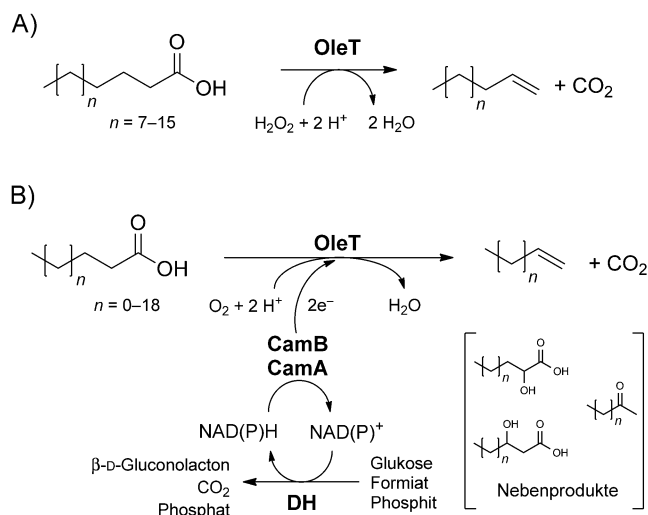


Oxidative Decarboxylierung von kurzkettigen Fettsäuren zu 1-Alkenen**

Alexander Dennig, Miriam Kuhn, Sebastian Tassoti, Anja Thiessenhusen, Stefan Gilch, Thomas Bülter, Thomas Haas, Mélanie Hall und Kurt Faber*

Abstract: Die enzymatische oxidative Decarboxylierung von linearen kurzkettigen Fettsäuren (C4:0–C9:0) unter Verwendung der P450-Monooxygenase OleT, O₂ und NAD(P)H als Elektronendonator ermöglicht die Synthese terminaler C₃- bis C₈-Alkene mit Produkttitern von bis zu 0.93 g L⁻¹ und TTNs > 2000. Essentiell für diesen Prozess war die Entwicklung einer effizienten Elektronentransferkette unter Verwendung von Putidaredoxin (CamAB) und NAD(P)H-Regeneration basierend auf Glukose, Ameisensäure oder Phosphonat. Mithilfe dieses Reaktionssystems lassen sich auf biokatalytischem Weg industriell wichtige Alkene, wie z. B. Propen und 1-Octen zum ersten Mal vollständig aus nachwachsenden Rohstoffen herstellen.

In den letzten Jahrzehnten wurden große Anstrengungen unternommen, um Biomasse in organische Synthesebausteine zu transformieren, als alternatives Konzept zu einer Erdöl-basierten Industrie.^[1,2] Die industrielle Synthese organischer Verbindungen erfolgt mittels weniger Intermediate, ausgehend von kurzkettigen Olefinen und Aromaten.^[3] Im Gegensatz dazu spielt die terminale Alken-Funktionalität in der Biosynthese nur eine untergeordnete Rolle.^[3d] Als ideales Ausgangsmaterial zur Synthese von 1-Alkenen dienen gesättigte Fettsäuren (FS; C_x:0), da Kohlenstoff in niedriger Oxidationsstufe vorliegt und FS in großen Mengen aus natürlichen Quellen bezogen werden können. Zahlreiche chemische Methoden existieren zur Herstellung von 1-Alkenen (≥ C₉) aus gesättigten FS. Diese benötigen zumeist Metallkatalysatoren und hohe Temperaturen (> 130 °C).^[4] Rude et al. zeigten zum ersten Mal, dass eine P450-Monooxygenase (OleT) die oxidative Decarboxylierung von gesättigten, langkettigen FS (C16:0, C18:0, C20:0) zu terminalen Olefinen katalysiert, unter Verwendung von H₂O₂ als Oxidationsmittel (Schema 1, Weg A; Tabelle 1, Eintrag 1).^[5] In weiteren Studien wurde die Kristallstruktur von OleT untersucht und das



Schema 1. Oxidative Decarboxylierung gesättigter FS zu 1-Alkenen durch OleT. Weg A) Decarboxylierung langkettiger FS (C12:0–C20:0) mit H₂O₂ über den Peroxid-Shunt. Weg B) Enzymatische Redoxkaskade zur Decarboxylierung von FS (C4:0–C22:0) unter Verwendung von O₂ und NAD(P)H-Regeneration. DH = Dehydrogenase.

