



Abschlussbericht

(Stand April 2011)

DBU Förderschwerpunkt ChemBioTec



Titel des Projektes

„Entwicklung eines innovativen Produktionsverfahrens zur umweltfreundlichen Synthese der Modellverbindungen (*R*)-1-Phenylethanol und 7-Hydroxymethotrexat durch Einsatz der neuartigen Enzymklasse pilzlicher Peroxygenasen“

Aktenzeichen: AZ 13225-32

Projektpartner

Hochschule Lausitz (FH); Prof. Dr. Katrin Scheibner

Internationales Hochschulinstitut Zittau (IHI); Prof. Dr. Martin Hofrichter

JenaBios GmbH; Prof. Dr. Manfred Grün

Chiracon GmbH; Dr. Ralf Zuhse

Novozymes AS, Kopenhagen, Dänemark; Dr. Henrik Lund

LGC GmbH; Dr. Andreas Scherrmann

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung.....	1
2 Anlass und Zielsetzung.....	3
3 Ausführliche Ergebnisse und Darstellung der Methoden.....	5
Schwerpunkt: Enzymproduktion / Reinigung / Immobilisierung.....	5
Schwerpunkt: Identifizierung spezifischer Peroxygenase-Sequenzen.....	12
Schwerpunkt: Heterologe Expression der Peroxygenasen.....	13
Schwerpunkt: (<i>R</i>)-1-Phenylethanol.....	16
Schwerpunkt: 7-Hydroxymethotrexat.....	24
Schwerpunkt: 5-Hydroxypropranolol.....	25
Schwerpunkt: Ökoeffizienzanalyse.....	33
4 Diskussion.....	45
5 Kooperation innerhalb des Projektes.....	51
Artikel in referierten Fachzeitschriften, Publikationen.....	52
Patente.....	53
Präsentationen.....	53
Posterpräsentationen.....	54
6 Fazit.....	54
Quellenverzeichnis.....	55

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Verhältnis (3.Säule) zwischen Peroxygenase-Aktivität (1. Säule) und Laccase-Aktivität (2. Säule) von *A. aegerita* in einem Sojamehl-Basismedium unter Zusatz von 1 % Teeextrakt bzw. 1 % Maisspindelmehl
- Abb.2: Peroxygenaseaktivität bei Kultivierung von *Coprinellus radians* auf semisynthetischem Czepek Dox Medium mit unterschiedlichen Anteilen von Klee und Luzerne. Dargestellt sind die Veratrylalkohol oxidierenden Units gemessen in den Ansätzen mit 20 g/l Klee/Luzerne (28°C) (♦), 40 g/l Klee/Luzerne(28°C) (■), 60 g/l Klee/Luzerne (28°C)(X), 20 g/l Klee/Luzerne (30°C) (●), 40 g/l Klee/Luzerne(28°C)(▲) und 60 g/l Klee/Luzerne (30°C) (+).
- Abb. 3: Verlauf der Peroxygenaseproduktion (•) bei Schüttelkultivierung von *Marasmius rotula* in einem Komplexmedium bestehend aus 42 g l⁻¹ Glucose, 45 g l⁻¹ Pepton aus Sojamehl und 4.5 g l⁻¹ Hefeextrakt. Die Enzymaktivität wurde mit Veratrylalkohol bestimmt. Zusätzlich ist der pH-Wert-Verlauf (→) dargestellt.
- Abb.4: Chromatographische Trennung der drei AaP Hauptisofomern (I-III) durch Chromatofocusing. Dargestellt ist das Elutionsprofil bei 420nm (durchgezogene Linie), die mit Veratrylalkohol gemessenen Enzymaktivitäten (•), die Konzentration Puffer B (---) und der pH Gradient (•••)
- Abb. 5: Calcium-Alginat-Perlen nach Einschluss von *Agrocybe aegerita* Peroxygenase
- Abb. 6: Alignment mit 3 realen und 12 hypothetischen Peroxygenase Proteinsequenzen auf der Basis von mRNA (Pecyna et al. 2009)
- Abb.7: Vereinfachter phylogenetischer Baum auf der Basis von Proteinsequenzen von charakterisierten Häm-Thiolat Peroxidasen und homologen putativen Proteinen. (hypothetische Protein Sequenzen von genomischer DNA aus der Gen-Datenbank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) (Hofrichter et al. 2010)
- Abb. 8: pH Optimum für die Oxidation von Veratrylalkohol (A) durch WT392 und für die Hydroxylierung von Naphthalen (B) im Vergleich zwischen WT392 und AaP
- Abb. 9: Einfluss unterschiedlicher Konzentration von H₂O₂ auf die Hydroxylierung von Naphthalen. Ansatz: 0,01 mg WT392 Protein /ml, 2 mM Naphthalen, 0,25 oder 0,5 mM H₂O₂, 25°C. Die Zudosierung erfolgte einmalig oder durch dreimalige Zugabe über einen Zeitraum von 600 Sekunden.
- Abb. 10: Einfluss unterschiedlicher Konzentration von H₂O₂ auf die Hydroxylierung von Naphthalen im Vergleich zur AaP. Ansatz: 0,005 bis 0,05 mg WT392 Protein /ml bzw. 0,002 und 0,01 mg AaP Protein /ml, 1 mM Naphthalen, 0,25 mM H₂O₂ (WT392) oder 1 mM H₂O₂ (AaP), 25°C. Die Zudosierung von H₂O₂ erfolgte einmalig.
- Abb. 11: Einfluss der Temperatur auf die Hydroxylierung von Naphthalen.
- Abb. 12: HPLC-Chromatogramm (258 nm) der Umsetzung von Ethylbenzol zu Phenylethanol (primäres Produkt) und Acetophenon (sekundäres Produkt); Insert: UV-Spektrum (blau) eines unbekanntes Nebenprodukts (*T_R* = 6,55 min), Acetophenon (rot)
- Abb. 13: Dargestellt sind die Endkonzentrationen von Ethylbenzol (EB), Phenylethanol (PE) und Acetophenon (AC) in Abhängigkeit von A) der Dosiergeschwindigkeit bei gleichbleibender Enzymmenge (0,5 U) (rechte Ordinate: Selektivität der Enzymreaktion; Acetophenon/Phenylethanol; braun), B der eingesetzten AaP-Menge bei gleichbleibender Dosiergeschwindigkeit (3 ml h⁻¹) (rechte Ordinate: AaP-Effizienz bezogen auf Phenylethanol; Phenylethanol/AaP; braun), C und D des Stoffmengenverhältnisses von Wasserstoffperoxid und EB (H₂O₂/EB) bei konstanter Flussrate (C=3 ml h⁻¹; D=1 ml h⁻¹) und gleichbleibender Enzym-Menge (0,25 U) (rechte Ordinate Größenachse: Selektivität der Enzymreaktion (Selektivität der Enzymreaktion; Acetophenon/Phenylethanol; braun).

- Abb. 14: Basisliniengetrennte gaschromatographische Aufspaltung des Racemats von 1-Phenylethanol
- Abb. 15: Gaschromatogramme aus den 3L Versuchen mit Gehalt und Reinheit
- Abb. 16: HPLC-Elutionsprofil (280nm) der Umsetzung von Methotrexat mit AaP (rot) und die Kontrolle ohne Enzym (blau)
- Abb. 17: HPLC-Elutionsprofil (280nm) der Umsetzung von Methotrexat mit AaP (10 U ml^{-1}) und H_2O_2 (theoretische Endkonzentration 8 mM nach $1200 \text{ min} = 400 \text{ nmol h}^{-1}$)
- Abb. 18: Erzielte Ausbeuten an 5-Hydroxypropranolol in Prozent nach Umsetzung von Propranolol ($0,5 \text{ mM}$) bei verschiedenen pH-Werten, AaP: 2 U/ml , H_2O_2 : 5mM über einen Zeitraum von 15 min ; batch.
- Abb. 19: Erzielte Ausbeuten an 5-OHydroxypropranolol in Prozent nach Umsetzung von Propranolol ($0,5 \text{ mM}$) im 1 ml Maßstab bei verschiedenen Enzymaktivitäten und Peroxidkonzentrationen; batch 15 min , pH $7,0$.
- Abb. 20: Gegenüberstellung der Ausbeuten an 5-Hydroxypropranolol in Prozent nach Umsetzung von Propranolol (5 mM) im batch (einmalige Zugabe H_2O_2 , Gesamtvolumen: 10ml) und feed-batch (Zudosierung $5\text{ml H}_2\text{O}_2$ – Lösung zu 5ml Puffer/Enzym/Substrat-Vorlage mit Spritzenpumpe: 5ml/h). H_2O_2 : 5 mM ; AaP: 2 U/m ; pH $7,0$
- Abb. 21: Chromatogramm des isolierten Propranolols nach Cyclohexanextraktion bei pH12
- Abb. 22: Chromatogramm des isolierten 5-Hydroxypropranolols. Rückstand aus Ethylacetatextraktion bei pH $9,6$
- Abb. 23: Ökologisches Bewertungssystem von Sabento (aus Brinkmann et al. 2010, nach Heinzle et al. 2006). Hiernach wird jeder Stoff bezüglich 14 Wirkungskategorien (wie z.B. Rohstoffverfügbarkeit, Landverbrauch) jeweils einer von 3 Bewertungsklassen nach einer qualitativen ABC Klassifizierung (problematisch, wenig problematisch, unproblematisch) zugeordnet. Über Wichtungskoeffizienten ($W(\text{IC})$) werden die einzelnen Wirkungskategorien untereinander gewichtet, mit dem Ziel, einen Gesamtindikator zur Umweltbewertung zu erhalten. Hiernach erhält das thermische Risiko mit einem Wichtungskoeffizienten von 100 eine doppelt so hohe Bedeutung wie z.B. die Komplexität der Synthese mit 50 . In einem arithmetischen Verfahren wird mit diesen Angaben für jeden Stoff nun jeweils für die sieben Bewertungskategorien der Input- und jeweils elf Kategorien der Outputseite ein Umweltfaktor (EF) berechnet. Für jeden Stoff ist in Sabento zudem auch der Massenindex (MI) ermittelt worden, der aussagt, wieviel kg eines Stoffs pro kg Produkt verbraucht werden. Durch Multiplikation des Umweltfaktors mit dem Massenindex jedes einzelnen Stoffes und anschließender Addition der Werte aller Stoffe der Input- bzw. der Outputseite ergeben sich die Umweltbewertungszahlen für den Input (PEI Input) und Output (PEI Output). Mit einem Wichtungsverhältnis von Input zu Output von $40:60$ werden die beiden Werte zu einer Gesamtbewertungszahl (PEI) für einen Prozess zusammengefasst. Diese bezieht sich immer auf die Herstellung von 1 kg Produkt. Bei der Ermittlung des Umweltfaktors (EF) kann jede Bewertungskategorie zusätzlich nach SHE-Kriterien (Safety 13% , Health 27% und Environment 60%) gewichtet werden, so dass sich eine SHE-gewichtete Bewertungszahl ergibt. Für genauere Informationen wird auf die Veröffentlichung verwiesen
- Abb. 24: Enzymatische Umsetzung von Ethylbenzol zu (*R*)-1-Phenylethanol mittels Peroxygenase (AaP)
- Abb. 25: Mikrobielle Umsetzung von Acetophenon zu (*R*)-1-Phenylethanol mittels *E. coli*- Stamm BL21(DE)/AW-9 (Weckbecker, Dissertation 2005)
- Abb. 26: Enzymatische Umsetzung von Propranolol zu 5-Hydroxypropranolol mittels Peroxygenase (AaP)
- Abb. 27: Mikrobielle Umsetzung von Propranolol zu 5-Hydroxypropranolol mittels *Cunninghamella spec.*
- Abb. 28: Enzymatische Umsetzung von Propranolol zu 5-Hydroxypropranolol mittels rekombinantem *Bacillus megaterium* CYP102A1(Variante 2C11)

