DECHEMA
FORSCHUNGSINSTITUT
Stiftung bürgerlichen Rechts

Materials
Chemical Engineering
Biotechnology

Forschungsberichte Nr. 22

Sebastian Bormann

2021

Process engineering and heterologous enzyme production for hydrogen peroxide driven biocatalysis

Herausgeber: DECHEMA-Forschungsinstitut • Stiftung bürgerlichen Rechts
Vorstand: Prof. Dr. rer. nat. Jens Schrader
Sitz der Stiftung: Frankfurt am Main
www.dechema-dfi.de

Process engineering and heterologous enzyme production for hydrogen peroxide driven biocatalysis

Vom Fachbereich Maschinenbau und Verfahrenstechnik
der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades

Doktor-Ingenieur (Dr.-Ing.)
genehmigte
Dissertation

von
Herrn
M. Sc. Nico Sebastian Bormann
aus Frankfurt am Main

Datum der mündlichen Prüfung: 24.11.2020

Dekan:	Prof. Dr.-Ing. Tilmann Beck
Vorsitzender:	Prof. Dr.-Ing. Hans Hasse
Berichterstatter:	Prof. Dr. Roland Ulber
	Prof. Dr.-Ing. Dirk Holtmann
	Prof. Dr. Volker Schünemann

Zeichen der Universität Kaiserslautern im Bibliotheksverkehr: D 386

Bormann, Nico Sebastian. Process engineering and heterologous enzyme production for hydrogen peroxide driven biocatalysis.

Dissertation

Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.2020.
Ort der Dissertation: Kaiserslautern, Technische Universität Kaiserslautern

Schriftenreihe des DECHEMA-Forschungsinstituts

Band 22

Sebastian Bormann

Process engineering and heterologous enzyme production for hydrogen peroxide driven biocatalysis

D 386 (Diss. Technische Universität Kaiserslautern)

Shaker Verlag
Düren 2021

Bibliographic information published by the Deutsche Nationalbibliothek
The Deutsche Nationalbibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data are available in the Internet at http://dnb.d-nb.de.

Zugl.: Kaiserslautern, TU, Diss., 2020

Copyright Shaker Verlag 2021
All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior permission of the publishers.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-7968-5
ISSN 2197-6155

Shaker Verlag GmbH • Am Langen Graben 15a • 52353 Düren
Phone: 0049/2421/99011-0 • Telefax: 0049/2421/99011-9
Internet: www.shaker.de • e-mail: info@shaker.de

Abstract

Unspecific peroxygenases (UPOs) are heme-thiolate peroxidases that can catalyze the oxygenation of even unactivated C—H bonds, as well as heteroatom oxygenation reactions, such as sulfoxidations. These enzymes only require hydrogen peroxide as a co-substrate. Given the high interest in regio- and stereospecific oxygenation catalysts for synthetic chemistry and the economic and ecologic advantages of hydrogen peroxide as a co-substrate, UPOs are attractive catalysts for biocatalytic applications. This work seeks to address several of the issues that will have to be faced on the way towards the industrial application of these enzymes.

To demonstrate the applicability of these enzymes for preparative biocatalysis, the production of 2-butanol from butane was established in a bubble column reactor at 2 L scale. Optimization of H_2O_2 feed rates and use of *in situ* product removal resulted in the production of $\geq$ 80 mM oxidized product. The biocompatibility of a carbon nanotube-coated gas diffusion electrode based H_2O_2-production system and its positive impact on the energy required for H_2O_2 production was demonstrated. An immobilization technique based on metal affinity binding of affinity-tagged UPO was developed and the reusability of the immobilizate demonstrated. A process model for an electroenzymatic UPO process was developed and its applicability for process prediction was shown. The heterologous production of various putative UPO genes was investigated in yeast. Three novel enzymes were produced, purified and characterized.

Kurzfassung

Unspezifische Peroxygenasen (UPOs) sind Häm-Thiolat Peroxidasen, welche in der Lage sind, die Oxygenierung nicht-aktivierter C—H Bindungen sowie Heteroatom-Oxygenierungen wie Sulfoxidationen, zu katalysieren. Hierbei benötigen sie ausschließlich Wasserstoffperoxid als Kosubstrat. Aufgrund des hohen Interesses an regio- und stereospezifischen Oxygenierungskatalysatoren für die Synthesechemie und der ökonomischen und ökologischen Vorteile von H_2O_2 als Kosubstrat besteht großes Potential für den Einsatz von UPOs für biokatalytische Anwendungen. Diese Arbeit widmet sich einigen der Herausforderungen, die auf dem Weg zur industriellen Anwendbarkeit der Enzyme auftreten können.

