

## Abschlussbericht

AZ 13159-32

### **Förderschwerpunkt integrierte Biotechnologie:**

### **„Fokussierte gerichtete Evolution am Beispiel von Enzymen zur nachhaltigen Herstellung biogener Amide“**

Projektpartner: Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald  
(Prof. Dr. U. T. Bornscheuer, Dr. Aurelio Hidalgo, Anna Schließmann)

Dr. Rieks GmbH, Uetersen  
(Dr. Markus Kähler, Dr. André Rieks, Kerstin Wiggenhorn)

Projektkoordination: Prof. Dr. U. T. Bornscheuer

Projektbeginn: 01.04.2006

Projektende: 31.05.2009

Greifswald, 19.08.2009

## Inhaltsverzeichnis:

1. Zusammenfassung .....	4
2. Hintergrund und Zielsetzung des Projekts.....	5
3. Angewandte Methoden .....	6
3.1. Projektpartner Universität Greifswald.....	6
3.2. Projektpartner Rieks GmbH .....	7
4. Ergebnisse und Diskussion .....	8
4.1. Projektpartner Universität Greifswald.....	8
4.2. Projektpartner Rieks GmbH .....	27
5. Ökonomische und ökologische Betrachtungen des Projekts .....	41
5.1. Grundlegende Betrachtungen.....	41
5.2. Vergleich mit alternativen Verfahren .....	41
5.3. Ökologische Vorteile in Folge des Projekts .....	43
6. Zusammenfassung der Ergebnisse .....	44
7. Kooperationen im Rahmen des Projekts .....	45
8. Teilnahme an Projekt-relevanten Veranstaltungen.....	46
9. Zitierte Literatur und Veröffentlichungen im Rahmen des Projekts .....	48

## Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Biogene Amide, die vom Projektpartner Dr. Riexs GmbH zur Verfügung gestellt wurden. ....	9
Abbildung 2: Amidase-Screening mit dem NBD-Cl Assay. ....	9
Abbildung 3: GC-MS Analytik der Methylester der Öl- und Stearinsäure.....	10
Abbildung 4: Trennung von Amid 8, Palmitin- und Ölsäure .....	11
Abbildung 5: Strukturen der untersuchten Avenanthramide.....	14
Abbildung 6: Vergleich der Raumstrukturen der PFE und der BsubpNBE. ....	16
Abbildung 7: Position der durch Strukturalignment mit BsubpNBE identifizierten sieben Kassetten in PFE. .....	17
Abbildung 8: Eintopf-Megaprimer PCR des <i>pfe</i> -Gens unter Verwendung eines Templates. ....	18
Abbildung 9: Verteilung der Mutationen bei Verwendung von <i>spiked</i> -Oligonukleotiden in der Eintopf- Megaprimer PCR.....	18
Abbildung 10: Veränderung der Substratspezifität der Esterase durch Anwendung der OSCARR-Methode .....	19
Abbildung 11: Chirale Substrate, die in Biokatalysen mit den <i>Bottleneck</i> -Mutanten eingesetzt wurden ....	21
Abbildung 12: Docking .....	24
Abbildung 14: Racematspaltung von ( $\pm$ )-Azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on mit der $\gamma$ -Lactamase aus <i>Aureobacterium</i> . ....	25
Abbildung 15: Alignment der PFEI (grün) und der $\gamma$ -Lactamase (violett).....	25
Abbildung 16: Dünnschichtchromatogramm zweier kosmetischer Produkte .....	28
Abbildung 17: HPLC-Chromatogramm von <i>N</i> -Nitrosodiethanolamin. ....	29
Abbildung 18: Ergebnisse eines Agar-Diffusionstests unter Verwendung von <i>B. subtilis</i> (gram-positiv). ...	33
Abbildung 19: Ergebnisse eines Agar-Diffusionstests unter Verwendung von <i>Aspergillus niger</i> (Schimmelpilz). ....	34

## Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der verwendeten Standards von Phenylethylamin, bei Analyse mit dem Literatur-bekanntem und dem optimierten Assay. ....	8
Tabelle 2: Berechneter Umsatz von Amid 8 nach 25 h Inkubation.....	11
Tabelle 3: Umsätze bei der Hydrolyse des Amids 7 nach 48 h.....	12
Tabelle 4: Berechnete Umsätze für die Hydrolyse von 5 nach 65,5 h bei 37°C.....	13
Tabelle 5: Retentionszeiten der Standards für Biokatalysen mit Zimtsäurederivaten .....	14
Tabelle 6: Ergebnisse der Biokatalyse mit Zimtsäure-Vinylester als Acyldonor nach 96 h Inkubation bei 40°C und 1400 rpm. ....	15
Tabelle 7: Liste der <i>Bottleneck</i> Mutanten .....	20
Tabelle 8: Ausgewählte <i>Bottleneck</i> Mutanten für detailliertere Analyse.....	20
Tabelle 9: Enantioselektivitäten ausgewählter Mutanten gegenüber 1-Phenyl-1-propylacetat (4) .....	21
Tabelle 10: Enantioselektivitäten ausgewählter Mutanten gegenüber 1-Phenyl-2-propylacetat (5) .....	21
Tabelle 11: Enantioselektivitäten ausgewählter Mutanten gegenüber 1-Phenylethylacetat (3) .....	22
Tabelle 12: Übersicht der PFEI Mutanten, die aufgrund des Vergleichs mit der Lactamase erstellt wurden .....	26
Tabelle 13: Ergebnisse der Bouillon-Mikrodilutionstests zur Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration (MIC) ausgewählter biogener Amide .....	35
Tabelle 14: Antibakterielle and antifungale Aktivität des Ölsäure- <i>N</i> -Benzylamids, exemplarisch in einer Shampoo-Formulierung .....	38
Tabelle 15: Antibakterielle and antifungale Aktivität des Zimtsäure- <i>N</i> -Glycinamids, exemplarisch in einer Shampoo-Formulierung .....	39
Tabelle 16: Antibakterielle and antifungale Aktivität des Zimtsäureamids der Anthranilsäure, exemplarisch in einer Shampoo-Formulierung.....	40

## 1. Zusammenfassung

Ziel des Projekts ist die Entwicklung eines nachhaltig umweltgerechten und wirtschaftlichen Verfahrens zur enzymatischen Synthese biogener Amide. Die Zielverbindungen können aufgrund ihrer antimikrobiellen, antiinflammatorischen und oberflächenaktiven Eigenschaften sowohl in der Natur- und High-Tech-Kosmetik als auch der pharmazeutischen Industrie eingesetzt werden. Die Verbindungen (hierzu gehören u.a. *N*-Benzylamide, Ceramide, Anadamid, Oleamid und weitere sekundäre Amide) wurden bislang nicht durch enzymatische Synthesen gewonnen. Die derzeitige praktizierte chemische Synthese ist jedoch hinsichtlich eingesetzter Ausgangsstoffe, notwendiger Reaktionsbedingungen und sich bildender Nebenprodukte mit einer erheblichen Umweltbelastung verbunden. Ein besonderes Problem des chemischen Verfahrens ist die Bildung toxischer *N*-Nitrosamine. Das geplante biotechnologische Vorhaben, welches modellhaft eine Synthese biogener Amide ohne die genannten Verfahrensnachteile ermöglichen kann, setzt die Bereitstellung spezifischer, im Projekt zu generierender Enzyme voraus.

Zu Beginn der Projektlaufzeit galt es, die Modellsubstrate (biogene Amide) in ausreichenden Quantitäten zu synthetisieren und die notwendigen Analytiken mittels HPLC, GC und Kapillarelektrophorese zu etablieren. In enger Absprache zwischen den Projektpartnern Rieks GmbH und Universität Greifswald konnten alle relevanten Techniken etabliert werden. Muster der Verbindungen wurden von Rieks GmbH an die Universität Greifswald übergeben. Beim Projektpartner Rieks GmbH wurden verschiedene biogene Amide auf antimikrobielle Aktivitäten untersucht. Dabei konnten insbesondere Amide der Zimtsäure, der Ferulasäure, der Kaffeesäure und der Ölsäure als potenzielle Kosmetikwirkstoffe mit breitem antimikrobiellem Potenzial gegen gram-positive und -negative Bakterien, Hefen und Schimmelpilze identifiziert werden. Zimt- und Ferulasäureamide zeigten zusätzlich sehr gute UV-absorbierende Eigenschaften.

Im Rahmen eines umfangreichen Screenings wurden vom Projektpartner Universität Greifswald zahlreiche Enzyme auf Aktivität gegenüber den Modellsubstraten in einem im Hause etablierten und im Rahmen der Projektlaufzeit umfangreich optimierten Hydrolase-Assays erfolgreich im Mikrotiterplatten-Maßstab eingesetzt. Da aber keines der Enzyme ausgeprägte Aktivität in der Hydrolyse zeigte und da diese sehr wahrscheinlich nur geringe Syntheseaktivität aufweisen würden, standen diese Fragestellungen für den weiteren Projektverlauf Enzymdesignstudien im Vordergrund.

Die im Antrag vorgesehene neue Mutagenesemethode zur fokussierten gerichteten Evolution konnte erfolgreich etabliert werden. Infolgedessen kann die Größe der zu durchmusternden Mutantenbibliotheken um Größenordnungen verkleinert werden, wodurch die Generierung der gewünschten Enzymaktivitäten sehr zielgerichtet erfolgen kann. Diese Arbeiten wurden im weiteren Projektverlauf durchgeführt.

## 2. Hintergrund und Zielsetzung des Projekts

Ziel des Projekts ist die Entwicklung eines nachhaltig umweltgerechten und wirtschaftlichen Verfahrens zur enzymatischen Synthese biogener Amide. Die Zielverbindungen können aufgrund ihrer antimikrobiellen, antiinflammatorischen und oberflächenaktiven Eigenschaften sowohl in der Natur- und High-Tech-Kosmetik als auch der pharmazeutischen Industrie eingesetzt werden. Vor dem Hintergrund eines immens steigenden Bedarfs an neuen antimikrobiellen Wirkstoffen, die zur Konservierung kosmetischer oder pharmazeutischer Präparate einen Beitrag leisten, steht die Darstellung antibakterieller und antifungaler Amide im Fokus des Projekts. Zahlreiche dieser biogenen Amide sind bereits als Kosmetikwirk- oder Zusatzstoffe zugelassen und als weit verbreitete Substanzklasse im Einsatz. Aufgrund ihrer Viskosität und Grenzflächenaktivität finden zur Zeit insbesondere Mono- und Diethylamide längerkettiger Fettsäuren Verwendung. Insbesondere die Diethanolamide der Kokosnussfettsäuren („COCO DEA“), der Linolsäure („Linoleamid DEA“) oder der Laurinsäure („Lauramid DEA“) stellen essentielle Inhaltsstoffe kosmetischer Präparate wie beispielsweise Shampoos oder Schaumbäder dar. Das Applikationsspektrum der verwendeten Fettsäureamide beschränkt sich aktuell nahezu vollständig auf die Verwendung als Detergenz, Schaumbildner oder Stabilisator.

Aufgrund ihrer antibakteriellen, antifungalen und antiinflammatorischen Eigenschaften könnten biogene Amide jedoch weitaus vielseitiger in Kosmetika, Pharmazeutika oder technischen Zubereitungen Verwendung finden. Als Hauptanwendungsgebiete biogener Amide können genannt werden:

- Antimikrobielle Wirkstoffe zur Konservierung von Kosmetika, Pharmazeutika oder technischen Zubereitungen.
- Antimikrobielle Verbindungen in topischen Formulierungen gegen den Akneerreger *Propionibacterium acnes*.
- Antimikrobielle Wirkstoffe in Deodorantien zur Bekämpfung des Körpergeruch-verursachenden Mikroorganismus *Corynebacterium xerosis*.
- Antiinflammatorische Wirkstoffe in hautberuhigenden oder entzündungshemmenden Kosmetika oder Pharmazeutika (insbesondere Zimtsäureamide und Avenanthramide).
- Fettsäure-Betainamide oder Kokosnussölamide als Detergentien und Stabilisatoren von Kosmetika.
- Substitution bedenklicher Konservierungsmittel.
- Ferulasäure- und Zimtsäureamide als UV-Filter in Sonnenschutzmitteln.

Besonderes Augenmerk verdienen substituierte Zimtsäureamide der Anthranilsäure, sogenannte Avenanthramide. Diese spezifisch im Hafer (*Avena sativa*) vorkommenden polyphenolischen Verbindungen, von denen bisher etwa 40 verschiedene Strukturvarianten identifiziert wurden, zeigten in zahlreichen Studien antioxidative und entzündungshemmende Wirkungen (1). Da die natürlichen Hafer-Avenanthramide nicht in ausreichendem Maße verfügbar und schwer zu extrahieren sind, bietet eine enzymatische Synthese eine sinnvolle alternative zur Bereitstellung größerer Mengen natürlicher Avenanthramide. Neben den

vielfältigen kosmetischen Applikationsfeldern birgt die Verwendung biotechnologisch synthetisierter Avenanthramide als antioxidative und antiinflammatorische Nahrungsergänzungsmittel ein immenses Potenzial.

Aktuell werden Fettsäureamide industriell ausschliesslich chemisch synthetisiert. Weltweit werden nach einer Schätzung des Scottish Crop Research Institute ([www.lipidlibrary.co.uk](http://www.lipidlibrary.co.uk)) über 300.000 t Fettsäureamide pro Jahr produziert. Hierbei wird als gravierender Nachteil in Kauf genommen, dass mit den chemisch synthetisierten Amiden in Folge einer nicht quantitativen Umsetzung signifikante Mengen an primären und sekundären Aminen in kosmetische Formulierungen eingebracht werden. Diese Amine reagieren mit nitrosierenden Substanzen wie Nitriten oder dem als Konservierungsmittel häufig präsenten Bronopol zu toxischen Nitrosaminen. Zahlreiche kosmetische Produkte sind daher mit Nitrosaminen, wie *N*-Nitrosomorpholin, *N*-Nitrosodiethanolamin oder *N*-Nitroso-*N*-methyldodecylamin kontaminiert (2).

Die besondere Problematik der Nitrosaminentstehung in Kosmetika resultiert daraus, dass

- zahlreiche Nitrosamine genotoxisch und cancerogen wirken,
- Nitrosamine dermal penetrieren können,
- dermal penetrierte und resorbierte Nitrosamine in der Leber zu weiteren toxischen Intermediaten verstoffwechselt werden.

Gemäß Kosmetikverordnung ist daher die Verwendung reiner Nitrosamine und zahlreicher sekundärer Amine in Kosmetika verboten. Fettsäureamide dürfen lediglich einen synthesespezifisch nicht vermeidbaren Restgehalt an Aminen aufweisen.

Es ist daher ein Ziel des Projekts, biotechnologisch synthetisierte Amide mit einem niedrigen Restgehalt an Amin bereitstellen zu können.

### 3. Angewandte Methoden

#### 3.1. Projektpartner Universität Greifswald

Im Rahmen des Projekts wurden im Arbeitsbereich des Projektpartners Universität Greifswald folgende Methoden angewandt:

- Optimierung eines Hydrolase-Assays für das Amidase-Screening
- Etablierung einer GC/MS-Analytik
- Etablierung einer HPLC-Analytik
- Etablierung einer Kapillarelektrophorese-Analytik
- Screening nach Amidaseaktivitäten
- Entwicklung einer molekularbiologischen Methode mit hoher Mutationsrate
- Einsatz von *spiked*-Oligonukleotiden für die Kassettenmutagenese
- Etablierung einer Agarplattenmethode zur raschen Analyse der Bibliotheken

### 3.2. Projektpartner Rieks GmbH

Folgende Methoden wurden vom Projektpartner Rieks GmbH angewandt:

- Chemische Substratsynthese und Aufreinigung
- Etablierung der DC- und HPLC-Analytik (Edukte, Produkte)
- Etablierung der Analytik zur Detektion von Nitrosaminen
- Entwicklung antimikrobieller Assays
- Testung antimikrobieller Zielverbindungen
- Durchführung enzymatischer Modellsynthesen
- Ökologisch-/ökonomische Bewertung

## 4. Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden werden die von den jeweiligen Projektpartnern durchgeführten Arbeiten nach einzelnen Projektzielen gegliedert dargestellt und diskutiert.

### 4.1. Projektpartner Universität Greifswald

Die in Greifswald durchgeführten Arbeiten lassen sich in zwei Teilprojekte untergliedern:

- Untersuchung von Enzymen mit Amidaseaktivität zur Darstellung biogener Amide
- Etablierung einer molekularbiologischen Methode zur fokussierten gerichteten Evolution

#### 4.1.1. Etablierung einer Hochdurchsatzanalytik zur Bestimmung von Amidaseaktivität

Die Identifizierung von aktiven Enzymen (bzw. von Varianten, die über evolutive Methoden erzeugt werden) verlangt geeignete Testmethode, die insbesondere ein rasches Durchmusterung einer Vielzahl von Varianten verlangt.

Ein in früheren Arbeiten vom AK Bornscheuer beschriebener Assay (3) basiert auf der Detektion des in der Hydrolyse freigesetzten Amins nach Derivatisierung mit NBD-Cl (in 1-Hexanol gelöst) zu einem Fluorophor, das anschließend mit einem Fluorimeter detektiert werden kann. Dieser Assay wurde umfangreich optimiert, da es sich zeigte, dass die Derivatisierungsreaktion vergleichsweise langsam ist. Durch Variation des Lösungsmittels für NBD-Cl, der Temperatur und des pH-Wertes konnte die Einsatzfähigkeit dieses Assays deutlich verbessert werden. Es konnte gezeigt werden, dass im Konzentrationsbereich von 5-100  $\mu\text{M}$  ein linearer Zusammenhang zwischen Amin- und Fluorophorkonzentration besteht. Das Detektionslimit wurde für Phenylethylamin zu 2,8  $\mu\text{M}$  bestimmt, was für einen 180  $\mu\text{l}$  Reaktionsansatz (Assaydurchführung in Mikrotiterplatte) bedeutet, dass noch 486 pmol Amin mit statistischer Genauigkeit nachgewiesen werden können.

Um den Unterschied zu verdeutlichen, wurden zwei gleiche Ansätze mit dem von Henke und Bornscheuer (3) beschriebenen und dem optimierten Assay durchgeführt (Tabelle 1).

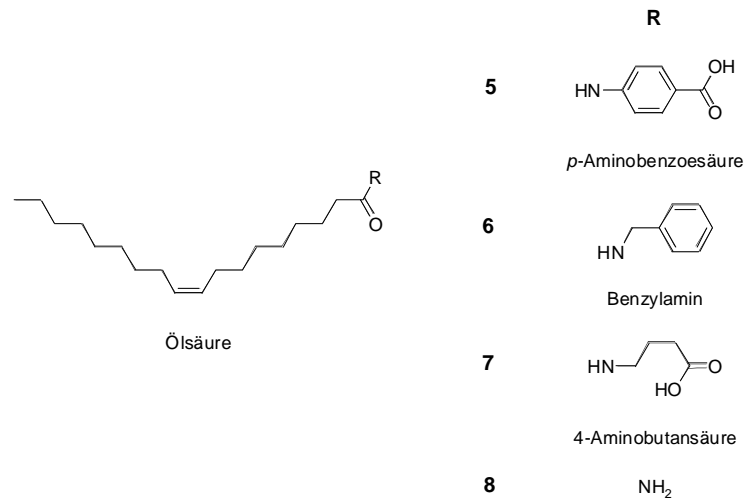
**Tabelle 1:** Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der verwendeten Standards von Phenylethylamin, bei Analyse mit dem Literatur-bekanntem und dem optimierten Assay.

