

Abschlussbericht

**Produktion und erstmaliger Einsatz von β -Aminopeptidasen
zur umweltfreundlichen Biosynthese von β -Peptiden als
Intermediate für die Herstellung innovativer Pharmaka**

AZ 13176

Dr. Birgit Geueke, Dr. Hans-Peter E. Kohler, Dipl.-Biol. Tobias Heck
Eidgenössische Anstalt für Wasserversorgung und Gewässerschutz (Eawag)
CH-8600 Dübendorf

Dr. Lars M. Blank, Prof. Dr. A. Schmid,
Dipl.-Biotechnol. Jochen Lutz, M.Sc. Jan Heyland
Technische Universität Dortmund
Fachbereich Bio- und Chemieingenieurwesen
Lehrstuhl Biotechnik
D-44227 Dortmund

Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger, Dr. Frank Rosenau, Dipl.-Biol. Viola Fuchs
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Institut für Molekulare Enzymtechnologie am FZ Jülich
D-52426 Jülich

Prof. Dr. Karl-Heinz Wiesmüller, Dr. Renate Spohn
EMC microcollections GmbH
D-72070 Tübingen

Projektbeginn: 1. September 2006

Laufzeit: 28 Monate

Dübendorf

2009

Projektkennblatt
der
Deutschen Bundesstiftung Umwelt



Az	13176	Referat	32	Fördersumme	502.891,00 €
----	--------------	---------	-----------	-------------	---------------------

Antragstitel **Förderschwerpunkt Biotechnologie: ChemBioTec: Produktion und erstmaliger Einsatz von beta-Amino-peptidasen zur umweltfreundlichen Biosynthese von beta-Peptiden als Intermediate für die Herstellung innovativer Pharmaka**

Stichworte Schwerpunkt-Biotechnologie
Expression, Gesundheit, Mikrobiologie, Produkt, Umweltchemikalien, Verfahren

Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)
28 Monate	1. September 2006	31. Dezember 2008	1

Zwischenberichte nach 13 Monaten:
30. September 2007

Bewilligungsempfänger	Technische Universität Dortmund	Tel	0231-755-7380
	Fachbereich Bio- und Chemieingenieurwesen	Fax	0231-755-7382
	Lehrstuhl Biotechnik	Projektleitung	
	Emil-Figge-Str. 66	Prof. Dr. A. Schmid	
	44221 Dortmund	Bearbeiter	
		Dr. Lars Blank	

Kooperationspartner

- Eidgenössische Anstalt für Wasserversorgung und Gewässerschutz (Eawag), CH-8600 Dübendorf
- Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Institut für Molekulare Enzymtechnologie am FZ Jülich, 52426 Jülich
- EMC microcollections GmbH, 72070 Tübingen

Zielsetzung und Anlass des Vorhabens

Ziel dieses Projekts ist die Entwicklung einer Technologieplattform zur enzymatischen Synthese von β -Peptiden und β/α -Peptiden. Diese Substanzen werden seit einem Jahrzehnt intensiv erforscht, da sie ein hohes Potential bei der Entwicklung neuer Pharmazeutika aufweisen.

In unserem Vorhaben werden wir zuerst die biokatalytische Herstellung von Carnosin untersuchen. Carnosin ist ein natürliches Peptid bestehend aus einer β - und einer α -Aminosäure, das zur Nahrungsergänzung, als Anti-Aging-Mittel und zur Stabilisierung der Magenschleimhäute verkauft wird. Die empfohlene Tagesdosis für Carnosin liegt bei einem Gramm und kostet rund 2 €. Momentan wird diese Substanz chemisch unter Einsatz aggressiver Reagenzien und Lösungsmittel hergestellt.

Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

Uns stehen mehrere Enzyme zur Verfügung, die die Synthese von β -Peptiden und β/α -Peptiden katalysieren.

Im beschriebenen Projekt werden wir die biotechnologische Herstellung dieser Enzyme optimieren (Etablierung eines geeigneten Überexpressionssystems; Optimierung der Fermentation und der Aufarbeitung), die Aktivität und Stabilität der Enzyme mittels genetischer Methoden optimieren und einen Prozess für die Carnosinsynthese etablieren. Die aus diesen Arbeiten erhaltenen Daten werden die Grundlage bilden, um mit dem gleichen oder einem nur leicht abgewandelten Verfahren weitere β -Peptide herstellen zu können.

Während der einzelnen Arbeitsschritte soll die Umweltverträglichkeit evaluiert werden, um schon während der Prozessentwicklung ökologische Aspekte zu integrieren. Dabei werden verschiedene Softwarelösungen angewandt und die Ergebnisse mit organisch-chemischen Prozessen verglichen.

Ergebnisse und Diskussion

Ziel des Projekts war die Etablierung eines Verfahrens zur biokatalytischen Synthese von Carnosin und weiteren β -aminosäurehaltigen Peptiden. Zu Beginn wurde die Reaktion, die durch β -Aminosäurepeptidasen katalysiert wird, charakterisiert und die Verfügbarkeit der Enzyme durch verbesserte Expression und eine einfache Aufreinigung gewährleistet. Die β -Aminopeptidasen 3-2W4 BapA und DmpA konnten während der gesamten Projektlaufzeit von der TU Dortmund (technisch rein) und der Eawag (hochaufgereinigt) bezogen werden. Die Expression dieser zwei Enzyme wurde durch neue Expressionssysteme deutlich gesteigert. Die Strategien, die zur Expressionsoptimierung angewandt wurden, führten zu einer Auswahl rekombinanter Stämme mit hohen bis sehr hohen intrazellulären Expressionsniveaus (bis zu 15% vom Gesamtprotein in *Pseudomonas putida*). Für DmpA wurde zusätzlich ein *Pichia pastoris* Stamm entwickelt, der das Enzym extrazellulär exprimiert und somit möglicherweise die Enzymaufarbeitung erspart.

Die Synthesereaktion von Carnosin wurde hinsichtlich ihrer biochemischen und kinetischen Eigenschaften ausführlich untersucht und eine Analytik etabliert, die sämtliche Nebenprodukte erfasst. Es konnte gezeigt werden, dass der pH-Wert eine entscheidende Rolle spielt, um das Verhältnis von Carnosinhydrolyse und -synthese zu optimieren. Nebenproduktbildung kann verhindert werden, wenn der Acylakzeptor Histidin als Methylester bei pH 8 eingesetzt wird. Die zwei untersuchten Enzyme unterscheiden sich deutlich hinsichtlich ihrer Aktivitäten und der möglichen Reaktionsausbeuten. Während DmpA hohe spezifische Aktivitäten aufweist, sind die Carnosinausbeuten geringer als bei 3-2W4 BapA.

Es wurden eine Vielzahl verschiedener Verfahren zur Reaktionsoptimierung untersucht. Wichtig war, eine schnelle Abtrennung von Enzym und Reaktionslösung zu gewährleisten, damit die Reaktion beim Maximum der Carnosinkonzentration gestoppt werden kann. Bei Versuchen zur Immobilisierung der Enzyme wurden diese leider inaktiviert. Jedoch erwiesen sich repeated-batch Verfahren mit gelöstem DmpA als auch Ganzzell-Umsetzungen mit rekombinanten *E. coli* Stämmen als sehr erfolgreich. So wurde in einem repeated-batch Versuch 2,2 g Carnosin aus β -Alaninamid und Histidin synthetisiert. Zur Aufreinigung wurde ein zweistufiges Fällungsverfahren entwickelt, bei dem zuerst Histidin mit Ethanol und dann Carnosin mit Zinkhydroxid aus der Reaktionslösung gefällt werden konnte.

Da die Substratspezifitäten von 3-2W4 BapA und DmpA hinsichtlich der Synthese gut untersucht wurden, kann ein ähnliches Verfahren auch auf die Synthese anderer kleiner, β -aminosäurehaltiger Peptide übertragen werden.

Verschiedene Szenarien wurden mit Hilfe von drei Softwarelösungen (EATOS, Sabento, e!Sankey plus Excel) modelliert und hinsichtlich ihrer Ökoeffizienz untersucht. Das enzymkatalysierte Verfahren wurde einmal in der Frühphase mit Sabento evaluiert und mit zwei chemischen Verfahren verglichen. Die daraus erhaltenen Ergebnissen wurden genutzt, um ein optimiertes Verfahren zu erstellen, das anschließend mit e!Sankey evaluiert wurde. Diese Untersuchungen zeigten, dass vor allem die Massenströme und die hohen Histidinüberschüsse ein ökologisches wie auch ökonomisches Problem darstellen können, wenn kein Substratrecycling durchgeführt werden soll. Die Enzymproduktion spielt hingegen eine untergeordnete Rolle, vor allem wenn ein Recycling des Enzyms gewährleistet sein wird.

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

Die Ergebnisse aus diesem Projekt sind bisher in einer wissenschaftlichen Veröffentlichung (Heck et al. 2007 Chem Biodiv) und auf mehreren Tagungen durch Vorträge und Poster publiziert worden. Eine Reihe weiterer Publikationen ist in der Bearbeitung und wird voraussichtlich in den nächsten Monaten in Fachzeitschriften veröffentlicht werden.

Fazit

Im Rahmen dieses Projekts konnte am Beispiel des Carnosins ein Verfahren zur enzymatischen Synthese von β -aminosäurehaltigen Peptiden entwickelt werden. Die Ergebnisse liefern eine sehr solide Basis für eine Prozessentwicklung zur Carnosinsynthese. Durch die parallele Bearbeitung verschiedener Arbeitspakete können nun problemlos verschiedene Strategien miteinander kombiniert und auch einfach bewertet werden. So kann z.B. in Abhängigkeit von der apparativen Ausstattung die β -Aminopeptidase DmpA extrazellulär exprimiert und ohne Aufreinigung für die Carnosinsynthese eingesetzt werden. Alternativ kann auch ein *E. coli* Ganzzellsystem benutzt werden, das ebenfalls aufwändige Proteinreinigungsschritte überflüssig macht und die Abtrennung von Produkt und Katalysator sehr vereinfacht. Alle vorstellbaren Szenarien können aufgrund der guten Vorarbeiten zur Umweltevaluation des Prozesses mit verschiedenen Softwarelösungen durchgespielt und bewertet werden. Auch die Übertragung dieser Ergebnisse auf genau spezifizierte kleine Peptide, die β -Aminosäuren enthalten, scheint problemlos möglich zu sein.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Anlass und Zielsetzung des Projekts	3
3	Darstellung der Arbeitsschritte und angewandten Methoden	5
3.1	Hinweise zur Nomenklatur von β -Aminosäuren	5
3.2	Kultivierung der rekombinanten Stämme	5
3.3	Enzymaufreinigung	5
3.4	Herstellung und Analyse der Substrate	6
3.5	Synthesereaktionen mit gelöstem Enzym	6
3.6	Ganzzellbiokatalyse	6
3.7	Analytik	7
3.8	Zielgerichtete Mutagenese des <i>bapA</i> Gens	8
3.9	Aufreinigung des Carnosins	8
3.10	Evaluation	9
4	Ergebnisse und wissenschaftliche Diskussion	10
4.1	Herstellung von Rumpfsequenzen (EMC)	10
4.2	Herstellung von Referenzverbindungen (EMC)	12
4.3	Herstellung der β -Aminopeptidasen (TU Dortmund)	14
4.4	Klonierung und Expression der β -Aminopeptidasen in heterologen Systemen (TU Dortmund und Uni Düsseldorf)	17
4.5	Charakterisierung des rekombinanten <i>P. pastoris</i> Stammes (TU Dortmund)	31
4.6	Synthesepotential der β -Aminopeptidasen (Eawag)	33
4.7	Bereitstellung von Verbindungen für ein robustes Hochdurchsatz-Screening für β -Aminopeptidasen (EMC)	37
4.8	Enzymatische Einführung von β -Aminosäuren in Leitstrukturen für die Immuntherapie (EMC)	38
4.9	Reaktionsoptimierung der enzymatischen Carnosinsynthese (Eawag und TU Dortmund)	38
4.10	Verwendung von Ganzen Zellen zur Synthese von Carnosin (TU Dortmund)	48
4.11	Up-Scaling der Carnosinsynthese (TU Dortmund)	59
4.12	Carnosinaufreinigung (TU Dortmund und EMC)	69
4.13	Umwelt-Evaluation (TU Dortmund und Eawag)	76
5	Diskussion	99
5.1	Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit dem Projektantrag	99
5.2	Kooperationen innerhalb des Projekts	101
6	Öffentlichkeitsarbeit	102
6.1	Publikationen in Fachzeitschriften und geplante Publikationen	102
6.2	Vorträge und Poster	102

6.3	Patentanmeldung	103
6.4	Präsenz im Internet	103
6.5	Diplom-, Studien- und Masterarbeiten	103
7	Fazit.....	105
8	Literaturangaben.....	106
9	Anlagen / Anhang	108
9.1	Kooperationsvertrag	109
9.2	Tagungsbeiträge.....	116
9.3	Patentanmeldung	120
9.4	Ergänzende Angaben zur Umweltevaluation (siehe 4.13).....	140

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:.....	8
Tabelle 2:.....	14
Tabelle 3:.....	16
Tabelle 4:.....	17
Tabelle 5:.....	19
Tabelle 6:.....	26
Tabelle 7:.....	28
Tabelle 8:.....	29
Tabelle 9:.....	30
Tabelle 10:.....	31
Tabelle 11:.....	32
Tabelle 12:.....	39
Tabelle 13:.....	42
Tabelle 14:.....	49
Tabelle 15:.....	50
Tabelle 16:.....	61
Tabelle 17:.....	69
Tabelle 18:.....	70
Tabelle 19:.....	71
Tabelle 20:.....	75
Tabelle 21:.....	77
Tabelle 22:.....	78
Tabelle 23:.....	86
Tabelle 24:.....	92
Tabelle 25:.....	99
Tabelle 26:.....	100

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:.....	10
Abbildung 2:.....	11
Abbildung 3:.....	12
Abbildung 4:.....	12
Abbildung 5:.....	13
Abbildung 6:.....	13
Abbildung 7:.....	14
Abbildung 8:.....	15
Abbildung 9:.....	16
Abbildung 10:.....	20
Abbildung 11:.....	21
Abbildung 12:.....	22
Abbildung 13:.....	23
Abbildung 14:.....	25
Abbildung 15:.....	27
Abbildung 16:.....	29
Abbildung 17:.....	33
Abbildung 18:.....	35
Abbildung 19:.....	39
Abbildung 20:.....	40
Abbildung 21:.....	41

Abbildung 22:.....	43
Abbildung 23:.....	44
Abbildung 24:.....	45
Abbildung 25:.....	45
Abbildung 26:.....	46
Abbildung 27:.....	47
Abbildung 28:.....	51
Abbildung 29:.....	51
Abbildung 30:.....	52
Abbildung 31:.....	53
Abbildung 32:.....	53
Abbildung 33:.....	54
Abbildung 34:.....	55
Abbildung 35:.....	56
Abbildung 36:.....	57
Abbildung 37:.....	58
Abbildung 38:.....	58
Abbildung 39:.....	61
Abbildung 40:.....	62
Abbildung 41:.....	63
Abbildung 42:.....	64
Abbildung 43:.....	64
Abbildung 44:.....	65
Abbildung 45:.....	66
Abbildung 46:.....	67
Abbildung 47:.....	68
Abbildung 48:.....	68
Abbildung 49:.....	72
Abbildung 50:.....	73
Abbildung 51:.....	73
Abbildung 52:.....	74
Abbildung 53:.....	74
Abbildung 54:.....	75
Abbildung 55:.....	82
Abbildung 56:.....	82
Abbildung 57:.....	83
Abbildung 58:.....	85
Abbildung 59:.....	88
Abbildung 60:.....	89
Abbildung 61:.....	93
Abbildung 62:.....	94
Abbildung 63:.....	95

Abkürzungen

3-2W4 BapA	β -Aminopeptidase aus <i>Sphingosinicella xenopeptidilytica</i> 3-2W4
cdw	Zelltrockengewicht
DABS-Cl	Dimethylaminoazobenzenesulphonylchlorid
DmpA	β -Aminopeptidase aus <i>Ochrobactrum anthropi</i>
ESI	Elektrospray Ionisierung
G.R.A.S.	Generally Regarded As Safe
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
MS	Massenspektrometrie
-pNA	-p-Nitroanilid
SDS	Natriumdodecylsulfat
Y2 BapA	β -Aminopeptidase aus <i>S. microcystinivorans</i> Y2
β Ala	β -Alanin
β hGly	β -Homoglycin

Mikroorganismen

Escherichia coli
Ochrobactrum anthropi
Pichia pastoris
Pseudomonas putida
Saccharomyces cerevisiae
Sphingosinicella microcystinivorans Y2
Sphingosinicella xenopeptidilytica 3-2W4

1 Zusammenfassung

Ziel des Projekts war die Etablierung eines Verfahrens zur biokatalytischen Synthese von Carnosin und weiteren β -aminosäurehaltigen Peptiden. Zu Beginn wurde die Reaktion, die durch β -Aminosäurepeptidasen katalysiert wird, charakterisiert und die Verfügbarkeit der Enzyme durch verbesserte Expression und eine einfache Aufreinigung gewährleistet. Die β -Aminopeptidasen 3-2W4 BapA und DmpA konnten während der gesamten Projektlaufzeit von der TU Dortmund (technisch rein) und der Eawag (hochaufgereinigt) bezogen werden. Die Expression dieser zwei Enzyme wurde durch neue Expressionssysteme deutlich gesteigert. Die Strategien, die zur Expressionsoptimierung angewandt wurden, führten zu einer Auswahl rekombinanter Stämme mit hohen bis sehr hohen intrazellulären Expressionsniveaus (bis zu 15% vom Gesamtprotein in *Pseudomonas putida*). Für DmpA wurde zusätzlich ein *Pichia pastoris* Stamm entwickelt, der das Enzym extrazellulär exprimiert und somit möglicherweise die Enzymaufarbeitung erspart.

Die Synthesereaktion von Carnosin wurde hinsichtlich ihrer biochemischen und kinetischen Eigenschaften ausführlich untersucht und eine Analytik etabliert, die sämtliche Nebenprodukte erfasst. Es konnte gezeigt werden, dass der pH-Wert eine entscheidende Rolle spielt, um das Verhältnis von Carnosinhydrolyse und -synthese zu optimieren. Nebenproduktbildung kann verhindert werden, wenn der Acylakzeptor Histidin als Methylester bei pH 8 eingesetzt wird. Die zwei untersuchten Enzyme unterscheiden sich deutlich hinsichtlich ihrer Aktivitäten und der möglichen Reaktionsausbeuten. Während DmpA hohe spezifische Aktivitäten aufweist, sind die Carnosinausbeuten geringer als bei 3-2W4 BapA.

Es wurde eine Vielzahl verschiedener Verfahren zur Reaktionsoptimierung untersucht. Wichtig war, eine schnelle Abtrennung von Enzym und Reaktionslösung zu gewährleisten, damit die Reaktion beim Maximum der Carnosinkonzentration gestoppt werden kann. Bei Versuchen zur Immobilisierung der Enzyme wurden diese leider inaktiviert. Jedoch erwiesen sich repeated-batch Verfahren mit gelöstem DmpA als auch Ganzzell-Umsetzungen mit rekombinanten *E. coli* Stämmen als sehr erfolgreich. So wurde in einem repeated-batch Versuch 2,2 g Carnosin aus β -Alaninamid und Histidin synthetisiert. Zur Aufreinigung wurde ein zweistufiges Fällungsverfahren entwickelt, bei dem zuerst Histidin mit Ethanol und dann Carnosin mit Zinkhydroxid aus der Reaktionslösung gefällt werden konnte.

Da die Substratspezifitäten von 3-2W4 BapA und DmpA hinsichtlich der Synthese gut untersucht wurden, kann ein ähnliches Verfahren auch auf die Synthese anderer kleiner, β -aminosäurehaltiger Peptide übertragen werden.

Verschiedene Szenarien wurden mit Hilfe von drei Softwarelösungen (EATOS, Sabento, e!Sankey plus Excel) modelliert und hinsichtlich ihrer Ökoeffizienz untersucht. Das enzymkatalysierte Verfahren wurde einmal in der Frühphase mit Sabento evaluiert und mit zwei chemischen Verfahren verglichen. Die daraus erhaltenen Ergebnissen wurden genutzt, um ein optimiertes Verfahren zu erstellen, das anschließend mit e!Sankey evaluiert wurde. Diese Untersuchungen zeigten, dass vor allem die Massenströme und die hohen Histidinüberschüsse ein ökologisches wie auch ökonomisches Problem darstellen können, wenn kein Substratrecycling durchgeführt werden soll. Die Enzymproduktion spielt hingegen eine untergeordnete Rolle, vor allem wenn ein Recycling des Enzyms gewährleistet sein wird.

2 Anlass und Zielsetzung des Projekts

Ziel des Projektes war die Entwicklung eines umweltfreundlichen biokatalytischen Syntheseverfahrens für das Dipeptid Carnosin auf der Basis bakterieller β -Aminopeptidasen, die seit wenigen Jahren bekannt sind (Geueke und Kohler 2007).

Viele Studien belegen eine positive Wirkung von Carnosin auf die menschliche Gesundheit. Diese Substanz wirkt antioxidierend, antiglykosylierend, metallchelierend, verhindert die Zellalterung und verlangsamt die Entwicklung von grauem Star (Hipkiss 2008). Aktuelle Studien belegen auch den Einfluss von Carnosin auf den Glucosemetabolismus bei Typ-2 Diabetikern (Sauerhöfer et al. 2007). Momentan wird Carnosin sowohl als freies Dipeptid als auch komplexiert mit Zink zur Nahrungsergänzung verkauft. Der Carnosin-Zink-Komplex wirkt stabilisierend auf die Magenschleimhäute und sorgt außerdem für eine gleichmäßige Versorgung mit Zink. Die empfohlene Tagesdosis für das freie Dipeptid liegt bei mindestens einem Gramm, für die komplexierte Form bei 75 mg. Der Konsum von Carnosin wird voraussichtlich deutlich zunehmen, da die medizinische Bedeutung momentan noch stark unterschätzt wird.

Die Erkenntnisse aus dem Projekt sollen anschließend für die Implementierung nachhaltiger ökologischer Herstellungsverfahren für weitere β -aminosäurehaltige Peptide verallgemeinert werden. Aufgrund ihrer hohen metabolischen Stabilität und der Fähigkeit, stabile Sekundärstrukturen einzunehmen, bilden β -Peptide interessante Ausgangssubstanzen für die Entwicklung neuer Pharmazeutika und Peptidmimetika. β -Peptide und gemischte α/β -Peptide besitzen beispielsweise antimikrobielle Wirkung, binden an Somatostatinrezeptoren (> Behandlung von Darmkrebs und Wachstumsstörungen), inhibieren die HIV-Replikation und die p53-hDM2-Interaktion (> Bekämpfung verschiedener Tumorarten).

Die Synthese von β -Peptiden und gemischten β/α -Peptiden war zu Projektbeginn noch nicht optimiert und β -Peptide sind kaum kommerziell erhältlich. Für Carnosin hingegen existieren chemische Herstellungsverfahren, da die N-terminale, nicht-chirale Aminosäure β -Homoglycin alternative Synthesewege zulässt.

Aufgrund der guten Verfügbarkeit der Carnosinbausteine Histidin und β -Homoglycinamid und der kommerziellen Nachfrage nach Carnosin haben wir diesen Prozess als Modell ausgewählt, um die biokatalytische Synthese zu etablieren und optimieren. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse lassen sich nach der Charakterisierung der β -Aminopeptidasen auch auf andere β -aminosäurehaltige Dipeptide übertragen. Da chemische Verfahren für die Carnosinsynthese aus der Patentliteratur bekannt sind, kann der biokatalytische Prozess nicht nur einzeln unter Aspekten der Ökoeffizienz

evaluiert werden, sondern auch direkt mit den klassischen chemischen Verfahren verglichen werden.

3 Darstellung der Arbeitsschritte und angewandten Methoden

3.1 Hinweise zur Nomenklatur von β -Aminosäuren

Eine der wenigen natürlich vorkommenden β -Aminosäuren ist β -Alanin. β -Alanin ist der traditionelle Name, entspricht aber nicht der von Seebach et al. empfohlenen systematischen Nomenklatur für β -Aminosäuren, denn hiernach wird die Substanz mit β -Homoglycin bezeichnet (Seebach et al. 2004). Aufgrund der verschiedenen Verfasser dieses Berichts, werden aber beide Namen benutzt.

3.2 Kultivierung der rekombinanten Stämme

Zur Herstellung der Enzyme DmpA und 3-2W4 BapA wurden rekombinante *E. coli* Stämme in Minimalmedium (Heck et al. 2006) in 2 Liter Fermentern (KLF; Bioengineering, Wald, Schweiz) bei pH 7.4 und 37°C im Fed-Batch Verfahren überexprimiert. Nach Erreichen einer optischen Dichte von 70 bis 90 wurden die Zellen durch Zugabe von 2 mM IPTG induziert und 4 h später per Zentrifugation abgeerntet und eingefroren.

Kultivierung in Schüttelkolben zur Untersuchung der Überexpression, als auch für die Ganzzellbiokatalyse wurde unter Zugabe des entsprechenden Antibiotikums in LB Komplexmedium durchgeführt. Hochzelldichtefermentationen im Fed-batch Verfahren wurden in 2,5 L Bioreaktoren mit entsprechenden Minimalmedien durchgeführt (Geueke et al. 2006; Hellwig et al. 1999; Sun et al. 2006). Durch eine integrierte Prozesskontrolle wurde ein exponentieller Feed (70% (w/v) Glukose) zur optimierten Zellausbeute gewährleistet. Zur Induktion wurde nach Bedarf 1 mM IPTG verwendet.

3.3 Enzymaufreinigung

160 g Zellfeuchtmasse wurden in einer Kugelmühle zweifach kontinuierlich aufgeschlossen (IMA Disintegrator S, 160 Zellfeuchtmasse 300 ml 50 mM Tris-Puffer, 2.5 mM MgSO₄, 0,5 mM CaCl₂, DNAase, pH 8.0, Verweilzeit > 5 min, 4000 rpm, 2°C, 0.1-0.25 mm Glaskugeln $V_{\text{Glaskugeln}}/V_{\text{Suspension}} = 1.05$), per Zentrifugation (25 min, 10000xg, 4°C) von Zelltrümmern befreit und anschließend auf einer Labomatic Pilotanlage (Labomatic Instruments AG, Allschwil, Schweiz) in einer Streamline 50 Säule (GE, Healthcare, Freiburg) mittels Anionenaustauschchromatographie (Streamline DEAE, 550 ml) zweimal auf die Säule im expandierten Modus (Flussrate 200 cm/h). Die Säule war zu Beginn mit 95/5% Puffer A (50 mM Tris, pH 8.0) und Puffer B (50 mM Tris + 1 M NaCl, pH 8.0) äquilibriert um anschließend mit steigenden Salzgradient das Protein im gepackten Säulenmodus bei 40 ml/min (120 cm/h) zu eluieren. Aktive Fraktionen wurden gepoolt und eingefroren.

3.4 Herstellung und Analyse der Substrate

Die Verbindungen wurden mit mikrochemischen Verfahren in mehrstufigen Synthesen in Lösung und an fester Phase hergestellt, mittels Präzipitation gereinigt und mit HPLC und Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS) analysiert. Die Reinheiten der Verbindungen lagen zwischen 85% und > 95%, die Ausbeuten zwischen 3,1 mg und 50 mg. Alle Produkte und Substrate wurden mit C₁₈-Umkehrphasen-Chromatographie mittels HPLC mit UV-Detektion (GILSON) bzw. HPLC-ESI-MS (Waters, alliance + M3100) oder mit massenspektrometrischen Methoden mittels ESI-MS (FISONS Instruments, VG Quattro II) analysiert. Als Laufmittel wurden bidestilliertes Wasser, Acetonitril und ein Zusatz von Ameisensäure verwendet.

3.5 Synthesereaktionen mit gelöstem Enzym

Eawag: Sofern nicht anderweitig erwähnt, wurden die Synthesereaktionen bei pH 10 in einem rein wässrigen Reaktionsmedium durchgeführt. Die Löslichkeit von *p*-Nitroanilinderivaten wurde durch die Zugabe von 10 bis 30% DMSO erhöht. Der Start der Synthesereaktion erfolgte durch Zugabe der gelösten Enzyme. Nach geeigneten Zeitpunkten wurden dem Reaktionsansatz Proben entnommen, die Reaktion durch die Zugabe von 25% (v/v) 1 M HCl abgestoppt und mittels HPLC analysiert. Histidin- und Carnosinmethylester wurden nach dem Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von NaOH auf pH 13 und fünfminütigem Erhitzen bei 95°C hydrolysiert.

TU Dortmund: Die enzymatischen Syntheserversuche erfolgten je nach Maßstab in 15 oder 50 ml Falcontubes (BD Biosciences, USA) bzw. in der Amicon (Millipore, Billerica, USA) Rührzelle oder im Enzym Membran Reaktor (Bioengineering AG, Wald, Schweiz). Als Standardreaktionsbuffer wurde 100 mM Natriumcarbonatpuffer (pH 10) verwendet und die Reaktionen erfolgten bei Raumtemperatur, 30°C oder 37°C. Die Eduktkonzentrationen variierten je nach Versuch, meist wurde dabei ein molares Verhältnis von Histidin/ β -Alaninamid von 5:1 verwendet. Durch DmpA Zugabe wurden die Reaktionen gestartet.

3.6 Ganzzellbiokatalyse

Ganzzellbiokatalyse wurde nach vierstündiger Überexpression der Produktionsstämme durchgeführt. Die Zellen wurden hierfür mittels Zentrifugation abgeerntet und im Reaktionspuffer resuspendiert. Standardmäßig wurde die Ganzzellbiokatalyse in 100 mM Natriumcarbonat-Puffer bei pH 10 und 30°C bei einer eingesetzten Zellaktivität im Ansatz von 0,05 U/mL (Aktivitätsassay) durchgeführt.

3.7 Analytik

3.7.1 Spektrophotometrischer Standardassay zur Bestimmung der Aktivität von β -Aminopeptidasen

Die enzymatische Aktivität der β -Aminopeptidasen wurde photometrisch mit Hilfe des chromogenen Substrats H- β hGly-*p*NA bestimmt. Dabei wurde die Freisetzung der Abgangsgruppe *p*-Nitroanilin bei einer Wellenlänge von 405 nm und 37°C gemessen ($\epsilon_{405} = 8.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Die Ansätze enthielten 5 mM Substrat und 10% DMSO in einem 50 mM Tris/HCl-Puffer bei pH 8. Die Reaktion wurde durch Zugabe einer geeigneten Menge Enzym gestartet und die Änderung der Absorption über einen Zeitraum von einer Minute verfolgt. Eine enzymatische Einheit (U) wird dabei als diejenige Enzymmenge definiert, die die Bildung von 1 μmol *p*-Nitroanilin pro Minute katalysiert.

3.7.2 HPLC und HPLC-MS-Analytik

Eawag: Alle Substrate und Produkte wurden mittels Reversed Phase-Hochdruckflüssigkeitschromatographie auf einer Dionex HPLC-Anlage bei einer konstanten Flussrate von 1 ml/min analysiert. Freie Peptide wurden mit einem Photodiodenarray-Detektor bei einer Wellenlänge von 205 nm, *p*-Nitroanilinderivate bei 383 nm und *p*-Nitroanilin bei 413 nm detektiert und anhand geeigneter Standardverbindungen quantifiziert. Die Trennung der Substanzen erfolgte auf einer Nucleodur C18 Pyramid-Säule (250 x 4 mm; Macherey-Nagel) in einem Gradienten aus 0.1% Trifluoressigsäure (Puffer A) und Acetonitril (Puffer B). Alle Verbindungen, die aus *p*-Nitroanilinderivaten synthetisiert wurden, wurden in einem Gradienten von 0 bis 60% Puffer B aufgetrennt. Carnosin und Nebenprodukte der Carnosinsynthese aus H- β hGly-NH₂ und Histidin bzw. Histidinmethylester wurden isokratisch in 100% Puffer A aufgetrennt. Alle Produkte der enzymkatalysierten Synthese wurden anhand ihrer Massen auf einer API 4000 LC-Tandem MS-Anlage in Verbindung mit einem Agilent 1100 LC-System identifiziert.

3.7.3 DABS-Cl-Methode

Es wurde eine Derivatisierungsmethode mit Dimethylaminoazobenzene-sulphonylchlorid (DABS-Cl) entwickelt, um möglichst alle Aminosäureedukte und -nebenprodukte der enzymatischen Reaktion erfassen zu können.

Die Probe wurde gemäß Tabelle 1 vorbereitet und für 15 min bei 72°C und 1000 rpm derivatisiert, anschließend für 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand auf einer CC-Nucleosil 100-5 C18 HD Säule (250 mm Länge, 4 mm Durchmesser, Macherey Nagel, Düren, Deutschland) mittels eines Gradientenlaufs über 70 min bei 35°C analysiert und bei 436 nm detektiert.

Tabelle 1:
 Probenaufbereitung für die DABS-Cl Methode

Komponente	Konzentration	Volumen
Probe	ca. 2-6 mM	40 µL
Interner Standard Serin	2 mM	10 µl
Natriumcarbonat pH 8.3	25 mM	200 µl
DABS-Cl	4 mM	100 µl
	Summe	350 µl

3.7.4 GC-MS Analytik

Zur Quantifizierung von ¹³C-Markierungen in proteinogenen Aminosäuren wurde eine GC-MS Analytik verwendet. Hierfür wurde am Ende der Versuche ausreichend Zellmaterial geerntet und für 12 h in 6 M HCl hydrolysiert und anschließend getrocknet. Zur Analyse wurden die Proben derivatisiert und im GC-MS analysiert. Der Anteil an ¹³C-markierten Aminosäuren konnte mittels Verwendung der FiatFlux Software (Zamboni et al. 2005) aus den GC-MS Datensätzen ermittelt werden.

3.8 Zielgerichtete Mutagenese des *bapA* Gens

Für jeden einzelnen Codon-Austausch führt man insgesamt drei PCR-Reaktionen durch. Mit den ersten beiden PCR-Reaktionen der *Overlap-Extension* PCR amplifiziert man jeweils mit einem mutagenen- und einem flankierenden Primer zwei DNA-Fragmente, deren Sequenzen sich teilweise überlappen. Die beiden mutagenen Primer sind jeweils komplementär zueinander. Die eingesetzten flankierenden Primer markieren zusammen mit den mutagenen Primern die Enden der neusynthetisierten Fragmente. Die Enden hybridisieren im Bereich der mutagenen Primer miteinander so, dass die DNA-Polymerase die noch bestehenden Lücken in einer dritten PCR auffüllen kann. Damit die Polymerase die entstandenen Stränge auch vervielfältigt, müssen die beiden flankierenden Primer in den PCR-Ansatz zugegeben werden. Das entstandene PCR-Produkt enthält den gewünschten Codonaustausch. Durch Restriktion und Ligationsansätze wurde das PCR-Produkt in den Vektor pGAPZ α kloniert.

3.9 Aufreinigung des Carnosins

3.9.1 Adsorption

Die Adsorbermaterialien wurden in 5 mL-Einwegspritzen, die am Boden mit einer Fritte verschlossen waren, eingewogen, konditioniert und anschließend mit den wässrigen Modelllösungen beaufschlagt. Die pH-Werte der Lösungen wurden mit einem 0,1 M Phosphat-Citrat- bzw. einem 0,1 M Ammoniak-

Ammoniumchlorid-Puffersystem eingestellt. Nach Inkubation über 36 Stunden unter ständigem Schütteln wurde das Eluat über einen 0,2 µm Spritzenvorsatzfilter abgesaugt. Die Adsorber wurden mit Wasser nachgewaschen und zur Ermittlung der adsorbierten Substanz-Menge für 1 h mit Methanol bzw. Ethanol inkubiert. Die abgesaugten Lösungen wurden lyophilisiert und ausgewogen. Die ermittelte Trockenmasse wurde den Erwartungswerten gegenüber gestellt.

3.9.2 Kristallisation aus übersättigten Lösungen

Zur Kristallisation der verschiedenen Reaktionsteilnehmer wurde den Proben (entweder artifizielle Mischungen oder reale Reaktionsproben in Tris-Puffer mit pH-Werten zwischen 7,6 und 9) absoluter Ethanol hinzugegeben, so dass Ethanolkonzentrationen zwischen 50-90% (v/v) eingestellt hatte. Die übersättigten Lösungen wurden anschließend bei 4°C für mindestens 24 Stunden bei 1400 rpm inkubiert und mittels Zentrifugation abgetrennt.

3.9.3 Zinkhydroxidfällung

Für die Herstellung von Zinkhydroxid wurden zu 500 ml der Zinksulfat-Lösung eine äquimolare Menge (50 mL) NaOH langsam unter Rühren (400 rpm, Raumtemperatur) hinzugegeben. Nach 3 Stunden wurde die Lösung abfiltriert und das Zinkhydroxid gewonnen und mindestens 24 Stunden bei 60°C getrocknet und anschließend gemörsert. Für die Fällung von Carnosin wurde das Pulver direkt in die Reaktionslösung gegeben. Die verwendeten Zinkhydroxid-Konzentrationen variierten zwischen 10 mM und 200 mM. Die Proben wurden bei 400 rpm zwischen 6 und 24 Stunden bei 50 bzw. 60°C inkubiert und abzentrifugiert. Durch eine pH Wert-Absenkung ($\text{pH} < 3$) konnte das Pellet resuspendiert und per HPLC analysiert werden.

3.10 Evaluation

Die Prozessmodelle zur Evaluation sowie die Evaluationen sind im Ergebnisteil bzw. im Anhang näher erläutert.

Weitere Methoden werden, soweit relevant, im Ergebnisteil erwähnt.

4 Ergebnisse und wissenschaftliche Diskussion

4.1 Herstellung von Rumpfsequenzen (EMC)

In der ersten Phase des Projektes wurden Rumpfpeptide (vorzugsweise Tripeptide) aus reinen α -Aminosäuren, aus reinen β -Aminosäuren und aus alternierend vorkommenden α - und β -Aminosäuren hergestellt. Die Sequenzen wurden nach den Prinzipien maximaler chemischer Diversität ausgewählt und decken ein breites Eigenschaftsspektrum kurzkettiger Peptide ab. Einige aus reinen α -Aminosäuren aufgebaute Tripeptide wurden zusätzlich um jeweils eine β -Aminosäure verlängert. EMC besitzt dazu eine Kollektion aus 18 mit geeigneten Schutzgruppen versehenen β^3 -Homoaminosäurebausteinen, die von natürlichen L-Aminosäuren abgeleitet sind (ausgenommen sind β^3 -Homocystein und β^3 -Homohistidin). Somit konnte aus jeweils einem Tripeptid eine Kollektion aus 18 verschiedenen β -Tetrapeptiden erhalten werden. Die Tri- und Tetrapeptide wurden dem Projektpartner Eawag als Rohprodukte mit einer zufriedenstellenden Reinheit von $>70\%$ zur Verfügung gestellt. Damit standen wertvolle, bisher nicht zugängliche Bausteine für die Analyse der Substratspezifität der untersuchten β -Aminopeptidasen zur Verfügung.

AGA	AGV	ALL	ALV	LLL	RFF	RGG	RGF	RFA	VKG	LLV	LLS
LLY	LLD	LLG	LGP	LLE	LLA	LVL	LGH	LGL	IGG	LLH	LLP
YLL	YFR	YGG	YAR	YKT	YSK	YMG	YYG	YYY	VLL	GWV	GWG
GFF	GHA	GMG	GLL	GLhP	PFR	TVL	SSS	FFF	FLL	FVD	KFK
KWK	KKK	MFG	MGD	MAS	MMM	MGG	MAA	MRF	DLL	DYM	HGG
HGH	ILL	ELL	EWE	EYE	QCP	QSP	GHK	GLM	GML	GGP	GGV
GGF	GHG	GHL	GIG	GGD	GGs	GGI	GCitG	GGL	GGE	GGA	PLL
PhPP	LLY	SII	IGL	VGK	EKL	MMA	TKY				

Abbildung 1:
Sequenzen der bereitgestellten Tripeptide.

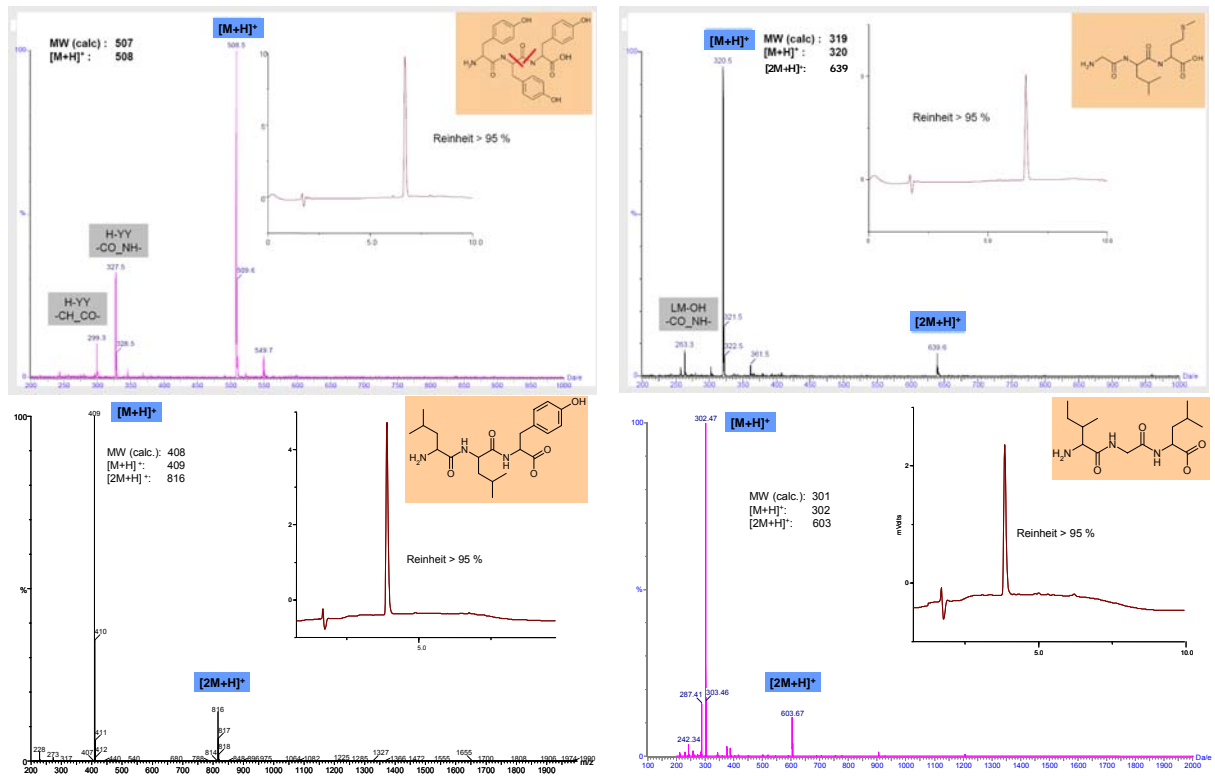


Abbildung 2:
ESI-MS und HPLC-UV-Chromatogramme von YYY, GLM, LLY und IGL.

Für den Einsatz in weitergehenden Studien zur enzymatischen β -Peptidsynthese mussten die Rumpfpeptide bis zur absoluten Homogenität aufgereinigt werden. Diese Aufgabe erforderte umfangreiche Arbeiten zur Optimierung der chromatographischen Trennmethode, da mit den Standard-Trennphasen nur hydrophobe Sequenzen aufgereinigt werden konnten.

Für die rationelle Analyse der in den biokatalytischen Verfahren mit den β -Amino-peptidasen hergestellten Produkte konnten im weiteren Verlauf des Projektes zuverlässige Methoden etabliert werden. Dies gelang mit Hilfe von neu entwickelten HPLC-Trennphasen („Hypercarb“, „Monolith“) verbunden mit einer Optimierung des Gradientenverlaufes.

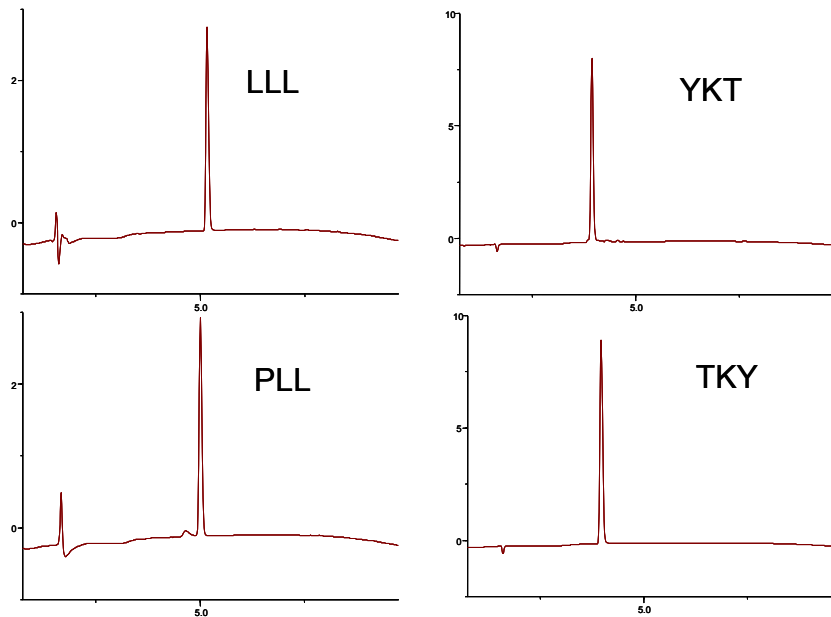


Abbildung 3:
HPLC-UV-Chromatogramme aufgereinigter Tripeptide.

4.2 Herstellung von Referenzverbindungen (EMC)

EMC hat eine große Zahl von Referenzverbindungen synthetisiert, die es den Projektpartnern ermöglichten, das komplette Leistungsspektrum der untersuchten β -Aminopeptidasen zu beschreiben. Hierfür wurden bevorzugt Tripeptide mit jeweils einer von den natürlichen L-Aminosäuren abgeleiteten β -Aminosäure verlängert.

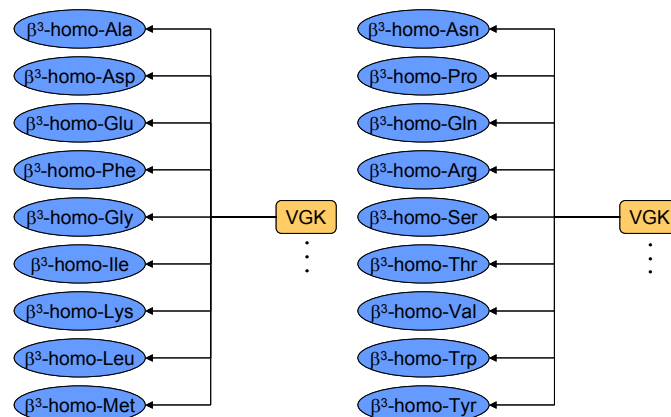


Abbildung 4:
Kopplung eines Tripeptids mit einer Kollektion aus 18 verschiedenen β^3 -Homoamino säuren.

Die Methoden zur Synthese und Aufreinigung dieser Verbindungen wurden durch ein iteratives Verfahren optimiert. Somit konnten die Referenzverbindungen in sehr hoher Reinheit erhalten werden.

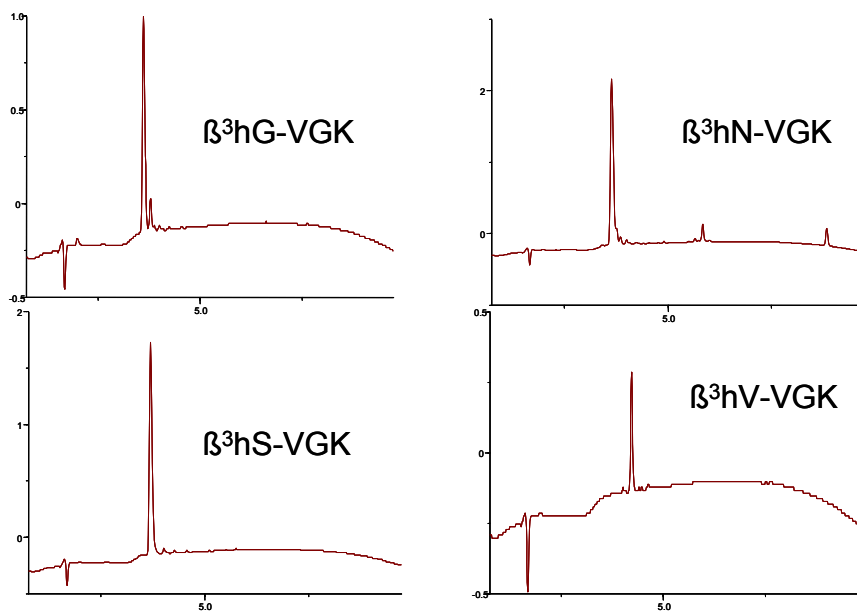


Abbildung 5:
HPLC-UV-Chromatogramme ausgewählter Referenzverbindungen.

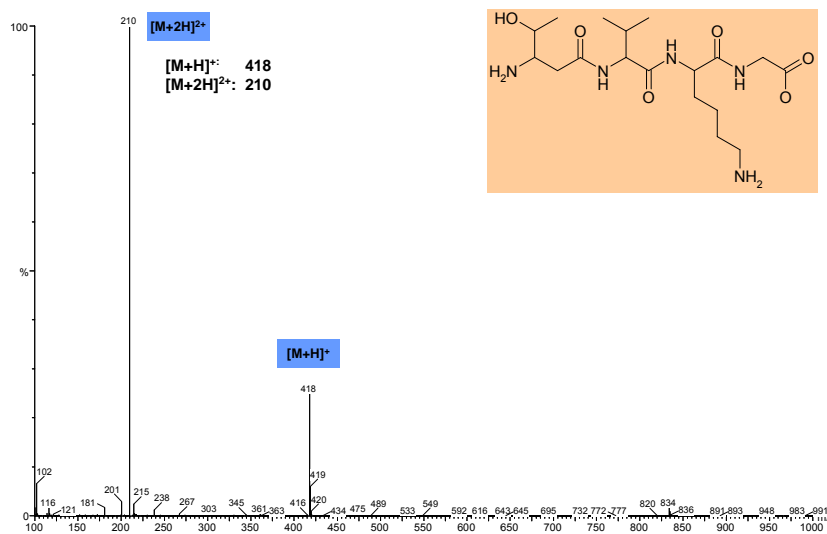


Abbildung 6:
ESI-MS der Referenzverbindung β^3 -Homo-Thr-VKG.

Des Weiteren wurden den Projektpartnern an der TU Dortmund und der Eawag Referenzverbindungen für die Charakterisierung der Lösungen aus der enzymatischen Carnosinsynthese bereitgestellt. Dabei handelt es sich um reinste Substanzen der erwarteten Haupt- und Nebenprodukte (Carnosin sowie Mehrfachkopplungen von β -Alanin- NH_2 und L-Histidin).

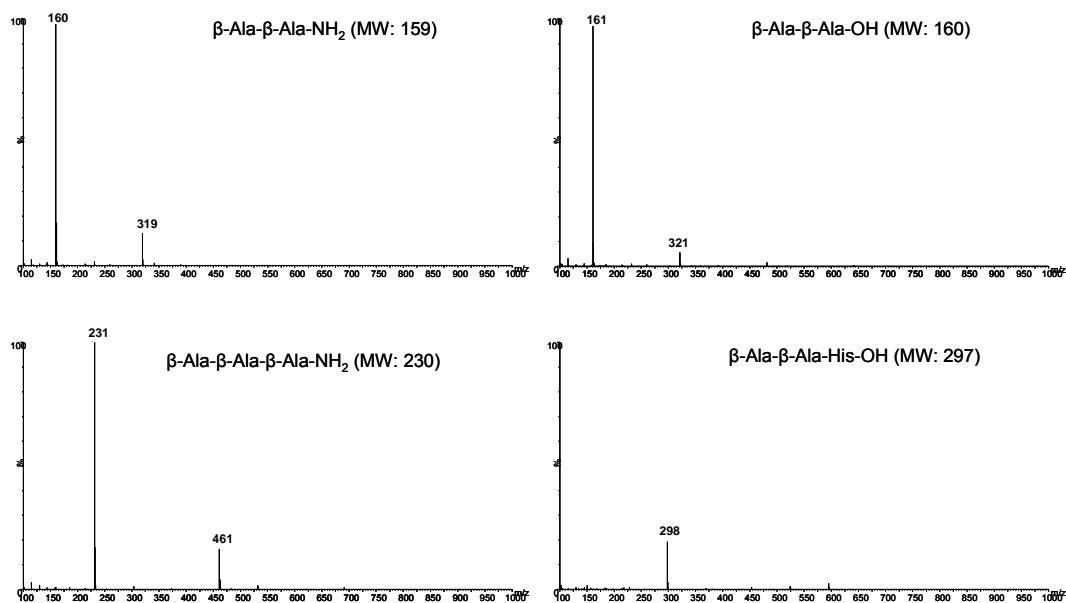


Abbildung 7:
ESI-MS von ausgewählten Nebenprodukten der enzymatischen Carnosinsynthese.

4.3 Herstellung der β -Aminopeptidasen (TU Dortmund)

Vom Projektpartner EAWAG wurden zu Projektbeginn folgende Stämme für die Expression der drei β -Aminopeptidasen bereitgestellt (Tabelle 2).

Tabelle 2:
Expressionsstämme für β -Aminopeptidasen (Stand zu Projektbeginn 09/2006)

<i>Escherichia coli</i> Stamm	Gen	Wildtypstamm	Expressionsplasmid (basierend auf pET3c)
BL21(DE3) pLysS	3-2W4 <i>bapA</i>	<i>Sphingosinicella xenopeptidilytica</i> 3-2W4	p3BapA
BL21(DE3) pLysS	Y2 <i>bapA</i>	<i>Sphingosinicella microcystinivorans</i> Y2	pYBapA
BL21(DE3) pLysS	<i>dmpA</i>	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	pODmpA

Da die zwei β -Aminopeptidasen aus *Sphingosinicella* ähnliche biochemische und strukturelle Eigenschaften aufweisen, 3-2W4 BapA aber eine höhere spezifische Aktivität besitzt, wurde mit Y2 BapA im Rahmen dieses Projekts nicht weitergearbeitet. 3-2W4 BapA und DmpA hingegen unterscheiden sich stark hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften. Vor allem die Carnosinhydrolyse wird von DmpA mit 10 U/mg deutlich besser katalysiert als von 3-2W4 BapA (0,026 U/mg) ((Heck 2006)). Auch die Expression dieser Enzyme in *E. coli* unterscheidet sich sehr voneinander (Abbildung 9). Um die beiden β -Aminopeptidasen besser untersuchen und miteinander vergleichen

zu können, wurden die rekombinanten Stämme im 2 Liter Maßstab fermentiert und die Proteine anschließend soweit aufgereinigt, dass sie für technische Anwendungen einsetzbar waren. Abbildung 8 zeigt dabei die verschiedenen Stufen zur Herstellung des Enzyms DmpA.