Die Anwendbarkeit von UPOs in präparativen Prozessen wurde Anhand der Oxygenierung von Butan zu 2-Butanol in einem 2 L Blasensäulenreaktor demonstriert. Durch Optimierung der H_2O_2-Dosierung und Einsatz eines *in situ* Produktabtrennungssystems konnten Produktkonzentrationen von ≥ 80 mM erreicht werden. Die Biokompatibilität eines auf einer Kohlenstoffnanotube-beschichteten Gasdiffusionselektrode basierenden elektrochemischen H_2O_2-Produktionssystems konnte demonstriert und eine Erhöhung der Energieeffizienz des bioelektrochemischen Prozesses ermittelt werden. Eine metallaffinitätsbasierte Immobiliserungsmethode für hexa-Histidin-markierte UPOs wurde etabliert und die Wiederverwendbarkeit des Immobilisats gezeigt. Am Beispiel eines elektrobiokatalytischen UPO-Prozesses wurde ein Prozessmodell entwickelt und die Vorhersagekraft des Modells für neue Prozessbedingungen dargelegt. Die heterologe Exprimierbarkeit diverser putativer UPO-Gene wurde in Hefe untersucht. Drei neue UPOs wurden produziert, aufgereinigt und charakterisiert.

Zusammenfassung

Unspezifische Peroxygenasen (UPOs) sind Häm-Thiolat Peroxidasen, welche in der Lage sind, die Oxygenierung nicht-aktivierter C—H Bindungen sowie Heteroatom-Oxygenierungen wie Sulfoxidationen, zu katalysieren. Insbesondere für die Synthesechemie sind Katalysatoren, die derartige Reaktionen regio- und stereoselektiv durchführen können, von hohem Interesse. Die von UPOs katalysierten Reaktionstypen gleichen denen der als Biokatalysatoren bereits etablierten P450 Monooxygenasen (P450s), da die Oxygenierungsreaktion durch die gleiche Oxoferryl-Porphyrin-π-Kation-Radikal-Spezies mit axialem Thiolat-Liganden katalysiert wird. Im Gegensatz zu P450s, welche häufig membranständig vorliegen und auf Elektronenübertragung durch eine NAD(P)H-abhängige Reduktase angewiesen sind, sind UPOs sekretierte Enzyme, welche direkt durch Reaktion mit Wasserstoffperoxid in die reaktive Form überführt werden. Auf dem Weg hin zur industriellen Anwendbarkeit dieser Enzyme sind jedoch Herausforderungen wie die Erhöhung der Vielfalt heterolog exprimierbarer UPOs sowie prozesstechnische Optimierungen, zum Beispiel zur Reduktion Wasserstoffperoxid-bedingter Enzyminaktivierung und zur Steigerung der Prozesseffizienz, zu meistern.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass UPOs in der Lage sind hohe katalytische Produktivitäten zu erreichen. Hierbei wurden häufig nur geringe Katalysatorkonzentrationen eingesetzt und somit nur analytische Produktmengen produziert. Wenige Beispiele existieren, die den präparativen Einsatz der Enzyme zur benzylischen Hydroxylierung zeigen. Dieser Reaktionstyp führt aufgrund der gegenüber nicht-aktivierten C—H Bindungen reduzierten Bindungsenergie zu deutlich höheren katalytischen Produktivitäten. Um zu demonstrieren, dass auch die Hydroxylierung einer vollständig nicht-aktivierten C—H Bindungen im präparativen Maßstab mit UPOs durchführbar ist und hierbei industriell relevante Produktkonzentrationen erreicht werden können, wurde die Oxidation von Butan zu 2-Butanol im Blasensäulenreaktor durch UPO etabliert. Hierbei wurde insbesondere der Einfluss der Enzymkonzentration und der H_2O_2-Dosierung auf die Produktivität im 0.2 L Maßstab untersucht und optimiert. Die Überoxidation von 2-Butanol zu 2-Butanon wurde als Nebenreaktion identifiziert. Der Prozess wurde in den 2 L Maßstab übertragen und mit einer *in situ* Produktabtrennung kombiniert, um das Produkt 2-Butanol kontinierlich aus dem Prozess zu entfernen. Im 2 Liter Maßstab konnten so Produktkonzentrationen (2-Butanol + 2-Butanon) von ≥ 80 mM produziert werden.