Konz. [ $\mu\text{M}$ ]	RFU <sup>a</sup>	
	Literatur	optimierter Assay
100	1873	12033
80	1516	9978
60	1116	7857
20	461	2931
10	294	1698
5	191	1072
Kontrolle	133	405

<sup>a</sup>RFU: relative Fluoreszenz-Einheit



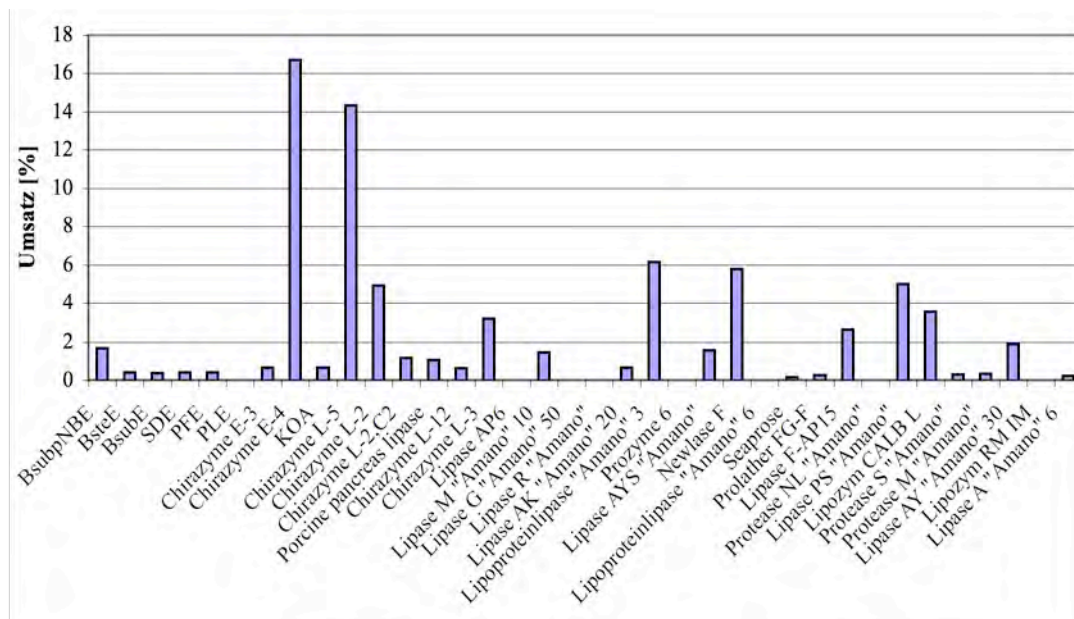
#### 4.1.2. Untersuchung von Hydrolasen zur Umsetzung von biogenen Amiden



**Abbildung 1:** Biogene Amide, die vom Projektpartner Dr. Rieks GmbH zur Verfügung gestellt wurden.

Anschließend wurde dieser Amidaseassay auf die vom Projektpartner Rieks GmbH zur Verfügung gestellten Amide (Abbildung 1) angewendet.

Da auch bei der Hydrolyse der biogenen Amide primäre Amine gebildet werden, wurde untersucht, ob sich diese auch mit dem Amidaseassay nachweisen lassen. Leider bildete nur Benzylamin, das Produkt der Hydrolyse von **6**, als einziges Amin mit NBD-Cl ein fluoreszierendes Produkt. Für das Screening von geeigneten Enzymen wurden die im Arbeitskreis verfügbaren rekombinanten Esterasen, kommerziellen Lipasen und Proteasen gegenüber einer 2 mM Lösung von Amid **6** auf Aktivität getestet (Abbildung 2). Für die Quantifizierung der Messwerte wurde eine Standardkurve mit verschiedenen Konzentrationen an Benzylamin verwendet. Für jede Reaktion wurden 20 µl Enzymlösung (10 mg/ml) oder 2 mg Immobilisat verwendet.

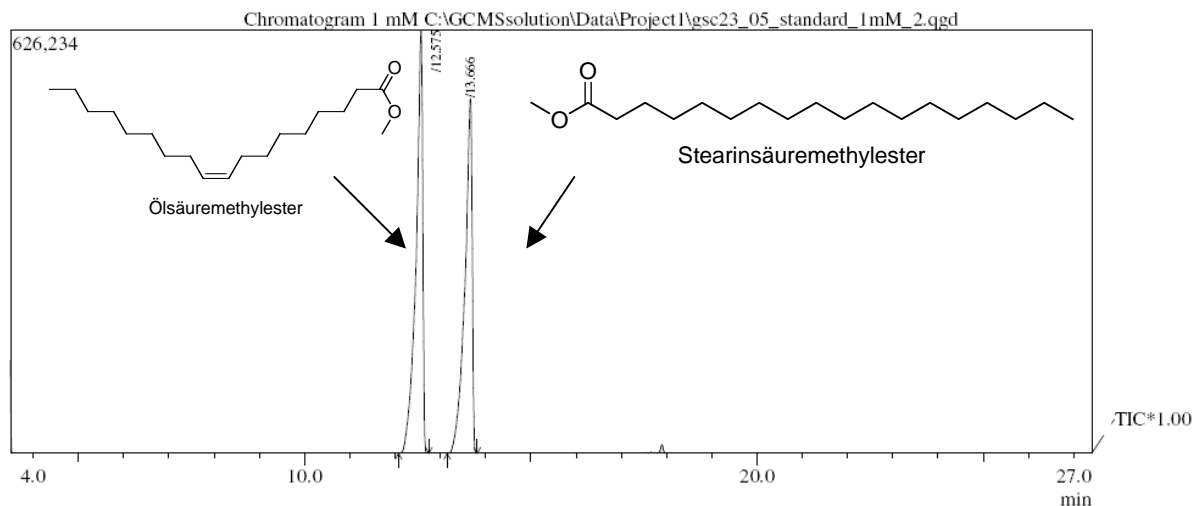


**Abbildung 2:** Amidase-Screening einer 2 mM Lösung von **6** in Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,5, 10% DMSO) mit dem NBD-Cl Assay. Proben wurden für 24 h bei 37°C inkubiert.

Die höchste Aktivität (Abbildung 2) zeigten die Esterase Chirazyme E-4 und die Lipase Chirazyme L-2 mit einem Umsatz von über 14% nach 24 h bei 37°C. Da die Aktivität gegenüber den anderen biogenen Amiden nicht mit dem Amidaseassay bestimmt werden konnte, wurde versucht die Amide und deren Produkte über GC-MS zu analysieren.

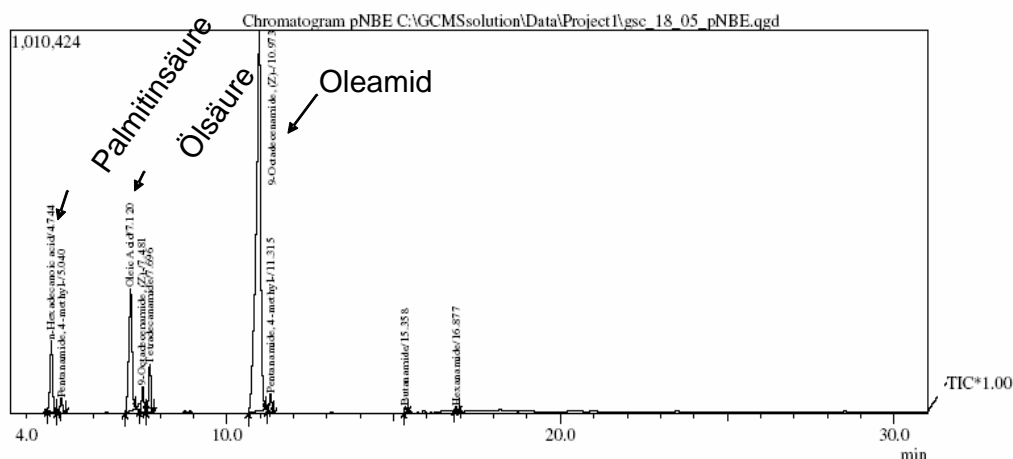
### Etablierung der GC-MS-Analytik

Da bei allen Hydrolysereaktionen der biogenen Amide **5-8** Ölsäure als Produkt entsteht, stand der Nachweis der Ölsäure im Fokus. Um den Umsatz der Reaktion zu bestimmen, wurde als interner Standard Stearinsäure gewählt, da sich diese hinsichtlich der Extraktion und Detektion ähnlich der Ölsäure verhält. Als GC-MS stand ein Gerät von Shimadzu mit einer BPX-5 Säule zur Verfügung. Da die Carbonsäuren bei der GC-MS-Analyse ein breites *Tailing* aufwiesen und nicht vollständig bis zur Grundlinie trennbar waren, wurden sie mit Diazomethan in ihre Methyl-ester umgewandelt. Eine Derivatisierung mit TMS-Diazomethan, welches sich deutlich leichter handhaben lässt als Diazomethan, wurde wegen der großen Anzahl an Verunreinigungen nicht berücksichtigt. Die Methyl-ester der Säuren wurden mit einem geeigneten Temperaturprogramm analysiert (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** GC-MS Analytik der Methyl-ester der Öl- und Stearinsäure ausgehend von einer 1 mM Standardlösung in Phosphatpuffer mit 10% (v/v) DMSO.

Für die Untersuchung des Oleamids **8** wurde Palmitinsäure anstatt Stearinsäure als interner Standard verwendet, da eine Methylierung mit Diazomethan auch eine mögliche Reaktion mit Oleamid bedeutet hätte. Zur Trennung wurde das gleiche Temperaturprogramm, welches auch bei der Trennung der Methyl-ester Einsatz fand, verwendet (Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Trennung von Amid **8**, Palmitin- und Ölsäure nach der Hydrolyse von **8** durch BsubpNBE.

### Biokatalysen mit biogenen Amiden

Für die Hydrolysereaktion der Amide **5**, **7** und **8** wurden 200 µl Hydrolaselösung (10 mg/ml), oder 20 mg immobilisiertes Enzym auf ein Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes von 1 ml verwendet. Der interne Standard, der wie das Substrat in DMSO gelöst war, wurde nach Unterbrechung der Reaktion mit 2 N HCl zum Reaktionsgemisch gegeben. Für die Untersuchung der Hydrolyse von **8** wurde eine 5 mM Substratlösung eingesetzt. Die gemessenen Umsätze sind Tabelle 2 angegeben.

**Tabelle 2:** Berechneter Umsatz von Amid **8** nach 25 h Inkubation.

Enzym	Umsatz [%]	Enzym	Umsatz [%]
Chirazyme E-3	1	<b>BsubpNBE</b>	<b>17</b>
Chirazyme E-4	10	PFE	0
Chirazyme L-5	0	BsubE	0
Chirazyme L-2	7	BstE	1
<b>Lipozyme CALB L</b>	<b>41</b>	<b>Chirazyme L-3</b>	<b>26</b>
Chirazyme L-2,C2	15	SDE	0
Lipase M "Amano" 10	0	KOA	1

Die höchsten Umsätze konnten unter Verwendung der Enzyme Lipozyme CALB L, Chirazyme L-3 und BsubpNBE mit einem Umsatz von 41, 26 und 17% erreicht werden. Auch zeigten Chirazyme E-4 und Chirazyme L-2,C2 gute Umsätze.

Bei der Untersuchung der Hydrolyse von **7** betrug die Endkonzentration im Reaktionsansatz 2,5 mM. Ein Problem bei der Analyse der Amide **5** und **7** durch GC-MS ist, dass keine separate Extraktion des Substrates und des Produktes erreicht werden konnte. Dadurch können sehr geringe Umsätze nur ungenau detektiert werden, da bei geringer Produktkonzentration die Probe konzentrierter auf die Säule gegeben werden müsste, was aber zu einer Überladung der Säule durch das in großer Konzentration vorliegende Substrat führen würde. In der nachfolgenden Tabelle 3 sind die gemessenen Umsätze bei der Hydrolyse von **7** nach 48 h Inkubation dargestellt.

**Tabelle 3:** Umsätze bei der Hydrolyse des Amids **7** nach 48 h.

Enzym	Umsatz [%]	Enzym	Umsatz[%]
BsubpNBE	0	Lipozyme CALB L	1
BsubE	0	Chirazyme L-2,C2	0
BstE	0	Chirazyme L-12	0
SDE	0	Lipase M "Amano" 10	0
PFE	0	Chirazyme E-3	0
Chirazyme L-5	0	<b>Chirazyme E-4</b>	<b>10</b>
Chirazyme L-2	1	Chirazyme L-3	0
Chirazyme L-5	0		

Bei der Hydrolyse von **7** (Tab. 3) zeigte nur Chirazyme E-4 Aktivität und setzte das Substrat innerhalb von 24 h zu 10% um.

Für die Hydrolyse des Amids **5** wurde eine Endkonzentration von 2 mM verwendet. Folgende Umsätze wurden nach 65,5 h Inkubation gemessen (Tabelle 4). Die erzielten Umsätze lagen noch unter den erreichten Umsätzen mit **7**. Den besten Umsatz zeigte die BsubpNBE nach 65,5 h mit 4% Umsatz, was 0,008 µmol hydrolysiertem Amid entspricht. Die Ursache für die schlechte Aktivität der Enzyme gegenüber **5** und **7** könnte auf die Carboxylgruppe am Aminrest zurückzuführen sein. Denn auch gegenüber **3** konnten nur sehr schlechte Umsätze gemessen werden.

**Tabelle 4:** Berechnete Umsätze für die Hydrolyse von **5** nach 65,5 h bei 37°C.

Enzym	Umsatz [%]	Enzym	Umsatz [%]
KOA	0	Chirazyme L-3	1
Chirazyme L-5	1	Lipase M "Amano" 10	0
Chirazyme L-2	1	Chirazyme L-2,C2	0
Lipozyme CALB L	0	BsubE	0
<b>BsubpNBE</b>	<b>4</b>	BstE	0
Chirazyme E-3	0	SDE	0
Chirazyme E-4	2	PFEI	0

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der überwiegende Teil der untersuchten Esterasen und Lipasen nahezu keine Aktivität gegenüber den Modellsubstraten zeigte. Vorteilhaft ist allerdings, dass BsubpNBE aktiv ist, da dieses Enzym rekombinant zur Verfügung steht und folglich durch Mutagenesemethoden optimiert werden kann.

Diese Arbeiten wurden von Gunnar Schmidt im Rahmen seiner Diplomarbeit durchgeführt (4).

#### *Screening nach aktiveren Varianten der BsubpNBE*

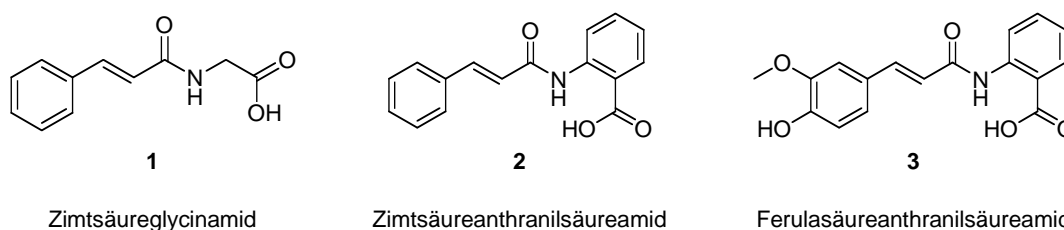
Die Umsätze, die durch Einsatz der BsubpNBE erzielt werden konnten, fielen sehr gering aus, daher sollte die Amidaseaktivität des Enzyms durch gerichtete Evolution gesteigert werden. Dafür wurde eine CASTing Bibliothek bestehend aus ca. 2000 Klonen angelegt, die Mutationen im aktiven Zentrum trugen. Für die Expression wurden zunächst 96-Well-Mikrotiterplatten (MTP) angeimpft, die sich nach 20 h Wachstum in der stationären Phase befanden - dadurch wurde sichergestellt, dass alle Wells etwa zur gleichen optischen Dichte gewachsen sind. Mit jeweils 50 µl dieser Übernachtskultur wird eine frische MTP angeimpft, nach drei Stunden wurde die Expression mit Rhamnose induziert, nach weiteren vier Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet. Für den Assay wurden die Zellen mit dem Proteinextraktionsreagenz BugBuster® (Novagen) aufgeschlossen.

Da der Umsatz des Wildtyps gegenüber den biogenen Amiden recht gering war und nur ein Amid für den Mikrotiterplattenassay nutzbar war, wurde ein einfacher Assay zur Bestimmung der Amidaseaktivität durchgeführt. Bei der Hydrolyse des Substrates Buttersäure-*p*-Nitroanilid ergibt sich in leicht basischer Lösung eine Gelbfärbung, die bei 410 nm detektiert werden kann. Parallel wurden die Platten auch mit Ölsäure-*p*-Nitroanilid als Substrat durchgemustert, um Klone mit einer erhöhten Toleranz gegenüber langkettigen Fettsäuren zu finden. Die Inkubationszeit

betrug in beiden Fällen 20 h bei 37°C und 200 rpm. Leider konnte kein Klon identifiziert werden, der eine im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle erhöhte Aktivität zeigte.

### Avenanthramide

Für die enzymatische Synthese der neu in das Arbeitsprogramm aufgenommenen Avenanthramide (Abbildung 5) wurde zunächst die Etablierung einer HPLC-Analytik durchgeführt. Im weiteren Projektverlauf wurden weitere im AK Bornscheuer vorhandene Enzyme (insbesondere solche, die bereits Amidaseaktivität zeigen) in der Hydrolyse und anschließend auch der Synthese der Zielverbindungen eingesetzt. Diese Verbindungen sind allerdings nicht leicht herzustellen, da durch die konjugierte Doppelbindung die Reaktivität der Carboxylgruppe herabgesetzt ist.



**Abbildung 5:** Strukturen der untersuchten Avenanthramide

Für die HPLC-Analytik wurde eine Kromasil C18 Säule mit 60 mm Länge verwendet. Die Auftrennung von Substrat und Produkten erfolgte mittels einem Gradienten aus Wasser mit 0,1% (v/v) Eisessig und Methanol (0 min 90-10, 15 min 20-80). Die Detektion erfolgte bei 254 nm; die Retentionszeiten der einzelnen Substanzen sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

**Tabelle 5:** Retentionszeiten der Standards für Biokatalysen mit Zimtsäurederivaten

Substanz	Retentionszeit [min]
Zimtsäure	8,95
Ferulasäure	6,59
Anthranilsäure	5,60
Zimtsäure-Glycinamid	8,92
Zimtsäure-Anthranilsäureamid	12,84
Ferulasäure-Anthranilsäureamid	9,29

Da in der Natur kein Enzym bekannt ist, dass die direkte Umsetzung von Zimtsäure oder Ferulasäure mit Aminen zu entsprechenden Amiden katalysiert (der postulierte Mechanismus zur Synthese von Avenanthramiden führt über mehrere Zwischenstufen und benötigt ATP (5)), sollte ein Enzym gesucht werden, das neben seinem natürlichen Substrat auch Avenanthramide umsetzt. Den gewünschten Produkten strukturell ähnlich sind zum Beispiel Ester der Ferulasäure sowie Chlorogenat (Ester der Kaffeesäure und Chinasäure). In der Literatur sind diverse Beispiele für Ferulasäureesterasen und Chlorogenat Esterasen beschrieben, allerdings wurden diese noch nicht auf Amidase Aktivität überprüft.