Substratspektrum bis C12:0 erweitert (Tabelle 1, Einträge 2 und 3).^[6] Liu et al. konnten zum ersten Mal zeigen, dass OleT ohne H₂O₂ und mithilfe eines enzymatischen Elektronentransfersystems FS oxidativ decarboxylieren kann.^[6b] Die Verwendung von NADPH und O₂ als Oxidationsmittel ermöglicht die Umgehung des problematischen H₂O₂-Shunts.^[7] Berichtete Aktivitäten für OleT weisen starke Unterschiede auf, wobei in allen Fällen die Bildung von α- und β-Hydroxysäuren als Nebenprodukte vorlag.^[5,6,7c] Kürzlich wurde eine Nicht-Häm-Eisenoxidase^[8] entdeckt, welche die Decarboxylierung von C10:0 katalysiert. Diese zeigte jedoch niedrige TTNs (total turnover numbers) und Produktivitäten (TTN bis 6.5, TOF bis 3.6 min⁻¹ mit C12:0 als Substrat) und ein enges Substratspektrum (FS von C10:0–C14:0). Die photobiokatalytische H₂O₂-Bildung zeigte ebenfalls nur geringe Aktivitäten für OleT (Tabelle 1, Eintrag 4).^[7c] Die vorliegende Studie zeigt die Entwicklung eines biokatalytischen Systems zur effizienten Decarboxylierung von kurzkettigen FS, einschließlich Buttersäure (Schema 1, Weg B).

Vorversuche mit OleT und H₂O₂ als Oxidationsmittel zeigten eine signifikant reduzierte Aktivität bei der Umsetzung von Stearin- (C18:0) und Palmitinsäure (C16:0) (Tabelle 1, Einträge 5 und 6; Tabelle S2 in den Hintergrundinformationen (SI)).^[5] Eine Erhöhung der H₂O₂-Konzentration (> 400 μM) führte dazu, dass OleT ausfällt. Bis heute sind

[*] Dr. A. Dennig, M. Kuhn, S. Tassoti, Dr. M. Hall, Prof. Dr. K. Faber
Institut für Chemie, Universität Graz
Heinrichstraße 28, 8010 Graz (Österreich)
E-Mail: Kurt.Faber@Uni-Graz.at

A. Thiessenhusen, Dr. S. Gilch, Dr. T. Bülter, Dr. T. Haas
Creavis, Evonik Industries, Bau 1420
Paul Baumann Straße 1, 45772 Marl (Deutschland)

[**] Wir danken Prof. Dr. Schallmeyer (TU Braunschweig) für das Plasmid mit dem CamAB-System und Dr. Gerald Rechberger (KFU Graz) für seine Unterstützung bei der Headspace-GC-MS-Analyse.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (einschließlich einer detaillierten Beschreibung der Quantifizierung der enzymatisch hergestellten Verbindungen 1-Buten und Propen) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201502925> zu finden.

Tabelle 1: Vergleich von Redoxsystemen zur Decarboxylierung von FS mit OleT.^[a]

Eintrag	OleT [μM]/ Substrat [mM]	Oxidationsmittel/ Elektronenquelle	1-Alken [μM]	TOF [min^{-1}]	TON	Lit.
1	0.5/0.2 (C16:0)	H ₂ O ₂ Batch	max. 18	≈ 7	n.r.	[5]
2	4.6/0.012 (C20:0) ^[b]	H ₂ O ₂ Batch	n.r.	10020 ^[b]	n.r.	[6a]
3	1/0.2 (C14:0)	H ₂ O ₂ Batch	194	1.1	194	[6b]
4	200/0.5 (C18:0) ^[c]	EDTA/FMN/ <i>h</i> ν	≈ 375	0.02	2.5	[7c]
5	0.32/1 (C18:0)	H ₂ O ₂ Batch ^[d]	23	n.d.	72	diese Arbeit
6	0.32/1 (C18:0)	H ₂ O ₂ Fed-Batch ^[e]	31	n.d.	99	diese Arbeit
7	0.32/1 (C18:0)	O ₂ /NADPH ^[f]	124	n.d.	391	diese Arbeit
Eintrag	Reaktionszeit [min]	Oxidationsmittel/ Elektronenquelle	1-Alken [μM] C18:0/C16:0	TOF [h^{-1}] C18:0/C16:0	TON C18:0/C16:0	Kopplung [%] C18:0/C16:0
8	150 ^[g]	O ₂ /1 mM NADPH	118 \pm 23/33	47/13	118/33	11/3
9	60 ^[g]	O ₂ /1 mM NADH	20 \pm 2/9	20/9	20/9	2/1
10	150	1 mM H ₂ O ₂ ^[h]	53 \pm 15/29	21/12	53/29	5/7
11	150	Kontrolle ^[i]	0	0	0	0