H_2O_2 zeichnet sich aufgrund seiner ökologischen und ökonomischen Eigenschaften als Kosubstrat für die Biokatalyse aus, da es günstig aus den Basischemikalien Wasser(stoff) und Sauerstoff erzeugt werden kann und als Reaktionsprodukt nur Wasser hinterlässt. Häm-Thiolat Peroxidasen sind jedoch häufig labil gegenüber diesem Kosubstrat, weswegen die genaue Dosierung wichtig ist, um hohe katalytische Produktivitäten zu erreichen. Gegenüber dem einfachen Zudosieren konzentrierter H_2O_2-Lösung zeichnet sich die *in situ* Produktion dadurch aus, dass sie lokale Konzentrationsmaxima und Volumenzunahme vermeidet. Insbesondere die elektrochemische Produktion ist vorteilhaft, da sie gegenüber enzymatischen und chemischen Methoden biokatalytisch kompatibel ist und ohne sakrifizielle Reagenzien auskommt. Entsprechende Katalysatoren müssen sowohl günstig herzustellen sein als auch hohe Energieeffizienz bieten. Der Einsatz oxidierter Kohlenstoffnanotubes (oCNTs) zur elektrochemischen H_2O_2-Produktion wurde bereits zuvor demonstriert und erfüllt beide Kriterien. Um zu zeigen, dass diese Vorteile auch im Rahmen eines gekoppelten bioelektrokatalytischen Systems beibehalten werden können, wurde die oCNT-basierte H_2O_2-Produktion mit einer enzymatischen Bromolaktonisierung gekoppelt. Um Limitierungen durch den Biokatalysator zu vermeiden, wurde nicht UPO, sondern Vanadium Chloroperoxidase eingesetzt, welche gegenüber H_2O_2 deutlich resistenter ist. Hierbei konnte die biokatalytische Kompatibilität der oCNT-beschichteten Elektrode bewiesen und eine Reduktion der zur H_2O_2-Produktion benötigten Energie von 32 kJ mol^{-1} gezeigt werden.

Aufgrund der hohen Produktionskosten von Häm-Enzymen ist die Maximierung der Produktivität des Biokatalysators äußert wichtig. Dies kann durch Optimierung der katalytischen Produktvität erreicht werden. Häufig müssen hier jedoch Prozessbedingunen gewählt werden, die die vollständige Inaktivierung des Biokatalysators bedingen, was zu unvollständigem Substratumsatz und somit zu höheren Aufreinigungskosten führen kann. Um nicht genutzten, jedoch noch aktiven Biokatalysator aus einem Prozess zu entfernen, ist dessen Immobilisierung nötig. Eine spezifische Immoblisierungsmethode auf Basis der Metallaffinität hexa-Histidin-markierter Enzyme wurde deshalb für UPOs etabliert. Hierfür wurde das hexa-Histidine markierte Enzym in *Pichia pastoris* produziert und charakterisiert. Die Immoblisierung des aufgereinigten Enzyms auf porösen Glasträgern sowie der Einsatz und die Wiederverwendbarkeit des Immobilisats konnten gezeigt werden. Darüber hinaus konnte demonstriert werden, dass der sekretierte Biokatalysator auch direkt aus der Kulturbrühe immobilisiert werden kann.

Die Modellierung (bio)chemischer Prozesse erlaubt die *in silico*-Nachverfolgung des Prozessverlaufs. Dies kann gerade dann von Vorteil sein, wenn die on-line Analyse

kritischer Reaktanden nur schwer möglich oder zu kostenintensiv wäre. Realitätsnahe Modelle erlauben darüber hinaus die Simulation neuer Prozessbedingungen, was schnelle Prozessoptimierungen möglich macht. Anhand von kinetischen Daten UPO-katalysierter Hydroxylierungsprozesse sollte die Modellierbarkeit eines solchen Prozesses in dieser Arbeit untersucht werden. Hierzu wurden verschiedene Gleichgewichtsreaktionsgleichungen in Erweiterung des Ping-Pong-Bi-Bi Mechanismus hergeleitet und deren Anwendbarkeit überprüft. Darüber hinaus wurde eine semi-empirische Inaktivierungskinetik entwickelt. Mit Hilfe dieses Modells konnten die ermittelten Prozessdaten mit hoher Übereinstimmung abgebildet werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die modellbasierte Steuerung der H_2O_2-Produktionsrate auf Basis vorhergesagter Enzyminaktivierungsraten möglich ist und somit neue Prozessbedingungen simuliert werden können.