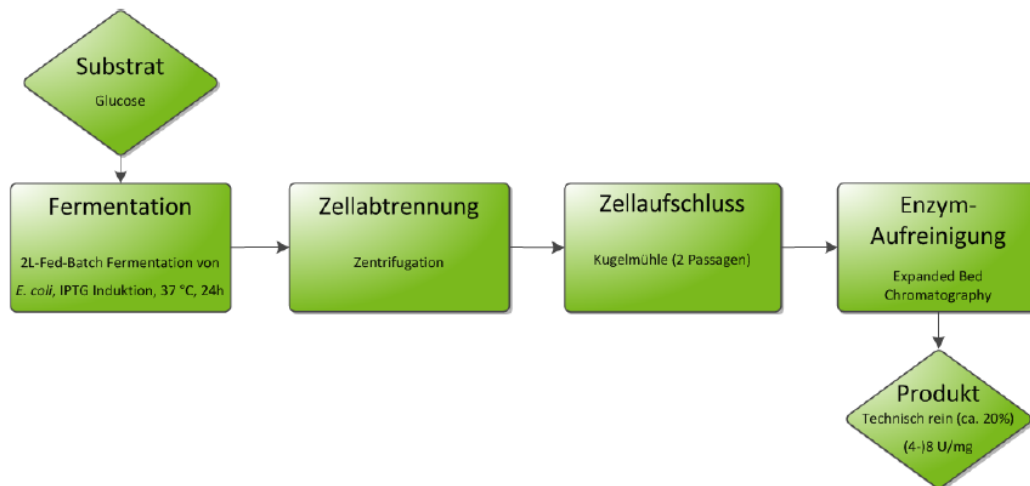


Abbildung 8:
Verfahrensschritte der DmpA-Enzym-Herstellung (= Produkt).

4.3.1 Expression im 2-Liter-Maßstab

Die Überexpression der beiden ausgewählten Enzyme 3-2W4 BapA und DmpA erfolgte im Fed-Batch Verfahren zum Erreichen höherer Zelldichten und nach Induktion mit IPTG. Tabelle 3 listet die sieben durchgeführten Fermentationen und erhaltenen Zellfeuchtmassen auf. Insgesamt konnten so 380 g Zellfeuchtmasse von *E. coli* 3-2W4 BapA und 875 g Zellfeuchtmasse von *E. coli* DmpA als Ausgangsmaterial für nachfolgende Experimente hergestellt werden. Die im Rohextrakt ermittelten spezifischen β -Aminopeptidaseaktivitäten von 0.02 U/mg für 3-2W4 BapA und 4.3 U/mg für DmpA stimmen sehr gut mit den in der Literatur veröffentlichten Werten überein (Geueke et al. 2006; Heck et al. 2006). Hierdurch erwies sich die Zell- und Enzymproduktion für beide Enzyme im 2-Liter Maßstab als ebenso effizient. Die Überexpression von 3-2W4 BapA und DmpA im 2 Liter Maßstab veranschaulichen die zwei SDS-Gele in Abbildung 9. Für 3-2W4 BapA ist keine deutliche Überexpression von 26 und 13 kDa Banden (α - und β -Untereinheit) erkennbar, während DmpA deutliche Banden bei ca. 30 und 16 kDa zeigt (und ebenso unprozessiertes Enzym bei 45 kDa)

Tabelle 3:
Enzymexpression von 3-2W4 BapA und DmpA im 2 L-Maßstab.

Fed-Batch Fermentation	Overexpressed Protein	Final OD450 [-]	Volume l	Cell Wet Weight (cww) g	Specific Activity ** U/mg	Cell Wet Weight per OD and Volume g/l
F-I	3BapA	175	1,5	166	0,018	0,63
F-II	3BapA	156	1,9	214	0,02	0,72
			Sum	380		
F-III	DmpA	179	1,75	147	4,4	0,47
F-IV-a *)	DmpA	219	1,75	216	4,3	0,56
F-IV-b	DmpA	173	1,93	171	n.d.	0,51
F-V-a	DmpA	190	1,95	179	n.d.	0,48
F-V-b	DmpA	220	1,85	162	n.d.	0,40
			Sum	875		

*) F-IV-a showed a more wet pellet

**) Standard Assay with β -Ala-pNA

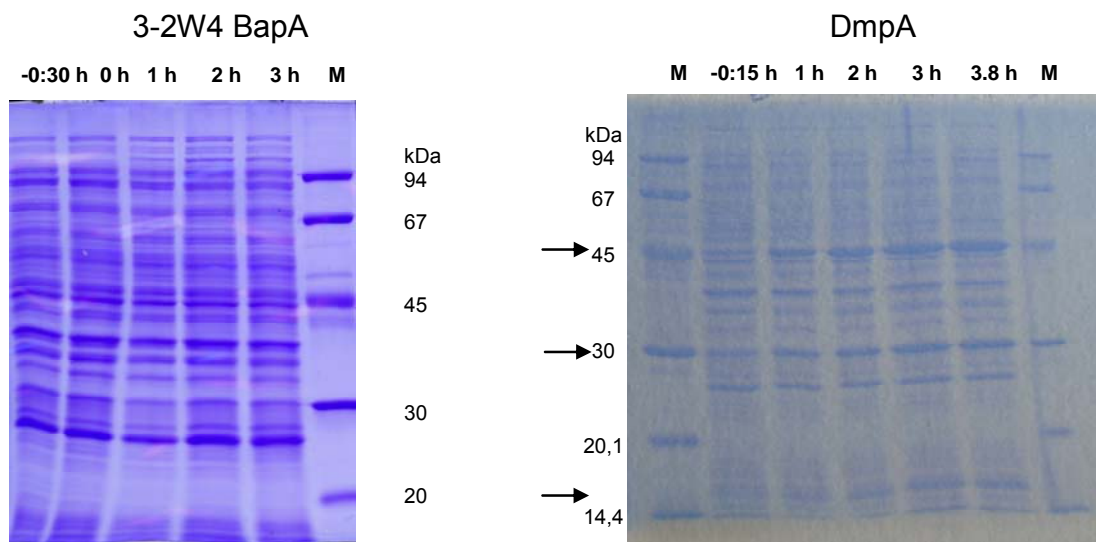


Abbildung 9:

Vergleich der Überexpression von A) 3-2W4 BapA und B) DmpA der 2-Liter Fed-Batch Fermentationen F-I und F-V-b (siehe Tabelle 3, M = Marker).

4.3.2 Enzymbereinigung von DmpA im größeren Maßstab

DmpA wurde in zwei Durchläufen im Gram-Maßstab in technischer Qualität aufgereinigt. Dazu wurden in zwei Durchläufen je ca. 160 g Zellfeuchtmasse von DmpA nach dem Zellaufschluss in einer Kugelmühle in einem einzelnen Chromatographieschritt (Expanded-Bed-Adsorptions-Chromatographie) auf einer Streamline® 50 mm Säule, gefüllt mit ca. 520 ml Streamline DEAE Säulenmaterial, aufgereinigt. Neben der Abtrennung von Zelltrümmern wurden dabei Aufreinigungsfaktoren der Hauptfraktionen von 1,6 und Ausbeuten zwischen 3 und 7 g Gesamtprotein bei ca. 17% Reinheit erhalten (Tabelle 4).

Tabelle 4:
Aufreinigungstabelle von DmpA.

	Volumen ml	Gesamt- protein mg	Spezifische Aktivität U/mg	Aufreinigungs- faktor fold	Wieder- findung %	Abgeschätzte Reinheit %
						45 U/mg=100 %
Rohextrakt	540	15331	4,8	1,0	100,0	10,6
Durchfluss	3000	2360	1,8	0,4	5,8	4,0
Hauptpool	100	1223	8,9	1,9	14,8	19,8
1. Nebenpool	300	2795	9,4	2,0	35,7	20,8
2. Nebenpool	200	1741	6,7	1,4	15,8	14,8
3. Nebenpool	200	1210	4,7	1,0	7,8	10,5
Haupt- + Nebenpools	800	6969	7,8	1,6	74,2	17,4

2. DmpA Aufreinigung 160 g cww, ca 32 g cdw, ca. 16 g protein
7 g im Pool mit 17 % Reinheit = 1,2 g DmpA = 7.5 % der Proteine der Zelle

4.3.3 Enzymformulierung

Die Enzymformulierung nach der Anionenaustauscherchromatographie sollte, sofern möglich, ohne ein Entsalzen betrieben werden, um Salz- und Wasserfrachten sowie zusätzliche Arbeitsschritte zu vermeiden. Die Lagerung und Formulierung von DmpA in Flüssigform erfolgte nach der Aufreinigung durch einfaches Einfrieren der Fraktionen ohne vorheriges Entsalzen. Zudem wurden Enzymfraktionen direkt ohne weitere Vorbehandlung testweise gefrier- und sprühgetrocknet. Dabei zeigte sich, dass die spezifische Aktivität an DmpA nach Resuspension der beiden Pulver dem Wert der Enzymlösung vor Trocknung entspricht, jedoch die Wiederfindung an DmpA Aktivität nach der Sprühtrocknung nur 50% im Vergleich zu 82-97% nach der Gefriertrocknung beträgt. Deshalb sollte, soweit erforderlich, eine Formulierung des DmpA Enzyms in Pulverform per Gefriertrocknung erfolgen.

4.4 Klonierung und Expression der β -Aminopeptidasen in heterologen Systemen (TU Dortmund und Uni Düsseldorf)

Zu Projektbeginn lagen für die β -Aminopeptidasen 3-2W4 BapA und DmpA *E. coli* T7-Expressionssysteme vor, mit denen aktives Protein hergestellt werden konnte (Geueke et al. 2006; Heck et al. 2006). Diese Stämme wurden in der ersten Projektphase genutzt, um Enzym für die biochemische Charakterisierung und erste präparative Versuche zu gewinnen (4.3). Jedoch ist das Expressionsniveau für 3-2W4 BapA nur gering, DmpA hingegen wurde teilweise unlöslich und unprozessiert in *E. coli* exprimiert. Die relativ geringen Expressionsausbeuten in *E. coli*, die Tatsache, dass die untersuchten β -Aminopeptidasen prozessiert werden müssen, und der Wunsch nach einem Sekretionssystem ließen uns daher nach alternativen Expressionssystemen suchen.

4.4.1 Expression in *Pseudomonas putida* (Uni Düsseldorf)

Ein Beispiel für ein Bakterium, das zukünftig neben *E. coli* als T7-Expressionsstamm verwendet werden kann, ist *Pseudomonas putida* KT2240 T7. *P. putida* ist ein Gram-negativer G.R.A.S.-Organismus und kann deshalb ohne weiteres als Wirt für heterologe Expressionen in biotechnologischen Anwendungen genutzt werden.

Zur Überexpression der β -Aminopeptidasen aus den Stämmen *Sphingosinicella microcystinivorans* 3-2W4 und *Ochrobactrum anthropi* in *Pseudomonas putida* wurden die kodierenden Gene *bapA* und *dmpA* in den Vektor pBR22b kloniert. Dieser sogenannte *broad-host-range* Vektor kann unter anderem in Pseudomonaden, aber auch in *E. coli* verwendet werden.

Die entsprechenden Gene für die β -Aminopeptidasen wurden aus den Plasmiden p3BapA und pODmpA (Tabelle 2), die von der Eawag zur Verfügung gestellt wurden, mit Hilfe von passenden Restriktionsenzymen ausgeschnitten und durch Ligation in den Vektor pBR22b eingebracht. Die neu erstellten Expressionsplasmide wurden pBR22b *3bapA* und pBR22b *dmpA* genannt und in *E. coli* BL21(DE3) bzw. *P. putida* KT2440 T7 transformiert. Die Expression der Enzyme erfolgte in 25 ml LB-Medium in Schüttelkolben bei 30°C. Die Inkubationszeit nach IPTG-Zugabe variierte zwischen 4 und 20 Stunden. Um die Expressionen der β -Aminopeptidasen BapA und DmpA in den verschiedenen Expressionsstämmen vergleichen zu können, wurden Ganzzellextrakte von den rekombinanten *E. coli* und *P. putida* Stämmen hergestellt. Dazu wurden von den Proben Ganzzellextrakte durch Ultraschallaufschluss (Branson-Sonifier W250, 2 x 2 min, Leistungszyklus 50%, 20 Watt; 4°C) hergestellt. Der photometrische Standardtest basiert auf der Spaltung von *p*-Nitroanilid durch β -Aminopeptidasen in das gelbe *p*-Nitroanilin, dessen Zunahme bei einer Wellenlänge von 405 nm photometrisch gemessen werden kann ((Heck et al. 2006)). Die Aktivität von 3-2W4 BapA im *E. coli* Zellextrakt erreichte spezifische Aktivitäten von 0,06 U/mg und war unabhängig von der Induktionsdauer. Hingegen wurde bei der Expression des gleichen Enzyms in *P. putida* Aktivitäten bis zu 0,2 U/mg, aber auch eine stärkere Abhängigkeit von der Induktionsdauer gemessen (Tabelle 5). Auch bei der heterologen Expression von DmpA erhöhte sich die Aktivität von DmpA erheblich, wenn *P. putida* KT2440 T7 als Expressionswirt benutzt wurde. Die höchste gemessene Aktivität lag bei diesem Stamm dann vor, wenn DmpA weitere 20 h nach IPTG Zugabe inkubiert wurde (5,4 U/mg). Die spezifischen Aktivitäten, die nach der Expression in *E. coli* BL21(DE3) ermittelt wurden, liegen unter den Werten von *P. putida* KT2440 T7. Die genauen Werte für die Aktivität der einzelnen β -Aminopeptidasen in den verschiedenen Expressionsstämmen sind ebenfalls aus Tabelle 5 zu entnehmen.

Abschließend kann man zusammenfassen, dass die spezifische Enzymaktivität sowohl von BapA, als auch von DmpA deutlich gesteigert waren, wenn *P. putida* KT2440 T7 als Expressionsstamm verwendet wurde.

Tabelle 5:
Spezifische Enzymaktivitäten der β -Aminopeptidasen in den zellfreien Rohextrakten der Expressionsstämmen *P. putida* KT2440 T7 und *E. coli* BL21(DE3) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion durch IPTG.

β -Amino- peptidase	Spezifische Aktivität [U/mg]		
		<i>P. putida</i> KT2440 T7	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)
BapA	4	0,21	0,061
	Induktionsdauer		
	20	0,042	0,065
DmpA	[h]		
	4	0,67	0,60
	20	5,4	1,0

4.4.2 Oberflächendisplay (Uni Düsseldorf)

Die Expression von Proteinen als Fusion mit Proteinen der Bakterienmembran ist eine leistungsstarke Technik mit vielen biotechnologischen und medizinischen Anwendungen (Rutherford und Mourez 2006). Es konnte schon mehrmals gezeigt werden, dass das Autotransporter-Protein EstA von *P. aeruginosa* in der Lage ist, verschiedenste Proteine auf die Oberfläche von *Escherichia coli* zu bringen (Becker et al. 2005; Wilhelm et al. 2007). Autotransporter Proteine bestehen aus einem N-terminalen Signalpeptid, gefolgt von einer Passagierdomäne und einer Translokatoromäne die für die Translokation der Passagierdomäne durch die äußere Membran sorgt. Die natürliche Passagierdomäne der Autotransporter kann durch heterologe Proteine ersetzt werden, die dann durch die Translokatoromäne auf die bakterielle Oberfläche gebracht werden. EstA ist ein membranverankerte Esterase von *P. aeruginosa*. Eine inaktive Variante dieser Esterase dient als Anker-Motiv für das Oberflächendisplay in *E. coli*.

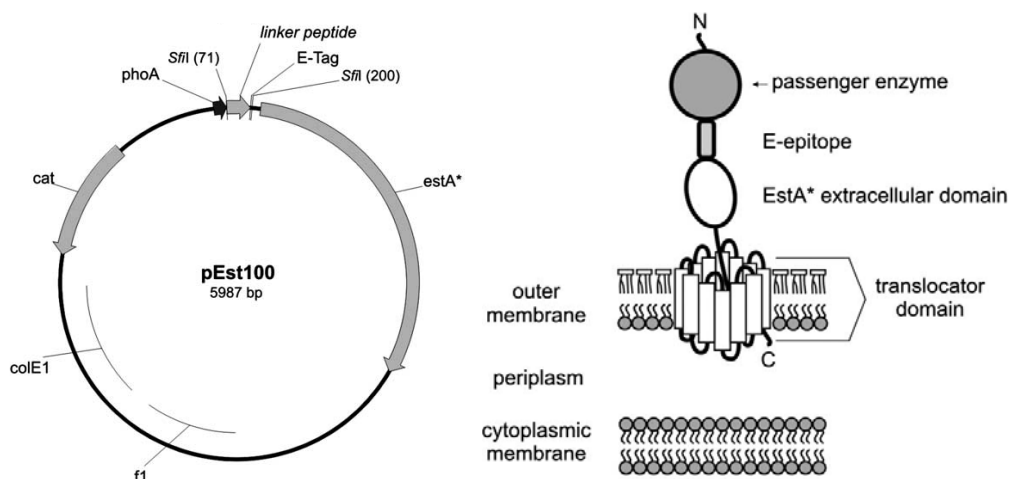


Abbildung 10:

Schematische Übersicht über den Expressionsvektor pEst100 und den Aufbau des Oberflächendisplay-Konstrukts (Becker et al., 2005). In diesem Fall entspricht das eingezeichnete Passagierenzym den verschiedenen β -Aminopeptidasen.

Für das hier verwendete Oberflächendisplay wurde der Vektor pEst100 verwendet (Abbildung 10). Die Gene für die entsprechenden β -Aminopeptidasen wurden unter Verwendung des Restriktionsenzym *SfiI* und anschließender Ligation in diesen Vektor eingebracht. Nach erfolgter Transformation der konstruierten pEST100 Expressionsvektoren in *E. coli* sollte die Aktivität der β -Aminopeptidasen bestimmt werden. Für keine der β -Aminopeptidasen konnte jedoch Enzymaktivität mit diesem Oberflächendisplay-System nachgewiesen werden. Die Enzyme wurden scheinbar in diesem System nicht bzw. nicht in aktiver Form an der Oberfläche des Expressionsstammes exponiert und somit konnte auch keine Enzymaktivität detektiert werden. Gründe für das Fehlen des aktiven Enzyms könnten in dem komplizierten Prozessierungsmechanismus der β -Aminopeptidasen liegen.

4.4.3 Klonierung und Expression von β -Aminopeptidasen in Hefen (TU Dortmund)

Ziel dieses Teilprojektes war es, eine Alternative zur bisherigen intrazellulären Expression der β -Aminopeptidasegene von 3-2W4 BapA aus *S. xenopeptidilytica* und DmpA aus *O. anthropi* zu finden. Daher wurde neben der Expression in *P. putida* (4.4.1) die Expression in den Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Pichia pastoris* als komplementäres System in Betracht gezogen. Die Expressionssysteme mit der besten Proteinüberexpression sollten abschließend zur genaueren Stammcharakterisierung und zum Prozess Scale-Up genutzt werden.

Die hierbei angewandte Klonierungsstrategie in Hefen fusionierte die Zielgene mit der in beiden Vektoren vorliegenden Sekretionssequenzen der Hefen (α -Signalsequenz). Das dadurch entstandene Fusionsprotein wird mit Hilfe der α -Signalsequenz aus der Zelle sekretiert, wobei die α -Signalsequenz während der Exkretion abgespalten wird, so dass das jeweilige, unmodifizierte Zielprotein im Medium vorliegt. Nach erfolgreicher Transformation der Vektor-Gen Konstrukte in *S. cerevisiae* und *P. pastoris* wurden erste Expressionsversuche im Schüttelkolben durchgeführt. Nach der Kultivierung der Expressionsstämme und Separation der Zellen vom Medium wurde zunächst versucht, die Enzyme durch SDS-PAGE zu visualisieren. Dazu wurde nach der Kultivierung eine Proteinfällung des Medienüberstandes durchgeführt. Leider konnte hierbei keine Überexpression nachgewiesen werden. Im Nachfolgenden wurde das Kultivierungsmedium mittels Proteinfällung 20fach aufkonzentriert, um eine Denaturierung des Enzyms zu vermeiden, und auf spezifische hydrolytische Enzymaktivität untersucht. Die hierbei beobachtete Produktbildung ergab eine geringe Aktivität beider Enzyme (3-2W4 BapA und DmpA). Die Auswertung der Daten ergab spezifische Aktivitäten von 0,007 – 0,008 U/mg_{CDW} für 3-2W4 BapA in Hefen, welches in etwa dem Wert in *E. coli* entspricht (0,011 U/mg_{CDW}¹) (Abbildung 11).

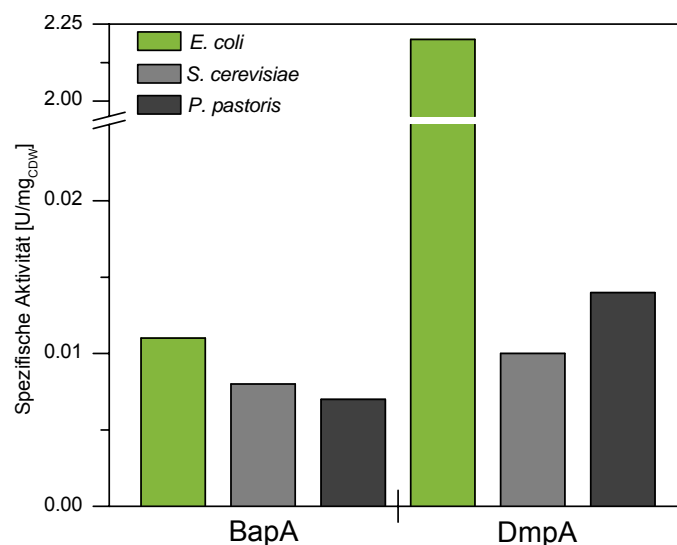


Abbildung 11:
Vergleich der spezifischen Aktivitäten von 3-2W4 BapA und DmpA pro Milligramm Zellrockengewicht in den verschiedenen Expressionssystemen.

¹ Intrazelluläre bestimmte Aktivitäten in U/mg_{Protein} wurden unter der Annahme, dass der Gesamtanteil des Proteins am Zellrockengewicht ca. 50% (w/w) entspricht, durch den Faktor 2 geteilt, um die Vergleichbarkeit der sekretierten Hefeproteine, deren Aktivitäten in U/mg_{CDW} angegeben wurden, zu realisieren.

Das hier erfolgreich verwendete, native *bapA* Gen hat zwar keine Erhöhung der Expression in Hefen erzielen können, doch hat das System, im Vergleich zur Expression in *E. coli*, vor allem die Sekretion des aktiven Proteins als Vorteil. Unter Umständen kann durch die Sekretion die Aufreinigung der Peptidase komplett entfallen, was deutliche Vorteile für die Prozesskosten mit sich bringen würde, da material- und geräteintensive Chromatographieschritte entfallen würden. Demgegenüber ergab der Vergleich der Aktivität von rekombinanter DmpA aus Hefen mit dem Wert aus *E. coli* eine deutlich geringere Aktivität von 0,01 – 0,014 U/mg_{CDW} im Vergleich zu 2,1 U/mg_{CDW} (Abbildung 11).

Zur Steigerung der Expressionsleistung wurde im nächsten Schritt die Codonzusammensetzung der nativen Gensequenz der Codonzusammensetzung des jeweiligen Expressionsstamms angepasst. Aufgrund der oben gezeigten Ergebnisse wurden daher optimierte 3-2W4 *bapA* Gensequenzen für *S. cerevisiae* und *P. pastoris*, sowie eine für *E. coli* optimierte *dmpA* Gensequenz synthetisiert. Nach Transformation der synthetischen Vektor-*bapA* Konstrukte in *S. cerevisiae* und *P. pastoris* erfolgten Expressionsversuche im Schüttelkolben ohne dass 3-2W4 BapA Aktivität im Medium nachgewiesen werden konnte. Die darauf folgende Analyse des Kulturüberstands mittel SDS Page ergab, dass die konstruierten Stämme eine deutliche Überexpression des sekretierten 3-2W4 BapAs ermöglichen, jedoch handelt es sich um das unprozessierte Protein mit einer Größe von ca. 39 kDa (Abbildung 12).

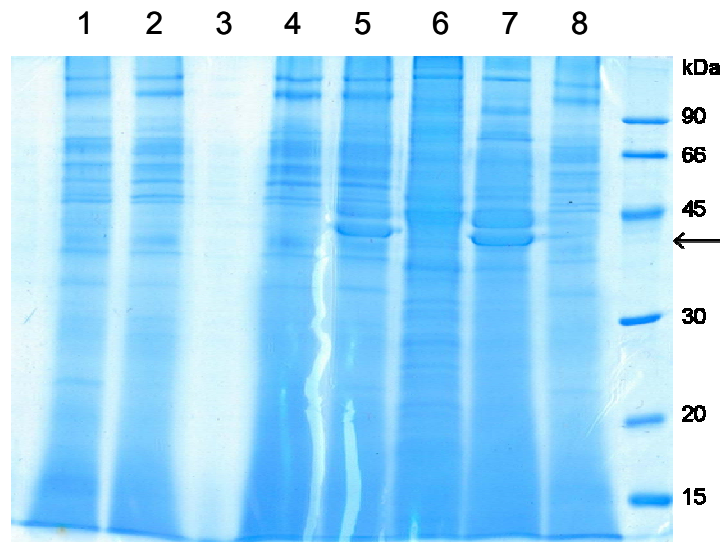


Abbildung 12:

SDS-Page Analyse nach Proteinfällung. (1, 2) Kontrolle *S. cerevisiae* (3) leer, (4) 3-2W4 BapA (nativ) in *S. cerevisiae*, (5) 3-2W4 BapA (synthetisch) *S. cerevisiae*, (6) Kontrolle *P. pastoris*, (7) 3-2W4 BapA (synthetisch) in *P. pastoris*, (8) 3-2W4 BapA (nativ) in *P. pastoris*

Eine wesentliche Erkenntnis der oben dargestellten Ergebnisse ist, dass die Kodonoptimierung für *S. cerevisiae* und *P. pastoris* erfolgreich war, da die Proteinexpressionsrate im Vergleich zur Expression des nativen Gens in Hefen um das bis zu 20fache gesteigert werden konnte. Weitere Expressionsexperimente ergaben, dass die Menge an exprimierter Peptidase in *S. cerevisiae* nicht reproduzierbar war (Daten nicht gezeigt). Es wurde daraufhin im Folgenden nur das Expressionssystem *P. pastoris* untersucht.

4.4.4 Untersuchungen des unprozessierten 3-2W4 BapA aus rekombinanten *P. pastoris* (TU Dortmund)

Ziel war es, eine Erklärung für die nicht erfolgte Prozessierung und die darin begründete Inaktivität des sekretierten 3-2W4 BapA zu erarbeiten. Um für weitere Studien eine genügende Menge des unprozessierten Proteins zu haben, wurde zunächst eine Fermentation durchgeführt. Es wurde hierbei ausreichend Protein im Fermentationsüberstand erzeugt (Abbildung 13).

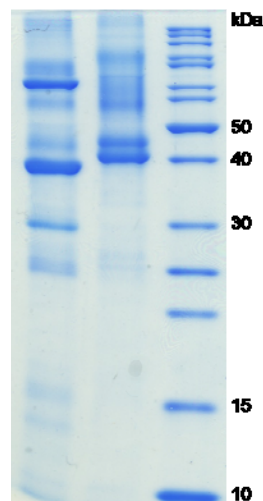


Abbildung 13:

SDS Page des Fermentationsüberstandes von *P. pastoris*. In der linken Spur ist das deglykosylierte 3-2W4 BapA bei 38 kDa zu sehen, in der Mitte sieht man möglicherweise das in Form einer Doppelbande vorliegende hyperglykosylierte 3-2W4 BapA.

Das inaktive Protein wurde unter drei Gesichtspunkten untersucht:

1) Welche Faktoren ermöglichen eine Prozessierung und damit Aktivierung des Proteins? Um dieser Frage nachzugehen wurde Protein zum einen unbehandelt zum anderen auch im deglykosylierten Zustand verwendet, da es Indikatoren für eine Hyperglykosylierung gab, die in Punkt 3 näher erläutert werden. Es wurde zunächst vermutet, dass das BapA durch Autoprocessing entsteht, wobei eine Initiierung der Autoprocessing erst durch Einfluss weiterer zellulärer Faktoren stattfinden kann. Daher war die Annahme, dass durch die hohen Expressionsraten keine ausreichende

Initiierung stattfinden konnte. Das Enzym wurde zunächst für einen Zeitraum von 12 h bei 37°C im Fermentationsüberstand inkubiert. Parallel erfolgte eine Inkubation in 50 mM Tris/Puffer (pH 8,0) bei 37°C. Alle 2 Stunden wurden eine Probe genommen und auf Aktivität untersucht. Unter gleichen Bedingungen erfolgte die Zugabe von aufgereinigtem aktiven 3-2W4 BapA und DmpA um eine Initiierung gewährleisten zu können. Außerdem wurde die Inkubation über 12 h in einem breitem pH Spektrum (pH 4-10) in 50 mM Tris Puffer durchgeführt. In allen Fällen konnte keine Aktivität und/oder Prozessierung des Proteins nachgewiesen werden. Da im Allgemeinen nicht ausgeschlossen werden konnte, dass andere Zellenzyme einen essentiellen Einfluss auf die Prozessierung haben, wurden Versuche ebenfalls im Fermentationsüberstand als auch in 50 mM Tris-Puffer (pH 8,0) bei 37°C unter Zugabe von ganzen Zellen, als auch von Zellextrakt der Expressionsstämme (*E. coli*, *P. putida*, *P. pastoris*) durchgeführt. Zusätzlich wurde noch parallel Glukose zugegeben, um eine Zellaktivität zu gewährleisten. Jedoch konnte auch unter diesen Bedingungen keine Aktivität und/oder Prozessierung des Proteins nachgewiesen werden.

2) Daher stellte sich die Frage, ob es sich bei dem im SDS-Gel visualisierten Protein überhaupt um das Zielprotein BapA handelte. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem Protein nicht um die fusionierten α/β -Untereinheiten des BapAs handelte, sondern um eine mögliche Fusion des α -Signalpeptids zur Sekretion mit der α -Untereinheit von BapA. Dabei bestand die gleichzeitige Annahme, dass die β -Untereinheit bereits im Zytoplasma abgespalten wurde und somit nicht in den Überstand sekretiert wurde und ebenfalls keine Abspaltung des Signalpeptids stattgefunden hätte. Dies wurde jedoch als eher unwahrscheinlich angenommen, da der Abspaltungsmechanismus des Signalpeptids als sehr effizient beschrieben wurde (Brake et al. 1984). Da es sich jedoch bei beiden theoretisch möglichen Fusionspeptiden um ähnliche Größen handelt (Abbildung 14), musste auch hier eine Aufklärung stattfinden. Dazu wurden die Proben aus dem Fermentationsüberstand einmal direkt und einmal deglykosyliert analysiert. Es erfolgte eine Auftrennung zwischen unbehandeltem und deklykosyliertem BapA im SDS Gel. Diese Proben wurden anschließend direkt aus dem Gel eluiert und nach tryptischem Verdau mittels LC-FTICR Massenspektroskopie analysiert (Daten nicht gezeigt). Die Analyse wurde mit Unterstützung des Institute for Analytical Sciences (ISAS, Dortmund) durchgeführt. Mit diesem Analyseverfahren konnten mehrere eindeutigen Übereinstimmungen der analysierten Fragmente mit den für die beiden BapA Untereinheiten zu erwartenden Fragmenten nachgewiesen werden. Es konnte daher gezeigt werden, dass es sich bei dem Fusionsprotein eindeutig um BapA handelte. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass Fragmente, in denen Glykosylierungssignale vorhanden waren,

nicht detektiert wurden, was durch die erhöhte Masse der Fragmente durch Mannosereste zu erklären wäre.

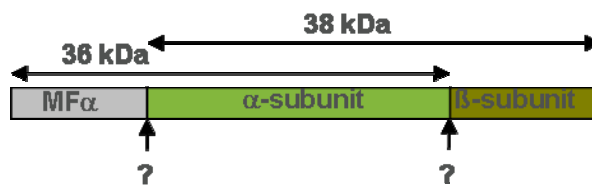


Abbildung 14:

Mögliche Fusionsproteine. Bei einer Abspaltung der β -Untereinheit und bleibender Fusion der α -Untereinheit mit dem α -Signalpeptid entsteht ein 36 kDa großes Protein. Das fusionierte BapA besitzt eine Größe von 38 kDa.

3) Diese Erkenntnis fokussierte unsere weiteren Studien auf die mögliche Hyperglykosylierung des BapAs während der Sekretion. Hefen sind als Eukaryonten im Allgemeinen in der Lage Proteine zu glykosylieren, d.h. Zuckerketten an die Proteine anzuheften. Bei der *N*-Glykosylierung kann jedoch das Problem auftreten, dass dabei ein mannosereicher Typ (*High-Mannose*) ausgebildet wird, wobei extrem lange Mannoseketten an eine im Protein vorliegende Signalsequenz (Asn-x-Ser/Thr) angehängt werden können und somit zu Hyperglykosylierung führen können (Romanos et al. 1992). Daher wurde zunächst ein möglicher Einfluss einer Hyperglykosylierung auf die Proteinstruktur abgeklärt. Dazu wurde das im Fermentationsüberstand vorliegende BapA mit *N*-Glycosidase F (New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland) behandelt. Eine Aktivierung des Enzyms konnte jedoch wie oben beschrieben nicht beobachtet werden. Es konnte jedoch eine Veränderung der Größe im SDS Gel (Abbildung 13) beobachtet werden. Diese entsprach mit ca. 38 kDa der erwarteten Größe des fusionierten BapAs.

Diese Ergebnisse deuteten stark auf eine durch Hyperglykosylierung hervorgerufenen Problematik bzgl. der Prozessierung/Aktivierung des BapAs hin. Die *N*-Glykosylierung wird im endoplasmatischen Retikulum (ER) durchgeführt, jedoch findet in Hefen eine weitere Modifikation dieser Glykosylierung bei der Sekretion in Golgi Vesikeln statt, bei es erst durch weiteres Anhängen von Mannoseresten zur Hyperglykosylierung kommt (Dean 1999). Aufgrund dieser Tatsache wurde das optimierte *bapA* Gen in einen Vektor umklontiert, welcher eine intrazelluläre Expression des BapAs in *P. pastoris* realisieren sollte. Nach Herstellung der rekombinanten Stämme wurden hierzu zunächst Expressionversuche im Schüttelkolben durchgeführt. Nach Aufschluss der Zellen durch Ultraschall konnte eine spezifische Aktivität von 0,125 U/mg_{CDW} (Abbildung 16) nachgewiesen werden.

4.4.5 Entfernung von Hyperglykosylierungsstellen in *bapA* zur verbesserten Expression in *Pichia pastoris* (Uni Düsseldorf)

Wie im vorherigen Abschnitt erläutert bestand die begründete Vermutung, dass 3-2W4 BapA aufgrund von Hyperglykosylierungen nur unprozessiert und somit inaktiv in *P. pastoris* exprimiert werden konnte. Um dieses Problem zu umgehen

wurden an drei putativen Hyperglykosylierungsstellen im *bapA* Gen die Codons für Asparagin gegen Glutamin ausgetauscht, da es mehrere Hinweise dafür gab, dass die Prozessierung von 3-2W4 BapA in die zwei aktiven Untereinheiten durch die Hyperglykosylierung verhindert wurde (4.4.4).

Tabelle 6:
Verwendete Oligonukleotide für den Austausch der Hyperglykosylierungsstellen im *bapA* Gen.

Bezeichnung	DNA-Sequenz (5' → 3' Richtung)	Merkmal/ Modifikation
bapA_Xhoup	GAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAGAGAGAGG	<i>XhoI</i> Schnittstelle
bapA_Xbadw n	GATGATGGTTCGACGGCGCTATTCAGATCC	<i>XbaI</i> Schnittstelle
A1_up	tgtagagcagtcacCAAggtactggtgagt	Austausch AAC gegen CAA
A1_down	actcaccagttaccTTGgatgactgctctacca	Austausch AAC gegen CAA
A2_up	ttaggagttgtagaCAAggttctacagcaggtg	Austausch AAC gegen CAA
A2_down	cacctgctgtagaacTTGtctaccaactcctaa	Austausch AAC gegen CAA
A3_up	tgccagcaattatcCAAgacactgactctgagac	Austausch AAC gegen CAA
A3_down	gtctcagagtcagtgctTTGgataattgctggcaa	Austausch AAC gegen CAA

Zum Austausch der Aminosäuren Asparagin gegen Glutamin an drei Stellen im Gen *bapA* wurden Primer konstruiert, die die Basenaustausche in der DNA-Sequenz enthielten (Tabelle 6). Zur zielgerichteten Mutagenese der drei Codons (AAC gegen CAA) in *bapA* wurde die Methode Overlap-Extension PCR verwendet. Eine schematische Übersicht der oben beschriebenen Schritte ist in Abbildung 15 dargestellt.

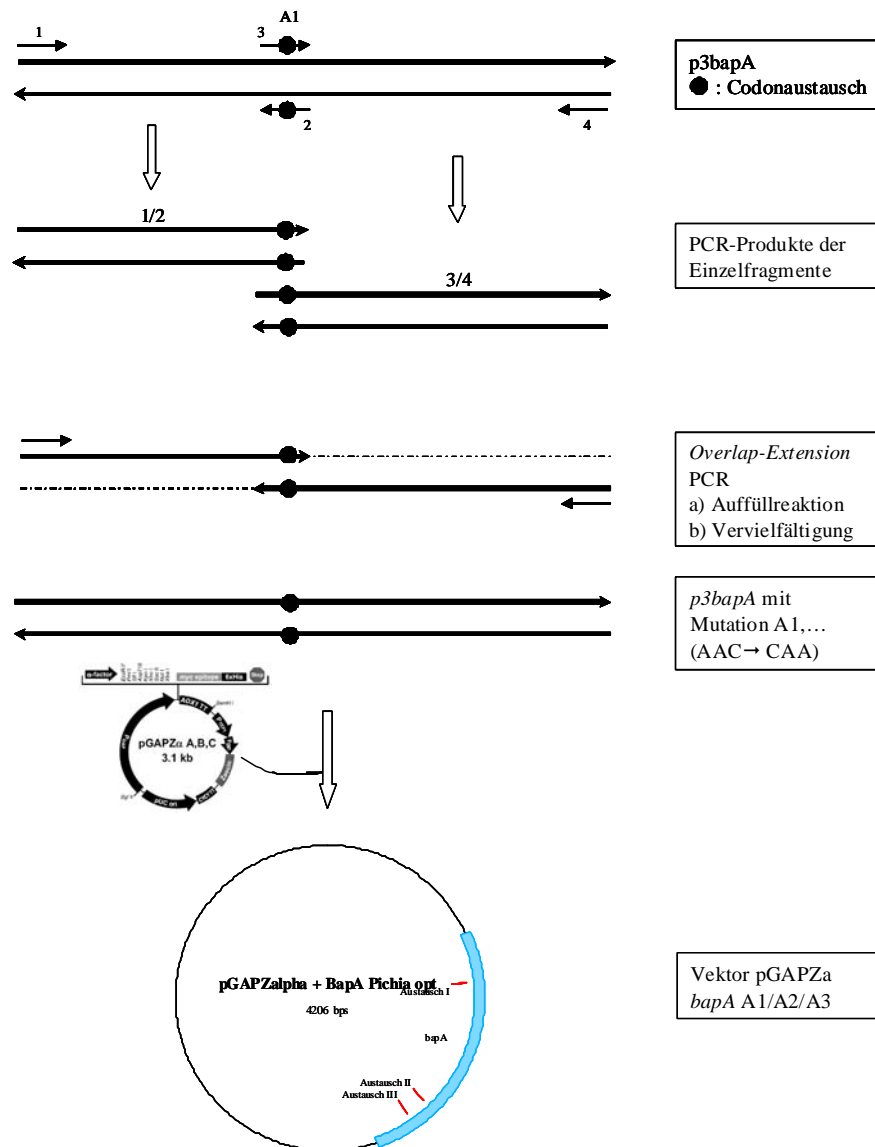


Abbildung 15:

Übersicht über die Einzelschritte der zielgerichteten Mutagenese des optimierten Gens *bapA* durch Overlap-Extension PCR zur Expression in *Pichia pastoris*. Primer 1 und 2 kennzeichnen die flankierenden Primer, Primer 3 und 4 die Mutageneseprimer.

Folgende Konstrukte wurden durch die Overlap-Extension PCR und anschließende Klonierung in den Vektor pGAPZ α konstruiert (AX kennzeichnet jeweils die Stelle im Gen, wo der Codonaustausch vorgenommen wurde, z.B.: A1 steht für den Austausch des Codons an der ersten Hyperglykosylierungsstelle):

- pGAPZ α *bapA* A1
- pGAPZ α *bapA* A2
- pGAPZ α *bapA* A3
- pGAPZ α *bapA* A1/A2
- pGAPZ α *bapA* A1/A2/A3

Ein erster Expressionsversuch im Schüttelkolben zeigte, dass geringe Aktivitäten vorhanden waren. Diese sind jedoch im Vergleich zum Produktionstitert vom unprozessierten BapA als äußerst niedrig zu werten. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, ob die geringe Aktivität durch die Aminosäureaustausche und eine eventuell dadurch bedingte Strukturveränderung hervorgerufen wurde. Andererseits kann auch aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden, dass nicht die Hyperglykosylierung Ursache für die Bildung der unprozessierten Form war. Es könnte daher auch angenommen werden, dass weitere intrazelluläre Faktoren, die bei der Sekretion in *P. pastoris* nicht vorliegen, für die Prozessierung essentiell sind.

4.4.6 Optimierung der Expression und Vergleich der Produktionsstämme im Bioreaktor (TU Dortmund)

Im Folgenden werden die vorliegenden Expressionsstämme, die ein aktives Enzym produzieren konnten (Tabelle 7), in Schüttelkolbenansätzen mit Komplexmedium verglichen.

Tabelle 7:
Expressionsstämme mit aktivem Enzym.

Produktionsstamm	Enzym	Vektor	Enzymlokalisierung	Genoptimierung
<i>E. coli</i> BapA	BapA	pET-3c	Intrazellulär	nein
<i>P. putida</i> BapA	BapA	pBR22b	Intrazellulär	nein
<i>P. pastoris</i> BapA (opt)	BapA	pGAPZ	Intrazellulär	ja
<i>E. coli</i> DmpA	DmpA	pET-3c	Intrazellulär	nein
<i>E. coli</i> DmpA (opt)	DmpA	pET-26b(+)	Intrazellulär	ja
<i>P. putida</i> DmpA	DmpA	pBR22b	Intrazellulär	nein
<i>P. pastoris</i> DmpA	DmpA	pGAPZ α	Extrazellulär	nein

Neben den oben genannten Hefestämmen wurde auch eine Genoptimierung des DmpAs für die Expression in *E. coli* vorgenommen. Wie in Abbildung 16 zu sehen ist, konnte die Expression im Laufe des Projektes deutlich gesteigert werden. So konnte durch die intrazelluläre Expression von BapA in *P. pastoris* (0,125 U/mg_{CDW}) eine fast 12fach höhere spezifische Aktivität erzielt werden als in den *E. coli* Stämmen die zu Beginn des Projektes vorlagen (0,011 U/mg_{CDW}). Auch durch die Optimierung von DmpA in *E. coli* konnte eine Steigerung um 80% von 2,1 U/mg_{CDW} auf 3,8 U/mg_{CDW} realisiert werden. Abschließend konnten wir durch diese Expressionsoptimierung die Produktion

ausreichender Mengen an den beiden Enzymen BapA und DmpA zur β -Peptidherstellung gewährleisten.

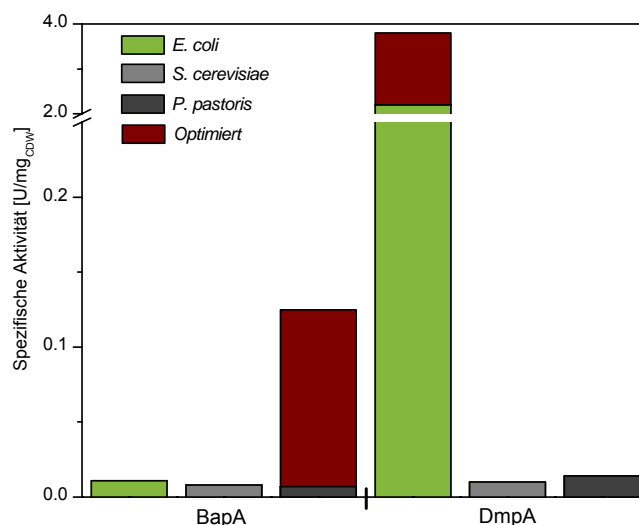


Abbildung 16:

Spezifische Aktivitäten von DmpA und BapA. Die roten Balken verdeutlichen die erhöhten Aktivitäten durch die einzelnen Optimierungen.

Um abschließend das absolute Synthesepotential der Produktionsstämme zu beurteilen, wurden alle Stämme zur Überexpression der Enzyme im Bioreaktor unter optimalen Bedingungen im Fed-Batch Prozess kultiviert. Hierzu wurden auch die an der Uni Düsseldorf generierten *P. putida* Expressionsstämme verwendet (Tabelle 8). Die Fermentationen erfolgten im 1-L-Maßstab in Minimalmedien für *E. coli* (Geueke et al. 2006) bei 37°C, *P. putida* (Sun et al. 2006) und *P. pastoris* (Hellwig et al. 1999) bei 30°C sowie bei konstantem pH und pO_2 .

Tabelle 8:

Fermentationsdaten der Produktionsstämme.

Produktionsstamm	Wachstum Batch [1/h]	Wachstum Fed-batch [1/h]	IPTG Induktion [1 mM]	Biomasse [CDW/L]	$Y_{X/S}$ [g/g]
<i>E. coli</i> BapA	n.d.	n.d.	IPTG – 5 h	26	n.d.
<i>P. putida</i> BapA	0,56	0,1	IPTG – 5 h	61	0,45
<i>P. pastoris</i> BapA (opt)	0,24	0,1	ohne	221	0,49
<i>E. coli</i> DmpA	n.d.	n.d.	IPTG – 5 h	36	n.d.
<i>E. coli</i> DmpA (opt)	0,58	0,1	IPTG – 5 h	37	n.d.
<i>P. putida</i> DmpA	0,56	0,1	IPTG – 5 h	58	0,45
<i>P. pastoris</i> DmpA	0,28	0,1	ohne	198	0,50

Wie aus Tabelle 8 ersichtlich, konnten die höchsten Zellkonzentrationen mit *P. pastoris* erzielt werden. Auch die auf das Substrat bezogene Ausbeute ist bei *P. pastoris* am höchsten, was beim Scale Up der Enzymproduktion Kosten einsparen würde. Nach erfolgreicher Fermentation wurden die Proben auf Aktivität untersucht (Tabelle 9). Hierfür wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen und auf die spezifische Aktivität hin untersucht. Allein für das durch *P. pastoris* produzierte DmpA wurde die Aktivität im Fermentationsüberstand nachgewiesen. Wie Tabelle 9 entnommen werden kann, findet man die höchste spezifische Aktivität durch die Überexpression in *P. putida* mit ca. 0,13 U/mg_{CDW} (0,25 U/mg_{Protein}) für BapA, was einen Proteingehalt am Gesamtprotein von ca. 14,7% entsprechen würde, bei einer max. Aktivität von 1,7 U/mg_{Protein} bei 37°C. Für DmpA findet man die höchste spezifische Aktivität von ca. 2,9 U/mg_{CDW} (5,7 U/mg_{Protein}) in *E. coli*, was in diesem Fall einem Anteil am Gesamtprotein von 8,9% entsprechen würde, bei einer max. Aktivität von 63,7 U/mg_{Protein} bei 37°C. Obwohl für *P. pastoris* bei einer spezifischen Aktivität von 0,06 U/mg_{CDW} (0,11 U/mg_{Protein}) nur ein Anteil von 6,4% BapA am Gesamtprotein synthetisiert wurde, so wurde doch bedingt durch die hohe Zelldichte der insgesamt höchste Produkttiter mit 7,2 g/L erreicht. Obwohl DmpA in *P. pastoris* nur in kleinen Mengen synthetisiert wird (0,04 U/mg_{CDW}), liegt durch die Sekretion in den Fermentationsüberstand eine hohe spezifische Aktivität von 11,9 U/mg_{Protein} vor. Diese Zahl verdeutlicht, dass bei einem höheren Expressionsniveau eine Aufreinigung des Enzyms möglicherweise überflüssig würde.

Tabelle 9:
Aktivitäten und Produktivitäten der fermentierten Expressionsstämme.

Produktionsstamm	Spez. Aktivität [U/mg _{CDW}]	Anteil Gesamtprotein [%]	Produktkonzentration [g/L]	Biomasse [cdw/L]
<i>E. coli</i> BapA	0,01	1,1	0,15	26
<i>P. putida</i> BapA	0,13	14,7	4,66	61
<i>P. pastoris</i> BapA (opt)	0,06	6,5	7,15	221
<i>E. coli</i> DmpA	2,15	6,7	1,21	36
<i>E. coli</i> DmpA (opt)	2,85	8,9	1,65	37
<i>P. putida</i> DmpA	2,10	6,6	1,91	58
<i>P. pastoris</i> DmpA	0,04	0,1	0,12	198

4.4.7 Zusammenfassung der Expressionssysteme

Abschließend können wir feststellen, dass wir durch Anwendung verschiedener Expressionssysteme sowie deren Optimierung ausreichend β -Aminopeptidasen herstellen können. Die Synthese des DmpA kann durch den optimierten *E. coli* Stamm gewährleistet werden, dessen DmpA-Anteil am Gesamtprotein mit 8,9% am höchsten lag. Die deutlichste Steigerung der Synthese konnten wir für 3-2W4 BapA erreichen. Dies konnte vor allem mit den Produktionsstämmen *P. putida* und *P. pastoris* erreicht werden, wobei der *P. putida* Stamm mit einem BapA-Anteil von 14,7% am Gesamtprotein die höchste spezifische Aktivität besaß. Der Vorteil des *P. pastoris* Stammes liegt trotz des deutlich niedrigeren BapA-Anteils von 6,5% in dem höheren Produkttiter, der durch die hohen Zelldichten erreicht wurde.

4.5 Charakterisierung des rekombinanten *P. pastoris* Stammes (TU Dortmund)

Zur Expression von Enzymen in industriellen Maßstab ist die Wirtschaftlichkeit eines Prozesses von größtem Interesse. Wichtig ist hierbei eine möglichst hohe Ausbeute des Produktes bezüglich des Mediums und der Zeit zu erzielen. Wir haben daher im Folgenden den Einfluss verschiedener Kultivierungsbedingungen auf die Zellphysiologie in Bezug auf die Proteinexpression des rekombinanten *P. pastoris* Stammes (intrazelluläre BapA Expression) untersucht, um etwaige Optimierungsschritte aufzuzeigen. Die meisten industriellen Prozesse zur Überexpression werden im Allgemeinen mittels Fed-batch Verfahren durchgeführt, um eine optimale Ausbeute zu erzielen. Dieses wird durch die Daten in dem von uns durchgeführten Fed-batch verdeutlicht (Tabelle 10). Wie hier vor allem zu beobachten ist, wird durch den das limitierte Wachstum eine erhöhte Ausbeute an Biomasse, als auch eine erhöhte Produktausbeute erzielt, da in dieser Phase keine ungewünschten Nebenprodukte generiert werden. Eine Prozessführung unterhalb der kritischen Wachstumsrate, wobei oberhalb dieser die Bildung von Nebenprodukten statt findet, ist dabei zu realisieren, wobei diese nahe der kritischen Wachstumsrate einzustellen wäre, um eine maximale Raumzeitausbeute zu gewährleisten.

Tabelle 10:
Prozessdaten vom rekombinanten *P. pastoris* Stamm im Fed-batch Verfahren.

Produktionsstamm	μ Batch [1/h]	$Y_{X/S}$ Batch [g/g]	μ Fed-batch [1/h]	$Y_{X/S}$ Batch [g/g]	C_{BapA} [g/L]
<i>P. pastoris</i> BapA	0,16	0,2	0,12	0,5	7,1

Um weitere mögliche Angriffspunkte zur Optimierung der Ausbeute zu finden, wurde der Einfluss verschiedener Medienzusammensetzungen im Schüttelkolben untersucht. Hierzu wurden neben dem im Fermentationsprozess üblichen Minimalmedium (Hellwig et al. 1999), dasselbige nur unter Zugabe von allen proteinogenen Aminosäuren, sowie Komplexmedium (YPD) mit Hefeextrakt und Pepton verwendet. Als Substrat haben wir komplett ^{13}C -markierte Glukose verwendet. Die Zellen wurden unter gleichen Bedingungen in den Medien kultiviert und anschließend analysiert. Zunächst wurden die standardmäßigen Wachstumsparameter bestimmt (Tabelle 11). Wie zu sehen erhält man unter Zugabe von Aminosäuren bzw. Verwendung von Komplexmedium verbesserte Prozessparameter als auch erhöhte spezifische Aktivitäten.

Tabelle 11:
Einfluss des Mediums auf das Wachstum (μ), die Ausbeute ($Y_{X/S}$) und Aktivität.

Medium	μ	[1/h]	$Y_{X/S}$	[g/g]	Spezifische Aktivität [U/mg _{CDW}]
Minimalmedium	0,16		0,2		0,08
Minimalmedium + AS	0,18		0,4		0,15
Komplexmedium	0,24		0,7		0,18

Anschließend erfolgte die Bestimmung der Aminosäureaufnahme durch die Zellen in dem jeweiligen Medium. Dazu wurden hydolysierte Zellextrakte mittels GC-MS Analytik untersucht. Anschließend wurde die ^{13}C -Markierung der 15 detektierbaren proteinogenen Aminosäuren bestimmt (Abbildung 17). Das ^{13}C -Markierungsmuster zeigt an, inwieweit Aminosäuren aufgenommen (^{12}C -markiert), bzw. von den Zellen selbst synthetisiert wurden (^{13}C -markiert). Es ist zu erkennen, dass beim Minimalmedium ohne Aminosäuren alle Aminosäuren eine 100%ige ^{13}C -Markierung vorweisen, was zu erwarten ist, da alle Aminosäuren nur aus dem ^{13}C -markierten Substrat gebildet werden konnten. Anders verhält es sich jedoch bei den Bestimmungen aus den anderen Medien, so lässt sich z.B. bei Methionin nur noch eine ^{13}C -Markierung von 15% in Minimalmedium unter Zugabe von Aminosäuren bzw. 5% in Komplexmedium beobachten. Dies bedeutet, dass analog nur 15% bzw. 5% der Aminosäuren in diesen Medien selber synthetisiert wurden und der restliche Anteil an Methionin aus dem Medium aufgenommen wurde. Es ist zu beobachten, dass es durch die definierte Zugabe von Aminosäuren zum Medium, als auch durch die Verwendung von Komplexmedium zu erhöhten Produktivitäten kommt. Die erhöhte Aufnahme im Komplexmedium lässt sich durch eine effizientere Aufnahme der Aminosäuren erklären, da im

Komplexmedium unter anderem Dipeptide vorliegen, die durch gleiche Transportmechanismen und zumeist unter gleichem Energieaufwand aufgenommen werden.

