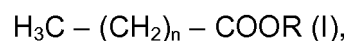

ENZYMATISCHE OMEGA-OXIDATION UND -AMINIERUNG VON FETTSÄUREN

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Oxidation einer Fettsäure oder eines Esters davon,

5 umfassend den Schritt Oxidieren der Fettsäure oder des Esters davon durch Kontaktieren mit einer Cytochrom P450-Monooxygenase der CYP153-Familie in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff und NAD(P)H und einem Ganzzellkatalysator exprimierend eine rekombinante Cytochrom P450-Monooxygenase der CYP153-Familie, eine rekombinante
10 Alkoholdehydrogenase, eine rekombinante Transaminase und optional ein oder mehr als ein rekombinantes Enzym aus der Gruppe umfassend Alanindehydrogenase, Ferredoxin und Ferredoxin-Reduktase sowie die Verwendung dieses Ganzzellkatalysators zur Oxidation einer Fettsäure oder eines Esters davon,

15 wobei die Fettsäure oder der Esters davon bevorzugt die Formel (I)



wobei R aus der Gruppe ausgewählt ist, die H, Methyl, Ethyl, Propyl und Butyl umfasst,

20

wobei n 0 bis 30, bevorzugt 6 bis 24 ist,

aufweist.

25

Polyamide sind eine Klasse von Polymeren, die durch sich wiederholende Amidgruppen gekennzeichnet sind. Der Begriff „Polyamid“ betrifft im Unterschied zu den chemisch verwandten Proteinen gewöhnlich synthetische, im Handel erhältliche, thermoplastische
30 Kunststoffe. Polyamide werden von primären Aminen oder von sekundären Aminen abgeleitet, die herkömmlich beim Cracken von Kohlenwasserstoffen gewonnen werden. Es können jedoch auch Derivate, genauer Aminocarbonsäure, Lactame und Diamine, zur Polymerherstellung

verwendet werden. Von Interesse sind weiterhin kurzkettige, gasförmige Alkane als Edukte, die ausgehend von nachwachsenden Rohstoffen mit biotechnologischen Verfahren gewonnen werden können.

- 5 Viele kommerziell stark nachgefragte Polyamide werden ausgehend von Lactamen hergestellt. Zum Beispiel kann man „Polyamid 6“ durch Polymerisation von ϵ -Caprolactam und „Polyamid 12“ durch Polymerisierung von Laurinlactam erhalten. Weitere kommerziell interessante Produkte umfassen Copolymere von Lactam, z. B. Copolymere von ϵ -Caprolactam und Laurinlactam.

- 10 Die konventionelle chemisch-technische Erzeugung von Aminen ist von der Versorgung mit fossilen Rohstoffen abhängig, ineffizient, und dabei fallen große Mengen unerwünschter Nebenprodukte an, in manchen Schritten der Synthese bis zu 80 %. Ein Beispiel für einen solchen Prozess stellt die Herstellung von Laurinlactam dar, das konventionell durch
- 15 Trimerisierung von Butadien gewonnen wird. Das Trimerisierungsprodukt Cyclododekatrien wird hydriert und das daraus resultierende Cyclododekan wird zu Cyclododekanon oxidiert, das anschließend mit Hydroxylamin zu Cyclododekanoxim umgesetzt wird, welche schließlich über eine Beckmann-Umlagerung zu Laurinlactam umgewandelt wird.

- 20 Angesichts dieser Nachteile wurden Verfahren entwickelt, um Amine unter Verwendung von Biokatalysatoren ausgehend von nachwachsenden Rohstoffen zu gewinnen. Als nachwachsende Rohstoffe kommen insbesondere Quellen für Fettsäuren in Frage, die in Form von Rapsöl, Kugeldistelöl, Palmkernöl, Kokosnussöl, Sonnenblumenkernöl und ähnlichen Naturprodukten aus einer Vielzahl von biologischen Quellen, insbesondere aus Pflanzen,
- 25 gewonnen werden können.

- PCT/EP 2008/067447 beschreibt ein biologisches System zur Herstellung chemisch verwandter Produkte, genauer ω -Aminocarbonsäuren, unter Verwendung einer Zelle, die eine Reihe von geeigneten enzymatischen Aktivitäten aufweist und in der Lage ist, Carbonsäuren zu
- 30 entsprechender ω -Aminocarbonsäure umzuwandeln.

Ein bekannter Nachteil des dabei verwendeten AlkBGT-Oxidasesystems aus *Pseudomonas putida* GPO1 besteht jedoch darin, dass es nicht in der Lage ist, eine selektive Oxidation von aliphatischen Alkanen zu primären Alkoholen zu leisten. Vielmehr treten eine Vielzahl von

Oxidationsprodukten auf; insbesondere erhöht sich der Anteil an höher oxidierten Produkten wie dem entsprechenden Aldehyd, Keton oder der entsprechenden Carbonsäure mit zunehmender Reaktionsdauer (C. Grant, J. M. Woodley and F. Baganz (2011), *Enzyme and Microbial Technology* 48, 480-486), was die Ausbeute an erwünschtem Amin entsprechend verringert.

Das Problem der relativ unselektiven Oxidation ist dadurch verschärft, dass die entstehenden Oxidationsprodukte strukturell sehr ähnlich sind. Dies bedingt, dass es sehr schwierig ist, sie von den erwünschten Oxidationsprodukten effizient und ohne signifikanten Ausbeuteverlust abzutrennen.

Es besteht somit Bedarf an Verfahren, bei denen die enzymatisch katalysierten Reaktionen selektiver verlaufen und die Bildung irreversibel hergestellter Nebenprodukte minimiert ist.

Vor diesem Hintergrund besteht die der Erfindung zu Grunde liegende Aufgabe darin, ein verbessertes Verfahren zur Oxidation und Aminierung von Fettsäuren unter Verwendung von Biokatalysatoren bereitzustellen.

Eine weitere der Erfindung zu Grunde liegende Aufgabe besteht darin, das Verfahren dahingehend zu verbessern, dass die Ausbeute, bezogen auf die Menge des Fettsäuresubstrates oder sonstiger Substrate, die Menge des Kohlenstoffsubstrates für zur biotechnologischen Synthese verwendete Zellen erhöht und/oder die Konzentration an Nebenprodukten oder das Verhältnis von Nebenprodukten zum erwünscht Produkt verringert wird.

Eine weitere der Erfindung zu Grunde liegende Aufgabe besteht darin, das Verfahren dahingehend zu verbessern, dass die Selektivität der eingesetzten Biokatalysatoren, insbesondere von Fettsäureoxidasen, erhöht und/oder verlängert wird, entweder zu Beginn der Reaktion, d.h. vor Erreichen eines Plateaus bei der Produktkonzentration über die Zeit, oder nach Einstellung des Gleichgewichtes, d.h. nach Erreichen des Plateaus.

Eine weitere der Erfindung zu Grunde liegende Aufgabe besteht, darin, die Aufarbeitbarkeit des bei der biotechnologischen Oxidation und/Aminierung von Fettsäuren entstehenden

Reaktionsgemisches zu verbessern, insbesondere mit Hinblick auf die Effizienz und Geschwindigkeit der Phasentrennung von hydrophilen und hydrophoben Stoffen.

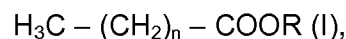
Diese und weitere Aufgaben werden durch den Gegenstand der vorliegenden Anmeldung und insbesondere auch durch den Gegenstand der beigefügten unabhängigen Ansprüche gelöst, wobei sich Ausführungsformen aus den Unteransprüchen ergeben.

Die der Erfindung zu Grunde liegende Aufgabe wird in einem ersten Aspekt gelöst durch ein Verfahren zur Oxidation einer Fettsäure oder eines Esters davon

umfassend den Schritt:

a) Oxidieren der Fettsäure oder des Esters davon durch Kontaktieren mit einer Cytochrom P450-Monooxygenase der CYP153-Familie in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff und NAD(P)H,

wobei die Fettsäure oder der Esters davon bevorzugt die Formel (I)



wobei R aus der Gruppe ausgewählt ist, die H, Methyl, Ethyl, Propyl und Butyl umfasst,

wobei n 0 bis 30, bevorzugt 6 bis 24 ist,

aufweist.

In einer ersten Ausführungsform des ersten Aspekts wird die Aufgabe gelöst durch ein Verfahren weiter umfassend die Schritte:

b) Weiteres Oxidieren der oxidierten Fettsäure oder des Esters davon aus Schritt a) durch Kontaktieren mit einer Alkoholdehydrogenase,

c) Aminieren der weiter oxidierten Fettsäure oder des Esters davon aus Schritt b) durch Kontaktieren mit einer Transaminase in Anwesenheit eines Aminodonors, bevorzugt Alanin,

5 wobei Schritt c) optional in Anwesenheit einer Alanindehydrogenase, von Ammonium und NAD(P)H erfolgt

In einer zweiten Ausführungsform, bei der es sich auch um eine Ausführungsform der ersten Ausführungsform handelt, wird die Aufgabe gelöst durch ein Verfahren, wobei die Cytochrom
10 P450-Monooxygenase der CYP153-Familie die Peptidsequenz LL(I/L)(V/I)GGNDTTRN aufweist und es sich bevorzugt um die Cytochrom P450-Monooxygenase der CYP153-Familie aus *Alcanivorax borkumensis* SK2 (Datenbankcode YP_691921) oder eine Variante davon handelt.

Diese und sämtliche weitere in diesem Dokument verwendeten Datenbankcodes stammen aus
15 der Genbank Protein-Datenbank des NCBI in dem am 9. März 2012 online verfügbaren Release.

In einer dritten Ausführungsform, bei der es sich auch um eine Ausführungsform der ersten bis zweiten Ausführungsform handelt, wird die Aufgabe gelöst durch ein Verfahren, wobei es sich
20 bei der Alkoholdehydrogenase um eine NAD(P)⁺-abhängige Alkoholdehydrogenase, bevorzugt um die NAD-abhängige Alkoholdehydrogenase aus *Escherichia coli* MS 187-1 (Datenbankcode ZP_07145023) oder eine Variante davon oder die Alkoholdehydrogenase von *Bacillus stearothermophilus* (Datenbankcode P42328) oder eine Variante davon, oder um eine Oxidoreduktase der Glucose-Methanol-Cholin-Oxidoreduktase-Familie, bevorzugt die aus
25 *Pseudomonas putida* (Datenbankcode CAB54054.1) oder eine Variante davon, oder um eine flavinhaltige Alkoholdehydrogenase, bevorzugt die flavinhaltige Alkoholdehydrogenase aus *Candida tropicalis* (Datenbankcode AAS46878.1) oder eine Variante davon, handelt.

In einer vierten Ausführungsform, bei der es sich auch um eine Ausführungsform der ersten bis
30 dritten Ausführungsform handelt, wird die Aufgabe gelöst durch ein Verfahren, wobei in Schritt a) zusätzlich eine Ferredoxin-Reduktase, bevorzugt die Ferredoxin-Reduktase aus *Alcanivorax borkumensis* SK2 (Datenbankcode YP_691923) oder eine Variante davon, und/oder ein Ferredoxin, bevorzugt das Ferredoxin aus *Alcanivorax borkumensis* SK2 (Datenbankcode YP_691920) oder eine Variante davon, anwesend ist.

In einer fünften Ausführungsform, bei der es sich auch um eine Ausführungsform der ersten bis vierten Ausführungsform handelt, wird die Aufgabe gelöst durch ein Verfahren, wobei Schritt c) in Anwesenheit einer Alanindehydrogenase, Ammonium und NADH erfolgt und es sich bei der Alanindehydrogenase um die Alanindehydrogenase aus *Bacillus subtilis subsp. subtilis* str. 168 (Datenbankcode NP_391071) oder eine Variante davon handelt.

In einer sechsten Ausführungsform, bei der es sich auch um eine Ausführungsform der ersten bis fünften Ausführungsform handelt, wird die Aufgabe gelöst durch ein Verfahren, wobei wenigstens ein Enzym aus der Gruppe umfassend Cytochrom P450-Monooxygenase der CYP153-Familie, Alkoholdehydrogenase, Transaminase, Alanindehydrogenase, Ferredoxin und Ferredoxin-Reduktase rekombinant in Form von einem Ganzzellkatalysator bereitgestellt wird.

In einer siebten Ausführungsform, bei der es sich auch um eine Ausführungsform der sechsten Ausführungsform handelt, wird die Aufgabe gelöst durch ein Verfahren, wobei sämtliche in wenigstens einem der Schritte a), b) oder c) mit der Fettsäure oder dem Ester davon, der weiter oxidierten Fettsäure oder dem Ester davon aus Schritt b) oder der aminierten weiter oxidierten Fettsäure oder dem Ester davon aus Schritt c) kontaktierten oder anwesenden Enzyme aus der Gruppe umfassend Cytochrom P450-Monooxygenase der CYP153-Familie, Alkoholdehydrogenase, Transaminase, Alanindehydrogenase, Ferredoxin und Ferredoxin-Reduktase rekombinant in Form eines oder mehr als eines Ganzzellkatalysators bereitgestellt werden.

In einer achten Ausführungsform, bei der es sich auch um eine Ausführungsform der sechsten bis siebten Ausführungsform handelt, wird die Aufgabe gelöst durch ein Verfahren, wobei der Ganzzellkatalysator zusätzlich ein Polypeptid der AlkL-Familie, bevorzugt ein AlkL aus der Gruppe umfassend AlkL aus *Pseudomonas putida* (Datenbankcode CAB69081), *Marinobacter aquaeolei* VT8 (Datenbankcode YP_957722), *Oceanicaulis alexandrii* HTCC2633 (Datenbankcode ZP_00953584), *Marinobacter manganoxydans* Mnl7-9 (Datenbankcode ZP_09158756), *Caulobacter* sp. K31 (Datenbankcode YP_001672217), *Pseudomonas oleovorans* (Datenbankcode Q00595) oder eine Variante davon exprimiert.

In einer neunten Ausführungsform, bei der es sich auch um eine Ausführungsform der ersten bis achten Ausführungsform handelt, wird die Aufgabe gelöst durch ein Verfahren, wobei es sich bei dem Ganzzellkatalysator um eine Zelle handelt, die eine ihrem Wildtyp gegenüber

verringerte Aktivität wenigstens eines Enzyms aufweist, das eine der Reaktionen der β -Oxidation von Fettsäuren katalysiert, wobei das Enzym bevorzugt aus der Gruppe ausgewählt ist, die Fettsäureimporter, Fettsäure-CoA-Ligase, Acyl-CoA-Dehydrogenase, 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase, Enoyl-CoA-Hydratase und 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase umfasst.

5

In einer zehnten Ausführungsform, bei der es sich auch um eine Ausführungsform der ersten bis neunten Ausführungsform handelt, wird die Aufgabe gelöst durch ein Verfahren, wobei die Alanindehydrogenase in Schritt c) so ausgewählt ist, dass sie den von der Alkoholdehydrogenase in Schritt b) oxidierten Redoxcofaktor, bevorzugt NAD^+ oder NADP^+ , reduziert.

10

In einem zweiten Aspekt wird die Aufgabe gelöst durch einen Ganzzellkatalysator exprimierend eine rekombinante Cytochrom P450-Monooxygenase der CYP153-Familie, eine rekombinante Alkoholdehydrogenase, eine rekombinante Transaminase und optional ein oder mehr als ein rekombinantes Enzym aus der Gruppe umfassend Alanindehydrogenase, Ferredoxin und Ferredoxin-Reduktase.