Abb. 29: Chemische Darstellung von 5-Hydroxypropranolol aus 1,5-Naphthalendiol

Abb. 30: Vergleich der Wirkungspotenziale der Wirkungskategorien (Inputseite) auf die Gesamtbewertungszahl

Abb. 31: Kostenstruktur im Verarbeitenden Gewerbe in Deutschland (Quelle: statistisches Bundesamt 2009)

Abb. 32: Kostenanteile der eingesetzten Materialien

Abb. 33: (a) Oxidation von Bromid zu Hypobromit und folgender Halogenierung; (b) Sulfoxidation; (c) N-Oxygenierung; (d) Hydroxylierung über instabiles Epoxid zum Phenol; (e) Hydroxylierung von Aliphaten, (f) Epoxidierung von Doppelbindungen; (g) Etherspaltung (Hoffrichter und Ullrich 2010)

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Einfluss und Schlussfolgerungen hinsichtlich der Peroxygenasebildung von *Agrocybe aegerita* im Vergleich zur Kontrolle bei unterschiedlicher Vorbehandlung des Sojamehls

Tab. 2: Aktivitätsverluste und spezifische Aktivität bei Konzentration der Peroxygenasen

Tab. 3: Vergleich der biochemischen und katalytischen Eigenschaften der heterolog exprimierten Peroxygenasen WT392 und WT393

Tab. 4: Physikalische Daten der nach enzymatischer Umsetzung zu trennenden Substanzen 1-Phenylethanol und Acetophenon

Tab. 5: Untersuchungen zum Umsatz von Methotrexat mittels AaP unter Einsatz einer Spritzenpumpe zur H₂O₂-Dosierung

Tab. 6: Ausbeuten bei Steigerung der Propranololkonzentration bei konstanten Reaktionsparametern: AaP: 2 U/ml, H₂O₂: 5mM, batch 15min und pH 7.

Tab. 7: Verfahrensschritte zur Isolierung von Produkt und Edukt.

Tab. 8: Vergleich der Gesamtausbeute in % (bezogen auf das Edukt) und der ökologischen Bewertung verschiedener Verfahren zur Herstellung von (*R*)-1-Phenylethanol anhand der mit Sabento ermittelten Gesamtumweltbewertungszahlen (UBZ). Zur Beschreibung der Verfahren siehe Text.

Tab. 9: Vergleich des Abfallindex (kg Abfall pro kg Produkt), Gesamtausbeute (bezogen auf das Edukt) und der ökologischen Bewertung verschiedener Verfahren zur Herstellung von 5- Hydroxypropranolol anhand der mit Sabento ermittelten Gesamtumweltbewertungszahl (UBZ). Zur Beschreibung der Verfahren siehe Text.

Tab. 10: Dargestellt sind erfolgreich abgeschlossene Meilensteine (+), Meilensteine mit positiven, weiterführenden Ergebnissen (O) und Meilensteine, für die Innerhalb des Projektverlaufes kein positiver Abschluss erreicht werden konnte (-).

1 Zusammenfassung

Grundlage des vorliegenden Projektes bildete die Beschreibung eines neuen Enzymtyps bei Basidiomyceten, den im März 2011 von der Enzymkommission mit EC 1.11.2.1 eingestuften unspezifischen Peroxygenasen. Diese bisher noch nicht kommerziell verfügbaren Enzyme verbinden katalytische Eigenschaften von klassischen Peroxidasen mit der Selektivität von P450-Monooxygenasen. Aufgrund ihrer bemerkenswerten Eigenschaften wie hohe Stabilität, extrazelluläres Vorkommen, breites Substratspektrum und kostengünstiges Cosubstrat sind Peroxygenasen als Biokatalysatoren für umweltfreundliche Hydroxylierungsreaktionen geeignet. Ziel des Verbundprojektes war der Einsatz von Peroxygenasen in der enantioselektiven Synthese, am Beispiel der aromatischen Seitenkettenhydroxylierung von Ethylbenzen zur Darstellung von (*R*)-1-Phenylethanol und am Beispiel der regioselektiven Synthese von 5-Hydroxypropranolol durch aromatische Ringhydroxylierung von Propranolol. Beide Modellverbindungen werden als Feinchemikalien in der Kosmetikindustrie, bzw. als Spezialchemikalien in der pharmazeutischen Industrie verwendet. Für jedes Produkt wurde ein Peroxygenase-basiertes Verfahren zur enzymatischen Darstellung bzw. bis zur präparativen Gewinnung entwickelt und dieses anhand einer projektbegleitenden Ökoeffizienzanalyse mit chemischen und biotechnologischen Syntheseverfahren verglichen. Die Bewertung der ökologischen Effizienz erfolgte über die so genannte Umweltbewertungszahl (UBZ). Die Basis für die Berechnung der UBZ bildete im vorliegenden Projekt das ökologische Bewertungssystem der Software „Sabento“. Grundsätzlich gilt, je kleiner die Umweltbewertungszahl ist, desto geringer ist die potentielle Umweltwirkung eines Syntheseverfahrens einzustufen.

Die Bildung der Peroxygenase aus *Agrocybe aegerita* (AaP) erfolgte in einem Sojamehlhaltigen Komplexmedium. Die erzielten Enzymaktivitäten variierten in Abhängigkeit vom Kultivierungsmaßstab (0,2 l bis 30 l) zwischen 700 und 1400 U l⁻¹. Die Peroxygenase aus *Agrocybe aegerita* konnte in Natrium-Alginat immobilisiert werden. Parallel zu *Agrocybe aegerita* wurde bei zwei weiteren Basidiomycetenstämmen die Peroxygenasebildung in speziellen Komplexmedien nachgewiesen. *Coprinellus radians* bildete in einem Klee-Luzernemedium Enzymaktivitäten von 979 bis 2285 U l⁻¹. Für die Peroxygenase von *Marasmius rotula* eignete sich ein Sojapepton-haltiges Medium, in dem bis zu 32116 U l⁻¹ gemessen werden konnten. Dies sind die bislang höchsten Aktivitäten eines Häm-Thiolat-Proteins (Peroxidase/Peroxygenase), die bisher für eine Wild-Stamm-Basidiomycetenfermentation publiziert wurden.

Basierend auf der Identifikation von zwei *Coprinus cinereus* Peroxygenase-Genen wurden zunächst Primer designed und anschließend m-RNA und c-DNA amplifiziert.

Diese Amplifikate konnten erfolgreich in Expressionsvektoren kloniert und anschließend in *Aspergillus* heterolog exprimiert werden. Bei zwei dieser heterolog exprimierten Peroxygenasen (WT392 und WT393) konnte eine Aktivität gegenüber Veratrylalkohol nachgewiesen werden. WT392 zeigte weiterhin Aktivität gegenüber Naphthalen und erreicht zum aktuellen Zeitpunkt ca. 20% der AaP Performance.

Die präparative Synthese von (*R*)-1-Phenyltethanol erfolgte im 600 ml-Maßstab. Nach Umsetzung von Ethylbenzen (5 mM) mit H₂O₂ (3 mM) und 0,25 U/ml AaP im feed-batch Verfahren (Kosubstratdosierung mit einer Flussgeschwindigkeit von 3 ml/ h) wurde die Ausbeute nach Reinigung des Syntheseansatzes zu 48 % (99 ee) bestimmt. Das innerhalb des vorliegenden Projektes entwickelte Peroxygenase-Verfahren erreichte im Vergleich zu einem chemischen Verfahren (UBZ: 7260), bei dem mit einem titanhaltigen Katalysator Acetophenon reduziert wird und der erhaltene racemische Alkohol anschließend einer kinetischen Racematspaltung unterzogen werden muss (Patent US 5227538: *Catalytic asymmetric reduction of ketones using metal catalysts*) eine bessere Umweltbewertungszahl (UBZ: 832). Die UBZ des in die Ökoeffizienzanalyse ebenfalls einbezogenen biotechnologischen Verfahrens mit gentechnisch veränderten *E. coli* (Weckbecker 2005) wurde mit 1489 ermittelt.

Die zweite, innerhalb des Vorhabens enzymatisch darzustellende Substanz war 7-Hydroxymethotrexat. Ausgehend vom Methotrexat konnten sieben verschiedene Metabolite nachgewiesen werden. 7-Hydroxymethotrexat wurde nicht identifiziert. In Folge dessen wurde 5-Hydroxypropranolol als neue Zielverbindung zum Nachweis einer regioselektiven Hydroxylierung gewählt. Die Zugänglichkeit dieser Verbindung war mittels Peroxygenase durch aromatische Ringhydroxylierung des β -Blockers Propranolol möglich. Das Optimum der enzymatischen Darstellung wurde bei einer Enzymkonzentration von 2 U/ml AaP, einer Kofaktorkonzentration von 5 mM H₂O₂ und einer Eduktkonzentration von 5 mM im batch-Verfahren (5 min) mit einer Ausbeute von 21,8 % erzielt. Auf Basis der Voruntersuchungen erfolgte die präparative Darstellung des humanen Metaboliten 5-Hydroxypropranolol in einem Enzymmembranreaktor im 200 ml-Maßstab (20 % Ausbeute, 60 mg). Nach extraktiver Aufarbeitung des enzymatischen Ansatzes konnten 40 mg (15,7 %) der Zielverbindung in hoher Reinheit isoliert werden. Kommerziell wird 5-Hydroxypropranolol durch die Firma Bertin Pharma (ehem. SPI-Bio) für einem Preis von 120 € pro Milligramm an racemischem 5-Hydroxypropranolol angeboten. Die Umweltbewertungszahl (UBZ) des hier entwickelten Verfahrens beträgt 4923. Damit ist das Peroxygenase-Verfahren nicht so effizient einzustufen wie das vierstufige chemische Syntheseverfahren (Oatis et al. 1981), welches eine UBZ von 3502 erreichte.