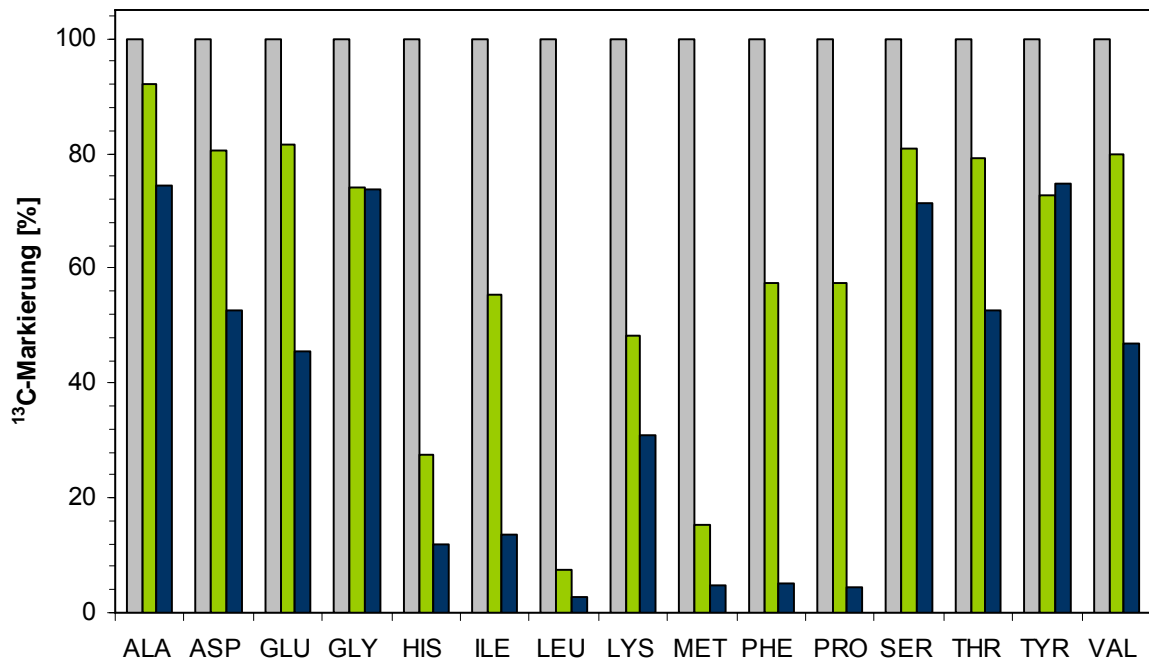


Abbildung 17:

^{13}C -Markierungsmuster der Aminosäuren in Abhängigkeit des Mediums. Graue Balken zeigen die ^{13}C -Markierung der einzelnen Aminosäuren in Minimalmedium an, grüne die ^{13}C -Markierung der einzelnen Aminosäuren in Minimalmedium mit zugesetzten Aminosäuren und blaue die ^{13}C -Markierung der einzelnen Aminosäuren Komplexmedium.

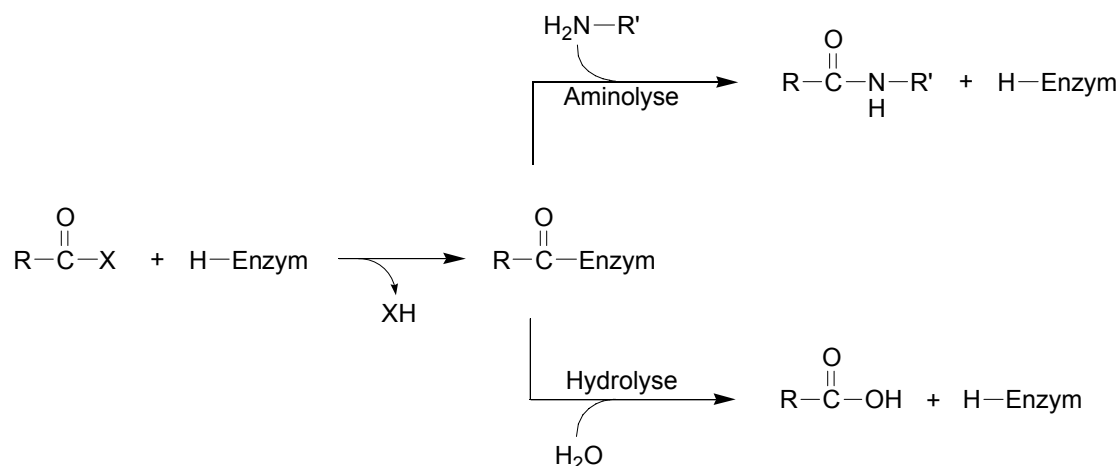
Die oben dargestellten Ergebnisse zeigen deutlich, dass höhere Ausbeuten bzw. Produktivitäten durch eine Optimierung des Mediums zu realisieren sind. Hierbei wäre aber vor allem eine Kosten-Nutzen Rechnung notwendig, da die Zugabe von Aminosäuren wahrscheinlich zu einer deutlichen Kostensteigerung in der Medienherstellung führen würde. Des Weiteren eignet sich die Verwendung von Komplexmedien nicht für Fed-batch Prozesse. Daher wäre es notwendig, entscheidende Metabolite zu identifizieren um eine wirtschaftliche Steigerung in der Produktivität zu erreichen. Alternativ wäre die Entwicklung eines Produktionsstammes, der die oben zu beobachtende Aminosäurelimitierung während der Überexpression kompensieren könnte, in Betracht zu ziehen. Hier würde es Ansätze im Bereich „Metabolic Engineering“ zur Optimierung geben (Raab et al. 2005).

4.6 Synthesepotential der β -Aminopeptidasen (Eawag)

Eine umfangreiche Studie zur Substratspezifität machte deutlich, dass die Enzyme BapA aus *Spingosinicella xenopeptidilytica* 3-2W4 und DmpA aus

Ochrobactrum anthropi LMG7991 in der Lage sind, ein breites Spektrum C-terminal aktivierter β -Aminosäuren (Acyl donor) unter Abspaltung der Abgangsgruppe an den freien N-Terminus einer weiteren Aminosäure bzw. eines Peptids (Acylakzeptor) zu koppeln. Alle Substrate und Produkte wurden mittels HPLC analysiert und quantifiziert und deren Massen mittels HPLC-MS verifiziert.

In diesem kinetisch-kontrollierten Reaktionssystem wird ein charakteristisches kovalentes Acyl-Enzym-Intermediat aus Enzym und Donoraminosäure gebildet. Anschliessend konkurrieren im wässrigen Reaktionssystem zwei Nucleophile um den kovalent ans Enzym gebundenen Acylrest. Erfolgt der nucleophile Angriff durch Wasser, so führt dies zur Hydrolyse des Acyl-Enzyms und damit zur Bildung der freien Aminosäure. Wirkt der N-Terminus des Acylakzeptors als Nucleophil, so kommt es zur Ausbildung der gewünschten Peptidbindung und damit zur Kopplung der Donoraminosäure an den Acylakzeptor (Schema 1). Unter kinetischer Kontrolle wird ein Produktmaximum durchlaufen, an dem die Reaktion abgestoppt werden muss, um eine optimale Ausbeute zu erhalten.



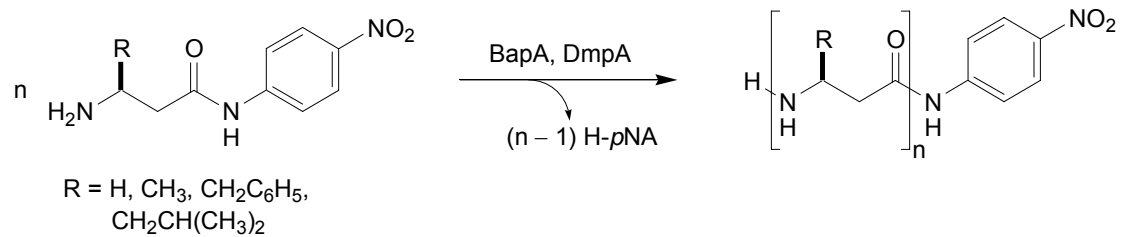
Schema 1:

Darstellung der enzymkatalysierten Peptidsynthese in einem Reaktionssystem unter kinetischer Kontrolle. Das aus einer C-terminal aktivierten Aminosäure und dem Enzym gebildete Acyl-Enzym-Intermediat wird durch konkurrierende Hydrolyse- und Aminolysereaktionen aufgelöst.

4.6.1 Oligomerisierung verschiedener β -Aminosäuren

Als Substrate für die enzymkatalysierte Oligomerisierung von β -Aminosäuren verwendeten wir *p*-Nitroanilinderivate (H- β^3 hXaa-*p*NA) von β -Homoglycin, (*S*)- und (*R*)- β^3 -Homoalanin, (*S*)- β^3 -Homoleucin und (*S*)- und (*R*)- β^3 -Homophenylalanin. Um sicherzustellen, dass die Aminogruppe des Acylakzeptors als Nucleophil vorliegt, wählten wir ein basisches Puffersystem

(pH 10). Unter diesen Reaktionsbedingungen verknüpfen sowohl BapA als auch DmpA die oben erwähnten Aminosäurederivate unter Abspaltung von *p*-Nitroanilin zu Oligomeren verschiedener Kettenlängen (Schema 2).



Schema 2:
Enzymkatalysierte Oligomerisierung verschiedener β -Aminosäuren.

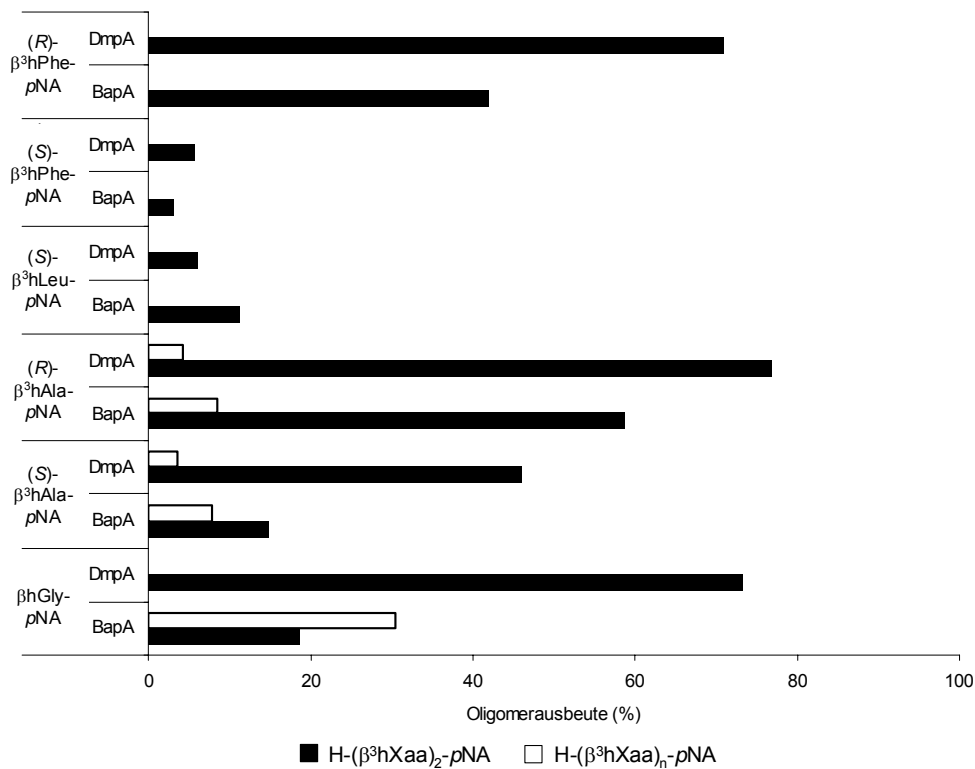


Abbildung 18:

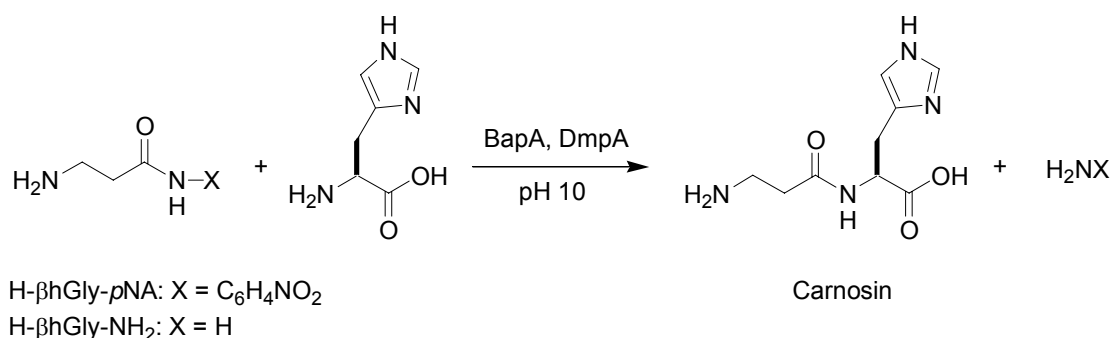
Oligomerisierung von β -Aminosäure *p*-Nitroaniliden durch die β -Aminopeptidasen BapA und DmpA. Das Balkendiagramm zeigt die maximal erreichten Ausbeuten an Dimer $\text{H}-(\beta^3\text{hXaa})_2$ -*p*NA und längererkettigen Oligomeren $\text{H}-(\beta^3\text{hXaa})_n$ -*p*NA.

Bei dieser Reaktion diente die aktivierte β -Aminosäure sowohl als Acyldonor als auch als Acylakzeptor. Mit den Substraten $\text{H}-\beta$ -hGly-*p*NA, (S)- und (R)- $\text{H}-\beta^3$ -hAla-*p*NA beobachteten wir die Bildung von Oligomeren mit Kettenlängen bis zu sieben Aminosäuren, während aus (S)- $\text{H}-\beta^3$ -hLeu-*p*NA und (S)- und

(*R*)-H- β^3 -hPhe-*p*NA lediglich Dimere gebildet wurden. Die erzielten Ausbeuten an β -Aminosäuredimer betragen dabei bis zu 76% (Abbildung 18).

4.6.2 Kopplung einer N-terminalen β -Aminosäure an eine zweite freie Aminosäure

Setzten wir neben den aktivierten β -Aminosäurederivaten eine zweite freie α - (Histidin, Leucin) oder β -Aminosäure (β^3 -Homoleucin) als Acylakzeptor in fünffachem molaren Überschuss ein, so katalysierten die Enzyme unter Abspaltung von *p*-Nitroanilin die Bildung der jeweiligen gemischten Dipeptide mit Ausbeuten von bis zu 32%. Unser Hauptaugenmerk in diesen Versuchen galt der Synthese des β/α -Dipeptids Carnosin (Schema 3), welches unter den genannten Reaktionsbedingungen mit Ausbeuten von 30% durch BapA bzw. 13% durch DmpA gebildet wurde. Die aus dieser Studie gewonnenen Resultate sind publiziert (Heck et al. 2007) und die durch die Enzyme katalysierte Synthesereaktion in der Schweiz zum Patent angemeldet (Anmeldenummer 01007/07).



Schema 3:

Enzymkatalysierte Synthese von Carnosin aus H- β hGly-*p*NA bzw. H- β hGly-NH₂ und Histidin.

Die Verwendung von *p*-Nitroanilinderivaten ist aus ökologischen Gesichtspunkten für einen Einsatz im grosstechnischen Massstab nicht geeignet, da die bei der Enzymreaktion freigesetzte Abgangsgruppe (*p*-Nitroanilin) als toxisch und wassergefährdend eingestuft ist. Um die Synthese von Carnosin hinsichtlich der Umweltverträglichkeit des Verfahrens zu verbessern, beschäftigten wir uns mit der Modifizierung der Abgangsgruppe. Hierbei erwies sich die Verwendung des Amids der β -Aminosäure β -Homoglycin (H- β hGly-NH₂) als ideal, da sich dieses (im Gegensatz zu Aminosäureestern) durch eine hohe Stabilität bei basischen Reaktionsbedingungen auszeichnet und bei der Kopplungsreaktion lediglich Ammoniak als Abgangsgruppe freigesetzt wird (Schema 3).

4.6.3 Kopplung einer β -Aminosäure an kurzkettige α -Peptide

In dieser Versuchsreihe wurde untersucht, inwieweit sich die Enzyme neben der Herstellung von β - und β/α -Dipeptiden auch für die Herstellung längererkettiger β/α -Peptide eignen. Dafür verwendeten wir H- β hGly-NH₂ als Donoramino­säure, die mit Hilfe von BapA und DmpA an 9 verschiedene α -Tripeptide sowie an die Peptide Angiotensin III (7 Aminosäuren) und Bradykinin (9 Aminosäuren) gekoppelt werden sollte. Die Kopplungsreaktion verlief bei allen dieser Peptide sehr ineffektiv und nur bei 6 der eingesetzten Akzeptortripeptide (YKT, GWV, GIG, TKY, MFG, MGG) konnten wir Spuren des Kopplungsprodukts mittels HPLC-MS detektieren. Tripeptide mit N-terminalen Glutamat-, Arginin- und Prolinresten (ELL, RFA, P-Hypro-P) sowie die längererkettigen Peptide Angiotensin III und Bradykinin dienten nicht als Acylakzeptoren.

4.7 Bereitstellung von Verbindungen für ein robustes Hochdurchsatz-Screening für β -Aminopeptidasen (EMC)

Um ein schnelles und effizientes Ausleseverfahren für die mit gerichteter Evolution durchgeführte Optimierung der β -Aminopeptidasen bereitzustellen, wurde mit der Entwicklung eines Hochdurchsatz-Assays begonnen. Aufgabe von EMC war dabei die Testung verschiedener Markierungsverfahren für geeignete interne Standards. Dazu wurden Tri- und Tetrapeptid-Bibliotheken hergestellt, die den gesamten Strukturraum der kurzen Peptide erfassen. Um eine Detektion der durch die β -Aminopeptidasen erzeugten Syntheseprodukte zu ermöglichen, wurden die Peptide C-terminal mit einem geeigneten Marker versehen. Die Modifikation mit einem sogenannten Massendetektions-Tag ermöglicht durch die Einführung einer positiven Ladung sowie die deutliche Erhöhung des Molekulargewichtes die massenspektrometrische Detektion. Für die molekularbiologische Detektion der Verbindungen in den Syntheselösungen wurden die Peptide mit einem Biotin-Label modifiziert. Um eine Detektion über Fluoreszenz-basierte Verfahren zu ermöglichen, wurde das Biotin-Label exemplarisch durch Rhodamin ersetzt. Auch wurden Modell-Verbindungen, die eine Auslesung über Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer ermöglichen, hergestellt. Alle Verbindungen wurden in sehr hoher Reinheit erhalten. Zudem wurden, wie oben beschrieben, schnelle Nachweis- und Quantifizierungsverfahren für die Produkte der enzymatischen Synthesen auf der Basis von HPLC-ESI-MS etabliert.

4.8 Enzymatische Einführung von β -Aminosäuren in Leitstrukturen für die Immuntherapie (EMC)

EMC führt in Kooperation mit Arbeitsgruppen an der Universität Tübingen und mit dem Fraunhofer IGB Stuttgart routinemäßig Screening-Prozesse zur Identifizierung neuer Antiinfektiva und immunmodulatorisch wirkender Verbindungen durch. Für acht α/β -Peptide konnte bereits eine biologische Aktivität nachgewiesen werden. Um Nebeneffekte durch Spuren von Verunreinigungen auszuschließen, wurden für die aktiven Verbindungen Wiederholungstests mit hochreinen, nach pharmazeutischem Standard analytisch charakterisierten Testsubstanzen durchgeführt. Alle positiven Ergebnisse konnten reproduziert und validiert werden. EMC erwartet aus diesen laufenden biologischen Untersuchungen neue β -Peptid-Leitstrukturen zur Anwendung bei der Bekämpfung von Infektionskrankheiten und in der Immuntherapie. Für die biologisch aktiven Verbindungen wird bereits in der frühen Phase der Leitstrukturoptimierung geprüft, ob die Einführung der β -Aminosäuren in diese Strukturen durch Verwendung der im Projekt identifizierten und optimierten β -Aminopeptidasen möglich ist und somit die klassisch-chemischen Verfahren ersetzt werden können.

4.9 Reaktionsoptimierung der enzymatischen Carnosinsynthese (Eawag und TU Dortmund)

4.9.1 Optimierung des Puffersystems für die Carnosinsynthese (Eawag)

Die enzymatische Synthese von Carnosin aus H- β hGly-NH₂ und einem fünffachen molaren Überschuss an Histidin wurde in verschiedenen basischen Puffersystemen untersucht. Dabei wurden die spezifischen Aktivitäten der Enzyme sowie die maximal erreichten Produktausbeuten miteinander verglichen (Abbildung 19). Sowohl mit BapA als auch mit DmpA konnten die besten Syntheseleistungen in basischen Puffersystemen bei pH 10 oder pH 11 erzielt werden. Für alle weitergehenden Versuche zur Carnosinsynthese aus H- β hGly-NH₂ und Histidin wählten wir daher einen 100 mM Carbonatpuffer bei pH 10.

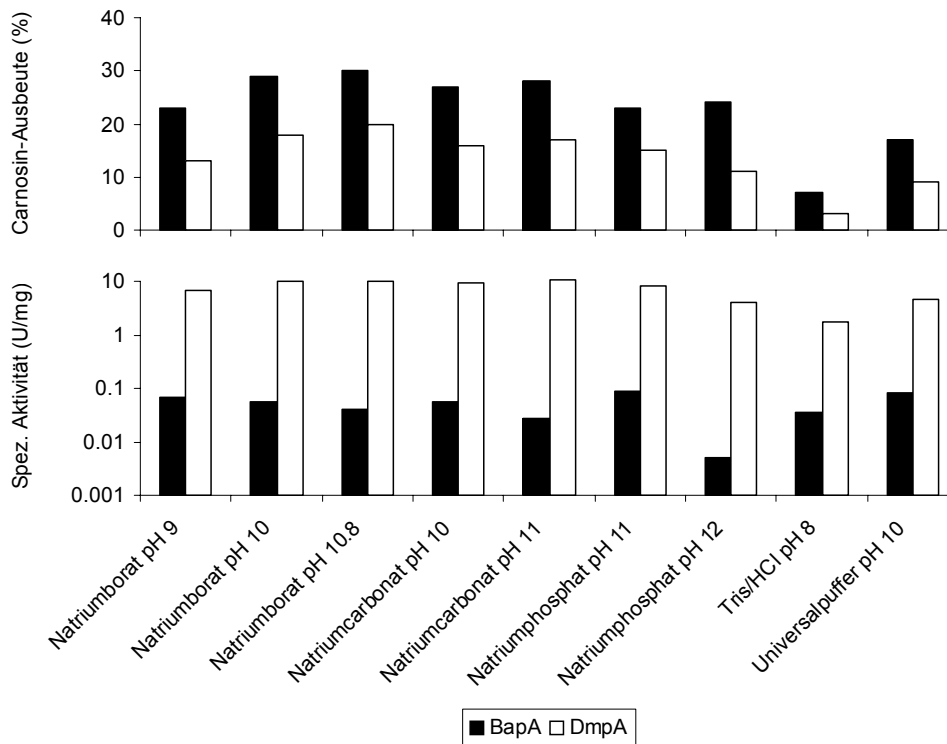


Abbildung 19:

Vergleich verschiedener basischer Puffersysteme für die enzymkatalysierte Synthese von Carnosin aus H- β hGly-NH₂ (5 mM) und Histidin (25 mM).

4.9.2 Zugabe von organischen Lösungsmitteln (Eawag)

In diesem Versuchsteil wurde untersucht, ob der Zusatz verschiedener organischer Lösungsmittel ins Reaktionsmedium einen positiven Effekt auf die durch DmpA katalysierte Bildung von Carnosin hat. Unter keiner der gewählten Bedingungen konnten wir jedoch höhere spezifische Aktivitäten bzw. Produktausbeuten beobachten als in einem rein wässrigen Reaktionsmedium (Tabelle 12). Zu hohe Lösungsmittelkonzentrationen führten innerhalb kurzer Zeit zur Inaktivierung des Enzyms. Alle weiteren Versuche wurden daher im wässrigen Reaktionssystem durchgeführt.

Tabelle 12:

DmpA-katalysierte Synthese von Carnosin aus H- β hGly-NH₂ (5 mM) und Histidin (25 mM) unter Zugabe verschiedener organischer Lösungsmittel.

	kein Lösungsmittel	Acetonitril		Aceton		2-Propanol		Dioxan	
		25%	44%	25%	44%	25%	44%	25%	44%
Spez. Aktivität (U/mg)	7,7	2,6	1,0	2,5	0,7	2,6	1,3	2,4	0,5
Carnosinausbeute (%)	18	3	1	9	1	8	1	10	0,4

4.9.3 Carnosinsynthese und Nebenreaktionen (Eawag)

In dem verwendeten Reaktionssystem bei pH 10 laufen neben der Synthese des Produkts Carnosin verschiedene ungewollte Nebenreaktionen ab. Darunter fallen die Hydrolyse sowie die Oligomerisierung des Acyl donors am stärksten ins Gewicht. Ein Vergleich der Startgeschwindigkeiten der parallel ablaufenden Reaktionen untereinander macht deutlich, dass die Überschusskonzentration des Acylakzeptors Histidin einen entscheidenden Einfluss auf die Syntheseleistung der Enzyme besitzt (

Abbildung 20). Hohe Histidinkonzentrationen erhöhen dabei die Wahrscheinlichkeit der Produktbildung erheblich. Aus Abbildung 3 werden zudem Unterschiede zwischen den Enzymen BapA und DmpA ersichtlich. Während auch bei hohen Histidinüberschüssen im DmpA-katalysierten Reaktionssystem die Bildung von Oligomeren überwiegt, dominieren in der BapA-katalysierten Reaktion die Hydrolyse des Substrats sowie die Bildung von Carnosin. Es wird deutlich, dass für das Erreichen einer guten Carnosinausbeute in diesem Reaktionssystem hohe Überschüsse an Histidin verwendet werden müssen.

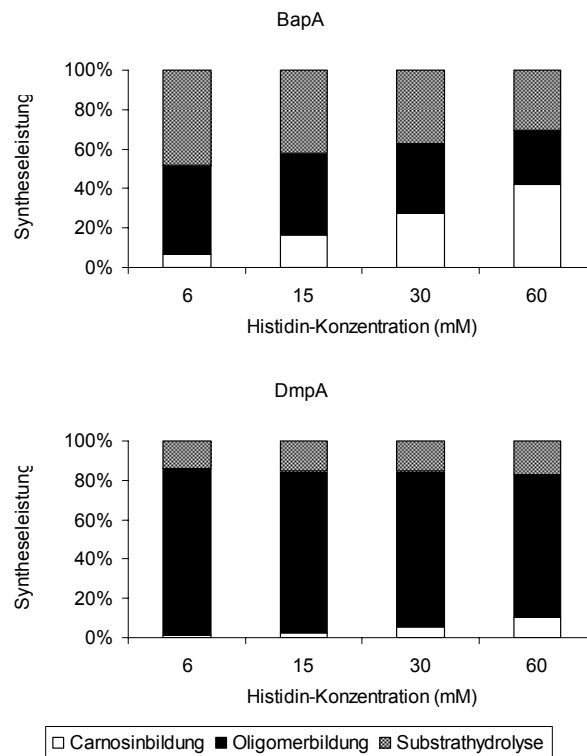


Abbildung 20:

Relative Startgeschwindigkeiten von Carnosinbildung und Nebenreaktionen (Substrathydrolyse und Oligomerisierung des Acyl donors) bei der BapA- und DmpA-katalysierten Carnosinsynthese aus 6 mM H- β hGly-NH₂ und verschiedenen Histidinkonzentrationen. Alle Reaktionen wurden in einem 100 mM Carbonatpuffer bei pH 10 durchgeführt.

4.9.4 Kinetik der Carnosinsynthese (Eawag)

Durch den Einsatz eines hohen Überschusses an Histidin konnte die Bildung von Nebenprodukten reduziert und die Effizienz der Synthesereaktion deutlich gesteigert werden. Mit DmpA erreichten wir eine Carnosinausbeute von knapp 40% bei einer maximalen spezifischen Aktivität von 16 U/mg Protein. Im BapA-katalysierten Reaktionssystem erreichten wir Carnosinausbeuten von mehr als 50%, die spezifische Syntheseaktivität war allerdings mit maximal 0.48 U/mg Protein deutlich geringer (Abbildung 21).

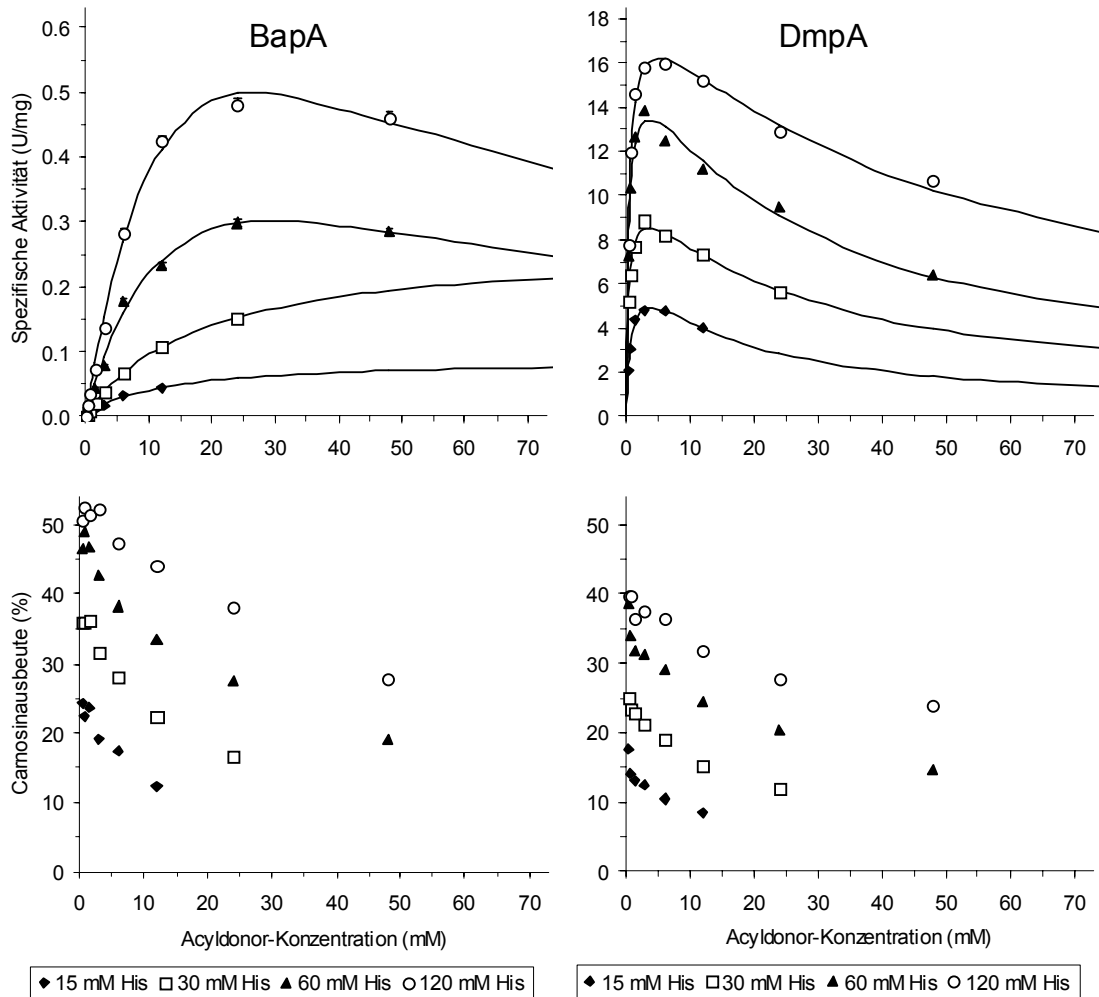


Abbildung 21:

Synthese von Carnosin katalysiert durch die Enzyme BapA und DmpA. Die Graphen stellen die gemessenen spezifischen Aktivitäten der Carnosinbildung (oben) und die maximal erreichten Ausbeuten an Carnosin (unten) bei verschiedenen Konzentrationen der Substrate H- β hGly-NH₂ und Histidin dar.

4.9.5 Carnosinsynthese aus H- β hGly-NH₂ und Histidin-Methylester (Eawag)

Da für die Bildung des Acyl-Enzym-Intermediats eine Donoramino­säure mit freiem N-Terminus benötigt wird, setzten wir für unsere Versuche lediglich ungeschützte Donor-Aminosäuren ein. Der Verzicht auf Schutzgruppen hat zur Folge, dass bei der Synthesereaktion neben dem Zielpeptid auch Nebenprodukte durch Kreuzreaktionen gebildet werden, beispielsweise β -Homoglycinoligomere oder H-[β hGly]₂-His-OH. Neben dem Einsatz hoher Überschusskonzentrationen an Histidin ergab sich ein weiterer hoffnungsvoller Ansatz zur Unterdrückung der Nebenreaktionen aus den chemischen Eigenschaften der beiden Substrate. Aufgrund der ähnlichen Dissoziationskonstanten ihrer Aminofunktionalitäten, liegen bei dem von uns gewählten pH-Wert 10 sowohl Histidin (theoretischer pK_a 9.3) als auch β -Homoglycin (pK_a 9.1) als Nukleophil vor, was die Entstehung von Nebenprodukten durch Kreuzreaktionen ermöglicht. Der Einsatz von Histidinmethylester (H-His-OMe), dessen Aminofunktionalität einen theoretischen pK_a-Wert von 7 besitzt, erlaubte das Absenken des pH-Wertes. Die Einstellung des Reaktionssystems auf einen pH-Wert von 8 stellte sich dabei als optimale Bedingung für die DmpA-katalysierte Carnosinsynthese heraus (Tabelle 13).

Tabelle 13:

Vergleich der DmpA-katalysierten Carnosinsynthese unter Verwendung zwei verschiedener Acyldonoren (Histidin und Histidinmethylester) bei verschiedenen pH-Werten. Die Ansätze enthielten 6 mM H- β hGly-NH₂ und 30 mM Acyldonor.

	pH 10 (Acylakzeptor His)	pH 8 (Acylakzeptor His-OMe)	pH 7 (Acylakzeptor His-OMe)
Spez. Aktivität (U/mg)	7.7	11.9	2.8
Carnosinausbeute (%)	18	21	6

In einem Reaktionsmedium bei pH 8 bleibt der nukleophile Charakter des Acylakzeptors (H-His-OMe) erhalten bei gleichzeitiger Protonierung der Aminofunktionalität des Acyldonors (H- β hGly-NH₂). Nebenreaktionen, in denen der Acyldonor selbst als Nukleophil reagiert, konnten somit auf ein Minimum reduziert werden.

Abbildung 22 zeigt vergleichend zwei HPLC-Chromatogramme der beiden Reaktionssysteme unter Verwendung unterschiedlicher Acylakzeptoren. Bei der Verwendung von Histidinmethylester als Acylakzeptor entsteht als Kopplungsprodukt der Methylester von Carnosin, der jedoch unter Zugabe

von NaOH leicht hydrolysiert werden konnte und somit das gewünschte Produkt Carnosin ergab.

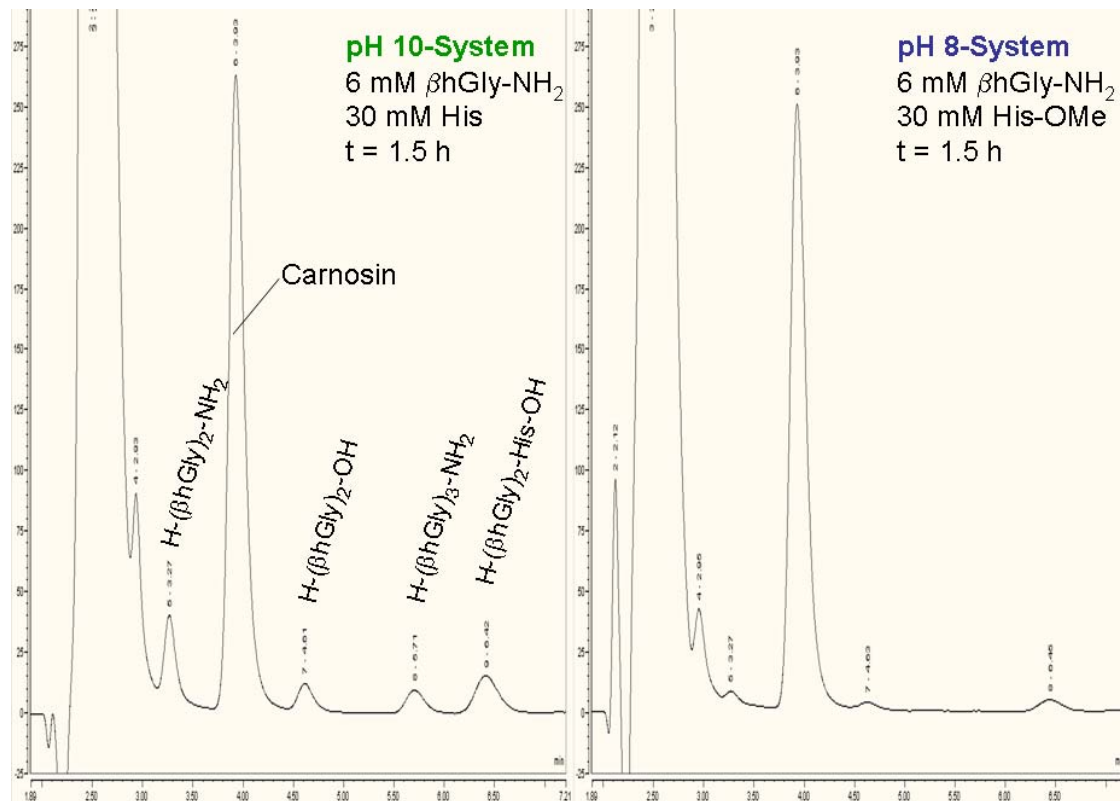


Abbildung 22:

HPLC-Chromatogramme zum Vergleich der bei der DmpA-katalysierten Carnosinsynthese auftretenden Nebenprodukte unter Verwendung zwei verschiedener Reaktionssysteme.

4.9.6 Zufütterung des Acyldonors H- β hGly-NH₂ während der Carnosinsynthese (Eawag)

Um gesteigerte Carnosinausbeuten in der DmpA-katalysierten Synthesereaktion zu erzielen, gaben wir dem Reaktionsmedium kurz vor Erreichen des Produktmaximums weiteren Acyldonor zu. Abbildung 23 zeigt, dass in beiden untersuchten Reaktionssystemen durch die erneute Zugabe von H- β hGly-NH₂ höhere Konzentrationen an Carnosin erreicht werden konnten und das Einsetzen der Produkthydrolyse deutlich hinausgezögert werden konnte.

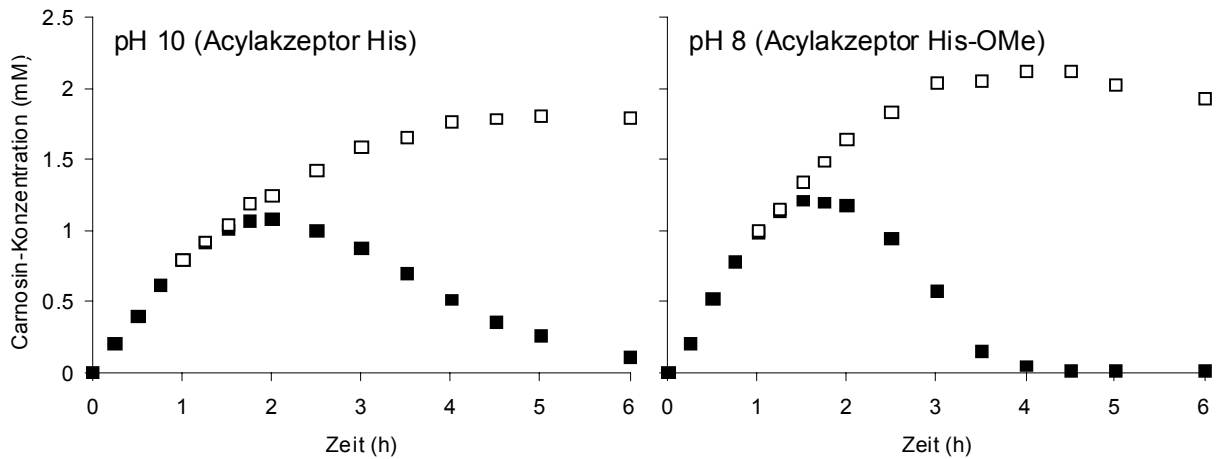


Abbildung 23:

DmpA-katalysierte Carnosinsynthese aus 6 mM H-βGly-NH₂ und 30 mM Histidin bzw. Histidinmethylester (■) und Zufütterung von 6 mM H-βGly-NH₂ nach einer Reaktionszeit von einer Stunde (□).

4.9.7 HPLC-Methodenentwicklung zum Nachweis von β-Alanin-Amid und β-Alanin zur Massenbilanzierung (TU Dortmund)

Die Carnosinausbeute bezogen auf das eingesetzte Edukt β-Alanin-Amid beträgt maximal 50% (Abbildung 40) und es stellte sich die Frage, ob die Ausbeute noch weiter gesteigert werden kann oder ob das Edukt durch Nebenreaktionen verbraucht wurde. Als Standard Analytikmethode kam eine isokratische und auf Ionenpaarchromatographie basierende HPLC Methode zum Einsatz. Mit dieser einfachen und 8 Minuten schnellen TFA-HPLC Analytik war es aber nicht möglich β-Alanin-Amid und β-Alanin in Gegenwart von hohen Überschüssen an Histidin zu detektieren. Deshalb wurde eine weitere Methode entwickelt, mit der das Edukt und auch die Nebenprodukte detektierbar sein sollten. Diese basierte auf der Derivatisierung der Aminosäuren durch Dimethylaminobenzolsulfonylchlorid (DABS-Cl) und Auftrennung mit einem Gradientensystem aus Acetonitril und Wasser. Abbildung 24 und Abbildung 25 zeigen typische Chromatogramme beider Methoden.

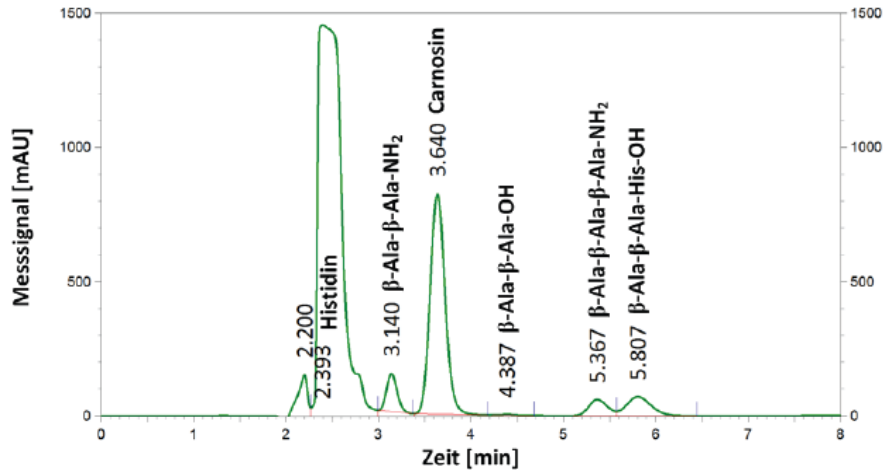


Abbildung 24:

Beispielchromatogramm einer mit der TFA-Methode analysierten Probe. Als Säule diente eine Nucleodur Pyramid C18 Säule, die hohe Stabilitäten auch mit wässrigen Eluenten zeigt. Die Elution erfolgte mit 0,1%(v/v) Trifluoressigsäure (TFA) in Wasser bei 10°C.

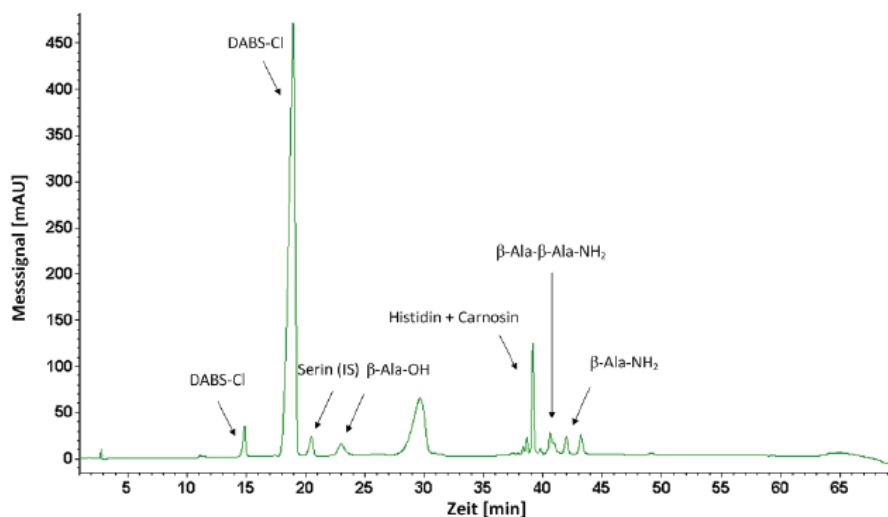


Abbildung 25:

Beispielchromatogramm einer mit der DABS-Cl-Methode analysierten Probe.

Mit der DABS-Cl Methode und zusätzlichen Standards, die von der EMC synthetisiert und bereitgestellt wurden, war es daraufhin möglich, den Reaktionsfortschritt während der Carnosinsynthese detaillierter zu verfolgen. Dabei zeigte sich, dass bereits nach zehnminütiger Reaktion 80% des β -Alanin-Amids verbraucht war, aber erst nach 180 Minuten das Carnosinmaximum auftrat. Aus β -Alanin-Amid werden die Amid-Di- und Trimere als Intermediate gebildet und ein Teil des „späteren“ Carnosins wird aus diesen Nebenprodukten synthetisiert. Das System verliert durch diese Nebenreaktionen einen Teil seiner Amid-Aktivierung. Zum Zeitpunkt des Carnosinmaximums waren nur noch die drei Nebenprodukte β -Alanin, β -Ala- β -Ala-His-OH und β -Ala- β -Ala-OH detektierbar, die keine Aktivierung

(Amidgruppe) mehr trugen. β -Ala-OH und β -Ala- β -Ala-His-OH machen gemeinsam einen Anteil von mindestens 20% des eingesetzten β -Alanin-Amids aus und erklären zum Teil die geringen Carnosinausbeuten, in diesem Experiment ca. 30%.

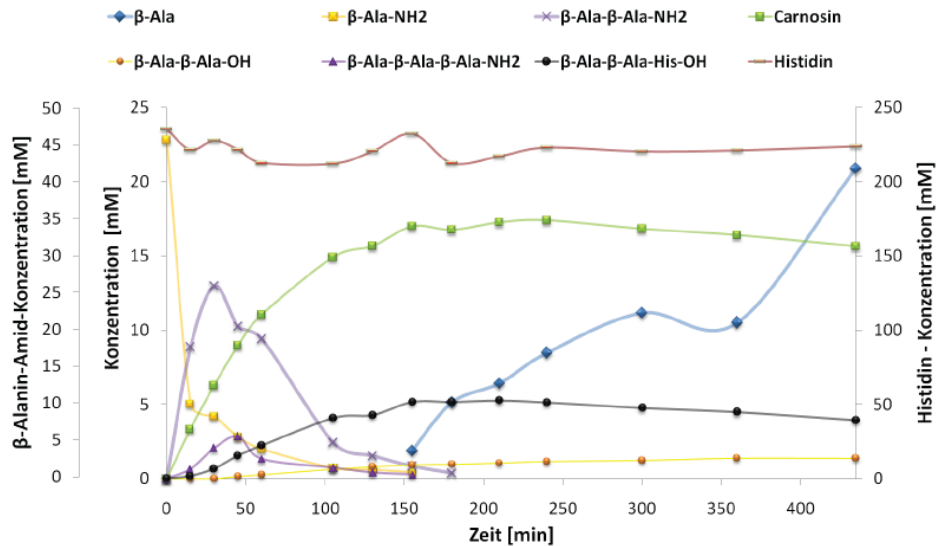


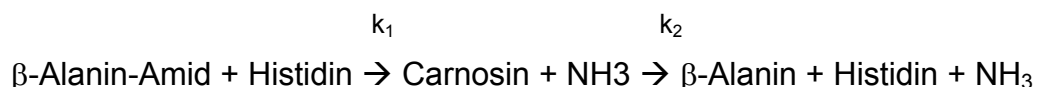
Abbildung 26:

Konzentrationsverlauf aller bekannten Komponenten bei der Carnosinsynthese über die Zeit. Die Konzentrationen von β -Ala-NH₂ und β -Ala, sowie die Konzentration von β -Ala- β -Ala-NH₂ bis einschließlich 60 Minuten Reaktion wurden mit der DABS-Cl Methode bestimmt. Alle anderen Konzentrationen wurden mit der TFA-Methode aufgenommen. Die Reaktion wurde in 100 mM Carbonatpuffer, pH 10 durchgeführt. Die Reaktion wurde bei 37°C und Substratkonzentrationen von 50 mM β -Alanin-Amid und 250 mM Histidin durchgeführt.

Die DABS-Cl Methode bedürfte einer weiteren Optimierung zum besseren Schließen der Massenbilanz, aber die darauf basierenden Ergebnisse konnten zeigen, dass die Nebenreaktionen und Hydrolyse des β -Alanin-Amids die Ausbeuten stark verringern.

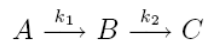
4.9.8 Modellierung der Reaktion mit einem vereinfachten Reaktionsmodell (TU Dortmund)

In einer theoretischen Betrachtung wurde versucht, die zu erwartenden Produktverläufe in einem stark vereinfachten Modell zu beschreiben.



Dabei kann die DmpA katalysierte Reaktion unter der Annahme eines hohen Histidinüberschusses und damit nahezu konstanter Histidinkonzentration während der Reaktion als eine Folgereaktion 1. Ordnung betrachtet werden,

bei der aus β -Alanin-Amid Carnosin als Intermediat gebildet wird. Abbildung 27 zeigt Kurvenschare zum Kinetikmodell bei unterschiedlichen Verhältnissen der Geschwindigkeitskonstanten.



$$\frac{dc_A}{dt} = -k_1 \cdot c_A$$

$$\frac{dc_B}{dt} = k_1 \cdot c_A - k_2 \cdot c_B$$

$$\frac{dc_C}{dt} = k_2 \cdot c_B$$

Die in Batch Versuchen beobachteten Carnosinverläufe ähneln den Verläufen aus Abbildung 27a mit einem Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten von 1, was ähnliche Geschwindigkeitskonstanten für Synthese und Hydrolysereaktion bedeutet (vgl. Abbildung 42). In einem etwas erweiterten Modell wurde ein Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten (Synthese/Hydrolyse) mit 0,97 ermittelt

Aus dieser theoretischen Betrachtung ergibt sich weiterhin, dass der Zeitpunkt des Carnosinmaximums nur von der Enzymkonzentration, aber nicht von der Start-Eduktkonzentration abhängt, während die Höhe des maximalen Carnosintiters direkt von den anfänglichen Eduktkonzentrationen abhängt.

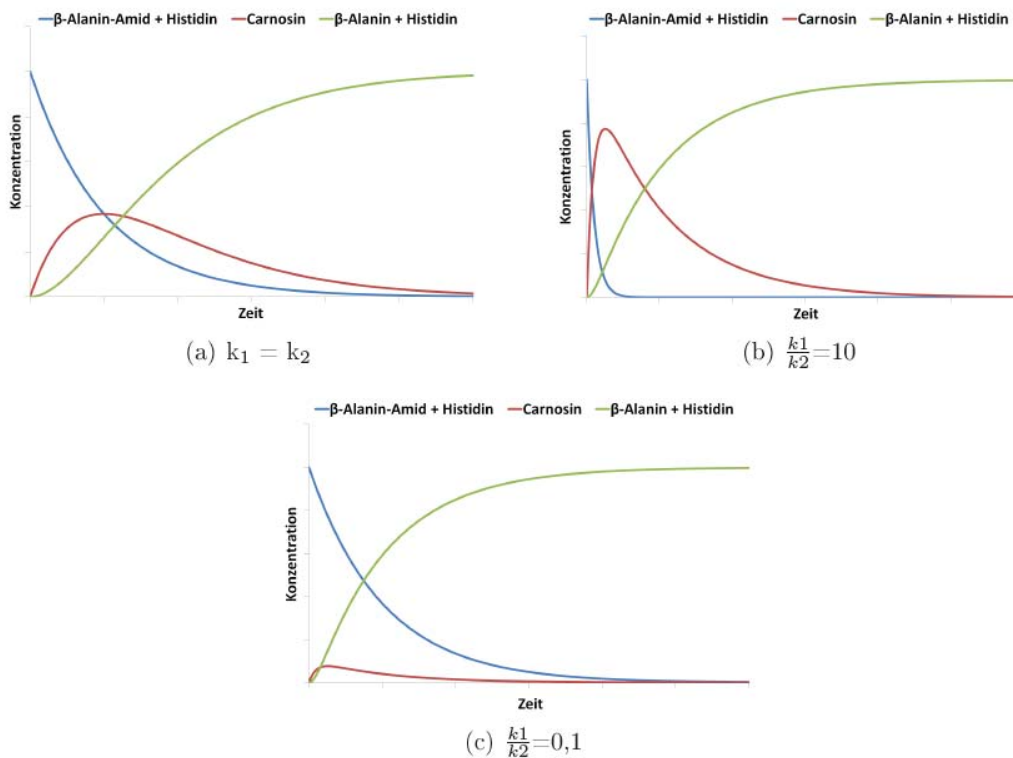


Abbildung 27:

Typische Kurvenverläufe von Folgereaktionen 1. Ordnung bei Variation der Geschwindigkeitskonstanten von Hin- und Rückreaktion.