Neben der Entwicklung effizienter UPO-katalysierter Prozesse ist die Verfügbarkeit der Biokatalysatoren eine wichtige Vorraussetzung für deren industrielle Anwendung. Da UPOs zumeist aus gentechnisch nicht zugänglichen Pilzen stammen, die häufig schwer kultivierbar sind, ist die heterologe Produktion der Enzyme von großer Bedeutung. Nur wenige UPOs können zur Zeit heterolog exprimiert werden. *P. pastoris* hat sich hierbei als Expressionssystem der Wahl herausgestellt, da mit diesem Organismus die höchsten Enzymtiter erreicht werden können. Um die Verfügbarkeit heterolog exprimierbarer UPOs zu steigern wurde die Expression zehn putativer UPO-Gene in *P. pastoris* in dieser Arbeit untersucht. Für zwei Gene aus *Psathyrella aberdarensis* sowie ein Gen aus *Aspergillus niger* konnte Enzymaktivität nachgewiesen werden. Die Enzyme wurden daraufhin im Bioreaktor produziert, aufgereinigt und charakterisiert. Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede im pH- sowie Substratspektrum der Enzyme. Die bei der Kultivierung im Bioreaktor erreichten Enzymkonzentrationen von 140–300 mg L^{-1} waren ähnlich der Konzentration, die für eine Hefe-evolvierte Variante der UPO aus *Agrocybe aegerita* bei Expression in *P. pastoris* erreicht werden kann. Somit konnte gezeigt werden, dass die Expression nativer UPO-Sequenzen in Hefe möglich ist.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von 2017—2019 in der Arbeitsgruppe Industrielle Biotechnologie des DECHEMA-Forschungsinstituts in Kooperation mit der TU Kaiserslautern angefertigt. Ohne den Einfluss und die Unterstützung, die ich in dieser Zeit erfahren durfte, hätte diese nicht in der heutigen Form erscheinen können.

Zunächst möchte ich mich herzlichst bei den Professoren Dirk Holtmann und Roland Ulber für die Betreuung meiner Arbeit und die kritische Diskussion der Ergebnisse bedanken. Darüber hinaus danke ich auch den weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission, Prof. Hans Hasse und Prof. Volker Schünemann. Ohne die schnelle Terminfindung wäre eine Verteidigung *in persona* wohl kaum möglich gewesen.

Darüber hinaus gilt mein Dank allen Kollaborationspartnern, insbesondere möchte ich mich für die Zusammenarbeit mit der TU Delft (Prof. Frank Hollmann, Dr. Morten van Schie), der TU Hamburg (Prof. Andreas Liese, Frederic Perz) und der TU Dresden (Prof. Martin Hofrichter, Dr. Harald Kellner) bedanken.

Nicht nur den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Industrielle Biotechnologie, sondern auch diversen anderen Mitarbeitern des gesamten Forschungsinstitutes, danke ich für die spannenden Gespräche, wissenschaftlichen Diskussionen, die technische Unterstützung und die schöne Zusammenarbeit! Insbesondere möchte ich mich bei allen Mitgliedern der DECHEMA-Band für die donnerstägliche, oftmals herzlich willkommene Ablenkung vom Laboralltag bedanken. Für ihren Einsatz und ihr Interesse im Rahmen der von mir betreuten Abschlussarbeiten danke ich Hannah Wohlers, Sabrina Schneider und Johanna Hermes sehr.

Mein ausgesprochener Dank gilt meinen Freunden und meiner Familie für all' die Unterstützung, Geduld und das Verständnis, das sie in diesen Jahren aufgebracht haben. Und ganz besonders gilt der Dank Dir, Claudi!

Table of Contents

Abstract III

Kurzfassung V

Zusammenfassung VII

Danksagung XI

List of Figures XIX

List of Tables XXIII

List of Schemes XXV

Abbreviations & acronyms XXVII

1. Introduction: Challenges and opportunities of H_2O_2-driven biocatalytic oxyfunctionalization 1

1.1. Biocatalytic C—H oxyfunctionalization . . . 1
1.2. Mechanistic and structural properties of UPOs . . . 2
1.3. UPO-catalyzed oxygenation reactions . . . 5
1.4. H_2O_2-driven biocatalytic oxygenation . . . 8
1.4.1. The catalase malfunction . . . 9
1.4.2. *In situ* H_2O_2 production . . . 10
1.5. Determining factors for UPO process design . . . 12
1.6. Enzyme production . . . 15
1.6.1. Homologous UPO expression . . . 15
1.6.2. Heterologous UPO expression . . . 15