Jedoch erreichte das im Rahmen des Projektes entwickelte Enzymverfahren im Vergleich mit zwei weiteren biotechnologischen Verfahren unter Verwendung von rekombinanten *B. megaterium* CYP102A1 nach Otey et al 2006 (UBZ: 84185448) bzw. einer Ganzzellsynthese mittels *Cunninghamella spez.* (UBZ: 129744) mit Abstand die geringste UBZ.

2 Anlass und Zielsetzung

Das große Interesse an enzymkatalysierten Oxidationsreaktionen in der Synthese wurde insbesondere durch die hohe Nachfrage an nachhaltiger Chemie vorangetrieben. Vor allem biokatalytische Oxyfunktionalisierungen stellen dank milder Reaktionsbedingungen, dem Verzicht auf Edel- und Schwermetallkatalysatoren, sowie der hohen Selektivität eine nachhaltige Alternative zu vielen chemisch katalysierten Prozessen dar. Enantio- und regioselektive Hydroxylierungen aromatischer Verbindungen zählen nicht nur zu den anspruchvollsten, sondern auch zu den wichtigsten Reaktionstypen, die zur Zugänglichkeit bedeutender Precursoren und Metaboliten für die chemischen und pharmazeutische Industrie genutzt werden. Nachteile der klassischen, chemischen Synthese sind oftmals Mehrstufenreaktionen und ein damit verbundener hoher Lösemittel- und Chemikalieneinsatz. Weiterhin werden geringe Ausbeuten, insbesondere bei der Darstellung chiraler, enantiomerenreiner Produkte in der Literatur als Defizit diskutiert (Campestrini & Tonellato, 2005; Warner et al., 2004; Krause, 1995). Nicht nur hohe Ausbeuten sondern auch hohe Enantioselektivitäten sind Kriterien, die zur wirtschaftlichen Etablierung eines Verfahrens führen, da die Enantiomerentrennung einen sowohl kostenintensiven als auch verlustintensiven Trennungsschritt darstellt (Federsel et al 1993). Viele Großunternehmen haben längst die Vorteile der weißen Biotechnologie bezüglich der stereo- und regioselektiven Oxyfunktionalisierung organischer Moleküle erkannt und bisherige chemische Verfahren durch biotechnologische ergänzt. Beispiele sind die enzymkatalysierte Hydroxylierung von (*R*)-2-Hydroxypropionsäure an Paraposition (BASF SE) oder die Hydroxylierung von Compactin zu Pravastatin (Bristol-Meyer Squibb, Sanko Pharma) unter Verwendung von Cytochrom P 450 – Monooxygenasen (CYP) (Zehentgruber, 2009). Die Cytochrom-P450 Monooxygenasen sind besonders vielseitige Biokatalysatoren, die in nahezu allen Organismen vorkommen. Sie sind u. a. für die Metabolisierung von Medikamenten und an der Entgiftung von toxischen Verbindungen in der menschlichen Leber verantwortlich (z. B. CYP 1E1), am Abbau von aromatischen Verbindungen durch Bakterien (CYP101, P450_{cam}), an der mikrobiellen Oxidation von Fettsäuren (CYP102) oder an der Synthese von Sekundärmetaboliten

beteiligt (z. B. Steroide, Vitamine, Hormone, Gallensäuren oder Alkaloide) (Waxman & Chang 2005, Guengerich 2005, Eiben et al. 2006, Ullrich & Hofrichter 2007). Derzeit ist ihre Nutzung jedoch nur begrenzt wirtschaftlich realisierbar, da sie schwierig zu isolieren, häufig Membrangebunden und wenig stabil sind, des Weiteren zusätzliche Elektronendonatoren (NAD(P)H), Hilfsproteine (Flavinreduktasen) und molekularen Sauerstoff als Kofaktor benötigen (Urlacher et al. 2004, Buchholz et al., 2005; Ahle (Ed.), 2004; Holland, 1998).

Pilzliche Peroxygenasen katalysieren eine ähnliche Reaktionsvielfalt wie P450 - Monooxygenasen, lassen jedoch aufgrund ihres extrazellulären Vorkommens, einer hohen Stabilität und einem kostengünstigen Kosubstrat (Wasserstoffperoxid) für die Hydroxylierung auf ein breiteres industrielles Einsatzpotential hoffen. Von wirtschaftlicher Bedeutung ist zudem, dass Peroxygenasen mit hohen Aktivitäten im produziert werden können (Gröbe et al. 2011, submitted). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Peroxygenase aus *Agrocybe aegerita* (AaP) eine Vielzahl selektiver Hydroxylierungsreaktionen organischer Substanzen katalysiert. Zu diesen Reaktionen gehören Hydroxylierungen von aktivierten und nicht aktivierten cyclischen, acyclischen, aromatischen, heterocyclischen C-H-Bindungen als auch Hydroxylierungen von Heteroatomen wie organisch gebundenen Schwefel und Stickstoff, sowie Etherspaltungs- und Halogenierungsreaktionen (Ullrich et al 2004, Ullrich und Hofrichter 2005, Hofrichter und Ullrich 2010, Aranda et al. 2009, Kinne et al. 2009). Bemerkenswert sind dabei die hohen Ausbeuten der Zielverbindungen sowie die geringe Nebenproduktbildung. Während durch rekombinante *B. megaterium* CYP102A1-Monooxygenasen vier verschiedene Metabolite (4-Hydroxypropranolol, 5-Hydroxypropranolol, N-Desisopropylpropranolol, 1-Naphthol) als Resultat der Umsetzung von Propranolol beschrieben wurden (Otey et al. 2006) katalysiert die AaP im vorliegenden Vorhaben die Umsetzung von Propranolol gezielt zu 5-Hydroxypropranolol (Kinne et al. 2009)

Anlass des vorliegenden Verbundvorhabens waren extrazelluläre unspezifische Peroxygenasen aus Basidiomyceten, welche bisher kommerziell noch nicht verfügbar sind. Die spektroskopischen und katalytischen Besonderheiten dieser Enzyme lassen eine Zwischenstellung ("missing link") zwischen Häm-Thiolat-Haloperoxidasen und Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen (Hydroxylasen) vermuten und zukünftig eine hohe biotechnologisch-industrielle Bedeutung prognostizieren. Im Rahmen des Vorhabens sollten Peroxygenase-Präparate in ausreichenden Mengen für die Anwendung in der Biokatalyse zur Verfügung gestellt werden. Dies beinhaltete neben der Enzymgewinnung durch Wildstamm-Kultivierung auch die Untersuchung von

Möglichkeiten zur heterologen Expression dieser glycosilierten Proteine. Ziel war es, das regio- und enantioselektive Katalysepotenzial für industrielle Verfahren am Beispiel der stereoselektiven Oxyfunktionalisierung von Ethylbenzol zu (*R*)-1-Phenylethanol (einem chiralen Auxiliar für die chemische Industrie und Ausgangsstoff für Duft- und Kosmetikprodukte) und der regioselektiven Hydroxylierung von Propranolol zu 5-Hydroxypropranolol (einem humanen *first pass* Lebermetaboliten, der für pharmakologische Untersuchungen benötigt wird) zu ermitteln. Die entwickelten Verfahren wurden projektbegleitend über Ökoeffizienzanalysen mit bekannten chemischen und biotechnischen Verfahren verglichen und entsprechend weiterentwickelt.

3 Ausführliche Ergebnisse und Darstellung der Methoden

Schwerpunkt: Enzymproduktion / Reinigung / Immobilisierung

Die Optimierung der Enzymproduktion und die Bereitstellung der Peroxygenasen für die Projektpartner erfolgte in Kooperation zwischen der Hochschule Lausitz, der JenaBios GmbH und dem IHI Zittau.

Entwicklung von spezifischen Induktionsmedien, Testung „ungewöhnlicher“ Komplexsubstrate zur Peroxygenaseproduktion durch *Agrocybe aegerita* und *Coprinellus radians*

Die Bildung der Peroxygenase aus *Agrocybe aegerita* (AaP) erfolgte in einem Sojamehlhaltigen Komplexmedium. Zur Aufklärung möglicher induzierender Komponenten im Sojamehl wurden mehrere Ansätze untersucht, bei denen das Sojamehl vor Inokulation mit *Agrocybe aegerita* thermisch (121 °C, 2 bar, 20 min), mit Säure oder Lauge (2,5 % HCl bzw. 2,5 % NaOH, 2 h) oder enzymatisch (Laccase, Cellulase/Hemicellulase, jeweils 3 Tage) vorbehandelt wurde. Zusätzlich wurden eine Kaltwasserextraktion sowie eine Extraktion mit Methanol (80 %, 24 h) durchgeführt. Während der sich anschließenden Kultivierung wurde in regelmäßigen Abständen die Enzymaktivität gemessen und mit der Kontrolle (unbehandeltes Sojamehl) verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die Zugabe von Tofu (Koagulation von Sojamilch) führte ebenfalls zur Bildung der Peroxygenase. Unter Verwendung dieses Induktionsmediums konnte die Laccasebildung vollständig unterdrückt werden, jedoch wurde im Vergleich zu Sojamehl eine um mehr als 50 % geringere Peroxygenaseaktivität gemessen.