[a] Einträge 5–7 (Doppelansatz): 1 mM Substrat (C18:0), 0.5 % EtOH (v/v), gereinigtes OleT (1 μM), KPi-Puffer (pH 7.5, 0.1 M). Einträge 8, 9 und 11 (Dreifachansatz): 1 mM Substrat (C18:0, C16:0), 2.5 % EtOH (v/v), 1 μM gereinigtes OleT, 0.05 U mL⁻¹ CamAB, 1200 U mL⁻¹ Katalase, KPi-Puffer (pH 7.5, 0.1 M). Eintrag 10 (Dreifachansatz): 1 mM Substrat (C18:0, C16:0), 2.5 % EtOH (v/v), 1 μM gereinigtes OleT, KPi-Puffer (pH 7.5, 0.1 M) und H₂O₂. [b] Stop-flow-Kinetik gemessen für 30 s, keine Produkte charakterisiert. [c] Zellfreies Lysat verwendet. [d] 1 mM H₂O₂, 16 h, 25 °C. [e] 27 \times 25 μM H₂O₂ alle 15 min, 50 °C. [f] Spinat-Ferredoxin-Reduktase/Ferredoxin. [g] Zeit bis zur vollständigen Oxidation des Cofaktors. [h] Starkes Ausfallen des Proteins beobachtet. [i] Eine der folgenden Komponenten wurde ausgelassen: OleT, H₂O₂, CamAB, NAD(P)H oder Substrat (C18:0).

CYP_{BS β} und CYP_{SP α} die einzigen P450-Monooxygenasen von > 20000 CYPs, welche effizient als Peroxygenasen funktionieren.^[7b,9] Die höchste Produktivität erreichte OleT bei einer H₂O₂-Konzentration von 400 μM (TON von 72) (Tabelle 1, Eintrag 5). Die Zugabe von H₂O₂ als Fed-Batch^[7a,10] reduzierte die Enzyminaktivierung (TON von 99), jedoch blieb der Umsatz niedrig (< 3 %, Tabelle 1, Eintrag 6). Alternativ zeigte die Verwendung der Elektronentransferkomponenten aus Spinat und Putidaredoxin CamAB (Tabelle 1, Einträge 7–9)^[11] verbesserte Decarboxylierung der FS C18:0 (TTN bis zu 2096; Tabelle 2, Eintrag 3). Eine niedrige CamAB-Konzentration war dabei optimal für einen höheren Umsatz (Abbildung S10). Obwohl NAD(P)H auch in Abwesenheit eines Elektronenakzeptors durch CamAB oxidiert werden kann,^[12]

Tabelle 2: Oxidative Decarboxylierung von FS (C18:0) durch OleT mit unterschiedlichen Elektronenquellen.^[a]

Eintrag	Elektronen- quelle	Redoxpartner	OleT [μM]	1-Alken [mM]	TTN
1	D-Glukose	GDH-CamAB	1.5	1.02	680
2	Na ₂ HPO ₃	PDH-CamAB	1.5	2.61	1739
3	NH ₄ HCO ₂	FDH-CamAB	1.5	3.14	2096
4	NH ₄ HCO ₂	FDH-CamAB	3	1.42 ^[b]	473
5	NH ₄ HCO ₂	FDH-CamAB ^[c]	3 ^[c]	1.57	522
6	D-Glukose	GDH (ohne CamAB)	3	0	0