Zusätzlich zu einigen im Labor vorhandenen Enzymen sollte noch die kommerziell verfügbare Chlorogenat Esterase aus *Aspergillus japonicus* (Firma: Kikkoman) getestet werden. In der Hydrolyse erreichte dieses Enzym einen Umsatz von Zimtsäure-Anthranilsäureamid von 36%, im Fall des Ferulasäure-Anthranilsäureamids waren es 29%, jeweils nach 3 Tagen bei 37°C. Aufgrund dieser viel versprechenden Werte sollte nun die Synthese untersucht werden. Dazu wurden zwei Ansätze verfolgt: In einem Ansatz wurde Zimtsäure-Vinylester als aktivierter Acyldonor und gleichzeitig Lösungsmittel gewählt, im anderen Ansatz wurden stöchiometrische Mengen Zimtsäure als Acyldonor in *tert*-Amylalkohol als Lösungsmittel eingesetzt, in beiden Fällen fungierte Anthranilsäure als Aminokomponente. Beide Systeme sind wasserfrei, damit die Hydrolyse nicht gegenüber der Synthese überwiegt. Die Ergebnisse der Biokatalysen sind in der Tabelle 6 zusammengefasst. Die Umsätze sind ausgesprochen niedrig; nur eines der drei "aktiven" Enzyme ist rekombinant verfügbar und stünde für Verbesserungen durch Mutagenesemethoden zur Verfügung. Acht von zwölf Enzymen setzen den Zimtsäure-Vinylester selbst in Anwesenheit von geringsten Wassermengen zu Zimtsäure um.

**Tabelle 6:** Ergebnisse der Biokatalyse mit Zimtsäure-Vinylester als Acyldonor nach 96 h Inkubation bei 40°C und 1400 rpm. Zimtsäure entsteht durch eine unerwünschte Nebenreaktion, nämlich die Hydrolyse des Zimtsäure-Vinylesters.

Enzym	Umsatz [%]	Bildung von Zimtsäure
Amano Ps ( <i>Pseudomonas cepacia</i> )	-	+
<i>Mucor miehei</i> Lipase	-	+
L3 ( <i>Candida rugosa</i> )	-	-
L7 (Schweinepancreas)	-	+
L8 ( <i>Thermocyces lanuginose</i> )	3%	+
CALB ( <i>Candida antarctica</i> )	2,5%	+
Chlorogenat Esterase ( <i>A. japonicus</i> )	-	-
BsubpNBE ( <i>Bacillus subtilis</i> )	-	-
PFE ( <i>Pseudomonas fluorescens</i> )	-	+
BsteE ( <i>Bacillus stearothermophilus</i> )	-	+
BsubE ( <i>Bacillus subtilis</i> )	-	-
SDE ( <i>Streptomyces diastratochromogenes</i> )	2,7%	+

Da der Einsatz des aktivierten Acyldonors im großen Überschuss nicht den gewünschten Erfolg brachte, wurden einige Lipasen im wasserfreien System (mit Molsieb) mit *tert*-Amylalkohol als Lösungsmittel eingesetzt (Esterasen sind wasserfreiem organischem Lösungsmittel oft nicht aktiv). Nur die CALB zeigte nach sechs Tagen bei 40°C und 1400 rpm einen Umsatz von 16,7%.

Die Chlorogenat Esterase aus *Acinetobacter baillii* ADP1 (6) wurde vor kurzem durch Enzymical<sup>S</sup>, eine geplante Ausgründung der Universität Greifswald, kloniert und funktionell exprimiert. Bislang konnte eine hydrolytische Aktivität gegenüber Ferulasäure-Anthranilsäureamid qualitativ nachgewiesen werden. Als nächstes soll die Synthese mit oben genannten Methoden versucht werden. Da dieses Enzym rekombinant vorliegt, wird es möglich sein, die Eigenschaften mit Hilfe der gerichteten Evolution zu verbessern.

#### 4.1.3. Etablierung einer molekularbiologischen Methode zur fokussierten gerichteten Evolution

Neben bereits gut etablierten Methoden zur gerichteten Evolution sollte im Rahmen des Vorhabens ein neues Verfahren zur „fokussierten gerichteten Evolution“ zur Verwendung kommen. Diese Methode soll es erlauben, kleine Sequenzabschnitte (10-15 Aminosäuren) im Bereich des aktiven Zentrums zu randomisieren und so die Trefferwahrscheinlichkeit signifikant zu erhöhen. Infolgedessen kann die Größe der zu durchmusternden Mutantenbibliotheken um Größenordnungen verkleinert werden, wodurch die Generierung der gewünschten Enzymaktivitäten sehr zielgerichtet erfolgen kann. Als Modellenzyme wurden eine Esterase aus *Pseudomonas fluorescens* (PFE) und aus *Bacillus subtilis* (BsubpNBE) ausgewählt. Die PFE spaltet keine Amide, die BsubpNBE besitzt Amidaseaktivität. Obwohl die Sequenzidentität beider Enzyme sehr gering ist (24% Identität), sind die Strukturen (PFE, pdb-code 1VA4; BsubpNBE, pdb-code 1QE3) sehr ähnlich. In einem Alignment der bekannten Strukturen konnten spezifische Bereiche um das aktive Zentrum identifiziert werden, die aller Wahrscheinlichkeit nach die Amidaseaktivität in BsubPNBE bedingen (Abbildung 6). Fünf Bereiche (Kassetten) befinden sich in einem 10 Å Radius, zwei weitere in einem 15 Å Radius um das aktive Zentrum. Daher wurden diese Kassetten ausgewählt (Abbildung 7) und an diesen Sequenzabschnitten die Methode zur fokussierten gerichteten Evolution etabliert.



**Abbildung 6:** Vergleich der Raumstrukturen der PFE und der BsubpNBE. Trotz großer Unterschiede sind vor allem die in türkis, pink und rot hervorgehoben Bereiche in der Nähe des aktiven Zentrums sehr ähnlich und vermutlich für die Amidaseaktivität verantwortlich.

Eine Methode, die es nicht nur erlaubt, diese Bereiche auszutauschen, sondern auch eine Zufallsmutagenese ermöglicht, wäre daher wünschenswert. In Vorarbeiten wurde bereits damit



begonnen für die in Abbildung 6 und Abbildung 7 hervorgehobenen Bereiche Mutationsmethoden zu entwickeln, die es erlauben diese sehr kleinen Sequenzen in einer PCR zu vervielfältigen und auch *error-prone* PCR Versuche durchzuführen. Nach weiteren Optimierungen konnte die Mutationsrate auf bis zu 5% gesteigert werden. Diese Mutationsrate liegt erheblich über den in der Literatur genannten Werten von ca. 1%. Somit ist es möglich, statistisch pro Kassette wenigstens einen Aminosäureaustausch zu erreichen.

```

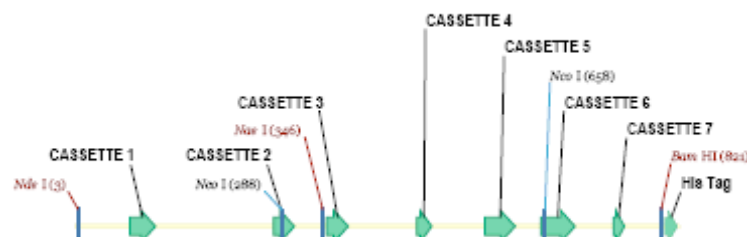
1   MSTFVAKDGT QIYFKDWGSG KPVL FSHGWL LDADMW EYQM EYLSSRGYRT
51  IAFDRRGFGR SDQPWIGNDY DTFADDIAQL IEHLDLKEVI LVGFSGGGGD
101 VARYIARHGS ARVAGLVLLG AVTPELGQKP DYPOGVPLDV FAREKTELLK
151 DRAQFISD FN APFYGINKGQ VVSQGVQTQT LQIALLASLK ATVDCVTAFN
201 EIDSRPDMAK IDVPTLVIHG DGDQIVPFET TGKVAELIK GAELKVYKDA
251 PHGFAVTHAQ QLNEDLLAFL KRGSHHHHHH *
```

10 Å:

CASSETTE 1  
CASSETTE 2  
CASSETTE 3  
CASSETTE 6  
CASSETTE 7

15 Å:

CASSETTE 4  
CASSETTE 5



**Abbildung 7:** Position der durch Strukturalignment mit BsubpNBE identifizierten sieben Kassetten in PFE.

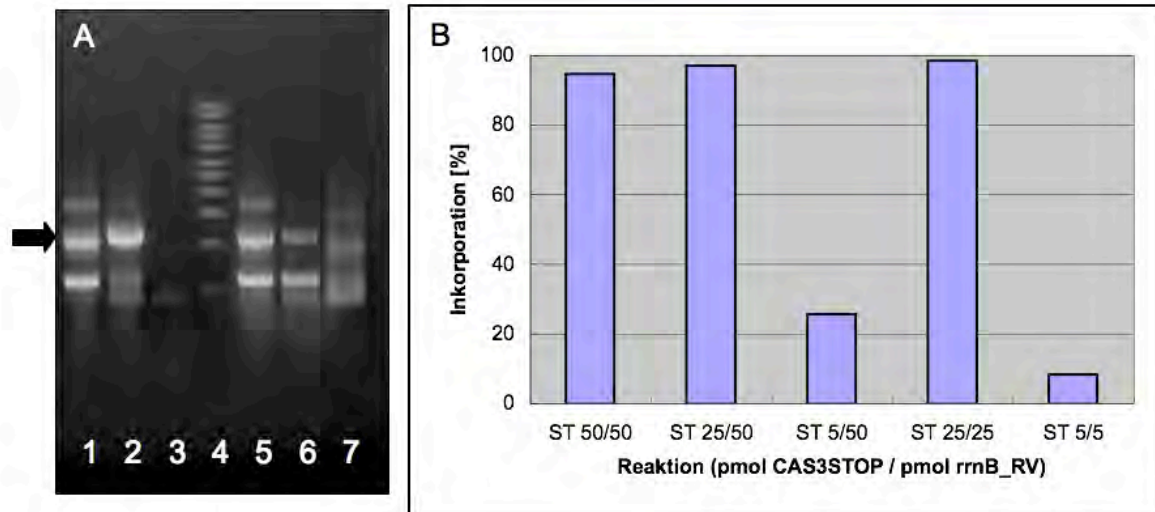
Von den durch Überlagerung der Strukturen identifizierten Bereichen wurde Kassette 3 als wahrscheinlichster Kandidat für die fokussierte gerichtete Evolution ausgewählt, da diese Sequenz dem aktiven Zentrum am nächsten liegt und auch keine sensiblen Aminosäurereste des aktiven Zentrums enthält.

Die entwickelte Methode basiert auf der ursprünglich von Kammann *et al.*(7) entwickelten Megaprimer PCR. Hierbei wird im ersten Schritt durch einen mutagenen inneren Primer und einen flankierenden Rückwärts-Primer der so genannte Megaprimer generiert, der aufgereinigt wird und im zweiten Schritt zusammen mit einem flankierenden Vorwärts-Primer das mutierte Produkt generiert. Verschiedene Strategien wurden vorgeschlagen, um den Aufreinigungsschritt zu umgehen. Hier wurde die Vorgehensweise von Ke *et al.*(8) gewählt. Sie beruht darauf, dass die flankierenden Primer unterschiedliche Schmelztemperaturen aufweisen. Im ersten Schritt wird ein kurzer Rückwärts-Primer mit niedriger Schmelztemperatur verwendet. Im zweiten Schritt wird ein längerer Vorwärts-Primer dazugegeben und die Hybridisierungstemperatur erhöht, so dass der Rückwärts-Primer nicht binden und interferieren kann.

Als mutagener Primer wurde hier ein so genanntes *spiked*-Oligonukleotid (9) eingesetzt. Dieser wird durch einen Algorithmus kreiert, der als Input die Originalsequenz und die Anzahl der gewünschten Mutationen benötigt. Des Weiteren kann man z.B. Positionen definieren, die nicht ausgetauscht werden dürfen, da sie beispielsweise Teil des aktiven Zentrums sind.

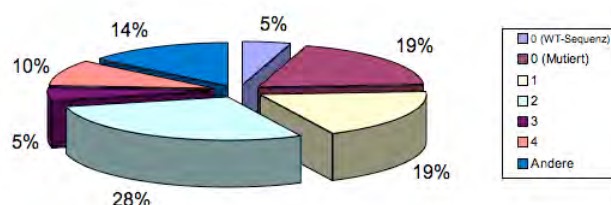
Um sehr hohe Sequenzierungskosten in der Etablierung der Methode zu vermeiden, wurde in das einzubauende Gen ein Stopp-Codon eingeführt. Folglich entstehen nach Einbau der muta-

genen Primer keine aktiven PFE-Varianten mehr, diese können somit in einem Überschicht-Agar leicht von aktiven Varianten unterschieden werden und somit die Mutationsrate einfach und schnell ermittelt werden. Abbildung 8 zeigt, dass die entwickelte Methode sehr gut funktioniert, da unter optimierten (Variation von Reaktionsbedingungen der PCR, Additive usw.) Bedingungen eine hohe Inkorporationsrate von nahe 100% eindeutig belegt werden konnte.



**Abbildung 8:** Eintopf-Megaprimer PCR des *pfe*-Gens unter Verwendung eines Templates. Der Pfeil zeigt die Größe des erwarteten Produktes an. (A) Spur 1: Reaktion mit 50 pmol CAS3stop und 50 pmol rrnB\_RV; Spur 2: Reaktion mit 25 pmol CAS3stop und 50 pmol rrnB\_RV; Spur 3: Reaktion mit 5 pmol CAS3stop und 50 pmol rrnB\_RV; Spur 4: 1 kb DNA Leiter; Spur 5: Reaktion mit 50 pmol CAS3stop und 50 pmol rrnB\_RV; Spur 6: Reaktion mit 25 pmol CAS3stop und 25 pmol rrnB\_RV; Spur 7: Reaktion mit 5 pmol CAS3stop und 5 pmol rrnB\_RV. (B) Prozentuale Inkorporation von Mutationen unter den hier genannten Reaktionsbedingungen. Für jedes Beispiel wurden mind. 200 Klone analysiert.

Nach einer PCR mit *spiked*-Primer wurden ausgewählte Klone bezüglich Häufigkeit und Art der Mutationen durch Sequenzierung analysiert. Abbildung 9 verdeutlicht, dass nur etwa 5% Wildtypsequenz und 19% stille Mutationen erhalten wurden. Etwa 14% der Mutationen führten zu Deletionen oder Verschiebungen im Leseraster. Folglich wurden 62% echte Mutationen erhalten, wobei für 10% bis zu vier Mutationen erhalten wurden. Zusammenfassend lässt sich folglich feststellen, dass diese Methoden zur Generierung von Mutantenbibliotheken hervorragend geeignet ist.

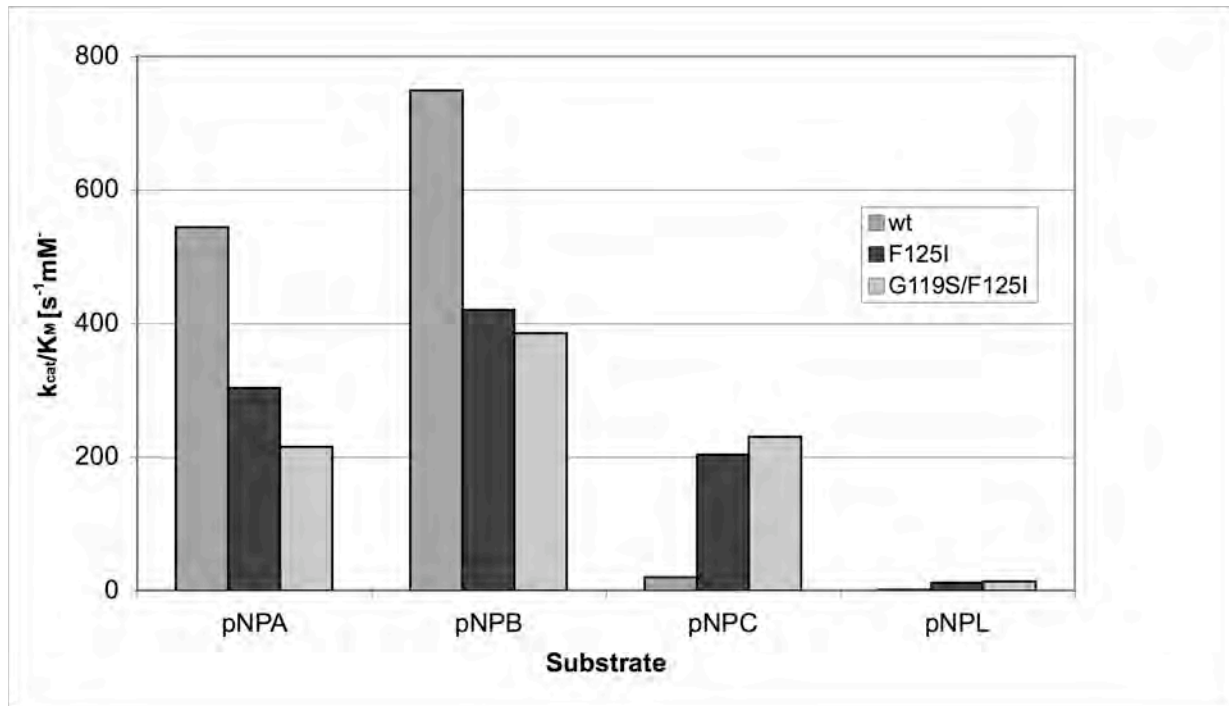


**Abbildung 9:** Verteilung der Mutationen bei Verwendung von *spiked*-Oligonukleotiden in der Eintopf-Megaprimer PCR. Die Kategorie 'andere' beinhaltet Deletionen und Verschiebungen des Leserasters.

Die über diese Methode ("One-pot, Simple Methodology for Cassette Randomization and Recombination for Focused Directed Evolution", OSCARR) zugänglichen Bibliotheken wurden auf Amidaseaktivität durchmustert. Es konnten keine aktiven Mutanten ermittelt werden. Dies ist möglicherweise auf die zu geringe Größe der Mutantenbibliothek zurückzuführen, allerdings

legen spätere Ergebnisse nahe, dass die falschen Substrate zum Screening eingesetzt wurden (s.u.).

Ein Teil dieser Versuche wurde von Anna Schließmann in ihrer Diplomarbeit durchgeführt (10).



**Abbildung 10:** Veränderung der Substratspezifität der Esterase durch Anwendung der OSCARR-Methode gegenüber *p*-Nitrophenylestern von Acetat (pNPA), Butyrat (pNPB), Caprylat (pNPC) und Laurat (pNPL).

Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass die Anwendung dieser Methode tatsächlich zur Veränderung der Enzymeigenschaften führen kann. Esterasen setzen typischerweise bevorzugt kurzkettige Ester um, während Lipasen langkettige Substrate bevorzugen. Nach Anwendung der hier entwickelten OSCARR-Methode und einem nachfolgenden Screening der Mutantenbibliothek mit *p*-Nitrophenylestern unterschiedlicher Kettenlänge der Acylkette (C2, C4, C8, C12) wurden Varianten gefunden, die *p*-Nitrophenylcaprylat mit ähnlicher Effizienz umsetzen, wie Acetat durch den Wildtyp. Selbst gegenüber *p*-Nitrophenyllaurat wurde im Gegensatz zum Wildtyp deutliche Aktivität beobachtet. Interessanterweise ging diese Verbreiterung der Substratspezifität nicht zu Lasten der katalytischen Aktivität bzw. Effizienz  $k_{\text{cat}}/K_m$  (Abbildung 10). Diese Ergebnisse wurden bereits publiziert (11).

Die beiden verbesserten Mutanten, die im Screening gefunden wurden, trugen beide die Mutation F125I. Als nächstes wurde nun eine Sättigungsmutagenese an Position 125 durchgeführt, dabei wurde die Mutante F125L entdeckt, die in ihren Eigenschaften der Mutante F125I sehr ähnelt. Der Rest F125 befindet sich am Eingang zum aktiven Zentrum und bildet gemeinsam mit F158, F143 und I224 einen schmalen Tunnel, durch den Substrate zum aktiven Zentrum gelangen. Fügt man die Mutation F125L ein, verbreitert sich dieser Tunnel ein wenig, so dass sperrigere Substrate einen besseren Zugang finden. Um diese Hypothese zu untermauern, wurde eine Reihe weiterer Mutanten (*Bottleneck* Mutanten) erstellt, bei denen die weiteren sperrigen Reste durch Leucine ersetzt wurden (vgl. Tabelle 7). Einfach-, Doppel-,

Tripel- und eine Quadrupelmutante wurden auf ihre Kettenlängenspezifität untersucht, um auch synergistische Effekte kombinierter Mutationen messen zu können. Tatsächlich hat die Quadrupelmutante eine deutlich höhere Aktivität gegenüber langkettigen Säuren; im Fall von *p*-Nitrophenyldodecanoat war die Aktivität um den Faktor 155 erhöht. Die erhöhte Aktivität der Mutanten gegenüber länger-kettigen Säuren ist größtenteils auf eine Erhöhung von  $k_{cat}$  zurückzuführen (je nach Mutante 7-60-fache Erhöhung), der  $K_M$  Wert wurde im Vergleich zum Wildtyp halbiert bzw. gedrittelt.

**Tabelle 7:** Liste der *Bottleneck* Mutanten

Name	Mutationen	Name	Mutationen
S1	F125V	D2	F125L/F143L
S2	G119S	D3	F143L/F158L
S3	I224F	D4	F143L/I224L
S4	I224L	D5	F158L/I224L
S5	F143V	D6	F125L/F158L
S6	F143L	T1	F125L/F143L/I224L
S7	F158L	T2	F125L/F158L/I224L
S8	F125L	T3	F125L/F143L/F158L
D1	F125L/I224L	Q	F125L/F143L/F158L/I224L

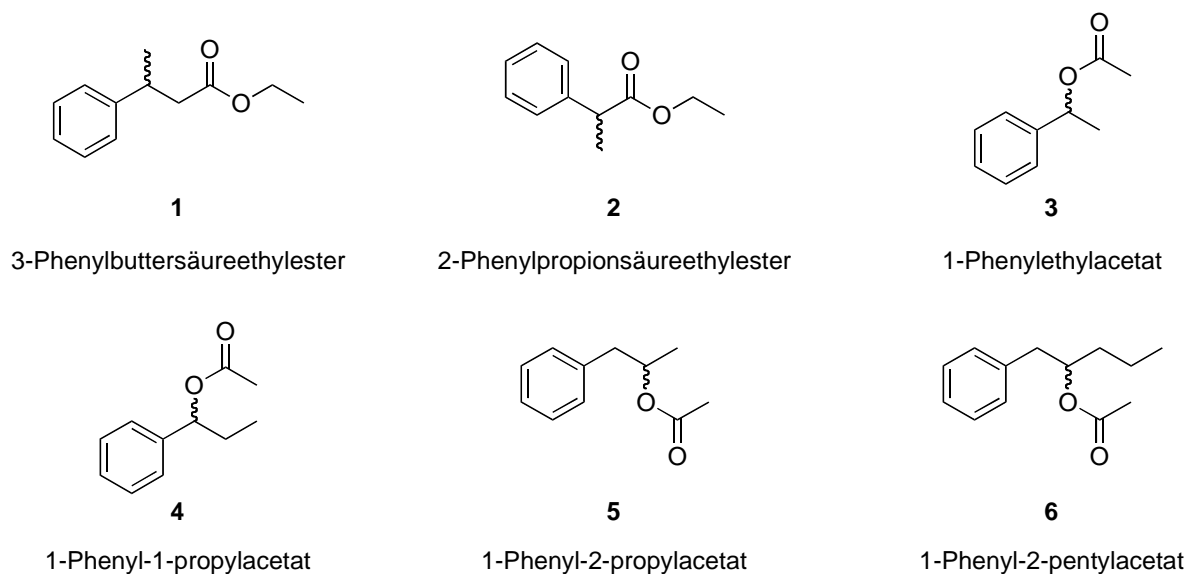
#### *Enantioselektivität der Bottleneck Mutanten*

Alle Mutanten wurden zunächst in einem Schnelltest auf Enantioselektivität überprüft. Daraufhin wurden vier viel versprechende Mutanten für eine genauere Untersuchung ausgewählt; diese Mutanten bauen aufeinander auf (visualisiert in Tabelle 8).

**Tabelle 8:** Ausgewählte *Bottleneck* Mutanten für detailliertere Analyse

Name	Mutationen
S7	F158L
D3	F158L/F143L
T3	F158L/F143L/F125L
Q	F158L/F143L/F125L/I224L

Die Enantioselektivität sollte gegenüber chiralen Alkoholen und chiralen Säuren bestimmt werden. Als Säuren wurden 3-Phenylbuttersäureethylester und 2-Phenylpropionsäureethylester eingesetzt, als Alkohole 1-Phenyl-1-propylacetat, 1-Phenyl-2-propylacetat, 1-Phenylethylacetat und 1-Phenyl-2-pentylacetat (vgl. Abbildung 11)

**Abbildung 11:** Chirale Substrate, die in Biokatalysen mit den *Bottleneck*-Mutanten eingesetzt wurden

Bei der Umsetzung von **1** ergaben sich keine großen Änderungen in der Enantioselektivität. Der Wildtyp hat eine schwache (*R*)-Selektivität ( $E=3,5$ ). Die Mutanten Q und S3 besitzen eine invertierte Enantioselektivität, diese ist allerdings ebenfalls sehr schwach ausgeprägt ( $E=1,2$ ).

**Tabelle 9:** Enantioselektivitäten ausgewählter Mutanten gegenüber 1-Phenyl-1-propylacetat (4)

Mutant	[%] $ee_s$	[%] $ee_p$	C [%]	E
S7	33,4	94,2	26,2	47
D3	84,5	87,2	49,2	39
T3	84,2	89,1	58,6	46
Q	8,9	66,2	11,9	5
wt	0,6	8,6	6,2	1

Aus Tabelle 9 wird ersichtlich, dass die Mutanten S7, D3 und T3 eine deutlich höhere Enantioselektivität gegenüber **4** aufweisen als der Wildtyp. Da der einzige Unterschied zwischen T3 und Q die Mutation I224L ist, scheint diese für die geringere Enantioselektivität der Vierfachmutante verantwortlich zu sein. Alle untersuchten Mutanten, ebenso wie der Wildtyp, waren (*R*)-selektiv.

**Tabelle 10:** Enantioselektivitäten ausgewählter Mutanten gegenüber 1-Phenyl-2-propylacetat (5)

Mutant	[%] $ee_s$	[%] $ee_p$	C [%]	E
S7	79,9	83,0	49,1	26
D3	71,7	76,1	48,5	16
T3	72,0	65,1	52,5	10
Q	90,0	89,2	50,2	54
wt	34,1	92,0	27,0	33

Die Daten in Tabelle 10 zeigen, dass sowohl die Enantioselektivität als auch die Aktivität gegenüber **5** nicht mit den Werten von **4** vergleichbar sind. Für die Biokatalysen mit beiden

Substraten wurde die gleiche Enzymlösung eingesetzt. Während bei der Reaktion mit der Mutante Q mit **4** nach 24 h erst 12% Umsatz erreicht werden, liegt der Umsatz nach gleicher Inkubationszeit mit **5** bei 50%. Im Fall von S7 liegt der Umsatz mit **4** nach 24 h bei 26%, mit **5** wird bereits nach vier Stunden ein Umsatz von 50% erreicht. Außerdem sind bei **5** die Enantioselektivitäten von Wildtyp und Q höher als die der anderen Mutanten - die bei **4** deutlich besser waren.

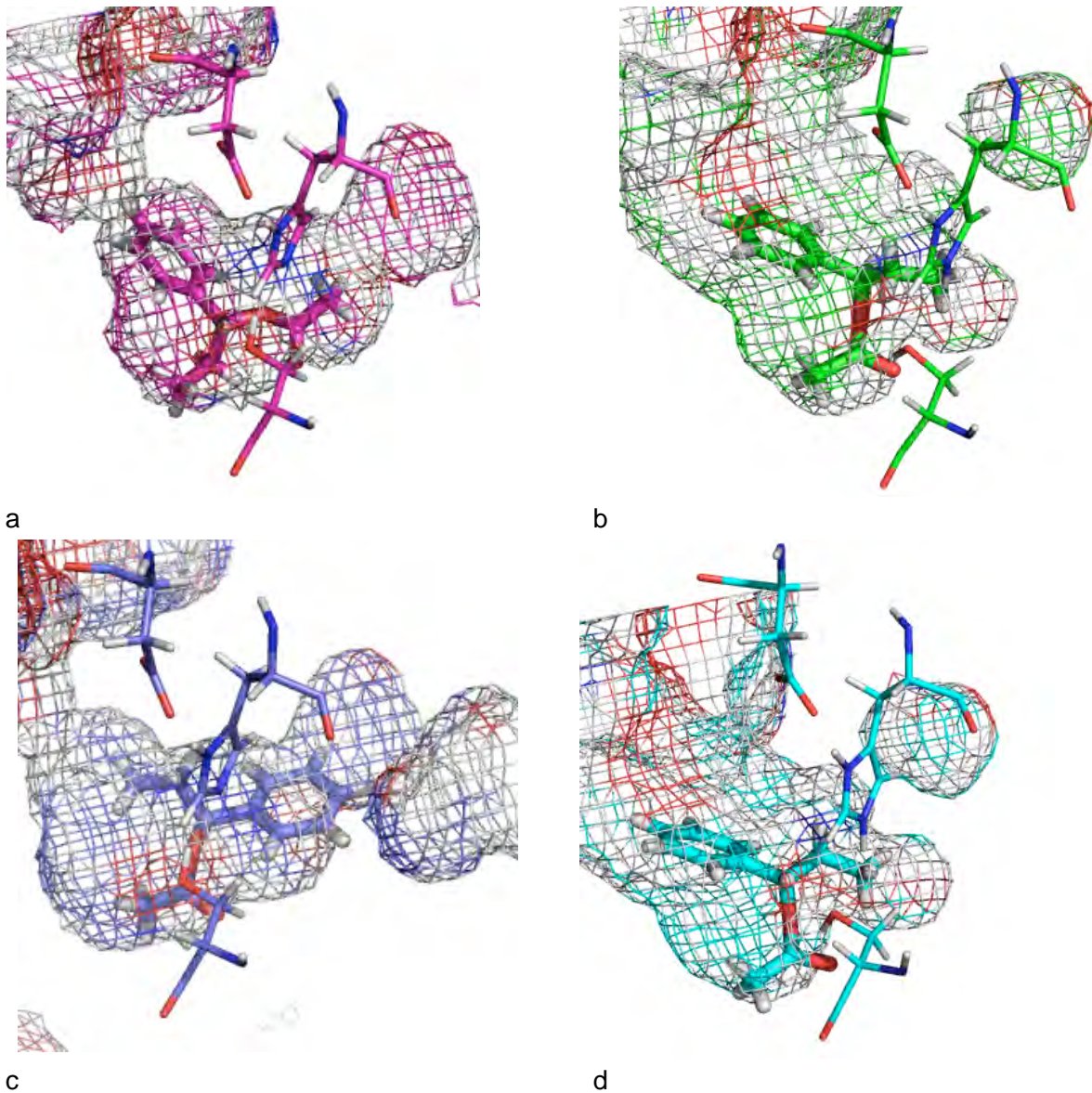
Schon der PFEI Wildtyp hat eine gute Enantioselektivität gegenüber **3**, allerdings haben alle Mutanten bei 50% Umsatz einen E-Wert von über 100 (Tabelle 11).

**Tabelle 11:** Enantioselektivitäten ausgewählter Mutanten gegenüber 1-Phenylethylacetat (**3**)

Mutant	[%] ee <sub>s</sub>	[%] ee <sub>p</sub>	C [%]	E
S7	99,99	95,2	50,6	>100
D3	99,99	93,1	48,5	>100
T3	99,99	95,6	51,1	>100
Q	99,99	86,9	53,5	>100
wt	99,99	69,9	58,9	52

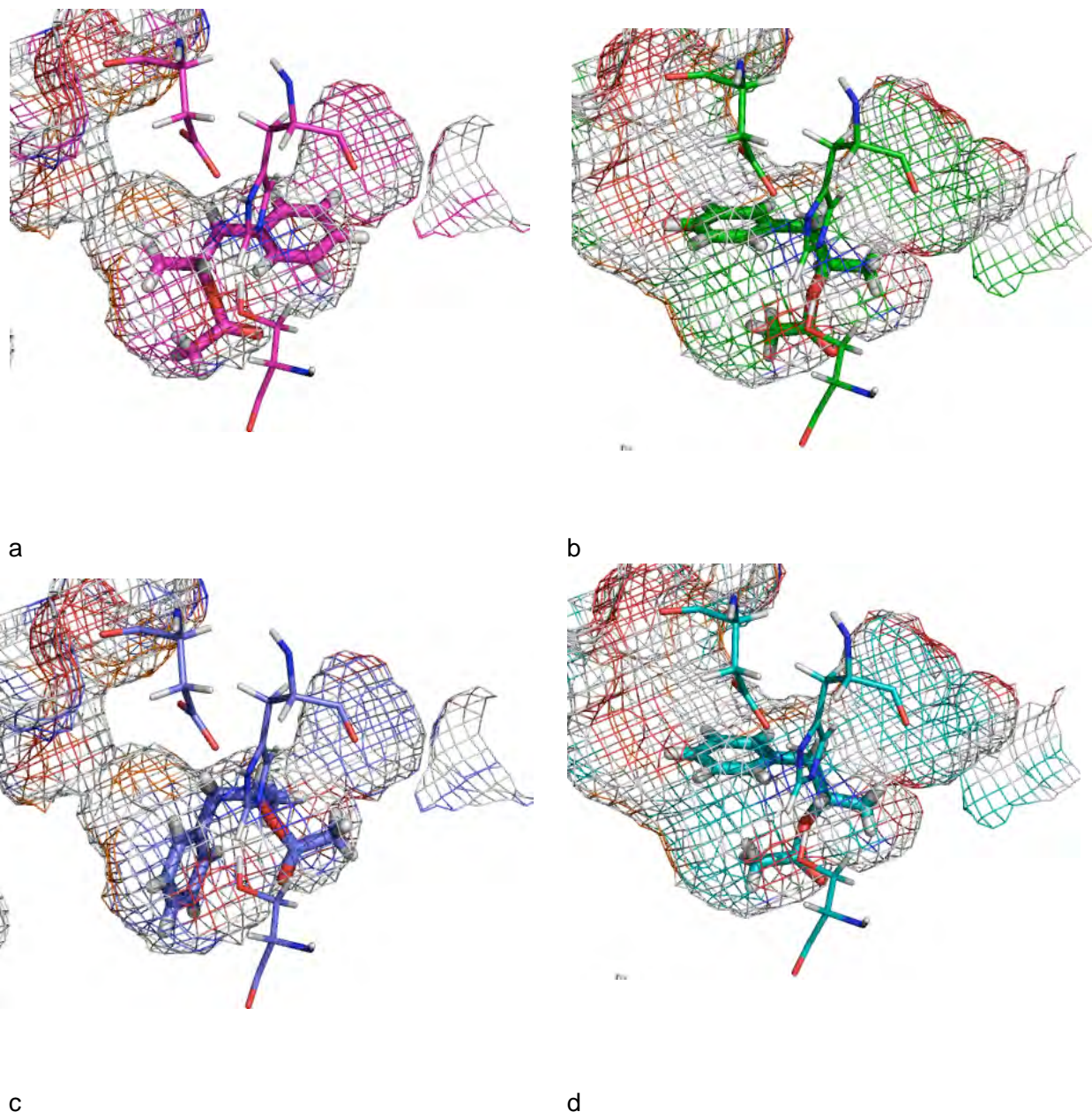
#### *Docking der Substrate in Wildtyp und Mutanten mit Hilfe von YASARA*

Zwei prinzipielle Möglichkeiten der Beeinflussung der Enantioselektivität von Enzymen sind in der Literatur bekannt. Zum einen können Aminosäurereste im aktiven Zentrum direkt mit dem Substrat interagieren (beispielsweise den Raum begrenzen, den es einnehmen kann). Auf diese Art wird die Bindung eines Enantiomers begünstigt, bzw. ein Enantiomer passt besser in die Bindungstaschen (12). Des Weiteren sind Beispiele beschrieben, in denen Reste am Zugang zum aktiven Zentrum die Enantioselektivität beeinflussen, indem sie die Diffusion des präferierten Enantiomers vereinfachen bzw. die des anderen behindern (13). Mit Hilfe des Programms YASARA wurden Simulationen durchgeführt, die beide Enantiomere von **4** und **5** in den PFE Wildtyp und in die Mutante Q bzw. T3 docken. Hierbei soll unter anderem geklärt werden, ob die mutierten Reste den Substraten nah kommen und somit die Bildung des Übergangszustands beeinflussen, oder ob sie eher den Zugang regulieren. Die unten gezeigten Bilder wurden mit PyMol erstellt.



**Abbildung 12:** Docking von 1-Phenyl-1-propylacetat a) Wildtyp, (*R*)-Enantiomer b) Mutante T3, (*R*)-Enantiomer c) Wildtyp, (*S*)-Enantiomer d) Mutante T3, (*S*)-Enantiomer

Die Bilder zeigen deutlich den Unterschied zwischen "Bottleneck" im Wildtyp und geweitetem Eingang zum aktiven Zentrum in der Mutante T3 (jeweils links im Bild). Wie sowohl aus Abbildung 12 als auch aus Abbildung 13 hervorgeht, nehmen gleiche Enantiomere in Wildtyp und Mutante drastisch unterschiedliche Positionen ein, dabei kann in der Mutante der Phenylring in Richtung Eingang zeigen, im Wildtyp reicht der Platz dafür nicht (Ausnahme ist (*R*)-4, allerdings hat der Phenylring hier sehr wenig Platz).