Betrachtet man das einfache Modell, so wird deutlich, dass die Gesamtreaktion sehr komplex ist und viele Nebenreaktionen auftreten. Das einfache Modell zeigt jedoch auch, dass das Verhältnis von Synthese- und Hydrolysereaktion (k_1/k_2) und damit die Katalysereaktion selbst nicht einfach zu verstellen sein wird. Am ehesten könnte dies durch pH-Wert Variation oder Enzyme Engineering möglich sein, bei dem das Enzym weniger leicht für ein zweites β -Alanin-Amid oder für Wasser zur Hydrolyse zugänglich sein könnte. Auch durch eine optimierte Prozessführung, bei der die β -Alanin-Amid Konzentration stets sehr gering gehalten wird, könnte die Ausbeute gesteigert werden. Eine einfache Zufütterung von β -Alanin Amid im Rührkessel (Fed-Batch) genügt hierzu jedoch nicht, da die Carnosinausbeute bei steigender Carnosinkonzentration sinkt. Dafür könnte eher ein Reaktor mit Pfropfenströmung und Zufütterung von β -Alanin-Amid in geringen Konzentrationen geeignet sein.

4.10 Verwendung von Ganzen Zellen zur Synthese von Carnosin (TU Dortmund)

Zur weiteren Optimierung der Carnosinsynthese in Bezug auf Wirtschaftlichkeit und Umweltfreundlichkeit wurde eine alternative Synthesemethode für Carnosin mittels Ganzer Zellen in Betracht gezogen. Diese Synthesemethode für Carnosin wurde als geeignet eingeschätzt, da die als Substrat dienenden β -Peptide nur durch β -Aminopeptidasen umgesetzt werden können und somit keine kompetitiven oder störenden Reaktionen durch die Zellen angenommen wurden. Ein wesentlicher Aspekt war außerdem, dass durch diese Methode die Aufreinigung der Enzyme entfiel. Im Folgenden wurden die einzelnen Stämme hinsichtlich ihrer Syntheseigenschaften für Carnosin charakterisiert und der geeignete Stamm für ein Up Scale im Fed-batch Prozess herausgestellt.

4.10.1 Hydrolyseaktivität der Produktionsstämme

Tabelle 14 zeigt die Stämme, die hinsichtlich ihrer Hydrolyseaktivität untersucht wurden. Zunächst wurden die Produktionsstämme in Komplexmedium herangezogen und bei Bedarf für vier Stunden induziert. Anschließend wurde ein Teil der Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Darauf fand die Aktivitätsanalyse sowohl der ganzen Zellen als auch des Zellaufschlusses im Aktivitätsassay mit 100 mM Natriumcarbonat-Puffer bei pH 10 statt.

Tabelle 14:
Hydrolyseaktivitäten der Ganzen Zellen und deren Zellaufschlüsse im Vergleich.

Produktionsstamm	Hydrolyseaktivität ² Ganze Zellen [U/g _{CDW}]	Hydrolyseaktivität ³ Zellaufschluss [U/g _{CDW}]	Verhältnis ⁴ GanzeZellen/Zellaufschluss [%]
<i>E. coli</i> BapA	1	3	36
<i>P. putida</i> BapA	7	20	36
<i>P. pastoris</i> BapA (opt)	3	19	17
<i>E. coli</i> DmpA	42	110	38
<i>E. coli</i> DmpA (opt)	71	171	42
<i>P. putida</i> DmpA	208	554	38
<i>P. pastoris</i> DmpA	4	22	19

Die in Tabelle 14 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass alle Produktionsstämme eine Hydrolyseaktivität im Aktivitätsassay aufweisen. Des Weiteren wird deutlich, dass die Hydrolyseaktivität in allen Fällen in Ganzen Zellen geringer als im Zellaufschluss ist. Dies lässt sich durch die Tatsache erklären, dass durch die Zellstruktur in Ganzen Zellen wahrscheinlich eine Transportlimitation durch die Zellmembran vorlag. Hier fällt besonders auf, dass das Verhältnis der Aktivitäten bei Hefen deutlich geringer ist, was vermutlich auch auf die Zellmembran zurück zu führen ist. Es liegt die Vermutung nahe, dass die Hefemembran durch die Synthesebedingungen bei pH 10 deutlich weniger belastet werden, als die der Bakterien und somit eine größere Barriere für den Transport darstellt. Trotz dieser Beobachtung gewährleisten die Bakterien eine intakte Zellstruktur zur Immobilisierung der Enzyme (siehe 4.10.4). Das leicht erhöhte Verhältnis beim *E. coli* Stamm mit dem optimierten DmpA lässt sich aufgrund des Expressionsmechanismus erklären: hierbei wurde ein Expressionsvektor (pET-26b(+)) gewählt, der einen Transport des Enzyms ins Periplasma realisiert (ca. 10% im Periplasma, 90% im Cytosol), wodurch das hier auftretende höhere Verhältnis zu erklären ist.

4.10.2 Carnosinsynthese mittels Ganzer Zellen

Zunächst wurde bei Raumtemperatur und pH 10 evaluiert, ob die Stämme β -Alanin-NH₂ und Histidin zu Carnosin umsetzen. Die in Tabelle 15 angegeben

² Hydrolyseaktivität im Aktivitätsassay unter Verwendung Ganzer Zellen

³ Hydrolyseaktivität im Aktivitätsassay des Zellaufschlusses der in ² verwendeten Zellen

⁴ Verhältnis der Aktivität Ganzer Zellen zum Zellaufschluss

Ausbeuten beziehen sich wie in dem gesamten Bericht auf das kostenintensivere Substrat β -Alanin-NH₂.

Tabelle 15:
Carnosinausbeuten der Stämme *E. coli* DmpA, *P. putida* DmpA, *P. putida* BapA und *P. pastoris* BapA bei einer eingesetzten Aktivität von 0,05 U/mL.

Produktionsstamm	Hydrolyseaktivität [U/g _{CDW}]	Carnosinaktivität [U/g _{CDW}]	Verhältnis [%]	Ausbeute ⁵ [%]
<i>E. coli</i> BapA	1,0	0,2	21	18
<i>P. putida</i> BapA	6,7	1,6	24	16
<i>P. pastoris</i> BapA (opt)	3,2	0,1	4	3
<i>E. coli</i> DmpA	40,1	11,8	29	22
<i>E. coli</i> DmpA (opt)	69,4	28,5	41	26
<i>P. putida</i> DmpA	222,9	63,6	28	20
<i>P. pastoris</i> DmpA	4,2	0,5	11	13

Die Ergebnisse zeigen, dass alle ausgewählten Stämme Carnosin bilden, jedoch die *P. pastoris* Stämme die geringsten Ausbeuten (BapA 3%, DmpA 13%) hatten. In der Theorie sollte jedoch das Verhältnis der Hydrolyseaktivität zur Carnosinaktivität bei den einzelnen Enzymen konstant sein, was jedoch nicht beobachtet werden konnte. Eine mögliche Erklärung für die Beobachtung könnte erneut eine Transportlimitation bzw. die Lokalisation des Enzyms sein, wobei hier vor allem die Verweilzeit des gebildeten Carnosins in der Zelle Einfluss auf die Ausbeute haben könnte. Die Stämme wurden anschließend intensiv unter verschiedenen Prozessbedingungen untersucht, um die günstigsten Parameter für die jeweiligen Stämme zu bestimmen.

4.10.3 Optimierung der Prozessparameter zur Carnosinsynthese mittels Ganzer Zellen

Bei der Optimierung der Prozessparameter wurde der Einfluss der folgenden Parameter auf die Carnosinsynthese untersucht: pH, Temperatur, Induktionszeiten und Substrat.

Es werden hier exemplarisch die Ergebnisse für den *E. coli* Stamm zur Synthese von DmpA (optimiert) erläutert, da dieser zum Schluss auch zum Up Scale der Synthese verwendet wurde und sich im Anschluss der Charakterisierung als geeigneter Stamm herausstellte. Es wurden jedoch alle Stämme in Bezug auf die oben genannten Parameter hin untersucht.

⁵ Bezogen auf das Substrat β -Ala-NH₂

Variation der Induktionszeit

Der Einfluss der Induktionszeit auf die spezifische Aktivität und die Carnosinsynthese wurde geprüft. Die Entwicklung der spezifischen Aktivität bei Variation der Induktionszeit ist in Abbildung 28 aufgezeigt. Wie zu erwarten liegt eine Zunahme der spezifischen Aktivität mit der Zunahme der Induktionszeit vor. Die spezifische Aktivität steigt von 0,025 U/mg_{CDW} nach einer Induktionszeit von 1 h auf 0,47 U/mg_{CDW} nach 6 h Induktion. Anschließend wurden diese Zellen zur Carnosinsynthese verwendet, um den Einfluss der Zellkonzentration auf die Carnosinsynthese zu untersuchen. Die eingesetzte Aktivität war in diesem Experiment stets gleich (0,05 U/mL). Der zeitliche Verlauf der Carnosinausbeute während der Synthese ist in Abbildung 29 veranschaulicht.

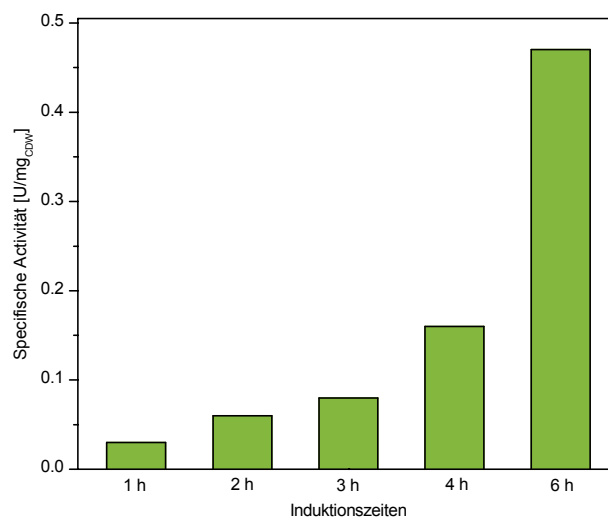


Abbildung 28:

Aufgetragen ist die spezifische Aktivität in Abhängigkeit der Induktionszeit im Aktivitätsassay.

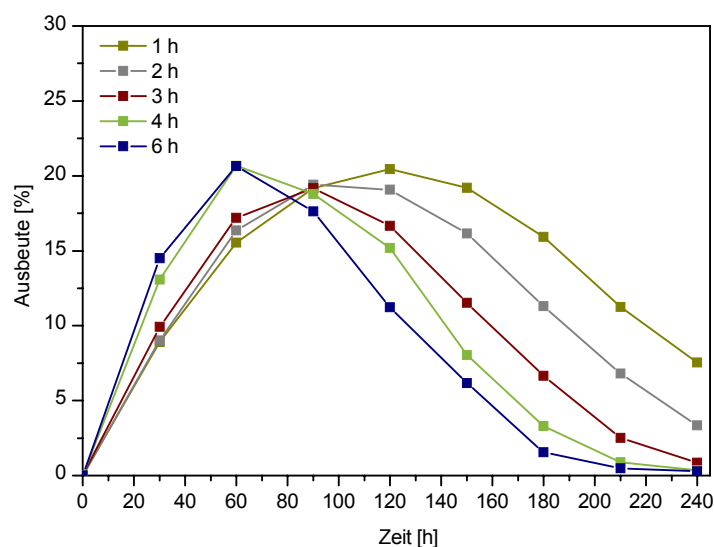


Abbildung 29:

Die gemessene Ausbeute im zeitlichen Verlauf bei dem Einsatz von Zellen, die unterschiedlich lange induziert wurden.

Es besteht ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der eingesetzten Zellkonzentration und der Synthesegeschwindigkeit. Je höher die Zelldichte war -oder anders formuliert: je kürzer die Zellen induziert worden sind-, desto schneller lief die Reaktion ab. Dies ist möglicherweise durch das Verhältnis der Substratkonzentration in der Zelle zur BapA Konzentration zu erklären. Die geringen Abweichungen der Maxima, sind vermutlich durch die Intervalle der Probennahme, wodurch eine exakte Bestimmung des Maximalwertes nicht möglich ist, begründet. Im weiteren Verlauf wurde aufgrund der oben erläuterten Beobachtung eine Induktionszeit von 4 h gewählt.

Temperatureinfluss

Der Einfluss der Temperatur bei der Synthese von Carnosin durch *E. coli* DmpA_{syn} wurde untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 30 veranschaulicht.

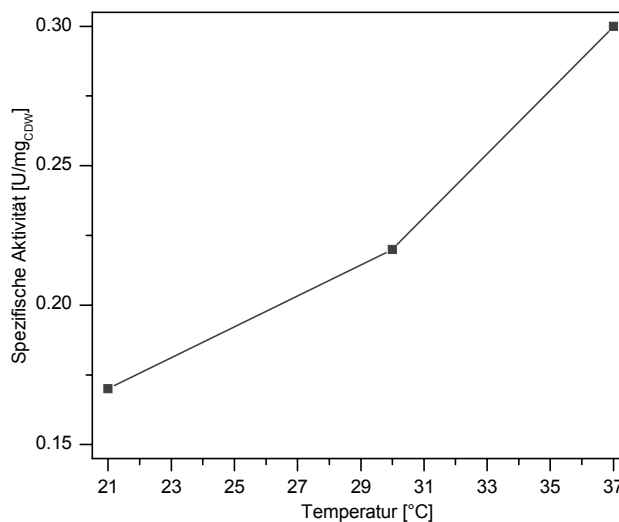


Abbildung 30:

Die spezifische Aktivität des Stammes *E. coli* mit DmpA in Abhängigkeit der Temperatur.

Der erwartete exponentielle Verlauf der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Temperatur nach der Arrhenius Formel ist zu beobachten. Die Ausbeuten bei unterschiedlichen Synthesetemperaturen, in Abbildung 31 dargestellt, unterscheiden sich. Die maximale Ausbeute bei dem Syntheseansatz mit einer Temperatur von 30°C beträgt 25,5%, bei 30°C ist die Ausbeute 20,5% und bei 37°C liegt eine Ausbeute von 23% vor. Eine Tendenz höherer Ausbeute bei höheren Temperaturen ist zu erkennen. Bei symmetrischer Messpunktverteilung vor und nach der maximal gemessenen Ausbeute ist die Nähe zur realen maximalen Ausbeute wahrscheinlich.

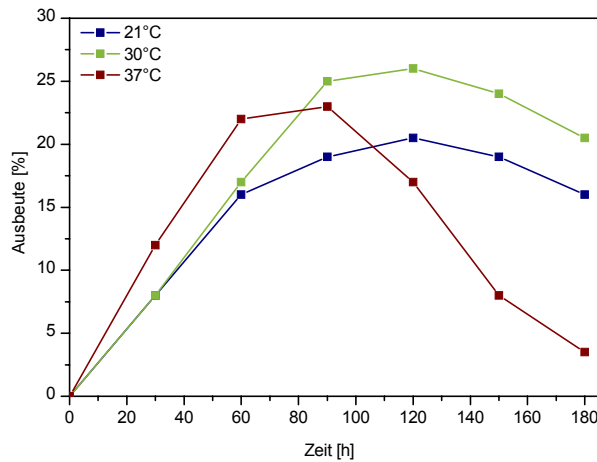


Abbildung 31:
Synthesen bei unterschiedlichen Temperaturen von 21°C, 30°C und 37°C.

Bei Betrachtung der Ausbeutekurve der Synthese bei 37°C fällt jedoch eine stark asymmetrische Verteilung der Messpunkte vor und nach der maximal gemessenen Ausbeute auf. Hier ist die reale Ausbeute vermutlich höher und liegt somit im Bereich der maximalen Ausbeute bei der Temperatur von 30°C.

Einfluss des pH-Wertes

Als nächstes fand eine Betrachtung des pH-Wert Einflusses auf die Ausbeute von Carnosin und Nebenprodukten bezogen auf β -Alanin-NH₂ statt.

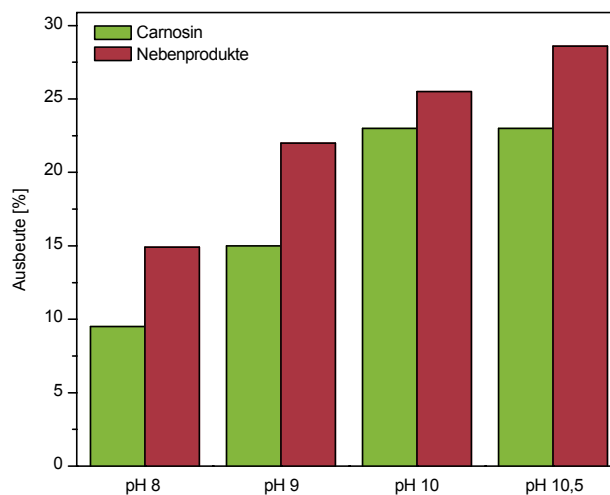


Abbildung 32:
Die auf β -Alanin-NH₂ bezogenen Ausbeuten zu Carnosin und den Nebenprodukten in Abhängigkeit unterschiedlicher pH-Werte.

In Abbildung 32 ist zu sehen, dass die Ausbeute der Nebenprodukte mit steigendem pH-Wert von 14,9% bei pH 8 auf 28,6% bei pH 10,5 steigt. Die Ausbeute an Carnosin stieg zunächst von pH 8 bis pH 10 von 9,5% auf 23%. Bei weiter steigendem pH-Wert auf pH 10,5 stagnierte die Ausbeute. Der Vergleich der Quotienten ergab hierbei das Optimum bei pH 10 mit einem

Verhältnis von 0,86 zwischen Carnosin und den Nebenprodukten. Da die Nebenproduktbildung mit höherem pH-Wert und die Produktbildung bis pH 10 stiegen, kann eine Reduktion der Hydrolysegeschwindigkeit bei steigendem pH Wert angenommen werden.

Verhältnis zwischen Histidin und β -Alanin-NH₂

Der Wahl des Substratverhältnisses liegen zwei Überlegungen zu Grunde: Durch Erhöhung des Verhältnisses von Histidin zu β -Alanin-NH₂ kann das Gleichgewicht auf die Seite des Produkts Carnosin verschoben werden, denn durch eine höhere Konzentration an Histidin ist die Synthese der Edukte gegenüber der Hydrolyse des Produkts Carnosin bevorzugt. Bei Betrachtung des Nebenproduktspektrums in Abbildung 33 fällt auf, dass die Nebenprodukte aus der Reaktion von zwei β -Alanin-NH₂ Molekülen entstehen.

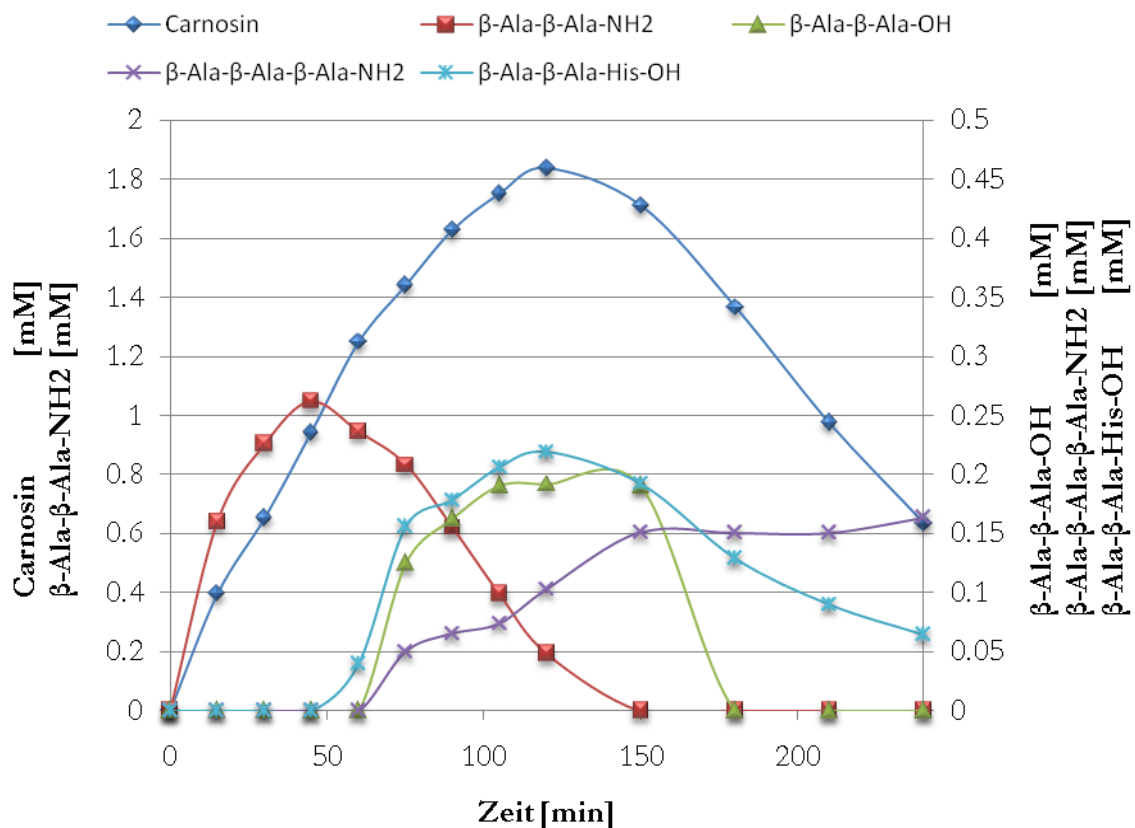


Abbildung 33:

Der zeitliche Verlauf der Konzentrationen an Carnosin und Nebenprodukten bei einem β -Alanin-NH₂ zu Histidin-Verhältnis von 10/50.

Zunächst entsteht das Nebenprodukt β -Ala- β -Ala-NH₂, welches nach 45 min abnimmt. Bei sonst konstanten Bedingungen ist eine Limitierung der Bildung durch β -Alanin-NH₂ wahrscheinlich. Das Nebenprodukt reagiert weiter zu den

Nebenprodukten β -Ala- β -Ala- β -Ala-NH₂ durch Addition eines weiteren β -Alanin-Amids, aber auch durch Reaktion mit Histidin zu β -Ala- β -Ala-His-OH. β -Ala- β -Ala-OH entsteht durch die Kopplung von β -Ala-NH₂ mit β -Ala-OH, das wiederum durch die Hydrolyse von β -Ala-NH₂ direkt zu Reaktionsbeginn gebildet wird. Es liegt somit nahe das Verhältnis von Histidin zu β -Alanin-Amid stark zu erhöhen um die Wahrscheinlichkeit der Reaktion von β -Alanin-NH₂ mit Histidin ansteigen zu lassen und mögliche Nebenreaktionen zu unterdrücken.

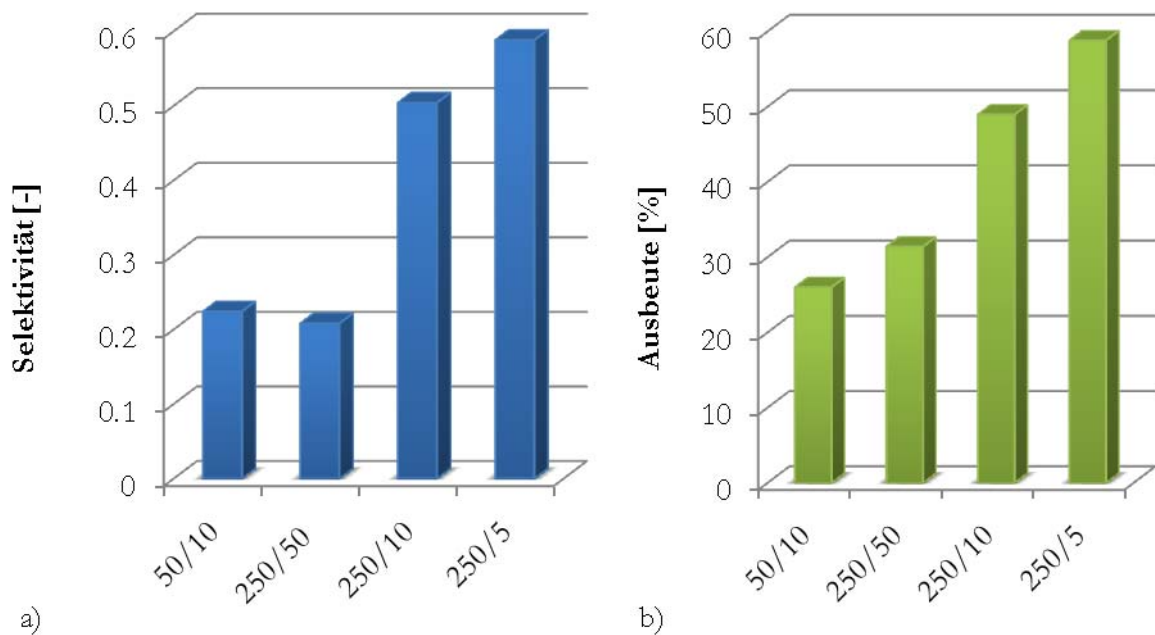


Abbildung 34:

a) Die Selektivität in Abhängigkeit von den Substratverhältnissen. Die Berechnung der Selektivität wurde bei einer Carnosinkonzentration von 2,5 mM durchgeführt. b) Die maximalen Ausbeuten in Abhängigkeit des Histidin zu β -Alanin-Amid-Verhältnisses von 50/10, 250/50, 250/10 und 250/5.

Die Ergebnisse in Abbildung 34a) zeigen eine deutliche Zunahme der Selektivität mit steigendem Histidin zu β -Alanin-NH₂ Verhältnis. Die Selektivität steigt hier von ca. 0,2 bei einem Verhältnis von 50/10 und 250/50 auf 0,5 bis 0,58 bei 250/10 bzw. 250/5. Die Ausbeuten bei einem Verhältnis von 250/10 und 250/5 sind mit 49% und 58% am Höchsten (Abbildung 34). Bei einem Verhältnis von 250/5 werden die Nebenprodukte in geringerem Ausmaß gebildet und die Hydrolyserate ist durch die niedrige Carnosinkonzentration relativ langsam (Abbildung 35)

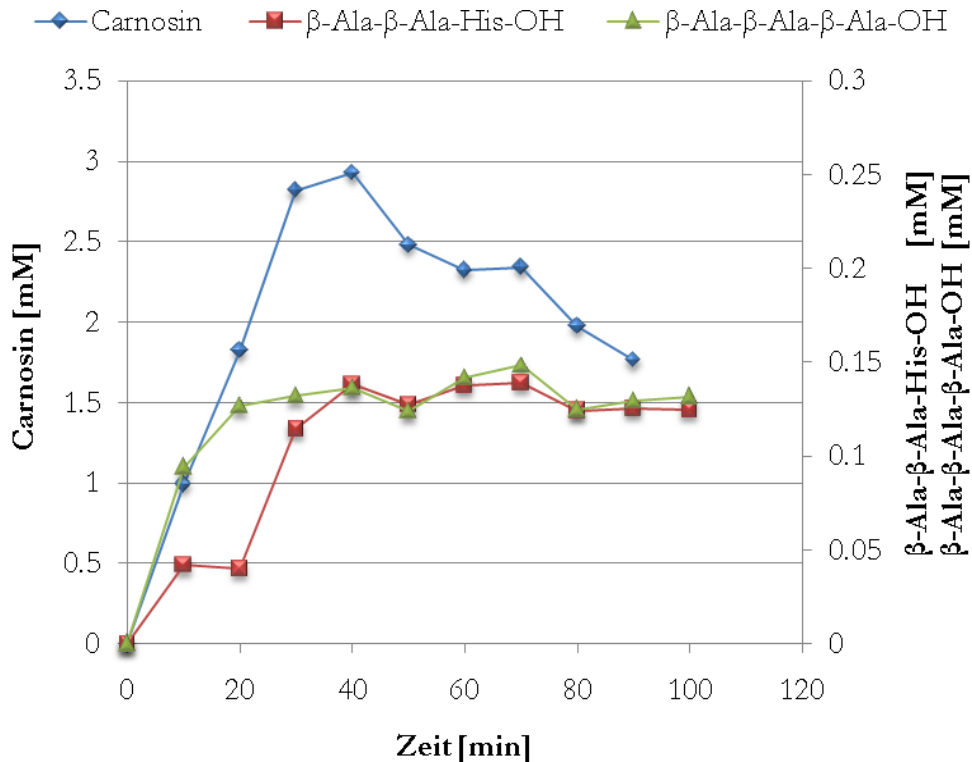


Abbildung 35:

Konzentrationsverlauf des Carnosins und der auftretenden Nebenprodukte bei einem Histidin zu β -Alanin-NH₂ Verhältnis von 250/5. Die Synthese der vorliegenden Abbildung wurde mit einer Aktivität von 0,2 U/mL bei 30°C und pH 10 durchgeführt.

Im Vergleich zu dem Produktspektrum bei einem Verhältnis von 50/10 (Abbildung 33) liegen bei dem Verhältnis 250/5 bei höheren Carnosinkonzentrationen wesentlich weniger und niedrigkonzentrierte Nebenprodukte vor. Das Substrat Histidin ist wesentlich kostengünstiger als β -Alanin-NH₂ und kann im Downstream-Prozess zurückgewonnen werden, so dass hohe Konzentrationen einen geringen Kostenfaktor bedeuten. Die Aufreinigung sehr ähnlicher kurzer Peptidmoleküle ist meist nur unter hohem Aufwand möglich. Da die Ausbeute zudem sehr hoch ist, wurde die Synthese im Fed-batch Prozess zur Steigerung des Produkttiters bei einem Histidin zu β -Alanin-NH₂ Verhältnis von 250/5 etabliert.

4.10.4 Stabilität der Zellsuspension

Die Aktivität im Überstand der Zellsuspension wurde überprüft. Hierzu wurde dem Synthesansatz während der Synthese Zellsuspension entnommen. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert und die Aktivität im Überstand des Mediums bestimmt. Als Referenz wurde die Aktivität der Zellsuspension gemessen.

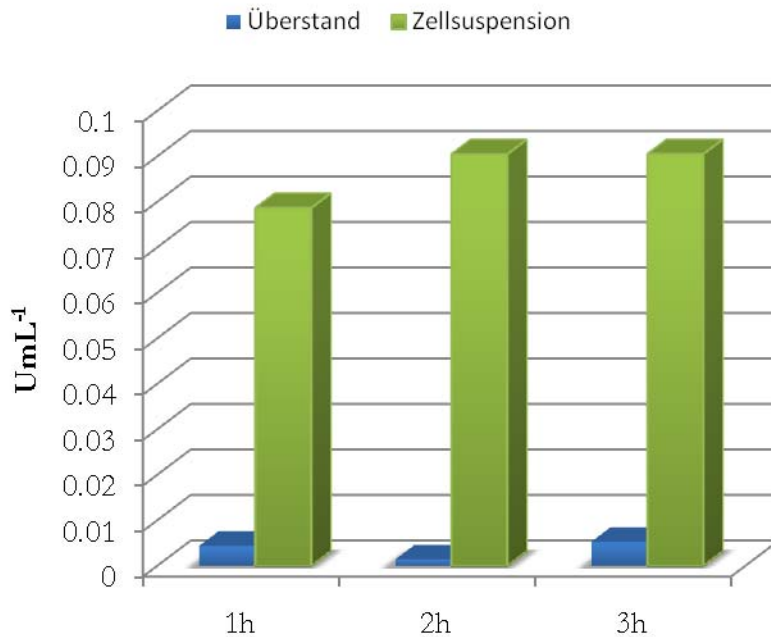


Abbildung 36:
Vergleich der Aktivität im Überstand mit der Aktivität der Zellsuspension.

Die Abbildung 36 zeigt geringe Aktivitäten im Überstand in Relation zur Zellsuspension. Die sehr geringe Aktivität im Überstand, ließ auf freie Enzyme schließen. Die freien Enzyme könnten geringfügig bei der Resuspension der Zellen durch mechanischen Aufschluss entstehen. Ein Lysieren der Zellen durch die Synthesebedingungen bei pH 10 ist eher unwahrscheinlich, da die Aktivität im Überstand nahezu konstant bleibt.

4.10.5 Carnosinsynthese im Fed-Batch Prozess

Die Ganzzellbiokatalyse zur Produktion von Carnosin wurde zur Steigerung des Produkttiters in einem Fed-Batch Prozess durchgeführt. Der Steigerung des Produkttiters muss die Ausbeutereduktion durch die starke Hydrolyse gegenübergestellt werden, da höhere Konzentrationen an Carnosin die Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrolysereaktion steigern. Die Konzentrationen an β -Alanin-NH₂ und Histidin im Reaktor wurden über separate Feedzuläufe konstant gehalten. Die Berechnung ist exemplarisch im nachfolgenden erläutert. Die Volumenströme mit den benötigten Konzentrationen an β -Alanin-NH₂ und Histidin wurden aus den zuvor durchgeführten Batch-Versuchen bestimmt. Aus den Reaktionsgeschwindigkeiten zu Produkt und Nebenprodukten kann hier der Substratbedarf berechnet werden. Die Reaktionsgeschwindigkeiten ergeben sich aus den Steigungen der Konzentrations-Zeit-Verläufe die nachfolgend aufgeführt sind. Die Hydrolysegeschwindigkeit wurde durch die Steigung der abfallenden Carnosinkonzentration bestimmt, die Reaktionen der

Nebenprodukte zu Carnosin sind hier berücksichtigt. Ein Substratverhältnis von 250 mM Histidin zu 5 mM β -Alanin-NH₂ wurde über die Feedzuläufe konstant gehalten. Die Reaktion wurde bei 30°C, pH 10 und einer Aktivität von 0,05 U/mL in 180 mL Reaktionsvolumen durchgeführt.

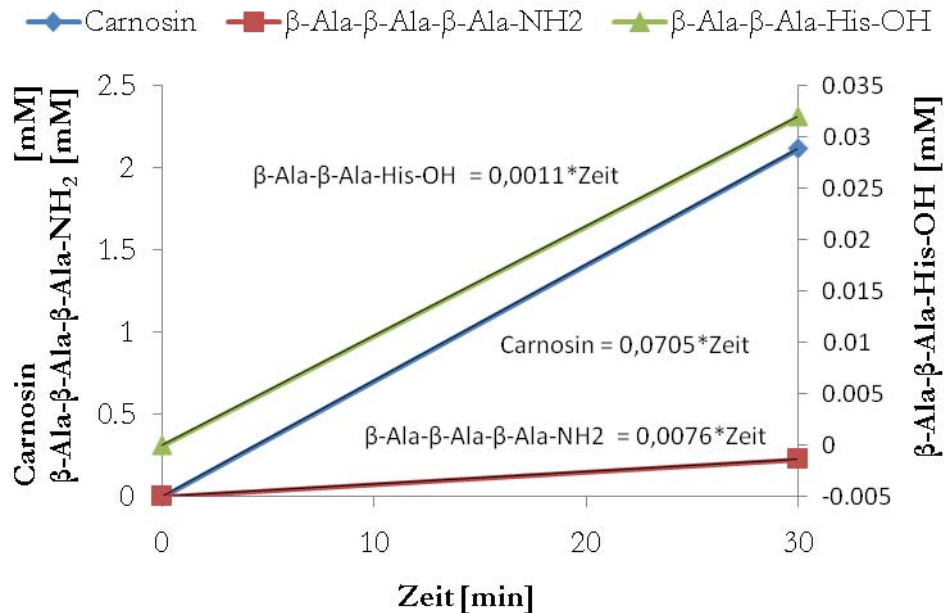


Abbildung 37:

Konzentrations-Zeit-Verläufe von Carnosin und den entstehenden Nebenprodukten im linearen Bereich bei einem His-OH/ β -Ala-NH₂ Verhältnis von 250/5.

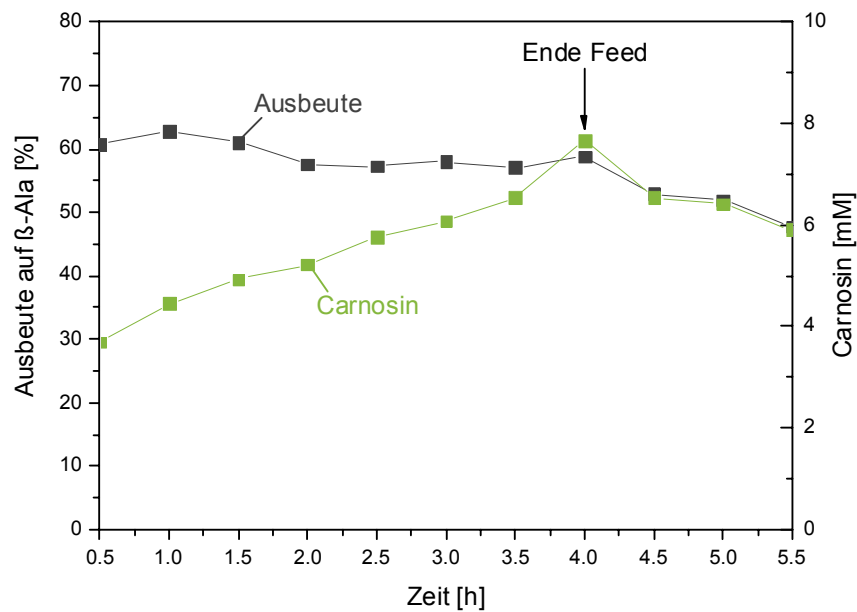


Abbildung 38:

Konzentrationsverlauf des Produktes Carnosin bei einem Verhältnis von His-OH zu β -Ala von 250 zu 5.

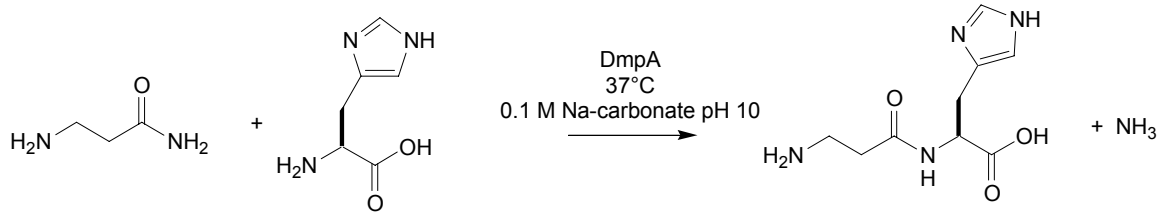
Abbildung 38 zeigt eine maximale Carnosinkonzentration von 7,8 mM nach 240 min Synthese. Die Feedzufuhr wurde nach 240 min gestoppt. Es liegt hier eine nahezu konstante Reaktionsgeschwindigkeit von ca. 0,86 mmol/h vor. Das einzige entstehende Nebenprodukt ist β -Ala- β -Ala-His-OH welches sehr wahrscheinlich aus Carnosin gebildet wird. In einem Syntheseansatz mit Carnosin und β -Alanin-NH₂, ohne Histidin, entstand neben geringen Mengen an β -Ala- β -Ala-OH im Wesentlichen das Nebenprodukt β -Ala- β -Ala-His-OH. Dieses Ergebnis, welches hier nicht präsentiert wird, stützt die These das β -Ala- β -Ala-His-OH aus Carnosin entstanden ist. Die Nebenprodukte, die aus der Reaktion zweier Moleküle des β -Alanin-Amids resultieren, sind nicht vorhanden. Carnosin liegt in Konzentrationen von 3,8 mM nach 30 min bis 7,8 mM nach 240 min vor und steigt in diesem Zeitraum linear an. Die Ausbeute fällt hier bedingt durch die steigende Hydrolysegeschwindigkeit von 61% auf 58%. Der steile Anstieg der Carnosinkonzentration zu Beginn der Synthese ist zum einen bedingt durch eine nicht vorhandene Hydrolyse und zum anderen ist eine Limitierung durch β -Alanin-NH₂ nicht auszuschließen. Absolut wurde hiermit somit am Maximum eine absolute Carnosinmenge von 0,32 g erreicht, was einer Konzentration von 1,75 g/L entspricht. Eine weitere Steigerung der Carnosinmenge wäre insofern im Fed-batch Prozess durchaus realisierbar.

4.10.6 Zusammenfassung der Ganzzellbiokatalyse

Der Stamm *E. coli* mit optimierten DmpA wurde auf Basis der erzielten Ergebnisse als geeigneter Stamm zur Optimierung der Prozessbedingungen und einer anschließenden Umsetzung im Fed-batch Prozess selektiert. Durch die Optimierung konnten gleichzeitig die Ausbeuten wesentlich gesteigert und die Produkttiter erhöht werden. Zudem war es möglich, dass Nebenproduktspektrum deutlich zu reduzieren. Des Weiteren wurde ein Fed-batch Prozesses etabliert, mit dem die Synthese größerer Mengen Carnosin realisiert werden kann. Geeignete Ausbeuten und Produkttiter können nur über eine Wirtschaftlichkeitsrechnung ermittelt werden. Der Ergebnisse zeigen die Möglichkeiten und Ansätze zur Optimierung des Reaktionssystems und der Erweiterung der biotechnologischen Plattform zur Produktion von β -Peptiden auf.

4.11 Up-Scaling der Carnosinsynthese (TU Dortmund)

Folgendes Reaktionsschema diente als Grundlage für die Prozessentwicklung und des Up-Scalings der Carnosinsynthese-Reaktion:



Schema 4:

Enzymatische Carnosinsynthese aus β -Alanin-Amid und Histidin mittels DmpA.

Die Reaktion basiert auf der kinetisch kontrollierten Peptidsynthese ausgehend von einem aktiviertem Substrat (β -Alanin-Amid) unter Bildung des Intermediats Carnosin, welches weiterreagiert und zu den freien Aminosäuren hydrolysiert wird. Bei der Betrachtung des Gesamtprozesses ist es daher wichtig, die Enzymreaktion im Carnosinmaximum abzustoppen bzw. das gebildete Carnosin kontinuierlich aus dem Prozess zu entfernen oder das Enzym aus der Reaktionslösung abzutrennen.

Dies kann auf verschiedene Arten erreicht werden:

- (Ir)reversibles Inaktivieren des Enzyms (pH, Temperatur etc.)
- Ausfällen des Produkts im Reaktor
- Abtrennen von Enzym und Reaktionslösung durch Immobilisierung
- Abtrennen von Enzym und Reaktionslösung durch Ultrafiltration

In den nachfolgenden Kapiteln werden Ergebnisse zur Enzymabtrennung mittels Immobilisierung und Ultrafiltration von DmpA vorgestellt.

4.11.1 Immobilisierungsversuche

Immobilisierung an feste Träger bietet eine einfache und schnelle Möglichkeit, um das Enzym von der Reaktionslösung bei maximaler Carnosinkonzentration abzutrennen. Auch ließe sich dadurch das Enzym für Synthesen wiederverwenden.

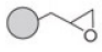
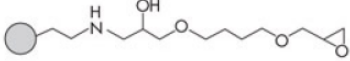
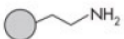
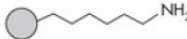
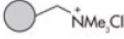
Deshalb wurde versucht, DmpA an verschiedenen Enzym-Träger-Materialien (Sepabeads® von Resindion, Eupergit® von Evonik) kovalent oder absorptiv zu immobilisieren

Trotz sehr umfangreicher Bemühungen gelang es nicht, mehr als 2,5% der eingesetzten Aktivität auf den getesteten Trägern zu erhalten, obwohl mittels Bradford Proteinmessungen und SDS-PAGE Analyse des Überstands gezeigt werden konnte, dass bis zu 95% des eingesetzten Proteins gebunden wurden (Abbildung 39). Auch unter Variation von pH-Wert, Temperatur, Ionenstärke konnten kaum Verbesserungen erreicht werden. Generell war die adsorptive Bindung von DmpA an die Trägermaterialien höher als die kovalente.

Aufgrund der hohen, aber nicht näher untersuchten Aktivitätsverluste des Enzyms wurden weitere Versuche zum Enzymrecycling mittels Ultrafiltration durchgeführt (4.11.4).

Tabelle 16:

Übersicht verschiedener getesteter Sepabeads®-Carrier. Standard Größe: 150-300 µm, Mittlere Größe: 200-600 µm, Durchschnittlicher Porendurchmesser 30-40 nm (Quelle, Resindion Datenblatt <http://www.resindion.com/sepabeadsec/sepabeadsecPI.html>)

Product Name	Functional Group	Functional Group Density
Sepabeads® EC-EP	 Epoxy	min. 1% (dry) = 0.4 % (wet)
Sepabeads® EC-HFA	 Amino- Epoxy	min. 0.5% (dry) = 0.2 % (wet)
Sepabeads® EC-EA	 Ethylamino	min. 0.6 mmol/g wet
Sepabeads® EC-HA	 Hexamethylamino	min. 0.7 mmol/g wet
Sepabeads® EC-Q1A	 Quaternary Ammonium	min. 0.2 mmol/g wet

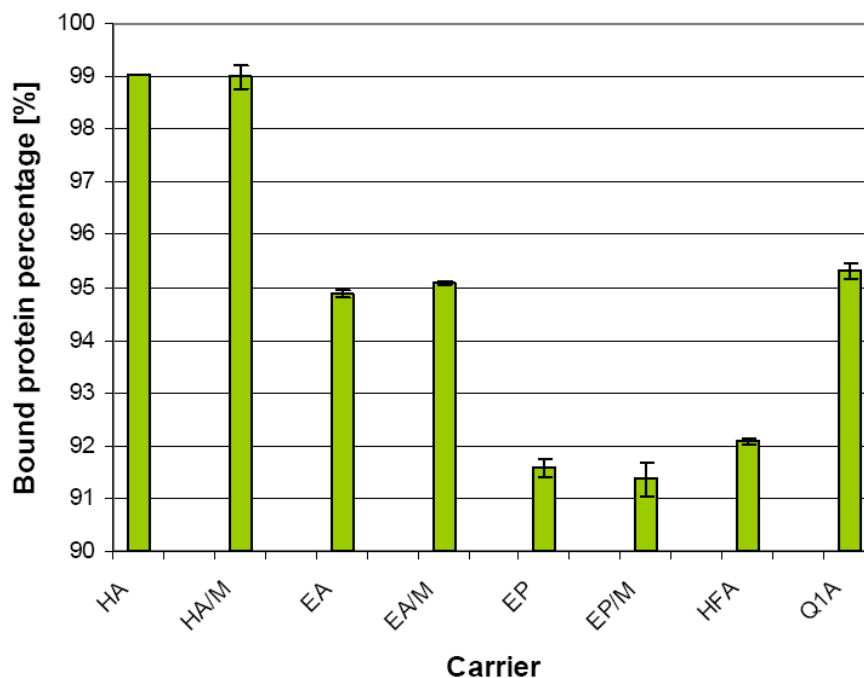


Abbildung 39:

Berechneter Anteil an gebundenem Protein an verschiedenen Trägermaterialien. Die Rechnung basierte auf dem verbliebenen Proteinanteil im Überstand der Immobilisierungslösung.

4.11.2 Batch-Versuche

Zunächst wurde die Synthesereaktion (Schema 4) in 10 ml Batch-Versuchen weiter charakterisiert, bevor in einem Up-Scaling mehr als 1 g Carnosin synthetisiert werden sollte. Abbildung 40 zeigt den Zusammenhang zwischen Carnosinausbeute und Carnosintiter in Batch Versuchen bei unterschiedlichen Startkonzentrationen und molaren Verhältnissen der Edukte β -Alanin-Amid und Histidin. Hohe Syntheseausbeuten von 50% lassen sich nur erreichen bei Histidinüberschüssen von 25-50 zu 1. Gleichzeitig ist es jedoch nicht möglich, im Satzbetrieb so auch maximale Produkttiter (bis zu 20 mM, 4,5 g/l) zu erzielen.

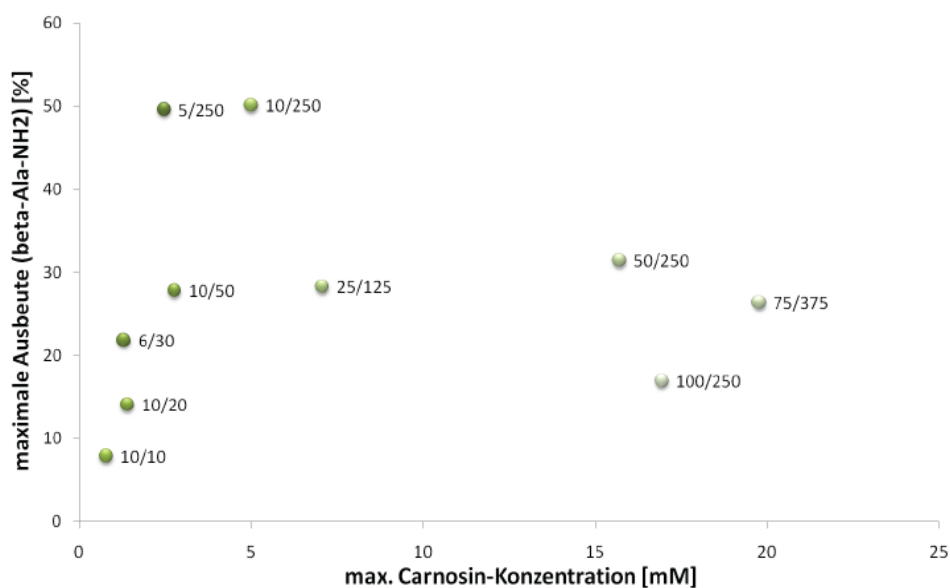


Abbildung 40:

Zusammenhang zwischen Carnosinausbeute und Carnosintiter bei unterschiedlichen Startkonzentrationen und Verhältnissen von β -Alanin-Amid und Histidin im Satzreaktor. Das Wertepaar 5/250 gibt an, dass die Anfangseduktkonzentration 5 mM β -Alanin-Amid und 250 mM Histidin betragen.

Da jedoch hohe Histidinüberschüsse ohne ein Histidinrecycling sehr hohe Kosten und Abfälle verursachen würden, wurden zur Prozessentwicklung überwiegend Synthesen mit einem molaren Überschussverhältnis von 5 zu 1 gewählt. Die Carnosinausbeute bewegt sich dabei im Bereich von 20-30%. Der erzielbare Carnosintiter hängt von der Startkonzentration der Edukte ab und beträgt maximal 20 mM bei 375 mM Histidin und 75 mM β -Alanin-Amid Startkonzentration. Steigerungen des Titors sind mit einem 5:1 Histidinüberschuss nicht mehr möglich, da bei einer Konzentration von 375 mM Histidin bereits an der Löslichkeitsgrenze vorliegt.

4.11.3 Fed-batch

Um einen erhöhten Produkttiter bei einer verhältnismäßig hohen Ausbeute an Carnosin zu erreichen, wurde eine Fed-Batch Reaktionsführung getestet, bei der der Acyldonor β -Alanin-Amid in geringen Konzentrationen (6 mM) nachdosiert wurde. Histidin als Acylakzeptor lag dabei in hohem Überschuss vor (150 mM) vor. Ziel war es hierbei, eine konstante Zunahme der Carnosinkonzentration und damit eine konstante Ausbeute über die Zeit zu erreichen. Abbildung 41 zeigt eine abflachende Zunahme der Carnosinkonzentration in Abhängigkeit der Reaktionszeit. Insgesamt überwiegt während der gesamten Reaktionsdauer die Carnosinsynthese gegenüber der Carnosinhydrolyse. Allerdings nimmt die Gesamtausbeute an Carnosin pro eingesetztem β -Alanin-Amid von 47% auf 30% ab. Aufgrund der stetig steigenden Carnosinkonzentration kommt es zu einer stetig wachsenden Zunahme der Hydrolysereaktion, womit sich das Synthese/Hydrolyse-Verhältnis verringert. Insgesamt bietet somit die Zufütterungs-Fahrweise keinen Vorteil gegenüber einem Batch-Versuch, der bei Eduktkonzentrationen von 35 mM/150 mM gemäß Abbildung 41 ähnliche Gesamtausbeuten liefert.

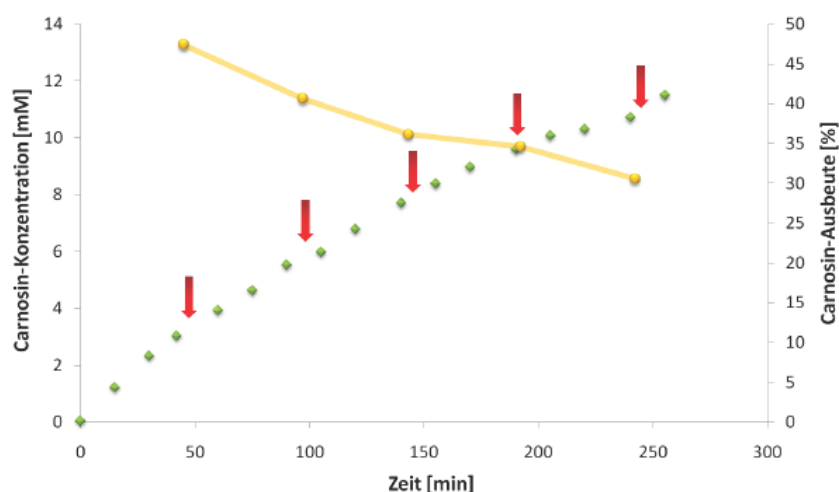


Abbildung 41:

Carnosin-Konzentration (grün) und Carnosin-Ausbeute (gelb) während eines Fed-Batch Versuchs. Rote Pfeile markieren die Zugaben von 6 mM β -Alanin-Amid. Histidin wurde am Anfang mit einer Konzentration von 150 mM vorgelegt.

4.11.4 Wiederholter Enzymeinsatz

DmpA erwies sich in verschiedenen Versuchen als robustes Enzym. Nach 24 h Inkubation bei 55°C verliert das Enzym seine katalytische Aktivität nicht. Auch konnte in einer Versuchsserie gezeigt werden, dass das Enzym nach Abtrennung mittels Ultrafiltration vierfach erneut in der Synthese wiedereingesetzt werden konnte (Abbildung 42 und Abbildung 43). Die

Konzentrationsverläufe verlaufen sehr ähnlich und der Prozess sehr stabil, was für die Vorhersage und das Abstoppen der Reaktion im Maximum wichtige Voraussetzungen sind.