[a] Reaktionsbedingungen: 5 mM FS (C18:0), 2.5 % EtOH, gereinigtes OleT, 0.05 U mL⁻¹ CamAB, 1200 U mL⁻¹ Katalase, KPi-Puffer (pH 7.5, 0.1 M), 200 μM NAD(P)H, 1 mL Reaktionsvolumen, RT und 170 rpm, 24 h; GDH (12 U mL⁻¹) und D-Glukose (100 mM) oder FDH (2 U mL⁻¹) und NH₄HCO₂ (100 mM) oder PDH (0.2 U mL⁻¹) und Na₂HPO₃ (100 mM). [b] Reaktionszeit 8 h. [c] 53 mg zellfreies Lysat, enthält das Elektronentransfersystem Fdr/Fdx von *E. coli*.^[6b]

wurde auch nach vollständiger Oxidation von 1 mM NADH kein H₂O₂ detektiert. Dies zeigt, dass Elektronen direkt von CamAB auf OleT übertragen werden, sodass eine Inaktivierung durch H₂O₂ ausgeschlossen werden kann. Ebenso zeigte die Abwesenheit von Katalase keinen signifikanten Effekt auf die Produktivität (Tabelle S3).

Obwohl für NADH höhere Oxidationsraten gemessen wurden (10-fach höher als NADPH, Tabelle S2), war die Kopplung der Elektronen um das 3- bis 5.5-fache niedriger (Tabelle 1, Einträge 8 und 9). Die niedrigere Produktivität und niedrige Kopplungseffizienz für C16:0 (Tabelle 1, Einträge 8–10) deuten auf eine Präferenz von OleT für langkettige FS.^[5,7c,14]

Zur Umsetzung höherer Substratkonzentrationen wurde ein NAD(P)H-Regenerationssystem verwendet, wobei das Glukose-Dehydrogenase(GDH)-basierte System einen verbesserten Umsatz (36 % aus 1 mM C18:0, Tabelle S3, Eintrag 1) und höhere TTN (389 für 10 mM C18:0) zeigte. Die daraus erhaltenen Produktmengen für C18:0 und C16:0 lagen bei 1.16 mM (0.27 g L⁻¹) 1-Heptadecen bzw. 1 mM (0.21 g L⁻¹) 1-Pentadecen nach 24 h (Tabelle S3). Die Bildung von Glukonsäure [Nebenprodukt der NAD(P)H-Regeneration] führte bereits ab 10 mM zu einer reduzierten Produktivität (Abbildung S12), welche sich durch die Bindung der Glukonsäure an die Aminosäure R245 erklären lässt.^[6a] Alternative NAD(P)H-Regenerationssysteme zeigten eine höhere Effizienz, z.B. eine Phosphit-Dehydrogenase (PDH; NADPH-abhängig)^[15] und eine Formiat-Dehydrogenase (FDH; NADH-abhängig).^[16] Dabei wurden Produktkonzentrationen von 2.6 mM (0.62 g L⁻¹) bzw. 3.1 mM (0.75 g L⁻¹) 1-Heptadecen ausgehend von 5 mM C18:0 erreicht (52 % und 62 % Umsatz). Dies entspricht dem höchsten berichteten TTN-Wert für OleT (1739 bzw. 2096, Tabelle 2, Einträge 2 und 3). Im Vergleich zu einem publizierten Ganzzell-Sys-

tem,^[6b] erreicht das FDH-System einen 9,5-fach höheren Produkttitel (930 mg L^{-1} 1-Alken) sowie eine 21-fach höhere volumetrische Produktivität von $42.5 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 1-Alken (Tabelle 2, Eintrag 4) gegenüber $2 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.^[8] Eine Reduzierung der NADH-Konzentration (von 200 bis $10 \mu\text{M}$) hatte keinen Einfluss auf die Produktbildung (Tabelle S4). Nach Umsetzung von C18:0 im 50 mL Maßstab konnten 47 % isoliertes Produkt gewonnen werden. Ebenso wurde gefriergetrocknetes zellfreies Lysat verwendet, wobei ein Produkttitel von 0.37 g L^{-1} 1-Heptadecen ($1565 \mu\text{M}$, 31 % Umsatz, Tabelle 2, Eintrag 5) erreicht wurde und eine aufwendige Proteinaufreinigung umgangen wird.