15

In einer ersten Ausführungsform des ersten Aspekts wird die Aufgabe gelöst durch einen Ganzzellkatalysator, wobei der Ganzzellkatalysator zusätzlich ein Polypeptid der AlkL-Familie, bevorzugt ein AlkL aus der Gruppe umfassend AlkL aus *Pseudomonas putida* (Datenbankcode CAB69081), *Marinobacter aquaeolei* VT8 (Datenbankcode YP_957722), *Oceanicaulis alexandrii* HTCC2633 (Datenbankcode ZP_00953584), *Marinobacter manganoxydans* Mn17-9 (Datenbankcode ZP_09158756), *Caulobacter* sp. K31 (Datenbankcode YP_001672217), *Pseudomonas oleovorans* (Datenbankcode Q00595) oder eine Variante davon exprimiert.

20

In einer zweiten Ausführungsform, bei der es sich auch um eine Ausführungsform der ersten Ausführungsform handelt, wird die Aufgabe gelöst durch einen Ganzzellkatalysator, wobei es sich bei dem Ganzzellkatalysator um eine Zelle handelt, die eine ihrem Wildtyp gegenüber verringerte Aktivität wenigstens eines Enzyms aufweist, das eine der Reaktionen der β -Oxidation von Fettsäuren katalysiert, wobei das Enzym bevorzugt aus der Gruppe ausgewählt ist, die Fettsäureimporter, Fettsäure-CoA-Ligase, Acyl-CoA-Dehydrogenase, 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase, Enoyl-CoA-Hydratase und 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase umfasst.

25

30

In einer dritten Ausführungsform, bei der es sich auch um eine Ausführungsform der ersten bis zweiten Ausführungsform handelt, wird die Aufgabe gelöst durch einen Ganzzellkatalysator, wobei der Ganzzellkatalysator eine Ferredoxin-Reduktase und ein Ferredoxin exprimiert.

- 5 In einer vierten Ausführungsform, bei der es sich auch um eine Ausführungsform der ersten bis dritten Ausführungsform handelt, wird die Aufgabe gelöst durch einen Ganzzellkatalysator, wobei der Ganzzellkatalysator eine Alanindehydrogenase exprimiert, wobei es sich um die Alanindehydrogenase aus *Bacillus subtilis subsp. subtilis* str. 168 (Datenbankcode NP_391071) oder eine Variante davon handelt.

- 10 In einer fünften Ausführungsform, bei der es sich auch um eine Ausführungsform der ersten bis vierten Ausführungsform handelt, wird die Aufgabe gelöst durch einen Ganzzellkatalysator, wobei das Cytochrom P450-Monooxygenase der CYP153-Familie die Peptidsequenz LL(I/L)(V/I)GGNDTTRN aufweist und/oder es sich um die Cytochrom P450-Monooxygenase der
15 CYP153-Familie aus *Alcanivorax borkumensis* SK2 (Datenbankcode YP_691921) oder eine Variante davon handelt, und es sich bei der Ferredoxin-Reduktase um die Ferredoxin-Reduktase aus *Alcanivorax borkumensis* SK2 (Datenbankcode YP_691923) oder eine Variante davon handelt und es sich bei dem Ferredoxin um das Ferredoxin aus *Alcanivorax borkumensis* SK2 (Datenbankcode YP_691920) oder eine Variante davon handelt.

- 20 In einer sechsten Ausführungsform, bei der es sich auch um eine Ausführungsform der ersten bis fünften Ausführungsform handelt, wird die Aufgabe gelöst durch einen Ganzzellkatalysator, wobei es sich bei der Alkoholdehydrogenase um eine NAD(P)⁺-abhängige Alkoholdehydrogenase, um eine Oxidoreduktase der Glucose-Methanol-Cholin-
25 Oxidoreduktase-Familie oder um eine flavinhaltige Alkoholoxidase handelt, bevorzugt um eine NAD(P)⁺-abhängige Alkoholdehydrogenase, am bevorzugtesten um die NAD-abhängige Alkoholdehydrogenase aus *Escherichia coli* MS 187-1 (Datenbankcode ZP_07145023) oder eine Variante davon handelt.

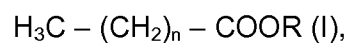
- 30 In einer siebten Ausführungsform, die auch eine weitere Ausführungsform des ersten oder zweiten Aspektes und deren Ausführungsformen darstellt, wird die Aufgabe gelöst durch einen Ganzzellkatalysator nach dem zweiten Aspekt oder einer Ausführungsform des zweiten Aspektes oder Verfahren nach dem ersten Aspekt oder einer Ausführungsform des ersten

Aspektes, wobei es sich bei der Transaminase um die Transaminase aus *Pseudomonas putida* GB-1 (Datenbankcode YP_001668026.1) oder eine Variante davon handelt.

5 In einer achten Ausführungsform, die auch eine weitere Ausführungsform des ersten oder zweiten Aspekts darstellt, handelt es sich bei der Fettsäure oder dem Ester davon um eine ungesättigte oder verzweigte Fettsäure oder Ester davon.

10 In einer neunten Ausführungsform, die auch eine weitere Ausführungsform des ersten oder zweiten Aspekts darstellt, wird die Aufgabe gelöst durch ein Verfahren, wobei wenigstens ein Enzym aus der Gruppe umfassend Cytochrom P450-Monooxygenase der CYP153-Familie, Alkoholdehydrogenase, Transaminase, Alanindehydrogenase, Ferredoxin und Ferredoxin-Reduktase rekombinant in Form von einem Ganzzellkatalysator bereitgestellt wird, oder wird die Aufgabe gelöst durch einen Ganzzellkatalysator, wobei es sich bei dem Ganzzellkatalysator um eine Zelle handelt, die eine relativ zum Wildtyp der Zelle eine verringerte Aktivität wenigstens
15 einer endogenen Aldehyddehydrogenase aufweist.

In einem dritten Aspekt wird die der Erfindung zu Grunde liegende Aufgabe gelöst durch die Verwendung des Ganzzellkatalysators nach dem zweiten Aspekt der Erfindung oder einer ihrer
20 Ausführungsformen zur Oxidation und/oder Aminierung einer Fettsäure oder eines Esters davon, wobei die Fettsäure oder der Ester davon bevorzugt die Formel (I)



25 wobei R aus der Gruppe ausgewählt ist, die H, Methyl, Ethyl, Propyl und Butyl umfasst,

wobei n 0 bis 30, bevorzugt 6 bis 24 ist,

aufweist

30 In einer ersten Ausführungsform des dritten Aspekts wird das Problem gelöst durch eine Verwendung, wobei die Oxidation eine Mischung von Oxidationsprodukten ergibt, die, bezogen auf die Stoffmenge der umgesetzten Fettsäure oder des Esters davon, wenigstens 90 % des

entsprechenden Alkohols, weniger als 1 % des entsprechenden Aldehydes und weniger als 10 % der entsprechenden Säure umfasst.

5 In einer zweiten Ausführungsform des dritten Aspekts, die auch eine weitere Ausführungsform der Ausführungsformen des dritten Aspekts darstellt, handelt es sich bei der Fettsäure um eine ungesättigte oder verzweigte Fettsäure oder Ester davon.

10 Die vorliegende Erfindung beruht auf der Erkenntnis der Erfinder, dass die Verwendung spezifischer Monooxygenasen oder von Ganzzellkatalysatoren exprimierend solche Monooxygenasen, genauer Cytochrom P450-Monooxygenase der CYP153-Familie, überraschend zur Oxidation und/oder Aminierung von Fettsäuren zur Bildung der erwünschten Produkte mit höherer Selektivität und besserer relativer Ausbeute führt.

15 Ohne an irgendeine Theorie gebunden sein zu wollen, vermuten die Erfinder, dass das aktive katalytische Zentrum dieser Monooxygenasen derart beschaffen ist, dass bereits hydroxylierte Produkte, nicht erst zum Aldehyd oder gar zur Säure oxidierte Produkte, mit geringerer Affinität gebunden und weiter oxidiert werden als es bei vergleichbaren, aus dem Stand der Technik bekannten Monooxygenasen der Fall ist.

20 Das erfindungsgemäße Verfahren sieht in Schritt a) die Oxidation von Fettsäuren durch eine Cytochrom P450-Monooxygenase der CYP153-Familie vor. In einer Ausführungsform wird unter dem Begriff „Fettsäure oder Ester davon“ eine Verbindung der Formel $\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_x-\text{COOR}$, wobei x 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 oder 30 und R Wasserstoff, Methyl, Ethyl oder Propyl, bevorzugt Wasserstoff ist. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist x 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 oder 24 und R Wasserstoff. In einer bevorzugtesten Ausführungsform handelt es sich dabei um Laurinsäure oder Laurinsäuremethylester. In einer bevorzugten 30 Ausführungsform handelt es sich um eine ungesättigte Fettsäure aus der Gruppe umfassend Myristoleinsäure, Palmitoleinsäure, Petroselinensäure, Ölsäure, Elaidinsäure, Vaccensäure, Gadoleinsäure, Icosensäure oder Erucasäure. Ebenso möglich sind Mischungen verschiedener Fettsäuren, beispielweise durch Hydrolyse und ggf. Veresterung von Kugeldistelöl, Kokosöl, Cuphea-Öl oder Palmkernöl gewonnene Mischungen von Fettsäuren oder Fettsäureestern. Da 35 nicht alle Fettsäuren in nennenswertem Maß bei Raumtemperatur löslich sind, kann es notwendig sein, weitere Maßnahmen zu ergreifen, wie beispielsweise die Erhöhung der

Temperatur oder, bevorzugterweise, die Zugabe eines organischen Lösungsmittels, um sie der wässrigen Phase zugänglich zu machen. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform findet eine Fettsäure oder ein Ester davon, am bevorzugtesten Laurinsäuremethylester oder Ölsäure, als ein solches weiteres Lösungsmittel Verwendung.

5

Wie bei allen in dieser Anmeldung genannten Verbindungen umfassen Fettsäuren nicht nur die protonierte Form der Fettsäure, sondern auch sämtliche in wässriger Lösung dissoziierte Formen, Formulierungen oder Salze. Beispielsweise umfasst der Begriff Laurinsäure auch Laureat oder Natriumlaureat. Als weiteres Beispiel umfasst die Aminosäure Alanin die in
10 Wasser an der Carboxylgruppe deprotonierten oder protonierten und die an der Aminogruppe protonierten oder deprotonierten Formen.

Das erfindungsgemäße Verfahren sieht nicht nur die Oxidation zur hydroxylierten Fettsäure vor, sondern ermöglicht die effiziente Umsetzung von Fettsäuren zur entsprechenden ω -
15 Aminocarbonsäure mittels eines Enzymsystems umfassend eine Cytochrom P450-Monooxygenase der CYP153-Familie, eine Alkoholdehydrogenase, eine Transaminase und optional eine Aminosäuredehydrogenase. Die Verwendung derartiger Enzyme erfolgt unter Bedingungen, die mit deren enzymatischer Aktivität kompatibel sind. Dazu gehört zunächst die Auswahl eines geeigneten wässrigen Puffersystems umfassend wenigstens einen pH-
20 stabilisierenden Puffer, beispielsweise Natriumphosphat, optional zusätzlich wenigstens ein Salz, beispielsweise Natriumchlorid, bei einem geeigneten pH-Wert. In einer bevorzugtesten Ausführungsform beträgt der pH-Wert 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7, 5, 8, 8,5, 9 oder 10, bevorzugt 2,5 bis 7,5 besonders bevorzugt 5,5 bis 7,5. Auch die Temperatur muss auf die Aktivität des zu verwendenden Enzyms oder der zu verwendenden Enzyme abgestimmt sein. In einer
25 bevorzugten Ausführungsform beträgt die Temperatur 1 bis 45, noch bevorzugter 20 bis 45, am bevorzugtesten 28 bis 42 °C. Die Auswahl eines geeigneten Puffersystems und die Stabilisierung der Aktivität kann der Fachmann anhand von Standardverfahren, siehe beispielsweise A Cornish-Bowden (1995), Fundamentals of Enzyme Kinetics, Portland Press Limited, 1995, vornehmen. Die Aktivität der Cytochrom P450-Monooxygenase der CYP153-
30 Familie, ohne oder in Kombination mit Ferredoxin und Ferredoxin-Reduktase, kann mittels des von Scheps, D., Malca, H., Hoffmann, B., Nestl, B. M., und Hauer, B. (2011) *Org. Biomol. Chem.*, 9, 6727 beschriebenen Assays bestimmt werden. Ob Ferredoxin und/oder Ferredoxin-Reduktase aktiv sind, erkennt der Fachmann durch eine erhebliche Aktivitätssteigerung der Monooxygenase in Anwesenheit der beiden aktiven Enzyme gegenüber deren Abwesenheit.

Ein Enzymtest für die Aktivität von Transaminasen wird von Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, vertrieben („Alanine Transaminase Activity Assay Kit, Item No. 700260“). Die Aktivität einer Aminosäuredehydrogenase lässt sich nach Germano, H. J., und Anderson, K. E. (1968), J. Bact. 96 (1), Seite 55-60, bestimmen.

5

Die Verwendung von Enzymen erfordert weiterhin die Anwesenheit aller notwendigen Substrate. So ist für die Aktivität der Cytochrom P450-Monooxygenase der CYP153-Familie neben der erfindungsgemäß umzusetzenden Fettsäure oder des Esters davon die Anwesenheit von Sauerstoff und eines Elektronendonors notwendig. Vorzugsweise wird Sauerstoff durch Kontakt der Reaktionsmischung umfassend Enzyme(e) oder Zellen und Substrate mit atmosphärischer Luft, alternativ mit reinem Sauerstoff oder mit Sauerstoff angereicherter atmosphärischer Luft verfügbar gemacht, besonders bevorzugt durch Rühren der Reaktionsmischung, während diese mit atmosphärischer Luft, alternativ mit reinem Sauerstoff oder mit Sauerstoff angereicherter atmosphärischer Luft, in Kontakt steht.

15

Zur optimalen Versorgung der Cytochrom P450-Monooxygenase der CYP153-Familie mit Elektronen aus dem Reduktionsmittel, bevorzugt NADH, ist es bevorzugt, dass die Monooxygenase zusammen mit funktionell mit ihr wechselwirkender Ferredoxin-Reduktase und funktionell mit ihr wechselwirkendem Ferredoxin verwendet wird. Dabei kann es sich um isolierte oder bei der Verwendung eines Ganzzellkatalysators um co-exprimierte Polypeptide oder um N- oder C-terminal mit der Cytochrom P450-Monooxygenase der CYP153-Familie fusionierte Polypeptide handeln. Ob eine Ferredoxin-Reduktase oder ein Ferredoxin mit einer gegebenen Cytochrom P450-Monooxygenase der CYP153-Familie mit einander funktionell wechselwirken, kann der Fachmann leicht dadurch feststellen, ob das Reduktionsmittel in Gegenwart eines Alkansubstrates und der drei Polypeptide oxidiert wird. Alternativ kann der von Scheps, D., Malca, H., Hoffmann, B., Nestl, B. M, und Hauer, B. (2011) *Org. Biomol. Chem.*, 9, 6727 beschriebene Enzymtest verwendet werden, der im Fall funktionell wechselwirkender Polypeptide eine deutliche Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit zeigt. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform stammen die Cytochrom P450-Monooxygenase der CYP153-Familie, das Ferredoxin und die Ferredoxin-Reduktase aus dem gleichen Organismus. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich um die Ferredoxin-Reduktase aus *Alcanivorax borkumensis* SK2 (Datenbankcode YP_691923) oder eine Variante davon, das Ferredoxin aus *Alcanivorax borkumensis* SK2 (Datenbankcode YP_691920) oder eine Variante

30

davon und die Cytochrom P450-Monooxygenase der CYP153-Familie aus *Alcanivorax borkumensis* SK2 (Datenbankcode YP_691921) oder eine Variante davon.