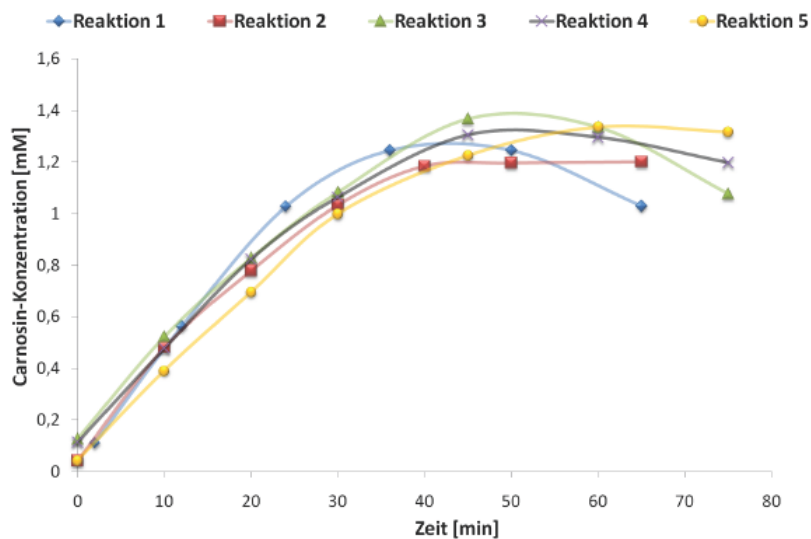


Abbildung 42:

Fünfmaliger Einsatz von DmpA in der Carnosinsynthese. Nach den einzelnen Batch-Synthesen wurde das Enzym in der Ultrafiltrations-Rührzelle (Amicon 8050) abgetrennt und für erneute Synthesen wiederverwendet. Zu Beginn der ersten Synthese wurden 0,38 mg DmpA (technische Reinheit) den 20 mL Reaktionsansätzen hinzugegeben. Die Reaktion erfolgte unter Standardbedingungen bei Raumtemperatur, 6 mM β -Alanin-Amid und 30 mM Histidin. Als Ultrafiltrationsmembran diente eine PM10 Membran aus regenerierter Cellulose der Firma Millipore (Millipore, Billerica, USA) mit 10kDa MWCO.

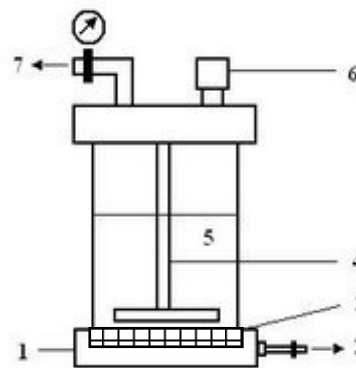


Abbildung 43:

Bild (links) und Schema der Amicon-Ultrafiltrationszelle zur Nutzung des Enzyms im wiederholten Satzbetrieb ("Repeated-Batch"-Enzym Membran Reaktor). Die Amicon-Zelle vereint Reaktor und Filtrationsmodul (Boden) in einer Zelle. Die Reaktionslösung wird mittels Überdruck durch die Membran gepresst und das Enzym verbleibt im Reaktionsraum.

Durch die Möglichkeit des Enzymrecyclings könnte die Carnosinsynthese in kleineren Reaktoren durchgeführt werden. Damit ließen sich einmalig die Installationskosten eines Reaktors und Aufarbeitungssystems senken und der Reaktor könnte in einer Produktionskampagne besser ausgelastet werden.

Zudem könnte so auch dauerhaft der Aufwand und die Kosten der Enzymproduktion (Fermentation und Aufreinigung) gesenkt werden.

4.11.5 2.2 g Carnosinsynthese

Das Up-Scale der Carnosinsynthese und die Produktion von mindestens einem Gramm Carnosin erfolgten aufgrund der ermittelten Prozessstabilität in einem Repeated-Batch Verfahren mit Enzymrückgewinnung bei Raumtemperatur. Die Amicon-Rührzelle (Abbildung 43) diente als Reaktor und Ultrafiltrationsmodul. Hierzu wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils fünf Synthesen zu je 50 ml mit Enzymrecycling durchgeführt. An jedem Tag wurde neues Enzym vorgelegt, jedoch die Filtermembran wurde für alle 10 Reaktionen verwendet (Abbildung 44).

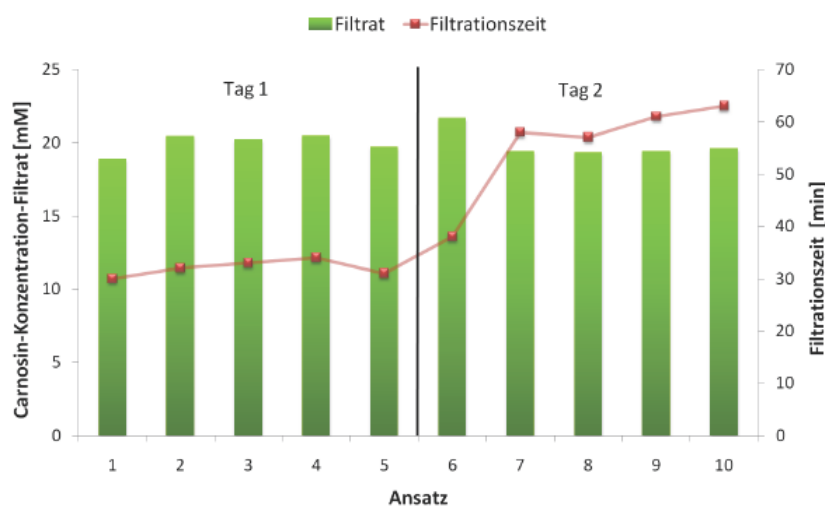


Abbildung 44:

Die Balken geben die Carnosin-Konzentration im Filtrat von zehn Carnosinsynthesen an. Die rote Kurve gibt die Filtrationszeit wieder. Für alle Reaktionen wurde ein- und dieselbe Membran verwendet (regenerierte Cellulose PM10 von Millipore mit 10 kDa MWCO). Enzym wurde jeweils vor Reaktion 1 und Reaktion 6 neu vorgelegt. Das Reaktionsvolumen betrug 50 ml und das Reaktionsmedium enthielt 50 mM β -Alanin-Amid und 250 mM Histidin in 100 mM Natriumcarbonatbuffer von pH 10. Die eingesetzte DmpA Menge zu Beginn der ersten und sechsten Reaktion betrug jeweils 7,15 mg technisch reinem Enzym pro 50 mL Reaktionsansatz. Die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur.

4.11.6 Produktivität der Synthese

Im wiederholten Batch Betrieb mit Enzymrückgewinnung konnten so 2.2 g Carnosin (20 mM, 500 ml) mit der β -Aminopeptidase DmpA im wässrigen Reaktionsmedium synthetisiert werden. Die Produktivität des Prozesses betrug 0,44 g/lh bezogen auf die reine Reaktionszeit und ca. 0,22 g/lh bezogen auf die Gesamtzeit aus Synthese und Filtration. Da die eingesetzte Enzymkonzentration nur 0,15 g/l betrug sollte die Gesamtproduktivität durch

Erhöhung der Enzymkonzentration deutlich (bis Faktor 100?) steigerbar sein. Hierbei wäre allerdings zu beachten, dass das „Abschalten“ der Synthesereaktion durch Enzymabtrennung mittels Ultrafiltration hinreichend schnell geschehen muss, um den Carnosintiter maximal zu halten. Größere Membranflächen oder eine reversible pH-Absenkung sollten helfen, dies zu ermöglichen.

Für Histidin zeigt DmpA eine normale Michaelis-Menten-Kinetik mit einem K_M -Wert von 51 mM und für β -Alanin-Amid eine Substrathemmungskinetik mit einem K_M von 1,5 mM und einem K_S von 95 mM. Durch Absenkung der β -Alanin-Amid Konzentration von 50 mM auf 10 mM während der Batch Synthese würde die Produktivität nur unwesentlich gesteigert (plus 10-20%), allerdings auf Kosten des Produktiters. Die Startkonzentration an Histidin sollte nicht unter 100 mM gesenkt werden, um die maximale Enzymaktivität ($v_{max} = 40$ U/mg) zu gewährleisten. Carnosin selbst zeigte in Tests bis 64 mM Konzentration keine Produktinhibierung und damit negativen Einfluss auf die Aktivität. Durch eine Steigerung der Temperatur von Raumtemperatur auf maximal 55°C sollte es möglich sein, die Aktivität des Enzyms bis um den Faktor 4 zu steigern, wie sich aus eigenen Temperatur-Aktivitätsdaten ergibt. Ausgehend von 0,44 g/lh (10,6 kg/m³d) Syntheseleistung von DmpA könnten so theoretisch Produktivitäten von bis zu 0,44 g/lh x 100 x 4 erreicht werden, was 176 g/lh oder 4.2 t/m³d entsprechen würde. Dies zeigt, dass die Enzymaktivität von DmpA bereits als Wildtyp-Enzym selbst für Umsetzungen im industriellen Maßstab geeignet wäre. Der Fokus bei der Prozessoptimierung sollte daher nun die Langzeitaktivität, optimierte Reaktionsfahrweise (kontinuierlich) oder auch ein Histidinrecycling umfassen.

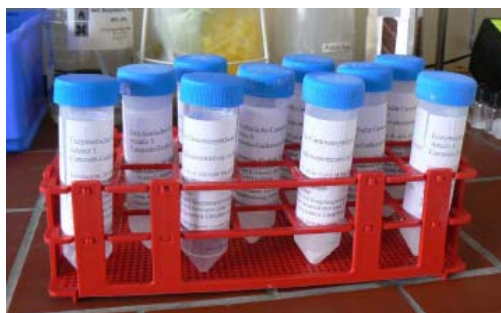


Abbildung 45:

Reaktionslösungen aus der Repeated Batch Synthese mit Enzymrecycling in der Amicon® Filterzelle. Insgesamt enthalten die Falcon Röhrchen ca. 2.2 g an Carnosin in 20 mM Konzentration (4,5 g/l) und 500 ml Volumen. (Foto: EMC microcollections)

4.11.7 Kontinuierlicher Reaktor

Die in den Repeated-Batch Versuchen gezeigte hohe Prozessstabilität von DmpA sollte auf einen kontinuierlichen Prozess übertragen werden, bei dem der Reaktor kontinuierlich am maximalen Arbeitspunkt (Carnosintiter)

betrieben wird und somit über längere Zeiträume eine konstante Produktivität liefert. Dadurch ließen sich Rüstzeiten vermindern und die kontinuierliche Produktion bei hoher Produktivität ermöglichen.

Hierzu wurde ein Enzym-Membran-Reaktor (EMR) aus der Arbeitsgruppe von Prof. Rolf Wichmann (Bioverfahrenstechnik, TU Dortmund) getestet (Abbildung 46). Dieser EMR kombiniert, wie die Amicon-Ultrafiltrations-Rührzelle in Batch Versuchen, Reaktor- und Filtrationseinheit. Das Reaktorvolumen beträgt 10 ml. Als Membran wurden verschiedene NADIR® Polyethersulfonmembranen mit Ausschlussgrößen von 5, 10 und 20 kDa eingesetzt.

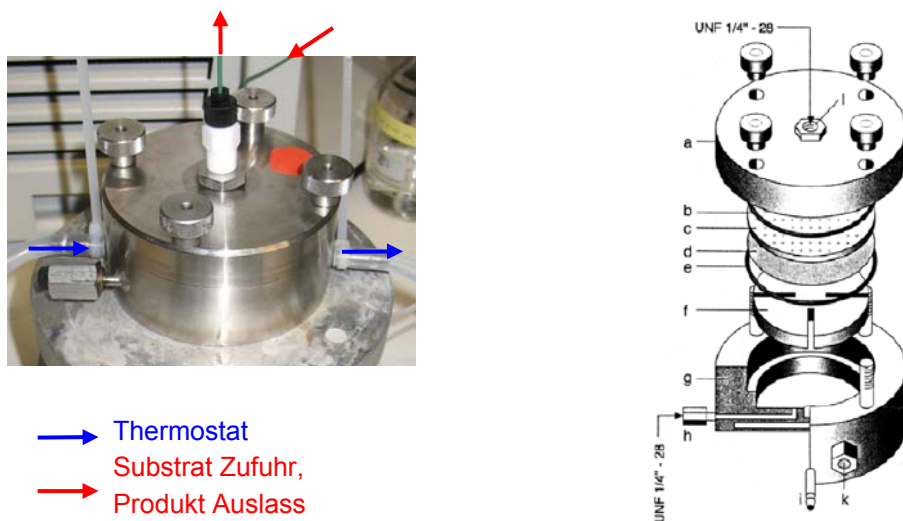


Abbildung 46:

Bild (links) und Schema (rechts) des kontinuierlich betriebenen Enzym-Membran Reaktors.

Tracer-Zugaben zur Messung der Verweilzeit ergaben breite, aber drehzahlunabhängige Antwortkurven. Bei der Carnosinsynthese wäre eine sehr enge Verweilzeitverteilung vorteilhaft, damit alle Volumenelemente den Reaktor nach der gleichen Reaktionszeit und damit mit maximaler Carnosinkonzentration verlassen. Das breite Verweilzeitverhalten des EMR verursachte jedoch im Vergleich zu Batchversuchen mit gleichen Startkonzentrationen ca. 20% geringere Carnosinausbeuten.

In einem Langzeitversuch zeigte sich nach der Einstellphase über einen Verlauf von 28 Verweilzeiten bei konstantem Fluss und konstanter Drehzahl eine Abnahme der Aktivität um 50%. Es konnte gezeigt werden, dass diese Aktivitätsabnahme unabhängig vom MWCO (5, 10, 20 kDa) der benutzten Filtermembran ist und keine Enzymaktivität im Ausfluss detektierbar war. Die errechnete Enzymerhaltung pro Verweilzeit bewegte sich zwischen 97-98,7%. Aus Abbildung 48 ist erkennbar, dass die Aktivitätsabnahme von der Rührerdrehzahl und der Beanspruchungszeit im Reaktor abhängig ist. Durch geänderte Bauform oder Rührergeometrie sollte es möglich sein, den

negativen Einfluss der Scherbelastung auf die Aktivität im EMR zu verringern und die Einsatzzeiten des Enzyms weiter zu steigern. Außerdem vereinfachen konstantere Aktivitäten die Prozessführung und benötigen ein weniger striktes „Online-Monitoring“ und weniger Stelleingriffe.

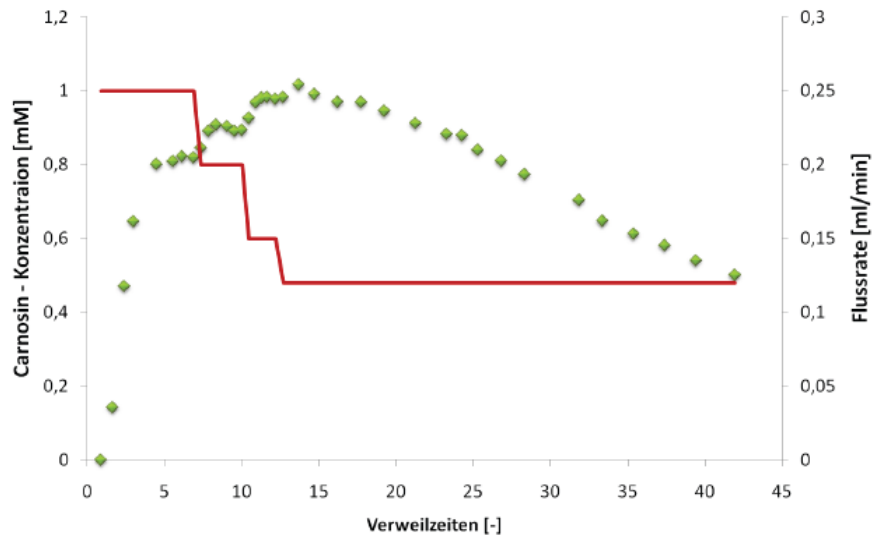


Abbildung 47:

Carnosinkonzentration über die Zeit zur Ermittlung der Langzeitaktivität im kontinuierlichen Enzym-Membran-Reaktor. Für den Versuch wurde eine 10 kDa PES-Membran verwendet. Die anfängliche Enzymmenge betrug 0,14 mg DmpA (20% rein). Der Feedstrom enthielt 6 mM β -Alanin-Amid und 30 mM Histidin in 100m M Natriumcarbonatpuffer von pH 10 bei 37°C.

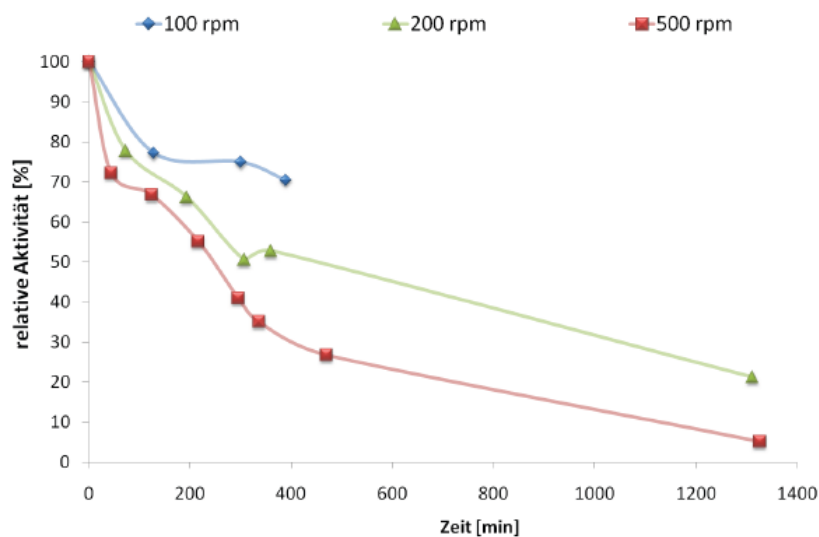


Abbildung 48:

Einfluss der Rührerdrehzahl auf Enzymaktivität im Reaktor. Die Proben wurden aus der Bulk-Phase des Reaktors entnommen und deren enzymatische Aktivität bestimmt

4.12 Carnosinaufreinigung (TU Dortmund und EMC)

Ausgangspunkt für die Entwicklung einer Aufarbeitungsstrategie, um Carnosin möglichst kostengünstig und umweltschonend aus der Reaktionslösung zu isolieren, war der Vergleich der Stoffeigenschaften der beteiligten Komponenten. Außerdem wurde versucht, große Massenströme möglichst frühzeitig abzutrennen. Viele Stoffeigenschaften (Tabelle 17) sind auf Grund der Tatsache, dass es sich entweder um einzelne Aminosäuren (β -Alanin-Amid, β -Alanin oder Histidin) oder kleine Peptide (Carnosin, β -Ala- β -Ala-NH₂, β -Ala- β -Ala-OH, β -Ala- β -Ala- β -Ala-NH₂, β -Ala- β -Ala-His-OH und höhere Nebenprodukte) handelt, sehr ähnlich.

Tabelle 17:
Stoffeigenschaften der wichtigsten Reaktionspartner

Komponente	Löslichkeit in Wasser bei 25 °C [g/kg]	pI	pK			Schmelzpunkt [°C]
β -Alanin	891,0	n.b.	3,51	10,08		200
β -Alanin-Amid	176,0	n.b.	n.b.		n.b.	
Histidin	44	7,6	1,70	6,04	9,09	287
Carnosin	322	8,2	2,51	6,76	9,35	260

Abweichungen hinsichtlich der Löslichkeit und des isoelektrischen Punktes sollten bei der Aufreinigung ausgenutzt werden, um eine erfolgreiche Trennung von Carnosin aus der Reaktionslösung zu gewährleisten und eine Rückführung von Histidin zu ermöglichen.

4.12.1 Charakterisierung der Syntheselösung aus der enzymatischen Carnosin-Synthese (10 parallele Ansätze) (EMC)

In den vom Projektpartner an der TU Dortmund erhaltenen klaren Lösungen aus der enzymatischen Carnosin-Synthese waren keine ungelösten oder entmischten Bestandteile enthalten (4.11.5). Der pH-Wert lag bei 10. Die erwartete Zusammensetzung der Lösung wurde anhand der Angaben zu Ansatz und Synthese-Umsatz berechnet.

Tabelle 18:
Zusammensetzung der Syntheselösung aus Ansatz 1.

Ansatz 1	Konzentration	Masse pro 1 mL
Carnosin	18,8 mM	4,25 mg
β -Alanin-NH ₂	31,2 mM	2,75 mg
Histidin	231,2 mM	35,87 mg
Na ₂ CO ₃	100,0 mM	10,60 mg
Enzymlösung	abfiltriert (10kDA)	–
pH auf 10 eingestellt mit 10 M NaOH		
	Summe	53,48 mg

Die Masse der gelösten Bestandteile entspricht in etwa dem Erwartungswert von 267,4 mg / 5 mL Lösung (Tabelle 18). Die Differenz ergibt sich aus der Zugabe von NaOH, enthaltenen Salzen, gebundenem CO₂ und Feuchtigkeit aus der Luft. Die HPLC-chromatographische Charakterisierung ließ die Aussage zu, dass keine unerwarteten hydrophoben oder längekettigen Bestandteile enthalten sind.

4.12.2 Adsorptionsversuche zur Aufreinigung der Syntheselösung (EMC)

Für die Abtrennung des Reaktionsproduktes Carnosin von den Ausgangsstoffen L-Histidin und β -Alanin-NH₂ sowie den Nebenprodukten wurde die Trennung über AMBERLITE[®] XAD-Adsorber-Systeme in Erwägung gezogen. Die aus einem verbrückten Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer bestehenden Adsorbentien schienen aufgrund ihrer Oberflächeneigenschaften (netzartige Makrostruktur mit großer Porenoberfläche, Oberfläche 800 m²/g, Porendurchmesser 50-500 Å / 0,6-1,8 mL/g, Kapazität 30-100 mg/mL) für die Absorption kleiner polarer Moleküle aus wässrigen Phasen zweckmäßig. Für die Versuche wurden sechs besonders geeignete Adsorbentmaterialien ausgewählt (Tabelle 19).

Tabelle 19:
Eigenschaften der verwendeten Adsorbentmaterialien.

Typ	Lieferant	Korngröße	Porendurchmesser	Einwaage	Quellvolumen
XAD-2	Serva	0,05 - 0,1 mm	90 Å	0,5 g	2,0 mL
XAD-4	Serva	0,05 - 0,1 mm	150 Å	0,5 g	2,0 mL
XAD-7	Serva	0,05 - 0,1 mm	100 Å	0,5 g	2,9 mL
XAD-8	Serva	0,05 - 0,1 mm	350 Å	0,5 g	2,4 mL
XAD-16	Sigma	0,27 - 0,81 mm	250 Å	1 g	1,5 mL
XAD-1180	Serva	0,20 - 1,25 mm	450 Å	1 g	1,4 mL

Die Adsorber wurden entsprechend den oben angegebenen Mengen portioniert, konditioniert und anschließend mit Modell-Lösungen von L-Histidin, β -Alanin-NH₂ sowie einer verdünnten Lösung der enzymatischen Syntheselösung aus Ansatz 2 beaufschlagt. Nach der Inkubationszeit wurde mit Methanol eluiert. Die ermittelte Trockenmasse der Eluate und Adsorbate wurde den beaufschlagten Substanzmassen gegenüber gestellt. Parallel dazu wurden die Lösungen mit HPLC-ESI-MS vermessen. Unter den eingestellten Bedingungen (pH-Wert, Salzgehalt) konnte durch die verwendeten Adsorbentmaterialien keine der drei Verbindungen aus der wässrigen Lösung adsorbiert werden.

In einer weiteren Serie von Experimenten wurde die pH-Wert-Abhängigkeit des Adsorptionsverhaltens betrachtet. Ausgangspunkt dieser Experimente war die Überlegung, dass die stark basischen Verbindungen Histidin bzw. Carnosin an ihrem isoelektrischen Punkt (7,6 bzw. 6,7), d.h. im quasi ungeladenen Zustand, eine stärkere Wechselwirkung mit dem hydrophoben Adsorbentmaterial eingehen.

Exemplarisch wurde dies für eine gepufferte L-Histidin-Modell-Lösung und den am besten geeigneten Adsorber XAD-4 untersucht. Als Elutions-Lösungsmittel wurde das unbedenkliche Ethanol eingesetzt.

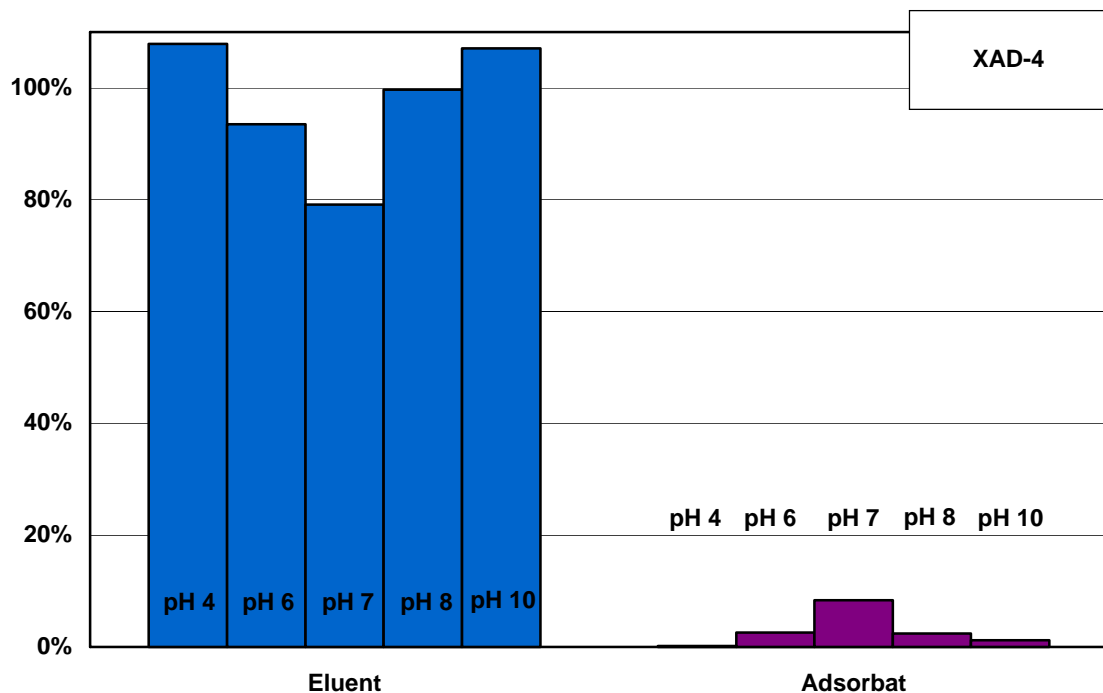


Abbildung 49:
Wiederfindung von L-Histidin in den Eluaten und Adsorbaten.

Ein leichter Adsorptionseffekt ist bei einem pH-Wert von 7 zu erkennen (Abbildung 49). Eine Adsorptionsquote von weniger als 10% ist jedoch für die quantitative Abtrennung von Carnosin nicht ausreichend, zumal neben der Abtrennung der Salzfracht eine vollständige Trennung der beiden chemisch sehr ähnlichen Verbindungen Carnosin und L-Histidin angestrebt wird. Somit hat sich der Weg über polymere Adsorbensysteme als nicht effektiv erwiesen.

4.12.3 Carnosin-Fällung mit Zinkhydroxid

Carnosin wird häufig als Zink-Carnosin Komplex vermarktet und Zink-Carnosin ist physiologisch in geringeren Dosen wirksam als Carnosin. Deshalb wurde versucht, als direktes Endprodukt Zink-Carnosin durch Fällung mit Zinkhydroxid herzustellen. Die Komplexbildung von Carnosin mit Zinkhydroxid bei pH-Werten um 6 und über 7,5 wurde beschrieben (Baran 2000; Forster und Vahrenkamp 1995). Abbildung 50 zeigt ein „Monomer“ des Carnosin-Zink-Komplexes nach Baran.

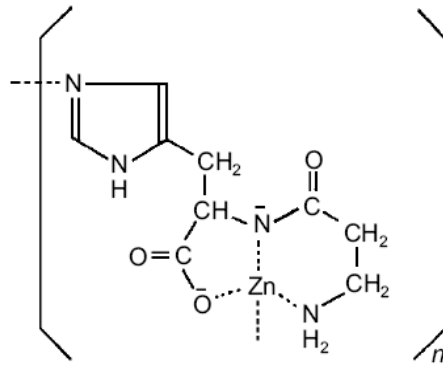


Abbildung 50:
Vermutete Struktur des Zn(II)-Carnosin-Komplexes (Baran 2000).

Eine direkte Fällung von Carnosin aus der Reaktionslösung war jedoch nicht möglich, da der Natriumcarbonatpuffer (100 mM, pH 10) selbst mit Zinkhydroxid eine Ausfällung verursacht. Die Verwendung von Tris-Puffer (50 mM, pH 8) statt Carbonatpuffer ermöglichte eine Fällung von Carnosin aus einer reinen Carnosin-Tris-Lösung. Die Fällungsreaktion zeigt einen zweistufigen Verlauf. In der Anfangsphase ist kaum eine Präzipitation zu beobachten die aber dann, vermutlich mit wachsender „Polymerlänge“, sichtbar wird. Die Komplexierung lässt sich durch eine Erhöhung der Temperatur (von 50°C auf 60°C) oder durch eine Erhöhung des Zn(OH)₂ zu Carnosin Verhältnisses weiter beschleunigen (Abbildung 51).

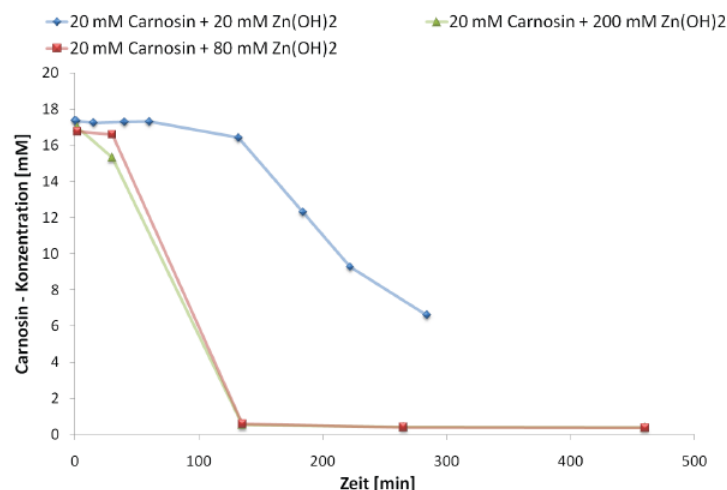


Abbildung 51:
Vergleich der Carnosinfällung mit unterschiedlichen Konzentrationen Zn(OH)₂ bei 50°C in Tris-Puffer, pH 8,0 und 400 UpM.

Die Komplexierung von Carnosin mit Zinkhydroxid wird aber durch die Anwesenheit von Histidin bereits in 20 mM Konzentration stark vermindert. In Gegenwart von 8 mM Histidin können 90% des Carnosins aus der Lösung

komplexiert werden, bei 20 mM Histidin jedoch nur noch 5%. Aus diesem Grund ist eine *in-situ* Produktentfernung aus der Reaktionslösung unter realen Standardbedingungen mit hohen Histidin-Konzentrationen (>200 mM) nicht direkt möglich und Histidin muss vor der Zink-Komplexierung abgetrennt werden.

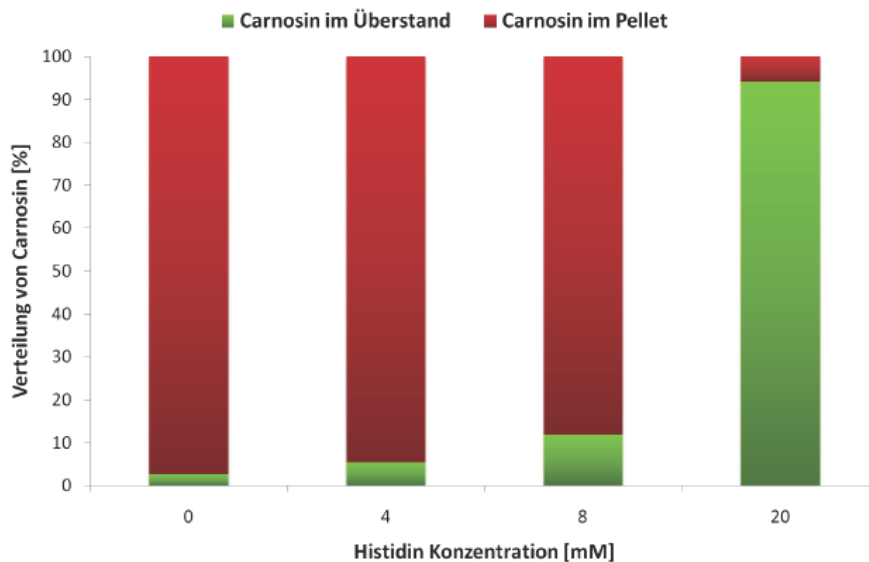


Abbildung 52:

Einfluss der Histidin-Konzentration auf den Anteil der Carnosin-Konzentration im Überstand der Proben bzw. im Pellet. Die anfängliche Carnosin-Konzentration betrug 40 mM, Zinkhydroxid wurde im zehnfachen Überschuss verwendet. Die Reaktion fand in 50 mM Tris-Puffer (pH 8) statt.

Die Löslichkeit von Histidin in Wasser beträgt ca. 15% der Löslichkeit von Carnosin in Wasser. Durch Zugabe von hohen Volumenanteilen an Ethanol, Aceton oder Acetonitril kann die Löslichkeit gesenkt werden und Histidin aus wässrigen/polaren Lösungen auskristallisiert werden, während Carnosin in den auftretenden Konzentrationsfenstern löslich bleibt (Abbildung 53).

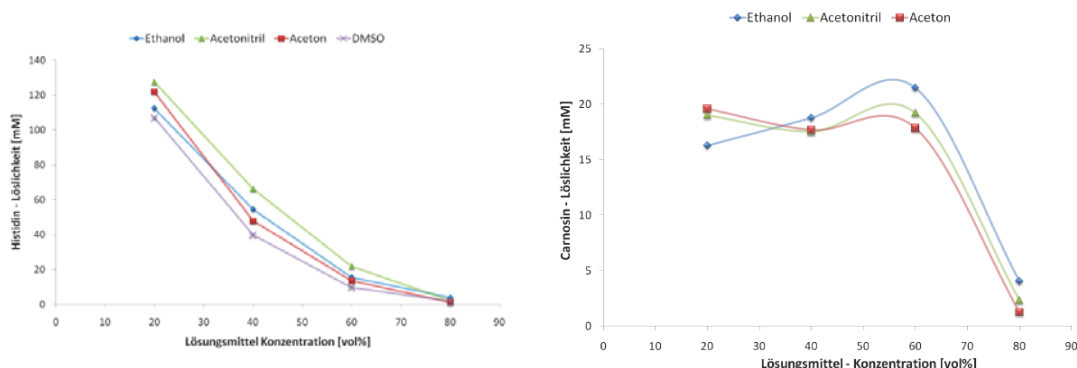


Abbildung 53:

Löslichkeit von Histidin (links) und Carnosin (rechts) in VE-Wasser/org. Lösungsmittel-Gemischen bei 25°C.

Diese Kristallisation sollte am isoelektrischen Punkt von Histidin (pI 7,6) erfolgen, um die Löslichkeit weiter abzusenken. Versuche mit Testgemischen aus Histidin in Wasser bzw. Carnosin in Wasser (oder Puffer) konnten zeigen, dass es so bei einer 80-90% Zugabe von Ethanol (v/v) bei pH 7.7 möglich ist, mehr als 93% von Histidin zu kristallisieren und Carnosin zu 100% in Lösung zu halten (Tabelle 20).

Tabelle 20:

Verbleibende Restanteile an Histidin bzw. Carnosin nach Fällung mit unterschiedlichen Volumenprozenten an Ethanol aus Testlösungen mit 230 mM Histidin plus 20 mM Carnosin in unterschiedlichen bei verschiedenen pH Werten

Ethanol (v/v)	pH 7,7		pH 9,0	
	His-Anteil (%) im Überstand	His-Anteil (%) im Überstand	Carnosin-Anteil (%) im Überstand	Carnosin-Anteil (%) im Überstand
60	13	34	100	94
70	10	35	100	100
80	7	33	100	100
90	4	22	100	100

Durch Kombination von Ethanol- und Zinkhydroxidfällung sollte eine fraktionierte Fällung von Histidin und Carnosin möglich sein. Dazu wurde eine reale Carnosinsyntheselösung mit DmpA in 50 mM Tris, pH 10 und anfänglichen Konzentrationen von 50 mM β -Alanin-Amid und 250 mM Histidin diesem Zwei-Stufenprozess unterzogen.

Nach der Ethanolfällung (90% (v/v)) konnten so in der ersten Stufe 94% des Histidins (230 mM in der Syntheselösung am Reaktionsende) abgetrennt werden, wobei Carnosin nicht ausfiel.

Die Zinkhydroxidfällung mit 10fachem molarem Überschuss an Histidin konnte ebenfalls 94% des gelösten Carnosins (19 mM in der Syntheselösung am Reaktionsende) komplexieren. Zusätzlich wurden noch 23% des noch verbliebenen Histidinanteils nach der Ethanolfällung mitpräzipitiert (entspricht 3.3 mM aus der Syntheselösung am Reaktionsende), ebenso wie Nebenprodukte, vor allem β -Ala- β -Ala-His-OH.

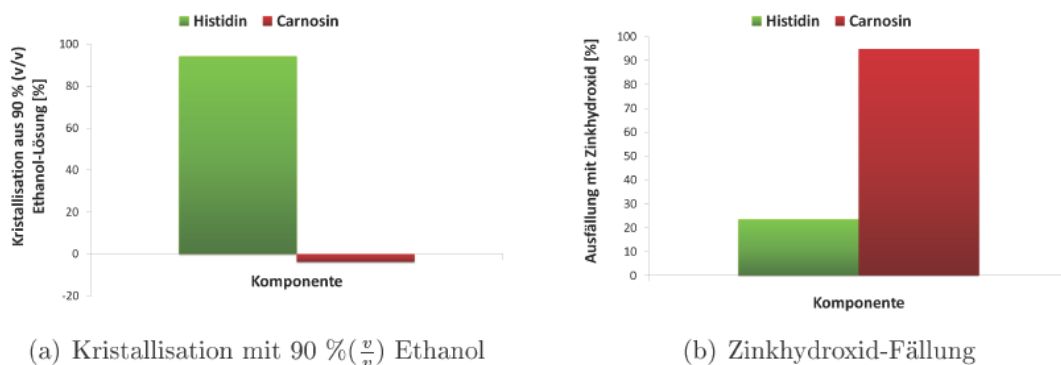


Abbildung 54:

Ergebnis eines zweistufigen Aufarbeitungsversuches aus einer Carnosinsyntheselösung mit DmpA in Tris-Puffer pH 10. Die anfängliche β -Alanin-Amid Konzentration betrug 50 mM. Histidin wurde im fünffachen Überschuss verwendet.

- (a) 1. Stufe – Fällung mit Ethanol über 24 Stunden bei 4°C und pH Einstellung auf 7.6
- (b) 2. Stufe – Komplexierung mit Zinkhydroxid in 10fachem molaren Überschuss bei 60°C für 24 h.

Histidin als natürliche Aminosäure sollte im Endprodukt nicht stören, inwieweit β -Ala- β -Ala-His-OH oder andere Nebenprodukte weiter abgereinigt werden müssen, ist bisher nicht bekannt. Eventuell müssten weitere Aufarbeitungsstufen folgen (z.B. Präparative HPLC).

Zusammenfassend könnte eine mögliche Carnosinaufreinigung wie folgt aussehen:

- Carnosinsynthese in Tris Puffer, pH10
- pH Werteinstellung am Ende der Synthese auf pH 7.6-7,7
- Zugabe von Ethanol mindestens (80 v/v) und Ausfällung/Kristallisation von Histidin → Recycling von 94% des unverbrauchten Histidins
- Zugabe von Zinkhydroxid und Komplexierung und Formulierung von Zink-Carnosin
- Recycling des eingesetzten Ethanols durch Destillation

4.13 Umwelt-Evaluation (TU Dortmund und Eawag)

Der Einsatz von β -Peptidasen in der wässrigen Peptidsynthese sollte am Beispiel der Carnosinsynthese unter dem Aspekt der Ökoeffizienzanalyse bewertet werden. Zwei Patente von Pfizer (Vinick 1982) und von Lonza (Hildbrand 2005), die die organisch-chemische Carnosinherstellung beschreiben, dienten zur Modellierung von Vergleichsprozessen. Die Jahreskapazität der Prozesse wurde mit 1 t Carnosin pro Jahr angesetzt. Der biologische Prozess sollte in einer frühen Entwicklungsphase abgebildet werden, um bei der Prozessentwicklung innerhalb des Projekts wichtige Optimierungsparameter frühzeitig erkennen zu können. Die Hauptziele der Evaluierung waren dabei:

- Erste und einfache orientierende Prozesserstellung/-abbildung
- Kenntnis der Größenordnung von wichtigen Parametern (Abfallindex etc.)
- Identifizierung von Schwachstellen und Optimierungspunkten
- Vergleich der Prozesse und erste Aussagen

Der Rahmen für die Evaluierung der drei Prozesse sollte die Synthese inklusive Aufarbeitung, also von den Edukten bis zum Produkt umfassen, und nicht den gesamten Lebenszyklus abbilden. Die „Vorgeschichte“ der Edukte ist in deren Umweltwertung pauschal miterfasst, ebenso die „Nachgeschichte“ des Carnosins (z. B. Eutrophierungspotential durch Stickstoff). Aufgrund der

häufig aufwendigen und teilweise mit großen Massenströmen verbundenen Herstellung von Enzymen als Biokatalysatoren wurde die Herstellung des Biokatalysators separat evaluiert. Hierdurch kann der Einfluss der Enzymherstellung gegenüber Synthese plus Aufreinigung abgeschätzt werden. Die detaillierten Arbeitsschritte der einzelnen Verfahren und Annahmen für die Modellierung sind im Anhang dieses Berichts aufgelistet (9.4).

Tabelle 21:
Evaluierungsrahmen der 3 verschiedenen Prozesse

Carnosinsynthese				
Chemische Prozesse			Biologischer Prozess	
Patent Vinick (Pfizer, 1982)		Patent Hildbrand (Lonza, 2005)	Potentieller Carnosin Prozess	
----- Synthese + Aufreinigung		----- Synthese + Aufreinigung	Enzymherstellung + Synthese + Aufreinigung	
Verfahren 1	Verfahren 2		Frühphasen- prozess	Optimierter Prozess

4.13.1 Software und Annahmen

Um die Vergleichbarkeit der verschiedenen Prozesse zu ermöglichen, wurde eine Software gesucht, die es gestattet, sowohl chemische wie biologische Prozesse in äquivalenter und ausreichender Tiefe zu modellieren und neben den Massenströmen (mitsamt Kosten) auch eine Wichtung der eingesetzten Chemikalien und damit Umweltbewertung ermöglicht. Das Anforderungsprofil an die Software umfasste somit folgende Punkte:

- Ökologische und ökonomische Evaluierung
- Möglichkeit der Frühphasenevaluierung mit geringer Detailtiefe
- Von den Edukten bis zum Produkt (Synthese plus Aufreinigung - aber kein vollumfassendes Life Cycle Assessment „from cradle to grave“)
- Abbildbarkeit von chemischen und biotechnologischen Prozessen in gleicher Tiefe
- Einarbeitungszeit und Bedienbarkeit der Software
- Zeitaufwand und Gesamtkosten der Evaluierung

Tabelle 22 vergleicht verschiedene Softwarepakete. Es zeigte sich, dass sich die Softwarelösungen in Preis, Modellierungsgrad (Tiefe, chemische/biologische Prozesse), Gewichtung und benötigter Vorkenntnisse

stark voneinander unterscheiden. Die Ergebnisse des Softwarevergleichs waren Teil der Veröffentlichung von Eiden und Schmid (2008).

Tabelle 22:
Vor- und Nachteile verschiedener Softwarelösungen zur Evaluierung von Prozessen. (Eiden und Schmid 2008).

Software	Vorteile	Nachteile
Sabento® (ifu Hamburg GmbH)	+ Ökologische, ökonomische und soziale Bewertung + Entwickelt für biotechnologische Prozesse (Fermentation, Enzymkatalyse) + Ökonomische und Ökologische Daten teilweise hinterlegt	– Limitierte Anzahl an Unit Operations
SuperPro Designer® (Intelligen, Inc.)	+ Optimal zur Prozesserstellung + Grosse Anzahl an Unit Operations hinterlegt + Gute grafische Darstellung	– Fehlende ökonomische und ökologische Daten – Keine soziale Bewertung
SEE-Balance® (BASF AG)	+ Ökologische, ökonomische und soziale Bewertung + Ganzheitliche Betrachtung über den Produktzyklus + Evaluierung wird von Experten vorgenommen (Erfahrung + Datenbank)	– Hohe Kosten
EATOS (Dr. Eissen)	+ Erlaubt einfachen Vergleich chemischer und enzymatischer Synthesen + Erfasst umweltrelevante Parameter + Kostenlos	– Keine soziale Bewertung
e!Sankey® (ifu Hamburg GmbH)	+ Einfache Erstellung von Sankey-Diagrammen (Fluss-Diagrammen) + Flexible Visualisierungsmöglichkeiten	- Keine eigenständige Massenbilanzierung/Modellierung (Verknüpfung mit Excel) - Keine ökologische Bewertung von Flüssen und keine Ökoeffizienzanalyse

Zwei verschiedene Softwarelösungen wurden für die Ermittlung der Ökoeffizienz der Carnosinsynthese-Prozesse verwendet. Zudem wurde Excel für einfache Massenbilanzierungen und e!Sankey für deren graphische Darstellung eingesetzt.

- EATOS (Environmental Assessment Tool for Organic Syntheses)
- Sabento® (ifu Hamburg GmbH)
- Excel® (Microsoft, München) und e!Sankey® (ifu Hamburg GmbH) zur Massen- und Kostenbilanzierung der eingesetzten Materialien.

EATOS erlaubt es als einfache und kostenlose Software, Verfahren anhand der Synthesegleichungen zu evaluieren. Somit bietet EATOS eine schnelle Möglichkeit die bestehenden chemischen und den neuen biokatalytischen Prozess bereits in einer frühen Entwicklungsphase miteinander zu vergleichen. Die Basis, auf der dieses Programm eine Bewertung der Ökoeffizienz durchführt, ist ausschließlich die einer ökologisch gewichteten Massenbilanzierung. Der Energieverbrauch, Kosten für Anlagen und Personal werden bei EATOS nicht erfasst und somit ergibt sich kein umfassendes Bild. Als Vorteil können jedoch schnell neue Szenarien durchgespielt werden und Veränderungen, die beispielsweise durch Enzymrecycling oder Erhöhung der Substratkonzentration erreicht werden, bewertet werden.

Sabento® ist kostenpflichtig, arbeitet assistentengestützt und wurde zur Evaluierung von biologischen Prozessen (Biokatalyse, Fermentation) entwickelt. Es erlaubt, ökologische, ökonomische und soziale Bewertungen zu erstellen. Sabento wurde mit Unterstützung von Prof. Heinzle von der Universität des Saarlandes entwickelt und erfasst einzelne eingesetzte Chemikalien in einem dreistufigem logarithmischem ABC Bewertungssystem, welches verknüpft mit den jeweiligen Massenindices und Wirkklassen zur ökologischen Wichtung der Komponenten benutzt wird (vgl. hierzu Sabento Handbuch) (Heinzle et al. 2006b; Kholiq und Heinzle 2006). Daneben erfolgt auch eine Auslegung von Komponenten (Reaktorgröße, Zentrifuge), die Abschätzung von Energieverbräuchen und Kosten sowie Fragen mit sozialen Gesichtspunkten (z.B. zur Arbeitssicherheit).

In Kooperation mit dem ifu Hamburg (Ansprechpartner: Tobias Brinkmann) erfolgte die Modellierung und Evaluierung der chemischen Prozesse in der Umberto® Umgebung (erweitertes Sabento®), da Sabento® selbst chemische Prozesse nicht abbilden kann. Mittels Sabento® wurde auch die Enzymproduktion von DmpA per Fermentation und Chromatographie bewertet. Hierzu wurde die Software vom ifu Hamburg um ein Chromatographiemodul erweitert. Die Assistentenführung ermöglicht einen einfachen Einstieg in die Prozessevaluierung, kann aber nicht jeden Spezialfall in Prozessen erfassen und abdecken. Auch ist eine nachträgliche Parametervariation und Test von Szenarien nicht immer möglich.

Sofern nicht anders angegeben, wurden folgende Grundannahmen getroffen, um mit der jeweiligen Software die Prozesse zu modellieren:

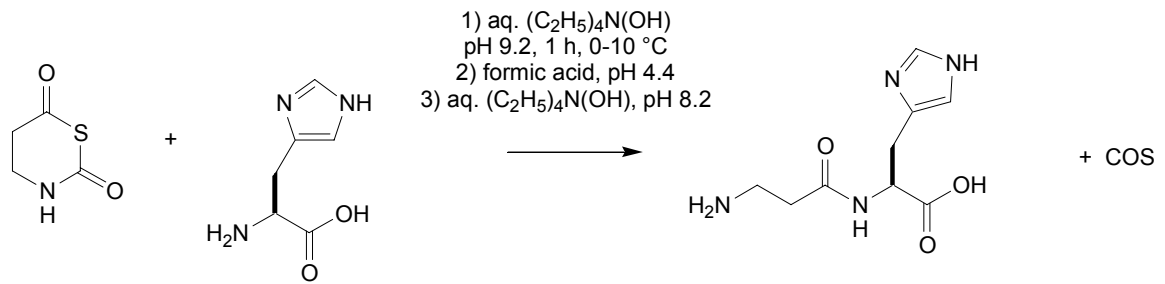
- Von der Synthese des Produkts bis zum aufgereinigtem Produkt (kein Life Cycle Assessment)
- Ökologische Bewertung der Chemikalien in Analogie zu (Heinzle et al. 2006b) nach den ABC Klassen (Siehe Anhang)
- Korrektheit und Skalierbarkeit der Patente
- Ausbeuten kleiner als 100% werden bei den chemischen Verfahren vereinfachend der Aufreinigung zugeschrieben (die Synthese wird mit 100% angenommen)
- Lösungsmittelrückgewinnung
 - Ethanol: 90% Rückgewinnung bei 95% Reinheit
 - Methylenchlorid (CH₂Cl₂): 95% Rückgewinnung bei 99% Reinheit
- Preisabschätzung der Chemikalien:
 - 1/10 der Kosten der Fluka-Katalogpreise
 - Bei gegenwärtigen Bulk-Chemikalien 1/3 der Kosten der Fluka-Katalogpreise
- 1 Tonne Carnosin Jahresproduktion

Gleichzeitig beinhalten die Modelle neben Ihrer Einfachheit und der damit verbundenen geringen Detailtiefe folgende Limitationen:

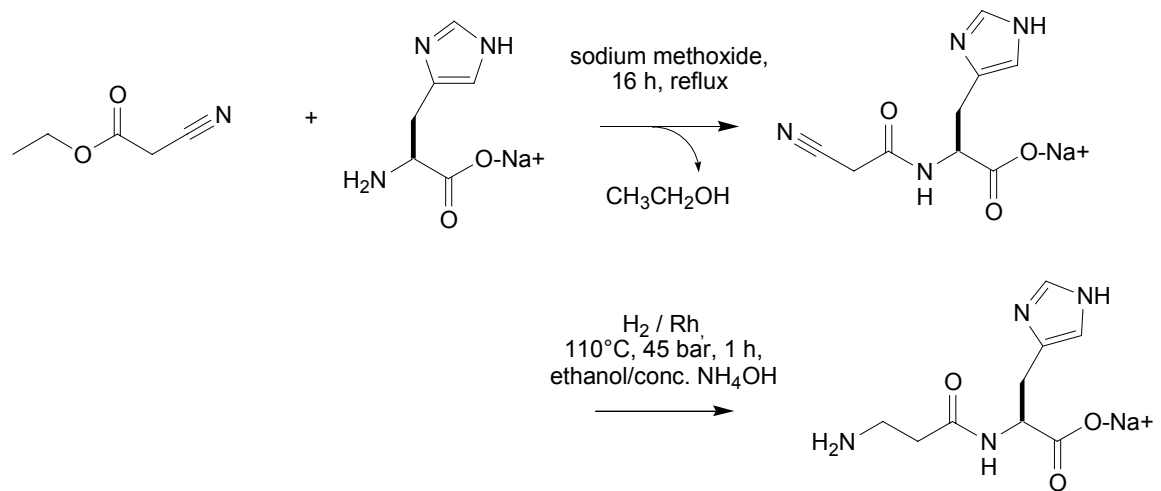
- Fehlende/Unpräzise Angaben der Patente bzw. des biotechnologischen Prozesses
- Stark vereinfachende Abbildung der Prozesse im Modell
- Materialbewertung
 - Teilweise fehlende Kenndaten und Preise
 - Umweltbewertung der Materialien teilweise durch Analogieschluss
- Energieverbräuche häufig nur grob abschätzbar
- Anlagekosten geschätzt

4.13.2 Prozessevaluierung mit EATOS

Auf Grundlage der Angaben in den Patenten von Vinick et al. (US4359416, Pfizer, 1982), Hildbrand et al. (US6878829, Lonza, 2005) und eigener Arbeiten wurden die in Schemata 4-6 (S. 60, 81, 81) dargestellten stöchiometrischen Reaktionsgleichungen in EATOS eingegeben. Das Patent von Hildbrand (Schema 6) beschreibt eine zweistufige Reaktion, aber wurde der Einfachheit halber unter Wahrung der korrekten Stöchiometrie und Berechnung der Gesamtausbeute zu einer einstufigen Reaktion zusammengefasst. Für die enzymatische Carnosinsynthese wurde der Frühphasenprozess modelliert.



Schema 5:
Reaktionsgleichung für die Carnosinsynthese nach Vinick.



Schema 6:
Reaktionsgleichung für die Carnosinsynthese nach Hildbrand.