Tab. 1: Einfluss und Schlussfolgerungen hinsichtlich der Peroxygenasebildung von *Agrocybe aegerita* im Vergleich zur Kontrolle bei unterschiedlicher Vorbehandlung des Sojamehls

Vorbehandlung	Ergebnis im Vergleich zur Kontrolle (Vollsoja) (Enzymaktivität: AaP)	Mögliche Eigenschaften der induzierenden Komponente
Thermische Vorbehandlung (121 °C / 2bar / 20 min)	keine Verringerung der gemessenen Enzymaktivität	hitze stabil
Kaltwasserextraktion (2 h)	ca. 60 % geringere Enzymaktivität	wasserlöslich
Methanolischer Extrakt (eingesetzt in Czapek-Dox Medium)	keine Enzymaktivität trotz Mycelwachstum	geringe Löslichkeit in Methanol, dafür ca. 2000 % gesteigerte Laccaseaktivität (Induktor: Genistein / Daidzein)
Säure (2,5 % HCl, 2 h)	keine Verringerung der gemessenen Enzymaktivität	säure stabil
Lauge (2,5 % NaOH, 2 h)	keine Enzymaktivität trotz Mycelwachstum	laugelabil
Laccase (50 U / 200ml) (3 d / 24 °C)	keine Verringerung der Enzymaktivität jedoch um ca. 7 Tage verzögertes Maximum der Enzymaktivität	phenolisch (Polymerisation der Komponente durch Laccase, dadurch verzögerte Induktion)
Cellulase/Xylanase (100 U / 200ml) (3 d / 24°C)	keine Verringerung der gemessenen Enzymaktivität	kein phenolisches Glycosid kein Cellulose- oder Xylanfragment

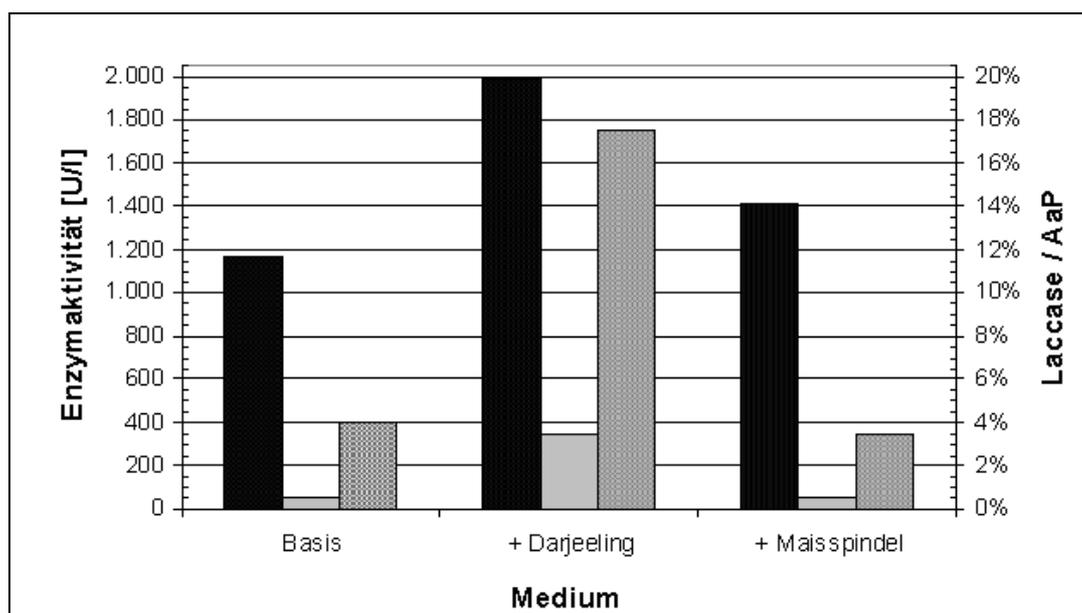


Abb. 1: Verhältnis (3.Säule) zwischen Peroxygenase-Aktivität (1. Säule) und Laccase-Aktivität (2. Säule) von *A. aegerita* in einem Sojamehl-Basismedium unter Zusatz von 1 % Teeextrakt bzw. 1 % Maisspindelmehl

Der Zusatz weiterer selektierter Naturstoffe, wie Teeextrakt oder Maisspindelmehl führte zwar zu einer Steigerung der Peroxygenaseaktivität, jedoch wurde gleichzeitig auch die Bildung der Laccase induziert (Abb. 1). Zur Produktion der Peroxygenase aus *Agrocybe aegerita* wurde auf Grund der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse schließlich Sojamehl verwendet. Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass insbesondere Inhaltsstoffe von Leguminosen essentiell für die Peroxygenasebildung sind, da alle verwendeten Medien (Soja, Klee- bzw, Luzerne Pellets, Sojapepton) die Enzyymbildung induzierten.

Die Peroxygenasebildung bei *Coprinellus radians* erfolgte in einem Czapek-Dox-Medium unter Zusatz von Rotklee- und Luzerne-Pellets. Zur Bestimmung des Optimums wurden sowohl der Gehalt an Leguminosenpellets, als auch der Einfluss unterschiedlicher Kultivierungstemperaturen auf die Enzymproduktion untersucht. Die höchsten Peroxygenaseaktivitäten (2285U/l) wurden bei einer Kultivierungstemperatur von 28 °C und einem Klee/Luzerne-Anteil von 20 g/l Klee- und 20 g/l Luzernepellets erreicht (Abb. 2). Das Maximum der Aktivität wurde am sechsten Kultivierungstag gemessen. Eine weitere Erhöhung der Temperatur auf 30°C, wie auch ein höherer Anteil an Klee und Luzerne führte zu keiner weiteren Steigerung der Enzymaktivität. Kultivierungstemperaturen unterhalb 25°C reduzierte n die erreichbare Enzymaktivität um mindestens 40% im Vergleich zu 28°C.

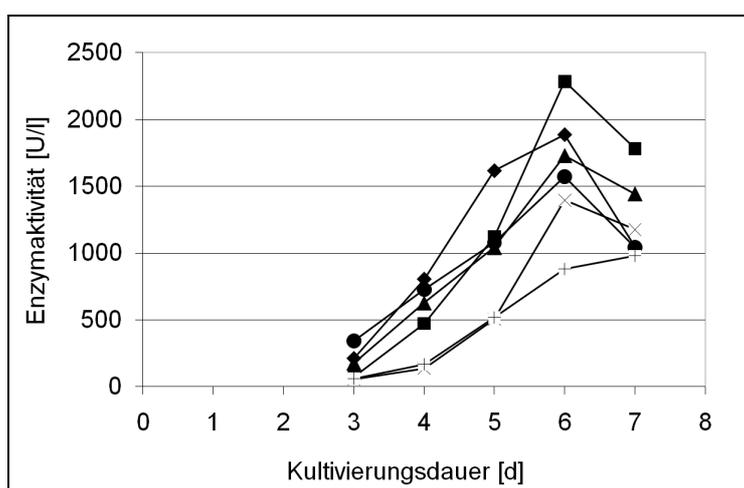


Abb.2: Peroxygenaseaktivität bei Kultivierung von *Coprinellus radians* auf semisynthetischem Czapek Dox Medium mit unterschiedlichen Anteilen von Klee und Luzerne. Dargestellt sind die Veratrylalkohol oxidierenden Units gemessen in den Ansätzen mit 20 g/l Klee/Luzerne (28°C) (◆), 40 g/l Klee/Luzerne(28°C) (■),60 g/l Klee/Luzerne (28°C)(X), 20 g/l Klee/Luzerne (30°C) (●), 40 g/l Klee/Luzerne(28°C)(▲) und 60 g/l Klee/Luzerne (30°C) (+).

Der Einsatz von Vollsojamehl führte zu einer maximalen Enzymaktivität von ca. 170 U l⁻¹. Noch ungeklärt sind die induktiven Mechanismen, die zur

Peroxygenasebildung führen. Die Identifizierung der Induktoren würde den Einsatz von synthetischen Medien erlauben, womit aufwändige Separations- und Reinigungsschritte reduziert und als Folge die Kosten der Enzymproduktion gesenkt werden könnten.

Das Screening nach weiteren Peroxygenasebildnern führte zur Beschreibung einer weiteren extrazellulären Peroxygenase aus *Marasmius rotula*. In einem speziellen Komplexmedium, bestehend aus 28 g l^{-1} Glucose, 12 g l^{-1} Pepton aus Soja und $4,5 \text{ g l}^{-1}$ Malzextrakt wurde nach 24 Tagen eine maximale Enzymaktivität von 32116 U l^{-1} erreicht (Abb. 3).

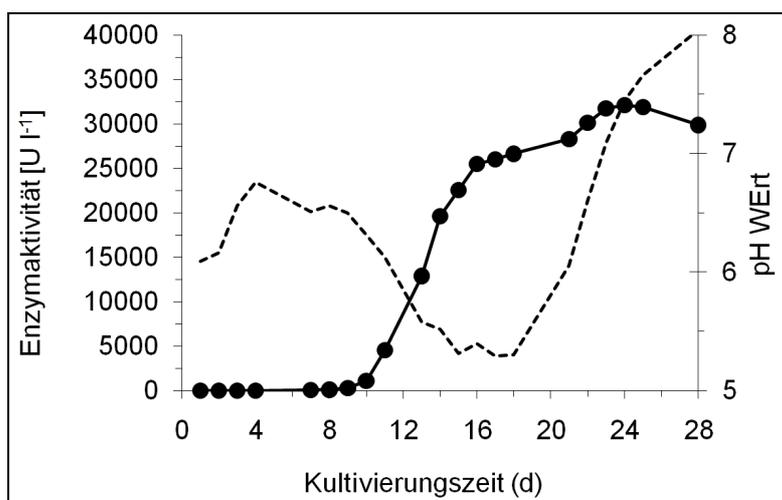


Abb. 3: Verlauf der Peroxygenaseproduktion (•) bei Schüttelkultivierung von *Marasmius rotula* in einem Komplexmedium bestehend aus 28 g l^{-1} Glucose, 12 g l^{-1} Pepton aus Sojamehl und $4,5 \text{ g l}^{-1}$ Malzextrakt. Die Enzymaktivität wurde mit Veratrylalkohol bestimmt. Zusätzlich ist der pH-Wert-Verlauf (--) dargestellt.

Entwicklung und Optimierung von Fermentationsverfahren zur Herstellung von Peroxygenasen in *stirred-tank bioreactors*

Die Submerskultivierung von *Agrocybe aegerita* erfolgt in einem Sojabohnenmehl-Kulturmedium (20 g/l). Die erreichten Enzymaktivitäten betragen je nach Arbeitsvolumen ($0,2 \text{ l}$ bis 30 l) zwischen 700 U/l und 1.400 U/l . Dabei wurden von der Beimpfung des Rührkesselreaktors bis zum Vorliegen des gefriergetrockneten Präparats ca. 12 kWh Energie (Elektrizität) und 12 l Wasser je 1.000 U AaP Rohextrakt verbraucht.

Peroxygenase-Konzentration, Isolation, Abtrennung, Eliminierung unerwünschter Phenol-Oxidasen (Laccasen), und Lyophilisierung

Zum Zeitpunkt der maximalen Enzymaktivität wurde die Kultivierung beendet und mittels Makrofiltration das Mycel vom Medium getrennt. Das Filtrat wurde bei -80°C eingefroren, um Polysaccharide auszufällen. Anschließend wurde die Lösung durch Ultrafiltration (Cutt-Off: 10 kDa) um den Faktor 30 aufkonzentriert und das Retentat anschließend

lyophilisiert oder chromatographisch gereinigt. In Tabelle 2 sind Reinigungsprotokolle für die Peroxygenasen aus *Agrocybe aegerita* und *Coprinellus radians* zusammengefasst.