Bei allen erfindungsgemäß eingesetzten Enzymen kann es sich um Zellen umfassend
5 entsprechende enzymatisch aktive Polypeptide oder deren Lysate oder Präparationen der
Polypeptide in sämtlichen Aufreinigungsstufen, vom kruden Lysat bis zum reinen Polypeptid,
oder Ganzzellkatalysatoren handeln. Dem Fachmann auf dem Gebiet sind zahlreiche Verfahren
bekannt, mit denen enzymatisch aktive Polypeptide in geeigneten Zellen überexprimiert und
aufgereinigt bzw. isoliert werden können. Zur Expression der Polypeptide können sämtliche
10 dem Fachmann zur Verfügung stehende Expressionssysteme verwendet werden. Zur
Aufreinigung kommen chromatographische Verfahren in Frage, beispielsweise die
affinitätschromatographische Aufreinigung eines mit einem Tag versehenen rekombinanten
Proteins unter Verwendungen eines immobilisierten Liganden, beispielsweise eines Nickelions
im Falle eines Histidin-Tags, von immobilisiertem Glutathion im Falle einer an das Zielprotein
15 fusionierten Glutathion-S-Transferase oder von immobilisierter Maltose im Falle eines Tags
umfassend Maltose-bindendes Protein. Für zahlreiche biotechnologisch bedeutsame Arten von
Zellen, z.B. *E. coli*, sind geeignete Verfahren und Vektoren bekannt, die für die Expression oder
Überexpression eines Nukleinsäuremoleküls verwendet werden können, beispielsweise die
Vektoren vom Typ pET oder pGEX und für deren Expression geeignete Zellen (B A Moffatt, and
20 F W Studier (1986) *J. Mol. Biol.* **189**, 113–130, A H Rosenberg, B N Lade, D Chui, S Lin, J J
Dunn, and F W Studier (1987) *Gene* **56**, 125–135 und F W Studier, A H Rosenberg, J J Dunn,
and J W Dubendorff (1990) *Meth. Enzymol.* **185**, 60–89.

Die aufgereinigten Enzyme können entweder in löslicher Form oder immobilisiert eingesetzt
25 werden. Dem Fachmann sind geeignete Verfahren bekannt, mit denen Polypeptide an
organischen oder anorganischen Festphasen kovalent oder nichtkovalent immobilisiert werden
können, beispielsweise durch Sulfhydryl-Kopplungs-Chemie (z.B. Kits der Firma Pierce).
Zellmembranassoziierte oder in Zellmembranen eingebettete Enzyme können in Form von
Membranpräparationen oder solubilisiert verwendet werden.

30 Im Falle der Verwendung wenigstens eines Ganzzellkatalysators ist bei längerer Reaktionszeit
zu beachten, dass die Bedingungen mit der Lebensfähigkeit der wenigstens einen als
Ganzzellkatalysator eingesetzten Zelle kompatibel sind. Der Fachmann kann Standardwerken,
beispielsweise Fuchs/Schlegel (2007) *Allgemeine Mikrobiologie*, 2008, Georg Thieme Verlag,

Bedingungen und Lösungen entnehmen, die die Erhaltung solcher Zellen in einem lebensfähigen Zustand ermöglichen.

In einer bevorzugten Ausführungsform versteht man unter dem Begriff „Ganzzellkatalysator“, wie hierin verwendet, eine intakte, lebensfähige und metabolisch aktive Zelle, die eine erwünschte enzymatische Aktivität bereitstellt. Der Ganzzellkatalysator kann das zu verstoffwechselnde Substrat, im Falle der vorliegenden Erfindung den Alkohol oder das daraus entstehende Oxidationsprodukt, entweder ins Zellinnere transportieren, wo es von cytosolischen Enzymen verstoffwechselt wird, oder er kann das Enzym von Interesse auf seiner Oberfläche präsentieren, wo es gegenüber Substraten im Medium direkt exponiert ist. Dem Fachmann sind zahlreiche Systeme zur Herstellung von Ganzzellkatalysatoren bekannt, beispielsweise aus der DE 60216245.

Bei der Verwendung eines Ganzzellkatalysators kann sich das Problem stellen, dass ein Substrat mit einem intrazellulär lokalisierten Enzym in Kontakt gebracht werden muss, damit es zur erwünschten Reaktion kommt. Im Falle langkettiger Alkane und Derivate davon ist bevorzugt, dass der Ganzzellkatalysator ein Polypeptid der AlkL-Familie aufweist. In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei einem „Polypeptid der AlkL-Familie“, wie hierin verwendet, um ein Polypeptid, das über eine Länge von 230 aufeinander abfolgenden Aminosäuren eine wenigstens 80, bevorzugt 90, noch bevorzugter 90%ige Sequenzidentität zu AlkL aus *Pseudomonas putida* (Datenbankcode CAB69081) und bevorzugt die Fähigkeit aufweist, den Import von langkettigen Alkanen ins Innere einer Zelle zu unterstützen. In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei einem „Polypeptid der AlkL-Familie“, wie hierin verwendet, um eine in der äußeren Membran eines Gram-negativen Bakteriums lokalisiertes Polypeptid, welches das Sequenzmotiv DXWAPAXQ(V/A)GXR, aufweist, wobei X eine proteinogene Aminosäure darstellt, und bevorzugt zusätzlich AlkL aus *Pseudomonas putida* (Datenbankcode CAB69081) oder eine Variante davon ist. Beispielhafte Mitglieder der AlkL-Familie umfassen AlkL aus *Pseudomonas putida* (Datenbankcode CAB69081), *Marinobacter aquaeolei* VT8 (Datenbankcode YP_957722), *Oceanicaulis alexandrii* HTCC2633 (Datenbankcode ZP_00953584), *Marinobacter manganoxydans* Mnl7-9 (Datenbankcode ZP_09158756), *Caulobacter* sp. K31 (Datenbankcode YP_001672217), *Pseudomonas oleovorans* (Datenbankcode Q00595) und Varianten davon.

Für eine Reihe von Anwendungen empfiehlt sich die Verwendung isolierter Enzyme. In einer bevorzugten Ausführungsform bedeutet der Begriff „isoliert“, wie hierin verwendet, dass das Enzym in reinerer und/oder aufkonzentrierter Form vorliegt als in seiner natürlichen Quelle. In einer bevorzugten Ausführungsform gilt das Enzym als isoliert, wenn es ein Polypeptidenzym ist und mehr als 60, 70, 80, 90 oder bevorzugt 95 % des Massenproteinanteils der entsprechenden Präparation ausmacht. Dem Fachmann sind zahlreiche Verfahren zur Messung der Masse eines Proteins in einer Lösung bekannt, beispielsweise die visuelle Abschätzung anhand der Dicke von entsprechenden Proteinbanden auf SDS-Polyacrylamidgelen, NMR-Spektroskopie oder massenspektrometrie-basierten Verfahren.

Bei den erfindungsgemäß verwendeten Enzymen handelt es sich bevorzugt um rekombinante Enzyme. In einer bevorzugten Ausführungsform wird unter dem Begriff „rekombinant“, wie hierin verwendet, verstanden, dass das entsprechende Nukleinsäure-Molekül in der Natur nicht vorkommt und/oder es unter Verwendung von gentechnischen Methoden hergestellt wurde. In einer bevorzugten Ausführungsform spricht man von einem rekombinanten Protein, wenn das entsprechende Polypeptid von einer rekombinanten Nukleinsäure kodiert ist. In einer bevorzugten Ausführungsform wird unter einer rekombinanten Zelle, wie hierin verwendet, eine Zelle verstanden, die wenigstens eine rekombinante Nukleinsäure oder ein rekombinantes Polypeptid aufweist. Dem Fachmann sind zum Herstellen rekombinanter Moleküle oder Zellen geeignete Verfahren bekannt, beispielsweise die in Sambrook/Fritsch/Maniatis (1989): Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition, beschriebenen.

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der als Ganzzellkatalysator oder bei der als Expressionssystem verwendeten Zelle um eine prokaryotische, bevorzugt um eine bakterielle Zelle. Es ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass aufgrund der guten genetischen Zugänglichkeit Mikroorganismen eingesetzt werden; ausgewählt aus der Gruppe der Bakterien, besonders aus der Gruppe enthaltend, bevorzugt bestehend aus, , *Magnetococcus*, *Mariprofundus*, *Acetobacter*, *Acidiphilium*, *Afipia*, *Ahrensia*, *Asticcacaulis*, *Aurantimonas*, *Azorhizobium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bartonella*, *tribocorum*, *Beijerinckia*, *Bradyrhizobium*, *Brevundimonas*, *subvibrioides*, *Brucella*, *Caulobacter*, *Chelativorans*, *Citreicella*, *Citromicrobium*, *Corynebacterium*, *Dinoroseobacter*, *Erythrobacter*, *Fulvimarina*, *Gluconacetobacter*, *Granulibacter*, *Hirschia*, *Hoeflea*, *Hyphomicrobium*, *Hyphomonas*, *Ketogulonicigenium*, *Labrenzia*, *Loktanella*, *Magnetospirillum*, *Maricaulis*, *Maritimibacter*,

Mesorhizobium, *Methylobacterium*, *Methylocystis*, *Methylosinus*, *Nitrobacter*, *Novosphingobium*,
Oceanibulbus, *Oceanicaulis*, *Oceanicola*, *Ochrobactrum*, *Octadecabacter*, *Oligotropha*,
Paracoccus, *Parvibaculum*, *Parvularcula*, *Pelagibaca*, *Phaeobacter*, *Phenylobacterium*,
Polymorphum, *Pseudovibrio*, *Rhodobacter*, *Rhodomicrobium*, *Rhodopseudomonas*,
5 *Rhodospirillum*, *Roseibium*, *Roseobacter*, *Roseomonas*, *Roseovarius*, *Ruegeria*, *Sagittula*,
Silicibacter, *Sphingobium*, *Sphingomonas*, *Sphingopyxis*, *Starkeya*, *Sulfitobacter*,
Thalassibium, *Xanthobacter*, *Zymomonas*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*,
Anaplasma, *Ehrlichia*, *Neorickettsia*, *Orientia*, *Rickettsia*, *Wolbachia*, *Bordetella*, *Burkholderia*,
Cupriavidus, *taiwanensis*, *Lautropia*, *Limnobacter*, *Polynucleobacter*, *Ralstonia*,
10 *Chromobacterium*, *Eikenella*, *corrodens*, *Basfia*, *Kingella*, *Laribacter*, *Lutiella*, *Neisseria*,
Simonsiella, *Achromobacter*, *Acidovorax*, *Alicyciphilus*, *Aromatoleum*, *Azoarcus*, *Comamonas*,
Dechloromonas, *Delftia*, *Gallionella*, *Herbaspirillum*, *Herminiimonas*, *Hylemonella*,
Janthinobacterium, *Leptothrix*, *Methylibium*, *Methylobacillus*, *Methylophilales*, *Methyloversatilis*,
Methylovorus, *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Oxalobacter*, *Parasutterella*, *Polaromonas*,
15 *Polaromonas*, *Pusillimonas*, *Rhodoferax*, *Rubrivivax*, *Sideroxydans*, *Sutterella*, *wadsworthensis*,
Taylorella, *Thauera*, *Thiobacillus*, *Thiomonas*, *Variovorax*, *Verminephrobacter*,
Anaeromyxobacter, *Bdellovibrio*, *bacteriovorus*, *Bilophila*, *Desulfarculus*, *Desulfatibacillum*,
Desulfobacca, *Desulfobacterium*, *Desulfobulbus*, *Desulfococcus*, *Desulfohalobium*,
Desulfitobacterium, *Desulfomicrobium*, *Desulfonatronospira*, *Desulfotalea*, *Desulfovibrio*,
20 *Desulfuromonas*, *Geobacter*, *Haliangium*, *Hipaea*, *Lawsonia*, *Myxococcus*, *Pelobacter*,
Plesiocystis, *Sorangium*, *Stigmatella*, *Syntrophobacter*, *Syntrophus*, *Arcobacter*, *Caminibacter*,
Campylobacter, *Helicobacter*, *Nitratifactor*, *Nitratiruptor*, *Sulfuricurvum*, *Sulfurimonas*,
Sulfurospirillum, *Sulfurovum*, *Wolinella*, *Buchnera*, *Blochmannia*, *Hamiltonella*, *Regiella*, *Riesia*,
Citrobacter, *Cronobacter*, *Dickeya*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Klebsiella*,
25 *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Proteus*, *Providencia*, *Rahnella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*,
Sodalis, *Wigglesworthia*, *Glossina*, *Xenorhabdus*, *Yersinia*, *Acidithiobacillus*, *Acinetobacter*,
Aeromonas, *Alcanivorax*, *Alkalilimnicola*, *Allochromatium*, *Alteromonadales*, *Alteromonas*,
Baumannia, *Beggiatoa*, *Bermanella*, *Carsonella*, *Ruthia*, *Vesicomysocius*, *Cardiobacterium*,
Chromohalobacter, *Colwellia*, *Congregibacter*, *Coxiella*, *Dichelobacter*, *Endoriftia*,
30 *Enhydrobacter*, *Ferrimonas*, *Francisella*, *Glaciecola*, *Hahella*, *Halomonas*, *Halorhodospira*,
Halothiobacillus, *Idiomarina*, *Kangiella*, *Legionella*, *Marinobacter*, *Marinomonas*, *Methylobacter*,
Methylococcus, *Methylomicrobium*, *Methylophaga*, *Moraxella*, *Moritella*, *Neptuniibacter*,
Nitrococcus, *Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter*, *Psychromonas*, *Reinekea*, *Rickettsiella*,
Saccharophagus, *Shewanella*, *Succinatimonas*, *Teredinibacter*, *Thioalkalimicrobium*,

Thioalkalivibrio, *Thiomicrospira*, *Tolumonas*, *Vibrionales*, *Actinobacillus*, *Aggregatibacter*, *Gallibacterium*, *Haemophilus*, *Histophilus*, *Mannheimia*, *Pasteurella*, *Azotobacter*, *Cellvibrio*, *Pseudomonas*, *Aliivibrio*, *Grimontia*, *Photobacterium*, *Photobacterium*, *Vibrio*, *Pseudoxanthomonas*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas*, *Xylella*, *Borrelia*, *Brachyspira*,
5 *Leptospira*, *Spirochaeta*, *Treponema*, *Hodgkinia*, *Puniceispirillum*, *Liberibacter*, *Pelagibacter*,
Odyssella, *Accumulibacter*, insbesondere *B. subtilis*, *B. megaterium*, *C. glutamicum*, *E. coli*,
Pseudomonas sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*,
Acinetobacter sp., *Burkholderia* sp., *Burkholderia thailandensis*, Cyanobakterien, *Klebsiella* sp.,
Klebsiella oxytoca, *Salmonella* sp., *Rhizobium* sp. und *Rhizobium meliloti*, wobei *E. coli*
10 besonders bevorzugt ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird unter dem Begriff „Cytochrom P450-Monooxygenase der CYP153-Familie“ eine cytosolische Oxidase verstanden, die Teil eines 3 Komponenten-Systems ist, das weiterhin ein Ferredoxin und eine Ferredoxin-Reduktase
15 umfasst, mit einer Alkan-Bindestelle und der Fähigkeit, Alkane zu hydroxylieren. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich um ein Enzym, das zu wenigstens 80, bevorzugt 90, am bevorzugtesten 95 oder 99 Prozent Sequenzidentität zur Cytochrom P450-Monooxygenase der CYP153-Familie aus *Alcanivorax borkumensis* SK2 (Datenbankcode YP_691921) aufweist oder um ein Enzym, das eine Polypeptidsequenz umfasst, die wenigstens
20 80, bevorzugt 90, am bevorzugtesten 95 oder 99 Prozent Sequenzidentität zur Cytochrom P450-Monooxygenase der CYP153-Familie aus *Alcanivorax borkumensis* SK2 (Datenbankcode YP_691921) aufweist und darüber hinaus Alkanhydroxylase-Aktivität aufweist. In einer bevorzugten Ausführungsform ist unter dem Begriff „Alkanhydroxylase-Aktivität“, wie hierin verwendet, die Fähigkeit zu verstehen, die Hydroxylierung von Alkanen oder unsubstituierten
25 linearen Alkylresten umfassend wenigstens fünf, bevorzugt zwölf Kohlenstoffstoffreste zu katalysieren. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird unter dem Begriff „Cytochrom P450-Monooxygenase der CYP153-Familie“ eine nicht membrangebundene Oxidase verstanden, die eine Bindestelle für Alkane, unsubstituierte lineare Alkylreste umfassend wenigstens fünf, bevorzugt zwölf Kohlenstoffstoffreste oder einfach hydroxylierte Alkane und
30 deren Polypeptidkette das Motiv LL(I/L)(V/I)GGNDTTRN umfasst. In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei einer „Cytochrom P450-Monooxygenase der CYP153-Familie“, wie hierin verwendet, um eine Cytochrom P450-Monooxygenase der CYP153-Familie aus *Alcanivorax borkumensis* SK2 (Datenbankcode YP_691921) oder eine Variante, die bevorzugt Alkanhydroxylaseaktivität aufweist.