Die Preise für die Chemikalien wurden unter den oben getroffenen Annahmen eingegeben (4.13.1, 9.4.4). Bei den zwei Prozessen, die Katalysatoren benötigen, wurde angenommen, dass die Katalysatoren jeweils zu 100% wieder verwertet werden können. Als Basis für die Berechnung der Ökoeffizienz dienten folgende Kennzahlen:

S ⁻¹	Massenindex	Input (kg) / Produkt (kg)
E	Umweltfaktor	Abfall (kg) / Produkt (kg)
EI _{in}	Umweltindex	mit Belastungsfaktoren gewichtetes S ⁻¹
EI _{out}	Umweltindex	mit Belastungsfaktoren gewichtetes E
CI	Kostenindex	€ / Produkt (kg)

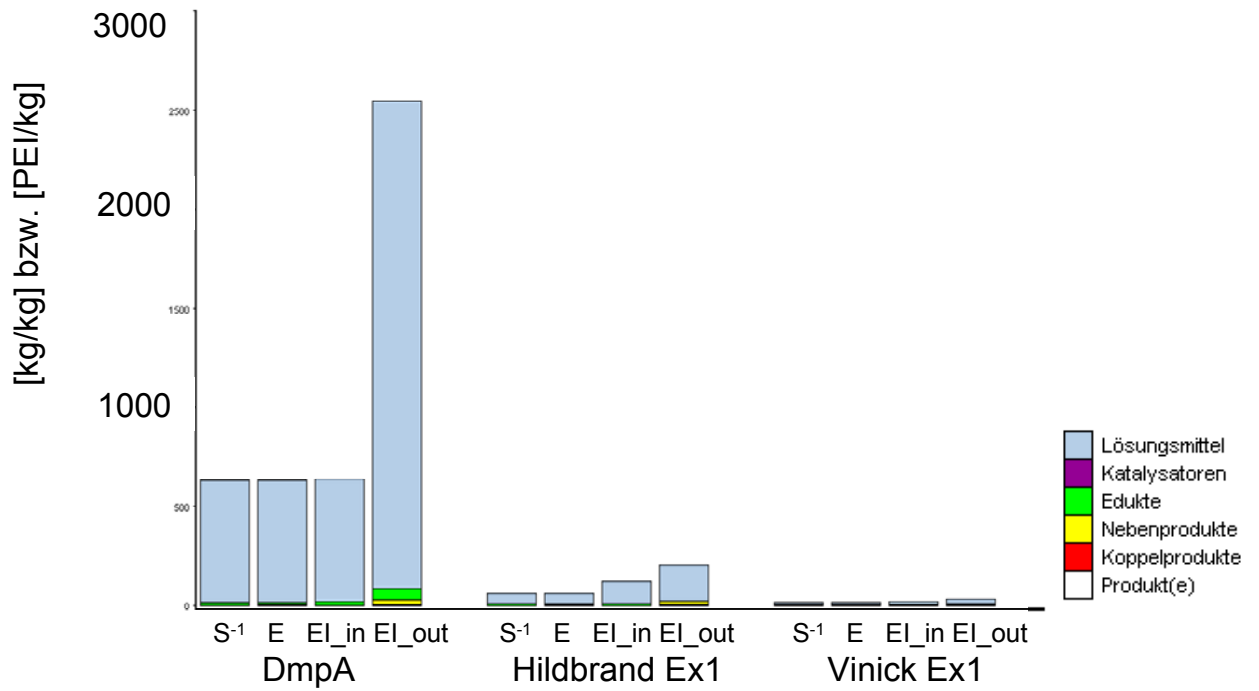


Abbildung 55:
Graphische Darstellung der vier Kennzahlen S^{-1} , E, EI_in und EI_out für die drei untersuchten Prozesse.

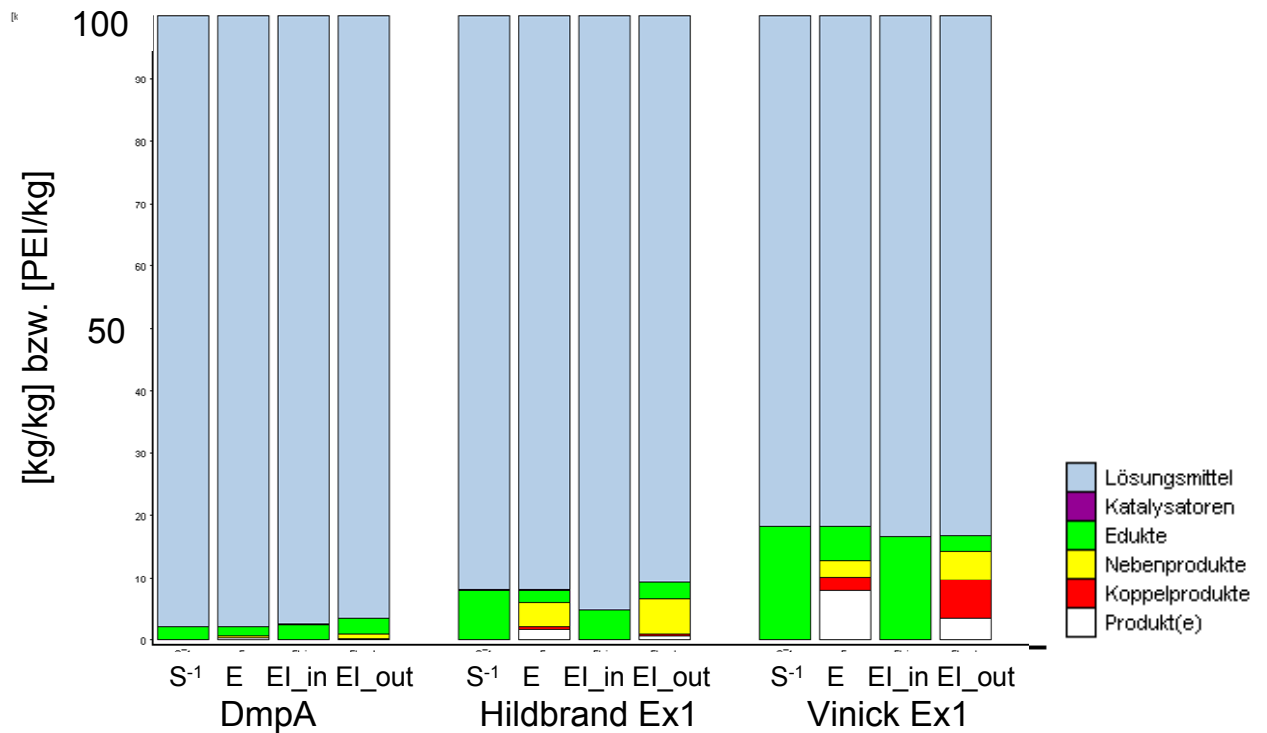


Abbildung 56:
Skalierung der Säulen aus Abbildung 1 auf jeweils 100, um die einzelnen Chemikalienkategorien deutlicher darzustellen.

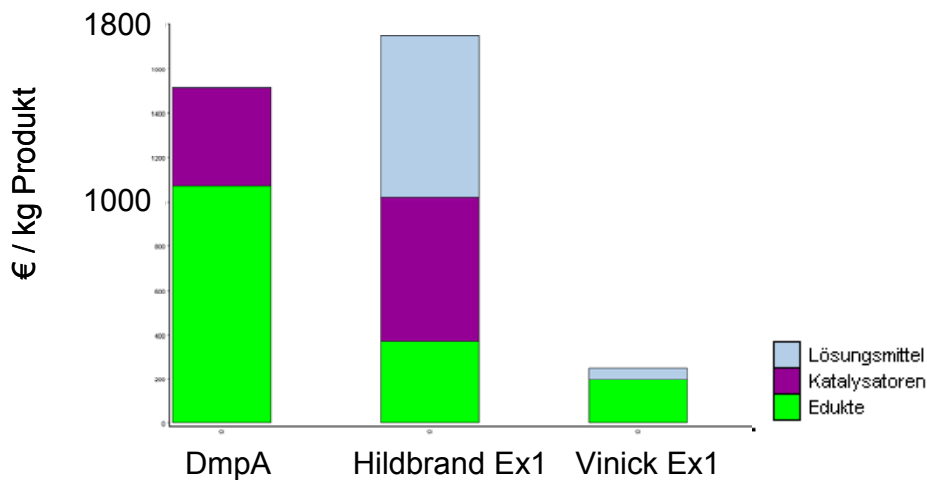


Abbildung 57:
Ökonomischer Index der drei verglichenen Prozesse.

Bei der ökologischen Bewertung zeigt der Vinick-Prozess die geringste Umweltbelastung. 96% der Umweltbelastung im biologischen Prozess verursacht das Lösungsmittel Wasser. Ohne Lösungsmittel wäre die Umweltbelastung statt anstelle von 40mal mal nur ca. dreimal größer als beim Vinick Verfahren. Auch beim Hildbrand Prozess tragen die verwendeten Lösungsmittel (Ethylacetat, Diethylether, Ethanol) stark zur Umweltbelastung. Der ökonomische Vergleich (Abbildung 57) zeigt, dass beim enzymatischen Prozess und beim Vinick Prozess die Edukte den Hauptkostenanteil ausmachen, während dies beim Hildbrand Verfahren die Lösungsmittel und Katalysatoren sind. Mit ca. 1000 €/kg liegen die Eduktkosten beim enzymatischen Verfahren 5mal höher als beim Vinick Verfahren. Bei einem angenommen Carnosinmarktwert von 1145 €/kg Carnosin zeigt sich hier nur der Vinick Prozess anhand des Materialverbrauchs rentabel. Zusammen mit der Umweltbewertung schneidet der Vinick Prozess in der Frühphasenevaluierung ökologisch-ökonomisch am besten ab.

EATOS bietet eine einfache und schnelle Möglichkeit der Prozessbewertung anhand der Synthesgleichung. Die Kernaussagen stimmen dabei gut mit der (viel aufwendigeren) Sabento Bewertung überein (4.13.3) und fehlende Module zur Produktaufarbeitung beeinflussten die Gesamtaussage nicht.

4.13.3 Prozessevaluierung mit Sabento®

Sabento wurde genutzt, um die zwei chemischen Prozesse aufgrund der Daten aus den Patenten von Vinick et al. (US4359416, Pfizer, 1982) und Hildbrand et al. (US6878829, Lonza, 2005) und einen teilweise noch hypothetischen biologischen Prozess (Frühphasenprozess) miteinander zu vergleichen (Tabelle 21). Letzterer wurde dabei in zwei Blöcke, die Biokatalysatorherstellung und die Carnosinsynthese, aufgeteilt.

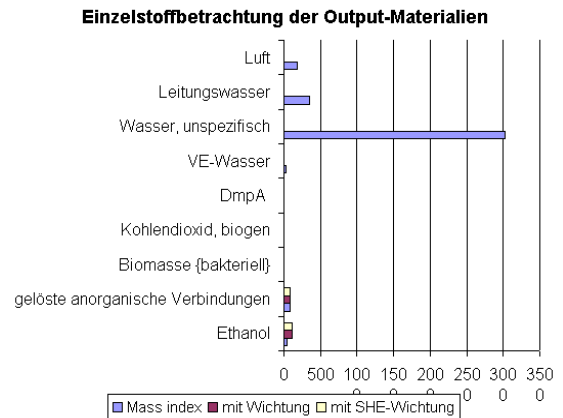
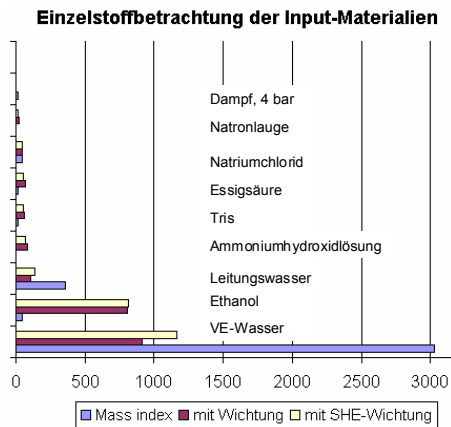
Biokatalysatorherstellung

Die ökologische Evaluierung der Biokatalysatorherstellung mittels Sabento von der Fermentation über eine Einstufenchromatographie bis zum einsetzbaren Biokatalysator zeigt, dass pro kg DmpA Enzym 3,7 t Material eingesetzt werden (Abbildung 58 und Tabelle 23). Dabei macht Wasser mit über 85% den Hauptmassenanteil auf der Input- und Outputseite aus. Unter Beachtung der ökologischen Wichtung bilden Wasser, Ethanol und anorganische Komponenten die Hauptfaktoren. Thermische Risiken (Dampf und Ethanol) formen den größten Wirkungskategorieanteil. Und die Komplexität der Synthese (Enzym, Glucose) sowie Rohstoffverfügbarkeit (Wasser) kennzeichnen die Stoffeingangsseite. Auf der Stoffausgangsseite kommen hierbei Eutrophierung (Stickstoff- und phosphathaltiges Abwasser) und Geruch (Fermentation, Essigsäure, etc.) zum Tragen.

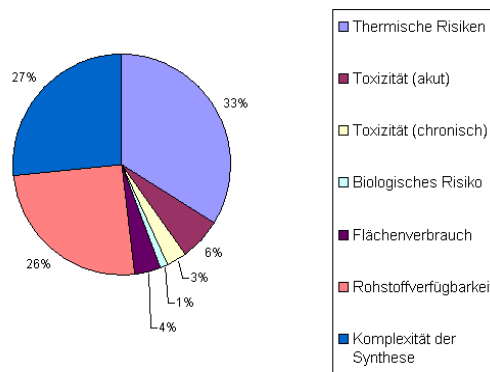
In der aggregierten Umweltbewertungszahl hat die Inputseite einen doppelt so hohen Wert wie die Outputseite. Der Gesamtprozess hat eine errechnete Umweltbewertungszahl von ca. 1400.

Die Biokatalysatorherstellung ist somit ein sehr materialintensiver Prozess. Da jedoch für die Herstellung einer Tonne Carnosin nur ca. 5-8 kg DmpA benötigt werden, ergäbe die Biokatalysatorherstellung für den Carnosinprozess (aus Synthese mit/ohne Aufreinigung) eine zusätzliche Erhöhung des Abfallindex von 18-30 kg pro kg Carnosin. Der Abfallindex des Carnosinprozesses selbst liegt zwischen 235-644 kg/kg Carnosin (Tabelle 23). Die Berücksichtigung der DmpA Herstellung würde diesen um 3% bis max. 13% erhöhen. Dies zeigt, dass die Enzymherstellung im Falle von DmpA keinen großen Anteil am massenbasierten und ökologischen Fußabdruck der enzymatischen Carnosinsynthese haben wird.

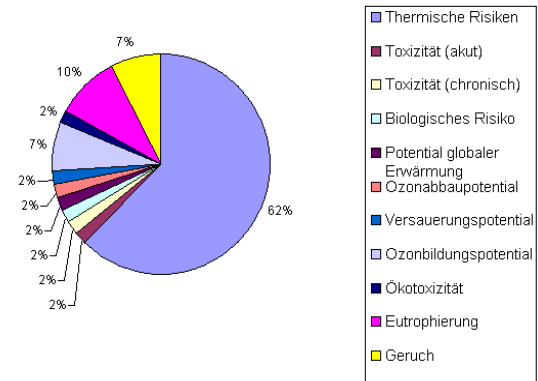
Für andere β -Aminopeptidasen (3-2W4 BapA, Y2 BapA) fiel der Einfluss der Enzymproduktion auf den Gesamtfußabdruck aufgrund im Vergleich zu DmpA deutlich schlechterer Überexpression und deutlich geringerer Carnosinsyntheseaktivitäten viel gewichtiger aus, da hierzu größere Fermentationen zur Herstellung eines Kilogramms Enzym notwendig wären und mehr Enzymmasse in der Synthese eingesetzt werden müsste. Beispielsweise zeigten die Rohextrakte von *E. coli* Überexpressionen für 3-2W4 BapA eine 220fach geringere spezifische Aktivität als für DmpA (Tabelle 9) in der Hydrolyse des Testsubstrats. Somit wäre hier eine Expressionsoptimierung oder eine direkte Enzymsekretion notwendig, damit die Enzymherstellung selbst nicht den größten Beitrag am Abfallindex und der ökologischen Bewertung der Carnosinsynthese leistet.



Wirkungskategorien der Inputseite



Wirkungskategorien der Outputseite



Umweltbewertungszahlen

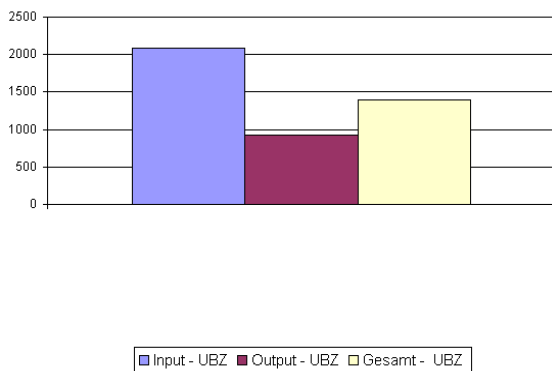


Abbildung 58:

Zusammenstellung der wichtigsten Parameter der DmpA Biokatalysator Herstellung aus der ökologischen Bewertung mittels Sabento®. SHE bedeutet eine weitere Wichtung der Chemikalien unter den Aspekten Safety, Health and Environment zu je 13 : 27 : 60.

Carnosinsynthese (Chemische Verfahren und Frühphasenprozess des biologischen Verfahrens)

Eine Übersicht der biologischen Carnosinsynthese während verschiedener Entwicklungsphasen im Vergleich zu den chemischen Verfahren in Bezug auf Abfallindices, Energieindices, Kosten und Umweltbewertungszahlen gibt Tabelle 23 wieder.

Der Vinick Prozess besitzt gegenüber den beiden anderen Prozessen in der Sabento Bewertung den geringsten Abfallindex mit 16-19 kg/kg Produkt. Die beiden Verfahren des Vinick Prozesses unterscheiden sich hinsichtlich der Produktaufarbeitung. Verfahren 1 nutzt dabei mehr Lösungsmittel (Ethanol und Dichlormethan gegenüber Ethanol), das thermisch zurück gewonnen wird, wodurch das Verfahren 30% energieintensiver, aber aufgrund der 18 Prozentpunkte höheren Ausbeute 3 kg/kg weniger masseintensiv ausfällt (Tabelle 23).

Tabelle 23:

Zusammenstellung wichtiger ökologischer Parameter der Prozessbewertung mit Sabento®

Sabento® Bewertungen	Abfallindex Kg Abfall/kg Produkt	Energieindex MJ/kg	Gesamt-Umwelt- Bewertungszahl (Input- und Output- Bewertungszahl)
Vinick Prozess			74
Verfahren 1	16	122	Input: 68
Synthese plus Aufreinigung	(mit Wasser)		Output: 78
Vinick Prozess			70
Verfahren 2	19	92	Input: 62
Synthese plus Aufreinigung	(mit Wasser)		Output: 75
Hildbrand Prozess	91	1026	1254
Synthese plus Aufreinigung	(mit Wasser)		Input: 1068
			Input: 1378
Biologischer Prozess in der Frühphase	642		84**
	(mit Wasser)	(80 *)	(geschätzt ca. 230)
Synthese plus fiktive Aufreinigung *	+ 21		Input: 222
	(Enzymsynthese)		Output: 0***
DmpA-Enzym-Produktion	3727	3164	1391
Fermentation plus Chromatographie	(pro kg Enzym)****	(pro kg Enzym)	Input: 2086
			Output: 928

n.b. nicht bewertet

*) Eine fiktive 100%ige Kältefällung wurde anfangs angenommen, da hierdurch keine zusätzlichen Materialströme generiert wurden und Sabento ohne einen Aufreinigungsschritt den Prozess nicht auswerten konnte.

***) Der Outputstrom floss mit Null in die Berechnung ein

****) Sabento lieferte den Wert Null

*****) d.h. plus 3.7 kg Abfallindex für den biologischen Prozess pro eingesetztes Kilo Enzym Synthese bei 1000 kg Carnosinproduktion

Der Hildbrand Prozess hat einen ca. 5fach höheren Abfallindex und zehnfach größeren Energieverbrauch pro kg Produkt als das Vinick Patent. Zudem ist die Umweltbewertungszahl 18fach höher. Das liegt zum einen an den

Umwelteigenschaften der verwendeten Chemikalien, an der geringeren Gesamtausbeute von 35% (Vinick 62-80%) sowie auch an der Verwendung von mehreren Lösungsmitteln (Ethanol, Ethylacetat, Diethylether), die im Modell thermisch recycled werden und deren Energieaufwand schwerer abzubilden war.

Der biologische Prozess in der Frühphase verursacht 642 kg Abfall pro kg Produkt und stellt sich bis zu 40mal abfallintensiver dar als der Vinick Prozess und 7mal intensiver als der Hildbrand Prozess. Dies ist, analog zur Biokatalysatorherstellung, dem hohen Wasserbedarf geschuldet, der 95% des gesamten Abfallindex ausmacht. Analoge Ergebnisse lieferte auch die EATOS Bewertung. Energetisch dagegen käme der biologische Prozess in der Sabento Bewertung mit 80 MJ Verbrauch pro Kilogramm Produkt in den gleichen Bereich wie das Vinick Verfahren. Dies liegt allerdings an der fiktiv angenommenen Aufarbeitung von Carnosin aus der Reaktionslösung durch Kältefällung bei der allerdings kein Lösungsmittel thermisch zurück gewonnen wird. Insgesamt verursacht das Vinick Verfahren die geringsten Abfälle und den geringsten Energieverbrauch. Dies korreliert auch mit der Gesamt-Umweltbewertungszahl, welche die Materialien der Input- und Outputseite neben deren Massenanteil auch ökologisch wichtet (Heinzle et al. 2006a) und dabei noch die Aspekte Sicherheit, Gesundheit und Umwelt unterschiedlich wertet (Tabelle 23). Wie bei der EATOS Bewertung zeigte sich das Vinick Patent auch hier als das wirtschaftlichste.

Bei den chemischen Prozessen stellen die Lösungsmittel (Ethanol, Dichlormethan und Ethylacetat) ökologisch gewichtige Input Komponenten dar (teilweise auch Output, sofern nicht recycled) (Abbildung 59), obwohl deren Massenanteil gering ist. Beim biologischen Prozess hat Wasser den größten Massenanteil vor Histidin, Carbonatbuffer und β -Alaninamid (in der Aufreinigung war hier nur eine fiktive Kältefällung ohne den Einsatz von Lösungsmitteln angenommen) Die ökologische Wichtung von Wasser wiegt aber nur ca. 1/3 dessen der Massengewichtung auf der Inputseite. Auf der Outputseite ist Wasser (bzw. der Ressourcenverbrauch an Wasser) nicht mehr in der ökologischen Wichtung enthalten. Ökologisch könnte die Inputseite des enzymatischen Prozesses durch eine Senkung des Wasserverbrauchs und des Carbonatbuffers verbessert werden. Abbildung 60 macht deutlich, dass bei den chemischen Verfahren die thermischen Risiken (Explosion, Brandgefahr) vor den Toxizitäten die Hauptwirkkategorien darstellen. Durch den Verzicht von Dichlormethan schneidet das Vinick Verfahren 2 in den Wirkungskategorien weniger toxisch ab als Verfahren 1. Beim biologischen Prozess stellen die Rohstoffverfügbarkeit und die Komplexität der Synthese, wie bei der Biokatalysatorherstellung, die Hauptwirkungskategorien der Inputseite und die Eutrophierung die Hauptwirkungskategorie der Outputseite dar (Salze und Stickstoffeintrag durch Aminosäuren).

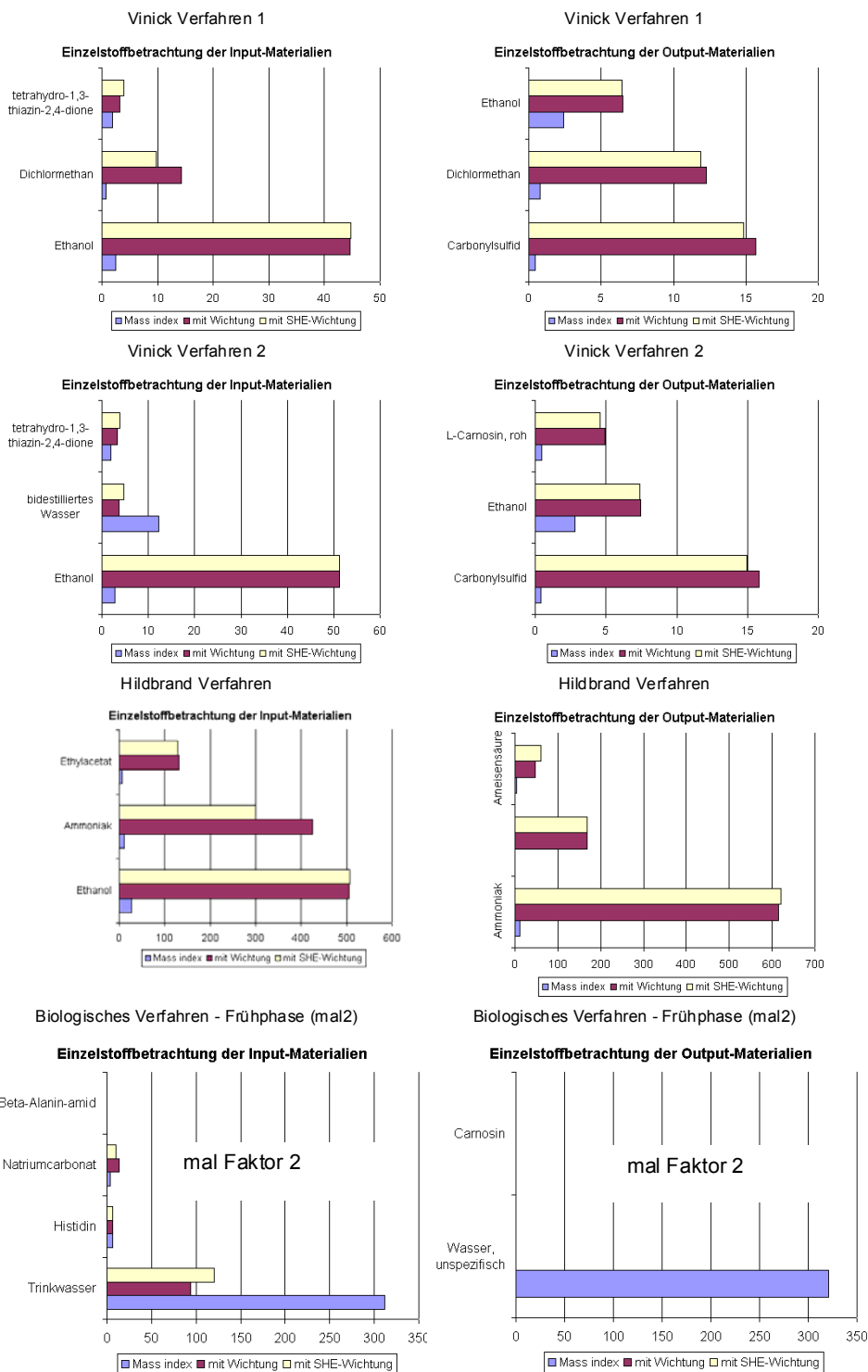
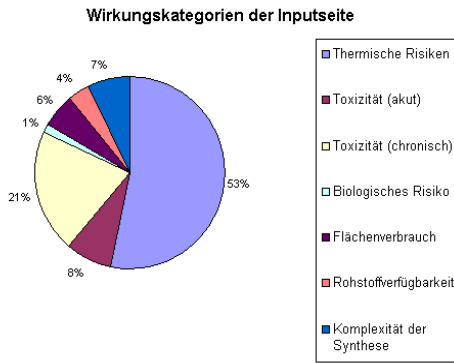


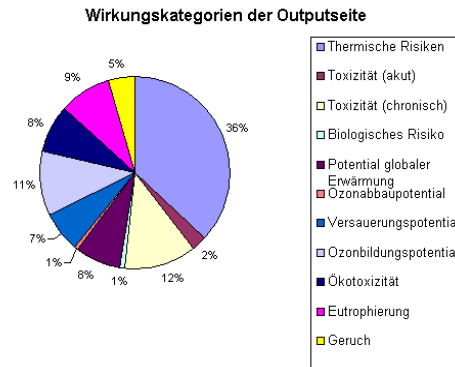
Abbildung 59:

Vergleich der wichtigsten Einzelstoffbetrachtungen von Input- und Output Seite der verschiedenen Verfahren mittels Sabento®. SHE bedeutet eine weitere Wichtung der Chemikalien unter dem Aspekt Safety, Health and Environment zu je 13 : 27 : 60. Sabento errechnete in diesem Modell fälschlicherweise einen "Anteil von Rohprodukt am Endprodukt" von 200%, was bedeutet, dass für die Herstellung von 1000 kg Carnosin 500 kg Roh-Carnosin aufgereinigt werden müssen. Das hat zur Folge, dass die Input- und Output-Materialströme und die Umweltbewertungszahl um den Faktor 2 zu gering ausfallen.

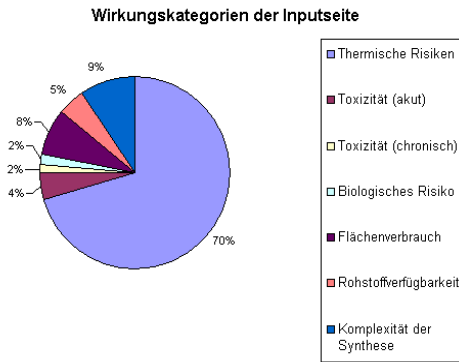
Vinick Verfahren 1



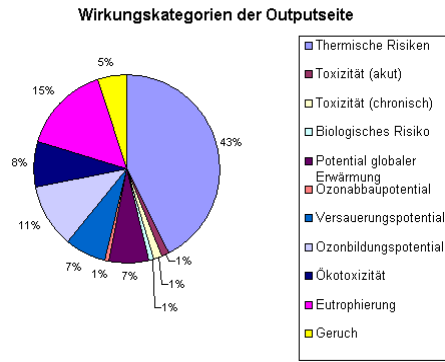
Vinick Verfahren 1



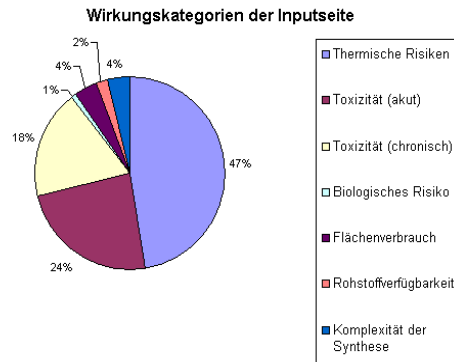
Vinick Verfahren 2



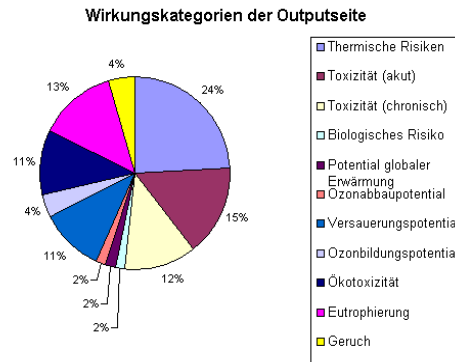
Vinick Verfahren 2



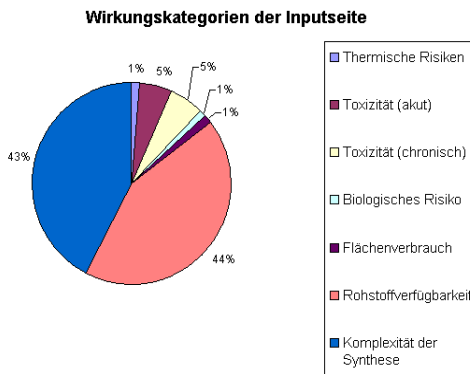
Hildbrand Verfahren



Hildbrand Verfahren



Biologisches Verfahren - Frühphase



Biologisches Verfahren - Frühphase

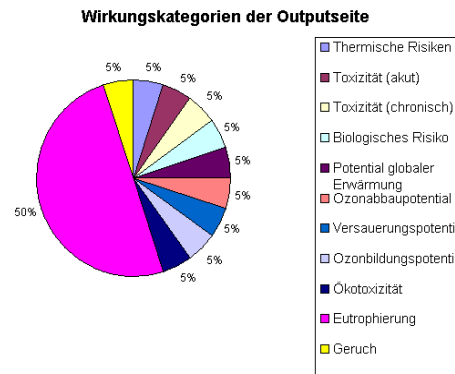


Abbildung 60:
Vergleich der Wirkungskategorien von Input- und Output Seite der verschiedenen Verfahren mittels Sabento®

Zusammenfassung der Frühphasenevaluierung durch Sabento

Die grobe Frühphasenevaluierung liefert insgesamt eine erste Einschätzung der Prozesse und zeigt trotz vieler Ungenauigkeiten oder fehlender Abbildbarkeit in Prozessmodellen eine erste Gesamttendenz.

- Die Modellierung der drei Prozesse ermöglicht die Vergleichbarkeit anhand von Zahlenwerten.
- Das Vinick Verfahren scheint ökologisch am effizientesten zu sein (geringste Gesamtumweltbewertungszahl).
- Das biologische Verfahren erfordert den höchsten Materialeinsatz und hat dadurch eine ungünstigere und höhere Gesamtumweltbewertungszahl.
- Der Wasseranteil macht ca. 95% des Abfallindex aus (eine jeweilige Betrachtung mit und ohne Wasser ist sinnvoll).
- Die Wirkungskategorien der chemischen Verfahren liegen stärker bei thermischen oder toxischen Risiken, während im biologischen Prozess Rohstoffverfügbarkeit, Komplexität der Synthese und Eutrophierung zählen.
- Die Wasser-, Histidin- und Carbonatpufferverbräuche sind drei gewichtige Einflussgrößen zur Senkung der ökologischen Belastung des biologischen Verfahrens. Wasser selbst ist jedoch im Vergleich zu den Edukten günstig, weshalb die Kosten des Verfahrens eher von den Edukten, Enzym und Salzen abhängen werden.

4.13.4 Prozessevaluierung mit e!Sankey®

Biologische Prozessentwicklung und deren Optimierung

Im Laufe der Projektentwicklung wurde der Prozess unter Berücksichtigung der aus der Frühphasenevaluierung erhaltenen Ergebnisse in mehreren Stufen weiterentwickelt und optimiert. Dabei galt es vor allem, den Wasser- und Histidinverbrauch zu senken. Zudem wurde neben der Synthese auch eine mögliche Produktaufarbeitung massenbilanz- und kostenmäßig eingerechnet (Abbildung 62 und Abbildung 63). Optimierungsschritte im Laufe der Prozessentwicklung beim Vergleich von Frühphasen- und Spätphasenprozess waren:

- Verringerung der Puffermenge und Salzfracht (von 100 mM Natriumcarbonatpuffer → 50 und 20 mM Tris-Puffer)
- Erhöhung der Enzymkonzentration von 9 mg/l auf 30 mg/l (reines DmpA)
- Erhöhung der Eduktverhältnisse (von 120:24 mM/mM auf 250:50 mM/mM Histidin:β-Alanin-Amid)
 - Steigerung des Produkttiters von 1.6 g/l auf 4.5 g/l
 - Steigerung der Carnosinausbeute von 30% auf 40%
- Recycling der Überschusskomponente Histidin bei der Aufarbeitung
- Recycling von Enzym und Ethanol

Die Optimierungen während der Prozessstufen wurden vereinfachend anhand der eingesetzten Materialien bzw. des Materialflusses und der Materialkosten in Excel® bewertet.

In Tabelle 24 sind die verschiedenen Prozessstufen vergleichend zusammengestellt. Auch eine Materialkostenabschätzung wurde vorgenommen. Sie zeigen, dass der Abfallindex der biologischen Synthese von 644 kg/kg auf 235 kg/kg (bzw. ohne Wassereinbezug von 19 kg/kg auf 12 kg/kg) gesenkt werden konnte. Durch diese Senkung des Abfallindex um 64% hätte sich auch die Umweltbewertungszahl deutlich gemindert, allerdings aufgrund der unterschiedlichen Materialgewichtung nicht direkt proportional zum Abfallindex. Die Umweltbewertungszahl wurde mit Excel jedoch nicht berechnet. Gleichzeitig konnten so die Ausgaben für Materialien (ohne Personal- und Anlagekosten) für die Synthese gesenkt werden, sodass anstelle eines Defizits von 175.000 € ein Überschuss von 549.000 € erzielt werden könnte, welche den Prozess erst finanziell sinnvoll erscheinen ließen. Abbildung 61 veranschaulicht graphisch die Materialflüsse der biologischen Synthese (ohne Aufreinigung) in der Früh- und Spätphase der Projektentwicklung und verdeutlicht die starke Verringerung der Materialströme in der Synthese um 26% bis 64% aufgrund der verschiedenen, oben aufgelisteten Prozessverbesserungen.

Unter Berücksichtigung der Aufreinigung neben der Synthese vergrößert sich der Abfallindex von 233 kg/kg auf 442 kg/kg, was hauptsächlich durch den Einsatz von Ethanol zur Histidinabtrennung verursacht wird. Dadurch sinkt der Materialkostenüberschuss auf 339.000 €.

Lässt man das Wasser und den Ethanolanteil in der Abfallbetrachtung unberücksichtigt, so konnte der Materialeinsatz von 19 kg/kg Restanteil auf 7 kg/kg Restanteil gesenkt werden. Diese Größenordnung bewegt sich im gleichen Bereich wie der Vinick Prozess (Tabelle 24).

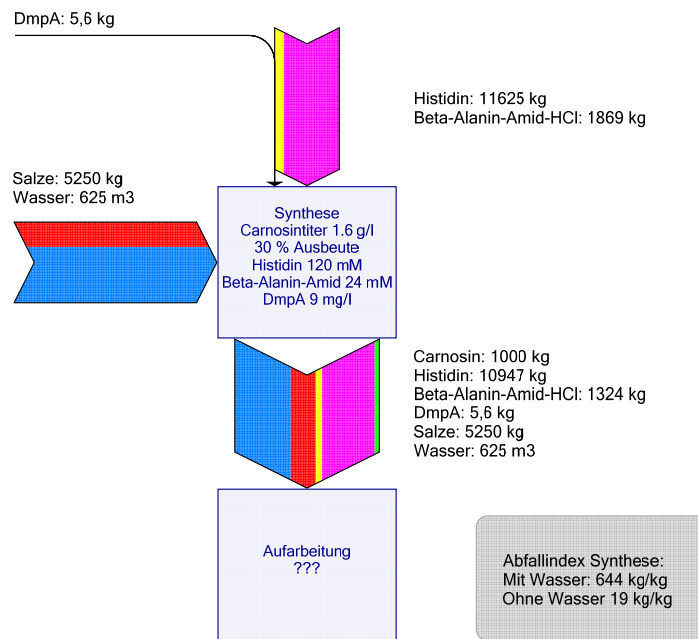
Abbildung 62 und Abbildung 63 zeigen den entwickelten Carnosinsynthese-Prozess mitsamt Aufreinigung der Spätphase (Stoffstromdiagramm und Kostenstromdiagramm). Aus dem Stoffstromdiagramm erkennt man, dass Histidin und Ethanol zu großen Teilen innerhalb des Prozesses recycled werden, wodurch der Gesamtabfallindex gesenkt werden konnte. Ohne Wasser und Ethanol würden nur noch 7 kg Abfall pro kg Carnosin erzeugt. Die Kostenseite zeigt, dass das neu zugeführte Histidin und das β -Alaninamid die Hauptkosten ausmachen und das frische hinzuführende Lösungsmittel Ethanol nur 1/5 dieser Kosten ausmacht. Wasser kann kostenmäßig, aber nicht unter Gesichtspunkten des Materialflusses vernachlässigt werden.

Tabelle 24:
Zusammenstellung wichtiger ökologischer Parameter der Prozessbewertung mit einer
einfachen Spreadsheet Massenbilanzierung mit Excel®

Spreadsheet- Massenbilanzierung (ohne Bewertungssoftware)	Abfallindex kg Abfall/kg Produkt	Energieindex MJ/kg	Gesamtmaterialkosten Überschuss oder Defizit
Biologischer Prozess in der Frühphase Synthese OHNE Aufreinigung	Mit Wasser: 644	n.b.	-175.000 €
	Ohne Wasser: 19		
Biologischer Prozess in der Spätphase Synthese OHNE Aufreinigung	Mit Wasser: 235	n.b.	+150.000 €
	Ohne Wasser: 12		
Biologischer Prozess in der Spätphase Synthese PLUS Aufreinigung	Mit Wasser und Ethanol: 442	n.b.	+339.000 €
	Ohne Wasser mit Ethanol: 188		
	Ohne Wasser ohne Alkohol: 7		

n.b. nicht bewertet

Frühphasenevaluierung Evaluation der Carnosinsynthese nach Stoffströmen (Synthese OHNE Aufreinigung)



Spätphasenevaluierung Evaluation der Carnosinsynthese nach Stoffströmen (Synthese OHNE Aufreinigung)

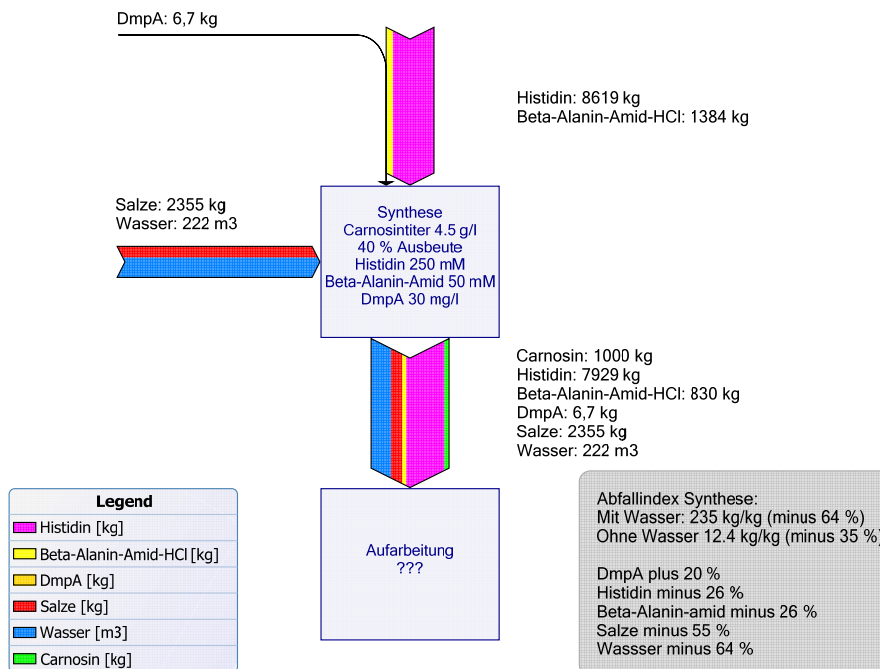


Abbildung 61:

Vergleich der Materialflüsse des biologischen potentiellen Carnosinsyntheseprozesses in der Früh- und Spätphase der Prozessentwicklung. Durch Reaktionsoptimierung gelang es bedeutende Materialströme (Wasser minus 64%) als auch kostenträchtige Ströme (Histidin minus 26%) zu senken. (e!Sankey@1.3 Diagramm).

Evaluation der Carnosinsynthese nach Stoffströmen (Synthese plus Aufreinigung)

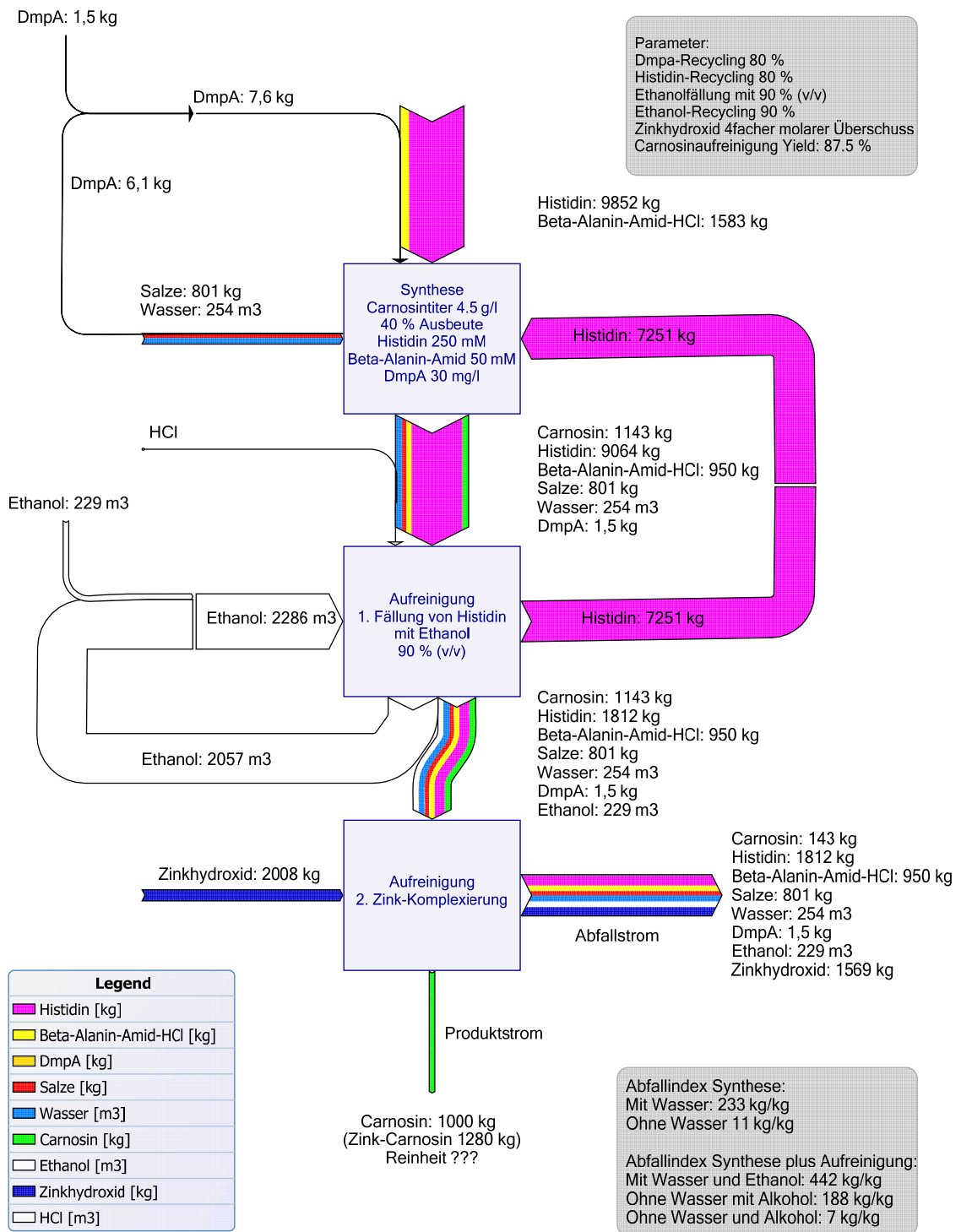


Abbildung 62:

Material-Flussdiagramm des biologischen potentiellen Carnosinsyntheseprozesses am Ende des Projekts (späte Prozessentwicklungsphase). Ein Teilstrom von Histidin, Ethanol und Enzym werden recycled (e!Sankey@1.3 Diagramm).

Evaluation der Carnosinsynthese nach Kosten (Synthese plus Aufreinigung)

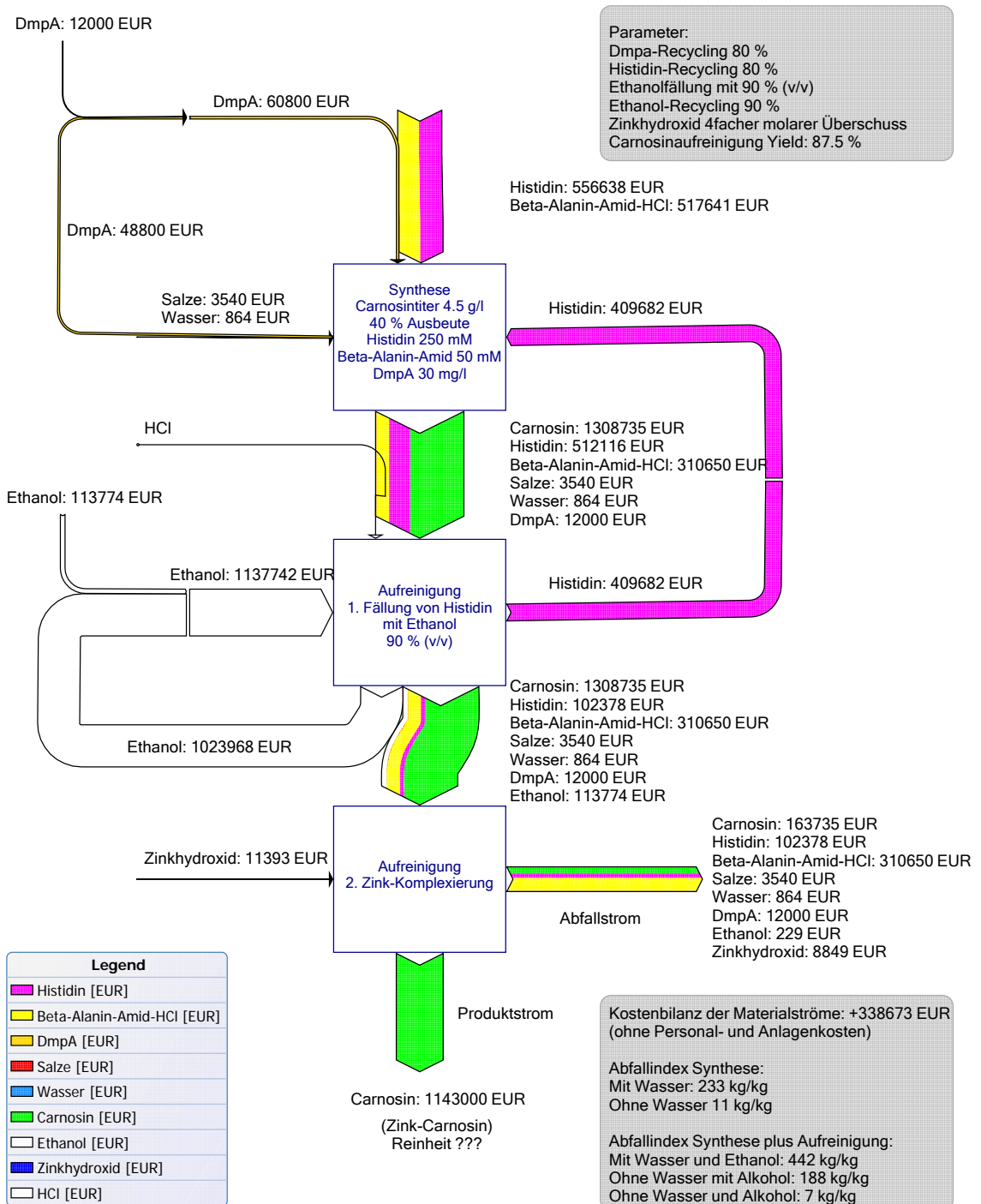


Abbildung 63:

Kosten-Flussdiagramm des biologischen potentiellen Carnosinsyntheseprozesses am Ende des Projekts (späte Prozessentwicklungsphase). Ein Teilstrom von Histidin, Ethanol und Enzym werden recycled (e!Sankey@1.3 Diagramm).

4.13.5 Bewertung der Prozessoptimierung

Insgesamt konnte der Prozess im Laufe der Entwicklung deutlich verbessert werden. Neben der Syntheseoptimierung wurde auch eine mögliche Produktaufarbeitung entwickelt.

Der Materialeinsatz und damit auch der ökologische Fußabdruck des Prozesses wurde gesenkt und die Ökonomie verbessert. Der bei einer Jahresproduktion von 1 t anfallende Restanteil von 7 t würde aber bereits ein ökologisch akzeptables Maß für einen Syntheseprozess der Größenordnung 1 t darstellen, bestünde der Abfall doch hauptsächlich aus organisch verwertbaren Komponenten (Histidin, Ethanol, β -Alanin(amid), Carnosin etc.). Lediglich der Salz- und Zinkhydroxideinsatz verursachen eine anorganische Belastung des Abwassers. Im Vergleich zu den chemischen Prozessen mit den organischen Lösungsmitteln Diethylether, Dichlormethan oder Ethylacetat ergibt sich hierdurch eher ein Eutrophierungspotential anstelle eines thermischen Risikos.

Nichtsdestotrotz würden weitere Material- und somit auch Kosten- und Energieeinsparungen helfen, den biologischen Prozess zu verbessern, allen voran Ethanol-, Wasser-, und Zinkhydroxideinsparungen. Ein noch unberücksichtigtes und größeres potentiell Einsparpotential könnte sich durch die Verringerung des Ethanolzusatzes bei der Histidin-Kristallisation von 90% (v/v) auf 80% (v/v) ergeben, da so der Ethanolzusatz von 9 Volumenteilen auf 4 Volumenteile und somit auch der Recyclingaufwand erheblich gesenkt werden könnte. Eventuell ließe sich auch das Zink aus dem Abwasser zurückgewinnen. So könnte vielleicht sogar das alte verbrauchte Medium ein zweites mal wiederverwendet werden, bei dem die verbliebenen Oligopeptide durch DmpA Zugabe zu Histidin und β -Alanin hydrolysiert würden, wobei das Histidin in der Reaktion benutzt werden könnte. Alternativ könnte eventuell das Wasser durch Elektrofiltration recycled werden.

Für die Wirtschaftlichkeit der Prozesse ist neben den Eduktpreisen der Carnosinpreis sehr wichtig. In den Modellen wurde ein Preis von 1145 € angenommen (1/10 des Preises von 100 g aus dem Fluka-Sigma-Katalog 2007), welcher im Vergleich zu im Internet vermarkteten L-Carnosintabletten mit ca. 800 €/kg als zu hoch erscheint. Mit einem Materialkostenüberschuss von 339.000 € und unter Berücksichtigung von Personal- und Anlagenkosten wäre der Neubau einer Produktionsanlage finanziell nicht möglich. Auf einer abbeschriebenen Anlage bei geringem Personalaufwand könnte der Prozess ökonomisch machbar sein. Die EATOS Bewertung zeigte für den Vinick Prozess Materialkosten von ca. 250 € pro kg Carnosin, der somit auch geringere Carnosinpreise tolerieren könnte.

Das Enzym DmpA stellt aufgrund seiner biochemischen Eigenschaften (spezifische Aktivität, Stabilität) einen technisch interessanten und anwendbaren Biokatalysator dar (4.11.5), dessen Herstellungsaufwand auch

bei einem optimierten Carnosinsynthese-Prozess keinen großen Ausschlag bei der Synthesereaktion machen würde (plus ca. 20 kg Abfall inklusive Wasser pro Kilogramm Carnosin). Das Enzym stellte nicht den Hauptfaktor der ökologischen Frühphasenbewertung dar, sondern der Histidin- und Wasserverbrauch (Abbildung 61).

Bei einem anderen Syntheseezym mit geringeren Aktivitäten würden sich der Herstellungsaufwand des Enzyms und somit auch der Abfallanteil der Enzymherstellung an der enzymatischen Synthese vergrößern. Wenn gleichzeitig stärkere Anpassungen in der Synthese erforderlich wären, müsste der Prozess neu bewertet werden.

Im Rahmen dieses Projekts haben wir festgestellt, dass eine Frühphasenevaluierung der Prozesse unter dem Gesichtspunkt der Ökoeffizienz schwierig ist, da ökologische, ökonomische und soziale Einflüsse in einer frühen Projektphase teilweise nur vage abgeschätzt werden können. Auch wurden aus Mangel eines geeigneten Softwarepaketes drei verschiedene Softwarelösungen eingesetzt, um drei verschiedene Carnosinsynthese-Verfahren in ähnlicher und vergleichbarer Tiefe beschreiben zu können. Letztlich dienten vor allem die Massenbilanz und der dabei ermittelte Abfallindex als Maß für die ökologische (und indirekt auch ökonomische) Bewertung.

Trotzdem erlaubt eine Frühphasenevaluierung eine erste Abschätzung von ökologischen und ökonomischen Kennzahlen anhand von Massenbilanzen und Einzelbetrachtung von Substanzen.