2. Aim and objectives 19

3. UPO-catalyzed butane oxidation at preparative scale 21

3.1. Introduction . . . 21
3.2. Material & Methods . . . 23
3.2.1. Chemicals . . . 23
3.2.2. Enzyme quantification . . . 23

3.2.3. Experimental set-up 24
3.2.4. Analytical methods 24
3.3. Results & Discussion 26
3.3.1. Determination of reaction parameters 26
3.3.2. Dependence of butane oxidation rate on H_2O_2 feed 27
3.3.3. Determination of catalyst efficiency at constant H_2O_2 feed rates 28
3.3.4. Scale-up and coupling with extraction 31
3.3.5. Conclusion 35

4. Efficient electrochemical H_2O_2 production for biocatalytic applications 37
4.1. Introduction 37
4.2. Material & Methods 38
4.2.1. Chemicals 38
4.2.2. Bromolactone synthesis 38
4.2.3. Enzyme preparation 38
4.2.4. Electrode preparation 38
4.2.5. (Bio)-electrochemical setup 38
4.2.6. Electrochemical H_2O_2 measurement 39
4.2.7. Gas chromatography 39
4.3. Results & Discussion 41
4.3.1. Electrode preparation 41
4.3.2. Abiotical electrode characterization 41
4.3.3. Application for an electroenzymatic halogenation 44
4.3.4. Conclusion 46

5. Immobilization of an UPO variant by metal affinity binding 47
5.1. Introduction 47
5.2. Material & Methods 49
5.2.1. Chemicals, strains & plasmids 49
5.2.2. Plasmid construction 49
5.2.3. Screening 50
5.2.4. Production of his-tagged UPO 50
5.2.5. Protein and activity assays 51
5.2.6. Protein purification 52
5.2.7. Immobilization 52
5.2.8. Enzyme catalysis 53

5.2.9. Analytical methods 54
5.3. Results & Discussion 55
5.3.1. Production of hexa-histidine tagged UPO 55
5.3.2. Purification and characterization of the fusion-protein 56
5.3.3. Affinity-tag based immobilization 57
5.3.4. Hydroxylation of ethylbenzoic acid 58
5.3.5. Immobilization from crude culture broth 61
5.3.6. Biotransformation using crude immobilizate 62
5.3.7. Conclusion 63

6. Model-based prediction of UPO-catalyzed processes 65
6.1. Introduction 65
6.2. Material & Methods 66
6.2.1. Chemicals 66
6.2.2. Electroenzymatic process 66
6.2.3. Abiotic characterization of the electrochemical system 67
6.2.4. Enzymatic assays 67
6.2.5. Analytics 67
6.2.6. Derivation of steady-state rate equations 68
6.2.7. Model identification 72
6.3. Results & Discussion 73
6.3.1. Process design 73
6.3.2. Determination of process data 74
6.3.3. Analytical model for electroenzymatic hydroxylation 79
6.3.4. Application of the model for simulation & prediction 87
6.3.5. Conclusion 89

7. Recombinant production of native UPOs in *P. pastoris* 91
7.1. Introduction 91
7.2. Material & Methods 93
7.2.1. Chemicals, strains & plasmids 93
7.2.2. Preparation and transformation of expression plasmids 93
7.2.3. Screening of *P. pastoris* clones for UPO activity 94
7.2.4. Protein production 95
7.2.5. Protein purification 95
7.2.6. Assays 96

7.2.7. Protein characterization 97
7.3. Results & Discussion 98
7.3.1. Expression of putative UPO genes in *P. pastoris* 98
7.3.2. Identification of UPO-producing mutants 98
7.3.3. Protein production in *P. pastoris* 101
7.3.4. Protein purification 104
7.3.5. Protein characterization 109
7.3.6. Conclusion 113

8. Concluding discussion and outlook **117**
8.1. Implications of catalyst efficiency for process design 118
8.2. Biocatalyst selectivity 120
8.3. Impact of H_2O_2 production 121
8.4. Considerations for process operation 122
8.5. Availability of biocatalysts 124

Bibliography **125**

Appendices **139**

Appendix A. UPO-catalyzed butane oxidation at preparative scale **141**
A.1. Material & Methods 141
A.1.1. Enzyme production 141

Appendix B. Efficient electrochemical H_2O_2 production for biocatalytic applications **143**
B.1. Material & Methods 143
B.1.1. Bromolactone synthesis 143
B.1.2. Enzyme preparation 143

Appendix C. Immobilization of an UPO variant by metal affinity binding **145**
C.1. Materials & Methods 145
C.1.1. DNA sequence of hexa-histidine tagged UPO 145
C.2. Results 145
C.2.1. Replicate biotransformation with free enzyme 145
C.2.2. Replicate biotransformation with crude immobilizate 147