Die Verwendung von Cytochrom P450-Monooxygenasen der CYP153-Familie zur Hydroxylierung von Alkanen ist im Stand der Technik beschrieben, ebenso Enzymtests zur Bestimmung der Enzymaktivität und Verfahren zur Expression und Aufreinigung (Scheeps, D.,
5 Malca, H., Hoffmann, B., Nestl, B. M, und Hauer, B. (2011) *Org. Biomol. Chem.*, 9, 6727). Neben einem zu oxidierenden Alkan oder unsubstituiertem linearen Alkylrest umfassend wenigstens fünf, bevorzugt zwölf Kohlenstoffstoffreste umfassen die für die Reaktion des Enzyms umfassenden Substrate Sauerstoff und Elektronen, die in Form von NADH bevorzugt über die anderen beiden Komponenten, Ferredoxin und eine Ferredoxin-Reduktase, auf die
10 Oxidase übertragen werden. Scheeps *et al.* (2011) sowie Roome, P. W., Jr., Philley, J. C., und Peterson (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 2593, Roome, P.W., and Peterson, J. A. (1988), *Arch. Biochem. Biophys.*, 266, 41 und Peterson, J. A., Lorence, M. C., und Amarneh, B. (1990) *J. Biol. Chem*, 265, 6066 offenbaren auch Verfahren zur Gewinnung von Ferredoxin und Ferredoxin-Reduktase in funktioneller Form.

15 Erfindungsgemäß wird in Schritt b) eine Alkoholdehydrogenase zur Oxidation des in Schritt a) entstandenen Fettsäurealkohols eingesetzt. Alkoholdehydrogenasen stellen eine seit Jahrzehnten in der Biochemie im Zusammenhang mit brauereitechnischen Fermentationsprozessen stark beachtete und biotechnologisch hochrelevante Enzymklasse
20 dar, die verschiedene Gruppen von Isoformen umfasst. So existieren membrangebundene, flavinabhängige Alkoholdehydrogenasen vom *Pseudomonas putida* GPO1 AlkJ-Typ, die Flavocofaktoren statt NAD^+ verwenden. Eine weitere Gruppe umfasst eisenhaltige, gegenüber Sauerstoff empfindliche Alkoholdehydrogenasen, die in Bakterien und in inaktiver Form in Hefe gefunden werden. Eine andere Gruppe umfasst NAD^+ -abhängige Alkoholdehydrogenasen,
25 unter ihnen zinkhaltige Alkoholdehydrogenasen, bei denen das aktive Zentrum ein cysteinkoordiniertes Zinkatom aufweist, das das Alkoholsubstrat fixiert. In einer bevorzugten Ausführungsform wird unter dem Begriff „Alkoholdehydrogenase“, wie hierin verwendet, ein Enzym verstanden, das ein Aldehyd bzw. Keton zu dem entsprechenden primären bzw. sekundären Alkohol oxidiert. Bevorzugt handelt es sich bei der Alkoholdehydrogenase im
30 erfindungsgemäßen Verfahren um eine NAD^+ -abhängige Alkoholdehydrogenase, d.h. eine Alkoholdehydrogenase, die NAD^+ als Cofaktor zur Oxidation des Alkohols bzw. NADH zur Reduktion des entsprechenden Aldehyds bzw. Ketons verwendet. In der bevorzugtesten Ausführungsform handelt es sich bei der Alkoholdehydrogenase um eine NAD^+ -abhängige, zinkhaltige Alkoholdehydrogenase.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Alkoholdehydrogenase um eine Alkoholdehydrogenase Oxidoreduktase der Glucose-Methanol-Cholin-Oxidoreduktase-Familie. In einer bevorzugten Ausführungsform wird unter dem Begriff „Oxidoreduktase der Glucose-Methanol-Cholin-Oxidoreduktase-Familie“, wie hierin verwendet, eine Alkoholdehydrogenase verstanden, die FAD als Cofaktor umfasst und bevorzugt das Enzym aus *Pseudomonas putida* (Datenbankcode CAB69081) oder eine Variante davon darstellt. Beispiele umfassen SEQ ID NO 26, 27, 28 und 29 sowie das Enzym aus *Pseudomonas putida* (Datenbankcode CAB69081).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der Alkoholdehydrogenase um eine Alkoholdehydrogenase der Familie der flavinhaltigen Alkoholdehydrogenasen. In bevorzugten Ausführungsform wird unter dem Begriff „Familie der flavinhaltigen Alkoholdehydrogenasen“, wie hierin verwendet, die Gruppe von Alkoholoxidasen verstanden, die ein Hämprotein vom c-Typ darstellen und FAD als Cofaktor enthalten und bevorzugt zusätzlich zur Gruppe des Enzyms mit dem Datenbankcode AAS46878.1 und Varianten davon gehören. Beispielhafte flavinhaltige Alkoholdehydrogenasen umfassen die Enzyme mit den Datenbankcodes AAS46878.1, AAS46880.1 aus *Candida tropicalis* und das Enzyme mit dem Datenbankcode CAB75351.1 aus *Candida cloacae*.

Erfindungsgemäß wird in Schritt c) eine Transaminase verwendet. In einer bevorzugten Ausführungsform wird unter dem Begriff „Transaminase“, wie hierin verwendet, ein Enzym verstanden, das die Übertragung von α -Aminogruppen von einem Donor-, bevorzugt eine Aminosäure, auf ein Akzeptormolekül, bevorzugt eine α -Ketocarbonsäure, katalysiert. In einer bevorzugten Ausführungsform wird unter dem Begriff „Amindonor“, wie hierin verwendet, eine L-Aminosäure verstanden, deren Aminogruppe von der Transaminase auf die α -Ketocarbonsäure unter Bildung einer Aminosäure übertragen werden kann. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Amindonor um L-Alanin. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Transaminase aus der Gruppe von Transaminasen und deren Varianten ausgewählt, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie an der Position der Aminosäuresequenz, die Val224 aus der Transaminase von *Pseudomonas putida* GB-1 (Datenbankcode YP_001668026.1) entspricht, eine Aminosäure ausgewählt aus der Gruppe umfassend Isoleucin, Valin, Phenylalanin, Methionin und Leucin aufweist, und an der Position der Aminosäuresequenz, die Gly230 aus der Transaminase von *Pseudomonas putida* GB-1

(Datenbankcode YP_001668026.1) entspricht, eine andere Aminosäure als Threonin und bevorzugt eine Aminosäure aus der Gruppe umfassend Serin, Cystein, Glycin und Alanin aufweist. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Transaminase aus der Gruppe ausgewählt, die die ω -Transaminase aus *Chromobacterium violaceum* DSM30191, 5 Transaminasen aus *Pseudomonas putida* GB-1, *Pseudomonas putida* W619, aus *Pseudomonas aeruginosa* PA01, *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Pseudomonas putida* (Datenbankcode YP_001668026), *Pseudomonas putida* (Datenbankcode YP_001668026.1 or YP_001671460); *Rhodobacter sphaeroides* (strain ATCC 17023; Datenbankcode YP_353455) und *Streptomyces avermitilis* MA 4680 sowie Varianten davon umfasst.

10 In einer bevorzugten Ausführungsform wird unter dem Begriff „Alanindehydrogenase“, wie hierin verwendet, ein Enzym verstanden, das die Umwandlung von L-Alanin unter Verbrauch von Wasser und NAD(P)⁺ zu Pyruvat, Ammoniak und NAD(P)H katalysiert. Bevorzugt handelt es sich bei der Alanindehydrogenase um eine intrazelluläre Alanindehydrogenase, noch 15 bevorzugter um eine rekombinante intrazelluläre Alanindehydrogenase eines bakteriellen Ganzzellkatalysators. Beispiele umfassen die Enzyme aus *Rhizobium leguminosarum* (Datenbankcode YP_002975437), *Bacillus megaterium* (Datenbankcode YP_003565624), *Rhodobacter capsulatus* (Datenbankcode ADE84249.1) und *Bacillus subtilis* (Datenbankcode NP_391071).

20 Während die Alkoholdehydrogenase in Schritt b), sofern es sich um eine NAD(P)-abhängige handelt, pro umgesetztes Substratmolekül ein Molekül des Redoxcofaktors NAD(P)H verbraucht, oxidiert die Aminodehydrogenase NAD(P)H. Besonders vorteilhaft ist daher die Verwendung eines Systems, bei dem Alkoholdehydrogenase und Aminosäuredehydrogenase 25 den gleichen Redoxcofaktor umsetzen. NADP-abhängige Alkoholdehydrogenasen umfassen das Enzym aus *E. coli* (YjgB, Datenbankcode ZP_07117674) und ein weiteres Enzym aus *E. coli* (YahK, Datenbankcode BAE76108.1). NAD-abhängige Alkoholdehydrogenasen umfassen ein Enzym aus *E. coli* (AdhP, Datenbankcode ZP_07145023), das Enzym aus *Bacillus subtilis* (Datenbankcode NP_391071), das Enzym aus *Bacillus stearothermophilus* (Datenbankcode 30 P42328.1) und das Enzym aus *Rhizobium leguminosarum* (Datenbankcode YP_002975437). NADP-abhängige Alanindehydrogenasen umfassen das Enzym aus *Rhodobacter capsulatus* (Datenbankcode ADE84249.1). NAD-abhängige Alanindehydrogenasen umfassen die Alanindehydrogenase aus *Bacillus subtilis subsp. subtilis* str. 168 (Datenbankcode NP_391071).

Die Lehre der vorliegenden Erfindung kann nicht nur unter Verwendung der bzw. auf die exakten Aminosäure- oder Nukleinsäuresequenzen der hierin beschriebenen biologischen Makromoleküle ausgeführt bzw. angewendet werden, sondern auch unter Verwendung von
5 oder auf Varianten derartiger Makromoleküle, die durch Deletion, Addition oder Substitution einer oder mehr als einer Aminosäuren oder Nukleinsäuren erhalten werden können. In einer bevorzugten Ausführungsform bedeutet der Begriff „Variante“ einer Nukleinsäuresequenz oder Aminosäuresequenz, im Folgenden gleichbedeutend und austauschbar mit dem Begriff „Homologon“ gebraucht, wie hierin verwendet, eine andere Nukleinsäure- oder
10 Aminosäuresequenz, die mit Hinblick auf die entsprechende ursprüngliche Wildtyp-Nukleinsäure- oder -aminosäuresequenz eine Homologie, hier gleichbedeutend mit Identität verwendet, von 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 96, 98, 99 % oder mehr Prozent aufweist, wobei bevorzugt andere als die das katalytisch aktive Zentrum ausbildende Aminosäuren oder für die Struktur oder Faltung essentielle Aminosäuren deletiert oder substituiert sind oder solche
15 lediglich konservativ substituiert sind, beispielsweise ein Glutamat statt einem Aspartat oder ein Leucin statt einem Valin. Der Stand der Technik beschreibt Algorithmen, die verwendet werden können, um das Ausmaß von Homologie von zwei Sequenzen zu berechnen, z. B. Arthur Lesk (2008), Introduction to bioinformatics, 3rd edition. In einer weiteren bevorzugteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weist die Variante einer Aminosäure- oder
20 Nukleinsäuresequenz, bevorzugt zusätzlich zur oben genannten Sequenzhomologie, im Wesentlichen die gleiche enzymatische Aktivität des Wildtypmoleküls bzw. des ursprünglichen Moleküls auf. Zum Beispiel weist eine Variante eines als Protease enzymatisch aktiven Polypeptids die gleiche oder im Wesentlichen die gleiche proteolytische Aktivität wie das Polypeptidenzym auf, d.h. die Fähigkeit, die Hydrolyse einer Peptidbindung zu katalysieren. In
25 einer besonderen Ausführungsform bedeutet der Begriff „im Wesentlichen die gleiche enzymatische Aktivität“ eine Aktivität mit Hinblick auf die Substrate des Wildtyp-Polypeptids, die deutlich über der Hintergrundaktivität liegt oder/und sich um weniger als 3, bevorzugter 2, noch bevorzugter eine Größenordnung von den K_M - und/oder k_{cat} - Werten unterscheidet, die das Wildtyppolypeptid mit Hinblick auf die gleichen Substrate aufweist. In einer weiteren
30 bevorzugten Ausführungsform umfasst der Begriff „Variante“ einer Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenz wenigstens einen aktiven Teil/oder Fragment der Nukleinsäure- bzw. Aminosäuresequenz. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform bedeutet der Begriff „aktiver Teil“, wie hierin verwendet, eine Aminosäuresequenz oder eine Nukleinsäuresequenz, die eine geringere als die volle Länge der Aminosäuresequenz aufweist bzw. für eine geringere

als die volle Länge der Aminosäuresequenz kodiert, wobei die Aminosäuresequenz oder die kodierte Aminosäuresequenz mit geringerer Länge als der Wildtyp-Aminosäuresequenz im Wesentlichen die gleiche enzymatische Aktivität wie das Wildtyppolypeptid oder eine Variante davon aufweist, beispielsweise als Protease. In einer besonderen Ausführungsform umfasst der Begriff „Variante“ einer Nukleinsäure eine Nukleinsäure, deren komplementärer Strang, bevorzugt unter stringenten Bedingungen, an die Wildtyp-Nukleinsäure bindet. Die Stringenz der Hybridisierungsreaktion ist für den Fachmann leicht bestimmbar und hängt im Allgemeinen von der Länge der Sonde, den Temperaturen beim Waschen und der Salzkonzentration ab. Im Allgemeinen benötigen längere Sonden höhere Temperaturen zum Hybridisieren, wohingegen kürzere Proben mit geringen Temperaturen auskommen. Ob Hybridisierung stattfindet, hängt im Allgemeinen von der Fähigkeit der denaturierten DNA ab, an komplementäre Stränge zu annellieren, die in ihrer Umgebung vorhanden sind, und zwar unterhalb der Schmelztemperatur. Die Stringenz von Hybridisierungsreaktion und entsprechende Bedingungen sind ausführlicher in F M Ausubel (1995), *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc. beschrieben. Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch „The DIG System Users Guide for Filter Hybridization“ der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl *et al.* (*International Journal of Systematic Bacteriology* 41: 255-260 (1991)). Die Hybridisierung findet in einer bevorzugten Ausführungsform unter stringenten Bedingungen statt, das heißt, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschritte durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die Hybridisierungsreaktion wird im Allgemeinen bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschritten durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996). Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein Puffer entsprechend 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50 °C - 68 °C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70% Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine Temperatur von in der Reihenfolge zunehmender Bevorzugung ca. 50 °C – 68 °C, ca. 52 °C – 68 °C, ca. 54 °C – 68 °C, ca. 56 °C – 68 °C, ca. 58 °C – 68 °C, ca.