**Abbildung 13:** Docking von 1-Phenyl-2-propylacetat a) Wildtyp, (*R*)-Enantiomer b) Mutante Q, (*R*)-Enantiomer c) Wildtyp, (*S*)-Enantiomer d) Mutante Q, (*S*)-Enantiomer

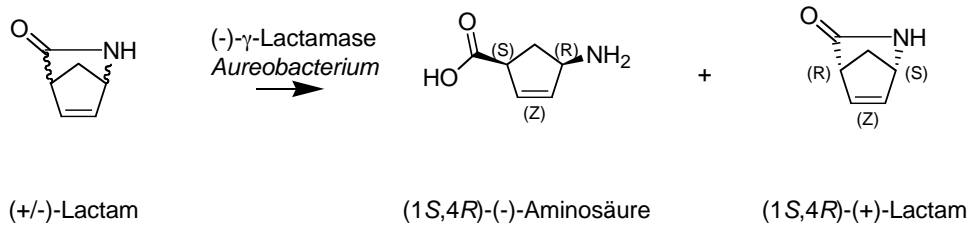
Bei beiden Substraten ist erkennbar, dass beide Enantiomere in der Mutante (Q bzw T3) beinahe die gleiche Position einnehmen - sie sind lediglich gespiegelt. Wahrscheinlich wird die bessere Reaktivität des (*R*)-Enantiomers unter anderem dadurch verursacht, dass es einen günstigeren Winkel und Abstand zum katalytischen Serin besitzt. Im Wildtyp hingegen tauschen bei den verschiedenen Enantiomeren Acylrest und Phenylring die Bindungstaschen.

### *Ein neues Modell für Amidaseaktivität: Die $\gamma$ -Lactamase aus *Aureobacterium**

Zu Beginn des Projekts war als Vorlage für eine  $\alpha/\beta$ -Hydrolase mit Amidaseaktivität die pNBE gewählt worden. Während die aus der gerichteten Evolution hervorgegangenen Mutanten interessante Eigenschaften betreffend ihrer Kettenlängenspezifität und Enantioselektivität aufwiesen, konnte keine Mutante mit Amidaseaktivität gefunden werden. Als alternatives



Modellenzym sollte daher die  $\gamma$ -Lactamase aus *Aureobacterium* dienen (14). Da die natürliche Funktion des Enzyms unbekannt ist, wurde es nach seiner Aktivität gegenüber dem Vince Lactam (Azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on) benannt (siehe Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Racematspaltung von ( $\pm$ )-Azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-on mit der  $\gamma$ -Lactamase aus *Aureobacterium*. Als Produkt entsteht (-)-4-Aminocyclopent-2-encarboxylsäure, das (+)-Lactam wird kaum umgesetzt.

Da das Vince Lactam ein wichtiges Intermediat für die Synthese des Reverse-Transkriptase-Hemmers Abacavir (GlaxoSmithKline) ist, ist die Bereitstellung optisch reinen Lactams industriell relevant.

Obwohl die Lactamase aus einem gram-positiven Organismus stammt, ist die Homologie zur PFEI hoch: Ein Alignment der Aminosäuresequenz ergab 37,8% Identität und 53,7% Positive (d.h. ähnliche Aminosäuren) - zum Vergleich dazu: PFEI und pNBE haben 7,7% Identität und 16,1% Positive; auch die Strukturen lassen sich recht gut übereinanderlegen (siehe Abbildung 15).



**Abbildung 15:** Alignment der PFEI (grün) und der  $\gamma$ -Lactamase (violett), die Aminosäuren des aktiven Zentrums sind als „Stick“ dargestellt.

Während zum aktiven Zentrum der PFEI die Reste S94-D222-H251 gehören, sind die Analoga in der Lactamase S98-D230-H259; die Oxyanionentasche wird in der PFEI von W28 und M95 gebildet, in der Lactamase von Y32 und M99. Sowohl die Aminosäuren des aktiven Zentrums, als auch die der Oxyanionentasche lassen sich gut zur Deckung bringen. Selbst die *random coil* Bereiche weichen in der Kristallstruktur nur wenig voneinander ab.

Zunächst wollten wir versuchen, mit Hilfe der Sequenz der Lactamase relevante Aminosäurereste der PFEI zu identifizieren, durch deren Mutagenese Amidaseaktivität zustande kommen könnte. Auch hier wurde nach der Prämissenverfahren, dass näher zum aktiven Zentrum gelegene Reste vermutlich mehr Einfluss auf die Katalyse haben und somit interessantere Ziele für Mutagenese sind als solche, die weiter entfernt liegen. Die weiter oben

beschriebenen Kassetten der PFEI wurden mit den korrespondierenden Sequenzen der Lactamase verglichen und QuikChange<sup>®</sup> Primer für den Austausch nicht-ähnlicher Aminosäuren wurden abgeleitet. Durchgeführt wurde die QuikChange<sup>®</sup> für die Kassetten 1,2,3,6 und 7, da diese Kassetten dem aktiven Zentrum am nächsten liegen.

**Tabelle 12:** Übersicht der PFEI Mutanten, die aufgrund des Vergleichs mit der Lactamase erstellt wurden

Kassette	Expression	Esterase-Aktivität	Mutationen
CAS1	<i>Inclusion bodies</i>	-	F25L/S26I/L30P/D34H/M35S
CAS2	löslich	+	G98T
CAS3	<i>Inclusion bodies</i>	-	V117A/L118F/T122E/L124F/F125L
CAS6	<i>Inclusion bodies</i> / Protein zu klein	-	D220T/G221K/F227I/T229A
CAS7	löslich	+	F253L/A254L
CAS2+3	<i>Inclusion bodies</i>	-	F25L/S26I/L30P/D34H/M35S/G98T

Wie aus Tabelle 12 ersichtlich wird, konnten nur zwei der konstruierten Mutanten funktionell exprimiert werden. Bei den weiteren Mutanten wurde die Expression bei unterschiedlichen Kultivierungstemperaturen erfolglos versucht. Die Mutante CAS2 und CAS7 weisen ein dem Wildtyp sehr ähnliches Substratspektrum auf; Buttersäure-*p*-Nitroanilid wurde nicht hydrolysiert.

Die Firma Chirotech Technology Ltd. war freundlicherweise bereit, uns das Gen der Lactamase für Forschungszwecke zu überlassen. Nach Umklonierung und Expression sollte es als Positivkontrolle dienen, jedoch zeigte sich schnell, dass das Substratspektrum der Lactamase begrenzt ist. Während das Vince Lactam zügig umgesetzt wird, war gegenüber dem Standard-Amidsubstrat Buttersäure-*p*-Nitroanilid keine Aktivität erkennbar. Während der Ester *p*-Nitrophenylacetat noch umgesetzt wird, konnte schon gegenüber dem Butyrat photometrisch keine Aktivität mehr nachgewiesen werden. Nun lag die Vermutung nahe, dass die Standard-Amidsubstrate nicht geeignet sind, um Amidaseaktivität in der PFEI nachzuweisen. Neueste Ergebnisse belegen, dass die PFEI in der Lage ist, das Vince Lactam umzusetzen, sie besitzt also bereits Amidaseaktivität. Biokatalysen mit nur je einem Diastereomer legen außerdem die Vermutung nahe, dass die PFEI eine gute Enantioselektivität gegenüber dem Vince Lactam aufweist. Um die Selektivität zu quantifizieren, muss zunächst die chirale Analytik etabliert werden, mit ersten Arbeiten hierzu wurde gerade begonnen.

Sollte die PFEI tatsächlich in der Lage sein, das Vince Lactam stereoselektiv umzusetzen, könnte das industriell interessant sein, dieses Thema wird ein Schwerpunkt der zukünftigen Untersuchungen sein.

## 4.2. Projektpartner Rieks GmbH

Der erste Projektabschnitt hatte zunächst das Ziel, die für die Projektdurchführung notwendigen Basistechnologien im Haus zu etablieren.

- Aufbau einer adäquaten HPLC-Analytik zur Quantifizierung von Edukten und Produkten
- Bereitstellung chemisch synthetisierter Modellverbindungen für das Amidase-Screening beim Projektpartner
- Etablierung antimikrobieller Wirkstoffassays und Charakterisierung des Wirkprofils ausgewählter Zielverbindungen

### 4.2.1. Etablierung der DC- und HPLC-Analytik zur Detektion von Aminen und Amiden

Ein entscheidendes Kriterium für die Beurteilung des zu entwickelnden biotechnologischen Syntheseverfahrens ist die anzustrebende vollständige Umsetzung der Edukte zum jeweiligen Zielprodukt.

Zunächst wurde bei der Dr. Rieks GmbH eine semi-quantitative DC-Analytik auf Amine und Amide etabliert. Für die Beurteilung des im Rahmen des vorliegenden Projekts jeweils entwickelten Verfahrens zur Synthese biogener Amide war jedoch vor allem von Interesse, die Anwesenheit von freien Aminen zu vermeiden, etwa bei der Synthese der Amide. Aus diesem Grunde wurde zusätzlich eine Analytik für die Amine etabliert, die sich nach der jeweiligen Umsetzung noch im Reaktionsgemisch befinden. Hierfür wurde die Eigenschaft der Amine ausgenutzt, in Abhängigkeit vom vorliegenden pH-Wert der Lösung unterschiedliche Wasserlöslichkeit aufzuweisen. Somit ließen sich die wässrigen Reaktionsansätze nach ansäuern und Ausschütteln mit Ethylacetat sowie nachfolgender Behandlung mit Natronlauge hinsichtlich der freien Amine aufkonzentrieren und diese dann über eine entsprechende HPLC-Analytik analysieren.

Hierzu wurden diese biogenen Amine nach Vorsäulen-Derivatisierung mit *p*-Nitrobenzoyloxycarbonylchlorid (PNZ-Cl) unter Verwendung einer Nucleosil RP18 Säule sowie unter isokratischen Bedingungen (Methanol/Wasser 80:20) aufgetrennt und bei einer Wellenlänge von 210 nm detektiert.

### 4.2.2. Etablierung der DC- und HPLC-Analytik zur Detektion von Nitrosaminen

Verunreinigungen durch nicht umgesetzte Amine stellen bei zahlreichen kommerziell erhältlichen, chemisch synthetisierten Amiden für die Kosmetikindustrie ein schwerwiegendes Problem dar, da diese Amine mit nitrosierenden Agenzien, wie beispielsweise Nitrogruppen-enthaltende Konservierungsmittel, zu toxischen Nitrosaminen reagieren können. So stellt insbesondere das Reaktionsprodukt *N*-Nitrosodiethanolamin ein häufiges Reaktionsprodukt in Kosmetika dar. Im Rahmen eines Screening der wesentlichen Nitrosamine in kosmetischen Formulierungen wurden verschiedene stationäre Phasen sowie Laufmittel für die Dünnschichtchromatographie untersucht. Danach konnte ein für die wichtigsten toxischen Nitrosamine universelles System gefunden werden, welches gleichzeitig für die Anwendung direkt aus den jeweiligen komplexen

Wirkstoffmischungen heraus geeignet ist. Dadurch stellt diese Methode einen echten Schnelltest dar, über den eine aufwendige Probenaufarbeitung entfällt. Nach Sicherstellung der Sensitivität des DC-Assays im Rahmen von Referenzmessungen konnte außerdem gezeigt werden, dass sich die Nachweisgrenze des DC kaum von den Ergebnissen der HPLC unterschied. Somit musste letzteres System lediglich zu Quantifizierung erhalten.

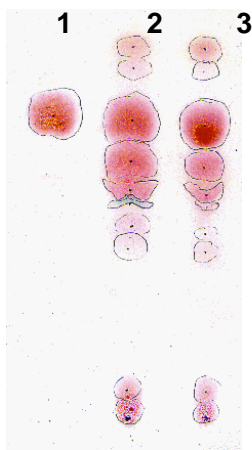
Die DC-Analytik wurde wie nachfolgend beschrieben durchgeführt:

Stationäre Phase: POLYGRAM® ALOX N/UV254 (Macherey-Nagel)

Laufmittel: Hexan / Diethylether / Methylenchlorid (4:3:2, v/v)

Detektion: Die Platte wurde mit Ethanol/Ammoniak (4:1 v/v) besprüht und wie nachfolgend entwickelt: Trocknen, besprühen mit Ninhydrin, erwärmen auf 100 °C und nachfolgendem besprühen mit Fluoresceinamin.

Spots von Nitrosaminen färbten sich nach dieser Methode unter Bestrahlung mit UV 366 nm rot/violett bis tiefrot. Nachfolgende DC (Abbildung 16) zeigt ein Beispiel Chromatogramm der Analytik von zwei kosmetischen Produkten gegen die Leitsubstanz *N*-Nitrosodiethanolamin.



**Abbildung 16:** Dünnschichtchromatogramm zweier kosmetischer Produkte (Spuren 2 und 3) gegen die Leitsubstanz *N*-Nitrosodiethanolamin (Spur 1).

Die quantitative Analytik der Nitrosamine erfolgte über eine HPLC-Anlage der Firma Merck (LaChrom) unter nachfolgenden Laufbedingungen (Abbildung 17):

RP-8, Wasser/Methanol ( $t=0$  (80/20);  $t=40$  (45/55);  $t=50$  (0/100), Flussrate 1 ml/min, 230 nm)

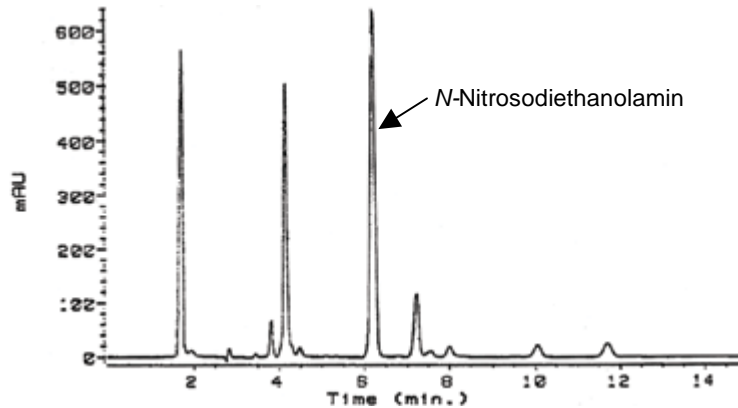


Abbildung 17: HPLC-Chromatogramm von *N*-Nitrosodiethanolamin.

#### 4.2.3. Chemische Synthese und Aufarbeitung ausgewählter Zielverbindungen

In Abstimmung mit dem Projektpartner wurden in der Frühphase des Projekts zunächst verschiedene biogene Amide als Modellverbindungen chemisch synthetisiert. Aufgrund ihrer Akzeptanz in der Kosmetik wurden einerseits Amide längerer Fettsäuren, andererseits bereitgestellt. Zusätzlich wurden vor dem Hintergrund eines multifunktionalen Wirkspektrums Amide der Zimtsäureverschiedener Phenolsäuren als Zielverbindungen ausgewählt.

Folgende Amide wurden synthetisiert:

- Ölsäure-*N*-Benzylamid (aus Ölsäure und Benzylamin)
- *N*-(4-Benzoessäure)ölsäureamid (aus Ölsäure und 4-Aminobenzoesäure)
- *N*-(4-Benzoessäure)ölsäureamid (aus Ölsäure und 4-Aminobutansäure)
- *N,N*-Dimethylauramid (aus Laurinsäure und Dimethylamin)
- Zimtsäure-*N*-Glycinamid (aus Zimtsäure und Glycin)
- Zimtsäure-*N*-Benzylamid (aus Zimtsäure und Benzylamin)

##### Synthese des Ölsäure-*N*-Benzylamids

15 g (49,8 mmol) Ölsäurechlorid werden in 150 ml Dioxan gelöst und tropfenweise mit 10,7 g (100 mmol) Benzylamin, gelöst in 100 ml Dioxan versetzt. Dabei bildet sich ein grau-weißer Niederschlag. Der Ansatz wird für 10 Minuten bei RT weitergerührt und dann auf ca. 500 ml Eiswasser gegeben, darauf werden nochmals ca. 500 ml Eiswasser gegeben. Der pH-Wert der Mischung wird durch Zugabe von 2,5 ml 1 N Salzsäure auf pH = 5 eingestellt, der Niederschlag über einen Büchnertrichter mit schnellem Filterpapier filtriert und der Filterkuchen von 31,7 g (noch feucht, theoretische Ausbeute 18,5 g Produkt) im Exsikkator getrocknet. Das Produkt wird in Ethanol gelöst und zusammen mit Ölsäurechlorid in Dioxan mittels DC auf Kieselgel in

Petrolether:Diethylether:Ethanol (5:5:0,2) analysiert. Die Syntheseausbeute betrug 17,29 g = 93,5%.

#### *Synthese des N-(4-Benzoessäure)ölsäureamids*

13,7 g (100 mmol) 4-Aminobenzoessäure wird in 500 ml Dioxan gelöst und tropfenweise mit 16 ml (= 15 g / 100 mmol) Ölsäurechlorid versetzt. Dabei wird die Lösung milchig trüb. Der Ansatz wird noch ca. 10 Minuten bei RT weitergerührt und dann auf ca. 1500 ml Eiswasser gegeben. Der pH-Wert der Mischung ist schon sauer, daher findet keine weitere Ansäuerung statt. Der Niederschlag wird über einen Büchnertrichter mit schnellem Papierfilter abfiltriert. Das noch feuchte Produkt (37 g) wird zum Trocknen in den Exsikator gestellt. Die Syntheseausbeute an trockenem Produkt liegt bei 18,8 g (94%). Das Produkt wird in Ethanol gelöst und zusammen mit Ölsäurechlorid in Dioxan mittels DC auf Kieselgel in Petrolether:Diethylether:Ethanol:Essigsäure (5 mL : 5mL : 0,2 mL : 0,1 mL) analysiert.

#### *Synthese des N-(4-Butansäure)ölsäureamids*

10,3 g (100 mmol) 4-Aminobutansäure werden in 200 ml 2 N Kaliumhydroxidlösung gelöst und tropfenweise mit 16 ml (= 15 g / 49,8 mmol) Ölsäurechlorid versetzt. Dabei bildet sich ein grauweißer, sich zusammenballender Niederschlag. Daraufhin werden 60 ml KOH zugegeben. Der Ansatz wird nach ca. 10 Minuten bei RT auf ca. 1000 ml Eiswasser gegeben. Der pH-Wert der Mischung wird durch Zugabe von ca. 200 ml 1 N Salzsäure auf pH = 5 eingestellt. Der angesäuerte Ansatz wird mit 500 ml Diethylether versetzt und im Scheidetrichter ausgeschüttelt. Die bräunliche organische Phase wird abgetrennt, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und der Ether abgezogen. Es bleiben 16,09 g eines braunen Öls zurück, die langsam zu einem hellbraunen Feststoff werden. Der Rückstand wird in Ethanol gelöst und als weißer Niederschlag auskristallisiert. Nach Filtration und Trocknung im Exsikator liegen 14,2 g N-(4-Butansäure)ölsäureamid vor. Das Produkt wird in Ethanol gelöst und mittels DC auf Kieselgel in Petrolether:Diethylether:Ethanol:90% Essigsäure (5:5:0,2:0,1) analysiert.