Appendix D. Model-based prediction of UPO-catalyzed processes **149**
D.1. Materials & Methods 149
D.1.1. Model identification 149
D.1.2. Derivation of steady-state enzyme kinetic equations 150
D.2. Results 154
D.2.1. Prediction of $H_2O_2 \leq 1.2$ mM 154
D.2.2. Prediction of $H_2O_2 \leq 0.5$ mM 156

Appendix E. Recombinant production of native UPOs in *P. pastoris* **157**
E.1. DNA sequences of putative UPO genes 157
E.1.1. Sequences from *Aspergillus niger* 157
E.1.2. Sequences from *Aspergillus versicolor* 157
E.1.3. Sequences from *Chaetomium globosum* 158
E.1.4. Sequences from *Kretzschmaria deusta* 158
E.1.5. Sequences from *Marasmius fiardii* 159
E.1.6. Sequences from *Mycena galopus* 159
E.1.7. Sequences from *Psathyrella aberdarensis* 160
E.1.8. Sequences from *Trichoderma harzianum* 161

Appendix F. **163**
Lebenslauf 163
Veröffentlichungen aus dieser Arbeit 164
Betreute studentische Arbeiten mit Bezug zur Dissertation 165

List of Figures

3.1. Determination of initial reaction conditions for butane oxidation. . . . 26
3.2. Dependence of r*Aae*UPO-PaDa-I-catalyzed butane oxidation rates on the H_2O_2 feed. . . . 27
3.3. Dependence of specific butane oxidation rate on specific H_2O_2 feed rate. 28
3.4. r*Aae*UPO-PaDa-I-catalyzed butane oxidation at a constant, low H_2O_2 feed rate. . . . 29
3.5. Absolute product formation and H_2O_2 yield at a constant, low H_2O_2 feed rate. . . . 29
3.6. r*Aae*UPO-PaDa-I-catalyzed butane oxidation at high productivity conditions. . . . 30
3.7. Absolute product formation and H_2O_2 yield at high productivity conditions. . . . 31
3.8. Scale up of r*Aae*UPO-PaDa-I-catalyzed butane oxidation coupled with extraction. . . . 33
3.9. Absolute product formation and H_2O_2 yield of the scaled-up extractive process. . . . 34

4.1. Characterization of oCNTs-loaded GDEs by linear sweep voltametry. 41
4.2. Potentiostatic H_2O_2 production and coulombic efficiencies of oCNT-loaded GDEs. . . . 42
4.3. Coupled electroenzymatic halogenation of 4-pentenoic acid to bromolactone. . . . 45

5.1. Endpoint determination of ABTS-activity from supernatant of *Aae*UPO-PaDa-I_C6his expressing clones after cultivation in DWP for 70 h. . . . 55
5.2. Production of r*Aae*UPO-PaDa-I_C6his using clones 15 and 23 in a 1 L bioreactor. . . . 56
5.3. SDS-PAGE analysis of r*Aae*UPO-PaDa-I_C6his after Ni-NTA purification . . . 57
5.4. Absorption spectrum of r*Aae*UPO-PaDa-I_C6his after Ni-NTA purification. . . . 57
5.5. Immobilization of purified r*Aae*UPO-PaDa-I_C6his on EziG Fe-glass bead carriers. . . . 58

5.6. EBA hydroxylation by free r*Aae*UPO-PaDa-I_C6his 59
5.7. EBA hydroxylation by purified r*Aae*UPO-PaDa-I_C6his immobilized on EziG Amber 60
5.8. Reusability of purified r*Aae*UPO-PaDa-I_C6his immobilized on EziG Amber in a repeated fed-batch. 61
5.9. EBA hydroxylation by crude r*Aae*UPO-PaDa-I_C6his immobilized on EziG Amber. 62