Tab 2: Aktivitätsverluste und spezifische Aktivität bei Konzentration der Peroxygenasen

<i>Agrocybe aegerita</i>	Volumen [ml]	Peroxygenase Units [Ugesamt]	Verlust [% Ausgang]	Enz.- Akt. [U/ml]
1. Filtration (nach Kultivierung)	1500	930	0	0,62
2. Filtration (nach -80°C)	1490	894	4	0,60
1. Ultrafiltration (10kDa)	325	863	8	2,65
2. Ultrafiltration (10kDa)	45	857	9	19,04

<i>Coprinellus radians</i>	Volumen [ml]	Peroxygenase Units [Ugesamt]	Verlust [% Ausgang]	Enz.- Akt. [U/ml]
1. Filtration (nach Kultivierung)	1400	4260	0	3,04
2. Filtration (nach -80°C)	1040	3837	10	3,69
1. Ultrafiltration 10kDa	355	3582	16	10,1
2. Ultrafiltration 10kDa	47	3371	21	71,7

Die anschließende Lyophilisation führte zu keinen Aktivitätsverlusten bei den produzierten Peroxygenase-Präparationen. Dieser Arbeitsschritt war notwendig, um die Enzyme für die Untersuchungen der Projektpartner in stabiler Form zur Verfügung zu stellen. Die Abtrennung unerwünschter Fremdproteine aus der Kulturflüssigkeit und zur Reinigung der Peroxygenasen von *Agrocybe aegerita* und *Coprinellus radians* wurden mehrere Chromatographieschritte, die Anionenaustauscher, Kationenaustauscher, Größenausschlusschromatographie und Chromatofocussing umfassten, durchgeführt. Bereits nach dem ersten Chromatographieschritt (AaP: SP Sepharose FF, Kationenaustauscher / CrP: Q Sepharose FF, Anionenaustauscher) konnte keine Laccaseaktivität mehr detektiert werden. Insgesamt waren für die Reinigung der Peroxygenase aus *Agrocybe aegerita* zwei (SP Sepharose FF und Mono P) und bei der Peroxygenase von *Coprinellus radians* drei Chromatographieschritte (Q Sepharose FF, Mono Q, SEC) notwendig (Ullrich et al 2009). Abbildung 4 zeigt die chromatographische Trennung der verschiedenen AaP Hauptformen (I-III) und der drei Nebenisoformen durch Chromatofocussing nach vorheriger Trennung mittels Kationenaustauscher (SP Sepharose FF). Die Molekulargewichte der einzelnen Proteinfractionen waren mit ca. 46 kDa nahezu identisch, differierten jedoch in ihren isoelektrischen Punkten (pI 5.2, 5.6, 6.1), was auf verschiedene glycosilierte Isoformen schlussfolgern lässt.

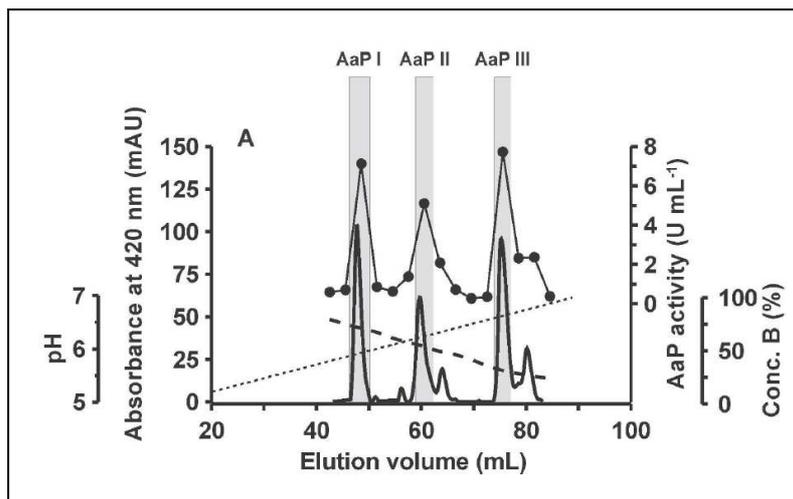


Abb. 4: Chromatographische Trennung der drei AaP Hauptisoformen (I-III) durch Chromatofocusing. Dargestellt ist das Elutionsprofil bei 420nm (durchgezogene Linie), die mit Veratrylalkohol gemessenen Enzymaktivitäten (•), die Konzentration Puffer B (---) und der pH Gradient (•••)

Die durch die Partner JenaBios GmbH und Hochschule Lausitz produzierten Enzyme wurden über den gesamten Projektverlauf in ausreichender Menge und in geeigneten Applikationsformen allen Partner zur Verfügung gestellt.

Enzym-Immobilisierung

Die Immobilisierung der Peroxygenase aus *Agrocybe aegerita* wurde an zwei verschiedenen Trägermaterialien untersucht.

Trägermaterial 1: Natürliche Polymere – Alginate

Bei diesem Verfahren werden die Enzyme in gelartige Strukturen eingebettet, was voraus setzt, dass Substrate und Produkte in die Matrix eindringen und diese auch wieder verlassen können. Für die Versuchsreihe wurde Natrium-Alginate verwendet. Dieses Polysaccharid besteht aus 1,4-glycosidisch verknüpfter α -L-Guluronsäure und β -D-Mannuronsäure, welche homopolymer miteinander verbunden sind. Das in Wasser lösliche Alginate geht über die Carboxyl- und Hydroxygruppen eine Wechselwirkung mit dem Calcium ein. Bedingt dadurch wird die Matrix in Wasser unlöslich und ist außerdem mechanisch stabil (Buchholz 2005).

0,4 g Alginate wurden in 20 ml deionisiertem Wasser gelöst. Um die Löslichkeit zu erhöhen, wurde der Ansatz dabei erwärmt. Parallel dazu wurde in einem weiteren Becherglas 4g Calcium-Gluconat in 200 ml H₂O bidest gelöst. In einem Citronensäure-Phosphat-Puffer pH 7 (2 ml) wurden 10 U *Agrocybe aegerita* Peroxygenase (AaP) gelöst. Die Enzymlösung und 2 ml Alginatelösung wurden vermischt und in eine Einwegspritze überführt. Mit dieser Spritze wurden kleine Tropfen direkt in die Calcium-Gluconat-Lösung getropft. Nach einer Stunde Aushärtungszeit konnten die Perlen abfiltriert werden. Anschließend wurden diese in Puffer überführt und in einem photometrischen

Test mit Veratrylalkohol als Substrat, die Enzymaktivität für die im Alginat eingeschlossene AaP bestimmt. (Smidsrød 1990; You 2001, Buthe 2004)

Für das immobilisierte Enzym konnte ein Wert von 0,0053 U/mg_{Träger} bestimmt werden. Die Alginat-Perlen sind in Abbildung 5 dargestellt.

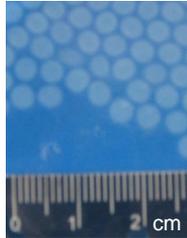


Abb. 5: Calcium-Alginat-Perlen nach Einschluss von *Agrocybe aegerita* Peroxygenase.

Trägermaterial 2: Trisoperl

Bei diesem Verfahren sollte die AaP kovalent an sphärische, poröse Glaskügelchen (Trisoperl, VitraBio GmbH, Steinach) gebunden werden. Die Anbindung an die Aminogruppen des Trägermaterials wurde über die Verknüpfung mit den primären Aminogruppen der endständigen Aminosäuren des Enzyms realisiert. Glutaraldehyd diente in diesem Fall als Linker (modifiziert nach Spohn et al. 1998). Bei diesem Ansatz konnte nach Immobilisierung keine Enzymaktivität gemessen werden. Eine Überprüfung der Waschlösung ergab, dass auch darin keine Aktivität der AaP mehr vorhanden war. Folglich ist davon auszugehen, dass die *Agrocybe aegerita* Peroxygenase an den Glasperlen immobilisiert, jedoch dabei inaktiviert wurde. Mögliche Gründe sind eine Umfaltung der Proteinstruktur oder eine Unzugänglichkeit des aktiven Zentrums, bedingt durch die starre Fixierung des Enzymes an der Trisoperloberfläche.

Enzymstabilitäten

Die Peroxygenase aus *Marasmius rotula* zeigte eine hohe Lösemittestabilität (bis zu 50 % vol/vol) gegenüber Methanol, Acetonitril und N,N-Dimethylformamid. Das Enzym war weiterhin in einem breiten pH – Bereich von pH 5 bis pH 10 aktiv, wobei das Optimum der meisten Reaktionen zwischen pH 5 bis pH 6 lag. Weiterhin war das Enzym bei pH-Werten von pH 5 bis pH 9 über einen Zeitraum von 8 Stunden und 25°C stabil. Bei einem pH Wert von pH 5 und Temperaturen bis 40°C konnte über diesen Zeitraum für die Peroxygenase *Marasmius rotula* ebenfalls kein Verlust an Enzymaktivität gemessen werden.

Schwerpunkt: Identifizierung spezifischer Peroxygenase-Sequenzen

Die Identifizierung spezifischer Peroxygenase-Sequenzen, das data mining und Ableitung von spezifischen Peroxygenase-Primern wurde vom Projektpartner IHI Zittau in Kooperation mit dem Partner Novozymes A/S untersucht.

Auf der Basis von *de-novo* Aminosäuresequenz-Fragmenten des AaP-Proteins gelang es geeignete Primer zu designen. Mit diesen Primern wurden schließlich erfolgreich m-RNA und c-DNA der AaP amplifiziert. Diese Amplifikate wurden in *E. coli* kloniert, und die so erzeugten Plasmide dem Projektpartner Novozymes A/S für Expressionsexperimente zur Verfügung gestellt. Seitdem konnten verschiedene Untersuchungen zur heterologen Expression in geeigneten Wirtsorganismen durchgeführt werden.

Die Sequenzdaten zu den entsprechenden Peroxygenase-Genen sind der European Molecular Biology Laboratory nucleotide database folgenden Zugangsnummern zu entnehmen: FM872457 (*A. aegerita* apo1 gene), FM872458 (*A. aegerita* apo1 mRNA), and FM872459 (*C. radicans* apo1 partial mRNA). Ein Sequenzvergleich mit der bisher einzigen bekannten extrazellulären pilzlichen Häm-Haloperoxidase (CPO= chloroperoxidase von *Caldariomyces fumago*; EC 1.11.1.10) ergab lediglich eine relative geringe Identität von 27%, die in den Bereichen der proximalen und distalen Häm-Bindungsstelle jedoch deutlich größer ist (Abb. 6).