60 °C – 68 °C, ca. 62 °C – 68 °C, ca. 64 °C – 68 °C, ca. 66 °C – 68 °C eingestellt wird. Temperaturbereiche von ca. 64 °C – 68 °C oder ca. 66 °C – 68 °C werden bevorzugt. Es ist gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf eine Konzentration entsprechend 0,2 x SSC oder 0,1 x SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur in

5 Schritten von ca. 1 – 2 °C von 50 °C auf 68 °C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise in der Reihenfolge zunehmender Bevorzugung mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90%, mindestens 91%, mindestens 92%, mindestens 93%, mindestens 94%, mindestens 95%, mindestens 96%, mindestens 97%, mindestens 98% oder mindestens 99% Identität zur Sequenz des eingesetzten Nukleinsäuremoleküls. Weitere

10 Anleitungen zur Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558). In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst der Begriff „Variante“ einer Nukleinsäure, wie hierin verwendet, eine beliebige Nukleinsäuresequenz, die für die gleiche Aminosäuresequenz wie die ursprüngliche Nukleinsäure oder eine Variante dieser

15 Aminosäuresequenz im Rahmen der Degeneriertheit des genetischen Codes kodiert.

Wird erfindungsgemäß ein Ganzzellkatalysator eingesetzt, so ist bevorzugt, dass es sich dabei um eine Zelle handelt, die eine ihrem Wildtyp gegenüber verringerte Aktivität wenigstens eines Enzyms aufweist, das eine der Reaktionen der β -Oxidation von Fettsäuren katalysiert, wobei

20 das Enzym bevorzugt aus der Gruppe ausgewählt ist, die Fettsäureimporter, Fettsäure-CoA-Ligase, Acyl-CoA-Dehydrogenase, 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase, Enoyl-CoA-Hydratase und 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase umfasst. Die β -Oxidation von Fettsäuren ist ein weit verbreiteter Stoffwechselweg, der es prokaryontischen und eukaryontischen Organismen gleichermaßen erlaubt, Fettsäuren zu oxidieren und die darin enthaltene chemische Energie dem Stoffwechsel

25 verfügbar zu machen (Y Fujita, H Matsuoka, and K Hirooka (2007) *Mol. Microbiology* 66(4), 829-839). Im weiteren Sinn beginnt sie mit der Aufnahme einer Fettsäure in die Zelle, im Falle von *E. coli* durch den Transporter FadL (P N Black (1991) *J. Bacteriol.* 173, 435-442), der sie durch die äußere bzw. innere Membran der Gram-negativen Bakterienzelle schleust und das FadD-Genprodukt (P N Black, C C DiRusso, A K Metzger, and T L Heimert (1992) *J. Biol.*

30 *Chem.* 267, 25513-25520), das die Fettsäure in Form des CoA-Esters ins Cytosol freisetzt. Dort wird die Fettsäure, sofern die Bedingungen es erfordern, zunächst an der β -Position des CoA-Fettsäureesters durch eine Acyl-CoA-Dehydrogenase, im Falle von *E. coli* FadE (J. W. Campbell & J. E. Cronan (200) *J. Bacteriol.* 184, 3759-3764), oxidiert. Ein ähnliches Molekül kann alternativ auch aus einer doppelt ungesättigten Fettsäure durch Reduktion mittels einer

2,4-dienoyl-CoA-Reduktase, bei *E. coli* FadH, gebildet werden. Ein multifunktionelles Enzym, die Enoyl-CoA-Hydratase/3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase, bei *E. coli* FadB, katalysiert anschließend die Hydratisierung unter Bildung des sekundären Alkohols und dessen anschließende Oxidation zum Keton. Im letzten Schritt katalysiert eine 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase, im Falle von *E. coli* FadA, die Spaltung des Ketoacyl-CoA mit dem Ergebnis, dass Acetyl-CoA und ein im Vergleich zum Ausgangsmolekül um zwei Kohlenstoffatome verkürzter CoA-Ester der Fettsäure freigesetzt werden. Sofern es sich nicht ebenfalls um Acetyl-CoA handelt, kann letzterer erneut in den β -Oxidationszyklus eingespeist und unter Oxidation verkürzt werden. An der Regulation der β -Oxidation von Fettsäuren ist auch FadR beteiligt, ein Regulator des Fad-Operons, der die für den Abbau von Fettsäuren erforderlichen Gene umfasst, ohne dass FadR eine Reaktion der β -Oxidation katalysieren würde. In einer bevorzugten Ausführungsform wird unter dem Begriff „Enzym, das eine der Reaktionen der β -Oxidation von Fettsäuren katalysiert“ ein jegliches Enzym verstanden, das direkt mit dem Fettsäuresubstrat oder einem auf dem Weg zum Acetyl-CoA daraus entstehenden Molekül wechselwirkt, bevorzugt es als Substrat erkennt, und seine Umwandlung zu einem auf diesem Abbauweg näher am Acetyl-CoA liegenden Stoffwechselprodukt katalysiert, bevorzugt einschließlich des Fettsäureimporters, der die Aufnahme der Fettsäure in die Zelle bewerkstelligt. Beispielsweise zählt zu diesen Enzymen nach der vorangegangenen Definition die Acyl-CoA-Dehydrogenase, da sie mit dem Fettsäure-CoA-Ester wechselwirkt und dessen Umwandlung zum Enoyl-CoA katalysiert, das auf dem Stoffwechselweg der β -Oxidation näher am Acetyl-CoA liegt als der Fettsäure-CoA-Ester. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird unter dem Begriff „Enzym, das eine der Reaktionen der β -Oxidation von Fettsäuren katalysiert“, wie hierin verwendet, jedes Enzym aus der Gruppe verstanden, die die Genprodukte FadA, FadB, FadD, FadL und FadE aus *E. coli* und/oder deren Varianten oder Homologa aus anderen Organismen umfasst. Die Genprodukte FadA, FadB, FadD, FadL und FadE aus *E. coli* ebenso wie Varianten und Homologa aus zahlreichen weiteren biotechnologisch nutzbaren Organismen und ihre Nukleinsäure- und Polypeptidssequenzen sind im Stand der Technik beschrieben, beispielsweise FadA unter Zugangsnummer AP009048.1, FadB unter Zugangsnummer BAE77457.1, FadD unter Zugangsnummer BAA15609.1, FadE unter Zugangsnummer BAA77891.2 und FadL unter Zugangsnummer BAA16205.1

Mit der Entwicklung moderner genetischer, mikrobiologischer und molekularbiologischer Methoden stehen dem Fachmann zahlreiche Werkzeuge zur Verfügung, mit denen er die

Aktivität von in lebenden Zellen vorhandenen Enzymen routinemäßig messen und beeinflussen kann. Zur Bestimmung der Aktivität eines Enzyms, die in Form einer Suspension, eines Pellets vorliegt oder in prozessierter Form einer Zellkultur entnommen sein kann, können enzymatische Standardtests verwendet und ausgewertet werden, wie es in Lehrbüchern, beispielsweise A
5 Cornish-Bowden (1995), Fundamentals of Enzym Kinetics, Portland Press Limited, beschrieben ist. Der Stand der Technik offenbart zahlreiche Tests, die speziell für die Messung der Aktivität von Enzymen geeignet sind, die eine der Reaktionen der β -Oxidation von Fettsäuren katalysieren, beispielsweise in K Kameda & W D Nunn (1981) J. Biol. Chem. 256, 5702-5707, Hi Marrakchi, W E DeWolf, C Quinn, J West, B J Polizzi, C Y So et al. (2003) Biochem. J. 370,
10 1055-1062, S Lobo, G Florova, and K A Reynolds (2001) Biochemistry 40 (39), 11955-64 und X Yu, T Liu, F Zhu, and C Khosla (2011) PNAS, *elektronische Veröffentlichung vor Drucklegung*. Auch routinemäßig anwendbare Verfahren zur Verringerung der Aktivität eines Enzyms in einer Zelle, beispielsweise durch ungerichtete Mutagenese von Zellen durch Exposition gegenüber radioaktiver Strahlung gefolgt von Anreicherung oder Screening der Mutanten, durch
15 ortsgerichtete Einführung von Punktmutationen oder durch den Knock-out eines chromosomal in eine Zelle integrierten für ein aktives Enzym kodierendes Gen sind im Stand der Technik beschrieben, beispielsweise in Sambrook/Fritsch/Maniatis (1989): Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition oder in Fuchs/Schlegel (2007) Allgemeine Mikrobiologie, 2008, Georg Thieme Verlag. Im besonderen Fall der Fad-
20 Genprodukt bietet sich zu Verringerung der Aktivität auch die Überexpression eines transkriptionellen Repressors, beispielsweise von FadR (Y Fujita, H Matsuoka, and K Hirooka (2007) Mol. Microbiology 66(4), 829-839). an. Auch eine Aktivitätsverringern auf der Basis von RNA-Interferenz (T Tuschl (2001) ChemBioChem 2: 239-145) oder unter Verwendung von spezifischen Inhibitoren ist möglich. In einer bevorzugten Ausführungsform bedeutet die
25 Formulierung „wobei die Zelle eine ihrem Wildtyp gegenüber verringerte Aktivität“ eines Enzyms aufweist, wie hierin verwendet, dass die Aktivität des Enzyms in der veränderten Zelle gegenüber der Aktivität des gleichen Enzyms in einer Wildtyp-Zelle verringert ist. In einer bevorzugten Ausführungsform beträgt die relative Verringerung in der Reihenfolge zunehmender Bevorzugung 5, 10, 20, 40, 50, 75, 90, 95, 99 oder mehr Prozent der Aktivität. In
30 einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist keine Aktivität des Enzyms gegenüber dem Hintergrund mehr nachweisbar.

Wird erfindungsgemäß ein Ganzzellkatalysator verwendet, so ist es weiterhin vorteilhaft, wenn es sich bei dem Ganzzellkatalysator um eine Zelle handelt, die eine relativ zum Wildtyp der

Zelle verringerte Aktivität wenigstens einer endogenen Aldehyddehydrogenase handelt. In einer bevorzugten Ausführungsform wird unter dem Begriff „endogene Aldehyddehydrogenase“, wie hierin verwendet, ein Enzym verstanden, das in der Lage ist, die Oxidation eines Aldehyds zur entsprechenden Carbonsäure zu katalysieren, und das natürlich im Genom des Wildtyps der verwendeten Zelle vorhanden ist. Ein Beispiel für eine für *E. coli* endogene Alkoholdehydrogenase stellen das Enzym mit dem Datenbankcode BAA15032.1 (AldA) und Varianten davon dar.

- 10 Die vorliegenden Anmeldung umfasst ein Sequenzprotokoll mit den folgenden Polypeptid (Polyp)- und Nukleotid (DNA)-Sequenzen:

SEQ ID NO	Typ	Beschreibung
1	Polyp	AlkL aus <i>Pseudomonas oleovorans</i> (Datenbankcode Q00595)
2	DNA	AlkL aus <i>Pseudomonas oleovorans</i> (Datenbankcode Q00595)
3	Polyp	AlkL aus <i>Pseudomonas putida</i> (Datenbankcode CAB69081)
4	DNA	AlkL aus <i>Pseudomonas putida</i> (Datenbankcode CAB69081)
5	Polyp	AlkL aus <i>Marinobacter aquaeolei</i> VT8 (Datenbankcode YP_957722)
6	DNA	AlkL aus <i>Marinobacter aquaeolei</i> VT8 (Datenbankcode YP_957722)
7	Polyp	AlkL aus <i>Oceanicaulis alexandrii</i> HTCC2633 (Datenbankcode ZP_00953584)
8	DNA	AlkL aus <i>Oceanicaulis alexandrii</i> HTCC2633 (Datenbankcode ZP_00953584)
9	Polyp	AlkL aus <i>Marinobacter manganoxydans</i> Mnl7-9 (Datenbankcode ZP_09158756)
10	DNA	AlkL aus <i>Marinobacter manganoxydans</i> Mnl7-9 (Datenbankcode ZP_09158756)
11	Polyp	AlkL aus <i>Caulobacter</i> sp. K31 (Datenbankcode YP_001672217)
12	DNA	AlkL aus <i>Caulobacter</i> sp. K31 (Datenbankcode YP_001672217)
13	Polyp	Ferredoxin-Reduktase aus <i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2 (Datenbankcode YP_691923)

14	DNA	Ferredoxin-Reduktase aus <i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2 (Datenbankcode YP_691923)
15	Polyp	Ferredoxin aus <i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2 (Datenbankcode YP_691920)
16	DNA	Ferredoxin aus <i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2 (Datenbankcode YP_691920)
17	Polyp	NAD-abhängige Alkoholdehydrogenase aus <i>Escherichia coli</i> MS 187-1 (Datenbankcode ZP_07145023)
18	DNA	NAD-abhängige Alkoholdehydrogenase aus <i>Escherichia coli</i> MS 187-1 (Datenbankcode ZP_07145023)
19	Polyp	CYP153-Familie aus <i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2 (Datenbankcode YP_691921)
20	DNA	CYP153-Familie aus <i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2 (Datenbankcode YP_691921)
21	Polyp	LL(I/L)(V/I)GGNDTTRN
22	Polyp	Alanindehydrogenase aus <i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i> str. 168 (Datenbankcode NP_391071)
23	DNA	Alanindehydrogenase aus <i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i> str. 168 (Datenbankcode NP_391071)
24	Polyp	Transaminase aus <i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472 (Datenbankcode NP_901695)
25	DNA	Transaminase aus <i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472 (Datenbankcode NP_901695)
26	Polyp	Oxidoreduktase der Glucose-Methanol-Cholin-Oxidoreduktase-Familie (Deletion von AlkJ Q00593)
27	DNA	Oxidoreduktase der Glucose-Methanol-Cholin-Oxidoreduktase-Familie (Deletion von AlkJ Q00593)
28	Polyp	Oxidoreduktase der Glucose-Methanol-Cholin-Oxidoreduktase-Familie YP_694430 (Ab_AlkJ)
29	DNA	Oxidoreduktase der Glucose-Methanol-Cholin-Oxidoreduktase-Familie YP_694430 (Ab_AlkJ)
30	Polyp	Ferredoxin-Reduktase (YP_957889(Maqu_FdOR))
31	DNA	Ferredoxin-Reduktase (YP_957889(Maqu_FdOR))