Aus der (Frühphasen)-Evaluierung konnten folgende Ergebnisse und Aussagen gemacht werden

- Patente können für eine grobe Prozessbeschreibung herangezogen werden.
- Trotz häufiger Abschätzungen unbekannter Werte („evaluated guess“, z.B. ökologische Wertung von Substanzen, Preise) und trotz Vereinfachung gestatten Frühphasenmodelle einen ersten Überblick in Zahlen
- Betrachtung des ganzen Prozesses zu Beginn der Prozessentwicklung und Erleichterung bei der Prozessoptimierung
- DmpA Enzymproduktion hat keinen großen ökologischen Einfluss auf die Synthesereaktion
- Der Biologische Prozess besitzt große Massenströme mit eher ungefährlichen Komponenten
- Als hauptkritische ökologische Stellschrauben des biologischen Prozesses erwiesen sich: Wasser, Histidin, Puffersalze
- Als hauptkritische ökonomische Stellschrauben des biologischen Prozesses ergaben sich: Histidin, β -Alaninamid
- Reinheit des Endprodukts und Aufarbeitungsschritte schwer vorhersagbar

- Evaluierungssoftwarepakete teilweise noch nicht ausgereift und entwicklungsfähig/erweiterbar, vor allem beim Vergleich zwischen chemischen und biologischen Prozessen. Aber in der Kernaussage liefern EATOS und Sabento ähnliche Bewertungen
- Eine zentrale Datenbank mit den ökologischen Bewertungen von Substanzen wäre hilfreich, um die Evaluierung zu vereinfachen und zu vereinheitlichen
- Energiebetrachtungen in der Frühphase (für Laien) nicht abschätzbar

5 Diskussion

5.1 Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit dem Projektantrag

Wie in Tabelle 25 deutlich wird, sind die Meilensteine, die zu Projektbeginn festgelegt wurden, mit einer (geplanten) Ausnahme erreicht worden. Die Optimierung der β -Aminopeptidasen wurde in diesem Projekt nicht durchgeführt, da dies durch eine Kürzung der Mittel zu Projektbeginn nicht mehr möglich war. Der abschließende Bearbeitungsstand des Projekts entspricht somit den ursprünglichen Planungen sehr gut.

Tabelle 25:
Meilensteine, die zum Abschluss des Projekts erreicht wurden.

Partner	Meilensteine	Zeitpunkt (Monat)	erreicht
1+4	Auswertung der Substratspektren für die Synthesereaktion; Auswahl der Produkte, deren Herstellung optimiert werden soll	12	✘
2	Bereitstellung von ausreichenden Mengen an rekombinanten, aufgereinigten β -Aminopeptidasen für die Carnosinsynthese im Labormaßstab	12	✘
2+3	Bereitstellung von Expressionsstämmen für eine optimierte Expression und Reinigung	12	✘
1+3	Charakterisierter Prozess zur Carnosinsynthese im Labormaßstab	20	✘
alle	Zwischenbegutachtung, Statusbericht	neu: 13, vorher 20	✘
3+4	Optimierte und charakterisierte β -Aminopeptidasen	28	-
2	Up-Scale der Carnosinsynthese	28	✘
1	Ökoeffizienzanalyse der Carnosinsynthese	28	✘
alle	Abschlussbericht	28	✘

Anhand des Arbeitsplans und der Meilensteine (Tabelle 25; Tabelle 26) werden einzelne Abweichungen zum Projektantrag deutlich, die unter anderem auch schon im Statusbericht diskutiert wurden. Anders als ursprünglich geplant, wurde die Ökoeffizienzanalyse nicht nur von der Eawag, sondern auch von der TU Dortmund durchgeführt. Aufgrund der um 45% gekürzten Projektmittel für die Uni Düsseldorf wurden die Arbeitspakete „Optimierung von BapA durch gerichtete Evolution“ und „Einführung von Endopeptidaseaktivität“ aus der ursprünglichen Planung gestrichen. Die Etablierung eines „Robusten Hochdurchsatzscreenings für BapA“ wurde

wegen dieser Streichungen auch nur noch in Grundlagen bearbeitet, da die Etablierung eine Assays für den Hochdurchsatz momentan nicht mehr von Priorität war. Da der Schwerpunkt der Arbeiten an der Uni Düsseldorf jetzt ausschließlich auf der Expressionsoptimierung lag, wurden auch noch Experimente zum Oberflächendisplay der β -Aminopeptidasen hinzugenommen. Aufgrund der guten Ergebnisse während der Projektlaufzeit wurden noch zwei umfangreiche, zusätzliche Arbeitspakete („Carnosinsynthese durch Ganzzellsysteme“ und „Carnosinaufarbeitung“) hinzugenommen und an der TU Dortmund und bei der EMC erfolgreich bearbeitet.

Tabelle 26:

Das im Projektantrag geplante Arbeitsprogramm und die im Laufe der Projektlaufzeit durchgeführten Änderungen.

Partner	Aufgaben	Monat							
		1-4	5-8	9-12	13-16	17-20	21-24	25-28	
1 Eawag	Synthesepotential der BAPs	■							
	Reaktionsoptimierung: Carnosin	■							
	Umwelt-evaluation	■							
2 TU Do	Herstellung der BapAs	■							
	Charakterisierung des Produktionsstammes	■							
	Up-Scaling der Carnosin Produktion	■							
	Carnosinsynthese durch Ganzzellsysteme					NEU			
	Carnosin-aufarbeitung					NEU			
	Umwelt-evaluation					NEU			
3 HHUD	Klonierung und Expression der BapA Enzyme in <i>Pseudomonas</i>	■							
	Einführung von Endopeptidaseaktivität					Gestrichen			
	Optimierung von BapA durch gerichtete Evolution					Gestrichen			
	Oberflächen-display					NEU			
4 EMC	Herstellung von Rumpfsequenzen	■							
	Herstellung von Referenzverbindungen	■							
	Robustes Hochdurchsatz-Screening für BAP					Eingeschränkt durchgeführt			
	Enzymatische Einführung von β -Aminosäuren in Leitstrukturen					■			
	Carnosin-aufarbeitung					NEU			

5.2 Kooperationen innerhalb des Projekts

Die Zusammenarbeiten im Rahmen des Projekts liefen sehr effektiv ab. Dabei wurden sowohl Daten als auch Materialien wie z.B. rekombinante Stämme, Chemikalien und Reaktionslösungen zwischen den einzelnen Labors ausgetauscht. Folgende interne und externe Kooperationen fanden in den 28 Monaten Projektlaufzeit statt:

- Die Ökoeffizienz des biotechnologischen Verfahrens und der chemischen Prozesse wurde gemeinsam von der TU Dortmund, der Eawag (Partner 1) und der ifu Hamburg GmbH analysiert.
- Die Eawag hat mehrere Wildtyp-Stämme und rekombinante *E. coli*-Stämme, sowie Plasmid- und genomische DNA an die TU Dortmund und die Uni Düsseldorf versandt, um die molekularbiologischen Arbeiten und die rekombinante Produktion der Enzyme 3-2W4 BapA und DmpA zu ermöglichen.
- Die Eawag erhielt von der TU Dortmund *E. coli*-Zellpellets aus Fermentationen, in denen die Proteine 3-2W4 BapA und DmpA exprimiert worden waren.
- Die EMC hat Referenzpeptide, Substrate und Nebenprodukte der Carnosinsynthese hergestellt und der Eawag sowie der TU Dortmund zur Verfügung gestellt.
- Die Gene *bapA* und *dmpA* wurden durch Jan Heyland bei Professor Anton Glieder (TU Graz) für die Expression in Hefe bzw. *E. coli* optimiert. Dazu war ein einwöchiger Besuch notwendig, es besteht fortlaufend Kontakt.
- Die optimierte *dmpA* Gensequenz wurde von der TU Dortmund an die Uni Düsseldorf geschickt.
- Substrate für eine Racematspaltung von β -Aminosäureamiden wurden von der Evonik (Service Center Biocatalysis, Hanau) synthetisiert und der Eawag zur Verfügung gestellt.
- Ein Reaktionsansatz, der ca. 2,2 g Carnosin enthielt, wurde von der TU Dortmund an die EMC zur Aufreinigung geschickt.

Insgesamt wurden fünf Projekttreffen abgehalten:

- 27. September 2006 - Eawag, Dübendorf
- 16. April 2007 - Institut für Molekulare Enzymtechnologie im FZ-Jülich
- 19. November 2007 - Lehrstuhl Biotechnik, TU Dortmund
- 9. Juni 2008 - EMC microcollections, Tübingen
- 13. Februar 2009 - Eawag, Dübendorf

6 Öffentlichkeitsarbeit

Zum jetzigen Bearbeitungsstand wurden die Ergebnisse hauptsächlich in der wissenschaftlichen Gemeinschaft über Vorträge und Poster auf Fachtagungen publiziert. Mehrere Veröffentlichungen in Fachzeitschriften sind darüber hinaus geplant. Kontakte mit der chemischen und biotechnologischen Industrie wurden hergestellt, um mögliche Lizenznehmer für die unten aufgeführte Patentanmeldung zu finden (mit Unterstützung des ETH Technologietransferbüros).

6.1 Publikationen in Fachzeitschriften und geplante Publikationen

- Heck T, Kohler HP, Limbach M, Flögel O, Seebach D, Geueke B (2007) Enzyme-catalyzed formation of β -peptides: β -peptidyl aminopeptidases BapA and DmpA acting as β -peptide-synthesizing enzymes. *Chem Biodivers.* 4(9):2016-30.
- Heck T, Osswald S, Seebach D, ter Wiel M, Kohler HPE, Geueke B, Efficient kinetic resolution of aliphatic β -amino acid amides by β -peptidyl aminopeptidases. Eingereicht bei ChemBioChem.
- Heck T, Lutz J, Blank LM, Schmid A, Makam, SV, Hilvert D, Kohler HPE, Geueke B, Biochemical characterization of β -aminopeptidases for the synthesis of carnosine and further β -amino acid containing peptides. In Vorbereitung.
- Lutz J, Lang K, Heck T, Geueke B, Kohler HPE, Blank LM, Schmid A, Towards enzymatic production of carnosine. In Vorbereitung.
- Lutz J, Eiden F, Geueke B, Blank LM, Schmid A, Evaluation of economic and ecologic parameters for enzymatic carnosine synthesis. In Vorbereitung.
- Heyland J, Lutz J, Heck T, Kohler HPE, Geueke B, Blank LM, Schmid A, Simple procedure for carnosine synthesis: whole-cell peptidase activity production and biocatalyst recycling. In Vorbereitung

6.2 Vorträge und Poster

Vorträge:

- Blank LM: Produktion und erstmaliger Einsatz von β -Aminopeptidasen zur umweltfreundlichen Biosynthese von β -Peptiden als Intermediate für die Herstellung innovativer Pharmaka. ChemBioTec Kick-Off-Meeting, DBU, Osnabrück, 20. November 2006.
- Lutz J: Erste Schritte zur Evaluierung von chemischer und biologischer Carnosinsynthese mittels Sabento®, Ökoeffizienzsysteme - Workshop

"Quantifizierung und Nachhaltigkeit / Methoden und Tools", DBU, Osnabrück, 12. September 2007

- Heck T: Bacterial β -aminopeptidases acting as β -peptide-synthesizing enzymes. SGM, Interlaken, Juni 2008
- Heck T: Bacterial β -aminopeptidases acting as β -peptide-synthesizing enzymes. Biocat, Hamburg, September 2008
- Geueke B: Enzyme-catalyzed synthesis of β -peptides. Bioperspectives, Hannover, Oktober 2008

Poster:

- Heck T: Bacterial aminopeptidases with unusual substrate specificities for β - and mixed α,β -oligopeptides. SGM, Interlaken, März 2006
- Geueke B: Site directed mutagenesis effects the expression, processing and substrate specificity of β -aminopeptidases. Biocat, Hamburg, September 2008

Die Zusammenfassungen der Vorträge und Poster sind im Anhang aufgeführt.

6.3 Patentanmeldung

- Erfinder: Heck T, Geueke B, Kohler HP; Patenthalter: Eawag, Schweiz. Patentanmeldung Nr. 1007/07 vom 22. Juni 2007 „Enzymatisches Syntheseverfahren zur Herstellung β -aminosäurehaltiger Peptide“

6.4 Präsenz im Internet

- Enzymatisches Verfahren: Umweltfreundliche β -Peptide-Produktion dank enzymatischer Verfahren 24.03.2009 | Redakteur: Manja Felgentreu, www.process.de, Vogel Business Media GmbH & Co.KG
http://www.process.vogel.de/anlagen_apparatebau/behaelter/fermenter/articles/177692/?cmp=beleg-mail

6.5 Diplom-, Studien- und Masterarbeiten

- Masterarbeit an der Eawag: Venkata Sudheer Makam, Student der TU München und University of Singapore, Oktober 2007 bis April 2008, Biocatalytical and expression studies of β -aminopeptidases catalyzing the synthesis of β -peptides.
- Diplomarbeit an der TU Dortmund: Karsten Lang, August 2008 bis März 2009, Enzymatische Carnosinsynthese mittels β -Aminopeptidasen: Verfahrensentwicklung und Optimierung.

- Diplomarbeit an der TU Dortmund: Jianan Fu, August 2008 bis März 2009, Physiology of methylotrophic yeasts during heterogonous protein production
- Studienarbeit an der TU Dortmund: Kerstin Lange, April bis September 2008, Immobilization of a β -aminopeptidase for its application in enzymatic synthesis.
- Studienarbeit an der TU Dortmund: Artur Reimer, Juli bis August 2008, Klonierung einer β -Aminopeptidase in *P. pastoris*
- Studienarbeit an der TU Dortmund: Nicolai Antweiler, November 2008 bis März 2009, Production of L-carnosine using recombinant whole cell biocatalysts

7 Fazit

Im Rahmen dieses Projekts konnte am Beispiel des Carnosins ein Verfahren zur enzymatischen Synthese von β -aminosäurehaltigen Peptiden entwickelt werden. Die Ergebnisse liefern eine sehr solide Basis für eine Prozessentwicklung zur Carnosinsynthese. Durch die parallele Bearbeitung verschiedener Arbeitspakete können nun problemlos verschiedene Strategien miteinander kombiniert und auch einfach bewertet werden. So kann z.B. in Abhängigkeit von der apparativen Ausstattung die β -Aminopeptidase DmpA extrazellulär exprimiert und ohne Aufreinigung für die Carnosinsynthese eingesetzt werden. Alternativ kann auch ein *E. coli* Ganzzellsystem benutzt werden, das ebenfalls aufwändige Proteinreinigungsschritte überflüssig macht und die Abtrennung von Produkt und Katalysator sehr vereinfacht. Alle vorstellbaren Szenarien können aufgrund der guten Vorarbeiten zur Umweltevaluation des Prozesses mit verschiedenen Softwarelösungen durchgespielt und bewertet werden. Auch die Übertragung dieser Ergebnisse auf genau spezifizierte kleine Peptide, die β -Aminosäuren enthalten, scheint problemlos möglich zu sein.

Änderungen in der Zielsetzung wurden nur zu Beginn des Projekts durch den veränderten finanziellen Rahmen notwendig. Die Hauptziele (Optimierung der Expression, Charakterisierung der Reaktion, Prozessentwicklung, Umweltevaluation) wurden beibehalten und konnten erfolgreich durchgeführt werden. Die vier Partner konnten sehr gut ihre unterschiedlichen Qualifikationen und Expertisen einbringen und die Zusammenarbeit lief reibungslos.

8 Literaturangaben

- Baran EJ (2000) Metal complexes of carnosine. *Biochemistry (Mosc)* 65:789-797
- Becker S, Theile S, Heppeler N, Michalczyk A, Wentzel A, Wilhelm S, Jaeger KE, Kolmar H (2005) A generic system for the *Escherichia coli* cell-surface display of lipolytic enzymes. *FEBS Lett* 579:1177-1182
- Brake AJ, Merryweather JP, Coit DG, Heberlein UA, Masiarz FR, Mullenbach GT, Urdea MS, Valenzuela P, Barr PJ (1984) Alpha-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:4642-4646
- Dean N (1999) Asparagine-linked glycosylation in the yeast Golgi. *Bba-Gen Subjects* 1426:309-322
- Eiden F, Schmid A (2008) Ökoeffizienz und Biokatalyse. *transkript* 14:39
- Forster M, Vahrenkamp H (1995) Zinc-Complexes of Amino-Acids and Peptides .5. Zinc-Complexes of Histidine-Containing Dipeptides and Tripeptides. *Chem Berichte* 128:541-550
- Geueke B, Heck T, Limbach M, Seebach D, Kohler HPE (2006) Bacterial β -peptidyl aminopeptidases with unique substrate specificities for β - and mixed β/α -oligopeptides. *FEBS J* 273:5261-5272
- Geueke B, Kohler HP (2007) Bacterial β -peptidyl aminopeptidases: on the hydrolytic degradation of β -peptides. *Appl Microbiol Biotechnol* 74:1197-1204
- Heck T. 2006. Novel Aminopeptidases for biodegradation and synthesis of β -peptides [Diplomarbeit]. Tübingen: Eberhard-Karls-Universität. 74 p.
- Heck T, Kohler HP, Limbach M, Flögel O, Seebach D, Geueke B (2007) Enzyme-catalyzed formation of beta-peptides: beta-peptidyl aminopeptidases BapA and DmpA acting as beta-peptide-synthesizing enzymes. *Chem Biodivers* 4:2016-2030
- Heck T, Limbach M, Geueke B, Zacharias M, Gardiner J, Kohler HPE, Seebach D (2006) Enzymatic degradation of β - and mixed α,β -oligopeptides. *Chem Biodiv* 3:1325-1348
- Heinzle E, Biwer A, Cooney CL. (2006a). Development of sustainable bioprocesses. John Wiley & Sons.
- Heinzle E, Biwer A, Eissen M, Kholiq MA (2006b) Evaluation of biotechnological processes in early phases of the development regarding risks concerning ecology, security and health. *Chemie Ingenieur Technik* 78:301-305
- Hellwig S, Robin F, Drossard J, Raven NP, Vaquero-Martin C, Shively JE, Fischer R (1999) Production of carcinoembryonic antigen (CEA) N-A3 domain in *Pichia pastoris* by fermentation. *Biotechnol Appl Biochem* 30 (Pt 3):267-275
- Hipkiss AR (2008) On the enigma of carnosine's anti-ageing actions. *Exp Gerontol*
- Kholiq MA, Heinzle E (2006) Modelling process and lastingness evaluation of a complete cell biotransformation in two-phase ionic liquid/water system. *Chemie Ingenieur Technik* 78:307-316
- Raab RM, Tyo K, Stephanopoulos G (2005) Metabolic engineering. *Adv Biochem Eng Biot* 100:1-17

- Romanos MA, Scorer CA, Clare JJ (1992) Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* 8:423-488
- Rutherford N, Mourez M (2006) Surface display of proteins by gram-negative bacterial autotransporters. *Microb Cell Fact* 5:22
- Sauerhöfer S, Yuan G, Braun GS, Deinzer M, Neumaier M, Gretz N, Floege J, Kriz W, van der Woude F, Moeller MJ (2007) L-carnosine, a substrate of carnosinase-1, influences glucose metabolism. *Diabetes* 56:2425-2432
- Seebach D, Beck AK, Bierbaum DJ (2004) The world of β - and γ -peptides comprised of homologated proteinogenic amino acids and other components. *Chem Biodiv* 1:1111-1239
- Sun Z, Ramsay JA, Guay M, Ramsay BA (2006) Automated feeding strategies for high-cell-density fed-batch cultivation of *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl Microbiol Biotechnol* 71:423-431
- Wilhelm S, Rosenau F, Becker S, Buest S, Hausmann S, Kolmar H, Jaeger KE (2007) Functional cell-surface display of a lipase-specific chaperone. *Chembiochem* 8:55-60
- Zamboni N, Fischer E, Sauer U (2005) FiatFlux--a software for metabolic flux analysis from ^{13}C -glucose experiments. *BMC Bioinformatics* 6:209
- Hildbrand S, Ruppen T, Veghini D (2005) Method for producing β -alaninamdes. US6878829, Lonza
- Vinick F (1982) Process for preparing L-carnosine. US4359416, Pfizer

9 Anlagen / Anhang

Kooperationsvertrag

Tagungsbeiträge

Patent

Ergänzende Angaben zur Umweltevaluation

9.1 Kooperationsvertrag

Zwischen den nachstehend genannten
Forschungsinstitutionen und Industrieunternehmen

Eidgenössische Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung und
Gewässerschutz, Eawag
Überlandstrasse 133
CH-8600 Dübendorf

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Vertreten durch den Kanzler
Universitätsstraße 1
D-40225 Düsseldorf
Projektleitung:
Herr Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger, Institut für Molekulare Enzymtechnologie
Leo-Brandt-Str. 1, 52426 Jülich

Universität Dortmund, 44221 Dortmund, vertreten durch den Rektor,
ausführende Stelle:
Univ.-Prof. Dr. Andreas Schmid
Lehrstuhl Biotechnik
Fachbereich Bio- und Chemieingenieurwesen
Universität Dortmund
Emil-Figge-Str. 66
D-44221 Dortmund

EMC microcollections GmbH
Sindelfinger Str. 3
D-72070 Tübingen

- nachfolgend einzeln und gemeinsam "Partner" genannt -

wird zur gemeinsamen Durchführung des Verbundprojektes „Beta-Aminopeptidasen zur
Biokatalyse“- nachfolgend „Verbundprojekt“ genannt - folgendes vereinbart:

Präambel

Die Partner bearbeiten ein Aufgabengebiet im Rahmen eines Verbundprojektes mit Unterstützung der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU), Referat Biotechnologie, 49007 Osnabrück.

Die Partner vereinbaren, vorbehaltlich einer entsprechenden Förderung durch die DBU, im Rahmen dieses Verbundprojektes gemäß den nachfolgenden Bestimmungen zusammenzuarbeiten.

1. Gegenstand der Vereinbarung

- 1.1. Der Gegenstand der Vereinbarung ist die Regelung der Zusammenarbeit bei der Durchführung des von der DBU geförderten Verbundprojektes „Beta-Aminopeptidasen zur Biokatalyse“.
- 1.2. Der jeweilige Leistungsumfang für die einzelnen Partner sowie der Zeitplan ergeben sich aus dem Zuwendungsbescheid der DBU sowie aus dem Projektplan.

2. Durchführung der Arbeiten

- 2.1. Die Partner verpflichten sich zur Durchführung von aufeinander abgestimmten Aufgabengebieten und Teilaufgaben. Die Partner tauschen untereinander die Inhalte der Zuwendungsbescheide, Aufgabenbeschreibungen, Zeitpläne sowie alle Informationen, die zur Durchführung des Verbundprojekts notwendig sind, aus. Hierbei sind Vertraulichkeitsbelange der Partner nach § 7 zu berücksichtigen.
- 2.2. Im Übrigen ist jeder Partner für die Durchführung der von ihm gegenüber der DBU übernommenen FuE-Aufgaben selbst verantwortlich.

3. Koordination

- 3.1. Die Projektkoordination übernimmt die Eawag. Der Projektkoordinator hat insbesondere die Aufgabe, die Arbeiten der einzelnen Partner sachlich und zeitlich zu koordinieren. Treten Abweichungen vom Gesamtarbeits- und Zeitplan auf, wird er die Partner und den Projektträger möglichst frühzeitig darauf aufmerksam machen und Maßnahmen zur Überwindung eingetretener Schwierigkeiten vorschlagen.
- 3.2. Lassen sich Termine nicht einhalten, ist dies unverzüglich dem Projektkoordinator mitzuteilen. Dieser informiert sodann die betroffenen Partner und den Projektträger. Der Projektkoordinator bereitet die zur Durchführung des Gesamtarbeits- und Zeitplans notwendigen Arbeitssitzungen (mindestens einmal pro Halbjahr) vor, lädt hierzu mit einer angemessenen Frist unter Beifügung der Tagesordnung ein, führt den Vorsitz bei den Arbeitssitzungen und ist für die Erstellung und den Versand der Sitzungsprotokolle verantwortlich. An den Sitzungen nehmen Vertreter aller Partner teil.
- 3.3. Jeder Partner wird einen für seine Arbeiten zuständigen Ansprechpartner benennen (mit Adresse, Rufnummer, Telefax und e-mail).

- 4. Rechte am Ergebnis/Schutzrechte**
- 4.1 Als Arbeitsergebnisse werden alle Ergebnisse einschließlich der erstellten Berichte und Unterlagen bezeichnet, die von den Partnern bei Durchführung ihrer Arbeit im Rahmen des Verbundprojekts erzielt werden (z.B. Know-how, Erfindungen, urheberrechtliche geschützte Ergebnisse, Software).
- 4.2 Arbeitsergebnisse, an denen ausschließlich Mitarbeiter oder Organmitglieder eines Partners beteiligt sind, gehören diesem Partner.
- 4.3 Arbeitsergebnisse, an denen Mitarbeiter oder Organmitglieder mehrerer Partner beteiligt sind, gehören diesen Partnern gemäß der erfinderischen Anteile der jeweils beteiligten Mitarbeiter oder Organmitglieder, im Zweifelsfall jedoch zu gleichen Teilen. Bei Erfindungen werden sich die Partner über die Anmeldung (einschließlich der Federführung im Einzelfall), Aufrechterhaltung, Verteidigung, Kostentragung sowie über die Nutzung von Gemeinschaftserfindungen abstimmen; über die Einzelheiten werden die Partner im jeweiligen Einzelfall in freundschaftlicher Weise eine gesonderte Vereinbarung treffen.
- 4.4 Der Partner, der eine bei ihm im Rahmen des Verbundprojekts entstandene Erfindung zum Schutzrecht anmeldet, wird die anderen Partner innerhalb von 60 Tagen nach Anmeldung durch Übermittlung der Anmeldedaten sowie einer Zusammenfassung des Anmeldegegenstandes darüber informieren.
- 4.5 Verzichtet ein Partner auf die Anmeldung und/oder Aufrechterhaltung seines Schutzrechtes oder eines ihm gemäß Ziffer 4.3 zustehenden Schutzrechtsanteils, wird er das Schutzrecht oder seinen Anteil daran oder die Anmeldung darauf den anderen Partnern zur Übertragung auf diese zu deren Kosten anbieten. Bei Gemeinschaftserfindungen erfolgt das Angebot zunächst an die an der Gemeinschaftserfindung beteiligten Partner. Innerhalb von 60 Tagen nach Eingang der Anbietung haben die anderen Partner ein Übernahmerecht; über die Einzelheiten der Übertragung werden die Partner im jeweiligen Einzelfall eine gesonderte Vereinbarung treffen. Danach ist der anbietende Partner von der Pflicht zur Nachsuchung oder Aufrechterhaltung dieses Schutzrechtes oder seines Anteils an diesem Schutzrecht befreit.
- 4.6 Jeder Partner trägt die an seine Mitarbeiter zu zahlenden Arbeitnehmererfindervergütungen selbst.
- 4.7 Jeder Partner erkennt an, dass Benutzungshandlungen im Rahmen der Bearbeitung des Projektes hinsichtlich der von den anderen Partnern erlangten Informationen und Gegenstände kein Vorbenutzungsrecht begründen.
- 4.8 Die Partner räumen sich gegenseitig an den bei der Durchführung des Verbundprojektes entstandenen Arbeitsergebnissen, einschließlich Erfindungen, für Zwecke und Dauer des Verbundprojektes ein nicht ausschließliches, nicht übertragbares und unentgeltliches Nutzungsrecht ein. Bei einer kommerziellen Nutzung räumen sich die Partner auf Wunsch eine Lizenz gegen eine angemessene Gebühr ein. Einzelheiten werden in einer gesonderten Vereinbarung festgelegt.
- 4.9 Die Partner werden sich für Zwecke und Dauer des Verbundprojektes ein nicht ausschließliches, nichtübertragbares und unentgeltliches Nutzungsrecht an ihren verbundprojektbezogenen eingebrachten Kenntnissen (alle außerhalb des Verbundprojekts erzielten und von einem Partner in die Kooperation eingebrachten Ergebnisse) einräumen, über die die Partner zum jeweiligen Zeitpunkt der

Einräumung verfügen können, soweit dies zur Durchführung des Verbundprojektes unbedingt notwendig sind. Jede Partei ist und bleibt auch in deren Verwertung ungehinderter Inhaber dieser Kenntnisse.

- 4.10 Jeder Partner erklärt sich bereit, den anderen Partnern an seinen eigenen im Rahmen des Verbundprojektes erzielten Arbeitsergebnissen im Rahmen eines abzuschließenden Lizenzvertrages ein nicht ausschließliches Nutzungsrecht zu angemessenen Bedingungen einzuräumen. Diese Bereitschaft ist bis ein Jahr nach Beendigung des Verbundprojektes befristet.
- 4.11 Vorarbeiten zu dem Verbundprojekt, die an der Eawag durchgeführt wurden und die die Grundlage dieses Verbundprojektes bilden, werden von der Eawag in Form einer Erfindung zum Schutzrecht angemeldet. Die Eawag räumt den Partnern für die Dauer des Projektes ein kostenloses Nutzungsrecht ein; bei einer kommerziellen Nutzung erfolgt die Nutzungseinräumung entgeltlich zu angemessenen Gebühren.

5. Finanzierung

Jeder Partner trägt die ihm im Rahmen der Durchführung dieser Vereinbarung entstehenden Kosten unter Verwendung der DBU-Zuwendung selbst.

6. Sonstige Zusammenarbeit/FuE-Fremdleistungen

- 6.1 Soweit ein Partner im Rahmen der Arbeiten im Verbundprojekt mit einem Dritten zusammenarbeitet, hat er sicherzustellen, dass die anderen Partner an den Ergebnissen des Dritten mindestens die gleichen Rechte erhalten, die sie hätten, wenn die Ergebnisse von dem Partner selbst erarbeitet worden wären.

Vor der Vergabe von Aufträgen zu FuE-Arbeiten im Laufe des Verbundprojektes sind die anderen Partner schriftlich über die beabsichtigte Auftragsvergabe zu informieren, soweit es die Kernaufgaben des Projektes betrifft.

- 6.2 Der Partner, der zur Erledigung seiner Arbeiten im Rahmen des Verbundprojektes einen Auftrag vergibt, trägt hierfür die Verantwortung und steht insbesondere dafür ein, dass der Auftragnehmer die in Ziff. 7 geregelten Verpflichtungen einhält.

7. Vertrauliche Behandlung/Veröffentlichungen

- 7.1 Die Partner werden - soweit in den Zuwendungsbedingungen der DBU nicht zwingend anders gefordert - die als vertraulich gekennzeichneten Informationen, die ihnen im Rahmen dieser Vereinbarung von den jeweils anderen Partnern übermittelt wurden, auch nach Beendigung oder Ausscheiden aus dieser Vereinbarung vertraulich behandeln und Dritten gegenüber nicht offenlegen.

- 7.2 Diese Verpflichtungen gemäß der Ziff. 7.1 gelten nicht für solche Informationen, die nachweislich

- durch Publikationen oder dergleichen allgemein bekannt sind oder
- ohne Verschulden des empfangenden Partners Gemeingut werden oder

- die ohne Verpflichtung zur Vertraulichkeit einem Partner durch Dritte überlassen wurden oder
 - vor Mitteilung durch einen anderen Partner dem empfangenden Partner bereits bekannt waren oder
 - das Ergebnis von Arbeiten von Mitarbeitern des empfangenden Partners sind, ohne dass die betreffenden Mitarbeiter Zugang zu den Informationen hatten.
- 7.3 Die Partner werden auch gegenüber Ihren Mitarbeitern im Hinblick auf die Vertraulichkeit der Informationen nach diesen Vorschriften die üblichen und zumutbaren Maßnahmen treffen.
- 7.4 Jeder Partner kann seine eigenen Arbeitsergebnisse veröffentlichen. Dabei ist in geeigneter Form auf das Verbundprojekt hinzuweisen. Es besteht die Verpflichtung, die Veröffentlichungen den anderen Vertragspartnern vorab mitzuteilen.
- 7.5 Veröffentlichungen, die vertraulich zu behandelnde Informationen anderer Partner enthalten oder auf Arbeitsergebnisse anderer Partner Bezug nehmen oder diese enthalten, bedürfen der vorherigen schriftlichen Zustimmung des jeweils betroffenen Partners. Kein Partner darf seine Zustimmung unbillig verweigern. Das Zustimmungserfordernis entfällt für Partner, wenn sie in Erfüllung ihrer gesetzlichen oder satzungsmäßigen Verpflichtung zur Veröffentlichung von Forschungsergebnissen lediglich grundsätzliche wissenschaftliche Aussagen oder Kenntnisse veröffentlichen, die keine Geschäftsgeheimnisse oder noch zu patentierendes technisches Wissen des jeweils betroffenen Partners darstellen.
- 8. Dauer der Kooperationsvereinbarung**
- 8.1 Diese Vereinbarung tritt nach Unterzeichnung aller Partner zu Beginn der Laufzeit des Verbundprojektes in Kraft und endet, nachdem der Zuwendungsgeber den gemeinsamen Abschlussbericht akzeptiert hat, soweit sie nicht vorher gekündigt oder sonstige beendet wird.
- 8.2 Jeder Partner ist berechtigt, diesen Vertrag aus wichtigem Grund zu kündigen. Einen wichtigen Grund stellt insbesondere die wesentliche Einschränkung oder Modifizierung der Förderung, die Einstellung oder Reduzierung der Förderung gegenüber einem oder mehreren Partnern dar, das Ausscheiden eines Partners, oder der Umstand, dass die Ergebnisse zeigen, dass die Zielsetzung des Verbundvorhabens nicht realisiert werden kann. Die Kündigung ist schriftlich dem Projektträger, dem Projektkoordinator und den Partnern mitzuteilen. Der kündigende Partner wird einen Abschlussbericht erstellen sowie auf Wunsch die von anderen Partnern erhaltenen Unterlagen, Dokumentationen, Datenträger und Objekte zurückgeben. Die Vereinbarung zwischen den übrigen Partnern wird durch das Ausscheiden des kündigenden Partners nicht berührt.
- 8.3 Im Falle des Ausscheidens des anderen Partners gemäß § 8.2
- beschränken sich seine Rechte auf die ihm bis zum Zugang der Kündigung von den anderen Partner mitgeteilten Arbeitsergebnisse;

- bleiben die dem anderen Partner durch den vorliegenden Vertrag eingeräumten Nutzungs- und Benutzungsrechte unberührt;
- wird die Zusammenarbeit von den anderen Partnern fortgeführt, vorausgesetzt, dass diese die nicht erfüllten Aufgaben des ausscheidenden Partners übernehmen und über die in diesem Zusammenhang zu leistenden Zahlungen verständigen können.

8.4 Die Verpflichtungen der anderen Partner gemäß § 4, 6 und § 7 dieses Vertrages gelten dem ausscheidenden Partner gegenüber nur für Arbeitsergebnisse, die vor Zugang der Kündigung entstanden sind, sowie für Schutzrechte, die vor dem Zugang der Kündigung angemeldet worden sind. Verpflichtungen des ausscheidenden Partners gemäß den vorstehend bezifferten Bestimmungen, beispielsweise Berichtspflichten, gelten auch nach seinem Ausscheiden für alle Informationen, Materialien oder Komponenten bzw. die dazugehörigen Schutzrechte, die er aufgrund von Arbeiten erhält, deren Durchführung er im Rahmen des Verbundprojektes übernommen bzw. begonnen hat.

9. Gewährleistung/Haftung

9.1 Die Partner werden die von Ihnen im Rahmen des Verbundprojektes übernommenen Arbeiten sachgemäß und nach bestem Wissen unter Berücksichtigung des Standes von Wissenschaft und Technik ausführen. Die Partner übernehmen keine Gewähr dafür, dass die von Ihnen aufgrund dieser Zusammenarbeit erarbeiteten Ergebnisse frei von Schutzrechten Dritter sind. Sobald einem Partner jedoch solche Schutzrechte bekannt werden, wird er die anderen Partner darüber unterrichten.

9.2 Ansprüche der Partner gegeneinander auf Ersatz von Schäden sind ausgeschlossen, soweit sie nicht auf Vorsatz oder grober Fahrlässigkeit beruhen. Dies gilt auch für mittelbare Schäden. Die Haftung für Personenschäden richtet sich nach den gesetzlichen Bestimmungen.

9.3 Die Partner werden im Rahmen der Zusammenarbeit die Übermittlung von Informationen mit der in eigenen Angelegenheiten üblichen Sorgfalt vornehmen. Die Partner haften weder während der Dauer der Zusammenarbeit noch nach Vertragsende für die Richtigkeit und Vollständigkeit der im Rahmen dieser Vereinbarung von Ihnen übermittelten Informationen sowie für Schäden gleich welcher Art, die aus der Verwertung dieser Informationen entstehen. Die Bestimmungen der Ziffern 9.1 und 9.2 bleiben hiervon unberührt.

10. Schlussbestimmungen

10.1 Sollte eine Bestimmung dieser Vereinbarung unwirksam sein oder werden, so berührt dies die Wirksamkeit der übrigen Bestimmungen dieser Vereinbarung nicht. Die Bestimmung soll vielmehr rückwirkend durch eine Regelung ersetzt werden, die rechtlich zulässig ist und in ihrem Gehalt der ursprünglichen Bestimmung am nächsten kommt.

- 10.2 Kein Partner ist berechtigt, mit Wirkung für andere Partner ohne deren vorherige ausdrückliche schriftliche Zustimmung Verpflichtungen zu übernehmen.
- 10.3 Änderungen und Ergänzungen dieser Vereinbarung einschließlich dieser Formvorschrift bedürfen der Schriftform.
- 10.4 Evtl. Meinungsverschiedenheiten aus dieser Vereinbarung, auch solche, die erst nach ihrer Beendigung entstehen, versuchen die beteiligten Partner gütlich beizulegen. Gelingt dies nicht, soll zunächst der Projektträger, anschließend die DBU gebeten werden, einen Meinungsausgleich herbeizuführen.
- 10.5 Die Rechte der DBU bleiben von dieser Vereinbarung unberührt und gehen dieser vor. Verpflichtungen der Partner gegenüber der DBU aus ihren jeweiligen Zuwendungsbescheiden bleiben von dieser Vereinbarung ebenfalls unberührt und gehen dieser vor.

Düsseldorf, den
Eawag

.....
Dr. Birgit Geuke

.....
Dr. Hans-Peter E. Kohler

Düsseldorf, den
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

.....
Prof. Ulf Pallme König
(Kanzler)

.....
Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger
(Projektleiter)

Dortmund, den
Universität Dortmund
Für den Rektor,
Der Kanzler
Im Auftrag

Für die ausführende Stelle:
.....
Univ.-Prof. Dr. Andreas Schmid

.....
Hans-Werner Pickhan

Tübingen, den
EMC microcollections GmbH

.....
Prof. Dr. Karl-Heinz Wiesmüller

9.2 Tagungsbeiträge

Vorträge

SGM Jahrestagung 2008, Interlaken

BACTERIAL β -AMINOPEPTIDASES ACTING AS β -PEPTIDE-SYNTHESIZING ENZYMES

T. Heck¹, H.-P. E. Kohler¹, M. Limbach², O. Flögel², D. Seebach², B. Geueke¹

¹ Environmental Microbiology, EAWAG, Dübendorf, Switzerland

² Department of Chemistry and Applied Biosciences, ETHZ, Zürich, Switzerland

High proteolytic stability and the ability to fold into well-defined secondary structures are features commonly associated with β -peptides, which were synthesized chemically for the first time in 1996. Since then, extensive research indicated a promising potential of these compounds as innovative peptide drugs mimicking natural peptides in protein-ligand interactions, yet being resistant to proteolytic breakdown *in vivo*. However, the formerly proposed stability of β -peptides is not absolute. We discovered that the bacterial hydrolases BapA from *Sphingosinicella xenopeptidilytica* and DmpA from *Ochrobactrum anthropi* efficiently catalyzed the hydrolysis of small β -peptides *in vitro* and exhibited very distinct substrate specificities.

The synthesis of β -peptides could so far only be accomplished by classical chemical synthesis methods. Based on our experiences with the enzymatic degradation of β -peptides, we employed the hydrolases BapA and DmpA as biocatalysts for the reverse reaction forming β -peptides from β -amino acid building blocks. Both enzymes were capable of coupling six different β -amino acids to oligomers with chain lengths of up to eight amino acid residues. We observed very high conversion rates, which correspond to dimer yields of up to 76%. Moreover, BapA turned out to be a versatile catalyst capable of coupling various β -amino acid residues to the *N*-termini of β - and α -amino acids and even to an α -tripeptide. The naturally occurring β/α -dipeptide carnosine (β hGly-His), which is an important antioxidant in muscle and nerve cells, was formed with almost 50% yield by BapA.

The possibility of catalyzing reactions with many *N*-terminal β -amino acid residues of peptides may suggest interesting practical applications of the β -aminopeptidases BapA and DmpA and provides the basis for an approach to biocatalytic synthesis of β -peptides.

Bacterial β -Aminopeptidases Acting as β -Peptide-Synthesizing Enzymes

T. Heck¹, H.-P. E. Kohler¹, M. Limbach², O. Flögel², D. Seebach², B. Geuke¹

¹Environmental Microbiology, EAWAG, Dübendorf, Switzerland; ²Department of Chemistry and Applied Biosciences, ETHZ, Zürich, Switzerland

High proteolytic stability and the ability to fold into well-defined secondary structures are features commonly associated with β -peptides. In recent years, extensive research indicated a promising potential of these compounds as innovative peptide drugs mimicking natural peptides in protein-ligand interactions, yet being resistant to proteolytic breakdown *in vivo* [1]. However, the formerly proposed stability of β -peptides is not absolute. We discovered that the bacterial hydrolases BapA from *Sphingosinicella xenopeptidilytica*, BapA from *Sphingosinicella microcystinivorans* and DmpA from *Ochrobactrum anthropi* efficiently catalyzed the hydrolysis of small β -peptides *in vitro* and exhibited very distinct substrate specificities [2].

Apart from one lipase-catalyzed reaction, the synthesis of β -peptides has thus far exclusively been accomplished by nonenzymatic methods. Based on our experiences with the enzymatic degradation of β -peptides, we employed the β -aminopeptidases BapA and DmpA as biocatalysts for the reverse reaction forming β -peptides from β -amino acid building blocks. Both enzymes were capable of coupling six different β -amino acids to oligomers with chain lengths of up to eight amino acid residues. We observed very high conversion rates, which correspond to dimer yields of up to 76%. Moreover, BapA turned out to be a versatile catalyst capable of coupling various β -amino acid residues to the *N*-termini of β - and α -amino acids and even to an α -tripeptide. The naturally occurring β/α -dipeptide carnosine (β hGly-His), which is an important antioxidant in muscle and nerve cells, was formed with almost 50% yield by BapA from *Sphingosinicella microcystinivorans* (Figure 1) [3]. The possibility of catalyzing reactions with many *N*-terminal β -amino acid residues of peptides may suggest interesting practical applications of the β -aminopeptidases BapA and DmpA and provides the basis for an approach to biocatalytic synthesis of β -peptides.

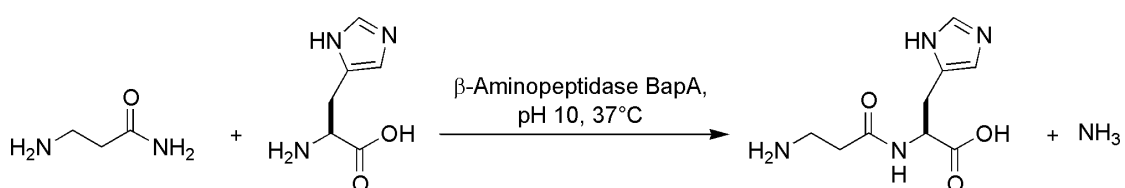


Figure 1: Enzyme-catalyzed formation of carnosine (β hGly-His) from β -homoglycine amide and histidine.

This study was financed by the Deutsche Bundesstiftung Umwelt (DBU-Projekt AZ 13176-32).

[1] D. Seebach, A. K. Beck, D. J. Bierbaum, *Chem. Biodivers.*, 2004, 1, 1111.

[2] (a) B. Geuke, H.-P. E. Kohler, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 74, 1197. (b) T. Heck, M. Limbach, B. Geuke, M. Zacharias, J. Gardiner, H.-P. E. Kohler, D. Seebach, *Chem. Biodivers.*, 2006, 3, 1325.

[3] T. Heck, H.-P. E. Kohler, M. Limbach, O. Flögel, D. Seebach, B. Geuke, *Chem. Biodivers.*, 2007, 4, 2016.

Bioperspectives 2008, Hannover

Enzyme-catalyzed synthesis of β -peptides

Tobias Heck, Hans-Peter E. Kohler, Birgit Geueke

High proteolytic stability and the ability to fold into well-defined secondary structures are features commonly associated with β -peptides that are composed of β -amino acids with proteinogenic side chains. Since 1996, when such β -peptides were chemically synthesized for the first time, extensive research indicated a promising potential of these compounds as innovative peptide drugs mimicking natural peptides in protein-ligand interactions, yet being resistant towards proteolytic breakdown *in vivo*.

However, the formerly proposed stability of β -peptides is not absolute. Bacterial β -aminopeptidases from different strains of *Proteobacteria* exhibit not only the unique potential to hydrolyze β -peptides, but also the ability to catalyze β -peptide bond formation under appropriate experimental conditions. We applied the two β -aminopeptidases BapA and DmpA from *Sphingosinella xenopeptidolytica* and *Ochrobactrum anthropi*, respectively, as catalysts in the formation of β -peptides. Both enzymes synthesized oligomers with chain lengths of up to eight identical β -amino acid residues. We observed very high conversion rates, which correspond to dimer yields of up to 76%. Moreover, BapA turned out to be a versatile catalyst capable of coupling various β -amino acid residues to the N-termini of β - and α -amino acids and even to an α -tripeptide. The naturally occurring β/α -dipeptide carnosine (β hGly-His), which is an important antioxidant in muscle and nerve cells, was formed with almost 50% conversion by BapA. These results may suggest interesting practical applications of the β -aminopeptidases BapA and DmpA and provides the basis for a biocatalytic approach for the synthesis of β -peptides.

Poster

SGM Jahrestagung 2006, Interlaken

BACTERIAL AMINOPEPTIDASES WITH UNUSUAL SUBSTRATE SPECIFICITIES FOR β -AND MIXED α,β -OLIGOPEPTIDES

T. Heck¹, B. Geueke¹, M. Limbach², J. Gardiner², D. Seebach², H.-P. E. Kohler¹

¹ Environmental Microbiology, EAWAG, Dübendorf, Switzerland

² Department of Chemistry and Applied Biosciences, ETHZ, Zürich, Switzerland

β -Amino acids can be considered as homologues of α -amino acids with an additional carbon atom in the amino acid backbone. Peptides comprised of β -amino acids exhibit some astonishing properties such as the ability to adopt defined secondary structures and to mimic α -peptidic ligands in protein-protein interactions. They have been reported to be metabolically stable *in vivo* and are also resistant to degradation by many common proteases and peptidases *in vitro*. Recently, two β -peptidyl-aminopeptidases (BapA) from two closely related strains of the genus *Sphingosinella* were isolated and functionally characterized. They share the unique feature of being able to hydrolyze N-terminal β -amino acids from short oligopeptides. These results clearly demonstrated that the biological stability of β -peptidic structures is not absolute.

Comparative studies revealed that both BapA enzymes and a third related enzyme, the L-aminopeptidase-D-amidase/esterase DmpA from *Ochrobactrum anthropi*, exhibited unique but clearly distinct substrate specificities. Both BapA enzymes were absolutely specific for peptides carrying a β -amino acid residue in the N-terminal position and did not accept substrates with N-terminal α -amino acids. Since peptides consisting exclusively of β -amino acids do not occur in nature the physiological role of these enzymes is yet to be elucidated. In contrast, DmpA cleaved α -peptides as well as β - and mixed α,β -peptides, but a small side chain of the N-terminal β -amino acid residue seemed to be a prerequisite for the successful hydrolysis of the peptide. Astonishingly, DmpA exhibited much higher catalytic rates for the mixed α,β -dipeptide carnosine, which is highly concentrated in muscle and brain tissues, than for any other substrate described until now.

Biocat 2008, Hamburg

Site directed mutagenesis effects the expression, processing and substrate specificity of β -aminopeptidases

B. Geueke, E.-M. Schaub, V. S. Makam, T. Heck, H.-P. E. Kohler

Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology (Eawag), Environmental Microbiology, Ueberlandstrasse 133, 8600 Dübendorf, Switzerland

Exclusive properties of the recently described genus *Sphingosinicella* are the presence of β -aminopeptidases and the ability to grow on β -peptides, which are unnatural peptides composed of β -amino acids. Two further β -aminopeptidases from *Ochrobactrum anthropi* and *Pseudomonas* sp. are known, but differ considerably in their substrate specificities from the enzymes found in *Sphingosinicella*.

Site-directed mutagenesis studies were performed with BapA from *S. xenopeptidilytica* and DmpA from *O. anthropi* to elucidate the molecular mechanism of substrate recognition and specificity. In general, the activity of BapA was decreased by these mutations, but the affinity towards peptides with small N-terminal β -amino acids such as β -homoglycine (also known as β -alanine) was increased by a factor of up to 27 for mutations at position 164.

However, in DmpA the introduced mutations strongly affected the enzyme expression and processing in *E. coli*. Since it is a prerequisite for activity that the preproteins of β -aminopeptidases are cleaved into two subunits at a defined site, these unprocessed mutants were inactive. A possible solution of this unexpected problem is the separate expression of both DmpA subunits in one *E. coli* strain.

9.3 Patentanmeldung

22.06.2007

EAWAG

Beschreibung

5

Titel

Enzymatisches Syntheseverfahren zur Herstellung beta-aminosäurehaltiger Peptide

Technisches Gebiet

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung beta-aminosäurehaltiger Peptide
10 oder Proteine.

Stand der Technik

β -Aminosäuren unterscheiden sich von gewöhnlichen α -Aminosäuren durch eine
zusätzliche Methylgruppe zwischen Amino- und Carboxyterminus (Nomenklatur in
15 diesem Dokument nach Chem. Biodiv. 1, 2004, Seite 11). β -Peptide sind Peptide, die
aus β -Aminosäuren aufgebaut sind; diese Substanzen kommen nicht natürlich vor. Wie
 α -Peptide besitzen auch β -Peptide die Fähigkeit, definierte Sekundärstrukturen
anzunehmen, weisen aber im Gegensatz zu ersteren eine erstaunlich hohe Stabilität
gegen den Abbau durch proteolytische Enzyme *in vitro* und *in vivo* auf. Aufgrund ihrer
20 hohen metabolischen Stabilität sowie ihren strukturellen Ähnlichkeiten zu α -Peptiden
gelten β -Peptide als hoffnungsvolle Verbindungen für die Entwicklung neuartiger
Peptidmimetika. Ein erstes Beispiel für die Imitierung eines natürlichen α -Peptids durch
ein β -Peptid ist die Herstellung eines synthetischen β -Peptids, das als
Somatostatinanalogon mit nanomolaren Affinitäten am humanen Somatostatin hsst₄-
25 Rezeptor bindet (J. Med. Chem. 44, 2001, Seite 2460; Naunyn-Schiederberg's Arch.
Pharmacol. 367, 2003, Seite 95). In J. Am. Chem. Soc. 127, 2005, Seite 13126 gelang

die Synthese mehrerer β -Peptide, die an das HIV-Protein gp41 binden und dadurch die Fusion des Virus mit der Wirtszellmembran verhindern. Diese ersten Anwendungsbeispiele verdeutlichen das hohe pharmazeutische Potential von β -Peptiden.

- 5 Für die Synthese von kurzkettigen β -Peptiden können gewisse klassische organisch-chemische Synthesemethoden, die für α -Peptide entwickelt wurden, in angepasster Form übernommen werden. Dazu werden die Synthesen z.B. an einer Festphase unter Verwendung von Fmoc-Schutzgruppen oder in Lösung mit Boc-Schutzgruppen durchgeführt (Chimia 51, 1997, Seite 315; Helv. Chim. Acta 81, 1998, Seite 187). Für
- 10 längerkettige β -Peptide hingegen funktionieren diese Standardmethoden nur eingeschränkt. Die Eigenschaft der β -Peptide, schon ab einer Kettenlänge von sechs Aminosäuren stabile Sekundärstrukturen auszubilden, wirkt sich bei zunehmender Kettenlänge negativ auf die Löslichkeit der Peptide, die Reaktionszeit und die Entschützungsreaktion aus (J. Pept. Res. 65, 2005, Seite 229). Da die chemische
- 15 Herstellung von Peptiden häufig mit einer aufwendigen Schutzgruppenchemie, dem Einsatz starker anorganischer Säuren und Basen sowie einer Vielzahl organischer Lösungsmittel verbunden ist, ist die Anwendung von chemischen Synthesemethoden im industriellen Massstab aus ökologischen und auch wirtschaftlichen Gesichtspunkten oft nicht ideal.
- 20 Das β,α -Dipeptid L-Carnosin (β hGly-L-His) kommt in hohen Konzentrationen in Muskel- und Nervenzellen von Vertebraten vor. Es wirkt als Antioxidans und verhindert die nicht-enzymatische Glycosylierung von Proteinen und verlangsamt somit den Zellalterungsprozess (Sci. Ageing Knowl. Environ. 18, 2005, Seite 12). Daneben gilt es als wirksamer Schutz vor Diabetes-bedingten Nierenleiden. Aufgrund dieser
- 25 Eigenschaften besitzt L-Carnosin ein grosses Marktpotential und wird bereits als „Anti-ageing-Peptid“ weltweit verkauft.

Verschiedene Verfahren zur chemischen Synthese von L-Carnosin sind bereits beschrieben. In der US 4359416 basiert die L-Carnosinsynthese z.B. auf einer Reaktion aus L-Histidin mit Dihydro-1,3-thiazin-2,6-dion. Für diesen Syntheseweg ist der Einsatz von Schutzgruppen unbedingt notwendig, weshalb die Anwendung des Prozesses im grossen Massstab aus Kostengründen nicht geeignet ist.

Ein weiterer Ansatz zur Synthese von L-Carnosin wird in der US 6878829 beschrieben. Dieses Verfahren ist kostengünstig und wenig aufwendig und eignet sich daher für einen Einsatz im industriellen Massstab. Aus ökologischen Gesichtspunkten ist die Methode jedoch äusserst bedenklich, da grosse Mengen giftiger Lösungsmittel wie Ethylacetat, N,N-Dimethylformamid und Diethylether, gesundheitsschädliche Cyanoverbindungen und Schwermetalle wie Rhodium, Nickel und Kobalt erforderlich sind.

In J. Org. Chem. 48, 1983, Seite 392 wird die Synthese von Carnosin aus L-Histidin und β Gly unter Einsatz von Methylethylxanthat, Phosphortribromid sowie diverser Lösungsmittel, Säuren und Basen beschrieben.