<i>A.aegerita</i> (AaP)	1	D	I	R	G	P	C	P	G	L	N	T	L	A	S	H	G	V	L	P	R	N	G	V	A	T	P	V	I	N	A	V	G	E	G	L	N	F	D	N	Q	A	A	V	F	A	T	Y	A	A	H	L	V	D	G	N	L	I	59
<i>C.radicans</i> (CrP)	1	D	I	R	G	P	C	P	G	L	N	T	L	A	S	H	G	V	L	P	R	N	G	V	A	T	P	A	Q	I	N	A	V	E	G	F	N	F	N	Y	E	G	A	V	F	T	Y	F	A	H	L	V	D	G	N	L	V	59	
<i>C.cinerea</i>	1	D	V	R	G	P	C	P	G	L	N	T	L	A	S	H	G	V	L	P	R	D	G	V	A	T	P	A	Q	I	T	A	V	E	G	F	N	M	E	Y	G	I	A	T	E	V	T	Y	A	A	H	L	V	D	G	N	F	L	59
<i>P.nodorum</i> 1	1	D	L	R	G	P	C	P	G	L	N	A	F	A	N	H	N	L	P	H	N	G	Y	A	S	V	A	Q	Y	I	E	A	T	K	V	V	G	M	G	A	N	L	A	L	E	L	S	V	L	G	A	L	D	G	D	V	L	59	
<i>G.zeae</i>	1	E	I	R	G	L	C	P	G	L	N	T	L	A	N	H	N	L	P	R	N	G	V	A	T	F	T	Q	Y	I	N	A	V	E	G	V	W	G	M	A	P	D	L	A	T	V	L	T	L	G	V	V	I	G	N	L	F	59	
<i>C.fumago</i> (CPO)	1	D	S	R	A	P	C	P	A	L	N	A	L	A	N	H	G	V	I	P	H	D	G	R	A	I	S	R	E	T	L	Q	N	A	F	L	N	H	M	G	I	A	N	S	V	I	E	L	A	T	N	A	F	V	V	55			
<i>A.niger</i>	1	D	V	R	A	P	C	P	M	L	N	T	L	A	N	H	G	V	L	P	H	N	G	K	D	I	T	E	Q	H	T	I	N	A	L	N	A	L	G	I	E	E	L	A	V	L	H	Q	E	A	V	T	55						
<i>P.chrysosporium</i> 1	1	D	S	R	A	P	C	P	A	M	N	S	M	A	N	H	G	V	L	P	R	D	G	K	I	T	A	D	I	I	D	A	L	M	K	C	F	R	L	S	K	P	L	A	W	A	L	T	H	G	A	L	T	54					
<i>P.anserina</i>	1	E	L	R	A	P	C	P	A	M	N	S	L	A	N	H	G	V	I	Q	R	D	G	K	N	I	T	V	E	G	L	T	P	V	L	K	E	V	F	H	L	S	H	E	L	A	F	T	V	S	Q	L	G	L	F	T	55		
<i>A.nidulans</i>	1	D	L	R	G	P	C	P	A	M	N	S	L	A	N	H	G	V	I	N	H	N	G	S	N	I	T	V	N	E	V	P	L	M	Q	E	V	F	H	L	S	E	E	L	A	T	I	V	T	G	L	A	V	S	55				
<i>P.nodorum</i> 2	1	D	V	R	G	P	C	P	A	L	N	T	L	A	N	H	G	V	I	H	H	D	G	K	M	T	I	P	H	L	K	G	L	A	E	G	M	N	G	A	D	F	T	T	A	I	G	A	A	G	L	L	S	55					
<i>A.bisporus</i>	1	D	S	R	G	P	C	P	A	L	N	A	N	H	G	V	L	P	R	D	G	K	N	I	Q	F	K	E	M	G	R	L	I	R	T	T	Y	N	F	S	S	F	C	Y	E	V	P	H	Y	A	E	K	55						
<i>P.infestans</i>	1	F	R	R	S	P	C	P	G	L	N	A	L	A	N	H	G	V	I	P	R	S	G	K	N	I	T	H	E	D	L	R	A	A	M	S	V	F	N	F	D	S	G	L	T	Q	V	L	N	Q	L	P	A	54					
<i>P.capsici</i>	1	Y	S	R	S	P	C	P	A	L	N	T	L	A	N	H	G	V	L	P	R	N	G	K	E	L	T	P	T	L	G	D	G	L	M	K	V	F	N	D	R	K	L	L	D	V	I	F	L	A	I	P	S	54					
<i>P.pachyrhizi</i>	1	P	L	G	C	P	C	P	G	I	S	T	L	I	N	H	C	V	L	N	P	I	D	E	N	P	I	K	Y	S	E	I	V	D	G	L	I	K	C	E	N	L	T	K	S	H	A	L	L	S	51								
<i>A.aegerita</i> (AaP)	60	T	D	L	L	S	I	G	R	K	T	R	L	T	G	P	D	P	P	P	A	S	V	G	G	L	N	E	H	G	T	F	E	G	D	A	S	M	T	R	G	D	A	F	F	G	105												
<i>C.radicans</i> (CrP)	60	T	D	L	L	S	I	G	G	K	T	N	L	T	G	E	D	T	G	A	P	A	I	G	G	L	N	T	H	S	V	F	E	G	D	A	S	M	T	R	D	D	F	H	F	G	105												
<i>C.cinerea</i>	60	T	N	L	S	I	G	G	K	T	R	K	T	G	P	D	P	P	P	A	I	V	G	G	L	N	T	H	A	V	F	E	G	D	A	S	M	T	R	G	D	F	H	L	G	105													
<i>P.nodorum</i> 1	60	N	W	S	M	G	G	T	P	S	L	A	Q	G	V	T	G	I	L	G	N	G	L	T	G	S	H	N	K	F	E	G	D	A	S	P	T	R	P	D	L	Q	A	103															
<i>G.zeae</i>	60	A	V	S	Q	G	G	Y	S	H	M	S	N	N	L	F	G	L	L	G	T	P	R	G	L	D	G	T	H	P	L	F	E	V	D	G	S	P	T	R	G	D	L	Y	D	P	105												
<i>C.fumago</i> (CPO)	56	C	E	Y	V	T	G	S	D	C	G	D	S	L	V	N	L	T	L	A	E	P	H	A	F	E	H	D	H	S	F	S	R	K	D	Y	K	O	G	94																			
<i>A.niger</i>	56	N	P	A	N	A	T	T	S	L	N	D	L	S	R	H	L	E	H	D	A	S	L	S	R	O	D	A	F	F	G	89																											
<i>P.chrysosporium</i>	56	L	L	D	O	G	S	A	P	E	L	H	D	L	A	R	H	N	K	V	E	H	D	A	S	L	Y	H	P	N	A	G	R	88																									
<i>P.anserina</i>	56	A	L	D	F	S	K	V	I	T	L	Q	D	L	T	D	R	H	N	V	F	E	H	D	A	S	L	S	R	E	D	A	K	F	G	90																							
<i>A.nidulans</i>	56	A	D	D	P	A	S	S	I	N	L	D	M	L	N	B	H	N	F	F	E	H	D	A	S	L	T	R	K	F	L	89																											
<i>P.nodorum</i> 2	56	S	P	F	L	G	S	S	D	L	D	L	N	M	H	N	F	P	E	H	D	A	S	L	S	R	O	D	A	A	L	90																											
<i>A.bisporus</i>	56	V	V	K	K	Y	N	N	D	T	N	L	D	E	L	H	H	N	G	I	E	H	D	A	S	L	C	R	E	D	S	A	L	C	91																								
<i>P.infestans</i>	55	T	F	S	L	D	I	S	R	H	N	V	L	E	H	D	A	S	L	V	H	N	D	E	F	F	G	81																															
<i>P.capsici</i>	55	N	T	L	S	D	E	F	I	N	H	D	A	S	L	V	H	V	D	E	F	F	Q	78																																			
<i>P.pachyrhizi</i>	52	L	S	A	T	K	I	C	G	L	K	G	A	L	T	I	A	Q	L	S	H	G	M	I	E	H	D	A	S	I	T	R	F	N	H	S	D	G	89																				

Abb. 6: Alignment mit 3 realen und 12 hypothetischen Peroxygenase Proteinsequenzen auf der Basis von mRNA (Pecyna et al. 2009)

Eine Datenbank (BLAST) gestützte Suche ergab eine Vielzahl Peroxygenase-ähnlicher Gene bzw. hypothetischer Proteine innerhalb der Gruppe der Fungi aber auch darüber hinaus, beispielsweise der Oomycota. Die Ergebnisse hierzu sind in Abb. 7 zusammen-

fassend dargestellt. Allerdings ist es bislang nicht gelungen aktive Peroxygenase mit diesen Organismen zu produzieren.

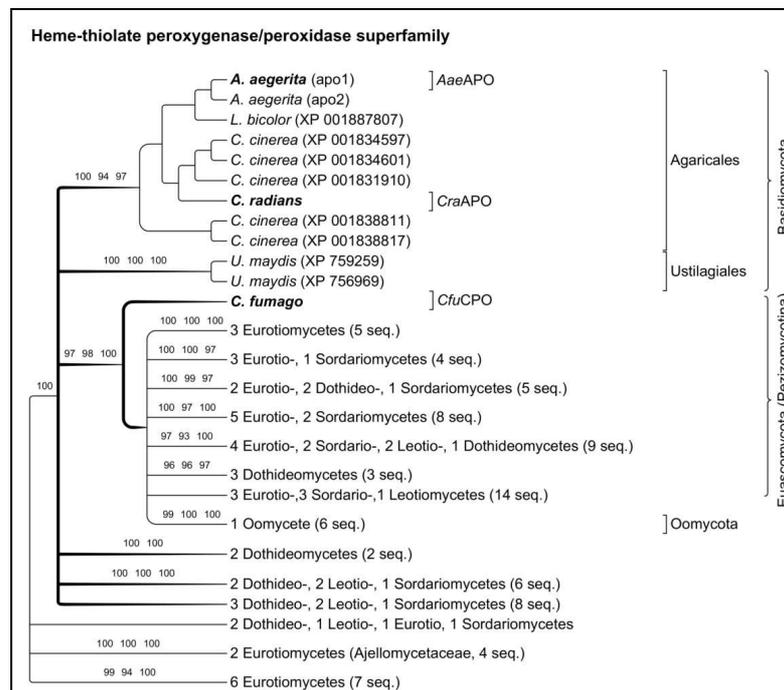


Abb. 7: Vereinfachter phylogenetischer Baum auf der Basis von Proteinsequenzen von charakterisierten Häm-Thiolat Peroxidasen und homologen putativen Proteinen. (hypothetische Protein Sequenzen von genomischer DNA aus der Gen-Datenbank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) (Hofrichter et al. 2010)

Schwerpunkt: Heterologe Expression der Peroxygenasen

Etablierung der heterologen Expression von *Agrocybe*-Peroxygenasen in *Aspergillus oryzae*, Optimierung der Expression/Überexpression.