Im Projektverlauf wurde bei der Dr. Rieks GmbH eine neue vielversprechende Wirkstoffgruppe in das Vorhaben integriert. In einer internen Untersuchung zum Potenzial verschiedener Getreideinhaltsstoffe stellten sich die substituierten Zimtsäureamide der Anthranilsäure, so genannte Avenanthramide, welche bisher nur im Hafer identifiziert wurden, als vielversprechend heraus. Von besonderem Interesse sind hierbei Amide der Zimt-, Ferula- oder Kaffeesäure mit potenziellen antimikrobiellen, entzündungshemmenden und UV-absorbierenden Eigenschaften.

Es wurden folgende Modell-Amide für ein Hydrolase-Screening beim Projektpartner Universität Greifswald) synthetisiert:

- Ferulasäureamid der Anthranilsäure
- Zimtsäureamid der Anthranilsäure
- Kaffeesäureamid der Anthranilsäure

### *Synthese des Ferulasäureamids der Anthranilsäure*

Das Ferulasäureamid der Anthranilsäure wurde in einem 4-stufigen Syntheseverfahren hergestellt:

#### *Darstellung von Acetoxy-Ferulasäure*

Es werden 16,4 g Ferulasäure (84,45 mmol) in 50 ml Essigsäureanhydrid aufgenommen. Die Reaktion wird durch Zugabe von 0,51 g DMAP gestartet. Nach 4 Stunden wird der Ansatz in 100 ml Wasser gegeben und der Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nun wird der feine weiße Niederschlag über einen Büchnertrichter abfiltriert und mehrmals mit Wasser gespült. Nach dem Trocknen bleiben 20,48 g eines weißen Pulvers zurück.

#### *Darstellung von Acetoxy-Ferulasäurechlorid durch Umsetzung mit Thionylchlorid*

Es werden 6,1 g Acetoxy-Ferulasäure (25,82 mmol) in 100 ml Toluol suspendiert und über eine Vorlage tropfenweise mit 7,5 ml (103,39 mmol) Thionylchlorid versetzt. Die Mischung wird für eine Stunde unter Rückfluß gekocht und anschliessend das Lösungsmittel samt überschüssigem Thionylchlorid abdestilliert. Dabei bleibt ein Feststoff im Kolben zurück, der in 50 ml Toluol aufgenommen unter Erwärmung gelöst wird. Beim Abkühlen fallen cremefarbene Kristalle aus. Der Schmelzpunkt liegt bei 135,5°C statt der angegebenen 139 – 140°C.

#### *Umsetzung von Acetoxy-Ferulasäurechlorid mit Anthranilsäure*

Es werden 3,7 g 4-Acetoxy-Ferulasäurechlorid (14,53 mmol) in 75 ml Dioxan gelöst und mit 3,95 g (29,05 mmol) Anthranilsäure (gelöst in 20 ml Dioxan) über den Rückflußkühler unter kräftigem Rühren tropfenweise versetzt. Nach vierstündiger Inkubation unter Rühren bei 50°C wird auf Eis gefällt und der Niederschlag über einen Büchnertrichter abfiltriert. Der Filterkuchen wird noch zweimal in je 500 ml Wasser aufgeschlämmt und abfiltriert. Der Rückstand wird mittels HPLC analysiert.

#### *Abspaltung der Acetoxy-Schutzgruppe*

1 g des Produkts werden in 10 ml 10%iger NaOH gelöst, für 10 Minuten im Wasserbad bei 70°C – 95°C erhitzt und anschließend bei Raumtemperatur für weitere 1,5 Stunden gerührt. Anschließend wird mit 30 ml 1 N Salzsäure versetzt und der weiße, flockige Niederschlag über einen Büchnertrichter abfiltriert. Der Filterkuchen wird dann noch zweimal mit Wasser gewaschen und abfiltriert. Der Rückstand wird bei 60°C getrocknet. Das Produkt wird in der HPLC auf Reinheit analysiert.

#### *Darstellung des Zimtsäureamids der Anthranilsäure*

Es werden 10 g (67,49 mmol) Zimtsäure unter leichter Erwärmung auf dem Wasserbad unter Rückfluß tropfenweise mit 7,34 ml (101,24 mmol) Thionylchlorid versetzt. Dabei geht die Zimtsäure vollständig in Lösung. Nach zweistündiger Inkubation wird überschüssiges Thionylchlorid über die Destillationsbrücke unter Wasserstrahlpumpenvakuum abdestilliert. Das

Zimtsäurechlorid wird in 200 ml Dioxan gelöst und tropfenweise mit einer Lösung aus 18,51 g (134,99 mmol) Anthranilsäure (in 90 ml Dioxan) versetzt. Nach ca. 30 Minuten wird der Ansatz unter Rühren auf 1,2 l Eiswasser gegeben. Der Niederschlag wird über einen Büchnertrichter abfiltriert und insgesamt fünf mal wieder in Wasser aufgeschlämmt, bis der pH-Wert der Lösung neutral ist.

#### *Darstellung des Kaffeesäureamids der Anthranilsäure*

Es werden 5 g (27,75 mmol) Kaffeesäure unter leichter Erwärmung auf dem Wasserbad unter Rückfluß tropfenweise mit 3,02 ml (41,63 mmol) Thionylchlorid versetzt. Zum Ansatz werden 100 ml Dioxan zugegeben. Nach Abklingen der Gasentwicklung wird die in 40 ml Dioxan gelöste Anthranilsäure (7,62 g = 55,56 mmol) zugetropft. Nach 30-minütigem Rühren wird die Lösung über einen Büchnertrichter abfiltriert, der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und viermal mit Wasser gegengeschüttelt. Die Ethylacetatphase wird über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das entstehende Produkt wird in der HPLC auf Reinheit analysiert.

Die Zimtsäure-Derivate wurden analog zu den oben geschilderten Verfahren hergestellt.

Die synthetisierten Amide werden zum einen dem Projektpartner Universität Greifswald (Prof. Bornscheuer) für ein Hydrolase-Screening zur Verfügung gestellt. Zum anderen wurden ausgewählte Amide auf ihre antimikrobiellen Eigenschaften und ihre Eignung zum Einsatz in Kosmetika untersucht.

#### *4.2.4. Etablierung antimikrobieller Wirkstoffassays und Charakterisierung des Wirkprofils ausgewählter Zielverbindungen*

Zahlreiche antimikrobielle Wirkstoffe weisen ein auf bestimmte Mikroorganismen beschränktes Wirkspektrum auf. Infolgedessen werden zur Zeit zur wirksamen Konservierung kosmetischer oder pharmazeutischer Formulierungen stets mehrere antimikrobielle Substanzen eingesetzt. Eine signifikante Reduzierung der erforderlichen Konservierungsmittel erfordert die Bereitstellung neuer Verbindungen, die gleichzeitig gegen Bakterien, Hefen und Schimmelpilze wirken. Um eine erste Aussage zum Wirkspektrum und zu notwendigen Einsatzkonzentrationen ausgewählter Amide in zu konservierenden Produkten treffen zu können, wurden drei verschiedene Assays etabliert und durchgeführt:

1. Agar-Diffusionstest, modifiziert auf Testung lipophiler Substanzen
2. Bouillon-Mikrodilutionsmethode zur Ermittlung minimaler inhibitorischer Konzentrationen
3. Formulierungsspezifische Keimbelastungstests

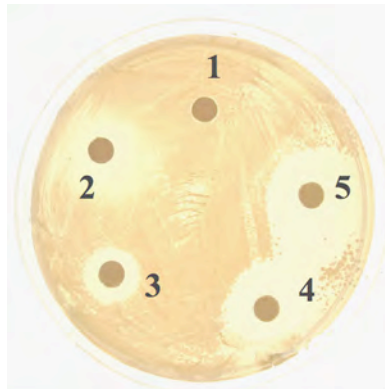
#### *Agar-Diffusionstest*

Beim Agar-Diffusionstest werden Filterpapierblättchen auf eine mit dem Testkeim beimpfte Nährmedienoberfläche aufgelegt und mit der antimikrobiellen Testsubstanz getränkt. Infolge der Diffusion der Testsubstanz in den Agar entsteht um das Blättchen ein Hemmhof, dessen Durchmesser ein erstes semi-quantitatives Maß für die antimikrobielle Eigenschaft der Testsub-

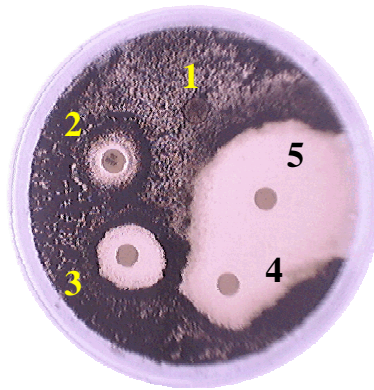


stanz darstellt. Die Testung erfolgte auf den nach DIN 58940 standardisierten Referenzmedien. Ausplattiert wurden jeweils etwa  $10^5$  Keime von folgenden Teststämmen: *B. subtilis* DSM 347 (gram-positiv), *E. coli* DSM 498 (gram-negativ), *C. kefyr* DSM 70073 (Hefe), *C. albicans* DSM 1665 (Hefe), *A. niger* DSM 1988 (Schimmelpilz). Von *A. niger* wurde eine ausreichende Menge Kultur von einer Stammkulturplatte entnommen und auf YPD ausplattiert. Die Amide sowie als antimikrobielle Referenzen Zimtsäure und Phenylethanol wurden in definierten Konzentrationen in DMSO (+ 0,1% Tween 20) gelöst und jeweils 10  $\mu$ l auf die Filterpapierblättchen aufgetropft. Als Negativ-Kontrolle wurden 10  $\mu$ L DMSO (+ 0,1% Tween 20) eingesetzt. Folgende biogene Amide wurden auf ihre antimikrobielle Aktivität untersucht:

- Ölsäure-*N*-Benzylamid (Eigensynthese)
- *N*-(4-Benzoessäure)ölsäureamid (Eigensynthese)
- *N*-(4-Benzoessäure)ölsäureamid (Eigensynthese)
- *N,N*-Dimethylauramid (Eigensynthese)
- Zimtsäure-*N*-Glycinamid (Eigensynthese)
- Zimtsäure-*N*-Benzylamid (Eigensynthese)
- *N,N*-Dimethylauramid, CAS-Nr. 3007-53-2 (Sigma-Aldrich)
- *N*-Stearoylethanolamid, CAS-Nr. 111-57-9 (Sigma-Aldrich)
- Zimtsäureamid der Anthranilsäure (Eigensynthese)
- Ferulasäureamid der Anthranilsäure (Eigensynthese)



**Abbildung 18:** Ergebnisse eines Agar-Diffusionstests unter Verwendung von *B. subtilis* (gram-positiv). Aufgetragen wurden: 1. Kontrolle DMSO, 2. 250  $\mu$ g Zimtsäure, 3. 250  $\mu$ g Ölsäure-*N*-Benzylamid, 4. 250  $\mu$ g Zimtsäure-*N*-Benzylamid und 5. 250  $\mu$ g Zimtsäure-*N*-Glycinamid.



**Abbildung 19:** Ergebnisse eines Agar-Diffusionstests unter Verwendung von *Aspergillus niger* (Schimmelpilz). Aufgetragen wurden: 1. Kontrolle DMSO, 2. 250 µg *N*-Stearylethanolamid, 3. 250 µg *N,N*-Dimethylauramid, 4. 250 µg Ölsäure-*N*-Benzylamid und 5. 250 µg Zimtsäure-*N*-Benzylamid.

### Bouillon-Mikrodilutionsmethode

Ergänzend zum Agar-Diffusionstest wurde zur Bestimmung minimaler Hemmstoffkonzentrationen (MIC, *minimal inhibitory concentration*) ausgewählter Amide die Bouillon-Mikrodilutionsmethode eingesetzt (Tabelle 13). Dieses Verfahren liefert quantitative Aussagen zu antibakteriellen und antifungalen Eigenschaften in wasserhaltigen Flüssigmedien. Die MIC stellt die niedrigste Konzentration eines Wirkstoffs dar, die die *in vitro*-Vermehrung von Bakterien oder Hefen innerhalb einer festgelegten Zeitspanne von 48 h verhindert (keine Zunahme der OD).

Folgende Teststämme wurden eingesetzt: *B. subtilis* DSM 347 (gram-positiv), *Micrococcus luteus* DSM 1790 (gram-positiv), *E. coli* DSM 498 (gram-negativ), *Candida kefyr* DSM 70073 (Hefe). Als Referenz-Substanzen wurden die in der Naturkosmetik als antimikrobielle Wirkstoffe gebräuchlichen Verbindungen Zimtsäure und Phenylethanol eingesetzt. Zur Bestimmung der MIC (*minimal inhibitory concentration*) ausgewählter Amide wurden jeweils Teströhrchen mit gleichem Volumen (1,98 ml) Müller-Hinton-Bouillon, definiertem Mikroorganismen-Inokulum (etwa  $1 \times 10^5$  CFU/mL) und gleichem Volumen an unterschiedlich konzentriertem, zu testenden Wirkstoff (20 µl) beschickt.

**Tabelle 13:** Ergebnisse der Bouillon-Mikrodilutionstests zur Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration (MIC) ausgewählter biogener Amide. Dargestellt ist diejenige Wirkstoffkonzentration (in % w/v), bei der keine Zunahme der OD nach 48 h Inkubation festgestellt wurde.

Wirkstoff	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Candida kefyr</i>
Zimtsäure- <i>N</i> -Glycinamid	0,05%	0,1%	0,3%	0,15%
Zimtsäure- <i>N</i> -Benzylamid	0,1%	0,15%	0,3%	0,2%
Ölsäure- <i>N</i> -Benzylamid	0,1%	0,3%	0,5%	0,2%
<i>N</i> -(4-Benzoessäure)ölsäureamid	0,1%	0,25%	0,3%	0,25%
<i>N,N</i> -Dimethylauramid	0,25%	0,5%	0,6%	0,4%
<i>N</i> -Stearylethanolamid	0,5%	0,6%	0,8%	0,6%
<i>Ferulasäureamid der Anthranilsäure</i>	0,4%	0,6%	0,3%	0,3%
<i>Zimtsäureamid der Anthranilsäure</i>	0,4%	0,6%	0,2%	0,2%
Ref.: Zimtsäure	0,3%	0,35%	0,6%	0,2%
Ref.: Phenylethanol	0,3%	0,4%	0,5%	0,5%

Erfreulicherweise zeigten im Bouillon-Mikrodilutionstest prinzipiell alle Zielsubstanzen deutliche inhibitorische Aktivitäten sowohl gegen gram-positive und gram-negative Bakterien als auch gegen die Hefe *C. kefyr*. Hinsichtlich der minimalen inhibitorischen Konzentrationen zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede. Insbesondere das Glycinamid und das Benzylamid der Zimtsäure zeigten bei niedrigen Einsatzkonzentrationen sowohl breite antibakterielle Wirkung gegen *B. subtilis*, *M. luteus* (beide gram-positiv) und *E. coli* (gram-negativ) als auch antifungale Aktivität gegen die Hefe *C. kefyr*. Des Weiteren zeigten die Amide der Ölsäure, Ölsäure-*N*-Benzylamid und *N*-(4-Benzoessäure)ölsäureamid ebenfalls sehr gute antibakterielle und antifungale Aktivität. Dagegen erwies sich insbesondere *N*-Stearylethanolamid erst bei signifikant höheren Einsatzkonzentrationen als ausreichend antimikrobiell wirksam. Die Phenolsäureamide der Anthranilsäure zeigten insbesondere gegen *C. kefyr* und *A. niger* gute antifungale Aktivitäten.

Basierend auf diesen viel versprechenden Resultaten wurden nun bei der Dr. Rieks GmbH Wirkstoff- und Formulierungs-spezifische Keimbelastungstests etabliert. Zum Einsatz kamen hierbei die im Bouillon-Mikrodilutionstest wirksamsten Amide.

#### Formulierungs-spezifische Keimbelastungstests

Die Keimbelastungstests wurden in Anlehnung an die Europäische Pharmacopoeia 4, 5.1.3, mit geringen Modifikationen durchgeführt. Hierbei wurden in zahlreichen Versuchsreihen unkonser-vierten kosmetischen Formulierungen unterschiedliche Konzentrationen an Amiden beigefügt. Anschließend wurde eine hinsichtlich der Zellzahl definierte Keimbelastung durch Inokulieren mit Vorkulturen von *Staphylococcus aureus* (gram-positiv), *E. coli* (gram-negativ) und *C. albicans* (Hefe) erreicht. Aus den kontaminierten Formulierungen wurden zu den jeweiligen Inkuba-

tionszeitpunkten Aliquots entnommen, verdünnt, auf Nährmedien ausplattiert und die Koloniebildenden Einheiten ausgezählt. Ein Konservierungsmittel ist umso wirksamer, je kürzer der Zeitraum bis zur signifikanten Reduktion der Keimzahl ist. Die Bakterienkeimzahl sollte nach sieben Tagen, die Hefekeimzahl nach 14 Tagen mindestens um zwei Zehnerpotenzen herabgesetzt sein.

Die Testung erfolgte auf den nach DIN 58940 standardisierten Referenzmedien. Abbildung 19 illustriert die antimikrobielle Wirkung der eingesetzten Wirkstoffe als wachstumsfreie Hemmhöfe.

Der Keimbelastungstest dient der Bestimmung der Konservierungswirkung in spezifischen Kosmetik-Formulierungen wie Cremes, Lotionen, Shampoos oder Duschbädern. Die antimikrobielle Wirkung einer Verbindung hängt im erheblichen Maße von der Zusammensetzung der zu konservierenden Formulierung ab. So haben insbesondere pH-Wert und Wassergehalt sowie die Präsenz anderer Naturstoffe einen signifikanten Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität. Um eine vorausschauende Aussage über die Einsatzmöglichkeiten für antimikrobiell wirksame Amide treffen zu können, wurden ausgewählte Amide in unterschiedliche Testformulierungen im Rahmen der Keimbelastungstests eingebracht.

Getestet wurde die antimikrobielle Wirkung der Amide in folgenden Formulierungen: Shampoo, Kinder-Duschbad, Lotion, Ringelblumen-Handcreme.

Getestet wurden folgende Amide:

- Ölsäure-*N*-Benzylamid
- *N*-(4-Benzoesäure)ölsäureamid
- Zimtsäure-*N*-Benzylamid
- Zimtsäure-*N*-Glycinamid
- Zimtsäureamid der Anthranilsäure

Tabelle 14 zeigt die Ergebnisse der Keimbelastungstests unter Verwendung von Ölsäure-*N*-Benzylamid als antimikrobielle Substanz und einer Lotion und eines Shampoos als Testformulierung.

Bereits bei einer Einsatzkonzentration von 0,1% konnte in beiden Formulierungen gemäß Pharmacopoeia eine ausreichende Reduzierung des gram-positiven Keims *S. aureus* erreicht werden. Die potenziell humanpathogene Hefe *C. albicans* sowie der herkömmlich schwer zu inhibierende Schimmelpilz *Aspergillus niger* wurden schon in Gegenwart von 0,1% Ölsäure-*N*-Benzylamid ausreichend inhibiert. Das gram-negative Bakterium *Escherichia coli* konnte bei vergleichsweise niedriger Dosierung des Amids (0,3%) ausreichend inhibiert werden. Aufgrund der hinlänglich bekannten Tatsache, dass gram-negative Bakterien resistenter gegen membranaktive antimikrobielle Wirkstoffe sind, werden aktuell Versuche zur Optimierung der Wirkung gegen diese Organismengruppe durchgeführt. Es konnte bereits in ersten Ansätzen gezeigt werden, dass ein Zusatz ausgewählter „Verstärker“ eine signifikante Reduzierung der erforderlichen Einsatzkonzentration bewirkt. Daher kann Formulierungs-übergreifend von einer notwendigen Dosierung des Amids zwischen 0,1 und 0,3% ausgegangen werden.