6.1. Potentiostatic GDE catalyzed H_2O_2 production. 74
6.2. r*Aae*UPO-PaDa-I catalyzed hydroxylation of EBA to HEBA with *in situ* H_2O_2 production using a GDE at various applied currents. 75
6.2. (continued) r*Aae*UPO-PaDa-I catalyzed hydroxylation of EBA to HEBA with *in situ* H_2O_2 production using a GDE at various applied currents. 76
6.2. (continued) r*Aae*UPO-PaDa-I catalyzed hydroxylation of EBA to HEBA with *in situ* H_2O_2 production using a GDE at various applied currents. 77
6.3. Comparison of the catalytic efficiency and velocity of r*Aae*UPO-PaDa-I catalyzed hydroxylation of EBA at various H_2O_2 production rates. . . 78
6.4. Determination of initial velocities of the r*Aae*UPO-PaDa-I catalyzed hydroxylation of EBA at various concentrations of organic substrate and co-substrate H_2O_2. 81
6.5. Comparison of goodness of fits for simple Ping-Pong and extended Ping-Pong with substrate inhibition. 84
6.6. Comparison of experimental data and simulation of a UPO catalyzed hydroxylation of EBA. 87
6.6. (continued) Comparison of experimental data and simulation of a UPO catalyzed hydroxylation of EBA. 88
6.7. Comparison of experimental data and prediction of a UPO catalyzed hydroxylation of EBA where the maximum H_2O_2 concentration was limited to 1.2 mM. 89
6.8. Comparison of experimental data and prediction of a UPO catalyzed hydroxylation of EBA where the maximum H_2O_2 concentration was limited to 0.5 mM. 90

7.1. Screening of *Pichia pastoris* clones transformed with expression plasmids for various UPOs for activity using ABTS and NBD assays. . . . 100
7.2. Production of recombinant UPOs with *P. pastoris* in a bioreactor . . . 103

7.3. Purification of UPOs by hydrophobic interaction chromatography. . . 105
7.4. SDS-PAGE analysis of pooled fractions from the HIC purification . . 106
7.5. Purification of UPOs by size exclusion chromatography. 107
7.6. SDS-PAGE analysis of purified proteins after HIC, SEC, concentration and dialysis 109
7.7. Analysis of glycosylation content of purified proteins 110
7.8. Absorption spectra of purified proteins 112
7.9. Determination of the pH-optimum of r*Pab*UPO 1, r*Pab*UPO 2 and r*Ani*UPO using ABTS as a substrate. 113
7.10. Determination of the pH-optimum of r*Pab*UPO 1, r*Pab*UPO 2 and r*Ani*UPO using NBD as a substrate. 114
7.11. Determination of the pH-optimum of r*Pab*UPO 1, r*Pab*UPO 2 and r*Ani*UPO using VA as a substrate. 114
7.12. Relative activities of purified proteins 115

C.1. Replicate EBA hydroxylation by free r*Aae*UPO-PaDa-I_C6his 146
C.2. Replicate EBA hydroxylation by crude r*Aae*UPO-PaDa-I_C6his immobilized on EziG Amber. 147

D.1. Replicate comparison of experimental data and prediction of a UPO catalyzed hydroxylation of EBA where the maximum H_2O_2 concentration was limited to 1.2 mM. 155
D.2. Replicate comparison of experimental data and prediction of a UPO catalyzed hydroxylation of EBA where the maximum H_2O_2 concentration was limited to 0.5 mM. 156

List of Tables

3.1. Extraction coefficient and residual UPO activities for solvents tested for butanol extraction. 32
3.2. Comparison of the catalytic efficiencies and velocities of butane oxidation processes carried out. 35

5.1. Primers used for the construction of pPpB1 based plasmid for hexahistidine-tagged *Aae*UPO-PaDa-I expression. 50

6.1. Parameters derived from fitting the experimental data. 86

7.1. Primers used for the construction of pPpB1-based UPO expression plasmids. 94
7.2. Origin of putative UPO genes expressed. 98
7.3. Purification of r*Pab*UPO 1, r*Pab*UPO 2 and r*Ani*UPO 108
7.4. Size and spectroscopic characteristics of r*Pab*UPO 1, r*Pab*UPO 2 and r*Ani*UPO. 111

8.1. Theoretical product yields per volume of biocatalyst fermentation broth based on enzyme titers and catalyst efficiency reported in this work and published before. 119
8.2. Impact of and potential cost and energy savings for electrochemical H_2O_2 production with reduced energy requirements. 122

D.1. King-Altman patterns 150
D.2. Directed pattern for species E* EBA/E HEBA. 151
D.3. Directed pattern for species E. 152
D.4. Directed pattern for species E H_2O_2/E* H_2O. 152
D.5. Directed pattern for species E*. 153
D.6. Directed pattern for species E*. 153
D.7. Directed pattern for species E EBA. 154