Die Versuche wurden in Kooperation der Partner IHI Zittau und Novozymes A/S durchgeführt.

Es wurden verschiedene Versuche zur Expression der Isoform AaP II in *Aspergillus spec.* durchgeführt. Leider führte diese nicht zu einem biokatalytisch aktiven Peroxygenase-Protein. Dies gilt ebenfalls für die Klonierung der AaP Isoform I in *Aspergillus* und den damit verbundenen Versuchen zur Gewinnung ausreichender Mengen rekombinanten Enzymes.

Dem gegenüber stand die Identifizierung von zwei Peroxygenase Genen in *Coprinus cinereus*. Diese Gene konnten in *Aspergillus* Expressionsvektoren kloniert und anschließend transformiert werden (WT392 und WT393).

Das Molekulargewicht (Mw) der Isoform AaP II wurde mit 46 KDa bestimmt, für das Protein ohne Glycosylierung ca. 37 KDa. Der isoelektrische Punkt (pI) der Isoform beträgt 5,6 (Ullrich et al. 2009). Bei der Peroxygenase aus *Coprinellus radicans* konnten folgende

Kenndaten bestimmt werden (Mw: 43 – 45 KDa, pl: 3,8 – 4,2). Damit liegen die heterolog exprimierten Enzyme im Bereich bekannter Peroxygenasen.

Die für die heterolog exprimierten Enzyme bestimmten Kenndaten sind in Tabelle 3 zusammen gefasst.

Tab. 3: Vergleich der biochemischen und katalytischen Eigenschaften der heterolog exprimierten Peroxygenasen WT392 und WT393.

Enzyme	Mw theor. (kDa)	Mw - SDS-PAGE (kDa)	N-Glycosyliert	pI	Oxidation von Veratrylalkohol	Hydroxylierung von Naphthalen
WT 392	42.8	46 +	+	7.85	+	+
WT 393	38.6	47 +	+	5.84	+	-

Vergleichsuntersuchungen zwischen verfügbaren Enzymproteinen

WT393 zeigte keine, oder nur eine sehr geringe Aktivität gegenüber Naphthalen. Im Vergleich dazu konnte mit WT392, bei Anwesenheit dieses Substrates, eine Aktivität gemessen werden.

WT392 ist gegenüber der Peroxygenase aus dem Basidiomyceten *Agrocybe aegerita* (AaP) zu 58% homolog. WT392 war in der Lage, Veratrylalkohol zu oxidieren und Naphthalen zu hydroxylieren. Die hierfür notwendigen Assay wurden am Photometer durchgeführt (Ullrich et al. 2004, Kluge et al. 2007)

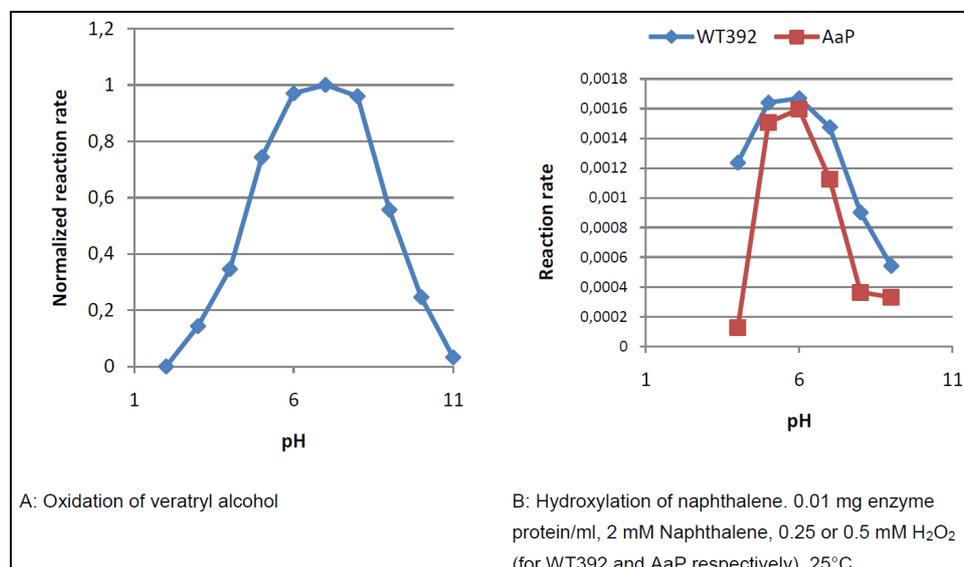


Abb. 8: pH Optimum für die Oxidation von Veratrylalkohol (A) durch WT392 und für die Hydroxylierung von Naphthalen (B) im Vergleich zwischen WT392 und AaP

Das pH-Optimum für die Oxidation von Veratrylalkohol lag, wie bei der *Agrocybe aegerita* Peroxygenase, bei einem pH Wert von 7. Für die Hydroxylierung von Naphthalen wurde für WT392 ein optimaler pH Wert von 6 bestimmt. Bei der *Agrocybe*

aegerita Peroxygenase konnte, im Vergleich dazu, ein optimaler pH Bereich von pH 6 bis 7 ermittelt werden (Abb. 8). Damit liegen die für WT392 ermittelten pH-Optima im zu erwartenden Bereich.

Die für die beschriebene Hydroxylierung von Naphthalen optimale Wasserstoffperoxidkonzentration lag für WT392 bei einem Anteil von 0,25 bis 0,5 mM. Dabei war es möglich, die Ausbeute der Hydroxylierung durch mehrfache Zugabe von 0,25 mM H₂O₂ zu steigern. Bei einer Wasserstoffperoxidkonzentration von 0,5 mM führte dies zu einer raschen Inaktivierung des Enzyms. (Abb. 9)

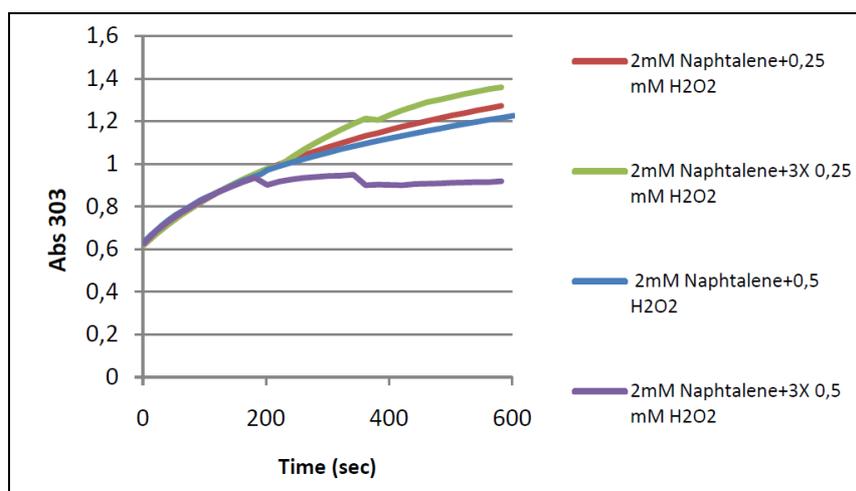


Abb 9: Einfluss unterschiedlicher Konzentration von H₂O₂ auf die Hydroxylierung von Naphthalen. Ansatz: 0,01 mg WT392 Protein /ml, 2 mM Naphthalen, 0,25 oder 0,5 mM H₂O₂, 25°C. Die Zudosierung erfolgte einmalig oder durch dreimalige Zugabe über einen Zeitraum von 600 Sekunden.

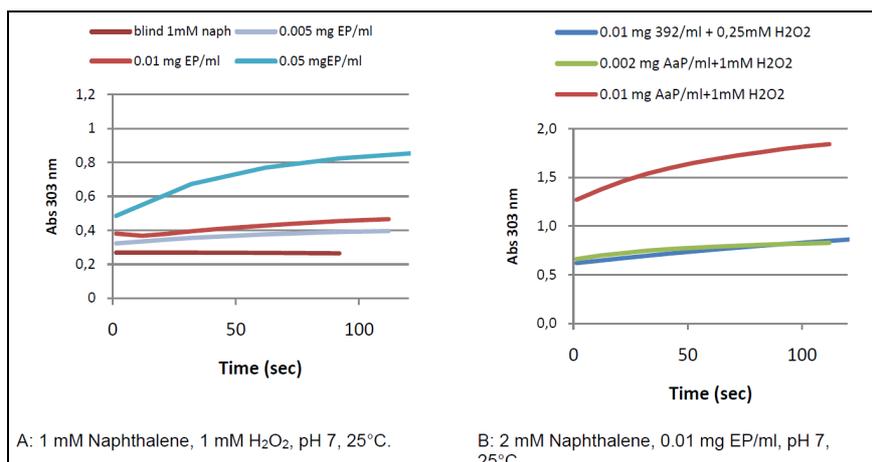


Abb. 10: Einfluss unterschiedlicher Konzentration von H₂O₂ auf die Hydroxylierung von Naphthalen im Vergleich zur AaP. Ansatz: 0,005 bis 0,05 mg WT392 Protein /ml bzw. 0,002 und 0,01 mg AaP Protein /ml, 1 mM Naphthalen, 0,25 mM H₂O₂ (WT392) oder 1 mM H₂O₂ (AaP), 25°C. Die Zudosierung von H₂O₂ erfolgte einmalig.

Eine Erhöhung der WT392 Enzymaktivität resultierte in einer gesteigerten Umsetzung von Naphthalen im photometrischen Hydroxylierungs-Assay (Abb. 10). Mit dem jetzigen Kenntnisstand erreicht die Peroxygenase WT392 ca. 20% der AaP Performance.

Ein Vergleich der Aktivitäten bei 25°C und 50 °C zeigte, dass die Aktivität von WT392 bei 25°C gegenüber 50°C um ca. 55% höher ist (Abb. 11).

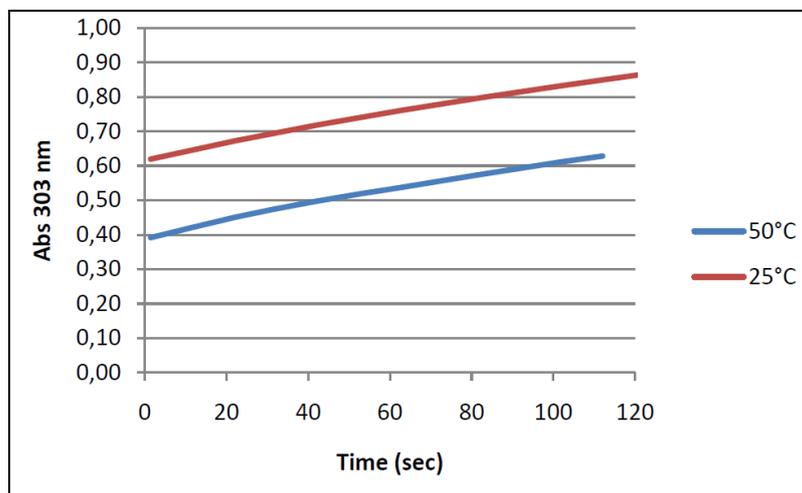


Abb. 11: Einfluss der Temperatur auf die Hydroxylierung von Naphthalen.

