

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VIII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX
SYMBOLVERZEICHNIS	XI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Selektiver Einbau von Sauerstoff in C-H Verbindungen.....	1
1.1.1 Chemische Methoden.....	1
1.1.2 Enzymatische Methoden	4
1.1.3 Vergleich beider Methoden	6
1.2 Cytochrom P450 Monooxygenasen	9
1.2.1 Katalysemechanismus.....	12
1.2.2 Redoxpartner und Elektronentransport	14
1.3 Biotechnologische Anwendung von Cytochrom P450 Monooxygenasen.....	15
1.3.1 Prozesse mit Cytochrom P450 Monooxygenasen.....	15
1.3.2 Herausforderungen biotechnologischer Anwendungen.....	18
2 AUFGABENSTELLUNG	23
3 CYP102A1 AUS <i>BACILLUS MEGATERIUM</i>	26
3.1 Charakterisierung des Biokatalysators.....	27
3.1.1 Kultivierung des Biokatalysators	28
3.1.2 Charakterisierung der Ganzzellbiotransformation	31
3.2 Parameterstudien.....	35
3.2.1 Sauerstoffversorgung	35
3.2.2 Redoxcofaktorversorgung.....	37
3.2.3 Bestimmung der Enantioselektivität	39
3.2.4 Einfluss von Substrat und Produkt auf die Hydroxylierungsreaktion.....	42
3.3 Satzreaktor (Batch) unter optimierten Bedingungen	49
3.4 Zusammenfassung.....	51
4 HUMANE CYP21	53
4.1 Charakterisierung.....	54
4.1.1 Kultivierung des Biokatalysators	54
4.1.2 Charakterisierung der Ganzzellbiotransformation	55

4.2	Parameterstudien	58
4.2.1	Sauerstoffversorgung	58
4.2.2	Cofaktorversorgung.....	58
4.2.3	Substratlöslichkeit	62
4.2.4	Substrattransport in die Zelle	67
4.3	Satzreaktor (Batch) unter optimierten Bedingungen.....	68
4.4	Zusammenfassung.....	69
5	CYP106A2 AUS <i>BACILLUS MEGATERIUM</i>.....	70
5.1	Charakterisierung des Ganzzellbiokatalysators	72
5.1.1	Kultivierung des Biokatalysators.....	72
5.1.2	Charakterisierung der Ganzzellbiotransformation.....	75
5.2	Parameterstudien für die Ganzzellbiotransformation.....	79
5.2.1	Substratlöslichkeit	79
5.2.2	Substrattransport in die Zelle	83
5.3	Charakterisierung des Zellrohextrakts.....	85
5.4	Parameterstudien bei Verwendung von Zellrohextrakt.....	88
5.4.1	Sauerstoffversorgung.....	88
5.4.2	Cofaktorversorgung.....	88
5.4.3	Substratlöslichkeit	91
5.5	Biotransformation unter optimierten Bedingungen	92
5.5.1	Biotransformation im Satzreaktor (Batch).....	92
5.5.2	Biotransformation im repetitiven Satzreaktor.....	94
5.5.3	Identifizierung der Nebenprodukte	98
5.6	Zusammenfassung.....	100
6	ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION UND AUSBLICK	102
6.1	CYP102A1 aus <i>Bacillus megaterium</i>	102
6.1.1	Geänderte Cofaktorspezifität und Etablierung einer enzymgekoppelten Cofaktorregenerierung	102
6.1.2	Strategien zur Überwindung der Produktinhibierung	103
6.1.3	Potentielle Anwendungen P450 katalysierter Oxidationen von Alkoholen ..	104
6.2	Humane CYP21	105
6.2.1	Quantifizierung des intrazellulären Redoxcofaktorpools	105
6.2.2	Lösungsmitteltoleranz der <i>S. pombe</i> CAD18.....	107
6.3	CYP106A2 aus <i>Bacillus megaterium</i>	108
6.3.1	Reaktorkonzept.....	108

6.3.2	Identifizierung des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts der Reaktion..	109
6.3.3	Regioselektivität der CYP106A2 katalysierten Hydroxylierung.....	111
6.4	Übergeordnete Betrachtung der untersuchten P450 Systeme.....	111
7	ZUSAMMENFASSUNG	114
8	MATERIAL UND METHODEN	118
8.1	Chemikalien und Geräte	118
8.1.1	Verwendete Chemikalien.....	118
8.1.2	Verwendete Geräte	120
8.2	CYP102A1 aus <i>B. megaterium</i>	120
8.2.1	Plasmide und Stammherstellung	120
8.2.2	Kultivierung von <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	121
8.2.3	Chemische Synthese von 4-Hydroxy- β -jonon.....	121
8.2.4	Aktivitätsbestimmung des <i>E. coli</i> Stammes mit CYP102A1 Variante	122
8.2.5	Stabilitätsuntersuchungen des <i>E. coli</i> Stammes mit CYP102A1 Variante ...	123
8.2.6	Präparative Herstellung und Identifizierung des Nebenprodukts 4-Oxo- β -jonon	123
8.2.7	CYP102A1 katalysierte Oxidation von 4-Hydroxy- β -jonon	123
8.2.8	<i>In situ</i> Produktabtrennung.....	124
8.2.9	Satzreaktor unter optimierten Bedingungen.....	125
8.2.10	Instrumentelle Analytik.....	125
8.3	Humane CYP21	126
8.3.1	Kultivierung der <i>S. pombe</i> CAD18	126
8.3.2	Aktivitätsbestimmung der <i>S. pombe</i> CAD18	127
8.3.3	Stabilitätsuntersuchungen der <i>S. pombe</i> CAD18.....	127
8.3.4	Löslichkeitsuntersuchungen der Steroide	127
8.3.5	Bestimmung der intrazellulären Cofaktorkonzentration der <i>S. pombe</i> CAD18.....	128
8.3.6	Permeabilisierung der <i>S. pombe</i> CAD18	128
8.3.7	Satzreaktor unter optimierten Bedingungen.....	129
8.3.8	Instrumentelle Analytik.....	129
8.4	CYP106A2 aus <i>B. megaterium</i>	130
8.4.1	Plasmide und Stammherstellung	130
8.4.2	Kultivierung des rekombinanten <i>E. coli</i> Stammes mit CYP106A2.....	130
8.4.3	Herstellung des Zellrohextrakts	130
8.4.4	Aktivitätsbestimmung.....	131

8.4.5	Stabilitätsuntersuchungen	131
8.4.6	Löslichkeitsuntersuchungen der Steroide	132
8.4.7	Bestimmung der Cofaktorkonzentration des Zellrohextrakts.....	132
8.4.8	Bestimmung des reaktionslimitierenden Schritts der Biotransformation.....	133
8.4.9	Biotransformation unter optimierten Bedingungen.....	133
8.4.10	Instrumentelle Analytik	134
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	136
	DANKSAGUNG	148