

Diss. ETH No. 12655

**Cytochrome P450<sub>BM-3</sub> Monooxygenase: Development of a  
Whole Cell Biocatalyst for the Regio- and Stereoselective  
Oxidation of Long Chain Fatty Acids**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH  
for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

Presented by  
SILKE SCHNEIDER  
'Dipl.-Ing. Biotechnologie'  
born March 5, 1968  
citizen of Germany

Accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. B. Witholt, examiner  
Prof. Dr. D. Seebach, co-examiner  
Dr. D. Sanglard, co-examiner

Zürich, 1998

## SUMMARY

The industrial demand for enzymes in organic synthesis is increasing. Due to the chemo-, regio- and stereo-selectivity, combined with their high specific activity, enzymes can provide solutions for existing problems in organic chemical synthesis. Especially the increased interest in enantioselective synthesis of drugs has boosted the use of enzymes as catalysts. Some 150 years after Pasteur's discovery of the two stereo-forms of a chiral molecule, enzymes now are catalysts in a significant number of industrial processes, thereby generating enantiomerically pure intermediates and products as demanded by the pharmaceutical industry.

Most research regarding cytochrome P450 monooxygenases has been aimed at clarification of the fate of drugs and toxic chemicals in the human blood stream. Many specific reactions have thus been identified, which in principle could be suitable to biocatalytic applications as well. We entered the field of biotransformations using a cytochrome P450 monooxygenase from *Bacillus megaterium*, cytochrome P450<sub>BM-3</sub> monooxygenase, which is one of the most efficient monooxygenases of this type and have applied it for the production of subterminal hydroxylated fatty acids on a laboratory scale. Since the monooxygenase is NADPH dependent, we chose to use a whole cell bioconversion system. We used whole cells of a recombinant *E. coli* which synthesizes the monooxygenase and had to overcome a number of technical problems to establish a system for the production of novel hydroxylated long chain fatty acids to g per liter concentrations.

Degradation of fatty acids and products via the  $\beta$ -oxidation pathway of recombinants of common laboratory variants of *E. coli* resulted in low yields of the desired hydroxylated fatty acids. An engineered bioconversion system, consisting of a recombinant of *E. coli* carrying a *fadD* mutation containing the gene encoding cytochrome P450<sub>BM-3</sub> monooxygenase, in combination with an as yet undefined fatty acid

uptake mechanism from *Pseudomonas oleovorans* was employed. This engineered strain was capable of oxidizing pentadecanoic acid with an increased productivity relative to *E. coli* strains that were *fadD*<sup>+</sup> mutants and not equipped with the uptake system.

During bioconversions with whole cells and cell free extracts, we observed that the oxygen concentration strongly influenced the nature of the desired bioconversion products since the distribution of the introduced oxygen atoms varied. To control the reaction, we applied different amounts of oxygen to the bioconversion system and were able to reduce the number of products to the desired three ( $\omega$ -1,  $\omega$ -2 and  $\omega$ -3) monohydroxylated fatty acids. This was illustrated by whole cell conversion of pentadecanoic acid (C<sub>15:0</sub>) at a 2 L scale performed at 2-10 % dissolved oxygen tension, which resulted in the exclusive formation of 12-, 13- and 14-hydroxypentadecanoic acid, thus avoiding multiple oxidation of the substrates and products to, for instance, ketoalcohols.

A product isolation procedure was developed by purifying the individual 12-, 13- and 14-hydroxypentadecanoic acids by reversed-phase HPLC. The optical purity of 14-hydroxypentadecanoic acid was determined by chiral HPLC analysis. We demonstrated that cytochrome P450<sub>BM-3</sub> is able to perform  $\omega$ -1 oxidation of pentadecanoic acid to S-(+)-14-hydroxypentadecanoic acid (e.e. >95 %). The stereoselective oxidation of pentadecanoic acid as a representative long chain fatty acid substrate of cytochrome P450<sub>BM-3</sub> monooxygenase extends the usefulness of the enzyme as a biocatalyst in organic synthesis.

This system was applied in laboratory scale bioconversions using different long-chain fatty acids (LCFA) ranging from C<sub>12</sub> to C<sub>18</sub> and led to the production of  $\omega$ -1,  $\omega$ -2 and  $\omega$ -3 hydroxylated long chain fatty acids, which are almost impossible to produce by traditional chemical means. Bioconversions performed at a 2 L scale followed by the product purification protocol, which was established for pentadecanoic acid oxidation products, allowed the production and

purification of regio-specifically hydroxylated molecules at 100 mg scale. These amounts were sufficient for their characterization, but significant improvements remain to be made before these new synthons can be applied as possible new useful building blocks for the fine chemicals or pharmaceutical market.

## ZUSAMMENFASSUNG

Die Verwendung von Enzymen in organischen Synthesen ist für die Industrie von ständig wachsendem Interesse. Aufgrund der Chemo-, Regio- und Stereoselektivität von Enzymen und ihrer hohen spezifischen Aktivität, sind sie oft die Lösung für eine Reihe von bestehenden Problemen in der organischen Chemie. Besonders das steigende Interesse an stereoselectiven Synthesen ist der Hauptgrund für die enorme Nachfrage nach Enzymen als Katalysatoren. 150 Jahre nach Pasteurs Entdeckung der Stereochemie von chiralen Molekülen werden Enzyme als Katalysatoren in einer beachtlichen Reihe von industriellen Prozessen verwendet, um, von der Pharmaindustrie gefordert, enantiomerenreine Intermediate und Produkte herzustellen.

