

# Abschlussbericht

AZ 13191

## Rekombinante Laccasen für die Feinchemie

Identifizierung, Erforschung und rekombinante Herstellung innovativer Laccasen für die Produktion von Feinchemikalien im großtechnischen Maßstab zur Substitution umweltbelastender chemischer Synthesen



### Projektpartner:

UG-Biotech	Koordination; Universität Greifswald, Biotechnologie und Enzymkatalyse Prof. Dr. Bornscheuer, Frau Dr. Schmidt
UG-Mibi	Universität Greifswald, Mikrobiologie Prof. Dr. Schauer, Frau Dr. Mikolasch, Frau Herter
UR-TC	Universität Rostock, Technische Chemie Prof. Dr. Kragl, Frau Dr. Hameister, Frau Illner
BRAIN	Biotechnology Reserach and Information Network, Aktiengesellschaft (B•R•A•I•N AG), Zwingenberg Dr. Eck, Dr. Liebeton
SIAL	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs (Schweiz) Dr. Wohlgemuth

Projektbeginn: 01.03.2007

Projektlaufzeit: 2 Jahre

Kostenneutrale Verlängerung bis 30.06.2009

Greifswald, 2009

## Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung und Fazit	3
2.	Anlass und Zielsetzung des Projekts	6
3.	Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandte Methoden	7
3.1.	Projektpartner UG-Mibi	7
3.2.	Projektpartner UR-TC	7
3.3.	Projektpartner UG-Biotech	8
3.4.	Projektpartner BRAIN	8
4.	Ergebnisse und Diskussion	9
4.1.	Projektpartner UG-Mibi	9
4.1.1.	HPLC-Analytik und Isolierung der Zielverbindungen mittels Festphasenextraktion	9
4.1.2.	Heteromolekulare Kopplung von <i>ortho</i> -dihydroxylierten, alkylsubstituierten Verbindungen mit aliphatischen Aminen	9
4.1.3.	Synthese weiterer sekundärer Amine aus 3-Methylbrenzkatechin und aliphatischen Aminen der Kettenlängen C <sub>3</sub> bis C <sub>9</sub> sowie Bestimmung des HPLC-log <i>P</i> der heteromolekularen Kopplungsprodukte	15
4.1.4.	Heteromolekulare Kopplung von <i>para</i> -dihydroxylierten, alkylsubstituierten Verbindungen mit aliphatischen Aminen	18
4.1.5.	Datengenerierung für die Ökoeffizienzanalyse	19
4.2.	Projektpartner UR-TC	22
4.2.1.	Verfahrensentwicklung zur Herstellung ausgewählter Verbindungen im Produktionsmaßstab	22
4.2.2.	Scale-Up und Downstream-Processing	24
4.2.3.	Datengenerierung für die Ökoeffizienzanalyse	27
4.3.	UG-Biotech	30
4.3.1.	Rekombinante Herstellung pilzlicher Laccasen	30
4.3.2.	Expression in <i>E. coli</i>	30
4.3.3.	Expression in <i>Pichia pastoris</i>	31
4.3.4.	Charakterisierung der rekombinanten Laccasen	32
4.3.5.	Fermentation im 10-Liter Maßstab	34
4.4.	BRAIN AG	36
4.4.1.	Rekombinante Herstellung prokaryotischer Laccasen	36
4.4.2.	Klonierung und Expression von <i>cotA</i> in <i>E. coli</i> und <i>B. subtilis</i>	36
4.4.3.	Klonierung und Expression von SLAC in <i>E. coli</i>	39
4.4.4.	Klonierung und Expression von SLAC in <i>Streptomyces albus</i>	41
4.4.5.	Klonierung und Expression von YifH in <i>E. coli</i>	42
4.5.	SIAL	44
5.	Ökoeffizienzanalyse	45
6.	Kooperationen im Rahmen des Projektes	48
7.	Teilnahme an Projekt-relevanten Veranstaltungen	50

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Sekundäre Amine als Kopplungsprodukte sowie Synthesebausteine.	7
Abb. 2: Peakflächen des heteromolekularen Kopplungsproduktes P1 des CotA-vermittelten Umsatzes von 3-Methylbrenzkatechin mit <i>n</i> -Hexylamin in Abhängigkeit der Inkubationstemperatur.	12
Abb. 3: UV-Absorptionsspektren des Laccase-Substrates 3-Methylbrenzkatechin (A), sowie der Produkte P1 (B) und P2 (C).	13
Abb. 4: Mittels HPLC ermittelte Peakflächen des Produktes der Modellreaktion II in Abhängigkeit der eingesetzten Enzymaktivitäten und der Molaritäten der Reaktionspartner.	20
Abb. 5: Verfahrensentwicklung für die Laccase-vermittelte Biotransformation.	26
Abb. 6: Modifiziertes Verfahren für den NaIO <sub>3</sub> -Vergleichsprozess.	27
Abb. 7: Temperaturabhängigkeit der Isoenzyme.	33
Abb. 8: Methanolabhängigkeit der Laccasen.	34
Abb. 9: Wachstum während der Fermentation anhand der optischen Dichte.	35
Abb. 10: Aktivitätszunahme während der Fermentation.	35
Abb. 11: SDS-PAGE-Analyse der Expression von cotA in der unmodifizierten Form (A) und in Fusion mit dem Maltose-Bindeprotein (C) in <i>E. coli</i> .	37
Abb. 12: Relative Aktivität von Expressionsklonen mit veränderter Ribosomen-Bindestelle.	38
Abb. 13: SDS-PAGE-Analyse der cytoplasmatischen Expression von SLAC in der unmodifizierten Form und als Fusion mit verschiedenen GST bzw. MBP in <i>E. coli</i> .	40
Abb. 14: Identifizierung von Laccase-Aktivitäts-steigernden Faktoren durch Coexpression einer Genbank aus <i>E. coli</i> .	41
Abb. 15: SDS-PAGE-Analyse der Kulturüberstände von <i>S. albus</i> pTaph_SLAC sowie der Leervektorkontrolle.	42
Abb. 16: SDS-PAGE-Analyse der cytoplasmatischen Expression von YifH in <i>E. coli</i> (A) sowie zur Löslichkeitsuntersuchung (B).	43
Abb. 17: Modellreaktionen für die Ökoeffizienzanalyse.	45
Abb. 18: Graphische Darstellung des Endergebnisses der Ökoeffizienzanalyse.	46
Tabelle 1: Übersicht über die Struktur der eingesetzten Referenzsubstanzen, deren HPLC-log $P$ und der mittels ACD/ChemSketch berechneten log $P$ -Werte.	16
Tabelle 2: Übersicht über die Strukturen der heteromolekularen Kopplungsprodukte, deren HPLC- und mittels dem chemischen Zeichenprogramm ACD/ChemSketch berechneten log $P$ -Werte.	17
Tabelle 3: Zusammenfassende Bewertung der generierten Daten für die Ökoeffizienzanalyse.	22
Tabelle 4: Ausgewählte Reaktionsansätze für die chemo- bzw. biokatalytische Synthese des Kopplungsproduktes.	29
Tabelle 5: Isolierte Laccase-Gene.	30
Tabelle 6: Vergleich der Aktivitäten, gewonnen bei verschiedenen Expressionstemperaturen.	31

## 1. Zusammenfassung und Fazit

Ziel des Projekts war es, über Laccase-vermittelte Reaktionen eine umweltfreundliche Synthese von Feinchemikalien vorzunehmen und somit im Rahmen der Weißen Biotechnologie ökoeffiziente Syntheseverfahren zu etablieren. Besonderes Augenmerk fiel hierbei auf die Gewinnung von sekundären Aminen. Dabei fanden Laccasen aus Weißfäulepilzen, direkt aus dem Pilz isoliert sowie rekombinant hergestellt, und rekombinante bakterielle Laccasen in Kopplungsreaktionen ihren Einsatz.

Mit Beginn des Projekts erfolgte die Vereinbarung eine enzymvermittelte Synthese von sekundären Aminen anzustreben, um so prinzipielle Reaktionsmuster und -kinetiken für nachfolgende Untersuchungen zu erhalten. Die Beispielreaktion stellt die heteromolekulare Kopplungen eines *ortho*- bzw. *para*-dihydroxylierten, alkylsubstituierten aromatischen Laccase-Substrates und diverser aliphatischer Amine dar.

Die Projektpartner BRAIN und UG-Biotech befassten sich mit der Klonierung und Expression verschiedener Laccasen. So konnte BRAIN drei prokaryotische Laccase-Gene gewinnen und diese funktionell rekombinant in *E. coli* exprimieren. Die Laccasen stammen aus *Bacillus subtilis* (CotA), aus *Streptomyces coelicolor* (SLAC (Small LACCcase)) und aus *E. coli* (YifH). CotA wird hauptsächlich unlöslich in *E. coli* exprimiert, dies konnte aber durch die Verwendung eines Fusionsproteins (hier MBP) enorm verbessert werden. Ebenso konnte SLAC mit Fusionen von GST und MBP löslich exprimiert werden, während die Laccase aus *E. coli* direkt löslich gewonnen wurden. Bei den Optimierungsversuchen fiel allerdings auf, dass trotz erhöhter Proteinmenge keine korrespondierende Zunahme der Aktivität festgestellt werden konnte. Nichtsdestotrotz wurden alle Enzyme auch in größeren Maßstäben exprimiert (1,5 bzw. 10 L Fermentationen), und so CotA mit  $0,13 \text{ U mL}^{-1}$  sowie SLAC mit  $0,9 \text{ mU mL}^{-1}$  dem Projektpartner UG-Mibi zur Verfügung gestellt, um Versuche zur Stabilität und zum Substratspektrum vorzunehmen.

Es erfolgten auch Expressionsversuche in *Bacillus subtilis* und *Corynebacterium glutamicum*. Die Laccase CotA konnte in *B. subtilis* in etwa gleicher Ausbeute wie in *E. coli* exprimiert werden. Eine Zufallsmutagenese der Ribosomenbindungsstelle lieferte Varianten mit bis zu dreifach höheren Enzymausbeuten. Die Expression der Laccase YifH konnte durch die Verwendung von *C. glutamicum* nicht optimiert werden. Auch die Coexpression einer *E. coli* Genbank erhöhte nicht die Ausbeute an der Laccase SLAC.

UG-Biotech gelang es, vier Gene für Isoenzyme aus *Trametes versicolor* und ein Laccase-Gen aus *Pycnoporus cinnabarinus* zu isolieren. Eine Expression in *E. coli* konnte nur im Stamm BL21(DE3) C41 erfolgen, allerdings konnte keine Aktivität gegenüber ABTS und Syringaldazin gemessen werden. Eine Chaperon-Coexpression ergab lediglich eine erhöhte Enzymmenge, aber keine Aktivität. Die Klonierung weiterer Konstrukte und Verwendung verschiedener *E. coli* Stämme ergaben keine Laccase-Aktivitäten.

Sowohl bei UG-Biotech als auch BRAIN ergab eine Erhöhung der Löslichkeit bzw. der Enzymmenge nicht die erwartete Aktivitätssteigerung.

Drei der prokaryotischen Enzyme ließen sich bei UG-Biotech aktiv in *Pichia pastoris* exprimieren. Die Expression sowie deren Aufarbeitung wurden genauer untersucht und

optimiert, sodass die Laccasen in ausreichenden Mengen ebenfalls an UG-Mibi übergeben werden konnten. Des Weiteren wurden die Laccasen hinsichtlich ihrer pH-Abhängigkeit, Temperaturstabilität und Methanolabhängigkeit untersucht.

UG-Mibi erfasste, unter Variation der Reaktionsparameter, den Einfluss verschiedener Bedingungen anhand der quantitativen Abnahme des eingesetzten Laccase-Substrates und simultaner Zunahme des heteromolekularen Kopplungsproduktes (sekundäres Amin). So konnte mit den Modellsubstraten 3-Methylbrenzkatechin und Methylhydrochinon unter katalytischer Wirkung der pilzlichen Laccasen aus *Myceliophthora thermophila* und *Pycnoporus cinnabarinus* eine Anbindung von linearen aliphatischen Aminen der Kettenlängen C<sub>3</sub> bis C<sub>12</sub> an die reaktiven Formen der Aromaten nachgewiesen werden. Dihydroxylierte Laccase-Substrate, welche in weiteren Kopplungen eingesetzt wurden, besaßen methoxylierte (3-Methoxybrenzkatechin bzw. Methoxyhydrochinon) oder verzweigte Substituenten (*tert*-Butylbrenzkatechin bzw. *tert*-Butylhydrochinon) am aromatischen Ringsystem. Mit Hinblick auf eine spätere Vermarktung der synthetisierten sekundären Amine erfolgten Reaktionen mit mehrfachsubstituierten *para*-dihydroxylierten Laccase-Substraten, da diese den Grundkörper von (pharmakologisch relevanten) Naturstoffen darstellen. So sollte das Produkt aus 2-Methoxy-3-methyl-1,4-benzendiol unter C-N-C-Kopplung mit aliphatischen oder cyclischen Aminen einer Synthese von Mitomycin-Analoga dienen. Weiterhin wurde unter Einsatz der Laccase aus *Pycnoporus cinnabarinus* eine Synthese von Menachinon- und Vitamin-K-Derivaten unter Anbindung einesamins mit isoprenoider Struktur (Geranylamin) an das Laccase-Substrat 2-Methyl-1,4-naphthohydrochinon vorgenommen.

Neben der Testung von aliphatischen Aminen als Kopplungspartner wurden ebenso vier aromatische Amine in Kreuzkopplungsansätzen mit 3-Methylbrenzkatechin und Methylhydrochinon bzw. Guajacol umgesetzt.

Die rekombinant exprimierten und von BRAIN und UG-Biotech zu Verfügung gestellten Laccase wurden ebenfalls hinsichtlich ihres Einsatzes in der heteromolekularen Kopplung von *ortho*-dihydroxylierten, alkylsubstituierten Verbindungen mit aliphatischen Aminen untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass alle rekombinanten Laccasen für die Synthesen von Aminen eingesetzt werden konnten. Besonders positiv ist die Tatsache, dass in den untersuchten Reaktionen keine Unterschiede zwischen den ursprünglich aus Pilzen gewonnenen Enzymen und den rekombinant exprimierten festgestellt wurden. Im Falle der prokaryotischen Laccasen konnte dieser Vergleich mangels Verfügbarkeit der nativen Enzyme nicht gemacht werden.

Die Entwicklung eines Fallfilmmikroreaktors für Laccase-katalysierte Reaktionen wurde ausgehend von der ebenfalls Sauerstoff-Eintrag abhängigen Reaktion der Glucoseoxidase bei UR-TC vorangetrieben. Die Oxidation von Glucose zu Gluconsäure konnte aufgrund der großen Oberfläche zu Volumenverhältnisses sowie der Optimierung der Reaktionsparameter wie Verweilzeit, Neigung und Kanalgeometrie des Reaktors mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von 1500 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> durchgeführt werden. Die Übertragung der Reaktorparameter auf die Laccase-katalysierte Reaktion von 3-Methylcatechol und *n*-Nonylamin erfolgte im Anschluss. Die Kopplungsreaktionen wurden zunächst sowohl im wässrigen als auch im Lösungsmittel-freien Medium im Rührkesselreaktor untersucht. Die Laccasen aus *Pycnoporus cinnabarinus*

und *Myceliophthora thermophila* zeigten in beiden Reaktionssystemen Aktivität, welche stark vom Wassergehalt des Reaktionsmediums abhängig ist.

Die Modellreaktion konnte im Anschluss nicht im Fallfilmreaktor optimiert werden, da sich herausstellte, dass nicht der Sauerstoff sondern die eigentliche Kopplung als Folgereaktion der Chinonbildung reaktionslimitierend auswirkt. Im begasten System kam es nachweislich zur schnelleren Bildung der chinoiden Form des Substrats, sodass die Reaktion in einem konventionell gerührten Reaktor mit zusätzlicher Begasung durchgeführt wurde. Die von UG-Mibi vorgeschlagenen Parameter wurden für das Upscaling angepasst und ausreichend optimiert. Hierbei spielte die Aufarbeitung der Produkte eine besonders große Rolle.

In der zweiten Projekthälfte wurden von UG-Mibi und vornehmlich von UR-TC Daten zur Erstellung der Ökoeffizienzanalyse generiert. Diese wurde für die ausgewählte Modellreaktion II – heteromolekulare Kopplung von 3-Methylbrenzkatechin und *n*-Hexylamin durch die kommerziell erhältliche Laccase aus *Myceliophthora thermophila* – im Vergleich zu einer Natriumiodat-katalysierten Reaktion von der BASF AG Projekt-begleitend angefertigt. Die Ökoeffizienzanalyse ergab im Basisfall, dass der chemische Prozess der ökoeffizientere ist. Dies ist hauptsächlich auf die Gewichtung der ökonomischen und ökologischen Seite zurückzuführen. In den mit aufgeführten Szenarien der Analyse ist zu erkennen, dass der Laccase-Prozess zwar der ökonomischere, da kostengünstigere, Prozess sein kann, aber die ökologische Seite dreimal mehr gewichtet ist.

Die Ökoeffizienzanalyse wird von den Projektpartnern eher kritisch betrachtet. So spielte zum einen die selektive Produktbildung der Laccase-Reaktion kaum eine Rolle bei der Bewertung. Zum anderen muss ausdrücklich darauf hingewiesen werden, dass es sich hier „nur“ um eine Modellreaktion handelte, die zu einem frühen Zeitpunkt des Projektes ausgewählt sein musste, um eine Projekt-begleitende Analyse mit einem zeitnahen Abschluss zum Projektende zu ermöglichen. Problematisch war hier vor allem, dass nicht genügend Zeit und Personal zur Verfügung stand, um eine effizientere Produktisolierung zu etablieren. Zudem ist zu betonen, dass eine deutlich fehlerbehaftete Hochrechnung der Kenndaten von Synthesen im Grammbereich direkt auf den 1000 kg-Maßstab erfolgte. Dennoch kann aus der Ökoeffizienzanalyse ersehen werden, welche Faktoren zu einem Scheitern einer geplanten industriellen Anwendung führen können, und welche Parameter in zukünftigen Untersuchungen eingehender beachtet werden müssen.

In diesem Vorhaben konnten fünf pilzliche Laccase-Gene isoliert werden, von denen sich drei in *Pichia pastoris* exprimieren lassen. Zusätzlich wurden drei prokaryotische Laccasen exprimiert und eingehender untersucht. Die Laccasen lassen sich in heteromolekularen Kopplungsreaktionen zur Herstellung von sekundären Aminen und Mytomycin-Analoga einsetzen und können so für die Feinchemie genutzt werden. Zudem konnten wichtige Erfahrungen zum Einsatz eines Fallfilmmikroreaktors in oxidativen Reaktionen gewonnen werden.

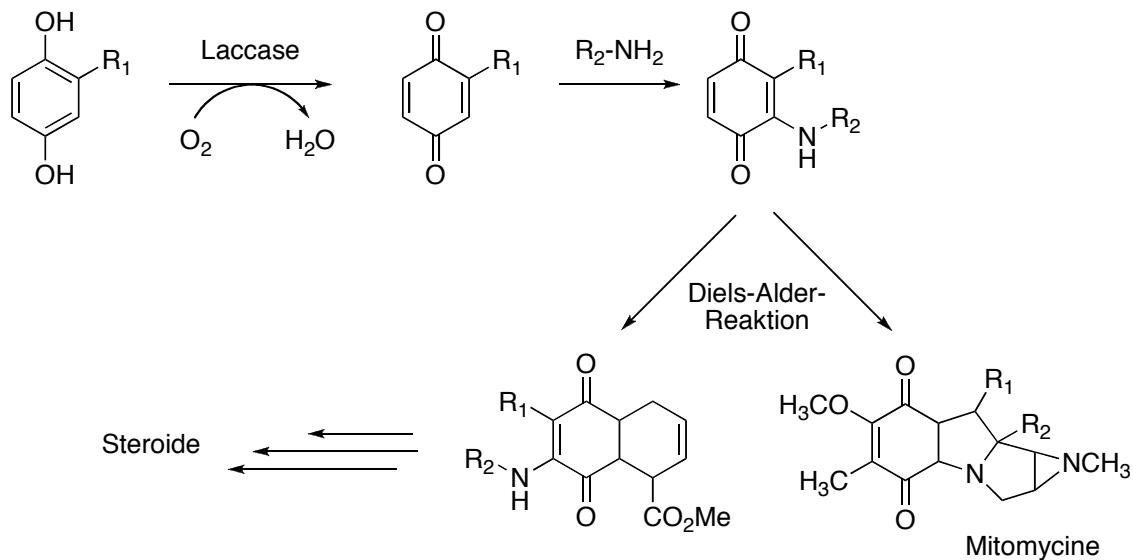
## 2. Anlass und Zielsetzung des Projekts

Im Projektverbund sollte der Einsatz von Laccasen für Anwendungen in der Feinchemie und Pharmazie im Vordergrund stehen. Bereits zur Verfügung stehende eukaryotische und prokaryotische Laccasen sollten rekombinant in geeigneten Wirtsorganismen hergestellt werden. Die Laccasen sollten vorwiegend für die Darstellung von Ethern und sekundären Aminen für die Feinchemie, aber auch für Verbindungen mit antibiotischer Wirkung, dienen. Da bislang nur unzureichende Expertisen in der Herstellung von Laccase-Produkten im größerem Maßstab (100 g bis Kilogramm-Maßstab) vorliegen, war die Verfahrensentwicklung für Laccase-vermittelte Reaktionen (Etablierung einer robusten Biokatalyse, Sauerstoffeintrag, Vermeidung von Nebenprodukten, Downstream-processing) von besonderem Interesse.

Vorrangig sollten die eukaryotischen Laccasen aus den Pilzen *Trametes versicolor* und *Pycnoporus cinnabarinus* untersucht werden. Ziel war es die Laccasen in geeignete Wirtsstämme rekombinant zu exprimieren, um eine Herstellung in ausreichender Menge für Maßstabsvergrößerungen und in gleich bleibender Qualität zu gewährleisten. Z.B. sollte das von Isolierung zu Isolierung variierende Verhältnis von Isoenzymen mit unterschiedlichen Eigenschaften vermieden werden. Zusätzlich kommt die Laccase aus *Myceliophthora thermophila* für die Untersuchungen in Frage.

Um das biotechnologische Potential von prokaryotischen Laccasen zu evaluieren, sollten zunächst die Gene für die Laccasen SLAC aus *Streptomyces coelicolor* sowie CotA aus *Bacillus subtilis* kloniert und exprimiert werden, da diese Enzyme jeweils eine der beiden strukturell zu unterscheidenden Gruppen präsentieren: CotA stammt aus der Gruppe der aus drei Cupredoxin-Domänen aufgebauten Polypeptide, SLAC aus der aus nur zwei Domänen bestehenden Enzymklasse.

Vorrangig stellten sekundäre Amine die Produkte der zu untersuchenden Laccase-katalysierten Reaktionen dar, welche in Kopplungsreaktionen von phenolischen Substraten und aliphatischen sowie aromatischen Aminen entstehen (Abbildung 1). Die resultierenden aminierten Phenole sind chemisch kaum zugänglich, stellen aber wichtige Synthesebaustein dar und können als Antioxidationsmittel eingesetzt werden. So könnten chinoide sekundäre Amine über eine Diels-Alder-Reaktion zu Bausteinen von Steroiden umgewandelt werden. Als weitere Verbindungsklassen mit Marktrelevanz wurden Mitomycine, deren Grundgerüst ebenfalls aus den Laccase-Reaktionen zugänglich ist, angesehen. Des Weiteren sollten aliphatische Alkohole als Kopplungspartner eingesetzt werden, um so Ether zu gewinnen.



**Abb. 1: Sekundäre Amine als Kopplungsprodukte sowie Synthesebausteine.**

Ein weiteres Ziel sollte die Entwicklung eines Fallfilmreaktors für Laccase-katalysierte Reaktionen sein. Aufgrund des sehr großen Oberflächen-Volumen-Verhältnisses und dünnen Flüssigkeitsschichten kann ein solcher Reaktor einen schnellen Gaseintrag, der gerade bei Oxidationsreaktionen wichtig ist, gewährleisten. Zudem sind darin bisher biokatalytische Reaktionen nicht untersucht worden. Mit Hilfe der Untersuchungen sollte so das Potential der Mikroverfahrenstechnik erweitert werden sowie anhand der Ergebnisse die Maßstabsvergrößerung bis zu 100 g Produkt erfolgen.

### 3. Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandte Methoden

#### 3.1. Projektpartner UG-Mibi

- Spektralphotometrische Aktivitätsbestimmung der Laccasen mittels ABTS-, 2,6-Dimethoxyphenol- und Syringaldazin-Assay
- Kultivierung des Weißfäulepilzes *Pycnoporus cinnabarinus*, Gewinnung und Reinigung der extrazellulären Laccase
- Durchführung von heteromolekularen Kopplungsreaktionen zur Synthese sekundärer Amine, begleitende Analytik mittels HPLC
- Reinigung der heteromolekularen Kopplungsprodukte mittels Festphasenextraktion und Lyophilisation
- Strukturanalytik mittels GC/MS, LC/MS, NMR
- Ermittlung des Substratspektrums rekombinant bakterieller Laccasen

#### 3.2. Projektpartner UR-TC

- Spektralphotometrische Aktivitätsbestimmung der Laccasen mittels ABTS-Assay
- Synthese des Kopplungsproduktes mit anschließendem Upscaling
- Reinigung des Kopplungsproduktes mittels Festphasenextraktion und einem sich anschließenden Trocknungsschritt unter Argon

- Analytik mittels HPLC während des Synthese- und Reinigungsschrittes
- Strukturanalytik des Produktes mittels HPLC, NMR
- Aufbau und Inbetriebnahme des Fallfilmmikroreaktors
- Synthese von D-Gluconsäure in einem Fallfilmmikroreaktor mit sich anschließender HPLC-Analytik

### 3.3. Projektpartner UG-Biotech

- Isolierung und Klonierung verschiedener Laccase-Gene (Details siehe Zwischenbericht)
- Klonierung der Laccasen in geeignete Expressionsvektoren (Details siehe Zwischenbericht)
- Erstellung einer Reihe von Expressionsvektoren, mit verschiedenen Signalsequenzen und Fusionsproteinen
- Rekombinante Expression der Laccasen in *E. coli* und *Pichia pastoris*
- Aufreinigung bzw. Aufkonzentrierung der Laccasen
- Aktivitätsbestimmungen gegenüber ABTS und Syringaldazin (Bestimmung von pH- und Temperatur Optima, Aktivität in Abhängigkeit von Methanol)
- Fermentation im 1 L Maßstab
- Fermentation im 10 L Maßstab und Aufarbeitung bei dem mit Projektpartner BRAIN

### 3.4. Projektpartner BRAIN

- Klonierung verschiedener prokaryotischer Laccase-Gene (Details siehe Zwischenbericht)
- Klonierung in geeignete Expressionsvektoren für *E. coli* und *B. subtilis* (Details siehe Zwischenbericht)
- Rekombinante Expression der Laccasen in *E. coli* und *B. subtilis* (Kultivierung von Zellen im Schüttelkolbenmaßstab, 1,5 L bzw. 10 L Fermentationsmaßstab)
- Aufreinigung bzw. Aufkonzentrierung von Laccasen
- Aktivitätsbestimmungen gegenüber ABTS, Dimethoxyphenol und Syringaldazin

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1. Projektpartner UG-Mibi

#### 4.1.1. HPLC-Analytik und Isolierung der Zielverbindungen mittels Festphasenextraktion

Wie bereits im Zwischenbericht dargestellt, wurden die Laccase-katalysierten und Natriumiodat-katalysierten Reaktionsansätze zur Synthese sekundärer Amine mittels HPLC-Analytik analysiert. Eine Produktisolierung konnte über eine Extraktion mittels Festphasensäulen realisiert werden. Das Reaktionsgemisch wurde auf C-18-Säulen übertragen und die Zielverbindungen unter Applikation variierender Eluenten-Verhältnisse (Methanol/Essigsäure-Gemisch) von ggf. vorhandenen Nebenreaktionsprodukten abgetrennt. Abschließend erfolgte eine Lyophilisation der in dem Eluenten-Gemisch befindlichen Zielverbindungen, sodass diese nachfolgend als Feststoff für anschließende Untersuchungen, insbesondere zur Quantifizierung und Analyse, vorlagen.

#### 4.1.2. Heteromolekulare Kopplung von *ortho*-dihydroxylierten, alkylsubstituierten Verbindungen mit aliphatischen Aminen

In der ersten Projekthälfte wurden geeignete Modellreaktionen mit nativen Laccasen aus Eukaryoten (*Trametes versicolor*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Myceliophthora thermophila*) und Prokaryoten (*Streptomyces coelicolor*, *Bacillus subtilis*) etabliert. Bei den Modellreaktionen handelt es sich um die Synthese sekundärer Amine aus einem alkylsubstituierten, *ortho*- bzw. *para*-dihydroxylierten Laccase-Substrat und einem aliphatischen Amin. Folgende Randbedingungen wurden in die Untersuchungen einbezogen:

- Molaritätsverhältnis von Laccase-Substrat und Kopplungspartner
- geeignete Enzymaktivität [ $\text{U mL}^{-1}$ ]
- Puffersystem (pH-Wert, Puffersalze, Molarität)
- Temperatur
- Minimierung von Nebenreaktionsprodukten ausgehend vom Laccase-Substrat
- Reaktionsmaßstab bzw. -volumen unter Berücksichtigung des Sauerstoffeintrages
- maximal einsetzbare Lösungsmittelkonzentrationen (Edukte als methanolische Stammlösungen in die Reaktionen eingeführt)
- Übertragbarkeit der Bedingungen auf das Up-Scaling durch UR-TC.

Die Versuchsbedingungen werden nachfolgend anhand der Reaktion zwischen 3-Methylbrenzkatechin mit den aliphatischen Kopplungspartnern *n*-Nonylamin (Modellreaktion I) bzw. *n*-Hexylamin (Modellreaktion II) diskutiert und anhand ausgewählter Ergebnisse veranschaulicht.

- Einfluss des Konzentrationsverhältnisses zwischen dem Laccase-Substrat und dem aliphatischen Kopplungspartner

In Hinblick auf die Synthese sekundärer Amine aus dem *ortho*-dihydroxylierten Laccase-Substrat und den aliphatischen Aminen, wurden unterschiedliche Molaritätsverhältnisse der Edukte getestet. Dabei wurden sowohl äquimolare Konzentrationen (1:1 mM) als auch

Überschüsse an aliphatischem Amin (1:2 mM bis 1:10 mM) mit den Laccasen von *M. thermophila* (pH 7) und *P. cinnabarinus* (pH 5) chromatographisch verfolgt. Es konnte festgestellt werden, dass sich eine Erhöhung der Molarität des Kopplungspartners begünstigend auf die Geschwindigkeit des Substratumsatzes auswirkt. Ein weiterer positiver Aspekt ist in der daraus resultierenden, beschleunigten Bildung an monoaminierten Kopplungsprodukt zusehen. Um eine Steuerbarkeit der Reaktion zu gewährleisten, wurde ein 1:5 mM Verhältnis zwischen 3-Methylbrenzkatechin und aliphatischem Amin für nachfolgende Untersuchungen gewählt, um so vergleichende Aussagen bezüglich der Produktausbeute in äquimolaren Konzentration sowie einer Variation anderer Versuchsparameter (u.a. Katalysatoraktivität) zu tätigen. Zudem entspricht die in einem 1:5 mM Reaktionsansatz befindliche Lösungsmittelmenge der Lösungsmitteltoleranz der eingesetzten Laccasen (12 % Lösungsmittelkonzentration).

- Einfluss der Enzymaktivität in heteromolekularen Kopplungsreaktionen in äquimolarer Konzentration und mit aliphatischen Amin im Überschuss

Um eine Kopplung der Reaktanden zu realisieren wurden 0.5, 1, 2, 4 und 10 U mL<sup>-1</sup> an Enzym bei 1:1 mM und 1:5 mM Molaritätenverhältnissen eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden zu definierten Zeitpunkten mittels HPLC vermessen.

Durch den Einsatz von steigenden Katalysatormengen wurde ersichtlich, dass sowohl in Reaktionsansätzen mit äquimolarem Verhältnis als auch mit überschüssigem Amin, die Abnahme des Laccase-Substrates 3-Methylbrenzkatechin gemessen an der Reaktionszeit gesteigert wurde. Daraus resultierte, verglichen mit geringeren Enzymaktivitäten, eine kinetisch beschleunigte Bildung von sekundärem Amin. Der katalytische Einfluss der Laccase von *M. thermophila* stagnierte in den Aktivitätsbereichen zwischen 0.5 bis 2 U mL<sup>-1</sup>. Eine weitere Erhöhung (4 U bzw. 10 U mL<sup>-1</sup>) bewirkte, dass die Ausbeute an Zielverbindung sogar abnahm. Dieses Ergebnis steht im engen Zusammenhang zu der Quantität an Nebenreaktionsprodukten (Laccase-Substrat als Wasser- bzw. Methanoladukt), welche bedingt durch die erhöhte Laccase-Aktivität verstärkt gebildet werden.

- Einfluss des Reaktionsmilieus auf die Synthese von sekundärem Amin unter Berücksichtigung des Aufkommens von Nebenreaktionsprodukten

Korrespondierend zu den pH-Optima der Laccasen wurden alle Synthesereaktionen in gepufferten Systemen vorgenommen (Phosphat-Citrat-Puffer [pH 7], Natriumacetat-Puffer [pH 5]), um so die optimale katalytische Leistungsfähigkeit des entsprechenden Enzyms zu gewährleisten und einer Ansäuerung durch die Freisetzung von Protonen entgegenzuwirken. Neben dem optimalen Arbeitsbereich des Enzyms, hat weiterhin die physikochemische Eigenschaft der Reaktanden, insbesondere die des 3- Methylbrenzkatechins bezogen auf den pH-Wert des Reaktionsmilieus, einen signifikanten Einfluss auf die Synthese an sekundärem Amin. So war die Qualität von Nebenreaktionsprodukten in Reaktionen mit der Laccase von *M. thermophila* (pH 7) generell höher als in jenen mit Laccase aus *P. cinnabarinus* (pH 5). Somit kann unter Einsatz von Laccasen, deren pH-Optimum in leicht

acide Bereiche (pH 4–5) fällt, die Neigung des Laccase-Substrates mit Methanol bzw. Wasser Adukte einzugehen, unterbunden werden. Dieses auf Reaktanden-Eigenschaften beruhende Charakteristikum ließ sich somit positiv auf den vollständigen Umsatz des Substrates in die anvisierte Zielverbindung anwenden.

Ein weiterer Aspekt bei der Synthese der Modellverbindung bei pH-Werten zwischen pH 4 bis 5, liegt in der Affinität des radikalisierten Laccase-Substrates eine zweifache Substitution einzugehen, sodass eine zunehmende Bildung trimerer Strukturen (zweifache Aminierung des 3- Methylbenzochinons) auftrat.

- Synthese von sekundären Aminen mit den rekombinant exprimierten Laccasen aus *Streptomyces coelicolor* (SLAC) und *Bacillus subtilis* (CotA) des Projektpartners BRAIN

Die prokaryotischen Laccasen von BRAIN wurden in der Modellreaktion II (3-Methylbrenzkatechin mit *n*-Hexylamin) charakterisiert.

Das **SLAC**-Präparat wurde in zwei verschiedenen Formen (Glycin-stabilisiertes bzw. nicht Glycin-stabilisiertes Lyophilisat) zur Verfügung gestellt. Das Glycin-stabilisierte Lyophilisat erwies sich in Bezug auf die Analytik der SLAC-vermittelten Synthesereaktion als nicht geeignet, da in dem Enzympräparat störende Begleit-Peaks zu verzeichnen waren. Diese ließen sich auf analytischer Ebene nur schwer von den eigentlichen Produkten abgrenzen, sodass sich ein nicht-stabilisierter Enzymextrakt als geeigneter erwies. Die Reaktionen wurden mit einer Enzymaktivität von 200 mU mL<sup>-1</sup> mit und ohne Zusatz von Kupfersulfat durchgeführt. Die Addition einer exogenen Kupferquelle zur Steigerung der Enzymaktivität wurde, im Gegensatz zu Laccasen aus Eukaryoten, vielfach für prokaryotische Laccasen beschrieben. In Kontrollversuchen ohne Enzymzusatz wurde ersichtlich, dass eine Supplementierung der Reaktionsansätze mit variierenden Kupfersulfatkonzentrationen keinen katalytischen Einfluss bedingte.

Bei Betrachtung der Reaktionen mit äquivalentem Verhältnis der Reaktanden, konnte unter Zusatz von Kupfersulfat ein schnellerer Umsatz des Laccase-Substrates in die Zielverbindung festgestellt werden. Nach einer Reaktionszeit von 120 min wurde bei vergleichender Betrachtung jedoch ersichtlich, dass in einem nicht-supplementierten Ansatz 20% mehr Amin entsteht. Durch die Erhöhung des Anteils an *n*-Hexylamin (5 mM), war die Produktausbeute in CuSO<sub>4</sub>-supplementierten Reaktionen im Vergleich zu jenen mit äquivalenten Edukt-Konzentrationen um 95 % gesteigert. Auch hier konnte, ähnlich wie in Versuchen mit 1:1 mM Edukt-Verhältnis, ohne exogene Kupferquelle eine signifikant höhere Konzentration an sekundärem Amin detektiert werden. Neben dieser um ca. 45% erhöhten Bildung an sekundärem Amin, wurde zudem ein zweifach aminiertes Syntheseprodukt (Trimer) gebildet.

Zusammenfassend lässt sich aus den dargestellten Ergebnissen schließen, dass SLAC für die durchgeführten Synthesen von sekundären Aminen mittels heteromolekularer Kopplung von alkylsubstituierten *ortho*-dihydroxylierten Verbindungen mit aliphatischen Aminen geeignet ist. Besonderheiten zeigten sich in der Addition von Kupfersulfat, da hier unter Verwendung einheitlicher Versuchsparameter im Mittel 50% weniger Produkt synthetisiert

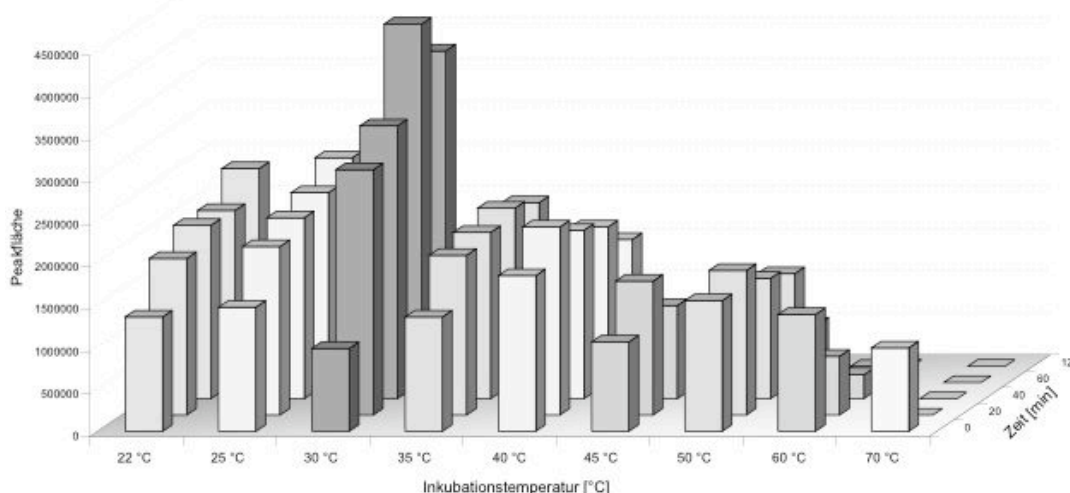
wird als in nicht-supplementierten Synthesansätzen. Von Vorteil ist in diesem Zusammenhang das Ausbleiben trimerer Verbindungen, auch wenn dies mit einer reduzierten Bildung an monoaminierten Zielprodukt einhergeht.

Zudem wurde festgestellt, dass die für die Versuche gewählte Kupfersulfatkonzentration (500  $\mu\text{M}$ ) die Aktivität des Enzyms deutlich reprimiert. Es wird beabsichtigt in künftigen Untersuchungen die  $\text{CuSO}_4$ -Supplementierung dem exogenen Kupferbedarf der Enzyme anzupassen.

Die rekombinant exprimierte Laccase aus *Bacillus subtilis* (**CotA**) lag in Lösung mit einer 0,1%igen Natriumazid-Beigabe vor. Für die Reaktionen wurde Natriumacetat-Puffer (20 mM, pH 4) verwendet, teils mit einer zusätzliche Kupferquelle von 10  $\mu\text{M}$ . Da CotA nicht als vorgereinigte Enzymprobe vorlag, waren in dieser relativ viele optisch aktive Substanzen zu detektieren, welche sich aber aufgrund ihrer frühen Retentionszeiten gut von den eigentlichen Laccase-Produkten abgrenzen ließen (siehe Abbildung 1 im Anhang).

Bei der Verwendung von CotA wurden zudem Ansätze bei verschiedenen Temperaturen getestet, da eine fünffache Aktivitätssteigerung bei der Erhöhung bis 85°C zu verzeichnen ist. Zudem präzipitierten andere Proteine durch eine Erwärmung des Enzympräparates, was sich wiederum positiv auf die Chromatographie der Reaktionsansätze auswirkte.

Mit Hinblick auf den in der Literatur für die CotA-Laccase beschriebenen Kardinalbereich von 45°C und pH 7, wurden ebenso vergleichende Messungen unter Anwendung dieser Parameter durchgeführt. Die Produktsynthese steigt in den getesteten Temperaturintervallen zwischen 22°C bis 30°C stetig an, wobei im Mittel nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten ein Maximalumsatz erreicht wurde. Allerdings konnte keine Steigerung bei höheren Temperaturen beobachtet werden (Abb. 2). Gleiches gilt auch für Reaktionen bei pH 7.



**Abb. 2: Peakflächen des heteromolekularen Kopplungsproduktes P1 des CotA-vermittelten Umsatzes von 3-Methylbrenzkatechin mit *n*-Hexylamin in Abhängigkeit der Inkubationstemperatur.**

Die optimalen Synthesebedingungen liegen auch hier bei 30°C und pH 4. Neben dem Hauptprodukt (P1) wurde ebenso ein Nebenprodukt (P2) in geringerer Konzentration gebildet. Bei Inkubation des enzysupplementierten Ansatzes bei 45°C (pH 4), waren ebenso beide Produkte detektierbar, jedoch in einer um mehr als ein Drittel reduzierten



- Bestimmung der maximalen Lösungsmittelkonzentration

Die Verträglichkeit von Methanol der CotA-Laccase wurde anhand der Aktivität gegenüber dem nicht-phenolischen Redoxindikator ABTS in Abhängigkeit von der Inkubationszeit gemessen. Die Ergebnisse sind nachfolgend graphisch dargestellt. Die Aktivität von CotA nimmt im Zuge einer Inkubation (30°C) innerhalb von 60 min ohne den Zusatz eines Lösungsmittels um ca. 25% ab (siehe Abbildung 3 im Anhang). Durch den Zusatz des Lösungsmittels Methanol in den Konzentrationsbereichen zwischen 10–15% war eine weitere Abnahme von bis 3% zu verzeichnen, sodass nach 60 min ca. 72% der ursprünglichen Aktivität verblieben sind. Da in den vorliegenden Modellreaktionen sowohl das 3-Methylbrenzkatechin als auch das *n*-Hexylamin als methanolische Stammlösungen in die Reaktionen eingeführt wurden, entspricht bei einem 1:5 mM Reaktandenverhältnis, die Lösungsmittelkonzentration 12%. Ausgehend von einer Reaktionszeit von 60 Minuten, verbleiben unter diesen Bedingungen 56% der ursprünglichen enzymatischen Aktivität, wobei dies, verglichen mit der Aktivitätsabnahme ohne Lösungsmittel, zu einem 19%igen Aktivitätsverlust führt. Die rekombinant exprimierte bakterielle Laccase CotA besitzt somit eine um etwa die Hälfte verringerte Methanoltoleranz als es für die Laccase von *Myceliophthora thermophila* durch den Projektpartner UG-Biotech gezeigt werden konnte (Abschnitt 4.3.4)

Abschließend kann festgehalten werden, dass sich die bakterielle Laccase von der pilzlichen bezüglich der Lösungsmitteltoleranz beachtlich unterscheidet. Diese Tatsache könnte sich mit der Kristallstruktur beider Enzyme begründen lassen, da insbesondere die Substratbindungstaschen beider Laccasen unterschiedlich konstruiert sind. So wurde für Laccasen aus Prokaryoten vielfach in der Literatur beschrieben, dass aufgrund des Aufbaus der Substratbindungstasche ein signifikant größerer Kontakt mit Lösungsmitteln erfolgen kann.

- Synthese von sekundären Aminen mit rekombinant exprimierten pilzlichen Laccasen

Von dem Projektpartner UG-Biotech wurden verschiedene Isoformen der rekombinanten Laccasen der Weißfäulepilze zur Verfügung gestellt. So wurde eine in der Hefe *Pichia pastoris* rekombinant exprimierte Laccase aus *Pycnoporus cinnabarinus* (lac35) in heteromolekularen Kopplungsreaktionen bezüglich ihrer katalytischen Leistungsfähigkeit getestet. Da das Enzympräparat direkt aus der Fermentation stammte, enthielt es einen hohen Anteil an Hefeproteinen und Mediumsbestandteilen. Um die Präparateigenschaften für die vorgesehenen HPLC-Analysen zu verbessern, wurde vor jedem Transformationsexperiment 1 mL von diesem in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und bei 4°C bei 8000 U min<sup>-1</sup> für 10 min zentrifugiert. Somit konnten störende Begleitstoffe zum Teil präzipitiert und der Überstand des Enzympräparates in Synthesereaktionen eingesetzt werden. Im Anhang sind die Ergebnisse bezüglich des Umsatzes des *ortho*-dihydroxylierten Laccase-Substrates 3-Methylbrenzkatechin (1 mM) und die Bildung des heteromolekularen Kopplungsproduktes mit dem aliphatischen Partner *n*-Hexylamin graphisch dargestellt (Abbildung 4 im Anhang). Auch mit der rekombinanten PcL erfolgte eine temporäre Bildung

des bereits aus Kopplungsreaktionen mit CotA bekannten Produktes P1. Dieses konvertiert jedoch bereits nach 20 Minuten in das strukturell charakterisierte Produkt P2, welches mit zunehmender Inkubationszeit im Reaktionsansatz akkumulierte. Eine Erhöhung der Enzymaktivität bewirkte die alleinige Entstehung des Produktes P2, jedoch keine Erhöhung der Ausbeute.


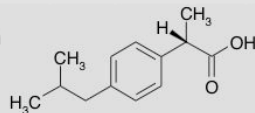
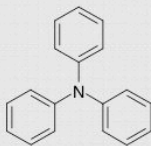
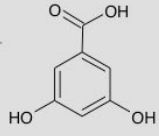
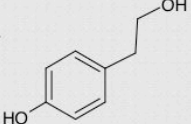
Die rekombinant exprimierten Isoformen der Laccase von *Trametes versicolor* (**lac5** und **lac10**) wurden ebenso auf ihre katalytische Fähigkeit anhand der Modellreaktion II untersucht. Mit den rekombinanten Laccasen konnten prinzipiell die mit der nativen Laccase erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden. Das anfänglich gebildete sekundäre Amin nahm unter Bildung von drei quantitativ dominierenden höher molekularen Produkten simultan ab. Das Aufkommen dieser, unter anderem trimeren Produkte, begründet sich nicht nur in dem katalytischen Wirken der Laccasen, sondern auch wesentlich in dem pH-Wert des Reaktionsmilieus (pH 4,5).

Die rekombinant exprimierten pilzlichen Laccasen von UG-Biotech sind für projektrelevante Synthesereaktionen überaus geeignet, da Unterschiede zu den nativen Laccasen auf der Ebene heteromolekularer Kopplungsreaktionen nicht festgestellt werden konnten.

#### 4.1.3. Synthese weiterer sekundärer Amine aus 3-Methylbrenzkatechin und aliphatischen Aminen der Kettenlängen C<sub>3</sub> bis C<sub>9</sub> sowie Bestimmung des HPLC-log $P$ der heteromolekularen Kopplungsprodukte

Neben den Syntheseprodukten der Modellreaktionen I und II, wurden weitere sekundäre Amine mittels heteromolekularer Kopplung des 3-Methylbrenzkatechins mit den aliphatischen Aminen *n*-Propylamin, *n*-Butylamin, *n*-Pentylamin, *n*-Heptylamin und *n*-Octylamin in Laccase-vermittelten Reaktionen synthetisiert. Die Kopplungspartner lagen in einem 1:5 mM Verhältnis vor, als Laccase diente das Enzym aus *Myceliophthora thermophila*. Die nach der Lyophilisation gewonnenen Feststoffe wurden einer Bestimmung des *n*-Octanol-Wasserverteilungskoeffizienten mittels HPLC-log $P$ -Bestimmung unterzogen. Da der log $P$  einer quantitativen Beschreibung der Lipophilie dient, kann dieser als eine Schlüsseldeterminante für pharmakokinetische Eigenschaften (Verteilungsverhalten einer Substanz zwischen lipophilen Biomembranen und wässrigem Cytosol) angesehen werden. Eine wichtige Größe ist der log $P$  unter anderem auch in QSAR-Studien (**quantitative structure activity relationships**) und in Bereichen des Wirkstoffdesigns, da hier eine enge Verknüpfung mit der Wirkstoffabsorption, Bioverfügbarkeit, der Metabolisierung und der Toxizität besteht. In Tabelle 1 sind die hydrophoben und hydrophilen Referenzsubstanzen, die literaturbekannten HPLC-log $P$  und die berechneten log $P$ -Wert dargestellt.

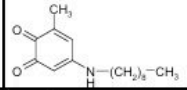
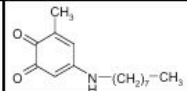
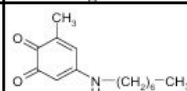
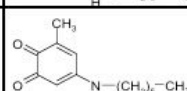
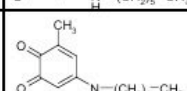
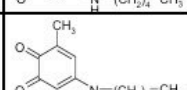
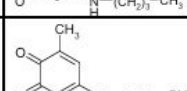
**Tabelle 1: Übersicht über die Struktur der eingesetzten Referenzsubstanzen, deren HPLC- $\log P$  und der mittels ACD/ChemSketch berechneten  $\log P$ -Werte.**

Referenz	Struktur	HPLC- $\log P$	$\log P$ [ACD/ChemSketch]	
Toluol		2.605	2.68 +/- 0.17	<i>Hydrophobe Referenz</i>
Ibuprofen		3.36	3.72 +/- 0.17	
Triphenylamin		k.A.	5.74 +/- 0.17	
3,5-Dihydroxybenzoesäure		1.00	1.12 +/- 0.24	<i>Hydrophile Referenz (sauer/alkalisch)</i>
2-(4-Hydroxyphenyl)ethylalkohol		0.89	0.62 +/- 0.20	

Um eine Aussage über die Zu- bzw. Abnahme des *n*-Octanol-Wasserverteilungskoeffizienten durch die Anbindung von Aliphaten verschiedener Alkylkettenlängen an das 3-Methylbrenzkatechin treffen zu können, wurde auch das Laccase-Substrat ebenso einer chromatographischen  $\log P$ -Bestimmung unterzogen.

Nachfolgende tabellarische Übersicht zeigt die Strukturen der synthetisierten sekundären Amine, die berechneten  $\log P$ -Werte in Abhängigkeit von der neben der entsprechenden hydrophoben Referenz eingesetzten hydrophilen Referenz (sauer/alkalisch) in der Standardmischung und im Abgleich dazu die über ACD/ChemSketch ausgegebenen  $\log P$ -Werte. Zudem wurde die  $\log P$ -Änderung in Abhängigkeit der jeweiligen Reduktion um eine Methylengruppe in dem System der hydrophoben Referenz und der hydrophilen Referenz 2-(4-Hydroxyphenyl)ethylalkohol berechnet (Tabelle 2).

**Tabelle 2: Übersicht über die Strukturen der heteromolekularen Kopplungsprodukte, deren HPLC- und mittels dem chemischen Zeichenprogramm ACD/ChemSketch berechneten log*P*-Werte.**

		HPLC-log <i>P</i>		log <i>P</i> -Berechnung	log <i>P</i> -Differenz [-CH <sub>2</sub> ]	
		3,5-DiOH-Benzoessäure	Phenyl-ethyl-alkohol	ACD/ChemSketch	HPLC	ACD/ChemSketch
<b>Laccasesubstrat</b>		- 0.007	0.75	1.34+/- 0.21		
<b>Aliphatischer Kopplungspartner</b>	<b>Kopplungsprodukt</b>					
<i>n</i> -Nonylamin		n.d.	3.64	4.00+/- 0.61		
<i>n</i> -Ocytlamin		n.d.	2.61	3.47+/- 0.61	1.03	0.53+/- 0.61
<i>n</i> -Heptylamin		1.77	2.02	2.94+/- 0.61	0.59	0.53+/- 0.61
<i>n</i> -Hexylamin		0.77	1.29	2.41+/- 0.61	0.73	0.53+/- 0.61
<i>n</i> -Pentylamin		-0.58	0.41	1.88+/- 0.61	0.88	0.53+/- 0.61
<i>n</i> -Butylamin		-2.15	-0.75	1.34+/- 0.61	1.16	0.53+/- 0.61
<i>n</i> -Propylamin		-3.31	-1.72	0.81+/- 0.61	0.97	0.53+/- 0.61

Aus den Berechnungen konnte abgeleitet werden, dass mit 2-(4-Hydroxyphenyl)ethylalkohol als hydrophile Referenz, in Abgleich zu den mit dem chemischen Rechenprogramm ermittelten log*P*-Werten, fundiertere Werte erhalten wurden. Dies begründet sich vermutlich darin, dass die Kopplungsprodukte ebenso alkalische Eigenschaften vorweisen und somit der Einsatz einer Referenzsubstanz mit Säuregruppierung nicht geeignet ist. Bezogen auf das Laccase-Substrat besitzen die Syntheseprodukte mit einer C<sub>3</sub> bis C<sub>5</sub>-Anbindung hydrophilere Eigenschaften. Da der Kow > 1 ist und zudem negative log*P*-Werte vorliegen, wurden somit Substanzen mit verbesserter Wasserlöslichkeit synthetisiert. Mit zunehmender Methylengruppe der Aliphaten stieg der log*P* im Mittel um 0,83 an. Abgeleitet von den log*P*-Werten bekannter Wirkstoffe und einhergehend mit deren Membrangängigkeit, könnten somit ungeachtet der nicht ermittelten biologischen Wirkung der Syntheseprodukte, Aussagen bezüglich möglicher Wirkorte getätigt werden.

#### 4.1.4. Heteromolekulare Kopplung von *para*-dihydroxylierten, alkylsubstituierten Verbindungen mit aliphatischen Aminen

Die Ergebnisse bezüglich der Synthese sekundärer Amine mit einfach substituierten *para*-dihydroxylierten Laccase-Substraten (Methylhydrochinon, Methoxyhydrochinon, *tert*-Butylhydrochinon) wurden bereits im Zwischenbericht detailliert dargestellt. Ebenso wurden Laccase-vermittelte Reaktionen mit mehrfachsubstituierten, *para*-dihydroxylierten Laccase-Substraten durchgeführt, welche einer Synthese von potenziell antibiotisch wirksamen **Mitomycin-Vorstufen** dienen sollten. Der Grundkörper (2-Methoxy-3-methyl-1,4-benzendiol) wurde in heteromolekularen Kopplungsreaktionen mit cyclischen (Cyclooctylamin) und aliphatischen (*n*-Octylamin, Geranylamin) Aminen umgesetzt. In allen Reaktionen erfolgte die Bildung monoaminierter und diaminierter Verbindungen, wobei die chinoide Form der Laccase-Substrate, insbesondere in Reaktionen mit der Laccase von *Pycnoporus cinnabarinus*, nahezu vollständig in die entsprechende Zielverbindung konvertierte.

Über Festphasenextraktionen wurden die Syntheseprodukte isoliert und anschließend lyophilisiert. Leider war es nicht möglich, die als Feststoff vorliegenden Verbindungen strukturchemisch mittels NMR-Analysen näher zu charakterisieren. Die postulierten Strukturen der gewonnen Mitomycin-Analoga sind im Anhang aufgeführt (Abbildung 5 im Anhang).

Die Synthese eines **Vitamin K-Derivates** erfolgte bereits in der ersten Projekthälfte unter dem Aspekt, Verbindungen zu erhalten, die in ihrem Grundgerüst den natürlichen Verbindungen ähneln, jedoch der isoprenoide Molekülbestandteil nicht über eine C-C-, sondern über eine C-N-C-Brücke an den aromatischen Grundkörper gebunden ist. Allerdings erwies sich die Synthese der Zielverbindung als äußerst schwierig, eine abschließende Optimierung konnte in der zweiten Projekthälfte nicht realisiert werden. Die Laccase-vermittelte Synthese von Vitamin-K ähnlichen Strukturen wird jedoch im Rahmen der aus diesem Projekt abgeleiteten Promotionsarbeit weiter untersucht.

Die strukturell mit Vitamin K verwandten **Ubichinon-Derivate** sollten in der zweiten Projekthälfte über Laccase-vermittelte Synthesen gewonnen werden. Der dafür benötigte Grundkörper, das 2,3-Dimethoxy-5-methylhydrochinon, lag zum Zeitpunkt des Zwischenberichtes bereits in ausreichender Menge vor. Allerdings konnte in Enzym-vermittelten Reaktionen keine Bildung heteromolekularer Kopplungsprodukte erfolgen. Als Kopplungspartner kamen *n*-aliphatische Amine unterschiedlicher Kettenlängen, Geranylamin und auch der aromatische Kopplungspartner 4-Aminobenzoesäure zum Einsatz. Es erfolgte lediglich eine Umwandlung des 2,3-Dimethoxy-5-methylhydrochinons in seine chinoide Form. Eine weitere Transformation im Sinne einer Aminierung konnte unter keiner der getesteten Versuchsbedingungen (Variation des pH-Wertes, der Enzymmenge, der Molaritäten) erzielt werden. Da an dem radikalisierten Laccase-Substrat lediglich eine Position für die Anbindung eines Amins vorhanden ist, scheint die Stellung und Art der am Ring befindlichen Substituenten problematisch für die angestrebte Aminierung zu sein. Eine Verbindung mit

der Methoxylierung in 2,3-Position, aber ohne Methylsubstituenten am C<sub>6</sub>-Atom ist leider nicht kommerziell erhältlich und konnte somit nicht als Alternative getestet werden.

#### 4.1.5. Datengenerierung für die Ökoeffizienzanalyse

Wie in Abschnitt 5 dargestellt, haben sich die Projektpartner zunächst auf die Modellreaktion I geeinigt. Diese Reaktion wurde von der UG-Mibi in einem 5 mL bzw. 40 mL Maßstab etabliert. Das Scale-Up implizierte u.a. die Vergrößerung des Maßstabes und die Erhöhung der Edukt-Konzentrationen. Letzteres erwies sich aufgrund der geringen Löslichkeit des Kopplungspartners *n*-Nonylamin (Löslichkeit 1 g L<sup>-1</sup>), insbesondere in Hinblick auf die angestrebte Reaktion in einem Fallfilmmikroreaktor, als problembehaftet. Mit dem Ziel einer Erhöhung der Löslichkeit des Kopplungspartners durch die Zugabe von Methanol, präzipitierten Pufferbestandteile oder es erfolgte die Entstehung eines Zwei-Phasen-Systems. Zudem erfolgt eine zunehmende Inaktivierung des Enzyms.

Um die beschriebene Problematik zu umgehen, wurde ein um drei Methylengruppen verkürztes aliphatisches Amin als Kopplungspartner (*n*-Hexylamin) in Erwägung gezogen und als Modellreaktion II bei der BASF als Bewertungsgrundlage zugrunde gelegt. Aufgrund der geringeren Lipophilie des *n*-Hexylamins (Löslichkeit 14 g L<sup>-1</sup>) wurde somit ein für das Upscaling wichtiges Kriterium erfüllt, da dies eine Konzentration der Edukte von mindestens 100 mM erfordert, um adäquate Produktausbeuten zu erhalten.

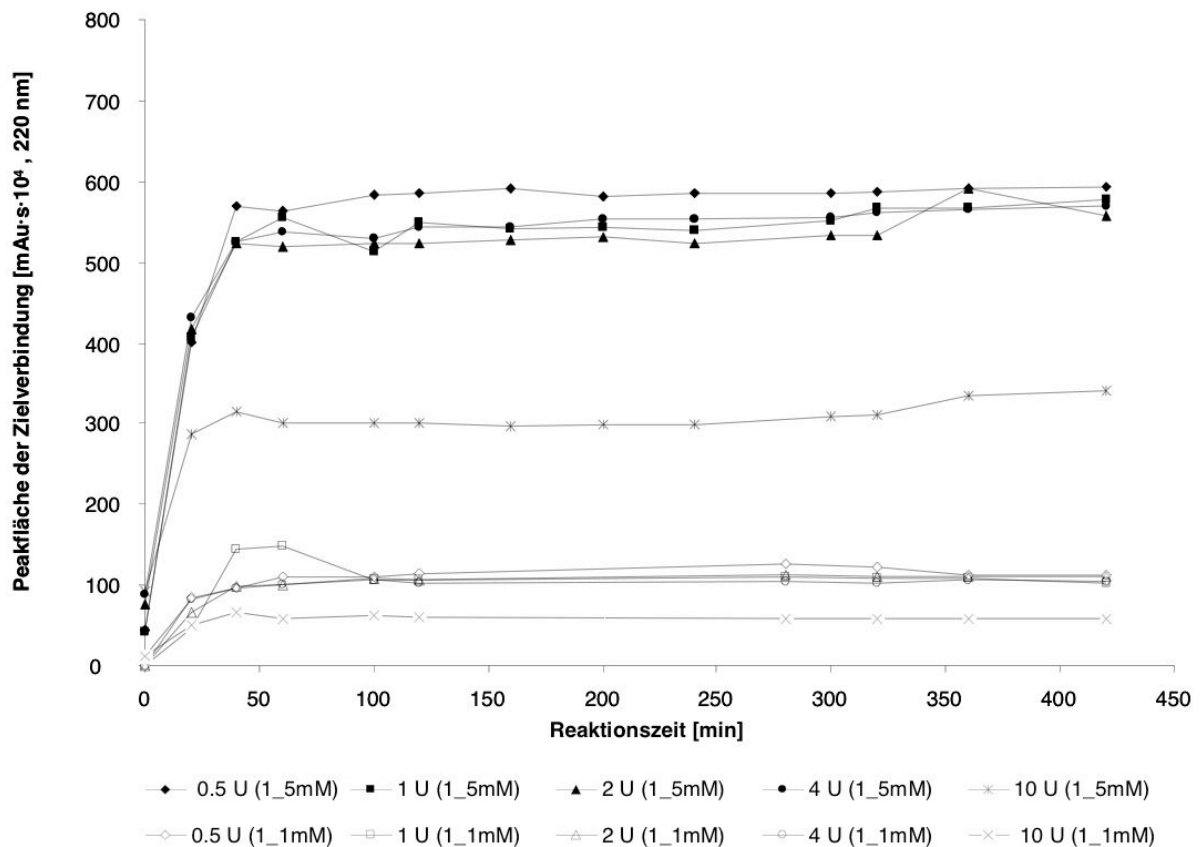
Als Vergleichsreaktion wurde die bekannte Umsetzung der Edukte mit Natriumjodat (NaIO<sub>3</sub>) gewählt. Untersuchungen, in denen ein Vergleich zwischen der katalytischen Aktivität von Laccase und NaIO<sub>3</sub> anvisiert wurde, wurden vor Projektbeginn von der UG-Mibi lediglich anhand *para*-dihydroxylierter Verbindungen vorgenommen. Damalige Untersuchungen der UG-Mibi haben gezeigt, dass zwar bei einer großen Anzahl an Transformationen das Produktmuster von Laccase-katalysierten und chemisch-katalysierten Reaktionen vergleichbar ist, aber die Produktausbeuten mit Laccase höher sind. Bei einzelnen Reaktionen konnten aber auch in Abhängigkeit vom Laccase-Substrat und dem Kopplungspartner bei der Laccase-katalysierten Reaktion Produkte nachgewiesen werden, während bei der Katalyse mit NaIO<sub>3</sub> (6 mM) keine Produkte detektierbar waren.

Da die Modellreaktionen I und II im Gegensatz zu dem oben angeführten Beispiel aus einem *ortho*-dihydroxylierten Laccase-Substrat (3-Methylbrenzatechin) und einem aliphatischen Kopplungspartner bestehen, wurden Umsatzversuche durchgeführt, in denen Laccase mit unterschiedlichen Aktivitäten in die Reaktion eingeführt wurde und gleichzeitig Versuche in denen die katalytische Wirkung von NaIO<sub>3</sub>, gegenüber den Modellverbindungen, unter Verwendung derselben Parameter getestet wurde. Da anhand der Ergebnisse einer heteromolekularen Kopplung von 3-Methylbrenzkatechin mit *n*-Nonylamin bzw. *n*-Hexylamin ersichtlich wurde, dass sich ein Überschuss des Kopplungspartners (5 mM) begünstigend auf eine Vermeidung potentiell entstehender Nebenreaktionsprodukte des Laccase-Substrates auswirkte und unter kinetischem Aspekt einer zügigen Entstehung der Zielverbindung sehr dienlich war, wurde diese Konstellation ebenso in Ansätzen mit NaIO<sub>3</sub> angewendet. Zudem wurde die Modellreaktion mit einem äquimolaren Verhältnis von

Laccase-Substrat und Kopplungspartner durchgeführt. Die Bedingungen sind im Anhang dargestellt.

- Betrachtung der Laccase- und Natriumiodat-katalysierten Modellreaktion II

In den Reaktionen zeigte sich, dass unabhängig von der Molarität der Reaktionspartner und der Aktivität bzw. Molarität der Katalysatoren ein maximaler Umsatz nach einer Reaktionszeit von 2 h bis 3 h auftrat. In einem Reaktionsmaßstab von 40 mL lief die Reaktion, bedingt durch die Modifikation der Parameter, zügiger ab, sodass präparative Maßnahmen zur Isolierung der Zielverbindung bereits nach 60 min (Laccase-katalysierte Reaktion) bzw. 100 min (Natriumiodat-katalysierte Reaktion) ergriffen werden konnten. Das 3-Methylbrenzkatechin war bereits nach 60 min vollständig verbraucht. Im nachfolgenden Diagramm sind die detektierten Peakflächen der Zielverbindung der **Laccase**-katalysierten Modellreaktion II im Verlauf der Inkubationszeit dargestellt (Abb. 4).



**Abb. 4: Mittels HPLC ermittelte Peakflächen des Produktes der Modellreaktion II in Abhängigkeit der eingesetzten Enzymaktivitäten und der Molaritäten der Reaktionspartner.**

Dies lässt erkennen, dass ein Überschuss an aliphatischem Amin im Vergleich zu einem äquimolaren Reaktionsansatz die Synthese der Zielverbindung um das 5-fache steigert. Eine Erhöhung der Laccase-Aktivität bewirkte unterdessen eine Abnahme der Ausbeute an sekundärem Amin. Somit konnte unter Einsatz der niedrigsten katalytischen Aktivität ( $0,5 \text{ U mL}^{-1}$ ) die größte Ausbeute an Zielverbindung generiert werden. Steigende katalytische Aktivitäten bedingen die Zunahme zweier Eigenreaktionsprodukte, welche vermutlich

Wasseradukten entsprechen (siehe Abbildung 6 im Anhang). Eine Isolierung dieser Produkte konnte mittels Festphasenextraktion vorgenommen werden, jedoch zerfielen sie im Zuge der Lyophilisation, so dass eine Strukturaufklärung mittels NMR nicht erfolgreich war.

Das Eigenreaktionsprodukt mit einer Retentionszeit von 3,8 min ist bereits nach der Zusammenführung der Reaktionspartner zu detektieren. Es besitzt dieselben Absorptionsmaxima und -minima wie das avisierte Syntheseprodukt. Das Produkt bei einer Retentionszeit von 3,4 min eluiert, im Vergleich zu Ersterem, zeitiger. Somit ist von einer höheren Lipophilie, als Ausdruck einer möglichen zweifachen Substitution mit Wassermolekülen, auszugehen. Die Konzentration der Nebenreaktionsprodukte ist relativ unabhängig von der Molarität der Edukte, jedoch zeigen sie eine starke Abhängigkeit von der eingesetzten Enzymaktivität. Eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität bewirkte gleichzeitig eine Steigerung der Eigenreaktionsproduktkonzentration unter Verminderung der Ausbeute an der Zielverbindung.

Ein weiteres Nebenreaktionsprodukt, welches auch in Natriumiodat-katalysierten Reaktionen auftritt, eluiert unter den verwendeten Chromatographiebedingungen bei einer Retentionszeit von 6.8 min. Die Molarität der Reaktionspartner und die eingesetzten Enzymaktivität spielt in sofern eine Rolle, dass eine erhöhte Molarität an *n*-Hexylamin eine stärkere Bildung von Produkt ergibt als in äquimolaren Ansätzen (siehe Abbildung 7 im Anhang). Das UV-Absorptionsspektrum dieses Produktes lässt vermuten, dass es der aktivierten Form von 3-Methylbenzochinon entspricht. Leider war es mittels der verwendeten präparativen Maßnahmen nicht möglich, dieses Produkt strukturchemisch zu charakterisieren. Nach Elution der intensiv-pink gefärbten Produktbande von der Festphasenextraktionssäule, konvertierte es binnen kurzer Zeit in das Ausgangssubstrat 3-Methylbrenzkatechin. Somit entspricht dieses Produkt keinem echten Eigenreaktionsprodukt.

In der **Natriumiodat**-katalysierten Modellreaktion II konnte ebenso eine heteromolekulare Kopplung des Laccase-Substrates mit dem aliphatischen Amin unter Synthese der Zielverbindung erreicht werden (Anhang, Abbildung 8). Im Gegensatz zu den Laccase-vermittelten Reaktionen konnte hier die Entstehung zweier monoaminierter Kopplungsprodukte, welche identische UV-Absorptionsspektren besitzen und zeitnah zueinander eluieren, nachvollzogen werden. In äquimolaren Reaktionsansätzen trat das zweite monoaminierte Kopplungsprodukt (bezeichnet als KKP\*) ab einer Natriumiodat-Konzentration von 50 mM in Erscheinung, in Reaktionen mit überschüssigem *n*-Hexylamin bereits ab einer 24 mM Katalysatorkonzentration. Ein weiterer Unterschied lag in der Tatsache, dass mit steigender Molarität an Natriumiodat die Quantität an sekundärem Amin generell gesteigert wurde. Jedoch bedingte dies eine Erhöhung des zweiten monoaminierten Syntheseproduktes KKP\*. Da die Konstitutionsisomere sehr zeitnah zueinander eluieren und nahezu dieselben physikochemischen Eigenschaften besitzen, erscheint es äußerst schwierig, diese getrennt voneinander darzustellen bzw. zu gewinnen.

Auf quantitativer Ebene konnte die Feststellung getroffen werden, dass das als 3-Methylbenzochinon postulierte Reaktionsprodukt (Retentionszeit 6.8 min) mit zunehmender Molarität an chemischem Katalysator erhöht wird (siehe Abbildung 9 im Anhang). Diese

Tatsache geht mit der Katalysatormolarität-bedingten, gesteigerten Bildung an sekundärem Amin in chemisch-katalysierten Synthesereaktionen einher.

**Tabelle 3: Zusammenfassende Bewertung der generierten Daten für die Ökoeffizienzanalyse.**

Bewertungskriterium	Laccase	Natriumiodat
Abnahme des Laccase-Substrates	Ab einer Katalysatorkonzentration von 1 U mL <sup>-1</sup> bzw. 24 mM nach 40 min vollständig verbraucht	
Abhängigkeit der Quantität der Zielverbindung		
Überschuss des aliphatischen Amins	5-fache Steigerung	3,5-fache Steigerung
Erhöhung der Katalysatoraktivität	Verminderung	Erhöhung
Nebenprodukte	2 (rt: 3,4 und 3,8 min)	viele Polymerisationsprodukte
Konstitutionsisomere	nein	Ja
Katalysatorlöslichkeit	unbegrenzt	320 mM
Günstigste Katalysatorenaktivität	0,5 U mL <sup>-1</sup> (0,6 mg <sub>Protein</sub> pro 5 mL)	320 mM (237,6 mg NaIO <sub>3</sub> pro 5 mL)

Die Daten wurden mit dem Ziel einer Evaluierung der Enzym-vermittelten Synthese sekundärer Amine im Vergleich zu einer chemischen Synthese an die BASF AG übermittelt. Zudem wurden gemeinsam mit UG-Biotech Daten zur Gewinnung der Laccasen *Pycnoporus cinnabarinus* und *Trametes versicolor* aus Pilzen zusammengestellt und an die BASF AG übermittelt. Diese beinhalten Stoffgrößen, die eine Stammhaltung und die sich für eine Kultivierung und anschließende Reinigung des Enzyms notwendigen Material- und Energiemengen umfassen (Kulturmedien, Puffersysteme, Proteinreinigungsverfahren etc.).

## 4.2. Projektpartner UR-TC

### 4.2.1. Verfahrensentwicklung zur Herstellung ausgewählter Verbindungen im Produktionsmaßstab

Im Rahmen dieses Projektes wurde ein Fallfilmmikroreaktor (FFMR) in Betrieb genommen, der aufgrund seines sehr großen Oberflächen-Volumen-Verhältnisses und den dünnen Flüssigkeitsschichten, einen optimalen Gaseintrag von z.B. Sauerstoff gewährleistet. Dieser Mikrostrukturreaktor soll als neuer Schlüsselfaktor zur Produkt- und Prozessoptimierung im Feinchemikalienbereich beitragen.

Zunächst wurde eine bekannte Reaktion in diesem Fallfilmmikroreaktor getestet, um dann im zweiten Schritt neue Reaktionen und/oder neue Laccasen darin einzusetzen. Als Modellreaktion wurde zunächst die durch Glucoseoxidase (GOD) katalysierte Oxidation von D-Glucose zur D-Gluconsäure gewählt, bei der – wie bei der Laccase-katalysierten Reaktion – Sauerstoff verbraucht wird. Der Sauerstoff wirkt aufgrund seiner geringen Löslichkeit von 8,5 mg L<sup>-1</sup> (entsprechend 0,3 mmol L<sup>-1</sup>) limitierend. Als konventionelle Vergleichsreaktoren wurden ein gerührtes Becherglas und eine Blasensäule herangezogen. Um Aussagen über

verschiedene Parameter wie Verweilzeit, Raum-Zeit-Ausbeute oder Umsatz treffen zu können, wurde bei der Planung der Systeme Blasensäule und Becherglas auf ein vergleichbares Volumen, Massendurchfluss, Temperatur, Substratkonzentration etc. geachtet. Es zeigte sich, dass die Sauerstofflimitierung der durch Glucoseoxidase katalysierten Modellreaktion von Glucose zu Gluconsäure erst bei hohen Substratkonzentrationen ( $> 0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ ) deutlich erkennbar wird. Für die vergleichende Beurteilung wurde eine Konzentration von  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  gewählt. Der Flüssigkeitsfilm wurde mit  $100 \text{ mL min}^{-1}$  Pressluft im Gegenstrom begast und der Sauerstoffgehalt über Sauerstoffsensoren (Firma Presens) am Ein- und Ausgang des Reaktors überwacht.

Durch die intensive Begasung im Fallfilmmikroreaktor und in der Blasensäule konnte man jeweils, im Vergleich zum Rührkessel, eine Aktivitätssteigerung des Enzyms (Umsatzsteigerung) beobachten, wodurch die Raum-Zeit-Ausbeute deutlich erhöht werden konnte (um den Faktor: 300; Details siehe Zwischenbericht). Als innovativer Verfahrensansatz sollte der Fallfilmmikroreaktor daraufhin zur Herstellung von Laccase-Produkten im größeren Maßstab dienen.

Aus den Untersuchungen ergaben sich einige allgemeine Voraussetzungen für enzymkatalysierte Oxidationsreaktion in einem kontinuierlich betriebenen Mikroreaktor. Zum einen ist es nötig hohe Substratkonzentrationen einzusetzen, um eine Stofftransportlimitierung durch das gasförmige Substrat zu gewährleisten. Zum anderen sollte es sich um eine relativ schnelle Reaktion handeln, bei der alle Substrate (Edukte/Produkte) vollständig gelöst vorliegen müssen.

In Hinblick auf die begleitende Ökoeffizienzanalyse hatten sich die Projektpartner auf die Modellreaktionen I und II geeinigt. An der UR-TC wurde die Modellreaktion I einer Produkt- und Prozessoptimierung sowie einem Scale-Up unterzogen. Zur Erfüllung der FFMR-Voraussetzungen mussten für die Laccase-katalysierte Reaktion die Substratkonzentration und die Löslichkeit aller Reaktionspartner erhöht werden, um eine Sauerstofflimitierung zu erreichen und ein Fouling in den Mikrokanälen zu verhindern. Trotz einer Prozessoptimierung und einer Umorientierung von *n*-Nonyl- auf *n*-Hexylamin (Modellreaktion II) ist die Wahl des Reaktortyps für diese spezielle Reaktion nicht auf den Fallfilmmikroreaktor gefallen. In späteren Untersuchungen stellte sich heraus, dass nicht der Sauerstoff sondern die eigentliche Kopplung als Folgereaktion der Chinonbildung Reaktionslimitierend wirkt.

Im begastem System (begaster vs. nicht-begaster Rührkessel) kam es nachweislich zur schnelleren Bildung der chinoiden Form des Substrats. Der anschließende nukleophile Angriff des langkettigen Amins ist dagegen vor allem durch dessen geringe Wasserlöslichkeit limitiert, weswegen die Gesamtreaktionsgeschwindigkeit durch den verbesserten Sauerstoffeintrag im FFMR nicht erhöht werden konnte. Außerdem kommt es während der Reaktion zur Entstehung und Fällung geringer Mengen von di- und triaminierten Produkten, die die Mikrostrukturen verkleben.

Als Reaktortyp für weitere Optimierungen im Hinblick auf das Scale-Up und die Aufarbeitung wurde ein konventionell gerührter Reaktor unter zusätzlicher Begasung ausgewählt.

#### 4.2.2. Scale-Up und Downstream-Processing

Zunächst wurde die von der UG-Mibi vorgeschlagene Reaktions- und Aufarbeitungsvarianten nachvollzogen. Diese sah eine niedrige Substratkonzentration von 1 mM für 3-Methylcatechol und 5 mM für *n*-Nonyl- bzw. Hexylamin mit hohen Puffersalzkonzentrationen vor. Die Aufarbeitung erfolgte durch Festphasenextraktion (solid phase extraction, SPE) mit anschließender Gefriertrocknung.

Für eine Zielmengenproduktion im Kilogramm-Maßstab mussten folgende Punkte bedacht und verbessert werden:

- 1) 10–100-fache Erhöhung der Substratkonzentration (äquimolare Konzentrationen)
- 2) Variation der Lösungsmittelzusammensetzung (MeOH/H<sub>2</sub>O)
- 3) Kompromiss für das pH-Optimum der Reaktion und des Enzyms finden
- 4) Minimierung oder Entfernung der Puffersalze
- 5) Test verschiedener kommerzieller und rekombinant hergestellter Laccasen
- 6) Überarbeitung der Aufarbeitung
- 7) Optimierung des chemo- und biokatalytischen Verfahrens in Hinblick auf die Ökoeffizienzanalyse und größere Produktionsmengen (siehe Abschnitt 4.2.3)

#### Ausführungen:

Das erste Ziel bestand in der Erhöhung der Substratkonzentration von 1 mM auf mindestens 10 mM, wodurch der Gesamtprozess ökonomischer wird und vielleicht einem Vergleich mit dem chemokatalytischen Verfahren standhält. Daran gekoppelt ist eine Erhöhung der Löslichkeit des langkettigen Amins, durch eine Erhöhung der Methanolkonzentration. Die MeOH-Konzentration wurde zwischen 20–100% als Lösungsmittelzusatz variiert. Es hat sich gezeigt, dass eine geringe MeOH-Konzentration einen geringen Substrateinsatz bedingt, gefolgt von einem Anstieg an Nebenprodukten und damit einer geringeren Ausbeute an Zielprodukt. Das optimale Verhältnis liegt bei 80% MeOH und 20% Wasser. Zwar kommt es bei einer so hohen MeOH-Konzentration zur starken Deaktivierung des Enzyms, doch diese ist reversibel, sodass eine Reaktion unter erhöhtem Katalysatoreinsatz möglich ist. Die Substratkonzentration konnte unter diesen Bedingungen auf max. 40 mM (äquimolar) gesteigert werden. Die besten Selektivitäten und Ausbeuten wurden mit 30 mM erzielt. Bei geringeren Konzentrationen sind die Verluste in der Aufarbeitung zu hoch, bei höheren Konzentrationen fallen bereits während der Reaktion die stark hydrophoben Nebenprodukte aus. Dies führt zu einer Gleichgewichtsverschiebung zu den di- bzw. triaminierten Kopplungsprodukten und dadurch zu starken Selektivitätseinbußen.

Es wurde daneben ein zunächst viel versprechender konzentrierter, lösungsmittelfreier Ansatzes mit Reinsubstanzen getestet. Darin stellt das im Überschuss eingesetzte, langkettige Amin das Lösungsmittel dar, in welches das Catechol und eine verdünnte Enzymlösung langsam zudosiert werden. Leider kommt es nach kurzer Zeit zu einer irreversiblen Deaktivierung der Laccase. Zudem ist das Ziel- bzw. Kreuzkopplungsprodukt im Basischen instabil (z.B. *n*-Nonylamin pH 12,6). Zur Erniedrigung des pH-Wertes wurde

Schwefelsäure zugesetzt, doch damit änderte sich die Viskosität des primären Amins rapide, was eine Produktion im größeren Maßstab nicht möglich machte.

Zur Überprüfung des pH-Optimums für die Reaktion und für die Laccase wurde der pH-Wert zwischen 1–9 variiert. Im Ergebnis wurde ein pH-Bereich von 5,5–6,5 festgelegt. Das pH-Optimum der kommerziell erhältlichen *Myceliophthora thermophila* Laccase (MtL) liegt bei pH 7, doch die Versuche zeigten, dass die höchste Reaktionsgeschwindigkeit für die Kreuzkopplung im Sauren erreicht wird.

Da eine Pufferung der stark basischen Amine hohe Puffersalzkonzentrationen erfordert, wurden vergleichende Ansätze (pH 6) unter Zusatz von einigen Mikrolitern konzentrierter Säuren (z.B. HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Eisessig), ohne Zusatz von Puffersalzen, vorgenommen. Unter Zusatz von Eisessig konnten die schnellsten Umsätze erzielt werden; die Aktivität der Laccase wurde nicht beeinflusst. Dadurch ist eine Substitution möglich, die den Zusatz von ca. 10 kg Puffersalzen auf 1 kg Produkt verhindert.

An der UG-Mibi und in eigenen Vorversuchen wurden die beiden kommerziell erhältlichen Laccasen von *Myceliophthora thermophila* (MtL) und *Pycnoporus cinnabarinus* (PcL) sowie die rekombinanten Laccasen unter sonst gleichen Bedingungen eingesetzt. Im Ergebnis wurde für das Scale-Up die MtL gewählt, da der Umsatz der Substrate schneller erfolgte.

Die größte Herausforderung stellte die Aufarbeitung dar, die für die angestrebte Produktion im Kilogrammmaßstab eine grundlegende Überarbeitung erforderte.

Einige Einschränkungen für die Aufarbeitungsmethodik ergaben sich aus den Eigenschaften des Kreuzkopplungsproduktes. Dieses ist:

- relativ instabil in Lösungsmittelgemischen und im Basischen,
- bei höheren Temperaturen instabil ( $T > 40\text{ °C}$ ),
- stabil in MeOH und H<sub>2</sub>O,
- schlecht löslich in H<sub>2</sub>O,
- sehr gut löslich in Alkoholen, *n*-Heptan, Essigsäureethylester,
- im Dunkeln aufzubewahren.

Zunächst wurde versucht die Zielkomponente jeweils mit *n*-Hexan, *n*-Heptan, Chloroform und Essigsäureethylester zu extrahieren (5-fach Extraktion). Das organische Lösungsmittel wurde anschließend am Rotationsverdampfer unter milden Bedingungen (bei 30°C) relativ schnell abdestilliert. Der zeitaufwendige Schritt der Gefriertrocknung wurde damit ersetzt. Mit der Extraktion kommt jedoch ein hoher Produktverlust zu Tragen, wodurch die Ausbeute stark abnahm. Ferner handelt es sich bei dem extrahierten Produkt nur um ein Rohprodukt, welches noch ca. 20% Verunreinigungen enthält. Eine erste Verbesserung wurde durch die erhöhte MeOH-Konzentration in der Reaktionsführung erzielt. Die Extraktion wurde umgangen, indem der MeOH-Anteil (80%) direkt abrotiert wurde und das gewünschte Produkt in Wasser ausfiel bzw. abfiltriert werden konnte. Der Katalysator wird mit dem Filtrat entsorgt, also nur einmal eingesetzt. Auch hierbei wird ein Rohprodukt mit 10–20% Verunreinigungen erhalten. Selbstverständlich kam auch die integrierte Produktabtrennung im 2-Phasensystem in Betracht. Sie ist jedoch durch eine starke Phasentransferlimitierung

des langkettigen Amins, welches sich vorwiegend in der organischen Phase anreichert, nicht zu empfehlen.

In Abb. 5 wurden bildlich die wichtigsten Modifikationen in der biokatalytischen Verfahrensentwicklung zusammengefasst.

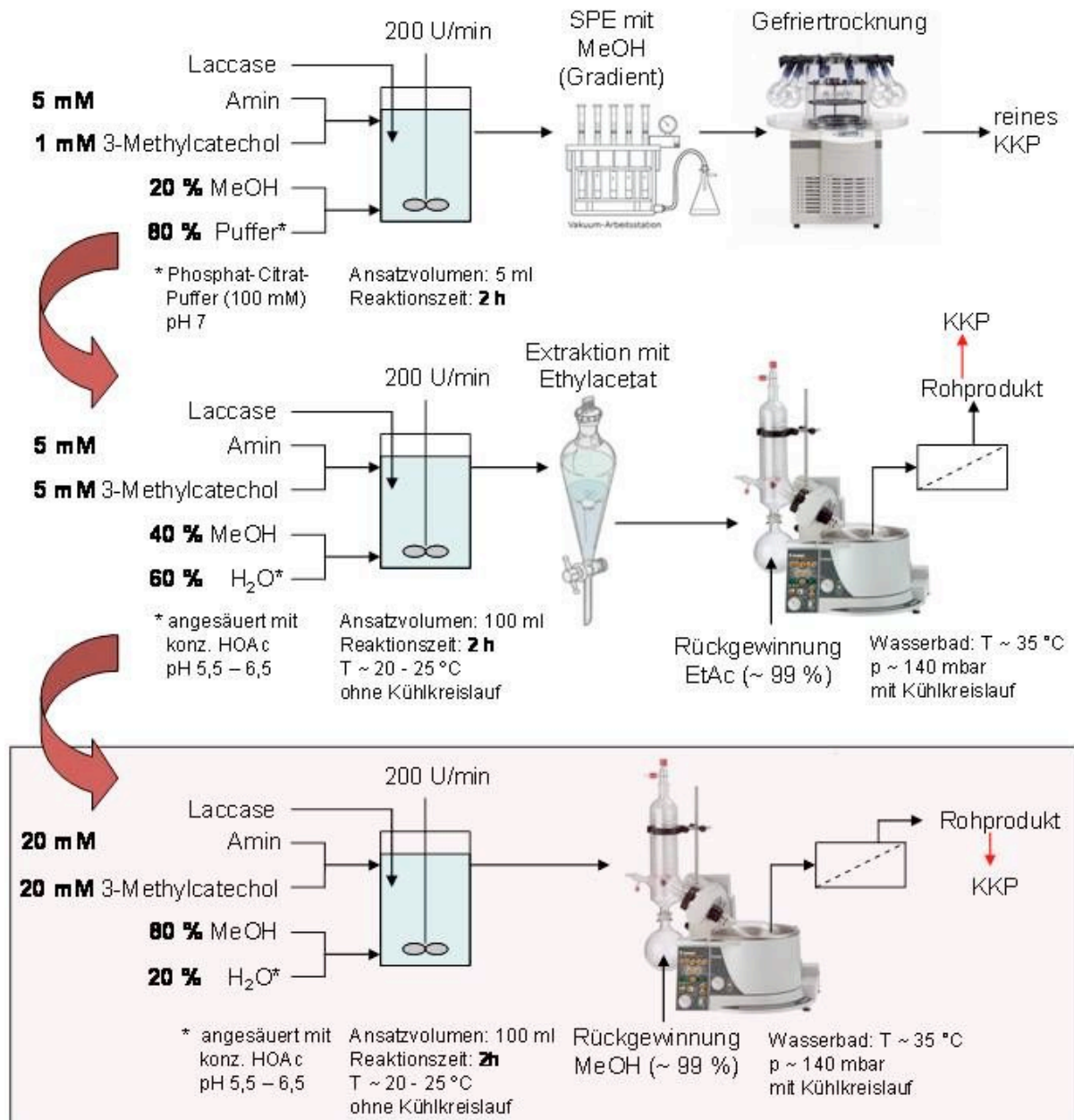


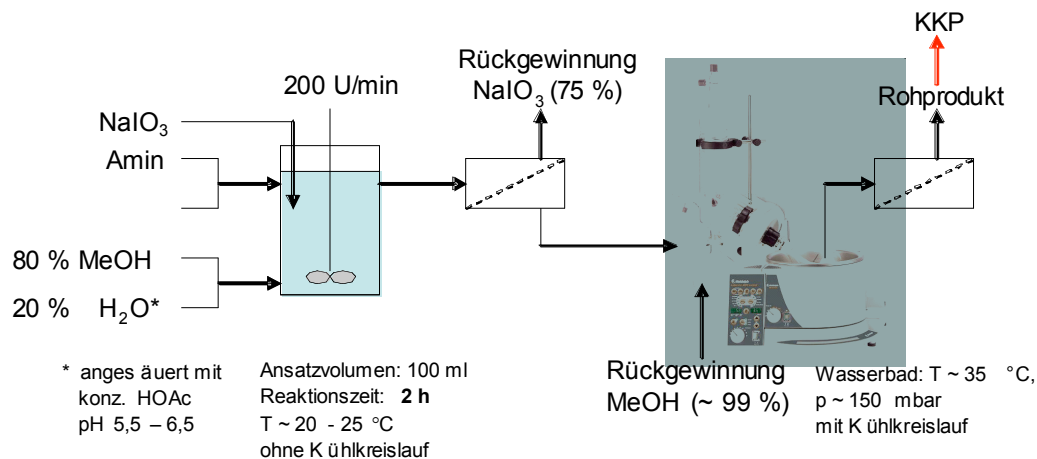
Abb. 5: Verfahrensentwicklung für die Laccase-vermittelte Biotransformation<sup>1</sup>.

In der Großtechnischen Produktion kann der Rotations- durch einen Kurzwegverdampfer oder eine Rektifikationskolonne substituiert werden. Der Einsatz von Adsorbentmaterialien, die gezielte Edukt- und Produktkonzentrationen in Lösung ermöglichen, kann einer weiteren Optimierung des biokatalytischen Systems dienen.

<sup>1</sup> Bildquellen: [www.martinchrist.de](http://www.martinchrist.de), [www.heidolph-instruments.de](http://www.heidolph-instruments.de), [www.arnold-chemie.de](http://www.arnold-chemie.de)

#### 4.2.3. Datengenerierung für die Ökoeffizienzanalyse

Da kein bestehendes großtechnisches Verfahren zur Herstellung der Zielverbindung besteht, musste auch der chemokatalytische Herstellprozess für einen realistischen Vergleich optimiert werden. Wie beim biokatalytischen Prozess wurden konzentrierte und verdünnte Ansätze mit hohen oder niedrigen Katalysatorkonzentrationen in unterschiedlichen Lösungsmittelverhältnissen untersucht. Das endgültige Verfahren zur Herstellung des Kopplungsproduktes mit  $\text{NaIO}_3$  als Katalysator ist in Abb. 6 dargestellt.



**Abb. 6: Modifiziertes Verfahren für den  $\text{NaIO}_3$ -Vergleichsprozess<sup>2</sup>.**

#### Zusammengefasste Ergebnisse

##### als positiv zu bewerten:

- Erhöhung der Volumenkonzentration im  $\text{NaIO}_3$ -Prozess und im Biotransformationsansatz von  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  auf  $60 \text{ mmol L}^{-1}$  bzw.  $20 - 30 \text{ mmol L}^{-1}$
- Veränderung des Substratverhältnisses (3-Methylcatechol : *n*-Hexylamin) von 1:5 auf 1:1 durch Einführung eines Fed-batch Prozesses
- Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit durch Erhöhung der Katalysatorkonzentration und Verbesserung des Sauerstoffeintrages
- Eliminierung von Puffersalzen durch den Einsatz von Eisessig zur pH Regulierung
- Ermittlung des pH-Optimums für die Reaktion: pH 5–7 (Produktinstabilität im Basischen)
- Erhöhung der MeOH-Konzentration von 10% auf 80% → Verbesserung der Substratlöslichkeit und der Aufarbeitung
- Veränderung der Aufarbeitung: SPE, Gefriertrocknung → Destillation, Filtration (plus Kristallisation evtl. in EtOH zur weiteren Aufreinigung)
- 75 % Katalysatorrückgewinnung im  $\text{NaIO}_3$ -Prozess
- Umsatz in beiden Prozessen > 95%

##### als negativ zu bewerten:

- relativ hohe Ausbeuteverluste durch die Aufarbeitung (20–30%)
- kein nennenswerter Selektivitätsgewinn durch den Einsatz der Laccase
- Erhöhung der Volumenkonzentration durch hydrophobes Amin beschränkt
- starker Aktivitätsverlust der Laccase durch hohen MeOH-Anteil (kein Recycling möglich)

<sup>2</sup> Bildquelle: www.heidolph-instruments.de

Im abschließenden Vergleich beider Verfahren wird, abgesehen von den eingesetzten Katalysatoren, im  $\text{NaIO}_3$ -Prozess pro Volumen und Zeit doppelt so viel Kreuzkopplungsprodukt bei annähernd gleichen Selektivitäten gewonnen. Daneben zeigt die Laccasevermittelte Reaktion geringere isolierte Ausbeuten, da die Verluste pro 100 mL Wasser durch die Aufarbeitung größer sind. Das Produkt ist nach der Vakuumdestillation im verbleibenden Wasser schwer löslich, dennoch geht circa 20% bei der Aufarbeitung des Rohproduktes verloren. Alternativen stellen die präparative Säulenchromatographie oder geeignete Adsorbentmaterialien dar. Im Rahmen dieses Projektes konnten diese Verfahren nicht ausreichend untersucht werden. Zur weiteren Aufreinigung wurden 3 g des Rohproduktes aus beiden Vergleichsprozessen zu SIAL versendet. Die gewonnenen Versuchsdaten wurden mit den Projektpartnern diskutiert und an Frau Achatz (BASF) für die Ökoeffizienzanalyse übergeben.

**Tabelle 4: Ausgewählte Reaktionsansätze für die chemo- bzw. biokatalytische Synthese des Kopplungsproduktes.**

	NaIO <sub>3</sub>			Laccase		
	1	2	3	1	2	3
Volumen [mL]	5	100	100	5	100	100
Katalysatormenge	0,024	3 *	3 *	1,7 µl	152 µl	200 µl
[g]	(24 mM)	(151 mM)	(151 mM)	(1 U)	(90 U)	(120 U)
3-Methylcatechol	0,00062	0,25	0,75	0,00062	0,124	0,372
m [g]	(1 mM)	(20 mM)	(60 mM)	(1 mM)	(10 mM)	(30 mM)
<i>n</i> -Hexylamin	0,0025	0,2035	0,6105	0,0025	0,2035	0,306
m [g]	(5 mM)	(20 mM)	(60 mM)	(5 mM)	(20 mM)	(30 mM)
wässrige Pufferlösung	0,005	0,02 (ohne Puffer)	0,02 (ohne Puffer)	0,005	0,06 (ohne Puffer)	0,02 (ohne Puffer)
v [L]						
MeOH v [L]	Spuren	0,08 **	0,08 **	Spuren	0,04 ***	0,08 **
Eisessig v [µL]	keine	115	375	keine	115	160
Reaktionszeit [h]	1	2,5	3	1	2 - 3	4
Umsatz [%]	> 95					
analyt. Ausbeute	k.A.	71	67	92,8	78	87
KKP [%]						
isolierte Ausbeute	k.A.	65,3	66,5	40 - 50	<<< 83	72
KKP [%]		(0,295 g)	(0,9015 g)	(max. 73 %)	(0,186 g)	(0,4854 g)
		roh	roh	rein	roh, feucht	roh
					zähflüssig!	

Legende:

\* Katalysator wird zu 75 % zurück gewonnen; erneuter Einsatz ist erfolgreich

\*\* MeOH wird zu ~ 99 % zurück gewonnen

\*\*\* Extraktion mit EtAc (Problem: Produktzerfall in EtAc, Nebenprodukte werden ebenfalls extrahiert)

1 Festphasenextraktion mit Strata-Giga-Tubes (C18) und Gefriertrocknung → Reinprodukt

2,3 Destillation und Kristallisation, Filtration → Rohprodukt

Durchgeführt wurden die Versuche in einem gerührten, unbeheizten Fed-Batch-System, indem das 3-Methylcatechol innerhalb der ersten Stunde zudosiert wurde. **Jeweils der 3. Ansatz (siehe Tabelle 4) wurde für die Ökoeffizienzanalyse ausgewählt.**

Ein Scale-Up im Kilogramm-Maßstab konnte nur theoretisch erfolgen, da die Substratverfügbarkeit des 3-Methylcatechols durch Lieferschwierigkeiten der Hersteller nicht gewährleistet werden konnte beziehungsweise bis heute nicht gewährleistet ist.

Für eine genaue Datenerhebung zur Ökoeffizienzanalyse sollten Energie- und Wärmedaten geliefert werden, diese konnten nur theoretisch ermittelt werden, da uns weder genügend Substrat noch ein Kurzwegverdampfer zur Verfügung stand. In der Theorie für die Destillation ohne Wärmeverluste wurde im *best-case* der Energieverbrauch aus der Verdampfungsenthalpie von MeOH berechnet. Bezogen auf 1 kg Produkt ergibt sich demnach unter den gegebenen Bedingungen ( $\Delta H_{V,MeOH} = 35,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ ,  $M_{MeOH} = 32 \text{ g mol}^{-1}$ ,  $\rho_{MeOH} = 0,79 \text{ g cm}^{-3}$ ,  $v_{MeOH} = 200 \text{ L}$ ) ein Energieverbrauch von 48,5 kWh.

Die Daten wurden an die BASF AG zur Erstellung der Ökoeffizienzanalyse weitergeleitet.

### 4.3. UG-Biotech

#### 4.3.1. Rekombinante Herstellung pilzlicher Laccasen

Wie bereits im Zwischenbericht ausführlich dargestellt wurden beim Projektpartner UG-Biotech verschiedene Gene der Laccasen aus *Pycnoporus cinnabarinus* und *Trametes versicolor* isoliert (siehe Tabelle 5) und in geeignete Expressionsvektoren für die anschließende Expression in *E. coli* und *Pichia pastoris* kloniert.

**Tabelle 5: Isolierte Laccase-Gene.**

Projekt-Synonym	Ursprungsorganismus	ACC. Nummer
lac5	<i>Trametes versicolor</i>	CAA77015 (2 AS-Austausche)
lac10		AAW29420 (2 AS-Austausche)
lac13		AAC49829 = Q12717 (3 AS-Austausche)
lac20		CAA59161 = Q12719 (3 AS-Austausche)
lac35	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	AAF13052.1 = AAG13724.1 (1 AS-Austausch)

#### 4.3.2. Expression in *E. coli*

Es wurde festgestellt, dass sich die verschiedenen Isoenzyme nur durch die Verwendung eines speziellen *E. coli* Stammes (*E. coli* BL21 DE3 C41, Details im Zwischenbericht) exprimieren ließen. Die Enzyme konnten aber ausschließlich in inaktiver und unlöslicher Form in *E. coli* gewonnen werden. Die An- bzw. Abwesenheit eines His-Taqs sowie die Zugabe von Kupfer ins Kulturmedium sowie während des Assays spielten dabei keine Rolle. Durch die Co-Expression von Chaperonen konnte eine visuelle Zunahme löslichen Proteins auf SDS-Gelen sowie in Western Blots, aber keine Aktivität gegenüber ABTS erhalten werden.

Daraufhin wurde in der weiteren Projektlaufzeit versucht die lösliche aktive Proteinexpression durch die Verwendung verschiedener Taqs (z.B. NusA), einer Expression im Periplasma (durch die *peIB*-leader Sequenz) sowie einer Expression unter Zuhilfenahme der natürlichen

Signalsequenz in *E. coli* zu erreichen. Weiterhin wurden weitere *E. coli*-Stämme getestet. Dafür wurden die entsprechenden Konstrukte für die fünf Laccase-Gene kloniert und die Expression mit SDS-Gelen, Western Blots und Aktivitätstest gegenüber ABTS analysiert. Allerdings führte keine dieser Strategien zum Erfolg (Daten nicht gezeigt). Dies lässt erneut die Vermutung zu, dass Laccasen toxisch für die Zelle sind (siehe Zwischenbericht und Abschnitt 4.4.2). Bisher ist, wie zum Zeitpunkt der Antragstellung, noch keine prokaryotische Expression eukaryotischer Laccasen in der Literatur beschrieben. Aus persönlichen Mitteilungen anderer Forschergruppen sind ebenfalls keine positiven Versuche bekannt, sodass sich die Frage stellt, ob weitere Experimente für die rekombinante Herstellung in *E. coli* sinnvoll sind.

#### 4.3.3. Expression in *Pichia pastoris*

Parallel zur Expression in *E. coli* erfolgten Expressionsversuche mit *Pichia pastoris*. Der Expressionsvektor wurde so gewählt, dass eine konstitutive Expression mit einer Sekretion unter Zuhilfenahme des alpha-Faktors von *Saccharomyces cerevisiae* erfolgte. Die natürlichen Signalsequenzen der einzelnen Laccasen wurden dabei aus den Genen entfernt. (Details siehe Zwischenbericht). In *P. pastoris* konnten die Laccasen in löslicher und aktiver Form exprimiert werden, wobei lac10 aus *Trametes versicolor* die höchsten Aktivitäten von  $728 \text{ mU mg}^{-1}_{\text{Protein}}$  bzw.  $39,32 \text{ mU mL}^{-1}_{\text{Medium}}$  lieferte.

In der weiteren Projektlaufzeit wurde versucht diese Expression zu optimieren, z.B. durch der Verwendung der natürlichen Signalsequenz anstelle des alpha-Faktors und Verringerung der Kultivierungstemperatur. Zudem wurden kontinuierlich die verschiedenen rekombinanten Laccasen gewonnen und dem Projektpartner UG-Mibi zu Verfügung gestellt.

Durch die Reduzierung der Expressionstemperatur von 30°C auf 20°C konnte die Aktivität von lac5 und lac35 deutlich erhöht werden. Dadurch konnten nun ebenfalls ausreichende Mengen an lac5 und lac35 hergestellt werden, um sie a) an UG-Mibi weiterzuleiten und b) diese Enzyme wie in Abschnitt 4.3.4 dargestellt näher zu charakterisieren. Erstaunlicherweise verringerte sich die Aktivität von lac20. Das veränderte Expressionslevel ist anhand der Aktivität pro Gesamtprotein gegenüber ABTS in Tabelle 6 dargestellt.

**Tabelle 6: Vergleich der Aktivitäten, gewonnen bei verschiedenen Expressionstemperaturen.**

	30°C	20°C
lac5	16 mU mg <sup>-1</sup>	423 mU mg <sup>-1</sup>
lac10	728 mU mg <sup>-1</sup>	168 mU mg <sup>-1</sup>
lac35	15 mU mg <sup>-1</sup>	364 mU mg <sup>-1</sup>

In einer Publikation, die während der Projektlaufzeit erschienen ist, wurde ebenfalls die Expression verschiedener Laccase-Isoenzyme in *Pichia pastoris* beschrieben<sup>3</sup>. Dabei wurde festgestellt, dass bei einigen Isoenzymen die Aktivität im Kulturüberstand gesteigert wurde,

<sup>3</sup> Koschorreck K, Richter SM, Swierczek A, Beifuss U, Schmid RD, Urlacher VB; Arch. Biochem. Biophys. 2008, 474, 213–219

in dem die natürlichen Signalpeptide der Laccasen anstatt des alpha-Faktors zur Sekretion verwendet wurden. Dies wurde ebenfalls auf die in diesem Projekt gewonnenen Isoenzyme aus *Trametes versicolor* als auch auf das Enzym aus *Pycnoporus cinnabarinus* angewendet. Dabei konnte in allen Fällen Expression erreicht werden, die aber weitaus geringer war als unter Verwendung des alpha-Faktors (Daten nicht gezeigt).

Weiterhin wurde untersucht, inwieweit sich die Zugabe von Cobaltionen zum Kultivierungsmedium anstelle von Kupferionen auswirkt. In allen Fällen wurde die höchste Aktivität durch die Zugabe von Kupferionen erreicht, die Zugabe von Cobaltionen ergab etwa 75% der Aktivität, Kultivierungen ohne Zugabe von Kupfer- oder Cobaltionen ergaben immerhin noch Aktivitäten von 50% im Vergleich zu einer Kupferionenzugabe (siehe Abbildung 10 im Anhang).

#### 4.3.4. Charakterisierung der rekombinanten Laccasen

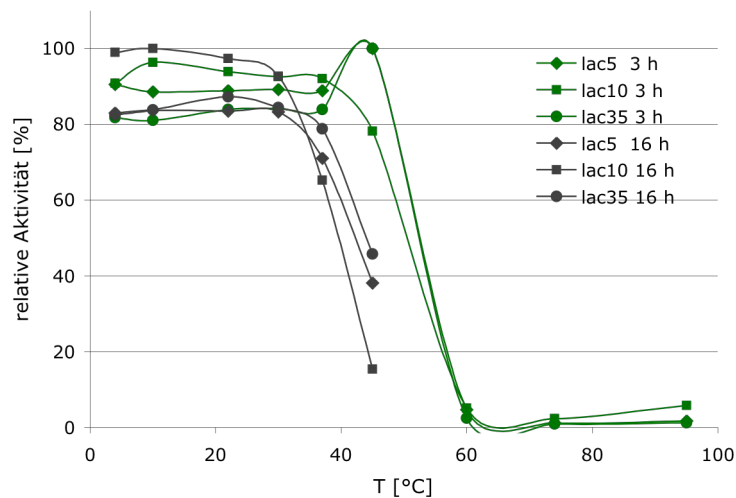
Die gewonnenen Laccasen wurden hinsichtlich ihres pH-Optimums und der Temperaturabhängigkeit, sowohl bezüglich ihrer Methanol-Toleranz mit Hilfe von Aktivitätstest gegenüber ABTS untersucht. Als Vergleich dienten die Laccasen direkt aus den Pilzen, wobei hauptsächlich Unterschiede für die rekombinanten Isoenzyme aus *Trametes versicolor* erwartet wurden.

Wie bereits im Zwischenbericht für lac10 dargestellt, wurden auch die pH-Profile der anderen Isoenzyme, sowie zum Vergleich die aus den Pilzen gewonnenen Laccase-Gemische, unter Verwendung verschiedener Puffersysteme bestimmt. Die entsprechenden Diagramme sind im Anhang aufgeführt (Abbildungen 11 bis 15 im Anhang). Anhand dieser kann man erkennen, dass alle Laccasen in Abhängigkeit vom Puffer pH Optima bei pH 2 (Phosphat-Puffer) bzw. bei pH 4 (Acetat-Puffer) aufweisen. Somit sind alle Isoenzyme im stark Sauren am aktivsten.

Im Falle der Isoenzyme von *Trametes versicolor* gibt es eine leichte Verschiebung des Profils für Maleat-Puffer. Die rekombinanten Enzyme lac5 und lac10 weisen bei pH 3 etwa 60% bzw. 50% der höchsten Aktivität (bei pH 2, Phosphat-Puffer) auf, während die aus Pilz gewonnene Laccase nur etwa 30% der Aktivität aufweist. Ähnliches ist bei der direkt aus *P. cinnabarinus* gewonnenen Laccase und dem entsprechenden rekombinanten Enzym lac35 zu erkennen. Hier besitzt die pilzliche Laccase bei pH 2 und 3 in Maleat-Puffer etwa 40% bis 30% der höchsten Aktivität, wobei die rekombinante Laccase bei pH 2 nur 5%, bei pH 3 aber 50% der Aktivität besitzt. Kleinere Unterschiede sind bei den pH-Werten ab 5,5 zu erkennen, die aber auch aufgrund der geringeren Aktivitäten der rekombinanten Enzyme zustande kommen können.

Bezüglich Ihrer Temperaturstabilität unterscheiden sich die verschiedenen Isoenzyme im Bereich des Messfehlers nicht. Alle sind bis zu 30°C bei einer Inkubation über Nacht (etwa 16 h) stabil. Bei einer kürzeren Inkubationszeit von 3 h sind die Laccasen sogar bis 50°C stabil, und verlieren dann abrupt Ihre Aktivität bei einer Erhöhung der Temperatur auf 60°C (Abb. 7). Die Stabilität bei 65°C der lac35 wurde genauer untersucht und ist Abbildung 16 im Anhang dargestellt. Bei einer Inkubation von 2 min steigt die Aktivität im Vergleich zur

Anfangsaktivität an (siehe unten: Reifungsprozess), bei weitere Inkubation sinkt sie allerdings, sodass nach einer halben Stunde bei 65°C keine Aktivität mehr vorhanden ist.

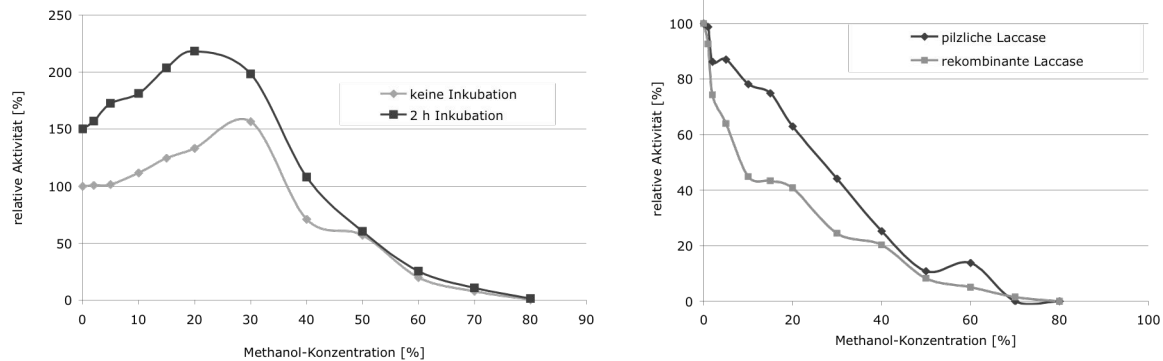


**Abb. 7: Temperaturabhängigkeit der Isoenzyme.**

Weiterhin wurde die Methanol-Abhängigkeit der Laccasen getestet, da die Substrate der anvisierten Synthesen eine begrenzte Wasserlöslichkeit aufweisen und somit unter Zuhilfenahme von Lösungsmitteln gearbeitet werden muss (siehe auch Abschnitt 4.1.4, Methanolabhängigkeit von CotA).

Zunächst wurde die Abhängigkeit der kommerziellen Laccase aus *Myceliophthora thermophila* untersucht. Wie in Abb. 8 zu ersehen ist, treten bei geringen Konzentrationen bis zu 20% starke Unterschiede auf, je nachdem ob die Messung direkt nach Zugabe von Methanol oder nach 2 h Inkubation erfolgte. In beiden Fällen steigt aber die Aktivität bis zu einer Konzentration von 20% Methanol, danach sinkt sie stark ab. Somit sollte der Einsatz von Methanol in den Modellreaktionen I und II mit MtL kein Problem darstellen.

Ebenfalls in Abb. 8 ist die Methanolabhängigkeit der Laccase aus *P. cinnabarinus* dargestellt. Hier fällt die Aktivität im Gegensatz zur MtL deutlich mit steigender Methanolkonzentration, sowohl für die Laccasen direkt aus dem Pilz gewonnen, als auch im Falle der rekombinanten Laccase. Im letzteren Falle jedoch stärker, was auf das veränderte Glykosylierungs-Muster und einer damit einhergehenden verminderten Stabilität zurückzuführen sein könnte. Diese Laccase wäre daher eher ungeeignet für die Modellreaktionen der Ökoeffizienzanalyse.



**Abb. 8: Methanolabhängigkeit der Laccasen.**  
links) *Myceliophthora thermophila* und rechts) *P. cinnabarinus*.

Die Charakterisierung der Enzyme mit Hilfe des ABTS Assays erwies sich als schwierig und zeigte starke Schwankungen auf. Dies wird auf einen Reifungsprozess der Enzyme zurückgeführt (*maturing*), der bereits bei anderen Oxidasen z.B. den Cholinoxidasen beobachtet und beschrieben wurde. Es wird angenommen, dass durch das Einfrieren das Enzym deaktiviert wird, z.B. durch das Absinken des pH Wertes. Die Reaktivierung des Enzyms ist u.a. abhängig von der Temperatur und kann mehrere Tage dauern<sup>4</sup>. So konnte z.B. in einer anderen Arbeit im AK-Bornscheuer festgestellt werden, dass die relative Abweichung der Aktivitäten verschiedener Cholinoxidase-Varianten mit zunehmender Lagerung bei 4°C nach dem Auftauen geringer wird, sich die Aktivität immer stärker einen Mittelwert annähern<sup>5</sup>. So ist z.B. zu erklären, dass die Aktivität bei Inkubation bei 50°C für 3 h im Gegensatz zum Startwert ansteigt (siehe Abb. 7), ebenfalls bei einer kurzen Inkubation bei 65°C oder, dass die Aktivität der MtL bis zu einer Methanolkonzentration von 20% unerwarteter Weise ansteigt (Abb. 8).

#### 4.3.5. Fermentation im 10-Liter Maßstab

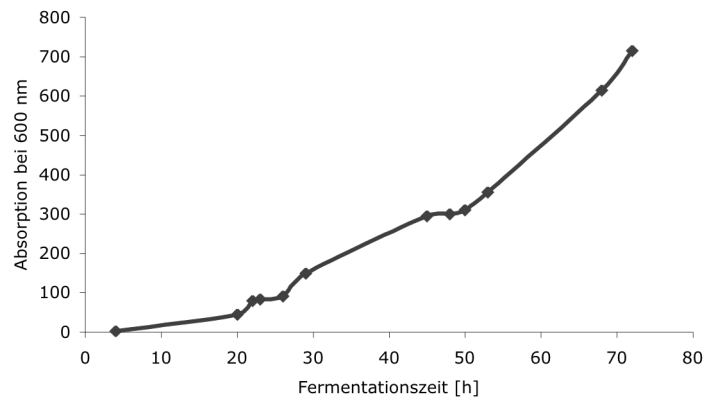
Eine Fermentation im 10-Liter Maßstab wurde beim Projektpartner BRAIN durchgeführt, da hier ein geeigneter Fermenter zur Verfügung stand und auf die ausreichende Erfahrung des Partners zurückgegriffen werden konnte.

Es wurde *Pichia pastoris* zur Herstellung von rekombinanter Laccase aus *Pycnoporus cinnabarinus* (*lac35*) fermentiert. Dazu wurden 6 L Batch Medium (pH 5; Zusammensetzung siehe Anhang) mit Zellen einer 500 mL Vorkultur in YPD Medium angeimpft und bei 28°C inkubiert. Der Sauerstoffgehalt wurde durch die Durchmischung und Begasung konstant auf 20%, der pH Wert durch die Zugabe von Ammoniak oder Phosphorsäure konstant auf pH 5 gehalten. Das Wachstum wurde über die O<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Messung der Abluft verfolgt. Außerdem erfolgte zu bestimmten Zeitpunkten die Messung der optischen Dichte, die aber aufgrund der großen Verdünnungen eher fehlerhaft ist. Nichtsdestotrotz ist das Wachstum

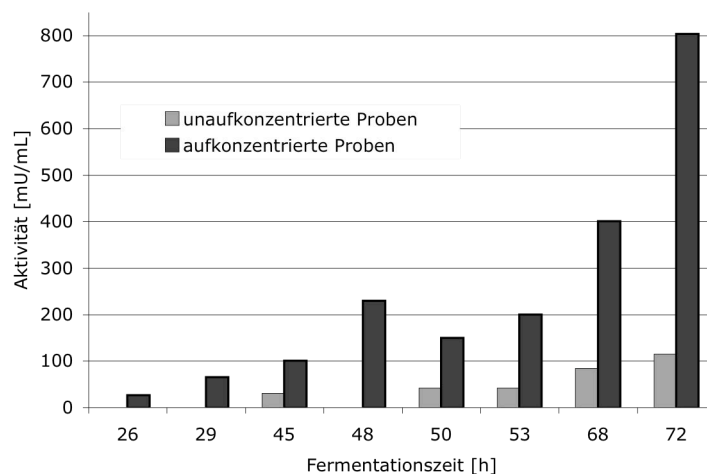
<sup>4</sup> Hoang JV, Gadda G; Funct. Bioinf., 2007, 66, 611-620

<sup>5</sup> Heinze B, 2008, Dissertation im AK-Bornscheuer

anhand der optischen Dichte in Abb. 9 dargestellt. Nach etwa 24 h sank zunächst der O<sub>2</sub>-Gehalt drastisch, was als Startpunkt für die Zufütterung (*fed batch*) genommen wurde. Mit Beginn der Fütterung (5%; 0,8 mL min<sup>-1</sup>; 4 L) stieg der Sauerstoffgehalt in der Abluft wieder deutlich an. Ab diesen Zeitpunkt begann auch die Produktionsphase. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben genommen, um die Zellzahl und die Laccase-Aktivität im Kulturüberstand gegenüber ABTS zu bestimmen (siehe Abb. 10). Nach 73 h wurde eine Zelldichte von 715 erreicht und die Fermentation gestoppt. Nach Zentrifugation lagen etwa 6 Liter Kulturüberstand vor, der steril filtriert und aufkonzentriert wurde. So wurden 800 mL Überstand mit einer Aktivität von 1,32 U mL<sup>-1</sup> bzw. 240 mU mg<sup>-1</sup><sub>Protein</sub> gegenüber ABTS erhalten. Insgesamt wurden 1056 Units an Laccase aus ca. 10 Litern Medium gewonnen werden. Damit konnte die Ausbeute an U L<sup>-1</sup><sub>Medium</sub> bezogen auf die Kultivierung im Schüttelkolben bei 20°C um das 6,5fache und bei 30°C um das 160fache gesteigert werden. Die Laccase wurde für die oben beschriebene Charakterisierung und heteromolekulare Kopplungen für die Aminsynthese beim Projektpartner UG-Mibi verwendet.



**Abb. 9: Wachstum während der Fermentation anhand der optischen Dichte.**



**Abb. 10: Aktivitätszunahme während der Fermentation.**  
gegenüber ABTS im Kulturüberstand vor und nach Aufkonzentrierung.

#### 4.4. BRAIN AG

##### 4.4.1. Rekombinante Herstellung prokaryotischer Laccasen

Ziel der Arbeiten des Verbundpartners BRAIN war die Identifizierung, Klonierung und Expression von Laccasen prokaryotischen Ursprungs. Den Auflagen der Gutachter entsprechend wurde dabei auf ein Screening nach neuen Laccasen in Metagenom-Banken verzichtet, um den Schwerpunkt des Projektes nicht auf die Verfügbarkeit einer Vielzahl von Laccasen zu setzen, sondern um mit wenigen vorliegenden Enzymen die Prozessentwicklung voranzutreiben. Die Arbeiten wurden auf folgende drei bakterielle Laccasen fokussiert: CotA aus *Bacillus subtilis*, SLAC (Small LACCase) aus *Streptomyces coelicolor* und YifH aus *E. coli*.

##### 4.4.2. Klonierung und Expression von cotA in *E. coli* und *B. subtilis*

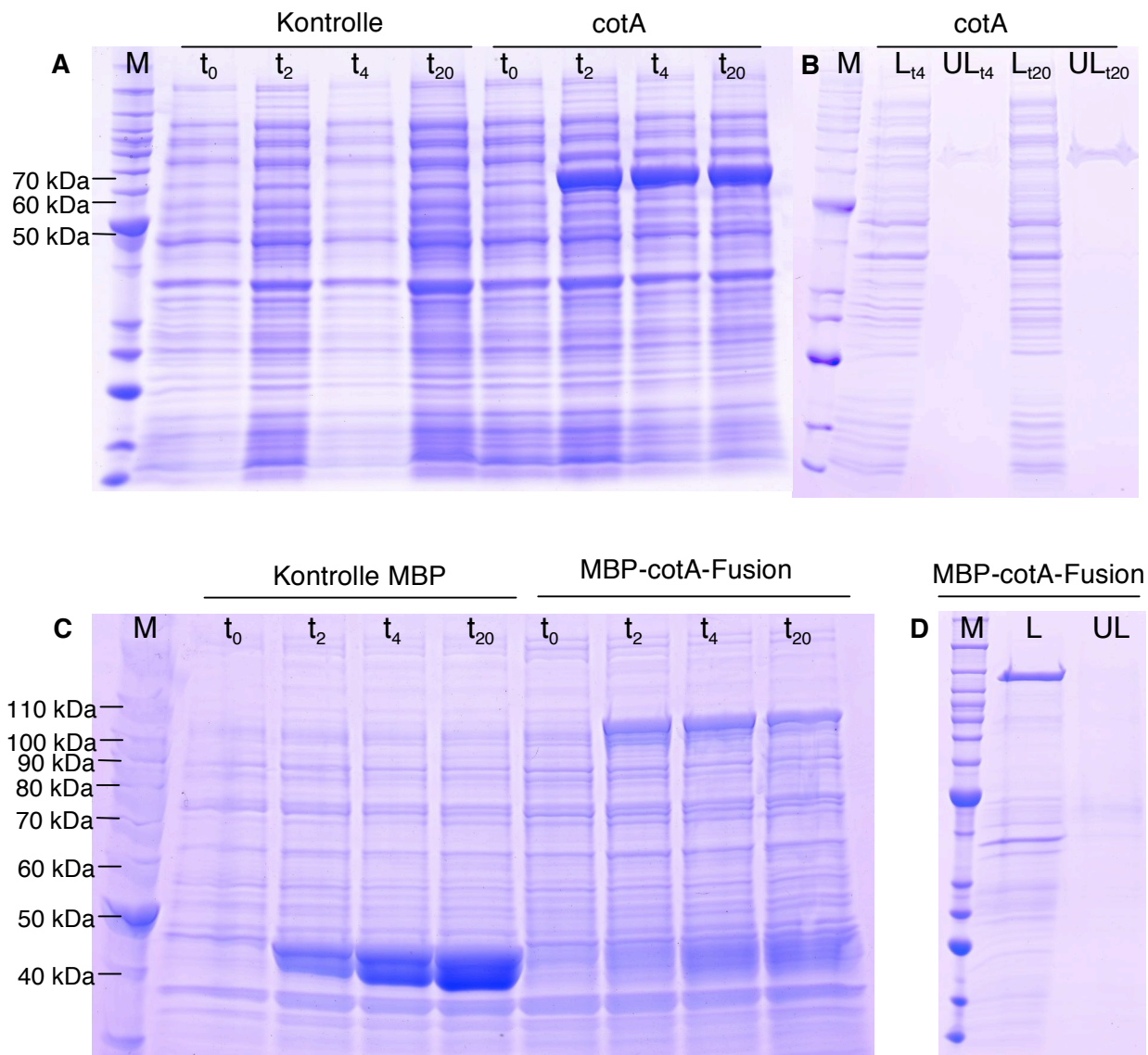
CotA ist ein ca. 65 kDa großes Protein, das die typischen Primärstrukturelemente einer Cu<sup>2+</sup>-abhängigen Laccase aufweist und auch bezüglich seines pH-Optimums (< 3.0 (ABTS)) den zahlreichen pilzlichen Laccasen entspricht. Dieses Protein ist zuvor bereits in *E. coli* unter Verwendung eines T7-RNA-Polymerase-basierten Expressionssystems dargestellt worden<sup>6</sup>. Die dabei gefundene hohe Unlöslichkeit (> 90%) war Anlass, das Protein neben der natürlichen Form als Fusionsprotein mit verschiedenen Löslichkeit-vermittelnden Fusionspartnern darzustellen.

Dazu wurde das Gen *cotA* aus *B. subtilis* (DSM 4393) amplifiziert und sequenziert. Die abgeleitete Proteinsequenz wies deutliche Abweichungen (93% Identität) zu der in Proteindatenbanken abgelegten Sequenz auf (Daten nicht gezeigt). Da aber eine Sporensuspension dieses *B. subtilis*-Stamms Laccase-Aktivität zeigte, deutete dies auf das Vorhandensein eines funktionellen Laccase-Gens hin und weitere Arbeiten wurden mit diesem Gen durchgeführt.

Mittels eines T7-basierten Expressionssystems konnte das Protein sowohl unmodifiziert als auch als Fusionsprotein mit verschiedenen Fusionspartnern deutlich überexprimiert werden (Abb. 11A und B). Die hohe Unlöslichkeit des Proteins bei Expression in *E. coli* konnte bestätigt werden (Abb. 11B). Durch Fusion mit verschiedenen Löslichkeit-vermittelnden Fusionspartnern, insbesondere dem Maltose-Bindeproteine (MBP) aus *E. coli*, konnte die Löslichkeit deutlich erhöht werden (Abb. 11D.)

---

<sup>6</sup> Martins LO, Soares CM, Pereira MM, Teixeira M, Costa T, Jones GH, Henriques AO; J. Biol. Chem., 2002, 277, 18849-18859



**Abb. 11: SDS-PAGE-Analyse der Expression von *cotA* in der unmodifizierten Form (A) und in Fusion mit dem Maltose-Bindeprotein (C) in *E. coli*.**

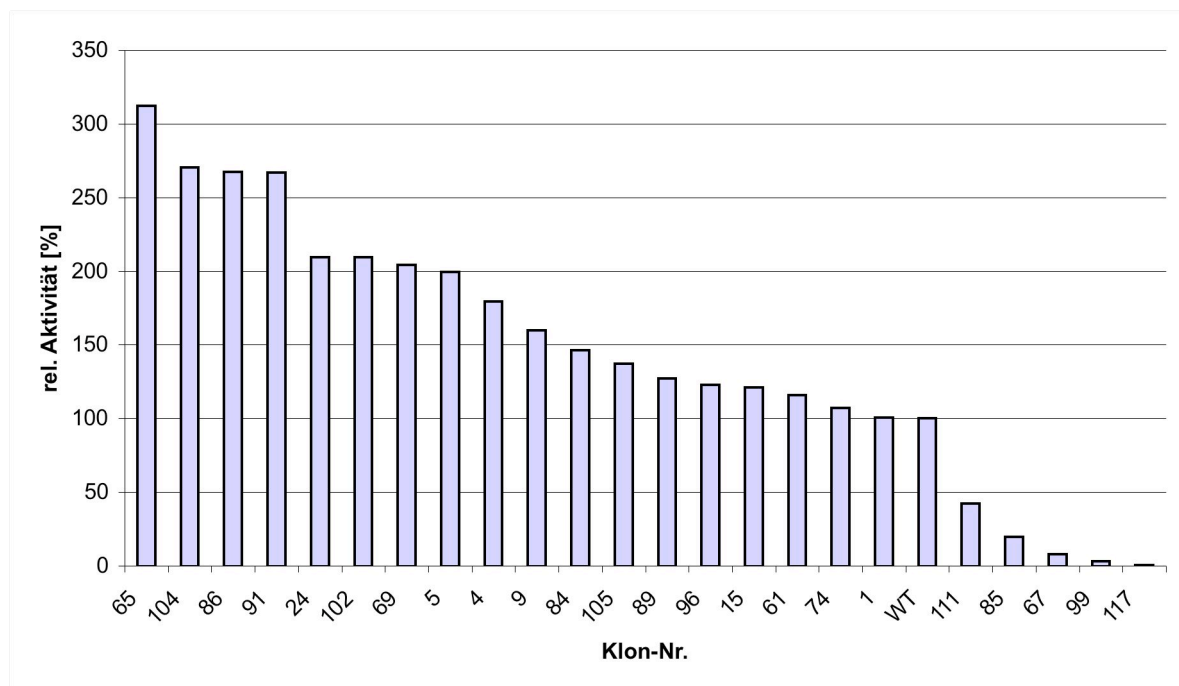
*E. coli* Tuner (DE3)-Zellen wurden mit den entsprechenden Expressionskonstrukten bzw. Leervektoren (Kontrolle) transformiert und im Schüttelkolben-Maßstab bei 28°C kultiviert. Die Expression wurde durch Zugabe von IPTG zum Zeitpunkt t<sub>0</sub> induziert und nach 2h, 4h bzw. 20 h mittels SDS-PAGE analysiert. Die berechnete Größe der Proteine beträgt 58,3 kDa (CotA) und 101.3 kDa (MBP-CotA). Die Löslichkeit der Proteine wurde in Abbildung B (CotA) bzw. D (MBP-CotA) untersucht. L: Lösliche Fraktion, UL: unlösliche Fraktion.

Zwar konnte für Ganzzelleextrakte von Zellen mit dem Expressionskonstrukt reproduzierbar eine Laccase-Aktivität gegen ABTS dokumentiert werden, doch entsprach die geringe, bei 45°C bestimmte Aktivität von ca. 3 nmol min<sup>-1</sup> × OD<sub>580</sub> nicht der starken Zunahme der löslichen Proteinmenge. Bei der optimalen Temperatur von 80°C steigt die Aktivität etwa um den Faktor 5.

Ein Fermentationsprozess wurde etabliert, welcher zu einer Steigerung der auf die Zelldichte normierten Aktivität um den Faktor 10 führte. Durch Aufkonzentrierung solcher Präparate konnte den Verbundpartnern Enzymproben mit etwa 0,13 U mL<sup>-1</sup> (45°C) für weitere

Untersuchungen zur Verfügung gestellt werden. Bei Untersuchungen zur Lagerform solcher Enzymproben erwies sich eine Glycerin-stabilisierte Probe (50%) am geeignetsten für weitere Untersuchungen (ohne Abbildung).

Die cytoplasmatische Expression von CotA in *B. subtilis* lieferte etwa die gleiche Aktivitätsausbeute, wobei allerdings keine Überexpression festzustellen war (ohne Abbildung). Eine zufällige Mutagenese zur Optimierung der Ribosom-Bindestelle führte zur Identifizierung von Klonen mit verstärkter Hofbildung in einem ABTS-Agarplatten-Test. Solche Klone zeigten auch nach Kultivierung im Flüssigmedium eine verstärkte Aktivität. Auf diese Weise konnten Varianten mit einer bis zu dreifach höheren Aktivitätsausbeute erzeugt werden (Abb. 12).



**Abb. 12: Relative Aktivität von Expressionsklonen mit veränderter Ribosomen-Bindestelle.**  
Die Aktivität ist bezogen auf die Aktivität des nicht-veränderten Ausgangskonstruktes (WT).

Des Weiteren werden Konstrukte zur Fusion von cotA mit verschiedenen Signalsequenzen erstellt, um die Option einer sekretierten Darstellung von CotA in *B. subtilis* zu überprüfen. In keinem Fall konnte extrazellulär lokalisierte Laccase entweder über einen Protein-Nachweis noch über die Aktivität identifiziert werden. Möglicherweise verhindert die natürliche Lokalisation des Enzyms in Sporen und die damit verbundenen Faltungskinetik die Erhaltung einer Translokations-kompetenten Konformation, so dass ein Export über die Cytoplasmamembran nicht mehr möglich ist.

Weitere Versuche zur Optimierung der Expressionsausbeute deuteten auf einen Wachstums-inhibierenden Effekt bei stärkerer Expression der Laccase. Ähnliche Phänomene traten bereits bei der Expression in *E. coli* auf. Hier konnte bei Erhöhung der Proteinmenge keine Aktivitätszunahme festgestellt werden. Möglicherweise tolerieren die Zellen (*E. coli* und *B. subtilis*) nur ein bestimmtes Maß an Laccase-Aktivität im Cytoplasma. Das Überschreiten dieses Maßes erzeugt einen so hohen Selektionsdruck, dass die Zellen

nicht mehr wachsen können. Entsprechend würden schon bei der Transformation nur solche Klone selektiert, die die Expression begrenzen konnten. Aus diesen Überlegungen wurden weitere Versuche zur Optimierung der cytoplasmatischen Expression eingestellt und der Schwerpunkt der Arbeit auf die extracytoplasmatische Darstellung der Laccasen gelegt (siehe unten).

#### 4.4.3. Klonierung und Expression von SLAC in *E. coli*

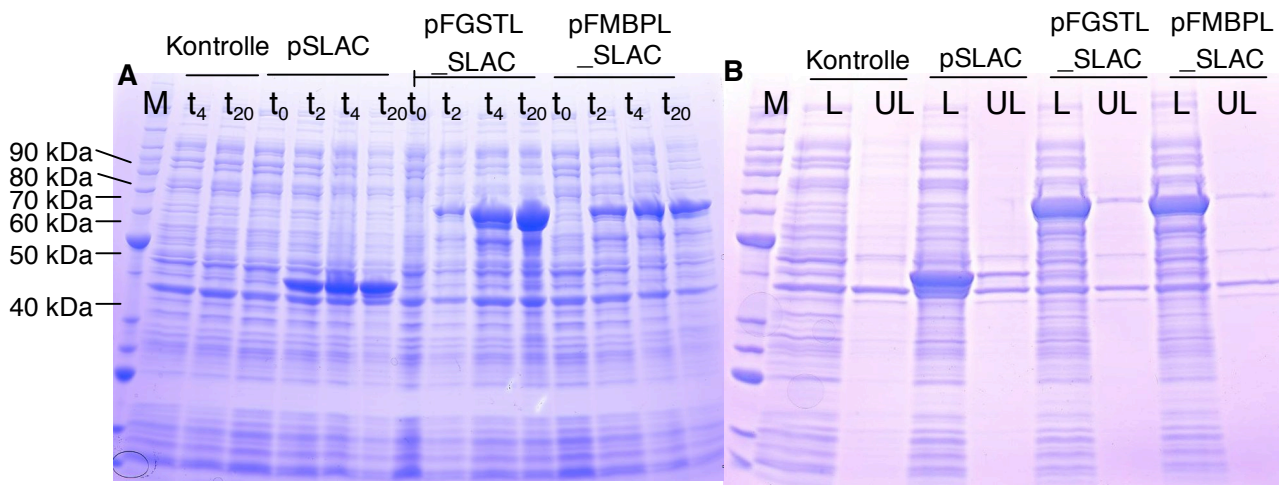
Die Laccase aus *Streptomyces coelicolor* ist durch das Fehlen einer der drei üblichen Cuprdoxindomänen charakterisiert, was zu einer geringen Größe von nur 36,8 kDa führt und ihr den Namen „kleine Laccase“ eingebracht hat. Des Weiteren zeichnet sie sich durch eine hohe Stabilität und durch ein ungewöhnliches pH-Optimum im alkalischen Bereich (pH 9,4) aus<sup>7</sup>.

Da das Protein natürlicherweise eine TAT-abhängige Signalsequenz aufweist, wurde für die Expression zunächst sowohl die natürliche Signalsequenz als auch die *E. coli* eigene TAT-abhängige TorA-Signalsequenz für den Export verwendet. Unter diesen Bedingungen war eine Überexpression allerdings nicht nachweisbar (ohne Abbildung).

Eine cytoplasmatische Expression ohne Signalsequenz bzw. als Fusion mit vier verschiedenen Löslichkeit-vermittelnden Proteinen führte zu deutlichen Überexpressionen von löslichem Protein, wie beispielhaft in Abb. 13 für die Fusionen mit GST and MBP gezeigt. Allerdings konnte auch für SLAC keine der Zunahme der Proteinmenge entsprechende Steigerung der Aktivität gefunden werden. Mit maximal 4 nmol/min x OD<sub>580</sub> für das Fusionsprotein mit SUMO war die Aktivität gegen 2,6-Dimethoxyphenol (DMP) ebenfalls sehr gering. Die Variation der während der Fermentation vorhandenen Cu<sup>2+</sup>-Konzentration zwischen 0 und 1 mM hatte nur einen marginalen Effekt auf die Aktivitätsausbeute. Die Zugabe von Kupferionen nach der Fermentation hat ebenfalls nur einen geringen Aktivitätssteigernden Effekt.

---

<sup>7</sup> Machczynski MC, Vijgenboom E, Sammy B, Canters GW; Protein Sci., 2004, 13(9) 2388-97



**Abb. 13: SDS-PAGE-Analyse der cytoplasmatischen Expression von SLAC in der unmodifizierten Form und als Fusion mit verschiedenen GST bzw. MBP in *E. coli*.**

*E. coli* Tuner (DE3)-Zellen wurden mit den entsprechenden Expressionskonstrukten bzw. Leervektoren (Kontrolle) transformiert und im Schüttelkolben-Maßstab bei 28°C kultiviert. Die Expression wurde durch Zugabe von IPTG zum Zeitpunkt t<sub>0</sub> induziert und nach 2h, 4h bzw. 20 h mittels SDS-PAGE analysiert. Die berechnete Größe der Proteine beträgt 36,83 kDa (pSLAC), 61,8 kDa (pFGSTL\_SLAC bzw. 77,0 kDa (pFMBPL\_SLAC). Die Löslichkeit der Proteine wurde in Abbildung B (CotA) bzw. D (MBP-CotA) untersucht. L: Lösliche Fraktion, UL: unlösliche Fraktion.

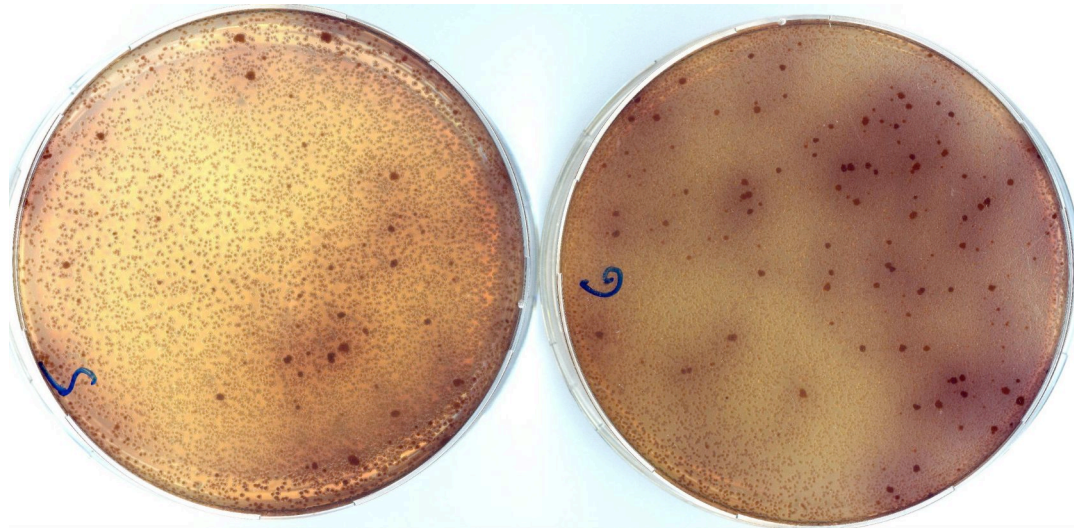
Um zu überprüfen, ob die Fusion mit einem weiteren Protein die Dimerisierung des Enzyms behindert, wurde eine Coexpression mit einer spezifischen Protease durchgeführt, für die eine zugehörige Erkennungssequenz zwischen dem Fusionspartner und SLAC integriert worden war. Unter nicht optimierten Bedingungen konnte eine etwa 30%ige Prozessierung des Fusionsproteins erzielt werden, die auch zu löslichem SLAC führte (ohne Abbildung). Die Aktivität gegen DMP blieb davon unbeeinflusst, jedoch nahm die Aktivität gegen Syringaldazin, einem alternativen Laccase-Substrat, um den Faktor 2,5 zu, was darauf hindeutet, dass die Fusion mit anderen Proteinen nachteilig sein könnte. Andererseits war die Expression mit dem unfusionierten Protein aus bisher unbekanntem Gründen nicht stabil, so dass für weitere Untersuchungen auf das mit SUMO fusionierte SLAC zurückgegriffen wurde.

Aus Fermentationen im 1,5 L Maßstab konnten Enzymproben gewonnen werden, die eine Aktivität von etwa 0,9 nmol mL<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> auswiesen und den Projektpartnern für weitergehende Charakterisierungen zur Verfügung gestellt wurden.

Um die Hypothese zu überprüfen, dass die Laccase-Expression einen negativen Effekt auf die Zellen hat, wurden zwei ansonsten identisch behandelte Kulturen nach 16 h im Rührkessel durch Variation der Rührerdrehzahl unterschiedlich belüftet. Die Erwartung einer verminderten Wachstumsrate, aber einer vermutlich aufgrund der erniedrigten Sauerstoffkonzentration (Laccase-Substrat) erhöhten Laccase-Aktivität konnte bestätigt werden. Dies untermauert die Hypothese, dass die Zelle nur ein bestimmtes Maß an Laccase-Aktivität im Cytoplasma tolerieren kann. Wird der Selektionsdruck durch Verminderung der Substratkonzentration (O<sub>2</sub>) erniedrigt, so kann die Zelle auch mehr Laccase-Protein

produzieren, welches anschließend im Aktivitäts-Assay (unter optimalen Sauerstoff-Konzentrationen) zu einer höheren Aktivität führt.

Durch Coexpression einer Genbank aus *E. coli* sollten Faktoren identifiziert werden, die möglicherweise den durch die Laccase-Expression erzeugten Selektionsdruck erniedrigen können und somit zu einer erhöhten Laccase-Produktion führen. Dazu wurden die Transformationsklone auf ABTS-Agarplatten ausgebracht. Klone mit erhöhter Laccase-Aktivität fielen durch eine tief rote Farbe auf (Abb. 14). Die anschließende Untersuchung der Laccase-Aktivität einzelner Klone nach Flüssigkultivierung zeigte nur vereinzelt einen geringen positiven Effekt. Aus diesem Grunde wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.



**Abb. 14: Identifizierung von Laccase-Aktivität-steigernden Faktoren durch Coexpression einer Genbank aus *E. coli*.**

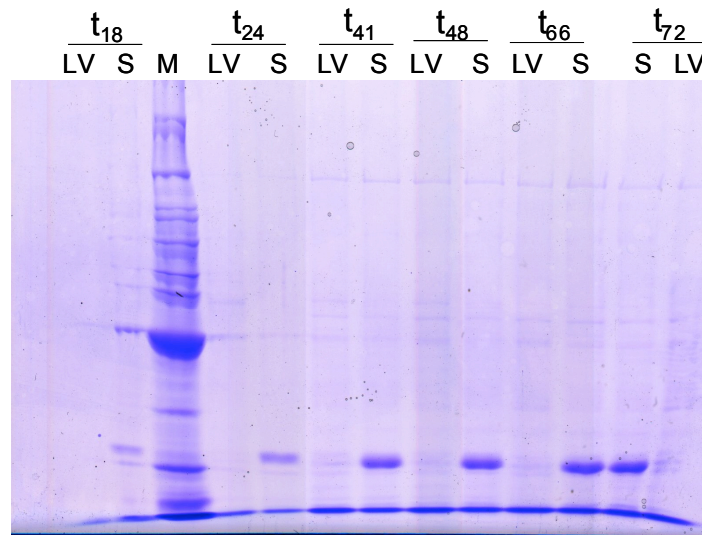
Dargestellt sind Transformationsplatten, die das Laccase-Substrat ABTS enthalten. Klone mit erhöhter Laccase-Aktivität fielen durch eine tief rote Färbung der Kolonien auf.

Durch Aufarbeitung eines Zellsediments aus einer 10 L Fermentation mittels Anionenaustauschchromatographie und Ultrafiltration konnte den Projektpartnern eine Enzymprobe mit einer Aktivität von ca.  $5 \text{ U mL}^{-1}$  übergeben und somit eine weitergehende Charakterisierung des Enzyms ermöglicht werden.

#### 4.4.4. Klonierung und Expression von SLAC in *Streptomyces albus*

Da der Eindruck entstanden war, eine cytoplasmatische Darstellung von Laccasen aufgrund des angesprochenen negativen Selektionsdrucks nicht deutlich verbessern zu können, sollte am Beispiel von SLAC eine extracytoplasmatische Produktion evaluiert werden. Als Expressionswirt wurde *Streptomyces albus* ausgewählt, da dieser Stamm leicht zu transformieren ist und aufgrund der verwandtschaftlichen Nähe zum Ursprungstamm dieser Laccase (*S. coelicolor*) die für die Sekretion des Enzyms notwendigen Faktoren bereitstellen könnte. Das Gen für die reife Laccase wurde mit der nativen TAT-abhängigen Signalsequenz fusioniert und unter die Kontrolle des konstitutiven ermE-Promotors aus *Saccharopolyspora erythraea* in zwei verschiedenen Vektoren gestellt, die sich in der RBS unterschieden. Unter

Verwendung beider Konstrukte ist es gelungen, die Laccase mit einer Ausbeute von ca. 20 mg L<sup>-1</sup> ins Kulturmedium zu sekretieren (Abb. 15). Bei einer Aktivität von 8 U L<sup>-1</sup> ergibt sich näherungsweise eine spezifische Aktivität von etwa 0,4 U mg<sup>-1</sup>. Die Variation der Kupfer-Konzentration hatte dabei keinen großen Einfluss auf die Ausbeute. Damit konnte ein Expressionssystem für die Laccase etabliert werden, welches die nachfolgende Aufarbeitung des Enzyms durch die Lokalisation im Kulturüberstand deutlich erleichterte.



**Abb. 15: SDS-PAGE-Analyse der Kulturüberstände von *S. albus* pTaph\_SLAC sowie der Leervektorkontrolle.**

20 µl Kulturüberstand, die zu dem angegebenen Zeitpunkten der Kultur entnommen wurden, wurden denaturiert und auf ein 4–20% Acrylamid-Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden Proteine mit Coomassie gefärbt. S: SLAC, LV: Leervektor-Kontrolle.

Entsprechende Ergebnisse wurden auch für die extracytoplasmatische Expression von SLAC in *Corynebacterium glutamicum* erzielt.

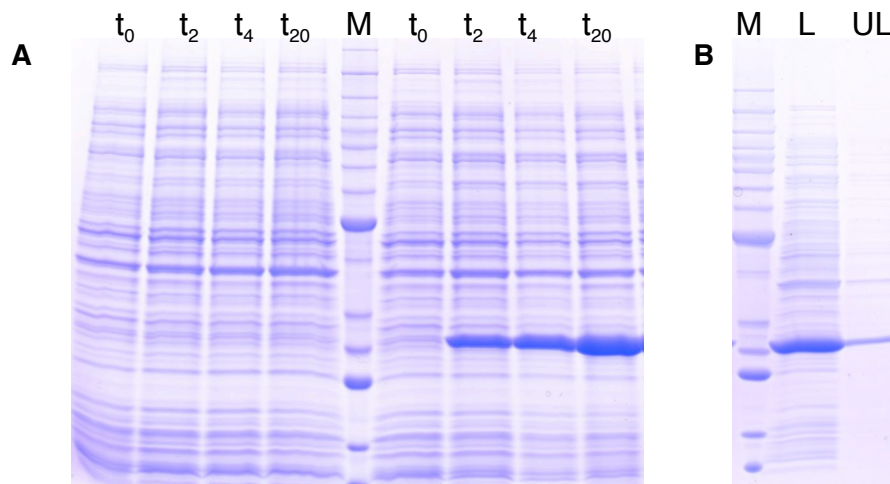
#### 4.4.5. Klonierung und Expression von YifH in *E. coli*

YifH ist ein Vertreter einer neuen Laccase-Familie, die erst durch ein Metagenom-Screening identifiziert worden war. Die Vertreter dieser Familie enthalten nicht die typischen Primärstrukturelemente und sind deutlich kleiner als andere Laccasen<sup>8</sup>. YifH zeigt eine Größe von ca. 26,3 kDa und auch für dieses Enzym liegt das pH-Optimum im alkalischen Bereich.

Nach Amplifikation des Gens aus *E. coli* BL21 wies die abgeleitete Protein-Sequenz 6 Mutationen gegenüber der Sequenz des als aktiv beschriebenen Proteins auf. Die Mutationen waren nicht auf PCR-bedingte Fehler zurückzuführen. Nach Expression dieses Gens in *E. coli* konnte keine Aktivität bestimmt werden. Deshalb wurde das Gen erneut aus *E. coli* MG1655 amplifiziert und die abgeleitete Proteinsequenz war identisch zu der Sequenz

<sup>8</sup> Beloqui A, Pita M, Polaina J, Martínez-Arias A, Golyshina OV, Zumárraga M, Yakimov MM, García-Arellano H, Alcalde M, Fernández VM, Elborough K, Andreu JM, Ballesteros A, Plou FJ, Timmis KN, Ferrer M, Golyshin PN; J. Biol. Chem., 2006, 281, 22933-22942

des als funktionell beschriebenen Proteins. Dieses Gen wurde wiederum für die Erstellung von Expressionskonstrukten sowohl ohne Fusionspartner als auch in Fusion mit verschiedenen Löslichkeit-vermittelnden Proteinen genutzt. In allen Fällen konnte eine starke Überexpression sowie eine weitgehende Löslichkeit des Proteins gefunden werden, wie in Abb. 16 beispielhaft für das unfusionierte Protein dargestellt. Auch für dieses Enzym konnte nur eine sehr geringe Aktivität von ca.,  $25 \text{ nmol min}^{-1} \times \text{OD}_{580}$  bestimmt werden.



**Abb. 16: SDS-PAGE-Analyse der cytoplasmatischen Expression von YifH in *E. coli* (A) sowie zur Löslichkeitsuntersuchung (B).**

*E. coli* Tuner (DE3)-Zellen wurden mit dem Expressionskonstrukt pET26\_yifH bzw. dem Leervektor (Kontrolle) transformiert und im Schüttelkolben-Maßstab bei 28°C kultiviert. Die Expression wurde durch Zugabe von IPTG zum Zeitpunkt  $t_0$  induziert und nach 2h, 4h bzw. 20 h mittels SDS-PAGE analysiert. Die berechnete Größe von YifH beträgt 26,3, kDa. L: Lösliche Fraktion, UL: unlösliche Fraktion.

Eine Fermentation von Zellen mit dem Expressionskonstrukt zur Darstellung von yifH im 10 L Maßstab konnte bisher noch nicht erfolgreich durchgeführt werden. Weitere Versuche sind nötig, um die Ursache für dieses Ergebnis zu identifizieren. Möglicherweise erzeugt insbesondere das Genprodukt YifH in der Zelle Stress, sodass ein Selektionsdruck auf die Unterdrückung der Expression besteht. Entsprechende Hinweise auf eine Wachstum-inhibierende Wirkung der Expression von YifH stammen auch von Agarplatten-Versuchen. Hier sinkt die Zahl der Kolonie-bildenden Einheiten nach Transformation von Zellen mit dem Expressionskonstrukt in Abhängigkeit von der Konzentration des Induktors im Agar. Der Versuch, das natürlicherweise cytoplasmatisch lokalisierte Protein YifH in *C. glutamicum* extracytoplasmatisch darzustellen, war nicht erfolgreich.

Durch die Übergabe von Enzymproben prokaryotischer Laccasen an die Projektpartner konnte das Projektziel, diese Enzyme in eine Charakterisierung von Laccasen bezüglich der biotransformatorischen Eigenschaften zu integrieren, erreicht werden.

#### 4.5. SIAL

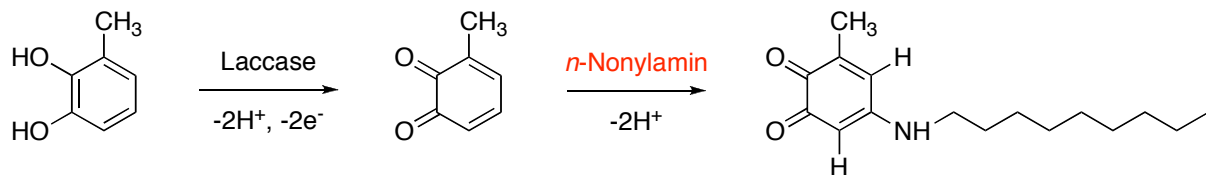
Die Identifizierung interessanter und nicht zu letzt marktrelevanter Kopplungsprodukte erfolgte hauptsächlich durch den Projektpartner SIAL. Zudem wurde das Vorhaben durch zahlreiche Diskussionen in Form von Telefonkonferenzen, angeregt und organisiert von Herrn Dr. Wohlgemuth, unterstützt und vorangetrieben (siehe Kapitel 8).

Weitere Unterstützung erhielt z.B. der Projektpartner UG-Mibi durch die kostenlose Bereitstellung der sehr teuren Chemikalie 2-Methoxy-3-methyl-1,4-benzendiol aus dem Angebot von Sigma-Aldrich. Zudem wurden bei SIAL die Kopplungsprodukte der Modellreaktion II aus Laccase-katalysierten und Natriumiodat-katalysierten Reaktionen der UR-TC aufgearbeitet. Durch diesen zweiten Reinigungsschritt (Kristallisation) konnten Produktreinheiten > 95% erreicht werden. Dies führte allerdings zu hohen Verlusten. Bei UR-TC konnte durch NMR-Messungen festgestellt werden, dass im Rohprodukt nur 10-30% Verunreinigungen zu finden waren. Durch die Kristallisation bei SIAL bleiben jedoch nur ca. 11% Reinprodukt, was einem Verlust von etwa 50% entspricht übrig. Diese Daten wurden wiederum für die Erstellung der Ökoeffizienzanalyse zu Verfügung gestellt. Weiterhin wurden Daten zur Gewinnung der Laccase aus *Myceliophthora thermophila*, welche in der Modellreaktion eingesetzt wurde, an die BASF AG für die Ökoeffizienzanalyse übermittelt.

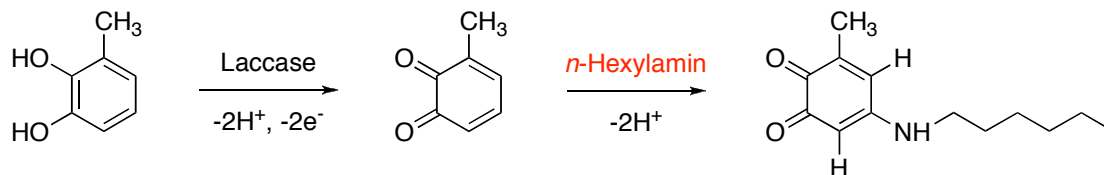
## 5. Ökoeffizienzanalyse

Die Projektpartner haben sich für die Ökoeffizienzanalyse zunächst auf eine Modellreaktion (Modellreaktion I) geeinigt: Laccase-vermittelte heteromolekulare Kopplung von 3-Methylbrenzkatechin mit *n*-Nonylamin zur Gewinnung eines sekundären Amins (siehe Abb. 17). Die Ökoeffizienzanalyse wurde im Juli 2008 bei der BASF in Auftrag gegeben. Allerdings erwies sich diese Reaktion in der weiteren Projektlaufzeit als schwierig, sodass auf eine andere Reaktion (Modellreaktion II) zurückgegriffen wurde. Dabei wurde als Kopplungspartner das aliphatische Amin *n*-Hexylamin aufgrund seiner wesentlich besseren Löslichkeit eingesetzt. Für die biokatalytische Reaktion wurde die kommerziell erhältliche Laccase aus *Myceliophthora thermophila* eingesetzt. Als Vergleich diente die Natriumiodat-katalysierte Reaktion.

Modellreaktion I



Modellreaktion II



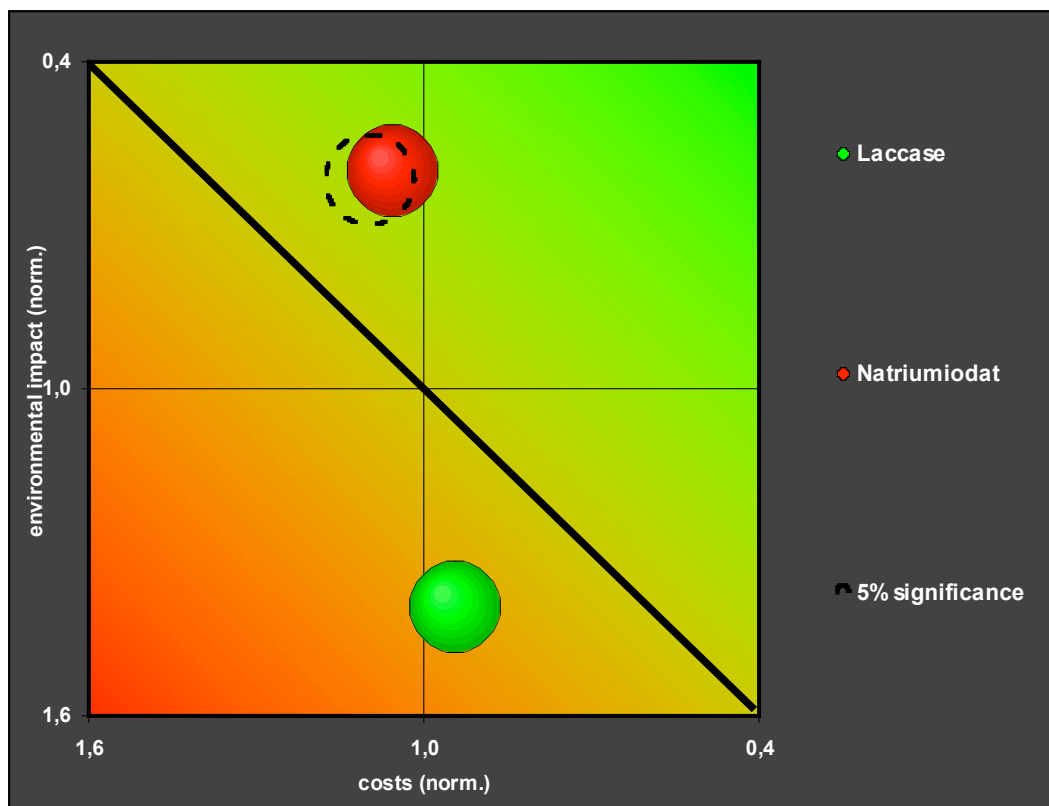
**Abb. 17: Modellreaktionen für die Ökoeffizienzanalyse.**

In den Abschnitten 4.1.5 und 4.2.3 sind die Versuche für die Datenevaluierung ausführlich beschrieben. Diese wurde in enger Absprache in einer Vielzahl von Telefonkonferenzen mit allen Projektpartnern und Frau Achatz (BASF AG) angefertigt und anschließend an die BASF AG übersandt. Die vorläufige Fertigstellung und die Zusendung der Ökoeffizienzanalyse durch die BASF AG erfolgten am 23.09.2009 und wurden in einer abschließenden Telefonkonferenz am 30.09.2009 besprochen. Der Übersendung des endgültigen Berichtes erfolgte am 05.10.2009 und ist komplett im Anhang dargestellt.

### Ergebnis

Die vorliegende Ökoeffizienzanalyse sagt aus, dass im Basisfall (Chemikalien kosten 1/10 des Preises für den Labormaßstab), bei dem die Ökologieseite dreimal so stark gewichtet ist wie die Ökonomieseite, das Natriumiodat-katalysierte Herstellungsverfahren der ökoeffizientere Prozess ist (siehe Abb. 18). Gründe für das „schlechtere Abschneiden“ der Biokatalyse sind vor allem in der Aufarbeitung und der damit verbundenen Lösungsmittelmenge zu suchen. Aus Zeit- und Personalgründen war es im Projekt leider

nicht mehr möglich die Aufarbeitung und damit die Ökoeffizienz dieser Reaktion zu verbessern.



**Abb. 18: Graphische Darstellung des Endergebnisses der Ökoeffizienzanalyse.**

Die Ökoeffizienzanalyse bietet zudem verschiedene Szenarien, bei denen beide Prozesse gleich bzw. der Laccase-katalysierte Prozess ökoeffizienter bewertet werden. Im Szenario 1.2 wird davon ausgegangen, dass die Ausbeute im Laccase-katalysierten Prozess von 8% auf 11% gesteigert werden kann und dadurch beide Verfahren als gleichwertig einzustufen sind. Allerdings ist das Natriumiodat-Verfahren immer noch als ökologisch günstiger zu bewerten. Der Laccase-Prozess ist allerdings ökonomischer, was besonders im Szenario 2.1, indem davon ausgegangen wird, dass die Chemikalienpreise für die Tonnen-Herstellung den des Labormaßstabes gleichen, deutlich wird. In diesem Falle wird das etwas günstigere Laccase-Verfahren trotz ökologischer Nachteile als ökoeffizienter eingestuft.

Würde man erreichen, dass im Laccase-Prozess gleiche Endkonzentrationen an Produkt wie im Natriumiodat-Verfahren vorliegen, würde der Lösungsmittelbedarf gleich sein. Beide Verfahren würden wie im Szenario 3.2 dargestellt annähernd gleich ökoeffizient sein. Ein Unterschied würde lediglich noch beim Flächenbedarf im „Ökologischen Fingerabdruck“ erkennbar sein, da für die Laccase-Herstellung das landwirtschaftlich erzeugte Produkt Glucose verwendet wird.

### Betrachtung durch die Projektpartner

Die Ökoeffizienzanalyse wird von den Projektpartnern aus folgenden Gründen eher kritisch bewertet bzw. betrachtet.

- Es stellte sich mehrfach die Frage, wie sinnvoll es ist, eine solche Analyse zum Beginn eines relativ kurzen Projektes zu stellen. Zu Anfang lagen noch keine geeigneten rekombinanten Laccasen für den angestrebten Prozess vor. Sämtliche Vorversuche für die Machbarkeit mit den angestrebten Substraten mussten zunächst geleistet werden. Nachdem diese Versuche durchgeführt wurden, bestand zeitlich nicht mehr die Möglichkeit die biokatalytische Synthese bei UR-TC zu optimieren.
- Im vorliegenden Fall wurden die Daten generiert, die von einem Gramm-Maßstab quasi nur mittels Dreisatz auf einen Tonnen-Maßstab hochgerechnet wurden; dies ist als überaus fehlerbehaftet zu betrachten.
- In der Analyse wird die hohe Selektivität des Laccase-Prozesses im Vergleich zum Natriumiodat-katalysierten Prozess, bei dem viele Nebenprodukte auftreten, nicht berücksichtigt. Allein aus diesem Grund, würden die Projektpartner den Laccase-Prozess dem chemischen Verfahren vorziehen. Leider ging nur die Endausbeute nach dem zweiten Reinigungsschritt bei SIAL in die Berechnung ein, wodurch enorme Verluste zu verzeichnen waren und die Selektivitätsgewinne nicht ins Gewicht fielen.
- Erst während des Projektes wurde realisiert, dass die Modellreaktion zu realitätsfern für ein industrielles Verfahren ist, und daher auch ohne Ökoeffizienzanalyse von einer Anwendung abgesehen worden wäre.
- Es ist besonders darauf hinzuweisen, dass die Modellreaktion einen Kompromiss darstellte. Sie wurde in einer frühen Phase des Projektes gewählt, in der noch keine Daten für die rekombinante Herstellung der Laccasen vorlagen. Daher wurde für die Umsetzung die kommerziell erhältliche Laccase aus *Myceliophthora thermophila* verwendet. Die Daten für die Laccase-Herstellung wurden durch Herrn Dr. Wohlgemuth vom Projektpartner SIAL bereitgestellt.
- Die Modellreaktion wurde so gewählt, dass eine chemische Vergleichsreaktion vorliegt. Für das vorliegende Ziel (heteromolekulare Kopplung zur Synthese eines Amins) existieren keine Beispiele für chemische Synthesen. Eine Möglichkeit dieses unter Zuhilfenahme eines chemischen Katalysators zu realisieren, ist der Einsatz von Natriumiodat. Dies gilt aber nicht für alle möglichen Kopplungspartner und Laccase-Substrate.

## 6. Kooperationen im Rahmen des Projektes

bis August 2008 siehe Zwischenbericht

Projektmeeting, im Rahmen des Statusseminars der zweiten Antragsrunde im Verbund ChemBioTec

Ort: Steigenberger Hotel Dortmund bzw. Universität Dortmund

Datum: 16. und 17.09.2008

Teilnehmer: UG-Biotech: Prof. Dr. Bornscheuer, Dr. Schmidt; UG-Mibi: Frau Herter; UR-TC: Prof. Dr. Kragl, Dr. Hameister, Frau Illner, Frau Bathke; BRAIN: Dr. Klaus Liebeton; SIAL: Dr. Wohlgemuth

Inhalte: Präsentation der Teilprojekte anhand des Vortrages am Vorabend des Seminars, Festlegung der weiteren Ziele insbesondere unter Berücksichtigung der Zielverbindungen für die Ökoeffizienzanalyse

Telefonkonferenz

Datum: 10.12.2008

Teilnehmer: UG-Biotech: Prof. Dr. Bornscheuer, Dr. Schmidt, Dr. Hilterhaus; UG-Mibi: Prof. Dr. Schauer, Frau Herter, Dr. Mikolasch; UR-TC: Prof. Dr. Kragl, Frau Illner; SIAL: Dr. Wohlgemuth; BRAIN: Dr. Liebeton

Inhalte: Diskussionen und Ergebnisvorstellung zum Unterauftrag Ökoeffizienzanalyse

Projekt-Austausch

Fermentation im 10 Liter Maßstab

UG-Biotech (Dr. Schmidt) bei BRAIN in Zwingenberg

Zeitraum: 08.12.2008 bis 12.12.2008

Telefonkonferenz

Datum: 15.12.2008

Teilnehmer: UG-Biotech: Prof. Dr. Bornscheuer, Dr. Schmidt; UG-Mibi: Frau Herter, Dr. Mikolasch; UR-TC: Dr. Hameister, Frau Illner; SIAL: Dr. Wohlgemuth; BRAIN: Dr. Liebeton; BASF: Frau Achatz; ChemBioTec: Dr. Eiden

Inhalte: Verständigung auf wesentliche Inhalte des Vertrages / Diskussion zur Ökoeffizienzanalyse

Projekttreffen

Ort: Greifswald

Datum: 06.01.2009

Teilnehmer: UG-Biotech: Prof. Dr. Bornscheuer, Dr. Schmidt; UG-Mibi: Prof. Dr. Schauer, Frau Herter, Dr. Mikolasch; UR-TC: Prof. Dr. Kragl, Dr. Hameister, Frau Illner, Frau Bathke

Inhalte: Maßstabsvergrößerung, Ökoeffizienzanalyse, Diskussion der Probleme des praktischen Arbeitens, Abwandlung der Modellreaktion, Diskussion über die

---

Bewertung des Statusberichtes von Seiten der Gutachter, Erstellung eines Arbeitsplanes für die weitere Projektlaufzeit

#### Telefonkonferenz

Datum: 26.01.2009

Teilnehmer: UG-Biotech: Prof. Dr. Bornscheuer, Dr. Schmidt; UG-Mibi: Prof. Dr. Schauer, Frau Herter, Dr. Mikolasch; UR-TC: Prof. Dr. Kragl, Frau Illner; SIAL: Dr. Wohlgemuth; BRAIN: Dr. Liebeton

Inhalte: Vorstellung der Ergebnisse von UR-TC in Bezug auf die modifizierte Modellreaktion, Diskussion der wesentlichen Schwerpunkte der anstehenden Telefonkonferenz mit Frau Achatz

#### Telefonkonferenz

Datum 30.01.2009

Teilnehmer: UG-Biotech: Prof. Dr. Bornscheuer, Dr. Schmidt; UG-Mibi: Frau Herter, Dr. Mikolasch; UR-TC: Prof. Dr. Kragl, Frau Illner; SIAL: Dr. Wohlgemuth; BASF: Frau Achatz

Inhalte: Ökoeffizienzanalyse

#### Telefonkonferenz

Datum: 02.03.2009

Teilnehmer: UG-Biotech: Prof. Dr. Bornscheuer, Dr. Schmidt; UG-Mibi: Frau Herter  
UR-TC: Dr. Hameister, Frau Illner; SIAL: Dr. Wohlgemuth; BASF: Frau Achatz

Inhalte: Ökoeffizienzanalyse, Präsentation der Daten der Maßstabsvergrößerung, vorgenommen durch die UR-TC, Aufgabenerfüllung Seitens SIAL

#### Telefonkonferenz

Datum: 06.04.2009

Teilnehmer: UG-Biotech: Prof. Dr. Bornscheuer, Dr. Schmidt; UG-Mibi: Frau Herter;  
UR-TC: Dr. Hameister, Frau Illner; SIAL: Dr. Wohlgemuth; BRAIN: Dr. Liebeton;  
BASF: Frau Achatz

Inhalte: Neue Ergebnisse hinsichtlich Ökoeffizienzanalyse und weitere Arbeitsinhalte der UR-TC

#### Telefonkonferenz

Datum: 17.04.2009

Teilnehmer: UG-Biotech: Dr. Schmidt; UG-Mibi: Prof. Dr. Schauer; UR-TC: Dr. Hameister, Frau Illner; SIAL: Dr. Wohlgemuth; BASF: Frau Achatz

Inhalte: Darstellung neuer Ergebnisse seitens UR-TC für die Fertigstellung der Ökoeffizienzanalyse, Terminerstellung für Bereitstellung fehlender Daten

**Telefonkonferenz**

Datum: 14.07.2009

Teilnehmer: UG-Biotech: Prof. Dr. Bornscheuer, Dr. Schmidt; UG-Mibi: Frau Herter;  
UR-TC: Frau Illner; SIAL: Dr. Wohlgemuth; BASF: Frau AchatzInhalte: Terminabsprachen für Fertigstellung der Ökoeffizienzanalyse, Diskussion  
über Ausbeuten bei Produktaufarbeitung, Besprechung allgemeiner Fragen zum  
Projektende**Telefonkonferenz**

Datum: 30.09.2009

Teilnehmer: UG-Biotech: Prof. Dr. Bornscheuer, Dr. Schmidt; UG-Mibi: Frau Herter,  
Dr. Mikolasch; UR-TC: Prof. Dr. Kragl, Frau Illner; BRAIN: Dr. Liebeton; BASF: Frau  
Achatz

Inhalte: Abschlusspräsentation der Ökoeffizienzanalyse

**7. Teilnahme an Projekt-relevanten Veranstaltungen**

bis August 2008 siehe Zwischenbericht

**Modern Synthetic Methods & Chiral Europe: Reaction to Reality**

Datum: 20.05.-23.05.2008

Ort: Vilamoura (Portugal)

Teilnehmer: Prof. Dr. Kragl

Vortrag von Prof. Kragl: „Process intensification in enzyme catalysis“

**BioPerspectives2008**

Datum: 07.10.-09.10.2008

Ort: Hannover

Teilnehmer: Prof. Dr. Bornscheuer

Vortrag von Prof. Bornscheuer: „Laccases for the synthesis of fine chemicals“