32	Polyp	Ferredoxin-Reduktase (BAE78453 (Ac_FdOR))
33	DNA	Ferredoxin-Reduktase (BAE78453 (Ac_FdOR))
34	Polyp	Ferredoxin YP_957887 (Maqu_Fd)
35	DNA	Ferredoxin YP_957887 (Maqu_Fd)
36	Polyp	Ferredoxin BAE78451 (Ac_Fd)
37	DNA	Ferredoxin BAE78451 (Ac_Fd)
38	Polyp	Oxidoreduktase der Glucose-Methanol-Cholin-Oxidoreduktase-Familie aus <i>Caulobacter</i> sp. K31 (Datenbankcode ABZ74557.1)
39	DNA	Oxidoreduktase der Glucose-Methanol-Cholin-Oxidoreduktase-Familie aus <i>Caulobacter</i> sp. K31 (Datenbankcode ABZ74557.1)
40	Polyp	Flavinhaltige Alkoholdehydrogenase aus <i>Candida tropicalis</i> (Datenbankcode AAS46878.1)
41	DNA	Flavinhaltige Alkoholdehydrogenase aus <i>Candida tropicalis</i> (Datenbankcode AAS46878.1)
42	Polyp	CYP153-Familie aus <i>Marinobacter aquaeolei</i> VT8 (Datenbankcode YP_YP_957888)
43	DNA	CYP153-Familie aus <i>Marinobacter aquaeolei</i> VT8 (Datenbankcode YP_YP_957888)
44	Polyp	CYP153-Familie aus <i>Acinetobacter</i> sp. OC4 (Datenbankcode YP_YP_957888)
45	DNA	CYP153-Familie aus <i>Acinetobacter</i> sp. OC4 (Datenbankcode YP_YP_957888)
46	Polyp	Alkoholdehydrogenase von <i>Pseudomonas putida</i> (Datenbankcode CAB54054)
47	DNA	Alkoholdehydrogenase von <i>Pseudomonas putida</i> (Datenbankcode CAB54054)
48	Polyp	Aminotransferase von <i>Pseudomonase putida</i> (Datenbankcode YP_001668026)
49	DNA	Aminotransferase von <i>Pseudomonase putida</i> (Datenbankcode YP_001668026)
50	DNA	AlkB-Promoter
51	DNA	Primer Fd_CYP153
52	DNA	Primer pHg-LL-08

53	DNA	Primer pHg-LL-09
54	DNA	Primer pHg-LL-10
55	DNA	Primer pHg-LL-11
56	DNA	Primer pHg-LL-06
57	DNA	Vektor pCOM10
58	DNA	Expressionsvektor pCOM[Ab_Fd/CYP153-2/FdOR/alkL]
59	Polyp	CYP52-Familie aus <i>Candida tropicalis</i> (Datenbankcode AAO73952)
60	DNA	CYP52A
61	Polyp	CYP52-Familie aus <i>Candida tropicalis</i> (Datenbankcode AAO73958)
62	DNA	CYP52-Familie aus <i>Candida tropicalis</i> (Datenbankcode AAO73958)
63	Polyp	NADPH abhängige Cytochrom P450 Oxidoreduktase (Datenbankcode P37201)
64	DNA	NADPH abhängige Cytochrom P450 Oxidoreduktase (Datenbankcode P37201)
65	DNA	pCOM10-Ct CYP52A12_co plus OR_co
66	DNA	pCOM10-Ct CYP52A17_co plus OR_co

Die vorliegende Erfindung wird weiterhin durch die folgenden Figuren und nicht beschränkenden Beispiele veranschaulicht, denen weitere Merkmale, Ausführungsformen, Aspekte und Vorteile der vorliegenden Erfindung entnommen werden können.

5

Beispiel 1

Herstellung von Expressionsvektoren für die Gene *CYP153*, *Fd* und *FdOR* aus *Alcanivorax borkumensis* SK2 sowie *alkL* aus *Pseudomonas oleovorans*

Zur Herstellung eines *E. coli*-Expressionsvektors für die Gene *CYP153* (SEQ ID Nr. 20), *Fd* (SEQ ID Nr. 16) und *FdOR* (SEQ ID Nr. 14) aus *Alcanivorax borkumensis*, sowie das Gen *alkL* (SEQ ID Nr. 2) aus *Pseudomonas oleovorans*, wurden die Gene unter die Kontrolle des *alkB*-Promotors (SEQ ID Nr. 50) im Plasmid pCOM10 kloniert. Die verschiedenen DNA-Fragmente wurden unter Einbringung homologer Bereiche zur Rekombinationsklonierung amplifiziert. Als Template diente die jeweilige chromosomale DNA.

15

Für die Amplifikation der jeweiligen Fragmente kamen folgende Oligonukleotide zum Einsatz:

Fd_CYP153

pHg-LL-07: 5'-TTAATAAAAATTGGAGTACAGACTTTTGGTAGGAGAATGC-3' (SEQ ID Nr. 51)

pHg-LL-08: 5'-CCTTGGGCTTATTTTTTAGCCGTCAACTTAAC-3' (SEQ ID Nr. 52)

5 *FdOR*

pHg-LL-09: 5'-AAAAATAAGCCCAAGGCACAGATAAAGAGAGA-3' (SEQ ID Nr. 53)

pHg-LL-10: 5'-TAGATCCTTCAGATCAAAGACTTTAATTCAAC-3' (SEQ ID Nr. 54)

alkL

10 pHg-LL-11: 5'-TGATCTGAAGGATCTAGGAACCAAGGAGAGTG-3' (SEQ ID Nr. 55)

pHg-LL-06: 5'-CTTGGCTGCAGGTCGATTAGAAAACATATGACGCACCAAG-3' (SEQ ID Nr. 56)

Folgende Parameter wurden für die PCR eingesetzt:

15

Fd-CYP153:

Denaturierung:	98 °C	30s	
Denaturierung:	98 °C	10s	35x
Annealing:	62 °C	20s	35x
20 Elongation:	72 °C	1:10 min	35x
Finale Elongation:	72 °C	10 min	

FdOR

Denaturierung:	98 °C	30s	
25 Denaturierung:	98 °C	10s	35x
Annealing:	53 °C	20s	35x
Elongation:	72 °C	55s	35x
Finale Elongation:	72 °C	10 min	

30 *alkL*

Denaturierung:	98 °C	30s	
Denaturierung:	98 °C	10s	25x
Annealing:	65 °C	20s	25x
Elongation:	72 °C	18s	25x

Finale Elongation: 72 °C 10 min

Für die Amplifikation wurde der Phusion™ High-Fidelity Master Mix von New England Biolabs (Frankfurt) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers verwendet. Jeweils 50 µl der PCR-Reaktionen wurden anschließend auf einem 1%igen TAE-Agarosegel aufgetrennt. Die Durchführung der PCR, der Agarose-Gel-Elektrophorese, Ethidiumbromidfärbung der DNA und Bestimmung der PCR-Fragmentgrößen erfolgte in dem Fachmann bekannter Art und Weise. In allen Fällen konnten PCR-Fragmente der erwarteten Größe amplifiziert werden (*Fd-CYP153*: 1800 bp; *FdOR*: 1276 bp; *alkL*: 745 bp). Zur Isolierung und Aufreinigung der DNA wurden die PCR-Produkte mit einem Skalpell aus einem präparativen Gel herausgeschnitten und mit dem *QiaQuick Gel extraction Kit* nach Anleitung des Herstellers (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden unter Verwendung des Geneart® Seamless Cloning and Assembly Kit nach Anleitung des Herstellers (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) in einen mit *EcoRI*-HF- und *Sall*-geschnittenen pCOM10-Vektor (SEQ ID Nr. 57) hinter den *alkB*-Promotor (SEQ ID Nr. 50) kloniert. Die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* 10 Beta Zellen (New England Biolabs, Frankfurt) erfolgte nach dem Fachmann bekannter Art und Weise. Die korrekte Insertion der Zielgene wurde durch Restriktionsanalyse überprüft und die Authentizität der eingebrachten Gene durch DNA-Sequenzierung bestätigt. Der entstandene Expressionsvektor wurde als pCOM[Ab_Fd / CYP153-2 / FdOR / *alkL*] (SEQ ID Nr. 58) bezeichnet.

Beispiel 2

Herstellung von Expressionsvektoren für die Gene *CYP52A12* und *OR* aus *Candida tropicalis* sowie *alkL* aus *Pseudomonas oleovorans*

Zur Herstellung eines *E. coli*-Expressionsvektors für die Gene *CYP52A12* (SEQ ID Nr. 60) und *OR* (SEQ ID Nr. 64) aus *Candida tropicalis*, sowie das Gen *alkL* (SEQ ID Nr. 2) aus *Pseudomonas oleovorans*, wurden die Gene *CYP52A12* und *OR* für die Expression in *Escherichia coli in silico* codonoptimiert und gemeinsam mit dem Gen *alkL* als Operon synthetisiert. Während der Synthese wurden Schnittstellen für *Ascl* und *Sall* stromaufwärts des *CYP52A12*-Gens und stromabwärts des *alkL*-Gens eingeführt. Das synthetisierte DNA-Fragment *CYP52A12_OR_alkL* wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Ascl* und *Sall* verdaut, in den entsprechend geschnittenen Vektor pCOM10 ligiert und das Produkt in chemisch kompetente *E. coli* 10 Beta Zellen (New England Biolabs, Frankfurt) transformiert. Der

fertiggestellte Vektor wurde als pCOM10-Ct CYP52A12_co plus OR_co (SEQ ID Nr. 65) bezeichnet.

Beispiel 3

5 **Herstellung von Expressionsvektoren für die Gene CYP52A17 und OR aus *Candida tropicalis* sowie *alkL* aus *Pseudomonas oleovorans***

Zur Herstellung eines *E. coli*-Expressionsvektors für die Gene CYP52A17 (SEQ ID Nr. 62) , und OR (SEQ ID Nr. 64) aus *Candida tropicalis*, sowie das Gen *alkL* (SEQ ID Nr. 2) aus *Pseudomonas oleovorans*, wurden die Gene CYP52A17 und OR für die Expression in
10 *Escherichia coli in silico* codonoptimiert und gemeinsam mit dem Gen *alkL* als Operon synthetisiert. Während der Synthese wurden Schnittstellen für *AscI* und *SalI* stromaufwärts des CYP52A17-Gens und stromabwärts des *alkL*-Gens eingeführt. Das synthetisierte DNA-Fragment CYP52A12_OR_alkL wurde mit den Restriktionsendonukleasen *AscI* und *SalI* verdaut, in den entsprechend geschnittenen Vektor pCOM10 ligiert und das Produkt in
15 chemisch kompetente *E. coli* 10 Beta Zellen (New England Biolabs, Frankfurt) transformiert Der fertiggestellte Vektor wurde als pCOM10-Ct CYP52A17_co plus OR_co (SEQ ID Nr. 66) bezeichnet.

Beispiel 4

20 **Produktion von Hydroxy-Laurinsäuremethylester durch einen *E. coli* Stamm mit Expressionsvektoren für die Gene CYP153, Fd und FdOR aus *Alcanivorax borkumensis* SK2 sowie *alkL* aus *Pseudomonas oleovorans* bzw. für die Gene CYP52A17 und OR aus *Candida tropicalis* sowie *alkL* aus *Pseudomonas oleovorans***

Zur Erzeugung eines *E. coli*-Stammes mit dem Expressionsvektor pCOM[Ab_Fd / CYP153-2 /
25 FdOR / *alkL*] oder pCOM10-Ct CYP52A17_co plus OR_co wurden elektrokompetente Zellen von *E. coli* W3110 hergestellt. Dies geschah in einer dem Fachmann bekannten Art und Weise. *E. coli* W3110 wurde jeweils mit einem der beiden aufgeführten Plasmide transformiert und auf LB-Agar-Platten mit Kanamycin (50 µg/ml) ausplattiert. Transformanten wurden durch Plasmidpräparation und analytische Restriktionsanalyse bezüglich der Anwesenheit der
30 korrekten Plasmide überprüft. Auf diese Weise wurden folgende Stämme konstruiert:

- *E. coli* W3110 pCOM[Ab_Fd / CYP153-2 / FdOR / *alkL*]
- *E. coli* W3110 pCOM10-Ct CYP52A17_co plus OR_co

Die Stämme wurden einer *fed-batch*-Fermentation unterzogen, um ihre Fähigkeit zur Produktion von Hydroxy-Laurinsäuremethylester, Oxo-Laurinsäuremethylester und Carboxy-Laurinsäuremethylester aus Laurinsäuremethylester zu untersuchen. Dies wurde in einem 8-fach Parallelfertigungssystem der Firma DASGIP durchgeführt.

5

Für die Fermentation wurden 1L-Reaktoren verwendet, die mit Überkopf-Rührern und Impellerturbinen ausgerüstet waren. Zur Prozessüberwachung wurden pH und pO_2 online gemessen. OTR/CTR Messungen dienten u.a. zur Abschätzung der Stoffwechselaktivität und Fitness der Zellen.

10

Die pH-Sonden wurden mittels einer Zwei-Punkt-Kalibrierung mit Maßlösungen von pH 4,0 und pH 7,0 laut technischer Referenz der Firma DASGIP kalibriert. Die Reaktoren wurden laut technischer Referenz mit den nötigen Sensoren und Anschlüssen versehen und die Rührwelle montiert. Anschließend wurden die Reaktoren mit 300 mL Wasser befüllt und 20 min bei 121 °C autoklaviert, um Sterilität zu gewährleisten. Die pO_2 Sonden wurden über Nacht (mindestens 6 h lang) nach Anschluss an die Meßverstärker polarisiert. Anschließend wurde das Wasser unter der Clean Bench entnommen und durch Hochzelldichtemedium bestehend aus $(NH_4)_2SO_4$ 1,76 g/L, K_2HPO_4 19,08 g/L, KH_2PO_4 12,5 g/L, Hefeextrakt 6,66 g/L, Trinatriumcitratdihydrat 11,2 g/L, 17 mL/L einer filtersterilisierten 1%igen Ammoniumeisencitrat-Lösung, und 5 mL/L einer filtersterilisierten Spurenelement-Stammlösung (bestehend aus HCl (37 %) 36,50 g/L, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 1,91 g/L, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,87 g/L, Ethylendiamintetraessigsäuredihydrat 0,84 g/L, H_3BO_3 0,30 g/L, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0,25 g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 4,70 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 17,80 g/L, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,15 g/L) mit 15 g/L Glucose als Kohlenstoffquelle (zugesezt durch Dosieren von 30 mL/L einer sterilen Feedlösung bestehend aus 500 g/L Glucose, 1 % (w/v) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ und 2,2 % (w/v) NH_4Cl) mit 50 mg/L Kanamycin ersetzt.

20
25

Im Folgenden wurden die pO_2 -Sonden mit einer Einpunkt-Kalibrierung (Rührer: 600 rpm / Begasung: 10 sL/h Luft) auf 100% kalibriert und die Feed-, Korrekturmittel- und Induktionsmittelstrecken mittels Cleaning-in-Place laut technischer Referenz gereinigt. Dazu wurden die Schläuche erst mit 70% Ethanol, anschließend mit 1 M NaOH, dann mit sterilem VE-Wasser gespült und zuletzt mit den jeweiligen Medien befüllt.

30

Alle weiter oben genannten *E. coli*-Stämme wurden zuerst aus einer Cryokultur in LB-Medium (25 mL in einem 100 mL Schikanekolben) mit 50 mg/L Kanamycin über Nacht bei 37 °C und

200 rpm für ca. 18 h angezogen. Anschließend wurden 2 mL dieser Kultur für eine zweite Vorkultur-Stufe in 25 mL Hochzelldichtemedium bestehend aus $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,76 g/L, K_2HPO_4 19,08 g/L, KH_2PO_4 12,5 g/L, Hefeextrakt 6,66 g/L, Trinatriumcitrat dihydrat 11,2g/L, 17 mL/L einer filtersterilisierten 1%igen Ammoniumeisencitrat-Lösung, und 5 mL/L einer filtersterilisierten

5 Spurenelement-Stammlösung (bestehend aus HCl (37 %) 36,50 g/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,91 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,87 g/L, Ethylendiamintetraessigsäure dihydrat 0,84 g/L, H_3BO_3 0,30 g/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4,70 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 17,80 g/L, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,15 g/L) mit 15 g/L Glucose als Kohlenstoffquelle (zugesetzt durch Dosieren von 30 mL/L einer sterilen Feedlösung bestehend aus 500 g/L Glucose, 1% (w/v) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und 2,2% (w/v) NH_4Cl) mit

10 den bereits beschriebenen Antibiotika in einem 100 mL Schüttelkolben überführt und bei 37 °C / 200 rpm für weitere 6 h inkubiert.