Die meisten Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der Cytochrom P450 Monooxygenasen befassen sich mit der Aufdeckung der Wege von Arzneimitteln und toxischen Chemikalien im menschlichen Blutssystem.

Mit dem Cytochrom P450 System von *Bacillus megaterium*, Cytochrom P450<sub>BM-3</sub>, welches eine der effizientesten Monooxygenasen diese Types ist, betraten wir das Gebiet der Biotransformationen und nutzten sie für die Produktion von endständig hydroxylierten Fettsäuren im Labormasstab. Da diese Monooxygenase NADPH abhängig ist, wählten wir ein Biotransformationssystem bestehend aus ganzen Zellen. Wir arbeiteten mit einem rekombinanten *E. coli*, welcher die Monooxygenase synthetisiert und mussten eine Reihe von technischen Problemen überwinden, um ein System zur Produktion von neuartigen langkettigen Hydroxyfettsäuren in mg bis g per Liter Mengen zu etablieren.

Der Abbau von Fettsäuren und deren Oxidationsprodukten durch  $\beta$ -Oxidation verschiedener *E. coli* Rekombinanten resultierte in geringen Ausbeuten der erwünschten hydroxylierten Fettsäuren. Ein "selbst-geschneidertes" Biotransformationssystem, bestehend aus

einem rekombinanten *E. coli*, welcher eine *fadD* Mutation und das Gen, welches die Cytochrom P450<sub>BM-3</sub> Monooxygenase codiert, trägt, in Kombination mit einem derzeit noch undefinierten Fettsäureaufnahmemechanismus von *Pseudomonas oleovorans*, wurden eingesetzt. Dieser "spezifisch geschneiderte" Stamm war fähig, Pentadekansäure mit höherer Produktivität zu oxidieren als *E. coli* Stämme, welche keine *fadD* Mutation trugen und das Aufnahmesystem nicht besaßen.

Bei der Durchführung von Biotransformationen mit ganzen Zellen und zellfreien Extrakten beobachteten wir, dass Sauerstoff stark die Art des gewünschten Biotransformationsproduktes beeinflusst, da die Position des eingebauten Sauerstoffatoms variierte. Um diese Reaktion zu kontrollieren, führten wir die Biotransformationen mit unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen durch und konnten zeigen, dass die Anzahl der Produkte auf die erwünschten drei ( $\omega$ -1,  $\omega$ -2 and  $\omega$ -3) Monohydroxyfettsäuren reduziert werden konnte. Diese Biotransformation von Pentadekansäure mit ganzen Zellen wurde im 2 L Masstab bei 2-10 % gelöstem Sauerstoff durchgeführt, wobei ausschliesslich 12-, 13- and 14-Hydroxypentadekansäuren gebildet wurden und somit Mehrfachoxidationen der Substrate und Produkte, die zum Beispiel zu Ketoalkoholen führen, vermieden werden konnten.

Weiterhin wurde ein Produktisolierungsprozess entwickelt, bei dem die einzelnen 12-, 13- and 14-Hydroxypentadekansäuren mittels Umkehrphasen-HPLC gereinigt werden. Die Enantiomerenreinheit der 14-Hydroxypentadekansäure wurde mittels HPLC bestimmt. Wir konnten zeigen, dass Cytochrom P450<sub>BM-3</sub> Monooxygenase die  $\omega$ -1 Oxidation von Pentadekansäure zu S-(+)-14-Hydroxypentadekansäure (e.e. >95 %) ausführt. Die stereospezifische Oxidation von Pentadekansäure, als ein repräsentatives langkettiges Fettsäuresubstrat der Cytochrom P450<sub>BM-3</sub> Monooxygenase, unterstreicht die Bedeutung dieses Enzymes als Biokatalysator in organischen Synthesen. Die Produktion

der  $\omega$ -1,  $\omega$ -2 and  $\omega$ -3 Hydroxypentadekansäuren bis zu 300 mg L<sup>-1</sup> wurde erwiesen.

Das System wurde für Biotransformationen im Labormasstab von langkettigen Fettsäuren mit Kettenlängen von C<sub>12</sub> bis C<sub>18</sub> verwendet, was zur Produktion von  $\omega$ -1,  $\omega$ -2 and  $\omega$ -3 Hydroxyfettsäuren führte; Produkte, welche mit traditionellen chemischen Methoden nur schwierig zu synthetisieren sind.

Biotransformationen im 2 L Masstab mit anschließender Produktaufreinigung, wie es für die Oxidationsprodukte von Pentadekansäure entwickelt wurde, ermöglichen die Herstellung und Aufreinigung chiraler Moleküle im 100 mg Bereich. Diese Mengen, ausreichend für ihre Charakterisierung, erfordern jedoch weitere grundlegende Verbesserungen, um diese neuen Moleküle als potentiell nützliche Bausteine für den Feinchemikalien- oder pharmazeutischen Markt einsetzen zu können.