Im nächsten Schritt wurde das Substratspektrum für FS der Kettenlänge C4:0 bis C22:0 untersucht (Tabelle 3). Dabei wurden die Reaktionen auch bei 4°C durchgeführt, um einen Verlust leichtflüchtiger 1-Alkene zu minimieren. Unerwartet

Tabelle 3: Substratspektrum der OleT-CamAB-FDH-Kaskade bei Raumtemperatur und 4°C .^[a]

Eintrag	FS	1-Alken [mM] RT/ 4°C	1-Alken [%] RT/ 4°C	α -OH + β -OH + 2-Alkanon [%] ^[b] RT/ 4°C
1	C22:0	n.d./n.d.	> 99/93 ^[c]	0/7
2	C20:0	n.d./n.d.	> 99/ > 99 ^[c]	0/0
3	C18:0	3.88/2.45	85/92	15/8
4	C16:0	1.11/2.06	69/80	31/20
5	C14:0	0.55/1.24	59/78	41/22
6	C12:0	0.27/3.26	> 99/73	0/27
7	C11:0	0/0.19	0/ > 99	0/0
8	C10:0	0.04/0.07	> 99/ > 99	0/0
9	C9:0	1.83/1.34	48/38	52/62
10	C8:0	2.45/2.25	> 99/ > 99 ^[d]	n.e./n.e.
11	C7:0	1.29/0.95	> 99/ > 99 ^[d]	n.e./n.e.
12	C6:0	1.17/0.77	> 99/ > 99 ^[d]	n.e./n.e.
13	C5:0	0.83/n.e.	> 99 ^[d] /n.e.	n.e./n.e.
14	C4:0	0.49/n.e.	> 99 ^[d] /n.e.	n.e./n.e.

[a] Reaktionsbedingungen befinden sich im Abschnitt Experimentelles.

[b] Signalfäche im GC. [c] Große Menge an Substrat isoliert (ESI).

[d] Detektiert mittels Headspace GC-MS. n.e.: nicht ermittelt.

zeigte OleT bei 4°C eine hohe Produktivität, insbesondere für C12:0 (Tabelle 3, Eintrag 6). Im Gegensatz zum OleT-RhFRed-Fusionssystem^[6b] wurde der höchste Umsatz für die FS 18:0 bei Raumtemperatur erreicht (0.93 g L^{-1} , Tabelle 3, Eintrag 3). Bemerkenswert ist, dass auch kurzkettige FS ($< \text{C9}$) decarboxyliert wurden, sodass zum ersten Mal 1-Alkene mit einer Kettenlänge von C9–C4 (0.04 bis 2.45 mM) direkt aus FS hergestellt werden können. Die Bildung der 1-Alkene aus Umsetzungen von kurzkettigen FS (C8:0–C4:0) wurde mittels Headspace-GC-MS-Analytik nachgewiesen (Details in den SI). Produktausbeuten waren stark abhängig von der Reaktionstemperatur und Kettenlänge der Substrate, wobei die Produktivität für C18:0 bei Raumtemperatur am höchsten war (max. 3.88 mM aus 10 mM C18:0) und C12:0 das beste Substrat bei 4°C (3.26 mM 1-Undecen) darstellte.

Allgemein war der Umsatz von FS der Kettenlänge C10:0–C16:0 höher bei 4°C . Im Gegensatz zu vorherigen Berichten über das Substratspektrum von OleT, mit einer Präferenz für langkettige FS (C22:0–C14:0),^[5,6,7c,14] erlaubt

das vorliegende System die Herstellung von Propen aus Buttersäure in einem einzigen Reaktionsschritt. Es ist weitläufig akzeptiert, dass langkettige FS insbesondere im Substratkanal Interaktionen haben^[6a] und kürzere Substrate im aktiven Zentrum binden wie bei CYP_{BSB}.^[17] FS mit mittlerer Kettenlänge (C10:0–C11:0) können nicht effizient binden und stellen somit schlechte Substrate dar (Tabelle 3, Einträge 7 und 8). Allgemein war die Decarboxylierung die Hauptreaktion (86–99 % Selektivität für C18:0–C22:0). Daneben wurde die Bildung von α/β -Hydroxysäuren detektiert, welche jedoch stark von der Kettenlänge und Temperatur abhängig war (max. 62 % α/β -Hydroxylierung für C9:0 bei 4°C). Zusätzlich wurden Spuren von 2-Alkanonen nachgewiesen (C16:0 und C18:0). Diese stammen wahrscheinlich aus der enzymatischen Oxidation der β -Hydroxysäuren (ähnlich wie bei CYP52A17^[18]), wobei nach spontaner Decarboxylierung der β -Ketosäuren die Alkanone erhalten werden.