Um die Reaktoren mit einer optischen Dichte von 0,1 anzuimpfen wurde die OD_{600} der zweiten Vorkulturstufe gemessen und die zum Animpfen benötigte Kulturmenge berechnet. Die

15 notwendige Kulturmenge wurde mit Hilfe einer 5 mL Spritze durch ein Septum in den temperierten und belüfteten Reaktor gegeben.

Folgendes Standardprogramm wurde verwendet:

DO-Regler		pH-Regler	
Preset	0%	Preset	0 ml/h
P	0,1	P	5
Ti	300 s	Ti	200 s
Min	0%	Min	0 mL/h
Max	100%	Max	40 mL/h

N (Rotation)	von	bis	XO2 (Gasmischung)	von	bis	F (Gasfluss)	von	bis
Wachstum und Biotransformation	0%	30%	Wachstum und Biotransformation	0%	100%	Wachstum und Biotransformation	15%	80%
	400 rpm	1500 rpm		21%	21%		6 sL/h	72 sL/h

20

Script	
Trigger scharf	31% DO (1/60h)
Induktion DCPK	10 h nach Feedstart
Feedtrigger	50% DO
Feedrate	3 [mL/h]

Der pH-Wert wurde einseitig mit 12,5%iger Ammoniak-Lösung auf pH 6,8 geregelt. Während Anzucht und Biotransformation wurde der Gelöstsauerstoff (pO_2 oder DO) in der Kultur über Rührerdrehzahl und Begasungsrate auf mindestens 30 % geregelt. Nach Animpfen fiel der DO von 100 % auf diese 30 %, wo er für den Rest der Fermentation stabil gehalten wurde.

Die Fermentation wurde als Fedbatch durchgeführt, wobei der Feedstart als Eingang zur Feed-Phase mit 5 g/L*h Glucosefeed, bestehend aus 500 g/L Glucose, 1 % (w/v) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ und 2,2 % (w/v) NH_4Cl , über den das Ende der Batch-Phase indizierenden DO-Peak getriggert wurde. Mit Feedstart wurde die Temperatur von 37 °C auf 30 °C gesenkt. 10 h nach Feedstart wurde mit 0,025 % (v/v) DCPK die Expression der Oxidationsgene induziert. Der Start der Hydroxylaurinsäuremethylester-Produktion (= Start der Biotransformation) erfolgte 14 h nach Feedstart. Dazu wurden 150 mL eines Gemisches aus Laurinsäuremethylester und Ölsäure (techn. 90 %) als Batch zu der Fermentationsbrühe gegeben.

Zur Quantifizierung von LSME und HLS in Fermentationsproben wurden 1/2/4/20/22 h nach Biotransformations-Start Proben entnommen. Diese Proben wurden für die Analytik vorbereitet. (siehe LC-ESI/MS²-basierte Quantifizierung von Produkten).

LC-ESI/MS²-basierte Quantifizierung von Produkten

Die Quantifizierung von LSME und HCL in Fermentationsproben erfolgte mittels LC-ESI/MS² anhand einer externen Kalibrierung für alle Analyten (0,1 – 50 mg/L) und unter Verwendung der internen Standards Aminoundekansäure (AUD für HLSME), und d3-LSME (für LSME).

Dabei kamen folgende Geräte zum Einsatz:

- HPLC Anlage 1260 (Agilent; Böblingen) mit Autosampler (G1367E), binärer Pumpe (G1312B) und Säulenofen (G1316A)
- Massenspektrometer TripelQuad 6410 (Agilent; Böblingen) mit ESI-Quelle
- HPLC-Säule: Kinetex C18, 100 x 2,1 mm, Partikelgröße: 2,6 µm, Porengröße 100 Å (Phenomenex; Aschaffenburg)
- Vorsäule: KrudKatcher Ultra HPLC In-Line Filter; 0,5 µm Filtertiefe und 0,004 mm Innendurchmesser (Phenomenex; Aschaffenburg)

Die Proben wurden vorbereitet, indem 1900 μL Lösungsmittel (80 % (v/v) Acetonitril, 20 % bidest. H_2O (v/v), + 0,1 % Ameisensäure) und 100 μL Probe in ein 2-mL-Reaktionsgefäß pipettiert wurden. Das Gemisch wurde ca. 10 Sekunden gevortext und anschließend bei ca. 13000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde mit einer Pipette entnommen und nach entsprechender Verdünnung mit Diluent (80 % (v/v) ACN, 20 % bidest. H_2O (v/v), + 0,1 % Ameisensäure) analysiert. Zu je 900 μL Probe wurden 100 μL ISTD hinzupipettiert (10 μL bei einem Probenvolumen von 90 μL).

Die HPLC-Trennung erfolgte mit oben genannter Säule bzw. Vorsäule. Das Injektionsvolumen betrug 0,7 μL , die Säulentemperatur 50 °C, die Flussrate 0,6 mL/min. Die mobile Phase bestand aus Eluent A (0,1 %ige (v/v) wässrige Ameisensäure) und Eluent B (Acetonitril mit 0,1 % (v/v) Ameisensäure). Folgendes Gradientenprofil wurde genutzt:

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	77	23
0.3	77	23
0.4	40	60
2.5	40	60
2.6	2	98
5.5	2	98
5.6	77	23
9	77	23

Die ESI-MS²-Analyse erfolgte im positiven Modus mit folgenden Parametern der ESI-Quelle:

- Gastemperatur 280 °C
- Gasfluss 11 L/min
- Nebulizerdruck 50 psi
- Kapillarspannung 4000 V

Die Detektion und Quantifizierung der Verbindungen DDS, DDSME, HLS, HLSME, OLS, OLSME erfolgte mit den folgenden MRM Parametern, wobei jeweils ein Produkt-Ion als *Qualifier* und eines als *Quantifier* genutzt wurde:

Analyt	Vorläufer-Ion [m/z]	Produkt-Ion [m/z]	Verweilzeit [ms]	Kollisionsenergie [eV]
HLSME	231,3	181,2	15	2
HLSME	231,3	163,2	25	5

Der Analyt LSME wurde im SIM Modus detektiert (m/z 201 und 215).

Es konnte gezeigt werden, dass der Stamm *E. coli* W3110 pCOM[Ab_Fd / CYP153-2 / FdOR / alkL] in der Lage ist aus Laurinsäuremethylester ω -Hydroxy-Laurinsäuremethylester zu bilden.

- 5 Der Stamm *E. coli* W3110 pCOM10-Ct CYP52A17_co plus OR_co konnte Laurinsäuremethylester nur in deutlich geringerem Maß zu ω -Hydroxy-Laurinsäuremethylester oder weiteren Oxidationsprodukten umsetzen.

- 10 Angegeben sind die Konzentrationen von Laurinsäuremethylester und ω -Hydroxy-Laurinsäuremethylester nach 22 Stunden Fermentationsdauer.

Stamm	C (Laurinsäure) methylester [g/L]	c (ω -Hydroxy- säuremethylester) [g/L]
<i>E. coli</i> W3110 pCOM[Ab_Fd / CYP153-2 / FdOR / alkL]	88,1	4,35
<i>E. coli</i> W3110 pCOM10-Ct CYP52A17_co plus OR_co	106,9	<0,1

Beispiel 5 (prophetisch)

- 15 **Produktion von Hydroxy-Laurinsäuremethylester durch einen *E. coli* Stamm mit Expressionsvektoren für die Gene *CYP153*, *Fd* und *FdOR* aus *Alcanivorax borkumensis* *SK2* sowie *alkL* aus *Pseudomonas oleovorans* bzw. für die Gene *CYP52A12* und *OR* aus *Candida tropicalis* sowie *alkL* aus *Pseudomonas oleovorans***

- 20 Zur Erzeugung eines *E. coli*-Stammes mit dem Expressionsvektor pCOM[Ab_Fd / CYP153-2 / FdOR / alkL] oder pCOM10-Ct CYP52A12_co plus OR_co werden elektrokompente Zellen von *E. coli* W3110 hergestellt. Dies geschieht in einer dem Fachmann bekannten Art und Weise. *E. coli* W3110 wird jeweils mit einem der beiden aufgeführten Plasmide transformiert und auf LB-Agar-Platten mit Kanamycin (50 μ g/ml) ausplattiert. Transformanten werden durch Plasmidpräparation und analytische Restriktionsanalyse bezüglich der Anwesenheit der korrekten Plasmide überprüft. Auf diese Weise werden folgende Stämme konstruiert:

- *E. coli* W3110 pCOM[Ab_Fd / CYP153-2 / FdOR / alkL]
- *E. coli* W3110 pCOM10-Ct CYP52A12_co plus OR_co

Die Stämme werden einer *fed-batch*-Fermentation unterzogen, um ihre Fähigkeit zur Produktion von HLSME zu untersuchen. Dies wird in einem 8-fach Parallelfertigungssystem der Firma DASGIP durchgeführt.

Für die Fermentation werden 1L-Reaktoren verwendet, die mit Überkopf-Rührern und Impellerturbinen ausgerüstet sind. Zur Prozessüberwachung werden pH und pO₂ online gemessen. OTR/CTR Messungen dienen u.a. zur Abschätzung der Stoffwechselaktivität und Fitness der Zellen.

Die pH-Sonden werden mittels einer Zwei-Punkt-Kalibrierung mit Maßlösungen von pH 4,0 und pH 7,0 laut technischer Referenz der Firma DASGIP kalibriert. Die Reaktoren werden laut technischer Referenz mit den nötigen Sensoren und Anschlüssen versehen und die Rührwelle montiert. Anschließend werden die Reaktoren mit 300 mL Wasser befüllt und 20 min bei 121 °C autoklaviert, um Sterilität zu gewährleisten. Die pO₂ Sonden werden über Nacht (mindestens 6 h lang) nach Anschluss an die Meßverstärker polarisiert. Anschließend wird das Wasser unter der Clean Bench entnommen und durch Hochzelldichtemedium bestehend aus (NH₄)₂SO₄ 1,76 g/L, K₂HPO₄ 19,08 g/L, KH₂PO₄ 12,5 g/L, Hefeextrakt 6,66 g/L, Trinatriumcitratdihydrat 11,2 g/L, 17 mL/L einer filtersterilisierten 1%igen Ammoniumeisencitrat-Lösung, und 5 mL/L einer filtersterilisierten Spurenelement-Stammlösung (bestehend aus HCl (37 %) 36,50 g/L, MnCl₂*4H₂O 1,91 g/L, ZnSO₄*7H₂O 1,87 g/L, Ethylendiamintetraessigsäuredihydrat 0,84 g/L, H₃BO₃ 0,30 g/L, Na₂MoO₄*2H₂O 0,25 g/L, CaCl₂*2H₂O 4,70 g/L, FeSO₄*7H₂O 17,80 g/L, CuCl₂*2H₂O 0,15 g/L) mit 15 g/L Glucose als Kohlenstoffquelle (zugesetzt durch Dosieren von 30 mL/L einer sterilen Feedlösung bestehend aus 500 g/L Glucose, 1 % (w/v) MgSO₄*7H₂O und 2,2 % (w/v) NH₄Cl) mit 50 mg/L Kanamycin ersetzt.

Im Folgenden werden die pO₂-Sonden mit einer Einpunkt-Kalibrierung (Rührer: 600 rpm / Begasung: 10 sL/h Luft) auf 100 % kalibriert und die Feed-, Korrekturmittel- und Induktionsmittelstrecken mittels Cleaning-in-Place laut technischer Referenz gereinigt. Dazu

werden die Schläuche erst mit 70 % Ethanol, anschließend mit 1 M NaOH, dann mit sterilem VE-Wasser gespült und zuletzt mit den jeweiligen Medien befüllt.

Alle weiter oben genannten *E. coli*-Stämme werden zuerst aus einer Cryokultur in LB-Medium (25 mL in einem 100 mL Schikanekolben) mit 50 mg/L Kanamycin über Nacht bei 37 °C und 200 rpm für ca. 18 h angezogen. Anschließend werden 2 mL dieser Kultur für eine zweite Vorkultur-Stufe in 25 mL Hochzelldichtemedium bestehend aus (NH₄)₂SO₄ 1,76 g/L, K₂HPO₄ 19,08 g/L, KH₂PO₄ 12,5 g/L, Hefeextrakt 6,66 g/L, Trinatriumcitrat dihydrat 11,2g/L, 17 mL/L einer filtersterilisierten 1%igen Ammoniumeisencitrat-Lösung, und 5 mL/L einer filtersterilisierten Spurenelement-Stammlösung (bestehend aus HCl (37 %) 36,50 g/L, MnCl₂*4H₂O 1,91 g/L, ZnSO₄*7H₂O 1,87 g/L, Ethylendiamintetraessigsäure dihydrat 0,84 g/L, H₃BO₃ 0,30 g/L, Na₂MoO₄*2H₂O 0,25 g/L, CaCl₂*2H₂O 4,70 g/L, FeSO₄*7H₂O 17,80 g/L, CuCl₂*2H₂O 0,15 g/L) mit 15 g/L Glucose als Kohlenstoffquelle (zugesezt durch Dosieren von 30 mL/L einer sterilen Feedlösung bestehend aus 500 g/L Glucose, 1% (w/v) MgSO₄*7H₂O und 2,2% (w/v) NH₄Cl) mit den bereits beschriebenen Antibiotika in einem 100 mL Schüttelkolben überführt und bei 37 °C / 200 rpm für weitere 6 h inkubiert.

Um die Reaktoren mit einer optischen Dichte von 0,1 anzupfen wird die OD₆₀₀ der zweiten Vorkulturstufe gemessen und die zum Animpfen benötigte Kulturmenge berechnet. Die notwendige Kulturmenge wird mit Hilfe einer 5 mL Spritze durch ein Septum in den temperierten und belüfteten Reaktor gegeben.

Folgendes Standardprogramm wird verwendet:

DO-Regler		pH-Regler	
Preset	0%	Preset	0 ml/h
P	0,1	P	5
Ti	300 s	Ti	200 s
Min	0%	Min	0 mL/h
Max	100%	Max	40 mL/h

N (Rotation)	von	bis	XO2 (Gasmisch ung)	von	bis	F (Gasfluss)	von	bis
Wachstum und Biotransfor mation	0%	30%	Wachstum und Biotransfor mation	0%	100%	Wachstum und Biotransfor mation	15%	80%
	400 rpm	1500 rpm		21%	21%		6 sL/h	72 sL/h

Script	
Trigger scharf	31% DO (1/60h)
Induktion DCPK	10 h nach Feedstart
Feedtrigger	50% DO
Feedrate	3 [mL/h]

Der pH-Wert wird einseitig mit 12,5%iger Ammoniak-Lösung auf pH 6,8 geregelt. Während Anzucht und Biotransformation wird der Gelöstsauerstoff (pO₂ oder DO) in der Kultur über Rührerdrehzahl und Begasungsrate auf mindestens 30 % geregelt. Nach Animpfen fällt der DO

5 von 100 % auf diese 30 %, wo er für den Rest der Fermentation stabil gehalten wird.

Die Fermentation wird als Fedbatch durchgeführt, wobei der Feedstart als Eingang zur Feed-Phase mit 5 g/L*h Glucosefeed, bestehend aus 500 g/L Glucose, 1 % (w/v) MgSO₄*7H₂O und 2,2 % (w/v) NH₄Cl, über den das Ende der Batch-Phase indizierenden DO-Peak getriggert wird.

10 Mit Feedstart wird die Temperatur von 37 °C auf 30 °C gesenkt. 10 h nach Feedstart wird mit 0,025 % (v/v) DCPK die Expression der Oxidationsgene induziert. Der Start der Hydroxylaurinsäuremethylester-Produktion (= Start der Biotransformation) erfolgt 14 h nach Feedstart. Dazu wurden 150 mL eines Gemisches aus Laurinsäuremethylester und Ölsäure (techn. 90 %) als Batch zu der Fermentationsbrühe gegeben.