**Tabelle 14:** Antibakterielle and antifungale Aktivität des Ölsäure-N-Benzylamids, exemplarisch in einer Shampoo-Formulierung (Hauptkomponenten sind Wasser (50%), Ammoniumlaurylsulfat, Laurylglucoside, Polyglyceryl-6-dicaprat und hydrolysierte Proteine) und in einer Lotion-Formulierung (aus Wasser (75%), Cetylstearylalcohol, Paraffin. subliqu., Vaseline. alb. und hydrolysierten Proteinen). Der Keimbelastungstest wurde in Anlehnung an die Europäische Pharmacopoeia 4, 5.1.3 mit geringen Modifikationen durchgeführt. Aus den kontaminierten Formulierungen wurden zu den jeweiligen Inkubationszeitpunkten Aliquots entnommen, verdünnt, auf Nährmedien ausplattiert und die Kolonie-bildenden Einheiten ausgezählt.

<b>Keimbelastungstest: Shampoo, pH 6,5</b>		<b>Kolonie-bildende Einheiten, Zeit (Tage)</b>				
<b>Organismus</b>	<b>Konservierung<sup>1</sup></b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>28</b>
<i>Escherichia coli</i>	keine	1.5 x 10 <sup>6</sup>	8.3 x 10 <sup>5</sup>	2.7 x 10 <sup>5</sup>	9.7 x 10 <sup>4</sup>	7.1 x 10 <sup>4</sup>
	0.1 % Ölsäure-N-Benzylamid	2.1 x 10 <sup>6</sup>	1.9 x 10 <sup>4</sup>	1300	400	< 10
	0.3 % Ölsäure-N-Benzylamid	1.6 x 10 <sup>6</sup>	2500	210	< 10	< 10
<i>Staphylococcus aureus</i>	keine	8.7 x 10 <sup>5</sup>	3.4 x 10 <sup>5</sup>	8.5 x 10 <sup>4</sup>	7.0 x 10 <sup>4</sup>	9800
	0.1 % Ölsäure-N-Benzylamid	4.1 x 10 <sup>6</sup>	2200	185	< 10	< 10
	0.3 % Ölsäure-N-Benzylamid	2.4 x 10 <sup>6</sup>	500	< 10	< 10	< 10
<i>Candida albicans</i>	keine	7.3 x 10 <sup>5</sup>	2.1 x 10 <sup>5</sup>	1.9 x 10 <sup>5</sup>	8.0 x 10 <sup>4</sup>	7.3 x 10 <sup>4</sup>
	0.1 % Ölsäure-N-Benzylamid	3.8 x 10 <sup>6</sup>	8500	300	< 10	< 10
	0.3 % Ölsäure-N-Benzylamid	9.6 x 10 <sup>5</sup>	280	< 10	< 10	< 10
<i>Aspergillus niger</i>	keine	6.6 x 10 <sup>5</sup>	3.0 x 10 <sup>5</sup>	4.9 x 10 <sup>4</sup>	6.1 x 10 <sup>4</sup>	2.1 x 10 <sup>4</sup>
	0.1 % Ölsäure-N-Benzylamid	7.1 x 10 <sup>5</sup>	6.9 x 10 <sup>4</sup>	2920	34	< 10
	0.3 % Ölsäure-N-Benzylamid	8.1 x 10 <sup>5</sup>	6100	48	< 10	< 10

<b>Keimbelastungstest: Lotion, pH 5,5</b>		<b>Kolonie-bildende Einheiten, Zeit (Tage)</b>				
<b>Organismus</b>	<b>Konservierung<sup>1</sup></b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>28</b>
<i>Escherichia coli</i>	keine	5.2 x 10 <sup>6</sup>	1.4 x 10 <sup>6</sup>	7.3 x 10 <sup>5</sup>	1.8 x 10 <sup>6</sup>	7.8 x 10 <sup>5</sup>
	0.1 % Ölsäure-N-Benzylamid	1.1 x 10 <sup>6</sup>	1.9 x 10 <sup>5</sup>	8800	990	< 10
	0.3 % Ölsäure-N-Benzylamid	2.9 x 10 <sup>6</sup>	5.9 x 10 <sup>4</sup>	910	185	< 10
<i>Staphylococcus aureus</i>	keine	2.4 x 10 <sup>6</sup>	1.6 x 10 <sup>6</sup>	2.1 x 10 <sup>6</sup>	6.2 x 10 <sup>5</sup>	4.8 x 10 <sup>5</sup>
	0.1 % Ölsäure-N-Benzylamid	3.1 x 10 <sup>6</sup>	5.9 x 10 <sup>4</sup>	2300	525	< 10
	0.3 % Ölsäure-N-Benzylamid	4.6 x 10 <sup>6</sup>	3500	420	< 10	< 10
<i>Candida albicans</i>	keine	6.3 x 10 <sup>6</sup>	9.7 x 10 <sup>6</sup>	5.1 x 10 <sup>6</sup>	5.4 x 10 <sup>6</sup>	2.2 x 10 <sup>6</sup>
	0.1 % Ölsäure-N-Benzylamid	4.1 x 10 <sup>6</sup>	2.9 x 10 <sup>4</sup>	2040	890	< 10
	0.3 % Ölsäure-N-Benzylamid	2.6 x 10 <sup>6</sup>	5500	210	< 10	< 10
<i>Aspergillus niger</i>	keine	3.9 x 10 <sup>5</sup>	8.2 x 10 <sup>5</sup>	6.9 x 10 <sup>4</sup>	2.2 x 10 <sup>4</sup>	4.1 x 10 <sup>4</sup>
	0.1 % Ölsäure-N-Benzylamid	4.2 x 10 <sup>5</sup>	6.2 x 10 <sup>4</sup>	1200	130	< 10
	0.3 % Ölsäure-N-Benzylamid	5.4 x 10 <sup>5</sup>	1.9 x 10 <sup>4</sup>	280	< 10	< 10

**Tabelle 15:** Antibakterielle and antifungale Aktivität des Zimtsäure-*N*-Glycinamids, exemplarisch in einer Shampoo-Formulierung (Hauptkomponenten sind Wasser (50%), Ammoniumlaurylsulfat, Laurylglucoside, Polyglyceryl-6-dicaprat und hydrolysierte Proteine) und in einer Lotion-Formulierung (aus Wasser (75%), Cetylstearylalcohol, Paraffin. subliqu., Vaseline. alb. und hydrolysierten Proteinen). Der Keimbelastungstest wurde in Anlehnung an die Europäische Pharmacopoeia 4, 5.1.3 mit geringen Modifikationen durchgeführt. Aus den kontaminierten Formulierungen wurden zu den jeweiligen Inkubationszeitpunkten Aliquots entnommen, verdünnt, auf Nährmedien ausplattiert und die Kolonie-bildenden Einheiten ausgezählt.

<b>Keimbelastungstest: Lotion, pH 5,5</b>		<b>Kolonie-bildende Einheiten, Zeit (Tage)</b>				
Organismus	Konservierung <sup>1</sup>	0	2	7	14	28
<i>Escherichia coli</i>	keine	6.2 x 10 <sup>6</sup>	5.4 x 10 <sup>6</sup>	8.8 x 10 <sup>5</sup>	9.6 x 10 <sup>5</sup>	8.8 x 10 <sup>5</sup>
	0.1 % Zimtsäure- <i>N</i> -Glycinamid	3.1 x 10 <sup>6</sup>	4.0 x 10 <sup>5</sup>	9200	630	< 10
	0.3 % Zimtsäure- <i>N</i> -Glycinamid	1.3 x 10 <sup>6</sup>	3.9 x 10 <sup>4</sup>	1910	85	< 10
<i>Staphylococcus aureus</i>	keine	3.8 x 10 <sup>6</sup>	2.6 x 10 <sup>6</sup>	1.9 x 10 <sup>6</sup>	8.2 x 10 <sup>5</sup>	3.3 x 10 <sup>5</sup>
	0.1 % Zimtsäure- <i>N</i> -Glycinamid	2.8 x 10 <sup>6</sup>	2.9 x 10 <sup>4</sup>	4300	225	< 10
	0.3 % Zimtsäure- <i>N</i> -Glycinamid	2.6 x 10 <sup>6</sup>	4100	100	< 10	< 10
<i>Candida albicans</i>	keine	3.3 x 10 <sup>6</sup>	9.7 x 10 <sup>5</sup>	1.1 x 10 <sup>6</sup>	1.4 x 10 <sup>6</sup>	1.2 x 10 <sup>6</sup>
	0.1 % Zimtsäure- <i>N</i> -Glycinamid	5.2 x 10 <sup>6</sup>	1.9 x 10 <sup>4</sup>	4040	290	< 10
	0.3 % Zimtsäure- <i>N</i> -Glycinamid	4.6 x 10 <sup>6</sup>	7500	210	< 10	< 10
<i>Aspergillus niger</i>	keine	3.9 x 10 <sup>5</sup>	8.2 x 10 <sup>5</sup>	6.9 x 10 <sup>4</sup>	2.2 x 10 <sup>4</sup>	4.1 x 10 <sup>4</sup>
	0.1 % Zimtsäure- <i>N</i> -Glycinamid	4.2 x 10 <sup>5</sup>	1.2 x 10 <sup>4</sup>	970	30	< 10
	0.3 % Zimtsäure- <i>N</i> -Glycinamid	3.8 x 10 <sup>5</sup>	9200	480	< 10	< 10

<b>Keimbelastungstest: Shampoo, pH 6,5</b>		<b>Kolonie-bildende Einheiten, Zeit (Tage)</b>				
Organismus	Konservierung <sup>1</sup>	0	2	7	14	28
<i>Escherichia coli</i>	keine	3.1 x 10 <sup>6</sup>	9.3 x 10 <sup>5</sup>	8.7 x 10 <sup>5</sup>	2.7 x 10 <sup>5</sup>	8.1 x 10 <sup>4</sup>
	0.1 % Zimtsäure- <i>N</i> -Glycinamid	4.1 x 10 <sup>6</sup>	1.9 x 10 <sup>5</sup>	9300	800	< 10
	0.3 % Zimtsäure- <i>N</i> -Glycinamid	1.8 x 10 <sup>6</sup>	6500	910	160	< 10
<i>Staphylococcus aureus</i>	keine	4.7 x 10 <sup>5</sup>	4.4 x 10 <sup>5</sup>	8.5 x 10 <sup>4</sup>	7.0 x 10 <sup>4</sup>	9800
	0.1 % Zimtsäure- <i>N</i> -Glycinamid	6.1 x 10 <sup>6</sup>	2200	185	< 10	< 10
	0.3 % Zimtsäure- <i>N</i> -Glycinamid	3.3 x 10 <sup>6</sup>	950	< 10	< 10	< 10
<i>Candida albicans</i>	keine	9.3 x 10 <sup>5</sup>	4.1 x 10 <sup>5</sup>	4.9 x 10 <sup>5</sup>	9.0 x 10 <sup>4</sup>	6.3 x 10 <sup>4</sup>
	0.1 % Zimtsäure- <i>N</i> -Glycinamid	3.8 x 10 <sup>6</sup>	9260	700	< 10	< 10
	0.3 % Zimtsäure- <i>N</i> -Glycinamid	2.6 x 10 <sup>5</sup>	780	< 10	< 10	< 10
<i>Aspergillus niger</i>	keine	5.6 x 10 <sup>5</sup>	2.0 x 10 <sup>5</sup>	4.0 x 10 <sup>4</sup>	8.1 x 10 <sup>4</sup>	4.1 x 10 <sup>4</sup>
	0.1 % Zimtsäure- <i>N</i> -Glycinamid	7.6 x 10 <sup>5</sup>	2.3 x 10 <sup>4</sup>	6920	434	< 10
	0.3 % Zimtsäure- <i>N</i> -Glycinamid	5.1 x 10 <sup>5</sup>	8500	590	< 10	< 10

**Tabelle 16:** Antibakterielle and antifungale Aktivität des Zimtsäureamids der Anthranilsäure, exemplarisch in einer Shampoo-Formulierung (Hauptkomponenten sind Wasser (50%), Ammoniumlaurylsulfat, Laurylglucoside, Polyglyceryl-6-dicaprat und hydrolysierte Proteine) und in einer Lotion-Formulierung (aus Wasser (75%), Cetylstearylalcohol, Paraffin. subliqu., Vaseline. alb. und hydrolysierten Proteinen). Der Keimbelastungstest wurde in Anlehnung an die Europäische Pharmacopoeia 4, 5.1.3 mit geringen Modifikationen durchgeführt. Aus den kontaminierten Formulierungen wurden zu den jeweiligen Inkubationszeitpunkten Aliquots entnommen, verdünnt, auf Nährmedien ausplattiert und die Kolonie-bildenden Einheiten ausgezählt.

<b>Keimbelastungstest: Lotion, pH 5,5</b>		<b>Kolonie-bildende Einheiten, Zeit (Tage)</b>				
Organismus	Konservierung <sup>1</sup>	0	2	7	14	28
<i>Escherichia coli</i>	keine	6.2 x 10 <sup>6</sup>	3.4 x 10 <sup>6</sup>	8.3 x 10 <sup>5</sup>	8.8 x 10 <sup>5</sup>	1.8 x 10 <sup>5</sup>
	0.2 % Zimtsäure-Anthranilsäureamid	7.1 x 10 <sup>5</sup>	1.2 x 10 <sup>5</sup>	3800	490	< 10
	0.4 % Zimtsäure-Anthranilsäureamid	1.9 x 10 <sup>6</sup>	1.9 x 10 <sup>4</sup>	810	85	< 10
<i>Staphylococcus aureus</i>	keine	3.4 x 10 <sup>6</sup>	2.6 x 10 <sup>6</sup>	2.4 x 10 <sup>6</sup>	8.2 x 10 <sup>5</sup>	8.8 x 10 <sup>5</sup>
	0.1 % Zimtsäure-Anthranilsäureamid	2.1 x 10 <sup>5</sup>	1.9 x 10 <sup>5</sup>	2600	225	< 10
	0.3 % Zimtsäure-Anthranilsäureamid	1.6 x 10 <sup>6</sup>	7500	320	< 10	< 10
<i>Candida albicans</i>	keine	2.3 x 10 <sup>6</sup>	1.7 x 10 <sup>6</sup>	3.1 x 10 <sup>6</sup>	1.4 x 10 <sup>6</sup>	8.2 x 10 <sup>5</sup>
	0.1 % Zimtsäure-Anthranils.-amid	1.1 x 10 <sup>6</sup>	2.9 x 10 <sup>4</sup>	3800	300	< 10
	0.3 % Zimtsäure-Anthranils.-amid	3.2 x 10 <sup>6</sup>	9500	160	< 10	< 10
<i>Aspergillus niger</i>	keine	6.9 x 10 <sup>5</sup>	8.2 x 10 <sup>5</sup>	4.0 x 10 <sup>4</sup>	1.2 x 10 <sup>4</sup>	1.1 x 10 <sup>4</sup>
	0.1 % Zimtsäure-Anthranilsäureamid	7.2 x 10 <sup>5</sup>	8.2 x 10 <sup>4</sup>	1200	130	< 10
	0.3 % Zimtsäure-Anthranilsäureamid	4.4 x 10 <sup>5</sup>	1.3 x 10 <sup>4</sup>	410	< 10	< 10

<b>Keimbelastungstest: Shampoo, pH 6,5</b>		<b>Kolonie-bildende Einheiten, Zeit (Tage)</b>				
Organismus	Konservierung <sup>1</sup>	0	2	7	14	28
<i>Escherichia coli</i>	keine	9.5 x 10 <sup>5</sup>	8.0 x 10 <sup>5</sup>	3.7 x 10 <sup>5</sup>	8.3 x 10 <sup>4</sup>	1.1 x 10 <sup>5</sup>
	0.1 % Zimtsäure-Anthranilsäureamid	3.1 x 10 <sup>6</sup>	6.2 x 10 <sup>4</sup>	7300	530	< 10
	0.3 % Zimtsäure-Anthranilsäureamid	2.6 x 10 <sup>6</sup>	6800	825	< 10	< 10
<i>Staphylococcus aureus</i>	keine	7.2 x 10 <sup>5</sup>	9.4 x 10 <sup>5</sup>	8.5 x 10 <sup>4</sup>	7.9 x 10 <sup>4</sup>	1.3 x 10 <sup>4</sup>
	0.1 % Zimtsäure-Anthranilsäureamid	4.1 x 10 <sup>6</sup>	8.8 x 10 <sup>4</sup>	3480	125	< 10
	0.3 % Zimtsäure-Anthranilsäureamid	9.0 x 10 <sup>5</sup>	5200	120	< 10	< 10
<i>Candida albicans</i>	keine	1.3 x 10 <sup>6</sup>	6.1 x 10 <sup>5</sup>	6.9 x 10 <sup>5</sup>	1.6 x 10 <sup>5</sup>	6.3 x 10 <sup>4</sup>
	0.1 % Zimtsäure-Anthranils.-amid	1.8 x 10 <sup>6</sup>	1.3 x 10 <sup>4</sup>	3150	< 10	< 10
	0.3 % Zimtsäure-Anthranils.-amid	8.6 x 10 <sup>5</sup>	980	< 10	< 10	< 10
<i>Aspergillus niger</i>	keine	7.0 x 10 <sup>5</sup>	2.4 x 10 <sup>5</sup>	2.4 x 10 <sup>4</sup>	4.1 x 10 <sup>4</sup>	1.9 x 10 <sup>4</sup>
	0.1 % Zimtsäure-Anthranilsäureamid	6.6 x 10 <sup>5</sup>	4.0 x 10 <sup>4</sup>	1600	20	< 10
	0.3 % Zimtsäure-Anthranilsäureamid	7.7 x 10 <sup>5</sup>	1.3 x 10 <sup>4</sup>	100	< 10	< 10



Eine natürliche, sowohl gegen gram-positive und gram-negative Bakterien als auch gegen Hefen und Schimmelpilze wirksame Verbindung steht gegenwärtig der Kosmetikindustrie nicht zur Verfügung. Angesichts der extrem niedrigen notwendigen Dosierung (0,1 – 0,3%) übertrifft das Einsatzpotenzial für Ölsäure-*N*-Benzylamid, Zimtsäure-*N*-Glycinamid und das Zimtsäureamid der Anthranilsäure die zu Projektbeginn formulierten Erwartungen erheblich.

#### 4.2.5. Durchführung erster enzymatischer Modellsynthesen

In einem ersten Ansatz wurden Lipase-katalysierte Synthesen zweier Fettsäureamide durchgeführt. Als Aminokomponente wurde Dimethanolamin, als Acyldonor Laurinsäure und Ölsäure eingesetzt. Unter Verwendung der *Candida antarctica* Lipase B (CAL-B), 100 mM Fettsäure und 250 mM Dimethanolamin in Acetonitril konnte prinzipiell die Amid-Syntheseaktivität des Enzyms ermittelt werden. Die erzielten Amid-Produktausbeuten lagen jedoch für das Ölsäureamid < 25% und für das Laurinsäureamid < 40%. Vergleichbare Umsätze wurden für das Novozym 435 auch bei Verwendung von Diethanolamin als Aminokomponente beschrieben (15). CAL-B ist bereits seit geraumer Zeit als gegenüber Amiden aktives Enzym bekannt (16).