Die erfolgreiche Decarboxylierung kurzkettiger FS kann durch die verbesserten Reaktionsbedingungen erklärt werden: 1) Höhere Substratkonzentrationen (10 mM anstatt 200 – $500 \mu\text{M}$)^[5,6,7c] umgehen niedrige Substrataffinitäten, wie gezeigt für P450 BM3,^[19] 2) Elektronen werden im Überschuss mittels eines Klasse-I-Elektronentransfersystems bereitgestellt. Die gute Kompatibilität von CamAB und OleT ist möglich durch eine ähnliche Koordination des proximalen Cystein-Thiolats von OleT und P450_{Cam} im „ferrous state“ (Fe^{2+}),^[6a] welches die Bindung von O_2 an das Häm-Eisen erlaubt.^[20] Die meisten bakteriellen P450s verwenden Elektronentransfersysteme der Klasse I.^[13b] Dies erklärt, warum OleT in Kombination mit CamAB eine höhere Produktivität hat als OleT-RhFRed oder Fdr/Fdx.^[6b]

Eine deutlich verbesserte katalytische Aktivität von OleT mit O_2 als Oxidationsmittel und NAD(P)H als Elektronendonator, im Gegensatz zu H_2O_2 , stellt die Klassifizierung von OleT als Peroxygenase in Frage.^[5] Die Funktion als Peroxygenase innerhalb der natürlichen Umgebung bedarf entweder einer Kompartimentalisierung innerhalb des Bakteriums (z. B. in Peroxisomen) oder der extrazellulären Sekretierung, wie bei Häm-Peroxygenasen aus Pilzen.^[10a,21] Da OleT unter Verwendung von O_2 und NAD(P)H in einer „biosynthetischen“ Redoxkaskade drastisch erhöhte TTNs aufzeigt, scheint OleT eher als Monooxygenase zu funktionieren.

Zusammengefasst ermöglicht das gezeigte System die oxidative Decarboxylierung von FS durch OleT, wobei Produkttitel von bis zu 0.93 g L^{-1} und TTNs > 2000 bei geringer Menge an Katalysator (0.06%) erreicht wurden. Das System ermöglicht den ersten direkten biokatalytische Zugang zu Propen und 1-Buten aus kurzkettigen FS.

Experimentelles

Allgemeine Prozedur zur Decarboxylierung von FS (C22:0–C4:0): Die Reaktion enthält gereinigtes OleT ($3 \mu\text{M}$ für C22:0–C14, $6 \mu\text{M}$ für C12:0–C4:0), 0.05 U mL^{-1} CamAB, 1200 U mL^{-1} Katalase, 10 mM FS, 5 % EtOH, KPi Puffer (pH 7.5, 0.1 M), NADH or NAD^+ ($200 \mu\text{M}$), FDH (2 U mL^{-1}) und NH_4HCO_2 (100 mM). Alle Umsetzungen von FS (C22:0 bis C6:0) wurden unter atmosphärischem Druck und bei Raumtemperatur (oder 4°C) in 1 mL Reaktionsvolumen und 170 rpm für 24 h durchgeführt. FS (C5:0 und C4:0) wurden bei

Raumtemperatur in 10 mL Reaktionsvolumen bei kontinuierlicher Rührung umgesetzt.

Stichwörter: 1-Alkene · Biokatalyse · Fettsäuren · OleT · Oxidative Decarboxylierung

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 8819–8822
Angew. Chem. **2015**, *127*, 8943–8946

