enzymatic Preparation of 20 β -Hydroxysteroids in a Two-Phase System. *Biotechnol. Bioeng.* **XVII**, 1101–1108 (1975).
157. Bühler, B., Witholt, B., Hauer, B. & Schmid, A. Characterization and application of xylene monooxygenase for multistep biocatalysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 560–568 (2002).
158. Schrewe, M. *et al.* Reaction and catalyst engineering to exploit kinetically controlled whole-cell multistep biocatalysis for terminal FAME oxyfunctionalization. *Biotechnol. Bioeng.* **111**, 1820–1830 (2014).
159. Kuhn, D., Kholiq, M. A., Heinzle, E., Bühler, B. & Schmid, A. Intensification and economic and ecological assessment of a biocatalytic oxyfunctionalization process. *Green Chem.* **12**, 815 (2010).
160. Gottlieb, H. E., Kotlyar, V. & Nudelman, A. NMR Chemical Shifts of Common

Laboratory Solvents as Trace Impurities. *J. Org. Chem.* **62**, 7512–7515 (1997).