

# *Pseudomonas putida* als universeller Biokatalysator für die selektive Oxidation von Monoterpenen

16900 N

Innerhalb dieses Forschungsvorhabens wurde der bisher industriell kaum verwendete Stamm *Pseudomonas putida* DSM12264 untersucht und hinsichtlich seines Einsatzes in Bioprozessen mit toxischen Substraten und Produkten optimiert.

Dazu wurden Molekularbiologische Tools, wie optimierte Expressionsplasmide mit verringertem *metabolic burden*, kompatible Coexpressionsplasmide für die Expression von Cytochrom P450-Monooxygenasen und Cofaktorregenerationssystem entwickelt. Es zeigte sich, dass *P. putida* DSM12264 im Vergleich zu *P. putida* KT2440 bei der Expression der Cytochrom P450-Monooxygenasen P450cam und P450cin signifikant (bis 2,5-fach) höhere P450-Expressionstiter erzeugt.

Außerdem wurden Protokolle für die Deletion genomisch kodierter Gene in *P. putida* DSM12264 erzeugt. Dadurch entstanden Mutanten von *P. putida* DSM12264 mit deutlich erhöhter Toleranz gegen toxische Substrate und Produkte. Untersuchungen zeigten, dass Transmembranproteine und Zell-Permeabilisierung zur Erhöhung der Solvanztoleranz und zur Verbesserung der Verfügbarkeit des Substrates von Bedeutung sind. Durch die Einführung von cofaktorregenerierenden Enzymen ließen sich die Substratumsätze optimieren.

Das *cym*-Operon und das Enzym P450cam waren für die Produktion von Perillaalkohol aus Limonen ungeeignet. Perillaalkohol wurde daher durch eine Variante von P450 BM3 produziert und mit Hilfe eines Cofaktorregenerationssystem optimiert.

Es wurden neue Varianten von P450 BM3 zur Oxidation von Pinen zu Verbenol und Verbenon erzeugt. Die Produktion von Verbenol und Verbenon aus Pinen durch Varianten von P450 BM3 wurde durch Transmembrantransporter und Co-Expression von cofaktorregenerierenden Enzymen optimiert.

Ferner konnten im Bioreaktor die bisher höchsten Prozesskennzahlen für die Biotransformation von Cineol zu Hydroxycineol beschrieben werden.

Hinsichtlich P450-Expressionstiter und Solvanztoleranz ist *P. putida* DSM12264 dem üblicherweise verwendeten und wissenschaftlich gut beschriebenen *P. putida* Stamm KT2440 überlegen. Diese Eigenschaften wurden weiter ausgebaut. Damit ist der nächste Schritt zur industriellen Anwendung dieses neuen Biokatalysators für Bioprozesse mit toxischen Substraten und Produkten vollzogen worden.

Bearbeitet wurde das Forschungsthema vom 02/11 bis 04/14 von der **DECHEMA e.V., Karl-Winnacker-Institut** (Theodor-Heuss-Allee 25, 60486 Frankfurt am Main) unter der Leitung von Prof. Dr. J. Schrader (Leiter der Forschungsstelle Prof. Dr. K. Wagemann) und der **Heinrich Heine Universität Düsseldorf, Institut für Biochemie, Lehrstuhl für Biochemie II** (Universitätsstraße 1, 40225 Düsseldorf, Tel.: 0211/81-13889) unter der Leitung von Prof. Dr. V. Urlacher (Leiter der Forschungsstelle Prof. Dr. V. Urlacher) und dem DECHEMA-Forschungsinstitut (Theodor-Heuss-Allee 25, 60486 Frankfurt am Main, Tel.: 069/7564-422) unter der Leitung von Prof. Dr. J. Schrader (Leiter der Forschungsstelle Prof. Dr. M. Schütze).

[--> TIB](#)

Gefördert durch:



Das IGF-Vorhaben Nr. 16900 N der Forschungsvereinigung DECHEMA, Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie e.V., Theodor-Heuss-Allee 25, 60486 Frankfurt am Main wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages