

Biokatalyse

Mikrobielle Oxidation von Monoterpenen

JENS SCHRADER

DECHEMA E. V., KARL-WINNACKER-INSTITUT, FRANKFURT A. M.

Die mikrobielle Oxidation von Monoterpenen bietet Zugang zu wertvollen bioaktiven Naturstoffen. Screening, *precursor feeding*, *in situ*-Produktentfernung und *metabolic engineering* bieten Optionen, effiziente Biokatalysesysteme zu entwickeln.

Microbial oxidation of monoterpenes opens access to valuable natural bio-actives. Screening, *precursor feeding*, *in situ* product removal and *metabolic engineering* enable the development of efficient biocatalytic systems.

■ Mit inzwischen über 40.000 bekannten Strukturen stellen die Terpene (auch „Isoprenoide“) die größte Naturstoffklasse dar [1]. Monoterpene besitzen ein Gerüst aus zehn C-Atomen und prägen mit ihrem Aroma und Duft die ätherischen Öle vieler Nadelhölzer, Zitrusfrüchte, Kräuterpflanzen und Blüten; ihre biologische Funktion wird mit der Anziehung von bestäubenden Insekten oder Abwehr von Fraßfeinden in Verbindung gebracht. Einige Monoterpene sind heutzutage wichtige medizinische Wirkstoffe, z. B. 1,8-Cineol, Menthol und Campher für Erkrankungen der Atemwege.

Biooxidation von Monoterpenen

Bestimmte Monoterpene sind zentrale Intermediate pflanzlicher Terpenbiosynthesen und kommen in der Natur in großen Mengen vor. Beispielsweise fallen jährlich über 50.000 Tonnen (+)-Limonen und ca. 160.000 Tonnen α -Pinen quasi als „Abfall“ der zitrus- bzw. holzverarbeitenden Industrien an [2, 3]. Wei-

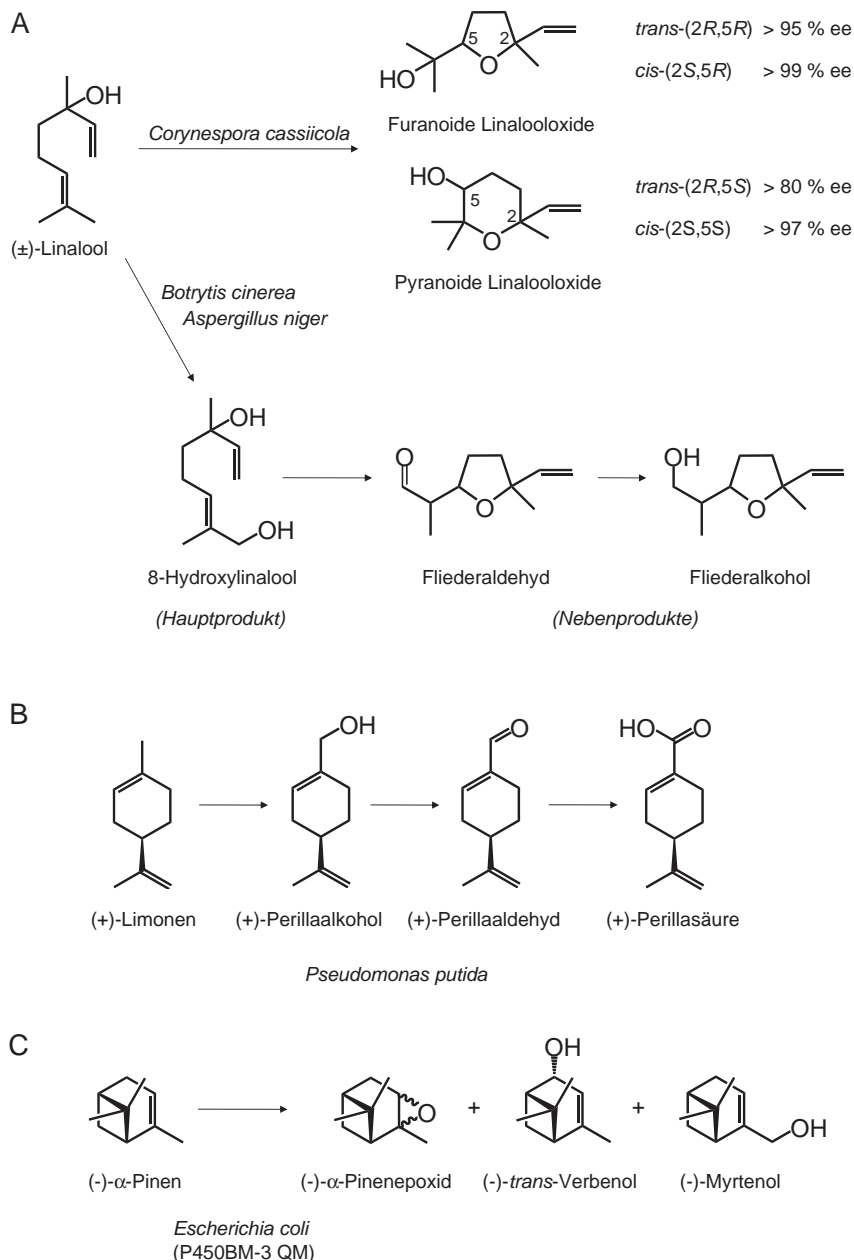
tere Monoterpene, wie die Linaloolisomere, sind Hauptbestandteile bestimmter ätherischer Öle (Kampherbaum, Koriander, Marjoran). Dagegen sind oxyfunktionalisierte Derivate dieser zentralen Monoterpene, die häufig wirtschaftlich interessante Eigenschaften aufweisen, in der Natur nur in geringen Konzentrationen zu finden. Die beispielhaft genannten Monoterpene bilden folglich eine ideale natürliche Ressource, um daraus hochwertige Naturstoffe zu synthetisieren. Ungeachtet des nachgewiesenen Potenzials von Mikroorganismen zur Biotransformation von Terpenen sind bisher kaum industriereife Beispiele beschrieben worden [4]. Die Hauptursachen sind in den physikochemischen Eigenschaften der Substrate und Produkte begründet: ihrer Hydrophobizität, das heißt geringen Wasserlöslichkeit, verbunden mit ausgeprägter Toxizität. Letztere geht auf die bevorzugte Akkumulation der Terpene in Zellmembranen zurück, wodurch essenzielle Funktionen der Mikroorganismen gestört wer-

den. Hinzu kommt, dass die gewünschten Reaktionen häufig von nur schwach aktiven und Kofaktor-abhängigen Oxygenasen katalysiert werden, deren Gene oft schwierig heterolog zu exprimieren sind.

Im Folgenden werden anhand ausgewählter Beispiele (**Abb. 1**) unterschiedliche methodische Herangehensweisen für die mikrobielle Oxidation von Monoterpenen vorgestellt: (1) Screening nach aktiven Mikroorganismen, (2) Steigerung der Produktivität durch *in situ*-Produktentfernung, (3) Verbesserung der Biooxidation durch heterologe Kofaktorregenerierung und Zweiphasenbioprozess.

Screening Linalool-oxidierender Pilze

Mit unseren Arbeiten konnten wir erstmals zeigen, dass bestimmte Pilze nach Dosierung des monozyklischen Monoterpenalkohols Linalool in der Lage sind, die bisher nur in Pflanzen beschriebenen Fliederaldehyde und -alkohole als metabolische Nebenprodukte zu synthetisieren [5]. Diese Aromastoffe prägen aufgrund ihrer sehr niedrigen Geruchsschwellen im Nanogrammbereich maßgeblich den Duft des blühenden Flieders *Syringa vulgaris* L. (*Oleaceae*). Linalool wirkt auf Mikroorganismen schon in niedrigen Konzentrationen toxisch. Deshalb waren für die erfolgreiche Identifizierung der gewünschten Zielverbindungen zunächst Toxizitätsstudien durchzuführen. Es wurden die stammspezifischen Linalool-Toleranzgrenzen und -verbrauchsdaten sowie Glukosezehreraten bestimmt und daraus *feeding*-Protokolle mit intervallartigen Linalool- und Glukosegaben abgeleitet. Auf diese Weise wurde genügend Linalool zugeführt und gleichzeitig ausreichend Biomasse gebildet, um die gewünschten Verbindungen auch bei niedrigen Konzentrationen identifizieren zu können. Mittels einer optimierten Festphasenmikroextraktion (SPME) GC-MS-Analyse des Gasraums über der Flüssigkultur gelang der Nachweis von Fliederaldehyd und -alkohol als metabolische Nebenprodukte (Maßstab: 100 bis 200 Mikrogramm pro Liter) in Kulturen von *Botrytis*



▲ **Abb. 1:** Mikrobielle Oxidation von Monoterpenen. **A,** Linalool-Biotransformationen als Ergebnis eines Screenings von Pilzen. % ee: Prozent Enantiomerenüberschuss. **B,** Umsetzung von Limonen zu Perillasäure durch *Pseudomonas putida*. **C,** Oxidation von α -Pinen mit rekombinanten *Escherichia coli*-Zellen, die eine gentechnisch erzeugte Variante der P450-Monooxygenase aus *Bacillus megaterium* (P450BM-3) überexprimieren, welche auch Terpene als nicht natürliche Substrate akzeptiert.

cinerea 5901/2, *B. cinerea* 02/FBII/2,1 und *Aspergillus niger* DSM 821. Die Identifizierung von 8-Hydroxylinalool deutete auf einen dem Fliederverstoffwechsel entsprechenden Biotransformationsweg hin (**Abb. 1A**, [5]).

Ein weiterer überraschender Befund des Screenings war, dass der Ascomycet *Corynespora cassiicola* DSM 62475 die Linaloolisomere hocheffizient und stereospezifisch in Linalooloxide, begehrte lavendelartige Duftstoffe, als Hauptprodukte überführte (**Abb. 1A**).

Einsatz Lösungsmittel-toleranter Bakterien zur Oxidation von Limonen im integrierten Bioprozess

Eine Besonderheit bestimmter *Pseudomonas putida*-Stämme ist ihre ausgeprägte Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln. Als Ursache werden verschiedene Mechanismen diskutiert, z. B. die *cis-trans*-Isomerisierung ungesättigter Fettsäuren der Zytoplasmamembran oder energieabhängige Solvent-Effluxsysteme [6]. Diese Eigenschaften machen die Bakterien zu attraktiven Kandi-

daten für die Biooxidation toxischer Substrate. So ist z. B. *P. putida* DSM 12264 in der Lage, mit der aromatischen Verbindung Cymol als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen. Die ersten Enzyme dieses katabolischen Stoffwechselweges ermöglichen dem Bakterium, in Gegenwart einer verwertbaren C-Quelle auch das dem Cymol strukturell nahe verwandte monozyklische Monoterpen (+)-Limonen zu (+)-Perillasäure zu oxidieren [7], welche ins Medium sekretiert wird (**Abb. 1B**). Die Monoterpensäure ist kaum geruchsaktiv, findet jedoch aufgrund ihres breiten antimikrobiellen Wirkspektrums Interesse als potenzieller natürlicher Konservierungsstoff für Kosmetika. Aufgrund der inhibierenden Wirkung des Produkts auf das Wachstum und die Biotransformationsaktivität des Mikroorganismus lassen sich jedoch auch unter optimierten Bioprozessbedingungen kaum mehr als zehn Gramm pro Liter Produkt erzielen [7]. Wir haben deshalb für diese Biotransformation einen integrierten Bioprozess entwickelt, in dem das Produkt mithilfe eines Anionenaustauscher-Fließbetts kontinuierlich aus dem Kulturmedium entfernt wird (**Abb. 2A**, [8]). Dieses Prozessdesign führte zu einer kumulativen Perillasäure-Gesamtkonzentration von 31 Gramm pro Liter (nach sieben Tagen) und einer Raum-Zeit-Ausbeute von ca. sieben Gramm pro Liter und Tag über die ersten vier Tage (**Abb. 2B**). Die Zahlen repräsentieren die höchsten Werte, die bisher für mikrobielle Monoterpenoxidationen beschrieben wurden.

Metabolic engineering und Bioprozessdesign zur mikrobiellen Oxyfunktionalisierung von α -Pinen

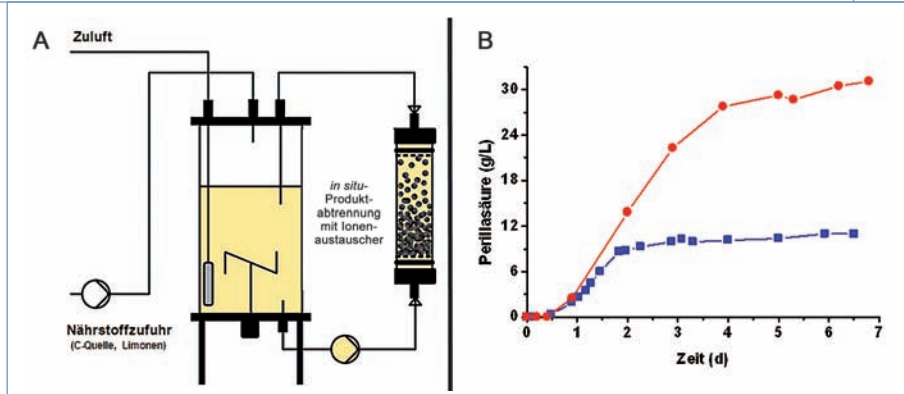
In vielen Fällen reichen die natürlichen Fähigkeiten von Mikroorganismen zur Katalyse einer gewünschten Reaktion nicht aus, um mit den bisher beschriebenen Maßnahmen „Screening“ und „verfahrenstechnische Optimierung“ zu wirtschaftlich interessanten Prozessen zu gelangen. Die heterologe Expression der membranassoziierten Schlüsselenzyme der pflanzlichen Terpenoxidation, der Cytochrom-P450-Monooxygenasen (P450), ist in vielen Fällen ebenfalls schwierig. Ein Ausweg können besser exprimierbare (zytosolische) bakterielle P450 wie CYP102A1 aus *Bacillus megaterium* („P450BM-3“) sein, für die Sequenz- und Strukturinformationen vorliegen. Solche Enzyme lassen sich durch rationales Design oder gelenkte Evolution gezielt modulieren, um gewünschte „unnatürliche“

Reaktionen mit Terpenen als Substraten zu katalysieren [9].

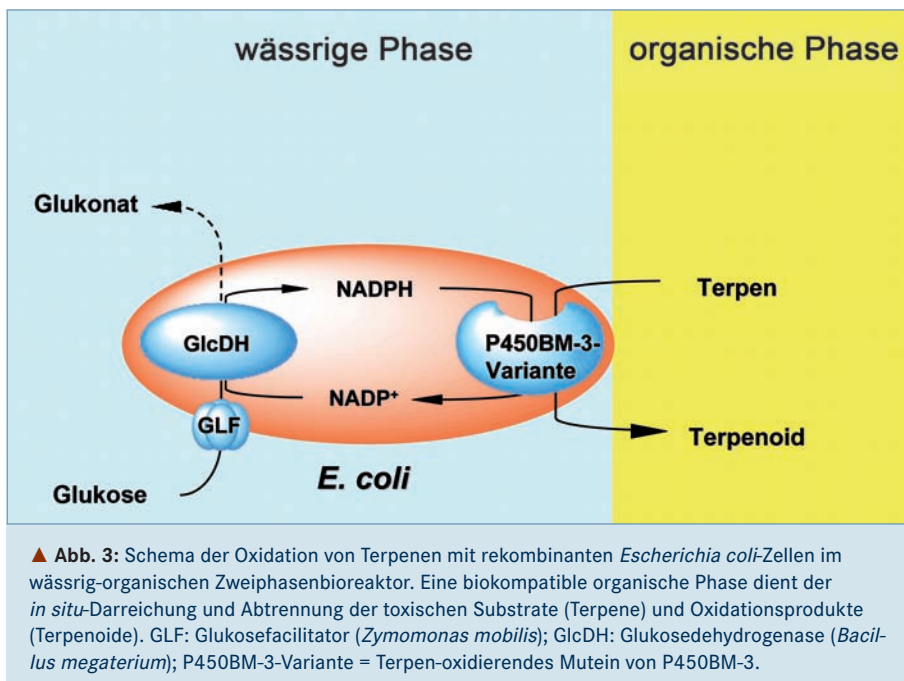
Eine durch rationale und evolutive Verfahren erzeugte Fünffachmutante (V26T, R47F, A74G, F87V, L188K) von CYP102A1 („P450BM-3 QM“) ist in der Lage, verschiedene Kohlenwasserstoffe als Substrate zu akzeptieren [10], darunter auch das bicyklische Monoterpen (–)- α -Pinen [11]. Anhand dieses Beispiels haben wir biologische und technische Maßnahmen kombiniert, um das Potenzial rekombinanter *Escherichia coli*-Zellen für die Monoterpenoxidation aufzuzeigen [11, 12]. Die entstehenden Produkte (Abb. 1C) sind interessante Aroma- und Riechstoffe bzw. deren Vorstufen. Unsere Hypothese war, dass nach Überexpression in *E. coli* die hohen intrazellulären Konzentrationen von P450BM-3 QM zu einer Verknappung des anabolen Kofaktors NADPH führen müssten, da dieser gleichzeitig ein zentraler Bestandteil des P450-Systems ist. Deshalb wurden zusätzlich Gene eingebracht, die für den Glukosefacilitator (GLF) aus *Zymomonas mobilis* und die Glukosedehydrogenase (GlcDH 2) aus *B. megaterium* codieren. GLF ermöglicht den energieunabhängigen Import von nicht phosphorylierter Glukose, während GlcDH 2 bevorzugt NADP⁺ als Kofaktor zu deren Oxidation verwendet. Der prozesstechnische Vorteil ist, dass intakte *E. coli*-Zellen – angetrieben durch externe Glukosegabe – die Zielreaktion effizient katalysieren können (Abb. 3). Als Ergebnis war eine ca. neunfach höhere initiale Produktbildungsrate zu verzeichnen. Im Bioreaktor wurden die toxischen Effekte des α -Pinsens durch vorheriges Lösen in einer biokompatiblen organischen Phase – hier Diisooctylphthalat – minimiert (Abb. 3). Das wasserunlösliche Lösungsmittel dient gleichzeitig zur *in situ*-Abtrennung der inhibierenden Produkte aus der wässrigen Phase. Mithilfe dieses Zweiphasenbioprozesses konnten die Standzeit des Ganzzellbiokatalysators verbessert und über ein Gramm pro Liter Oxidationsprodukte gebildet werden.

Danksagung

Besonderer Dank gilt Marco Antonio Mirata und Hendrik Schewe für die erfolgreiche Bearbeitung der Forschungsvorhaben, die teilweise aus Haushaltsmitteln des Bundesministeriums für Wirtschaft und Technologie (BMW) über die Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto von Guericke“ e. V. (AiF) gefördert (Vorhabenummern 119 ZN und 15089 N/1) wurden. ■



▲ Abb. 2: A, Fließbild des Bioprozesses zur Umwandlung von Limonen in Perillasäure durch *Pseudomonas putida* mit integrierter Produktabtrennung. Die Kulturflüssigkeit des Bioreaktors (gelb) wird kontinuierlich im Kreislauf durch ein Fließbett mit Anionenaustauscherkugeln gepumpt, um das Produkt zu binden und auf diese Weise Produktinhibierung zu umgehen. B, Die *in situ*-Produktabtrennung führt zu einer deutlichen Steigerung der Produktmenge (rot: kumulative Produktkonzentration des integrierten Bioprozesses; blau: konventioneller Fedbatch-Bioprocess).



▲ Abb. 3: Schema der Oxidation von Terpenen mit rekombinanten *Escherichia coli*-Zellen im wässrig-organischen Zweiphasenbioreaktor. Eine biokompatible organische Phase dient der *in situ*-Darreichung und Abtrennung der toxischen Substrate (Terpene) und Oxidationsprodukte (Terpenoide). GLF: Glukosefacilitator (*Zymomonas mobilis*); GlcDH: Glukosedehydrogenase (*Bacillus megaterium*); P450BM-3-Variante = Terpen-oxidierendes Mutein von P450BM-3.

Literatur

- [1] Aharoni A, Jongsma MA, Bouwmeester HJ (2005) Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. *Trends Plant Sci* 10:594–602
- [2] Ohloff G (1994) Scent and Fragrances. Springer, Berlin
- [3] Braddock RJ (1999) Handbook of citrus by-products and processing technology. J. Wiley & Sons, New York
- [4] Schrader J (2007) Microbial flavour production. In: Berger RG (Hrsg.) Flavours and fragrances. Springer, Berlin. 507–574
- [5] Mirata MA, Wuest M, Mosandl A et al. (2008) Fungal Bioconversion of (±)-Linalool. *J Agric Food Chem* 56:3287–3296
- [6] Heipieper HJ, Neumann G, Cornelissen S et al. (2007) Solvent-tolerant bacteria for biotransformations in two-phase fermentation systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 74:961–973
- [7] Mars AE, Gorissen JPL, van den Beld I et al. (2001) Bioconversion of limonene to increased concentrations of perillaldehyde by *Pseudomonas putida* GS1 in a fed-batch reactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:101–107
- [8] Mirata MA, Heerd D, Schrader J (2009) Integrated bioprocess for the oxidation of limonene to perillaldehyde with *Pseudomonas putida* DSM 12264. *Process Biochem* 44:764–771
- [9] Seifert A, Vomund S, Grohmann K et al. (2009) Rational design of a minimal and highly enriched CYP102A1 mutant library with improved regio-, stereo- and chemoselectivity. *Chembiochem* 10:853–861

- [10] Lentz O, Li Q-S, Schwaneberg U et al. (2001) Modification of the fatty acid specificity of cytochrome P450_{BM-3} from *Bacillus megaterium* by directed evolution: a validated assay. *J Mol Catal B: Enzym* 15:123–133
- [11] Schewe H, Kaup B-A, Schrader J (2008) Improvement of P450BM-3 whole-cell biocatalysis by integrating heterologous cofactor regeneration combining glucose facilitator and dehydrogenase in *E. coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 78:55–65
- [12] Schewe H, Holtmann D, Schrader J (2009) P450BM-3-catalyzed whole-cell biotransformation of α -pinene with recombinant *Escherichia coli* in an aqueous-organic two-phase system. *Appl Microbiol Biotechnol* 83:849–857

Korrespondenzadresse:



PD Dr. Jens Schrader
 DECHEMA e. V.
 Karl-Winnacker-Institut
 AG Bioverfahrenstechnik
 Theodor-Heuss-Allee 25
 D-60486 Frankfurt a. M.
 Tel.: 069-7564-422
 Fax: 069-7564-388
 schrader@dechema.de