15 Zur Quantifizierung von LSME und HLSME werden Fermentationsproben 1/2/4/20/22 h nach Biotransformations-Start entnommen. Diese Proben werden für die Analytik vorbereitet. (siehe LC-ESI/MS²-basierte Quantifizierung von Produkten).

20 **LC-ESI/MS²-basierte Quantifizierung von Produkten**

Die Quantifizierung von LSME und HLSME in Fermentationsproben erfolgt mittels LC-ESI/MS² anhand einer externen Kalibrierung für alle Analyten (0,1 – 50 mg/L) und unter Verwendung der internen Standards Aminoundekansäure (AUD für HLSME) und d3-LSME (für LSME).

25 Dabei kommen folgende Geräte zum Einsatz:

- HPLC Anlage 1260 (Agilent; Böblingen) mit Autosampler (G1367E), binärer Pumpe (G1312B) und Säulenofen (G1316A)

- Massenspektrometer TripelQuad 6410 (Agilent; Böblingen) mit ESI-Quelle
- HPLC-Säule: Kinetex C18, 100 x 2,1 mm, Partikelgröße: 2,6 µm, Porengröße 100 Å (Phenomenex; Aschaffenburg)
- Vorsäule: KrudKatcher Ultra HPLC In-Line Filter; 0,5 µm Filtertiefe und 0,004 mm Innendurchmesser (Phenomenex; Aschaffenburg)

Die Proben werden vorbereitet, indem 1900 µL Lösungsmittel (80 % (v/v) Acetonitril, 20 % bidest. H₂O (v/v), + 0,1 % Ameisensäure) und 100 µL Probe in ein 2-mL-Reaktionsgefäß pipettiert werden. Das Gemisch wird ca. 10 Sekunden gevortext und anschließend bei ca. 13000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der klare Überstand wird mit einer Pipette entnommen und nach entsprechender Verdünnung mit Diluent (80 % (v/v) ACN, 20 % bidest. H₂O (v/v), + 0,1 % Ameisensäure) analysiert. Zu je 900 µL Probe werden 100 µL ISTD hinzupipettiert (10 µL bei einem Probenvolumen von 90 µL).

Die HPLC-Trennung erfolgt mit oben genannter Säule bzw. Vorsäule. Das Injektionsvolumen beträgt 0,7 µL, die Säulentemperatur 50 °C, die Flussrate 0,6 mL/min. Die mobile Phase besteht aus Eluent A (0,1 %ige (v/v) wässrige Ameisensäure) und Eluent B (Acetonitril mit 0,1 % (v/v) Ameisensäure). Folgendes Gradientenprofil wird genutzt:

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	77	23
0.3	77	23
0.4	40	60
2.5	40	60
2.6	2	98
5.5	2	98
5.6	77	23
9	77	23

Die ESI-MS²-Analyse erfolgt im positiven Modus mit folgenden Parametern der ESI-Quelle:

- Gastemperatur 280 °C
- Gasfluss 11 L/min
- Nebulizerdruck 50 psi
- Kapillarspannung 4000 V

Die Detektion und Quantifizierung der Verbindung HLSME erfolgt mit den folgenden MRM Parametern, wobei jeweils ein Produkt-Ion als *Qualifier* und eines als *Quantifier* genutzt wird:

Analyt	Vorläufer-Ion [m/z]	Produkt-Ion [m/z]	Verweilzeit [ms]	Kollisionsenergie [eV]
HLSME	231,3	181,2	15	2
HLSME	231,3	163,2	25	5

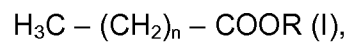
Der Analyt wird im SIM Modus detektiert (m/z 201 und 215).

- Es wird gezeigt, dass der Stamm *E. coli* W3110 pCOM[Ab_Fd / CYP153-2 / FdOR / alkL] in der
- 5 Lage ist aus Laurinsäuremethylester ω -Hydroxy-Laurinsäuremethylester zu bilden. Der Stamm *E. coli* W3110 pCOM10-Ct CYP52A12_co plus OR_co kann Laurinsäuremethylester nur in geringerem Maß zu ω -Hydroxy-Laurinsäuremethylester oder weiteren Oxidationsprodukten umsetzen.
- 10 Die in der vorangehenden Beschreibung, den Ansprüchen und den Beispielen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebiger Kombination zur Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausführungsformen wesentlich sein.

Ansprüche

1. Verfahren zur Oxidation einer Fettsäure oder eines Esters davon der Formel (I)

5



wobei R aus der Gruppe ausgewählt ist, die H, Methyl, Ethyl, Propyl und Butyl umfasst,

10

wobei n 0 bis 30, bevorzugt 6 bis 24 ist,

umfassend den Schritt:

15

- a) Oxidieren der Fettsäure oder des Esters davon durch Kontaktieren mit einer Cytochrom P450-Monooxygenase der CYP153-Familie in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff und NAD(P)H

2. Verfahren nach Anspruch 1, weiter umfassend die Schritte:

20

- b) Weiteres Oxidieren der oxidierten Fettsäure oder des Esters davon aus Schritt a) durch Kontaktieren mit einer Alkoholdehydrogenase,

25

- c) Aminieren der weiter oxidierten Fettsäure oder des Esters davon aus Schritt b) durch Kontaktieren mit einer Transaminase in Anwesenheit eines Aminodonors, bevorzugt Alanin,

wobei Schritt c) optional in Anwesenheit einer Alanindehydrogenase, von Ammonium und NAD(P)H erfolgt

30

3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei die Cytochrom P450-Monooxygenase der CYP153-Familie die Peptidsequenz LL(I/L)(V/I)GGNDTTRN aufweist und es sich bevorzugt um die Cytochrom P450-Monooxygenase der CYP153-Familie aus

Alcanivorax borkumensis SK2 (Datenbankcode YP_691921) oder eine Variante davon handelt.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei es sich bei der
5 Alkoholdehydrogenase um eine NAD(P)⁺-abhängige Alkoholdehydrogenase, bevorzugt um die NAD-abhängige Alkoholdehydrogenase aus *Escherichia coli* MS 187-1 (Datenbankcode ZP_07145023) oder eine Variante davon, oder um eine Oxidoreduktase der Glucose-Methanol-Cholin-Oxidoreduktase-Familie, bevorzugt die aus *Pseudomonas putida* GB-1 (Datenbankcode CAB54054.1) oder eine Variante davon, oder um eine
10 flavinhaltige Alkoholdehydrogenase, bevorzugt die flavinhaltige Alkoholdehydrogenase aus *Candida tropicalis* (Datenbankcode AAS46878.1) oder eine Variante davon, handelt.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei in Schritt a) zusätzlich eine
15 Ferredoxin-Reduktase, bevorzugt die Ferredoxin-Reduktase aus *Alcanivorax borkumensis* SK2 (Datenbankcode YP_691923) oder eine Variante davon, und/oder ein Ferredoxin, bevorzugt das Ferredoxin aus *Alcanivorax borkumensis* SK2 (Datenbankcode YP_691920) oder eine Variante davon, anwesend ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei Schritt c) in Anwesenheit einer
20 Alanindehydrogenase, Ammonium und NADH erfolgt und es sich bei der Alanindehydrogenase um die Alanindehydrogenase aus *Bacillus subtilis subsp. subtilis* str. 168 (Datenbankcode NP_391071) oder eine Variante davon handelt.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei wenigstens ein Enzym aus der
25 Gruppe umfassend Cytochrom P450-Monooxygenase der CYP153-Familie, Alkoholdehydrogenase, Transaminase, Alanindehydrogenase, Ferredoxin und Ferredoxin-Reduktase rekombinant in Form von einem Ganzzellkatalysator bereitgestellt wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei sämtliche in wenigstens einem der Schritte a), b) oder
30 c) mit der Fettsäure oder dem Ester davon, der weiter oxidierten Fettsäure oder dem Ester davon aus Schritt b) oder der aminierten weiter oxidierten Fettsäure oder dem Ester davon aus Schritt c) kontaktierten oder anwesenden Enzyme aus der Gruppe umfassend Cytochrom P450-Monooxygenase der CYP153-Familie, Alkoholdehydrogenase,

Transaminase, Alanindehydrogenase, Ferredoxin und Ferredoxin-Reduktase rekombinant in Form eines oder mehr als eines Ganzzellkatalysators bereitgestellt werden.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 8, wobei der Ganzzellkatalysator zusätzlich ein Polypeptid der AlkL-Familie, bevorzugt ein AlkL aus der Gruppe umfassend AlkL aus *Pseudomonas putida* (Datenbankcode CAB69081), *Marinobacter aquaeolei* VT8 (Datenbankcode YP_957722), *Oceanicaulis alexandrii* HTCC2633 (Datenbankcode ZP_00953584), *Marinobacter manganoxydans* Mnl7-9 (Datenbankcode ZP_09158756), *Caulobacter* sp. K31 (Datenbankcode YP_001672217), *Pseudomonas oleovorans* (Datenbankcode Q00595) oder eine Variante davon exprimiert.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 9, wobei es sich bei dem Ganzzellkatalysator um eine Zelle handelt, die eine ihrem Wildtyp gegenüber verringerte Aktivität wenigstens eines Enzyms aufweist, das eine der Reaktionen der β -Oxidation von Fettsäuren katalysiert, wobei das Enzym bevorzugt aus der Gruppe ausgewählt ist, die Fettsäureimporter, Fettsäure-CoA-Ligase, Acyl-CoA-Dehydrogenase, 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase, Enoyl-CoA-Hydratase und 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase umfasst.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 10, wobei die Alanindehydrogenase in Schritt c) so ausgewählt ist, dass sie den von der Alkoholdehydrogenase in Schritt b) oxidierten Redoxcofaktor, bevorzugt NAD^+ oder NADP^+ , reduziert.
12. Ganzzellkatalysator exprimierend eine rekombinante Cytochrom P450-Monooxygenase der CYP153-Familie, eine rekombinante Alkoholdehydrogenase, eine rekombinante Transaminase und optional ein oder mehr als ein rekombinantes Enzym aus der Gruppe umfassend Alanindehydrogenase, Ferredoxin und Ferredoxin-Reduktase.
13. Ganzzellkatalysator nach Anspruch 12, wobei der Ganzzellkatalysator zusätzlich ein Polypeptid der AlkL-Familie, bevorzugt ein AlkL aus der Gruppe umfassend AlkL aus *Pseudomonas putida* (Datenbankcode CAB69081), *Marinobacter aquaeolei* VT8 (Datenbankcode YP_957722), *Oceanicaulis alexandrii* HTCC2633 (Datenbankcode ZP_00953584), *Marinobacter manganoxydans* Mnl7-9 (Datenbankcode ZP_09158756), *Caulobacter* sp. K31 (Datenbankcode YP_001672217), *Pseudomonas oleovorans* (Datenbankcode Q00595) oder eine Variante davon, exprimiert.

14. Ganzzellkatalysator nach einem der Ansprüche 12 bis 13, wobei es sich bei dem Ganzzellkatalysator um eine Zelle handelt, die eine ihrem Wildtyp gegenüber verringerte Aktivität wenigstens eines Enzyms aufweist, das eine der Reaktionen der β -Oxidation von Fettsäuren katalysiert, wobei das Enzym bevorzugt aus der Gruppe ausgewählt ist, die Fettsäureimporter, Fettsäure-CoA-Ligase, Acyl-CoA-Dehydrogenase, 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase, Enoyl-CoA-Hydratase und 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase umfasst.
15. Ganzzellkatalysator nach einem der Ansprüche 12 bis 14, wobei der Ganzzellkatalysator eine Ferredoxin-Reduktase und ein Ferredoxin exprimiert.
16. Ganzzellkatalysator nach einem der Ansprüche 12 bis 15, wobei der Ganzzellkatalysator eine Alanindehydrogenase exprimiert, wobei es sich um die Alanindehydrogenase aus *Bacillus subtilis subsp. subtilis* str. 168 (Datenbankcode NP_391071) oder eine Variante davon handelt.
17. Ganzzellkatalysator nach einem der Ansprüche 12 bis 16, wobei die Cytochrom P450-Monooxygenase der CYP153-Familie die Peptidsequenz LL(I/L)(V/I)GGNDTTRN aufweist und/oder es sich um die Cytochrom P450-Monooxygenase der CYP153-Familie aus *Alcanivorax borkumensis* SK2 (Datenbankcode YP_691921) oder eine Variante davon handelt, und es sich bei der Ferredoxin-Reduktase um die Ferredoxin-Reduktase aus *Alcanivorax borkumensis* SK2 (Datenbankcode YP_691923) oder eine Variante davon handelt und es sich bei dem Ferredoxin um das Ferredoxin aus *Alcanivorax borkumensis* SK2 (Datenbankcode YP_691920) oder eine Variante davon handelt.
18. Ganzzellkatalysator oder Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, wobei es sich bei der Alkoholdehydrogenase um eine NAD(P)^+ -abhängige Alkoholdehydrogenase, um eine Oxidoreduktase der Glucose-Methanol-Cholin-Oxidoreduktase-Familie oder um eine flavinhaltige Alkoholorxidase handelt, bevorzugt um eine NAD(P)^+ -abhängige Alkoholdehydrogenase, am bevorzugtesten um die NAD -abhängige Alkoholdehydrogenase aus *Escherichia coli* MS 187-1 (Datenbankcode ZP_07145023) oder eine Variante davon handelt.

19. Ganzzellkatalysator oder Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, wobei es sich bei der Transaminase um die Transaminase aus *Pseudomonas putida* GB-1 (Datenbankcode YP_001668026.1) oder eine Variante davon handelt.

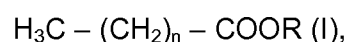
5 20. Ganzzellkatalysator oder Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 19, wobei es sich bei der Fettsäure um eine ungesättigte oder verzweigte Fettsäure handelt.

10 21. Ganzzellkatalysator oder Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, wobei wenigstens ein Enzym aus der Gruppe umfassend Cytochrom P450-Monooxygenase der CYP153-Familie, Alkoholdehydrogenase, Transaminase, Alanindehydrogenase, Ferredoxin und Ferredoxin-Reduktase rekombinant in Form von einem Ganzzellkatalysator bereitgestellt wird, oder wird die Aufgabe gelöst durch einen Ganzzellkatalysator, wobei es sich bei dem Ganzzellkatalysator um eine Zelle handelt, die eine relativ zum Wildtyp der Zelle verringerte Aktivität wenigstens einer endogenen Aldehyddehydrogenase handelt.

15

22. Verwendung des Ganzzellkatalysators nach einem der Ansprüche 12 bis 21 zur Oxidation und/oder Aminierung einer Fettsäure oder eines Esters davon, wobei die Fettsäure oder der Ester davon bevorzugt die Formel (I)

20



wobei R aus der Gruppe ausgewählt ist, die H, Methyl, Ethyl, Propyl und Butyl umfasst,

25 wobei n 0 bis 30, bevorzugt 6 bis 24 ist,

aufweist

30 23. Verwendung des Ganzzellkatalysators nach Anspruch 22, wobei die Oxidation eine Mischung von Oxidationsprodukten ergibt, die, bezogen auf die Stoffmenge der umgesetzten Fettsäure oder des Esters davon, wenigstens 90 % des entsprechenden Alkohols, weniger als 1 % des entsprechenden Aldehydes und weniger als 10 % der entsprechenden Säure umfasst.

24. Verwendung des Ganzzellkatalysators nach einem der Ansprüche 22 bis 23, wobei es sich es sich bei der Fettsäure um eine ungesättigte oder verzweigte Fettsäure handelt.