- [1] A. J. Straathof, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 1871–1908.
- [2] J. Murray, D. King, *Nature* **2012**, *481*, 433–435.
- [3] a) A. Bollmann, K. Blann, J. T. Dixon, F. M. Hess, E. Killian, H. Maumela, D. S. McGuinness, D. H. Morgan, A. Neveling, S. Otto, M. Overett, A. M. Slawin, P. Wasserscheid, S. Kuhlmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14712–14713; b) D. S. McGuinness, A. J. Rucklidge, R. P. Tooze, A. M. Z. Slawin, *Organometallics* **2007**, *26*, 2561–2569; c) S. K. Lee, H. Chou, T. S. Ham, T. S. Lee, J. D. Keasling, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2008**, *19*, 556–563; d) R. Kourist, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *127*, 4156–4158; *Angew. Chem.* **2015**, *54*, 4228–4230.
- [4] a) Y. Liu, K. E. Kim, M. B. Herbert, A. Fedorov, R. H. Grubbs, B. M. Stoltz, *Adv. Synth. Catal.* **2014**, *356*, 130–136; b) L. J. Gooßen, N. Rodriguez, *Chem. Commun.* **2004**, 724–725.
- [5] M. A. Rude, T. S. Baron, S. Brubaker, M. Alibhai, S. B. Del Cardayre, A. Schirmer, *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 1718–1727.
- [6] a) J. Belcher, K. J. McLean, S. Matthews, L. S. Woodward, K. Fisher, S. E. Rigby, D. R. Nelson, D. Potts, M. T. Baynham, D. A. Parker, D. Leys, A. W. Munro, *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 6535–6550; b) Y. Liu, C. Wang, J. Yan, W. Zhang, W. Guan, X. Lu, S. Li, *Biotechnol. Biofuels* **2014**, *7*, 28–39.
- [7] a) T. Krieg, S. Hüttmann, K.-M. Mangold, J. Schrader, D. Holtmann, *Green Chem.* **2011**, *13*, 2686–2689; b) A. Vidal-Limón, S. Aguila, M. Ayala, C. V. Batista, R. Vazquez-Duhalt, *J. Inorg. Biochem.* **2013**, *122*, 18–26; c) I. Zachos, S. K. Gassmeyer, D. Bauer, V. Sieber, F. Hollmann, R. Kourist, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 1918–1921.
- [8] Z. Rui, X. Li, X. Zhu, J. Liu, B. Domigan, I. Barr, J. H. Cate, W. Zhang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 18237–18242.
- [9] a) I. Matsunaga, E. Kusunose, I. Yano, K. Ichihara, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *201*, 1554–1560; b) I. Matsunaga, A. Ueda, N. Fujiwara, T. Sumimoto, K. Ichihara, *Lipids* **1999**, *34*, 841–846.
- [10] a) R. Ullrich, J. Nuske, K. Scheibner, J. Spantzel, M. Hofrichter, *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 4575–4581; b) F. van de Velde, N. D. Lourenco, M. Bakker, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *69*, 286–291.
- [11] a) P. Bracco, D. B. Janssen, A. Schallmeyer, *Microb. Cell Fact.* **2013**, *12*, 95; b) P. W. Roome, Jr., J. C. Philley, J. A. Peterson, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 2593–2598; c) A. Schallmeyer, G. den Besten, I. G. Teune, R. F. Kembaren, D. B. Janssen, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *89*, 1475–1485.
- [12] D. P. Nickerson, C. F. Harford-Cross, S. R. Fulcher, L. L. Wong, *FEBS Lett.* **1997**, *405*, 153–156.
- [13] a) R. Bernhardt, V. B. Urlacher, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 6185–6203; b) F. Hannemann, A. Bichet, K. M. Ewen, R. Bernhardt, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2007**, *1770*, 330–344.
- [14] M. Mitchell, J. Grant, C. Hsieh, T. Makris, *FASEB J.* **2014**, *28*, http://www.fasebj.org/content/28/21_Supplement/580.585.
- [15] J. M. Vrtis, A. K. White, W. W. Metcalf, W. A. van der Donk, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3257–3259; *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3391–3393.
- [16] E. Busto, N. Richter, B. Grischek, W. Kroutil, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 11225–11228.
- [17] a) O. Shoji, T. Fujishiro, H. Nakajima, M. Kim, S. Nagano, Y. Shiro, Y. Watanabe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3656–3659; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 3730–3733; b) O. Shoji, Y. Watanabe, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2014**, *19*, 529–539.
- [18] W. H. Eschenfeldt, Y. Zhang, H. Samaha, L. Stols, L. D. Eirich, C. R. Wilson, M. I. Donnelly, *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 5992–5999.
- [19] A. Dennig, J. Marienhagen, A. J. Ruff, L. Guddat, U. Schwaneberg, *ChemCatChem* **2012**, *4*, 771–773.
- [20] a) B. Meunier, S. P. de Visser, S. Shaik, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3947–3980; b) M. Sono, M. P. Roach, E. D. Coulter, J. H. Dawson, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2841–2888.
- [21] a) M. Hofrichter, R. Ullrich, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 116–125; b) D. R. Morris, L. P. Hager, *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 1763–1768.
- [22] C. J. Whitehouse, S. G. Bell, L. L. Wong, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1218–1260.

Eingegangen am 30. März 2015
Online veröffentlicht am 11. Juni 2015