Aufgrund der Insolvenz der Firma Riecks im Oktober 2008 stehen leider keine weiteren Daten über die dort durchgeführten Arbeiten zur Verfügung.

## 5. Ökonomische und ökologische Betrachtungen des Projekts

### 5.1. Grundlegende Betrachtungen

Steigender Wettbewerb und gleichzeitig wachsende Anforderungen hinsichtlich eines produktionsintegrierten Umweltschutzes erfordern auf dem Sektor neuer Kosmetikwirkstoffe die Entwicklung nachhaltiger Produktionsverfahren. Dies gilt insbesondere im Bereich der Naturkosmetik, da die Rohstoff-Richtlinien der entsprechenden Berufsverbände (BDIH, Ecocert) neben dem natürlichen Charakter der Produkte auch die umwelt- und Ressourcenschonende Herstellung vorschreiben. Neben extraktiven Methoden zur Rohstoffgewinnung werden enzymatische und mikrobielle Verfahren zur Bereitstellung natürlicher Rohstoffe ausdrücklich gewünscht.

### 5.2. Vergleich mit alternativen Verfahren

Die Darstellung ausreichender Quantitäten an biogenen Amiden kann prinzipiell auf folgende Arten geschehen:

#### a.) Extraktion biogener Amide aus Pflanzen

Viele pflanzliche Wirkstoffe werden in Kosmetika in Form wässriger, ethanolischer oder pulverförmiger getrockneter Extrakte eingesetzt. Biogene Amide wurden ebenfalls in diversen Pflanzen detektiert. Als Beispiele seien hier die Capsaicine oder die Piperine sowie Diacetylenisobutylamide in Sonnenhut-Pflanzenarten genannt. Im Gegensatz zu anderen in kosmetischen Formulierungen eingesetzten Wirkstoffen, wie beispielsweise Monoterpene oder Flavonoide, kommen biogene Amide jedoch nur in Spuren in Pflanzen vor. Beispielsweise sei auf eine Untersuchung des Diacetylenisobutylamidgehalts in sechs Sonnenhutarten verwiesen. Die als an biogenen Amiden besonders reich geltende Sonnenhutart *Echinacea angustifolia*

wies einen Gesamtgehalt an Diacetylenisobutylamiden von 1 g pro kg Pflanzenwurzel auf. Die Extraktion biogener Amide ist aufgrund des geringen Vorkommens in Pflanzen (meist < 0,1%) wirtschaftlich nicht darstellbar.

#### b.) Chemische Synthese biogener Amide

Die chemische Synthese einfacher Amide (z.B. Cocamid) der langkettigen Fettsäuren erfolgt ausgehend von den natürlichen Rohstoffen (Kokosfett, Olivenöl, Leinöl) unter Zufuhr von Ammoniak bei hohen Temperaturen von 150°C über einen Zeitraum von 12 - 24 Stunden. Die Amide der kurzkettigen Amine (Dimethylamin, Diethylamin etc.) werden unter vergleichbar drastischen Bedingungen ausgehend von den aktivierten Acylhalogeniden gewonnen. Hierzu müssen die entsprechenden Fettsäuren zunächst durch Umsetzung mit beispielsweise Thionylchlorid aktiviert werden, was eine erhebliche Belastung durch Rückstände von Sulfid, halogenierten Zwischenprodukten sowie großen Salzfrachten verursacht. Problematisch, und hauptsächlich Ursache für die geringe Verfügbarkeit von komplexeren Amid-Enzymen, ist die chemische Synthese im Falle von difunktionellen Reaktanden, beispielsweise von Hydroxyfettsäuren oder Hydroxyaminen, da hier meist Dehydratisierungs- oder Eliminierungsreaktionen einen erheblichen Beitrag zu Produktverlusten oder Nebenproduktbildung aufweisen.

#### c) Enzymatische Synthese als Inhalt des vorgestellten Projekts

Eine bisher industriell nicht verfügbare Quelle biogener Amide ist die enzymatische Synthese als Kern des vorgestellten Projekts. Hieraus erklärt sich gleichzeitig der innovative Charakter dieses Vorhabens: Die Entwicklung bzw. Anwendung der Amidasen bzw. von Enzymen mit Amidaseaktivität und die damit mögliche biokatalytische Synthese der biogenen Amide – ausgehend von nachwachsenden Rohstoffen – stellt also einen vollkommen neuen Zugang zu diesen Produkten dar.

Im Vergleich zur chemischen Synthese birgt die enzymatische Herstellung biogener Amide zahlreiche ökologische und ökonomische Vorteile:

- a. Die Acyl-Reaktionskomponenten sind weltweit in Form natürlicher Fettsäuren verfügbar und stellen günstige Ausgangsverbindungen dar.
- b. Im Gegensatz zur chemischen Synthese ist mit dem geplanten enzymatischen Verfahren ein umweltgerechter und nachhaltiger Bioprozess unter sehr milden Edukt- und Produkt-schonenden Reaktionsbedingungen möglich.
- c. Durch die Substitution chemischer Verfahren ist mit einer erheblichen Ressourcenschonung, insbesondere einer Senkung des Energieverbrauchs, einer Vermeidung von durch Säure- und Laugeneinsatz hervorgerufene Salzfrachten und einer verminderten Umweltbelastung durch Einsparungen in der Aufarbeitung, beispielsweise durch Verzicht auf Bleicherden, zu rechnen.
- d. Das vorgesehene Syntheseverfahren soll in Folge der milden Reaktionsbedingungen zu verglichen mit der chemischen Methode reineren und folglich toxikologisch unbedenklichen Produkten führen.
- e. Dank der geplanten enzymatischen Umsetzung bleibt der natürliche Charakter (vorteilhafte Kennzeichnung „natürlich“) erhalten.

### 5.3. Ökologische Vorteile in Folge des Projekts

Die ökologischen Vorteile in Folge einer enzymatischen Synthese von Fettsäure- oder Phenolsäureamiden bestehen insbesondere:

1. In der Etablierung eines neuen Bioprozesses der unter verglichen mit chemischen Amidierungen signifikant milderen Reaktionsbedingungen (insbesondere niedrigere Temperaturen) abläuft.
2. In der potenziellen Nutzung nachwachsender Rohstoffe (Fettsäuren) zur Darstellung hochwertiger natürlicher Kosmetikwirkstoffe.
3. In der Herstellung zahlreicher Phenolsäure-Derivate mit antimikrobiellen, antiinflammatorischen oder UV-absorbierenden Eigenschaften unter Nutzung einer Reaktionstechnik.
4. In der Substitution existierender Konservierungsmittel (halogenorganische Verbindungen, Formaldehydabspalter) durch ausgewählte Zielprodukte mit antibakteriellen und antifungalen Eigenschaften.

Eine quantitative ökologische Bewertung der Prozesse erfordert ein Prozessmodell, welches auf den tatsächlichen Stoff- und Energieströmen basiert. Die Abschätzung der ökologischen Vorteile des Einsatzes von Biokatalysatoren in einem industriellen Umfeld konnten bereits beispielhaft für die Synthese des (S)-1-Methoxy-2-propanol im Rahmen eines von der DBU geförderten Projekts (AZ13062) verdeutlicht werden. In diesem von beiden Projektpartnern erfolgreich bearbeiteten Vorhaben wurden im Rahmen der ökologischen und ökonomischen Evaluierung die im enzymatischen Prozess eingesetzten Ressourcen mit denen eines konventionellen Syntheseprozesses zur Herstellung eines vergleichbaren Moleküls in gleicher Menge aufgezeigt. Es konnte gezeigt werden, dass enzymatische Synthesen mit entsprechender Gestaltung der Randbedingungen und Einsatz geeigneter Technologien ein erhebliches Einsparungspotential - sowohl hinsichtlich des Kühlwasser- und Energieeinsatzes als auch der zu entsorgenden Abwasser- und Abfallmengen – darstellen.

Es ist davon auszugehen, dass die hier zugrunde gelegten Überlegungen prinzipiell auch für den Einsatz der in diesem Vorhaben zu untersuchenden Amidasen gelten.

## 6. Zusammenfassung der Ergebnisse

Leider musste der Kooperationspartner Dr. Rieks GmbH im Oktober 2008 Insolvenz anmelden, so dass von dieser Seite her keinerlei Daten mehr zur Verfügung gestellt wurden, die vorliegenden Daten lagen bereits im zum Zeitpunkt des Zwischenberichts vor.

Das Ziel der enzymatischen Herstellung biogener Amide wurde nicht in zufrieden stellendem Maße erreicht. Ein Hochdurchsatz-Assay konnte etabliert werden, ebenso wie die Analytik mittels GC und HPLC. Während einige Enzyme mittelmäßige hydrolytische Aktivität aufwiesen, waren die erzielten Umsätze in der Synthesereaktion leider sehr gering. Nach der Insolvenz des Kooperationspartner Dr. Rieks GmbH rückte dieses Ziel in den Hintergrund, die Arbeit konzentrierte sich auf die Charakterisierung der *Bottleneck* Mutanten und die Stützung der praktischen Ergebnisse durch Computer-Docking Versuche.

Erfolgreich war die Etablierung einer Methode zur fokussierten gerichteten Evolution. Die Methode (genannt "One-pot, Simple Methodology for Cassette Randomization and Recombination for Focused Directed Evolution", kurz OSCARR) wurde erfolgreich auf ein Modellenzym angewendet, um zunächst die Kettenlängenspezifität zu verändern. Die mit diesem Verfahren gefundene Mutation enthüllte einen Hotspot am Eingang zum aktiven Zentrum ("Bottleneck"). Durch rationales Proteindesign konnten weitere Mutanten erstellt werden, die sich in ihren Eigenschaften (Kettenlängenspezifität, Substratspezifität, Enantioselektivität) vom Wildtyp deutlich unterscheiden, so entstanden z.B. Mutanten, die hundertfach aktiver gegenüber *p*-Nitrophenylpalmitat sind als der Wildtyp, und die 1-Phenyl-1-propylacetat, 1-Phenyl-2-propylacetat und 1-Phenylethylacetat selektiver umsetzen. Durch computergestütztes Docking konnten die Ergebnisse untermauert werden. Durch die herkömmliche Methode der epPCR konnte bei einem Screening einer vergleichbar großen Bibliothek kein Klon mit veränderter Kettenlängenspezifität gefunden werden, unter anderem, da die wichtigen Regionen GC-reich und somit für Mutagenese durch epPCR schwer zugänglich waren. Diese Ergebnisse konnten zum Teil bereits publiziert werden, ein weiteres Manuskript befindet sich in Vorbereitung.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die *Pseudomonas fluorescens* Esterase I Amidaseaktivität besitzt, ein Schnelltest deutet darauf hin, dass sie das industriell interessante Vince Lactam stereoselektiv umsetzt.

## 7. Kooperationen im Rahmen des Projekts

Das Projekt war von Beginn an sowohl durch den intensiven Austausch der Ergebnisse zwischen allen Projektpartnern als auch die produktionsorientierte Vorgehensweise geprägt.

In der anfänglichen Projektphase fanden dementsprechend einige Treffen der Projektpartner Dr. Rieks GmbH und Universität Greifswald statt. Durch die Insolvenz der Firma Rieks konnte die Kooperation leider nicht fortgesetzt werden.

### 1. Projekttreffen

Datum: 03.09.2006  
Zeit: 18:00 Uhr bis 21:00 Uhr  
Ort: Biocat2006, Technische Universität Hamburg-Harburg  
Teilnehmer: Dr. D. Böttcher, Dr. M. Schmidt (Universität Greifswald);  
Dr. A. Rieks, Dr. M. Kähler (beide Dr. Rieks GmbH)  
Themen: Planung des experimentellen Vorgehens

### 2. Projekttreffen

Datum: 23.02.2007  
Zeit: 12:30 Uhr bis 14:00 Uhr  
Ort: TUTech GmbH und Silo 15, Hamburg-Harburg  
Teilnehmer: Prof. U. T. Bornscheuer (Univ. Greifswald); Dr. M. Kähler (Dr. Rieks GmbH)  
Themen: Präsentation erster Ergebnisse (Substratsynthese, Analytik) und neuer projektrelevanter Assay-Techniken, Planung des weiteren experimentellen Vorgehens.

### 3. Projekttreffen

Datum: 13.09.2007  
Zeit: 10:00 Uhr bis 14:00 Uhr  
Ort: Universität Greifswald  
Teilnehmer: Prof. Dr. U. T. Bornscheuer, A. Schließmann (Universität Greifswald);  
Dr. M. Kähler, Dr. U. Kirchner (Dr. Rieks GmbH)  
Themen: Präsentation aktueller Ergebnisse (Substratsynthese, Analytik, Proteindesign) und neuer projektrelevanter Assay-Techniken, Planung des weiteren experimentellen Vorgehens und dieses Berichtes.

## 8. Teilnahme an Projekt-relevanten Veranstaltungen

Die Synthese natürlicher Kosmetikwirkstoffe ist hinsichtlich sowohl neuer wissenschaftlicher Kenntnisse als auch ökonomischer Gesichtspunkte von großer Dynamik bestimmt. Um diesem Umstand Rechnung zu tragen, wurden in der zurückliegenden Projektphase von den Partnern eine Reihe von Tagungen und Messen besucht:

DECHEMA-Tagung: From  $\mu\text{l}$  to  $\text{m}^3$  – Strategies in Bioprocess Development

„Development and production of cosmetic actives: requirements and biotechnological solutions“

Ort: TU Hamburg-Harburg

Datum: 28. - 29.03.2006

Teilnehmer: Dr. Markus Kähler (Vortragender)

BIEM-Workshop: Zukunftsperspektiven der weissen Biotechnologie

„Zukünftige Produkt- und Marktanforderungen an ein Unternehmen aus der Kosmetikindustrie“

Ort: Potsdam-Hermannswerder (Veranstalter: BIEM, Universität Potsdam)

Datum: 06. – 07.07.2006

Teilnehmer: Dr. Markus Kähler (Vortragender)

Workshop on Directed Protein Evolution

Ort: Bremen

Datum: 30.07. – 1.08.2006

Teilnehmer: Dr. Aurelio Hidalgo

Protein Design and Evolution for Biocatalysis

Ort: Greifswald

Datum: 30.08. – 1.09.2006

Teilnehmer: Prof. U.T. Bornscheuer, Dr. Aurelio Hidalgo

Biofach

Ort: Messe Nürnberg

Datum: 17.02.2007

Teilnehmer: Dr. André Rieks

IIR Fachforum: Wirkkosmetik für die Haut – Innovative Naturstoffe

Ort: Kempinski Hotel Atlantik, Hamburg

Datum: 06.-07.02.2007

Organisator: Dr. Markus Kähler

in-cosmetics

Datum: 17. – 19.04.2007

Ort: Messe Paris

Teilnehmer: Dr. Ulrike Kirchner, Dr. Markus Kähler, Dr. André Rieks

Biotechnica

Datum: 10.10.2007

Ort: Messe Hannover

Teilnehmer: Dr. Dominique Böttcher (Universität Greifswald), Dr. Markus Kähler

Biocat 2008

Datum: 31.8. – 4.9. 2008

Ort: TU Hamburg

Teilnehmer: Prof. U.T. Bornscheuer, Dr. Aurelio Hidalgo, Anna Schließmann

Poster: Removing the bottleneck of *Pseudomonas fluorescens* esterase I by focused directed evolution and rational design (Hidalgo *et al.*)

A one-pot, simple methodology for cassette randomization and recombination for focused directed evolution (OSCARR) (Schließmann *et al.*)

## 9. Zitierte Literatur und Veröffentlichungen im Rahmen des Projekts

1. Dimberg, L.H., Theander, O. and Lingnert, H. (1993) Avenanthramides - A group of phenolic antioxidants in oats. *Cereal Chem.*, **70**.
2. Spiegelhalder, B. and Preussmann, R. (1984) Contamination of toiletries and cosmetic products with volatile and nonvolatile *N*-nitroso carcinogens. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **108**, 160-163.
3. Henke, E. and Bornscheuer, U.T. (2003) Fluorophoric assay for the high-throughput determination of amidase activity. *Anal. Chem.*, **75**, 255-260.
4. [Schmidt, G. \(2006\) Diplomarbeit, Universität Greifswald.](#)
5. Ishihara, A., Ohtsu, Y. and Iwamura, H. (1999) Biosynthesis of oat avenanthramide phytoalexins. *Phytochemistry*, **50**, 237-242.
6. Smith, M.A., Weaver, V.B., Young, D.M. and Ornston, L.N. (2003) Genes for chlorogenate and hydroxycinnamate catabolism (*hca*) are linked to functionally related genes in the *dca-pca-qui-pob-hca* chromosomal cluster of *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 524-532.
7. Kammann, M., Laufs, J., Schell, J. and Gronenborn, B. (1989) Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction (PCR). *Nucleic Acids Res.*, **17**, 5404.
8. Ke, S.H. and Madison, E.L. (1997) Rapid and efficient site-directed mutagenesis by single-tube 'megaprimer' PCR method. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3371-3372.
9. Hermes, J.D., Parekh, S.M., Blacklow, S.C., Koster, H. and Knowles, J.R. (1989) A reliable method for random mutagenesis: the generation of mutant libraries using spiked oligodeoxyribonucleotide primers. *Gene*, **84**, 143-151.
10. [Schliessmann, A. \(2007\) Diplomarbeit, Universität Greifswald.](#)
11. [Hidalgo, A., Schliessmann, A., Molina, R., Hermoso, J. and Bornscheuer, U.T. \(2008\) A one-pot, simple methodology for cassette randomisation and recombination for focused directed evolution. \*Protein Eng. Des. Sel.\*, \*\*21\*\*, 567-576.](#)
12. Bordes, F., Cambon, E., Dossat-Létisse, V., André, I., Croux, C., Nicaud, J.M. and Marty, A. (2009) Improvement of *Yarrowia lipolytica* lipase enantioselectivity by using mutagenesis targeted to the substrate binding site. *ChemBioChem*, **10**, 1705-1713.
13. Guieysse, D., Salagnad, C., Monsan, P., Remaud-Simeon, M. and Tran, V. (2003) Towards a novel explanation of *Pseudomonas cepacia* lipase enantioselectivity via molecular modelling of the enantiomer trajectory into the active site. *Tetrahedron: Asymmetry*, **14**, 1807-1817.
14. Line, K., Isupov, M.N. and Littlechild, J.A. (2004) The crystal structure of a (-) gamma-lactamase from an Aureobacterium species reveals a tetrahedral intermediate in the active site. *J. Mol. Biol.*, **338**, 519-532.
15. Liu, K.J., Nag, A. and Shaw, J.F. (2001) Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid diethanolamides. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 5761-5764.
16. Wagegg, T., Enzelberger, M.M., Bornscheuer, U.T. and Schmid, R.D. (1998) The use of methoxy acetoxy esters significantly enhances reaction rates in the lipase-catalyzed preparation of enantiopure 1-(4-chloro phenyl) ethyl amines. *J. Biotechnol.*, **61**, 75-78.