List of Schemes

1.1. Formation of compound I from resting state UPO upon H_2O_2 binding. 3
1.2. Reaction mechanism of compound I in the oxygenation, oxidation and halogenation pathway. 4
1.3. General reaction for the UPO-catalyzed oxidation of sp^3-C—H bonds. 5
1.4. Benzylic hydroxylation can be considered as a special case of the general sp^3-C—H bond hydroxylation catalyzed by UPO. 6
1.5. Oxygenation of aromatic compounds by UPO is believed to proceed *via* an epoxide intermediate that rapidly rearomatizes to yield the hydroxylated aromatic compound. 7
1.6. Alkene epoxidation as catalyzed by UPOs, which has been shown to result in the formation of chiral compounds. 7
1.7. Heteroatom oxidation of sulfur, *i.e.* sulfoxidation as catalyzed by UPOs. 7
1.8. Heteroatom oxidation of nitrogen as catalyzed by UPOs. 8
1.9. UPO-catalyzed O-dealkylation of ethers. 8
1.10. UPO-catalyzed N-dealkylation of amines. 8
1.11. Reaction of compound I with additional H_2O_2 molecules. 11

4.1. Schematic overview of the reaction system for electrobiocatalytic bromolactone synthesis. 44

6.1. H_2O_2 dependent hydroxylation of EBA catalyzed by r*Aae*UPO-PaDa-I 73
6.2. Reaction mechanism of UPO adapted for the hydroxylation of EBA . 80

Abbreviations & acronyms

***Aae*UPO**	UPO from *Agrocybe aegerita*
***Aae*UPO-PaDa-I**	UPO from *Agrocybe aegerita* variant PaDa-I
***Aae*UPO-PaDa-I_C6his**	UPO from *Agrocybe aegerita* PaDa-I with C-terminal hexa-histidine tag
***Ani*UPO**	UPO from *Aspergillus niger*
***Ave*UPO**	UPO from *Aspergillus versicolor*
***Cfu*CPO**	chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*
***Cgl*UPO**	UPO from *Chaetomium globosum*
***Ci*VCPO**	vanadium chloroperoxidase from *Curvularia inaequalis*
***Kde*UPO**	UPO from *Kretzschmaria deusta*
***Mfi*UPO**	UPO from *Marasmius fiardii*
***Mga*UPO**	UPO from *Mycena galopus*
***Mro*UPO**	UPO from *Marasmius rotula*
***Pab*UPO 1**	UPO 1 from *Psathyrella aberdarensis*
***Pab*UPO 2**	UPO 2 from *Psathyrella aberdarensis*
***Tha*UPO 1**	UPO 1 from *Trichoderma harzianum*
***Tha*UPO 2**	UPO 2 from *Trichoderma harzianum*
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)
BDE	bond dissociation energy
bromolactone	5-(Bromomethyl)dihydrofuran-2(3H)-one
CDS	coding sequence
CV	column volume
DO	dissolved oxygen
DWP	deep well plate
EBA	4-ethylbenzoic acid
EC	Enzyme Commission
FID	flame ionization detection

FPLC	fast protein liquid chromatography
GDE	gas diffusion electrode
GOx	glucose oxidase
HEBA	4-(1-hydroxyethyl) benzoic acid
HIC	hydrophobic interaction chromatography
HPLC	high pressure liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase
iR	internal resistance
KP$_i$	potassium phosphate buffer
LRET	long-range electron transfer
MCD	monochlorodimedone
MTP	microtiter plate
NBD	5-Nitro-1,3-benzodioxole
Ni-NTA	nickel nitrilotriacetic acid
oCNT	oxidized carbon nanotube
OD$_{600}$	optical density determined at 600 nm
ODEs	system of ordinary differential equations
P450	P450 monooxygenase
PCR	polymerase chain reaction
PMMA	poly(methyl methacrylate)
PTFE	polytetrafluoroethylene
R$_Z$	Reinheitszahl (Absorption$_{Soret}$/Absorption$_{280nm}$)
r*Aae*UPO-PaDa-I	recombinant UPO from *Agrocybe aegerita* variant PaDa-I
r*Aae*UPO-PaDa-I_C6his	recombinant UPO from *Agrocybe aegerita* PaDa-I with a C-terminal hexa-histidine tag
r*Ani*UPO	recombinant UPO from *Aspergillus niger*
r*Pab*UPO 1	recombinant UPO 1 from *Psathyrella aberdarensis*
r*Pab*UPO 2	recombinant UPO 2 from *Psathyrella aberdarensis*
relSD	relative standard deviation

RT	room temperature
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis
SEC	size exclusion chromatography
TOF	turnover frequency ($mol_{product}$ $mol^{-1}_{catalyst}$ $time^{-1}$)
TTN	total turnover number ($mol_{product}$ $mol^{-1}_{catalyst}$)
UPO	unspecific peroxygenase
VA	veratryl alcohol