Neben den klassischen chemischen Methoden kommt dem Einsatz bakterieller Hydrolasen als Biokatalysatoren für die α -Peptidsynthese eine wachsende Bedeutung zu. Der Vorteil gegenüber der chemischen Synthese liegt in der hohen Regio- und Stereoselektivität enzymkatalysierter Reaktionen sowie der hohen Spezifität der Katalysatoren, was den Einsatz von Schutzgruppen oft überflüssig macht. Der Einsatz von hydrolytischen Enzymen in wässrigem Milieu zur Synthese von α -Peptiden ist bereits mehrfach beschrieben. So beschreibt die EP0017485 ein Verfahren zur enzymatischen Herstellung von Peptiden, bei welchem eine modifizierte α -Aminosäure (N-terminal geschützt) als Acyldonor mit wenigstens einer weiteren α -L-Aminosäure als

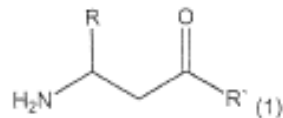
- Acylakzeptor in Anwesenheit einer L-spezifischen Serin oder Thiol-Carboxypeptidase in einem bestimmten pH-Bereich reagiert wird. Das in diesem Verfahren eingesetzte Enzym ist eine aus einem Hefepilz isolierte Carboxypeptidase Y, welche ein Serin-Enzym ist. In der EP 278787 wird das Verfahren gemäss der EP 0017485 in einem
- 5 Prozess vorgeschlagen, bei welchem als Ausgangsmaterial (Acyldonor) ein N-terminal ungeschützter α -Aminosäureester eingesetzt wird. Ein analoges Verfahren zur Herstellung von Dipeptiden und modifizierten Dipeptiden ist in der EP 0359399 beschrieben, dort unter Verwendung anderer, nicht auf Serin resp. Thiol eingeschränkter Amidase- oder Esteraseenzyme.
- 10 Des weiteren wird in der US 2005/0032187 A1 die Verwendung von spezifischen Enzymen, namentlich aus der Gattung *Empedobacter* oder *Sphingobacterium* zur Herstellung von einem α -Aminosäure Peptid aus einer Carboxy-Komponente und einer Amin-Komponente vorgeschlagen. Spezifisch wird ein Enzym aus *Empedobacter brevis* FERM BP-8113 für die Synthese von L-Ala-L-Gln und weiteren α -Dipeptiden verwendet.
- 15 Da diese Methode gänzlich auf den Einsatz von Schutzgruppen und organischen Lösungsmitteln verzichtet, stellt sie eine effektive und umweltfreundliche Alternative zur chemischen Synthese von α -Peptiden dar.

Darstellung der Erfindung

- 20 Die hier dargestellte Erfindung betrifft ein einstufiges Verfahren zur Synthese β -aminosäurehaltiger Peptide, ggf. sogar Proteine. Insbesondere wird eine Mischung aus einer am C-Terminus aktivierten β -Aminosäure und einer α -Aminosäure, einer β -Aminosäure oder einem Peptid mit einem Enzym so behandelt, dass ein Di-, Tri- oder Oligopeptid entsteht. Die vorliegende Erfindung liefert des weiteren ein geeignetes
- 25 Enzymsystem, durch das diese Reaktionen katalysiert werden.

Spezifisch wird ein Verfahren zur kostengünstigen Herstellung β -aminosäurehaltiger Peptide mittels Aminopeptidasen vorgeschlagen.

- Insbesondere werden gemäß einer ersten bevorzugten Ausführungsform die Aminopeptidasen BapA aus den Gattungen *Sphingosinicella* oder *Ochrobactrum* vorgeschlagen, bevorzugtermaßen aus den Arten *Sphingosinicella xenopeptidolytica* 3-2W4 (3-2W4 BapA), BapA aus *Sphingosinicella microcystinivorans* Y2 (Y2 BapA) und DmpA aus *Ochrobactrum anthropi*. Diese Systeme werden als Biokatalysatoren zur Herstellung von β - und gemischten β,α -Peptiden aus einem Acyldonor und einem Acylakzeptor vorgeschlagen. Als Acyldonor dient bevorzugtermaßen ein β -Aminosäureamid oder -ester der Formel:



- worin R entweder H, CH_3 , $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ oder $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ ist und R' $\text{NHC}_6\text{H}_4\text{NO}_2$, OCH_3 , OCH_2CH_3 oder NH_2 ist. Die Enzyme katalysieren unter Abspaltung von *p*-Nitroanilin, Ethanol, Methanol oder NH_3 die Bildung einer Peptidbindung zwischen dem Carboxyterminus des Acyldonors und dem freien Aminotermius des Acylakzeptors. Als Acylakzeptor dient eine α -Aminosäure, eine β -Aminosäure oder ein Peptid mit ungeschütztem Aminotermius.
- Die Neuheit der hier vorliegenden Erfindung besteht unter anderem darin, dass Aminopeptidasen erstmals für die enzymkatalysierte Bildung einer Peptidbindung zwischen dem Carboxyterminus einer β -Aminosäure und dem ungeschützten Aminotermius einer zweiten Aminosäure oder eines Peptids herangezogen werden. Ein wesentlicher Vorteil des Einsatzes der hier verwendeten Aminopeptidasen zur

biotechnologischen Synthese von β - und gemischten β,α -Peptiden gegenüber der chemischen Synthese liegt in den milden Reaktionsbedingungen, unter denen die Reaktion stattfindet. Ausgehend von ungeschützten Reaktanden läuft die Peptidsynthese in einem rein wässrigen Reaktionsmedium ab und bedient sich keiner organischen Lösungsmittel oder Schwermetalle. Daher stellt die Verwendung der beschriebenen Amino-peptidasen als Biokatalysatoren für die Synthese von β - und gemischten β,α -Peptiden eine kostengünstige und umweltverträgliche Alternative zur chemischen Synthese dar und bietet eine Plattformtechnologie für die Herstellung eines breiten Produktspektrums. Zum jetzigen Zeitpunkt sind kaum Enzyme beschrieben, die in der Lage sind mit β -aminosäurehaltigen Strukturen zu reagieren, geschweige denn gibt es in der Literaturhinweise dafür, dass derartige Enzyme im Sinne der vorliegenden Erfindung zur Synthese von β - und gemischten β,α -Peptiden eingesetzt werden könnten. Dies unterstreicht die Exklusivität des vorliegenden, biokatalytischen Reaktionssystems.

Enzymkatalysierte Prozesse existieren also für die Synthese von β -Peptiden bisher nicht. Bisher sind - mit Ausnahme der hier erwähnten β -Peptidylamino-peptidasen - kaum Enzyme beschrieben, die überhaupt in der Lage sind β -aminosäurehaltige Strukturen als Substrate zu akzeptieren ("Bacterial β -peptidyl aminopeptidasen: on the hydrolytic degradation of β -peptides", Appl Microbiol Biotechnol, 2007 epub), weitere Systeme mit dieser Fähigkeit werden aber wahrscheinlich in Zukunft gefunden werden und diese sind, sofern sie die erfindungsgemäße Funktion übernehmen können, ebenfalls vom allgemeinen Erfindungsgedanken umfasst.

Weitere bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung sind in den abhängigen Ansprüchen beschrieben.

25

Kurze Erläuterung der Figuren

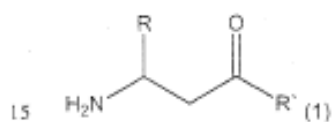
Figur 1: pH-Abhängigkeit der durch BapA aus *Sphingosinicella xenopeptidilytica* 3-2W4 katalysierten Oligomerisierung von β hGly-Komponenten;

Figur 2: Synthese von L-Camosin durch 3-2W4 BapA (A), Y2 BapA (B) und DmpA (C) aus β hGly-pNA und L-Histidin; ● β hGly-pNA, □ p-Nitroanilin, ▲ L-Camosin; und

Figur 3: Synthese von β^3 hAla- β^3 hLeu durch 3-2W4 BapA (A), Y2 BapA (B) und DmpA (C) aus β^3 hAla-pNA und β^3 hLeu; ● β^3 hAla-pNA, □ p-Nitroanilin, ▲ β^3 hAla- β^3 hLeu.

10 Wege zur Ausführung der Erfindung

Gemäss der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren beschrieben zur enzymkatalysierten Synthese von β -Peptiden und gemischten β,α -Peptiden, insbesondere von L-Camosin. Dabei dient ein β -Aminosäureamid der Formel:



worin R entweder H, CH₃, CH₂CH(CH₃)₂ oder CH₂C₆H₅ ist und R' NHC₆H₄NO₂, OCH₃, OCH₂CH₃ oder NH₂ ist als Acyldonor, der unter Abspaltung von p-Nitroanilin, Methanol, Ethanol oder NH₃ an den freien Aminoterminus eines Acylakzeptors gekoppelt wird. Als

20 Acylakzeptoren kommen β -Aminosäuren, α -Aminosäuren und Peptide mit einem ungeschützten Aminoterminus in Frage.

Bei zwei der als Biokatalysatoren verwendeten Enzyme handelt es sich um Aminopeptidasen, die aus den bakteriellen Stämmen *Sphingosinicella xenopeptidilytica*

22.06.2007

EAWAG

3-2W4 und *Sphingosinicella microcystinivorans* Y2 isoliert wurden. Ihrer exklusiven Fähigkeit, β -Peptide zu spalten, verdanken sie den Namen β -Peptidylaminopetidase (BapA). Das dritte verwendete Enzym ist die L-Amino-peptidase D-Alanin-Esterase/Amidase DmpA aus *Ochrobactrum anthropi*, die neben β - und gemischten β, α -Peptiden auch α -Peptide, α -Aminosäureamide und α -Aminosäureester hydrolysiert. Die Amino-peptidasen sind hinsichtlich ihrer biochemischen und hydrolytischen Eigenschaften, sowie hinsichtlich Ihrer Isolation und Reinigung bereits ausführlich charakterisiert (Biochem. J. 341 (Pt 1), 1999, Seite 147; FEBS J. 273 (23), 2006, Seite 5261; Chem. Biodiv. 3 (12), 2006, Seite 1325). Der Offenbarungsgehalt dieser Literaturstellen sei bezüglich der Herstellung respektive der Zurverfügungstellung der Amino-peptidasen aus den oben genannten Systemen ausdrücklich mit eingeschlossen. Die hier beschriebenen und verwendeten Organismen sind erhältlich bei DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH unter der Nummer DSM17130 (*Sphingosinicella xenopeptidilytica* 3-2W4), JCM - Japanische Sammlung von Mikroorganismen unter der Nummer JCM13185 (*Sphingosinicella microcystinivorans* Y2) und BCCM - Belgische Sammlung von Mikroorganismen unter der Nummer LMG7991 (*Ochrobactrum anthropi*).

Für die hier beschriebenen Versuche werden die Amino-peptidasen in *Escherichia coli* überexprimiert und die rekombinanten Enzyme anschliessend in einem zweistufigen chromatographischen Verfahren gereinigt und lyophilisiert (J. Bacteriol. 187 (17), 2005, Seite 5910; FEBS J. 273 (23), 2006, Seite 5261; Chem. Biodiv. 3 (12), 2006, Seite 1325). Der Reaktionsansatz enthält den Acyldonor und den Acylakzeptor und wird durch Zugabe einer geeigneten Menge Enzym gestartet. Um den Verlauf der Reaktion zu verfolgen, werden dem Reaktionsansatz regelmässig Proben entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 25% (v/v) 1 M HCl abgestoppt. Die Proben werden mittels

Flüssigkeitschromatographie (reversed-phase HPLC) und Massenspektroskopie analysiert und die Produkte - wenn möglich - anhand von Referenzverbindungen quantifiziert. Da das Gleichgewicht der Reaktion auf Seite der Hydrolyseprodukte liegt, muss die Reaktion abgebrochen werden sobald die maximale Produktausbeute erreicht ist.

Beispiel 1: Bestimmung des pH-Optimum der Synthesereaktion

Die enzymkatalysierte Synthese von β -Peptiden hängt stark vom pH-Wert des Reaktionsmediums ab. Zur Ermittlung des pH-Optimums wird die durch BapA aus *Sphingosinicella xenopeptidolytica* 3-2W4 katalysierte Oligomerisierung von β hGly-Komponenten untersucht. Dabei dient β hGly-pNA sowohl als Acyldonor als auch als Acylakzeptor. Die Bildung der Peptidbindung erfolgt unter Abspaltung von *p*-Nitroanilin zwischen dem Carboxyterminus und dem freien Aminoterminal von β hGly-pNA. Der Reaktionsansatz enthält 5 mM β hGly-pNA in einem Universalpuffer bei verschiedenen pH-Werten zwischen pH 5 und pH 12 (Biochem. Z. 299, 1938, Seite 416). Durch Zugabe von 60 μ g/ml 3-2W4 BapA wird die Reaktion gestartet. Nach 8 Stunden Inkubation bei 37°C wird die Reaktion durch Zugabe von 25% (v/v) 1 M HCl abgestoppt und die Bildung von $[\beta\text{hGly}]_n\text{-pNA}$ mittels Flüssigkeitschromatographie analysiert. Figur 1 zeigt, dass eine maximale Produktausbeute von $[\beta\text{hGly}]_n\text{-pNA}$ bei pH 10 bis pH 11 erreicht wird.

Beispiel 2: Synthese von L-Carnosin

Zur Synthese des gemischten β,α -Dipeptids L-Carnosin (β hGly-L-His) werden die lyophilisierten Aminopeptidasen BapA aus den Stämmen *Sphingosinicella xenopeptidolytica* 3-2W4 und *Sphingosinicella microcystinivorans* Y2 sowie die Aminopeptidase DmpA aus *Ochrobactrum anthropi* in Universalpuffer (pH 10) gelöst.

Der Reaktionsansatz hat ein Gesamtvolumen von 600 μ l und enthält 5 mM β hGly-pNA und 25 mM L-Histidin in Universalpuffer (pH 10). Die Reaktionen werden durch Zugabe von 50 μ l der Enzymlösungen 3-2W4 BapA (**A**, 0.45 mg Protein pro ml), Y2 BapA (**B**, 0.97 mg Protein pro ml) oder DmpA (**C**, 0.011 mg Protein pro ml) gestartet. Um den zeitlichen Verlauf der Reaktion zu verfolgen, werden dem Reaktionsansatz regelmässig Proben von 50 μ l entnommen und die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 12.5 μ l 1 M HCl abgestoppt. Die Bildung von L-Carnosin wird mittels Flüssigkeitschromatographie verfolgt und die Konzentration in der Probe anhand eines Referenzpeptids quantifiziert. Auf diese Weise konnten maximale Konzentrationen an L-Carnosin von 1.53 mM mit 3-2W4 BapA, 2.30 mM mit Y2 BapA bzw. 0.33 mM L-Carnosin mit DmpA erzielt werden (Figur 2). Bezogen auf die eingesetzte Anfangskonzentration von 5 mM β hGly-pNA entspricht dies Produktausbeuten von 31% bei Inkubation mit 3-2W4 BapA, 46% mit Y2 BapA und 7% mit DmpA.

15 *Beispiel 3: Synthese von β^3 hAla- β^3 hLeu*

Zur Synthese des β -Dipeptids β^3 hAla- β^3 hLeu werden die lyophilisierten Aminopeptidasen BapA aus den Stämmen *Sphingosinicella xenopeptidolytica* 3-2W4 und *Sphingosinicella microcystinivorans* Y2 sowie die Aminopeptidase DmpA aus *Ochrobactrum anthropi* in Universalpuffer (pH 10) gelöst. Der Reaktionsansatz hat ein Gesamtvolumen von 600 μ l und enthält 5 mM β^3 hAla-pNA und 25 mM β^3 hLeu in Universalpuffer (pH 10). Die Reaktionen werden durch Zugabe von 50 μ l der Enzymlösungen 3-2W4 BapA (**A**, 0.070 mg Protein pro ml), Y2 BapA (**B**, 0.097 mg Protein pro ml) oder DmpA (**C**, 0.011 mg Protein pro ml) gestartet. Um den zeitlichen Verlauf der Reaktion zu verfolgen, werden dem Reaktionsansatz Proben von 50 μ l entnommen und die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 12.5 μ l 1 M HCl abgestoppt. Die Bildung von β^3 hAla- β^3 hLeu wird mittels Flüssigkeitschromatographie

verfolgt und die Produktkonzentration anhand eines Referenzpeptids quantifiziert. Die maximal erreichten Konzentrationen von $\beta^3\text{hAla-}\beta^3\text{hLeu}$ betragen 1.56 mM (31% Ausbeute) für 3-2W4 BapA, 2.36 mM (47% Ausbeute) für Y2 BapA bzw. 0.41 mM (8% Ausbeute) für DmpA (Abbildung 3).

5

Beispiel 4: Synthese weiterer β - und β,α -Peptide

Die Aminopeptidase BapA aus *Sphingosinicella xenopeptidolytica* 3-2W4 wird zur Synthese weiterer β - und β,α -Peptide (Tabelle 1) eingesetzt. Dabei werden $\beta\text{hGly-pNA}$ (1), $\beta\text{hGly-NH}_2$ (2), $\beta^3\text{hAla-pNA}$ (3), $\beta^3\text{hPhe-pNA}$ (4), *R*- $\beta^3\text{hPhe-pNA}$ (5) und $\beta^3\text{hLeu-pNA}$ (6) als Acyldonoren verwendet, die unter Abspaltung von *p*-Nitroanilin (1, 3-6) bzw. NH_3 (2) an den freien Aminoterminus des α -Tripeptids Val-Ala-Leu oder der Aminosäuren α -Histidin, α -Leucin und $\beta^3\text{h-Leucin}$ gekoppelt werden. Die Reaktionsansätze haben ein Gesamtvolumen von 600 μl und enthalten 5 mM Acyldonor und 25 mM Acylakzeptor in Universalpuffer (pH 10). Zur Verbesserung der Löslichkeit von Produkten und Edukten werden den Ansätzen 4 und 5 30% DMSO, dem Ansatz 6 10% DMSO zugefügt. Die Reaktionen werden durch Zugabe von 50 μl der Enzymlösung 3-2W4 BapA (0.45 mg Protein pro ml für die Ansätze 1 und 2, 0.013 mg Protein pro ml für die Ansätze 3-6) gestartet. Um den zeitlichen Verlauf der Reaktion zu verfolgen, werden dem Reaktionsansatz Proben von 50 μl entnommen und die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 12.5 μl 1 M HCl abgestoppt. Die Verifizierung der Peptidprodukte erfolgt über die Bestimmung der Massen mittels LC-MS. Eine Quantifizierung der Produkte wurde nicht durchgeführt, da momentan keine Referenzpeptide verfügbar sind. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse (Tabelle 1) ist zu erwarten, dass β -Aminosäuren, die vom N-Terminus der getesteten Peptide hydrolytisch abgespalten werden können, auch in Form eines Amids, *p*-Nitroanilids oder Esters als Substrat für die Synthesereaktion eingesetzt werden können.

10
15
20
25

Tabelle 1: Synthese verschiedener β - und β,α -Peptide katalysiert durch die Aminopeptidase BapA aus *Sphingosinicella xenopeptidolytica* 3-2W4. Dargestellt sind die Peptidprodukte mit genauer Masse (M) und der Masse des experimentell durch LC-

5 MS bestimmten Mutterions ($M+H^+$).

Acyl donor		Acylakzeptor			
		His	Leu	β^h Leu	Val-Ala-Leu
β^h Gly-pNA (1)	Produkt	β^h Gly-His	β^h Gly-Leu	β^h Gly- β^h Leu	β^h Gly-Val-Ala-Leu
	Ausbeute	31%			
	M	226.1	202.1	216.2	372.2
	$M+H^+$	227.1	203.6	217.0	372.9
β^h Gly-NH ₂ (2)	Produkt	β^h Gly-His	nicht getestet	nicht getestet	nicht getestet
	M	226.1			
	$M+H^+$	227.1			
β^h Ala-pNA (3)	Produkt	β^h Ala-His	β^h Ala-Leu	β^h Ala- β^h Leu	β^h Ala-Val-Ala-Leu
	Ausbeute			31%	
	M	240.1	216.2	230.2	386.3
	$M+H^+$	241.0	217.2	231.5	387.1
β^h Phe-pNA (4)	Produkt	β^h Phe-His	β^h Phe-Leu	β^h Phe- β^h Leu	β^h Phe-Val-Ala-Leu
	M	316.2	292.2	306.2	462.3
	$M+H^+$	317.1	292.9	307.2	463.3
<i>R</i> - β^h Phe-pNA (5)	Produkt	<i>R</i> - β^h Phe-His	<i>R</i> - β^h Phe-Leu	<i>R</i> - β^h Phe- β^h Leu	<i>R</i> - β^h Phe-Val-Ala-Leu
	M	316.2	292.2	306.2	462.3
	$M+H^+$	317.1	292.9	307.2	463.2
β^h Leu-pNA (6)	Produkt	β^h Leu-His	nicht getestet	nicht getestet	nicht getestet
	M	282.2			
	$M+H^+$	283.5			

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von β -aminosäurehaltigen Peptiden oder Proteinen, dadurch gekennzeichnet, dass
5 C-terminal aktivierte β -Aminosäuren mit wenigstens einer weiteren Aminosäure ausgewählt aus α -Aminosäuren, β -Aminosäuren und/oder α -, α/β und/oder β -Peptiden in Anwesenheit eines Enzyms zur Reaktion zum β -aminosäurehaltigen Peptid oder Protein gebracht werden.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich beim Enzym um wenigstens eine Aminopeptidase, insbesondere wenigstens eine β -Peptidylaminopeptidase handelt, und dass das Verfahren im wesentlichen einstufig durchgeführt wird.
- 15 3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens eine β -Peptidylaminopeptidase ausgewählt ist aus der Gruppe der aus der Gattung *Sphingosinicella* oder *Ochrobactrum anthropi* isolierten β -Peptidylaminopeptidasen oder Mutanten dieser Enzyme.
- 20 4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich beim Enzym um eine β -Peptidylaminopeptidase isoliert aus *Sphingosinicella xenopeptidolytica* 3-2W4, *Sphingosinicella microcystinivorans* Y2, oder L-Aminopeptidase α -Alanin-Esterase/Amidase DmpA aus *Ochrobactrum anthropi* oder eine Mischung dieser Enzyme handelt.

25

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den C-terminal aktivierten β -Aminosäuren um C-terminal aktivierte aliphatische oder aromatische β -Aminosäuren als Acyldonor handelt, insbesondere bevorzugt um β hGly, β hAla, β hLeu, β hPhe, wobei es sich um β^2 - und/oder um β^3 -Aminosäuren handeln kann.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der C-terminal aktivierten β -Aminosäure um einen β -Aminosäureester oder ein β -Aminosäureamid, bevorzugtermaßen um eine pNA, eine OMe, OEt oder eine NH_2 β -Aminosäure handelt.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der weiteren Aminosäure um ein α -Aminosäure und/oder β -Aminosäure basiertes, Di-, Tri- oder Oligopeptid mit freiem Aminoterminus als Acylakzeptor handelt.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es in im wesentlichen wässriger Lösung, gegebenenfalls unter Hinzufügung von weiteren Lösungsmitteln zur Erhöhung der Löslichkeit der Edukte und Produkte, bei einem pH im Bereich von 6 und 12, insbesondere bevorzugt im Bereich von 8 - 11 zur Bildung der neuen Peptidbindung durchgeführt wird.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass es sich beim weiteren Lösungsmittel um Dimethylsulfoxid und/oder Dimethylformamid handelt, welches insbesondere bevorzugt im Bereich von 1-70 Vol% hinzugegeben wird.

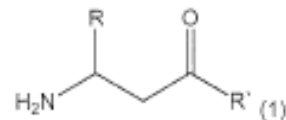
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es in einem organischen Lösungsmittel durchgeführt wird, bevorzugtermassen bei einem pH im Bereich von 6 und 12, insbesondere bevorzugt im Bereich von 8 – 11.
- 5
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es bei Temperaturen zwischen 0 and 100°C, insbesondere bevorzugt bei Temperaturen zwischen 20-40°C zur Bildung der neuen Peptidbindung durchgeführt wird.
- 10
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die wenigstens eine C-terminal aktivierte β -Aminosäure und/oder wenigstens eine weitere Aminosäure während der Reaktion kontinuierlich oder quasi-kontinuierlich zugegeben wird.
- 15
13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der C-terminal aktivierten β -Aminosäure um β hGly, insbesondere bevorzugt um β hGly-pNA handelt, und dass es sich bei der weiteren Aminosäure um L-Histidin handelt, welche zu L-Carnosin umgesetzt werden.
- 20
14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass als Enzym wenigstens eine β -Peptidylaminpeptidase in gelöster Form, durch kovalente Bindung oder durch Adsorption an Trägermaterialien immobilisiert oder in Form eines Ganzzellkatalysators, der die Enzyme rekombinant exprimiert, eingesetzt wird.
- 25

15. Verwendung eines Enzyms, bevorzugt einer Aminopeptidase, insbesondere einer β -Peptidylaminopeptidase zur Herstellung eines β -aminosäurehaltigen Peptids oder Proteins, bevorzugtermassen zur Herstellung von L-Carnosin.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur kostengünstigen Herstellung β -aminosäurehaltiger Peptide mittels Aminopeptidasen. Die Aminopeptidasen BapA aus *Sphingosinicella xenopeptidolytica* 3-2W4 (3-2W4 BapA), BapA aus *Sphingosinicella microcystinivorans* Y2 (Y2 BapA) und DmpA aus *Ochrobactrum anthropi* werden als Biokatalysatoren zur Herstellung von β - und gemischten β,α -Peptiden aus einem Acyldonor und einem Acylakzeptor vorgesehen. Als Acyldonor dient ein β -Aminosäureamid oder -ester der Formel:

10



worin R entweder H, CH_3 , $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ oder $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ ist und R' $\text{NHC}_6\text{H}_4\text{NO}_2$, OCH_3 , OCH_2CH_3 oder NH_2 ist. Die Enzyme katalysieren unter Abspaltung von *p*-Nitroanilin, Ethanol, Methanol oder NH_3 die Bildung einer Peptidbindung zwischen dem Carboxyterminus des Acyldonors und dem freien Aminotermius des Acylakzeptors. Als Acylakzeptor dient eine α -Aminosäure, eine β -Aminosäure oder ein Peptid mit ungeschütztem Aminotermius.

20

1/3

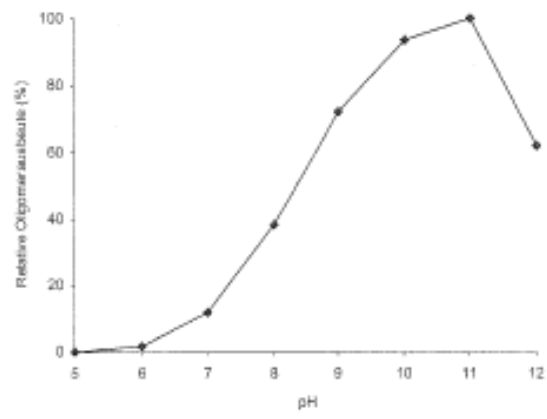


Fig. 1

2/3

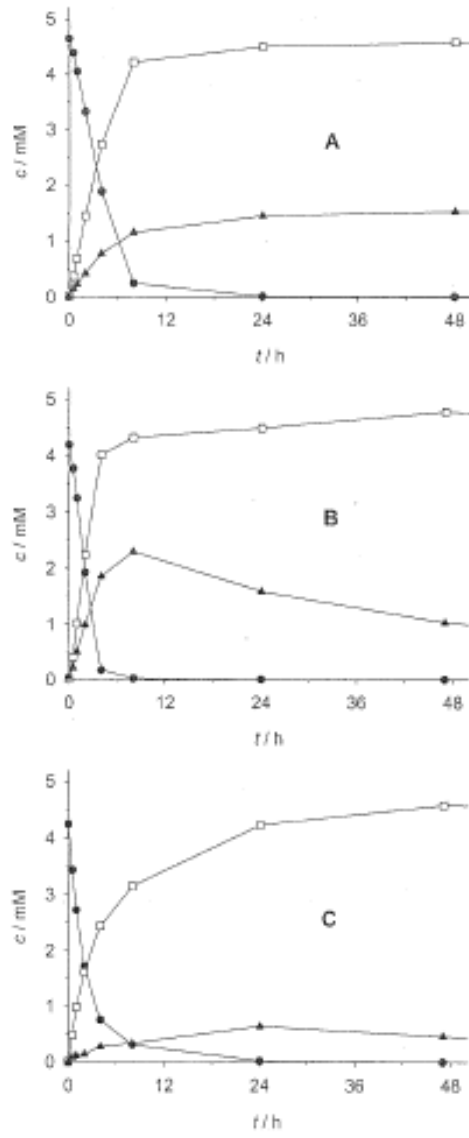


Fig. 2

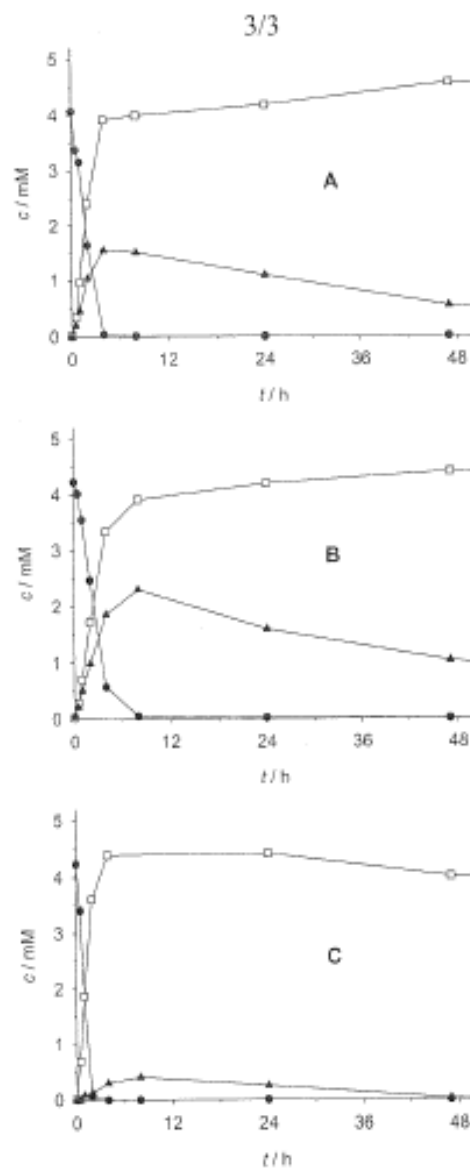


Fig. 3

9.4 Ergänzende Angaben zur Umweltevaluation (siehe 4.13)

9.4.1 Chemische Synthese nach dem Vinick Patent (Pfizer 1982)

Synthese (Schema 5; S. 81)

- Vorlage von Histidin in Wasser
- pH Einstellung auf 9.2 mit wässriger Tetraethylammoniumhydroxidlösung (20%)
- Zugabe von Tetrahydro-1,3-thiazin-2,4-dion (2facher Überschuss)
- Kräftiges Rühren, pH Kontrolle, 0-10°C, 1 Stunde Reaktionszeit
- pH Senkung auf 4,4 durch Zugabe von Ameisensäure
- Kohlenstoffoxysulfid Freisetzung (COS), 5 Minuten
- Patentbeschreibung im 7 Gramm Maßstab
- Tetrahydro-1,3-thiazin-2,4-dion : Histidin = 2 : 1
- Ein Kessel-Reaktion

Aufreinigung

Verfahrensbeispiel 1

- pH Einstellung auf 8.2
- Vakuumdestillation 45-50°C
- Carnosinfällung durch Zugabe von absolutem Ethanol bei RT über mehrere Stunden
- Filtration
- Waschen mit 95% Ethanol
- Waschen mit Methylenchlorid
- Waschen mit 95% Ethanol
- Waschen mit Methylenchlorid
- Waschen mit 95% Ethanol
- Waschen mit Ether
- Trocknung

Zusammenfassung

- Gesamtausbeute 79,6%, Maßstab 7,2 g

Verfahrensbeispiel 2

- pH Einstellung auf 8.2
- Vakuumdestillation 45-50°C
- Carnosinfällung durch Zugabe von absolutem Ethanol bei RT über mehrere Stunden
- Filtration
- Waschen mit absolutem Ethanol
- Trocknung

Zusammenfassung

- Gesamtausbeute 61,9%, Maßstab 1,4 g

9.4.2 Chemische Synthese nach dem Hildbrand Patent (Lonza 2005)

Synthese (Schema 6, S. 81)

1. Teilreaktion

- Histidin gelöst in Natriumethoxid bei RT
- Zugabe von Ethylcyanoacetate, 16 h Reflux
- Ethylcyanoacetate : Histidin = 1.5 : 1 mol/mol
- Kühlung auf Raumtemperatur
- Filtration
- Vakuumdestillation
- Suspendiert in Ethylacetate
- Filtration
- Waschen mit Ethylacetate
- 46% Ausbeute, Maßstab 28 g

2. Teilreaktion

- Vorstufe lösen in Ethanol/konz. Ammoniaklösung
- Rhodium-Aktivkohle Zugabe
- Hydrogenierung bei 110°C, 45 bar, 1 h
- Zugabe von Ethylcyanoacetate, 16 h Reflux

Aufreinigung

- Filtration
 - pH Einstellung auf 8.2 mit Ameisensäure
 - Vakuumdestillation
 - Suspendieren in Ethanol, 60°C , 30 min
 - Filtration
 - Waschen mit Ethanol
 - Waschen mit Ethylacetate
 - Waschen mit Diethylether
 - Trocknung
-
- 76% Ausbeute (2. Teilreaktion und Aufreinigung), Maßstab 1,3 g

Zusammenfassung

- Gesamtausbeute 35% (46% und 76% in den Teilschritten)

9.4.3 Enzymatische Carnosinsynthese

Enzymproduktion (DmpA Produktion)

- Fedbatch Fermentation von E. coli in def. Medium, IPTG Induktion, 37°C, 24 h
- Zentrifugation
- Zellaufschluss (Kugelmühle)
- Expanded Bed Adsorption Chromatographie (Anionenaustauscher)
- (plus Gefriertrocknung)

Enzymatische Carnosinsynthese (Schema 4, S. 34)

A. Frühe Entwicklungsphase

- Synthese in 100 mM Natriumcarbonatbuffer, pH 10
- Histidin : β -Alanin-Amid Konzentrationsverhältnis von 120 mM : 24 mM
- Reaktionszeit 1-2 Stunden bei Raumtemperatur bzw. 37°C
- DmpA Enzymkonzentration 9 mg/l
- Carnosinausbeute 30%, Carnosintiter 1.6 g

B. Späte Entwicklungsphase

- Synthese in 100 mM Natriumcarbonatbuffer, pH 10 bzw. Wechsel auf 20-50 mM Tris-Puffer, pH 10
- Histidin : β -Alanin-Amid Konzentrationsverhältnis von 250 mM : 50 mM
- Reaktionszeit 1-2 Stunden bei Raumtemperatur bzw. 37°C
- DmpA Enzymkonzentration 9 mg/l
- Carnosinausbeute 40%, Carnosintiter 4.5 g

Aufreinigung

- pH Werteinstellung auf pH 7.6-7,7

- Zugabe von 90% (v/v) Ethanol (mind. 80 (v/v)) und Ausfällung/Kristallisation von Histidin → Recycling von bis zu 94% des unverbrauchten Histidins (Annahme 80%)
- Zugabe eines 4fachen molaren Überschuss an Zinkhydroxid und Komplexbildung und Formulierung von Zink-Carnosin mit bis zu 94% Ausbeute (Annahme 87.5%)
- Recycling des eingesetzten Ethanols durch Destillation (Annahme 90%)

Zusammenfassung

Gesamtausbeute Frühphase: 30%

Gesamtausbeute Spätphase: 40%

Gesamtausbeute Spätphase mit Aufreinigung: 35% (40% und 87,5%)

9.4.4 EATOS: Kosten für Chemikalien

Chemikalie	Preisannahme (1/10 des Katalogpreises) €/kg	Synthese- strategie	Produkt/ Edukte/ Koppelprodukt/ Katalysator/ Lösungsmittel
β-homoglycine amide	327	DmpA	E
L-histidine	56,5	DmpA, Vinick, Hildbrand	E
DmpA	80000	DmpA	Kat
100 mM sodium bicarbonate pH 10	0,01	DmpA	LM
Carnosine	1145	DmpA, Vinick, Hildbrand	P
ammonia	70	DmpA Hildbrand	Kop LM
ethylcyanoacetate	8	Hildbrand	E
hydrogen	500	Hildbrand	E
rhodium	883	Hildbrand	Kat
activated carbon	10	Hildbrand	Kat
ethanol	15	Hildbrand	LM
sodium	18,6	Hildbrand	LM
formic acid	1,8	Hildbrand Vinick	LM
ethyl acetate	5,2	Hildbrand	LM
methanol	3,5	Hildbrand	LM

tetrahydro-1,3-thiazin- 2,4-dione	100	Vinick	E
tetraethylammonium hydroxide, 20% aq.	34,6	Vinick	LM
COS		Vinick	Kop

9.4.5 Sabento: Bewertung und Eigenschaften der Chemikalien

	Großtech. Preis Euro/kg	Kat Preis Fluka/Acras Preise ohne MwSt. Euro/kg	Area	Avail	Compl	ThRisk	Atox	Ctox	Brisk	Etox	GWP	ODP	AP	POCP	Odour	NP	CAS	MMV	
			/	/	/	/O	/O	/O	/O	/O	O	O	O	O	O	O			
Isopropanollösung (angelehnt an Sabento)	0,948	6,3	C	B	C	A	B	B	C	C	C	C	C	C	B	B	67-63-0	80,10	
Ammoniaklösung (verd.) (angelehnt an Abdu)	1,31	13,08	C	C	C	A	B	B	C	C	C	C	C	C	B	B	77-83-0	35,05	
Natronlauge (angelehnt an Sabento)	0,095	11,08	C	C	C	A	A	B	C	C	C	C	C	C	A	A	1336-21-6	40	
Chlorid Acid JL (angelehnt an Abdu)	2,03	20,33	C	C	C	C	A	B	C	C	C	C	C	C	C	C	1310-73-2	192,12	
Essigsäure JL (angelehnt an Abdu)	0,33	3,26	C	C	C	C	B	B	C	C	C	C	C	C	C	B	77-92-9	60,05	
Phosphorsäure (verd.) (angelehnt an Sabento)	0,402	5,63	C	C	C	C	A	B	C	C	C	C	C	C	C	A	7664-38-2	98	
Zink-Chlorid (≥98 %)	2,63	26,3	C	C	C	C	B	B	C	C	C	C	C	C	C	A	7646-85-7	136,6	
Natriumcarbonat	1,1	11	C	C	C	C	B	B	C	C	C	C	C	C	C	C	497-19-9	106,0	
Tris (analog bewertet zu MgSO4)	4,42	44,2	C	C	C	C	B	B	C	C	C	C	C	C	C	B	77-86-1	121,14	
Natriumchlorid (angelehnt an Sabento)	0,119	2,1	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	7647-14-5	56,44	
Ammonium Sulfate (angelehnt an Abdu)	0,81	6,1	C	C	C	C	B	B	C	C	C	C	C	C	C	A	7789-20-2	132,14	
KH2PO4 (angelehnt an Abdu)	1,91	19,06	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	A	7778-77-0	136,09	
Magnesium Sulfate Heptahydrate (ang. Abdu)	0,88	8,76	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	10034-99-8	246,47	
Glucose (angelehnt an Abdu)	0,44	4,4	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	B	50-98-7	180,16	
Traces/Spurenelemente (angelehnt an Abdu)	0,18	0,53	B	C	C	C	A	B	C	C	C	C	C	C	C	C			
Biomass (angelehnt an Abdu)	200	1500	B	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	B		25,5	
DmpA Enzym (angelehnt an Subtilisin in Sabento)	8000	80000	C	C	C	C	B	B	C	C	C	C	C	C	C	B	C59632	161660	
Carb. Dioxide (biogen) (angelehnt an Abdu)	0	0	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	37210-16-5	44,01	
Oxygen, pure (angelehnt an Abdu)	0,37	3,73	C	C	C	C	A	B	C	C	C	C	C	C	C	C	7782-44-7	32	
Luft	0	0	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D			
Ethanol (angelehnt an Abdu)	0,63	6,33	C	C	C	C	A	B	C	C	C	C	C	C	C	B	64-17-5	46,07	
Water VE (angelehnt an Abdu)	0,0034	nn	D	C	C	C	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	7732-18-5	18,02	
Histidin (angelehnt an Methionin in Sabento)	113	340	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	B	71-00-1	155,15	
beta-Alanin (angelehnt an Methionin in Sabento)	12,76	38,27	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	B	107-95-9	89,09	
beta-Alanin-Amid	327	3270	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	B	4776-56-6	88,092	
Carnosin	1145	11450	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	B	305-94-0	226,23	
Chloramphenicol (angelehnt an Sabento PenG)	145	434	C	C	C	C	A	A	C	C	C	C	C	C	C	B	56-57-7	323,13	
Ampicillin (angelehnt an Sabento PenG)	1044	3133	C	C	C	C	A	B	C	C	C	C	C	C	C	B	68-59-4	349,4	
IPTG	3770	37700	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	B	367-93-1	236,3	
Antifoam AF204	33	101,5	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	???	???	
Energie elektrisch, fossil	0,00002222	0,000042 €/KJ																	
Energie thermisch																			
	1/3 Kosten angesezt																		
	1/10 Kosten Standard																		

Chemikalie	Dichte	Hazard Code	Risk	Safety	MAK	Werte- gefahrsp- klasse VdK	Registrierung Substanz (REACH)	Sigma Catalogue Name and Amount	Sigma Alpharho Price in Euro without tax	Quality of the Sigma Chemical
Isopropanol (geliefert an Salento)	0,785 g/cm³	F+, Xi	11-36-07	Fukja Katalog	500 mg/m³ Wikipedia	Fukja Katalog	NTB050000	59000-25L	163	2-Propanol, puriss >= 99,8 %
Armonaklösung (Vers.) (geliefert an Abul)	0,8 (30-33 %)	C, N	34-40	7-12-24/25-26	14 mg/m³ MAK - 3,5 mg/m³ Gemischt	Fukja Katalog	B09625000	50002-270-G-H	98,6	NaOH, puriss. 30-33 %
Natronlauge (geliefert an Salento)	2,13 777	C	35	26-37/39-45			VB4000000	85003-729-G-C	3814,3	NaOH, puriss., meets analytical spec. >= 98 %
Chlor. Acid J. (geliefert an Abul)	1,542 777	Xi	41	26-39	MAK, nicht festgelegt		AF 1750000	27109-602 5/G-C-R	304,9	Chlor. Acid, puriss., meets analytical spec. >= 99,5 %
Essigsäure J. (geliefert an Abul)	1,271 (1+99,8 %)	C	34, CH-3	26-38-45	MAK, nicht festgelegt		AF 1750000	271725-200-L-R	895	Acetic Acid, puriss., meets analytical spec. >= 99,5 %
Phosphorsäure (Vers.) (geliefert an Salento)	1,886 (85-88 %)	C	34, CH-2	26-36/27/39-45	MAK, 2 mg/m³		TB5300000	04107-450-G-H	220,5	Phosphoric Acid, puriss., meets analytical spec. >= 98 %
Zink-Chlorid (198 %)	>= 98 %	C, N	22-34-59/53	26-36/27/39-45-60-61			ZH4000000	06470-540-C	131,5	
Natriumcarbonat	>= 98 %	Xi	38	22-36			V24050000	71352-540-C	54,9	
TiS (entlo) benedict to MgSO4		Xi	36/27/28	26-38	MAK, nicht festgelegt		Ty 2802000	TB3023 3/G	178,5	TiS >= 98 %
Natriumchlorid (geliefert an Salento)	2,168						U7 750000	12168-260-C-H	157,6	NaCl, puriss., meets analytical spec. >= 99,5 %
Magnesiumsulfat (geliefert an Abul)	1,17						ES4400000	11225-260-C-H	157,6	Anhydrous
MgSO4 (geliefert an Abul)	2,338						Ty 68115000	80208-940-C	83,4	Pentahydrat
Magnesium Sulfate heptahydrate (ang. Abul) I 68							OM4050000	83142-540-C-F	43,9	Magnesium sulfate heptahydrate >= 98 %
Glucose (geliefert an Abul)	1,54						L26600000	16325-602 5/G-C	198	D(+)-Glucose, puriss., meets analytical spec., anhydrous.
Traces/Spurenmerkmale (geliefert an Abul)										
Biomass (geliefert an Abul)										
Omega-Enzym (geliefert an Salento in Substanz)	1,85 kg/m³ (15°C)									
Calc. Dioxide (boogen) (geliefert an Abul)	1,34 kg/m³ (15 °C)									
Oxygen, pure (geliefert an Abul)	1,34 kg/m³ (15 °C)									
Luft										
Ethanol (geliefert an Abul)	0,789 g/l	F, Xi	11-307/122-69/207/122	16-36/37	0 mg/m³, Gemischtschleife 13			18187-251	117,78	Acros: Ethanol>95 %, anhydrous, densat. with 2% MEK, pure, Dichte 0,79 g/cm³
Milch, VE (geliefert an Abul)	0,855 g/cm³									
Hidifen (geliefert an Metron in Salento)										
Beta-Alanine (geliefert an Metron in Salento)										
Beta-Alanine (geliefert an Metron in Salento)										
Chlorochemical (geliefert an Salento Perf)										
Chlorochemical (geliefert an Salento Perf)										
Arcoflex (geliefert an Salento Perf)										
PTO										
Aufbaum AF 704	1,01 g/cm³									
Energie elektrolytisch, fessal										
Energie thermisch										

Land Use (Area), Raw Material Availability (Avail), Complexity of the Synthesis (Compl), Acute Toxicity (Atox), Chronic Toxicity (Ctox), Biological Risk (Brisk), Ecotoxicity (Etox), Global Warming Potential (GWP), Ozone Depletion Potential (ODP), Acidification Potential (AP), Photochemical Ozone Creation Potential (POCP), Odour, Eutrophication Potential (NP)

9.4.6 Sabento: Liste der Modellparameter

Enzymatische Synthese (Frühphasenevaluierung)

Beschreibung der Synthesereaktion mit 24 mM Beta-Alanin-Amid, 120 mM Histidin, 100 mM Carbonatpuffer

Fiktive Kältefällung von 4°C als Aufarbeitungsschritt, da sich ohne Aufarbeitung Sabento nicht auslegen lässt

Enzym

Rohprodukt = Endprodukt (ohne Aufreinigung)

Bewertung der Carnosinsynthese mit DmpA ohne Aufreinigung mit Kenntnisstand vom Anfang des Projekts

Vorbereitung

Produktbildung

Aufreinigung

Prozessvorbereitung Enzym Standard

Keine Reinigung

Waste à Abwasserreinigung

Prozessschritt selbst definiertes Medium

Selbst definiertes Medium ansetzen

Input Wasser

Trinkwasser

Beta-Alanin-Amid

Histidin

Natriumcarbonat

Rührdauer

0.5 h

Leistungseintrag des Rührers

3 W/kg

Wirkungsgrad

95%

Beta-Alanin-Amid Konz. (24 mM)

2.1144 g/l

Histidin Konz. (120 mM)

18.618 g/l

Natriumcarbonat-Konz. (100 mM)

10.6 g/l

Prozessschritt Sterilisieren

Keine Sterilisation

Kühlen: Keine Kühlung in der Vorbereitung

Hauptprozessschritt Produktbildung

Produktbildung Enzym Standard

Mischen durch Rühren (Leistungsdichte) E

Leistungsdichte der Reaktionslösung 3 W/kg

Belüftung: Keine Belüftung

Keine pH Regulierung

Keine Kühlung in der Produktbildung

Produktaufarbeitung

Kältefällung

Abfallstrom Abwasserreinigung

Ausbeute an gefälltem Produkt:

99%

CSB theoretisch

C₃H₉N₃O₂ 120 mM His braucht ca. 10.5 mal molar soviel

Sauerstoff : ca. 35000 mg/l

Temperatur der Flüssigkeit nach der Kältefällung

4°C

Temperatur der Flüssigkeit zu Beginn der Kältefällung

25°C

Wassergehalt des Solidstroms

50%

Wie hoch ist der Rückgewinnungsfaktor an Wärmeenergie

60%

Wirkungsgrad der Kühlanlage

40%

Keine weitere Aufarbeitung

Fertigstellen

Zusammensetzen der Reaktionslösung

Produktkonzentration pro Liter

1,6 g/l

Keine Auftrennung von Materialien in der Aufarbeitung			
Zusammenfassung	Übersicht über Input/Output Ströme		
	Input: Mediensalze	10.6 g/l	Output
	Input: Sonstiges	20.73	Output: Produkt 1.6 g/l
	Summe	31.33 g/l	Summe 31.33 g/l
	Konz. gel. anorganischer Komponenten		0 g/l
	Konz. gel. organischer Komponenten		0 g/l
Fertigstellen			
Vorhandenen Prozess auslegen			
Auslegung des Hauptreaktors			
	Ich möchte einen oder mehrere neue Reaktoren anschaffen		
	Jahresproduktionsziel		1 t/a
	Temperatur		37°C
	Befüllungsgrad		90%
	Wie lange dauert die Reaktion		3 h
	An wievielen Tagen im Jahr kann produziert werden		50 (statt 300)
	Wie viele Fermentationen werden fehlschlagen		1%
	Wie gross ist das Verhältnis von Vorkultur zur Hauptkultur		1% (0% nicht erlaubt)
	Wie viel verbleiben in der Form von Resten im Reaktor		3%
Zusammenfassung:			
	Reaktorvolumen		1.58 m ³
	Prozessdauer mit Rüstzeit		5.03 h
	Anzahl Batches pro Jahr		227
	Produktkonz. 1.6 g/l		
	Aufarbeitungsgrad gesamt		98%
	Anteil Rohprodukt am Endprodukt		200%
	Produktmasse vor Aufarbeitung		0.51 t/a
	Produktmasse nach Aufarbeitung		1 t/a
Ermittlung der Fixkosten			
	Nutzungsdauer		10 Jahre
	Kalkulationszinssatz		7%
Investitionsbedarf der Prozessvorbereitung			
	Gewählte Variante		Berechnung mit Peripherie
	Pauschaler Schätzfaktor		5% Standard
	Zuschlagsatz für Wartungskosten pro Jahr		5% Standard
Investitionsbedarf der Produktbildung			
	Gewählte Variante		Berechnung mit Peripherie
	Zuschlagsatz für Wartungskosten pro Jahr		5% Standard
Aufarbeitungsschritt			
	Gewählte Prozessdauer der Verarbeitung		12 h
Investitionsbedarf der Aufarbeitung			
	Gewählte Variante		Berechnung mit Peripherie
	Zuschlagsatz für Wartungskosten pro Jahr		5% Standard
	Leitende Angestellte		1
	Angestellte		3
	Leitende Angestellte		60,000 €
	Angestellte		20,000 €
	Anzahl der Schichten, in denen produziert wird		1

9.4.7 Sabento: Dokumentation der verwendeten Wichtungsfaktoren

Die Ermittlung der Wichtungsfaktoren und Umweltbewertungszahlen mittels Sabento® folgt den Ausführungen von Heinzle, E., A. Biber, et al. (2006). "Evaluation of biotechnological processes in early phases of the development

regarding risks concerning ecology, security and health." Chemie Ingenieur Technik 78(3): 301-305.

Zur Ermittlung der Umweltindices werden die entsprechenden Wichtungsfaktoren für alle Wirkungskategorien nach folgender Gleichung ermittelt:

$$WF = B^{\alpha}$$

Dabei ist B die verwendete Basis (Default-Wert = 10) und α der durch die Klassenzuordnung bestimmte Exponent. Die Standardwerte sind:

Klasse A $\rightarrow \alpha = 2$; Klasse B $\rightarrow \alpha = 1$; Klasse C $\rightarrow \alpha = 0$)

Für die aktuelle Bewertung werden folgende Werte verwendet:

Basis: B = 10

Exponenten: Klasse A $\rightarrow \alpha = 2$; Klasse B $\rightarrow \alpha = 1$; Klasse C $\rightarrow \alpha = 0$.

Die Wichtungsfaktoren und ihre Zugehörigkeit zur Gruppe Umwelt, Gesundheit oder Sicherheit (**E**nvironment, **H**ealth, **S**afety) sind in Tabellen 1 – 4 aufgelistet.

Tabelle 1: Wichtungsfaktoren der Wirkungskategorie für die Inputseite (Standardwerte)

Wirkungskategorie Input	Wichtungskoeffizient	EHS
Thermal Risk	100	S
Acute Toxicity	100	H
Chronic Toxicity	100	H
Biological Risk	100	H
Land Use	90	E
Raw Material Availability	75	E
Complexity of the Synthesis	50	E
Summe	615	

Tabelle 2: Wichtungsfaktoren der Wirkungskategorie für die Outputseite (Standardwerte)

Wirkungskategorie Output	Wichtungskoeffizient	EHS
Thermal Risk	100	S
Acute Toxicity	100	H
Chronic Toxicity	100	H
Biological Risk	100	H
Ecotoxicity	80	E
Global Warming Potential (GWP)	100	E
Ozone Depletion Potential (ODP)	66	E
Acidification Potential (AP)	66	E
Photochemical Ozone Creation Potential (POCP)	33	E
Odour	33	E
Eutrophication Potential	75	E
Summe	853	

)

Tabelle 3: Wichtungsfaktoren der Wirkungskategorie für die Inputseite (Anwender-Werte)

Wirkungskategorie Input	Wichtungskoeffizient	EHS
Thermal Risk	100	S
Acute Toxicity	100	H
Chronic Toxicity	100	H
Biological Risk	100	H
Land Use	90	E
Raw Material Availability	75	E
Complexity of the Synthesis	50	E
Summe	615	

Tabelle 4: Wichtungsfaktoren der Wirkungskategorie für die Outputseite (Anwender-Werte)

Wirkungskategorie Output	Wichtungskoeffizient	EHS
Thermal Risk	100	S
Acute Toxicity	100	H
Chronic Toxicity	100	H
Biological Risk	100	H
Ecotoxicity	80	E
Global Warming Potential (GWP)	100	E
Ozone Depletion Potential (ODP)	66	E
Acidification Potential (AP)	66	E
Photochemical Ozone Creation Potential (POCP)	33	E
Odour	33	E
Eutrophication Potential	75	E
Summe	853	

)

Die Standardwerte der EHS-Wichtungsfaktoren sind:

E = 60%, H = 27%, S = 13%

Für die aktuelle Bewertung werden folgende Werte verwendet:

E = 60%, H = 27%, S = 13%

Mit einer Wichtung von Input- und Outputseite (Originalwerte 40:60, Anwenderwerte 40:60) werden die beiden Werte in eine Gesamtumweltbewertungskennzahl überführt.