Daraus wird geschlossen, dass das Temperaturoptimum innerhalb des untersuchten Temperaturbereiches liegt. Die Temperaturstabilität von WT392 wurde mittels dynamischer Differenzkalorimetrie (10 mM Acetat-Puffer pH 5) auf 72,5°C bestimmt. Die Peroxygenase aus *Agrocybe aegerita* zeigt bei 50°C keinerlei verbleibende Restaktivität.

Einsatz molekularbiologischer Methoden zur Verbesserung der Peroxygenase-Eigenschaften (rationales Proteindesign, gerichtete Evolution)

Die Klonierung und Expression konnte erst mit voranschreitender Projektlaufzeit erfolgreich abgeschlossen werden. Molekularbiologische Verfahren zur Verbesserung von WT 392 und WT393 werden auch nach dem Abschluss des Projektes weiter fortgeführt.

Schwerpunkt: (R)-1-Phenylethanol

Die Arbeiten zur analytischen und präparativen Darstellung von (R)-1-Phenylethanol aus Ethylbenzol erfolgten in Kooperation zwischen den Partnern IHI Zittau, Chiracon GmbH und Hochschule Lausitz.

Ermittlung der prozesstechnischen Parameter bezüglich Umsatz und Ausbeute bei der enzymatischen Synthese von (*R*)-1-Phenylethanol

Für die Optimierung der Umsetzung von Ethylbenzol zu (*R*)-1-Phenylethanol wurde folgendes Versuchsdesign eingesetzt. In einem 1,5 ml HPLC-Vial wurden in einem Gesamtvolumen von 0,5 ml - 0,25 U *Agrocybe aegerita* Peroxygenase (AaP) (abweichend 0,05 - 1 U AaP), 20% Acetonitril in 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7 vorgelegt. In diese Vorlage wurde mittels Spritzenpumpe insgesamt 0,5 ml folgender Lösung dosiert:

- 1) äquimolare Lösung (jeweils 10 mM) von Ethylbenzol und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) $n_{\text{H}_2\text{O}_2}/n_{\text{Ethylbenzol}} = 1$ in 50% Acetonitril
- 2) Lösungen von Ethylbenzol und H_2O_2 (in Summe 20 mM) mit vorgegebenen Stoffmengenverhältnis ($n_{\text{H}_2\text{O}_2}/n_{\text{Ethylbenzol}}$) von 0,6 bis 1,2

Zusätzlich wurde die Flussrate von 0,5 bis 3,0 ml h⁻¹ (im Regelfall 3,0 ml h⁻¹) variiert. Am Ende der Umsetzung ergab sich ein Gesamtvolumen von 1,0 ml (5 mM Kaliumphosphatpuffer, 35% Acetonitril, in Summe 5 mM Ethylbenzol und Phenylethanol und als Folge einer weiteren Oxidation Acetophenon. Im Rahmen der Optimierung wurde jeweils ein Parameter der folgenden drei um einen Ausgangswert variiert:

- a) Flussrate der Ethylbenzol/ H_2O_2 -Dosierung,
- b) eingesetzte Peroxygenase-Menge (AaP)
- c) Stoffmengenverhältnis (H_2O_2 /Ethylbenzol, hohe Flussrate)
- d) Stoffmengenverhältnis (H_2O_2 /Ethylbenzol, geringe Flussrate)

Die Ausgangsparameter waren 3 ml h⁻¹ Flussrate, 0,25 U AaP (0,5 U ml⁻¹ in Vorlage, 0,25 U ml⁻¹ im Gesamtvolumen nach Dosierung) und ein Stoffmengenverhältnis von jeweils 10 mM Ethylbenzol und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (1). Die Ansätze wurden 1h nach Beendigung der Dosierung analysiert. Für die Analyse mittels HPLC wurde der Reaktionsansatz mit 0,5 ml Acetonitril versetzt, um die Löslichkeit der Analyten sicher zu stellen. Die quantitative Bestimmung erfolgte anhand der Peakflächen der Analyten bei 258 nm. Für die chromatographische Trennung wurde eine Umkehrphasensäule (Phenomenex Synergi FusionRP80 150mm x 4.6mm x 5 μ) mit einem Lösemittelgradienten bei 1ml min⁻¹ eluiert (A: 10 mM Ammoniumformiat, pH 3,2/ B: Acetonitril; 40->60% (8min) B). Die Umsetzung von Ethylbenzol durch AaP konnte sowohl in Hinblick auf die Bildung von Phenylethanol als auch auf die Minimierung von Acetophenon optimiert werden. Es wurden Endkonzentrationen von bis zu 3,8 mM

Phenylethanol und Selektivitäten (Verhältnis Acetophenon/Phenylethanol) von unter 5% erreicht.

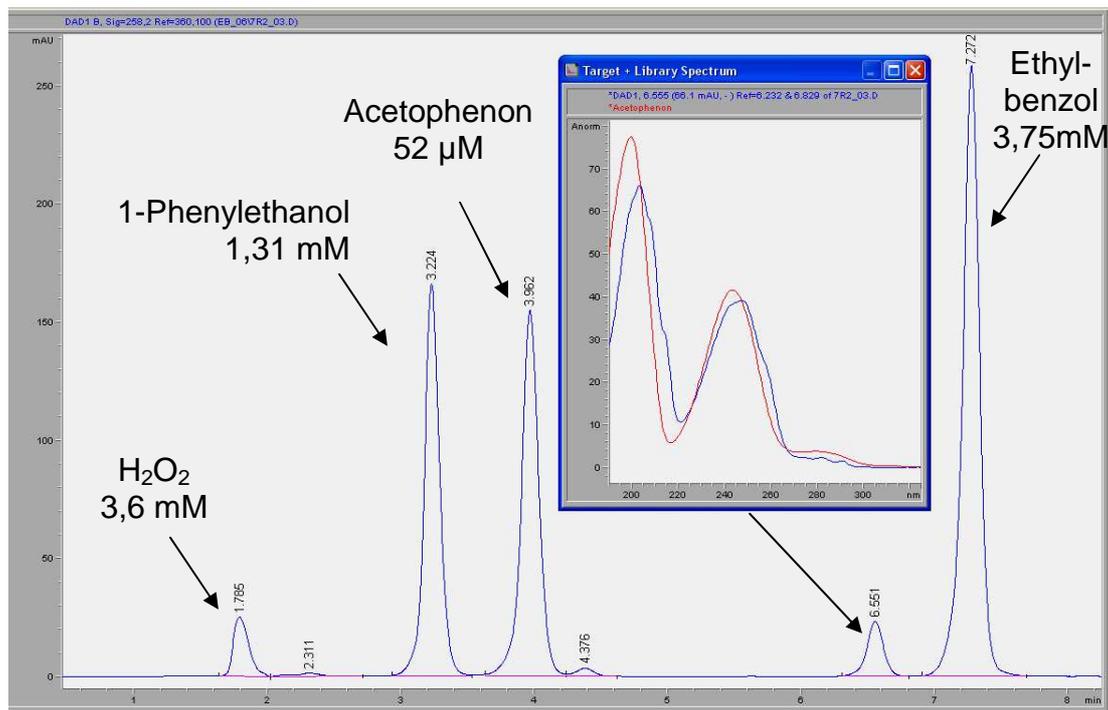


Abb. 12: HPLC-Chromatogramm (258 nm) der Umsetzung von Ethylbenzol zu Phenylethanol (primäres Produkt) und Acetophenon (sekundäres Produkt); Inset: UV-Spektrum (blau) eines unbekanntes Nebenprodukts ($TR = 6,55 \text{ min}$), Acetophenon (rot)

In geringen Mengen konnte ein weiteres Reaktionsprodukt nachgewiesen werden, bei dem es sich möglicherweise um 4-Hydroxyacetophenon handelt ($TR 6,55 \text{ min}$, UV-Spektrum ähnlich Acetophenon, Abb. 12).

Neben der optimierten Umsetzung von Ethylbenzol wurde versucht, die Quantitäten des gewünschten Produktes Phenylethanol zu verbessern.

Auf die Erhöhung der Phenylethanol-Endkonzentration wirkten sich positiv aus:

- eine geringe Flussrate $0,5\text{-}1,0 \text{ ml h}^{-1}$ (Abb. 13A)
- eine hohe Enzymmenge $0,5\text{-}1,0 \text{ U}$ (Abb. 13B)
- ein geringes H_2O_2 /Ethylbenzol Verhältnis ($X = 0,5\text{-}0,6$; H_2O_2 -Mangel!) bei hoher Flussrate ($3,0 \text{ ml h}^{-1}$, Abb. 13C)
- geringer Ethylbenzol Überschuss ($X = 0,9$) bei geringer Flussrate ($1,0 \text{ ml h}^{-1}$, Abb. 13D)

Die Selektivität für das Produkt Phenylethanol gegenüber der unerwünschten Überoxidation zu Acetophenon (Acetophenon/Phenylethanol: $0,6\text{-}15,9\%$) wurde ebenfalls untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass die Selektivität der Erhöhung der Phenylethanol-Endkonzentration („Produktivität“) diametral entgegen steht. Die

Konzentration an Acetophenon überstieg jedoch in keinem der durchgeführten Experimente 0,6 mM. Für die Minimierung des Acetophenon/Phenylethanol-Verhältnisses (hohe Selektivität) sind folgende Reaktionsbedingungen förderlich:

- hohe Flussraten ($2,0\text{-}3,0\text{ ml h}^{-1}$) resultieren in $<10\%$ (Abb. 13A)
- geringe Enzymmengen $0,05\text{-},025\text{ U AaP}$ ($0,6\text{-}5,5\%$) (Abb. 13B)
- leichter Einfluss von H_2O_2 -Mangel (Stoffmengenverhältnis <1) bei hohen Flussraten (3 ml h^{-1} : $4,7\%[X=1,2] - 4,0\%[X=0,6]$) (Abb. 13C)
- starker Einfluss von H_2O_2 -Mangel (Stoffmengenverhältnis <1) bei kleinen Flussraten (1 ml h^{-1} : $15,9\%[X=1,0] - 8,5\%[X=0,7]$) (Abb. 13D)

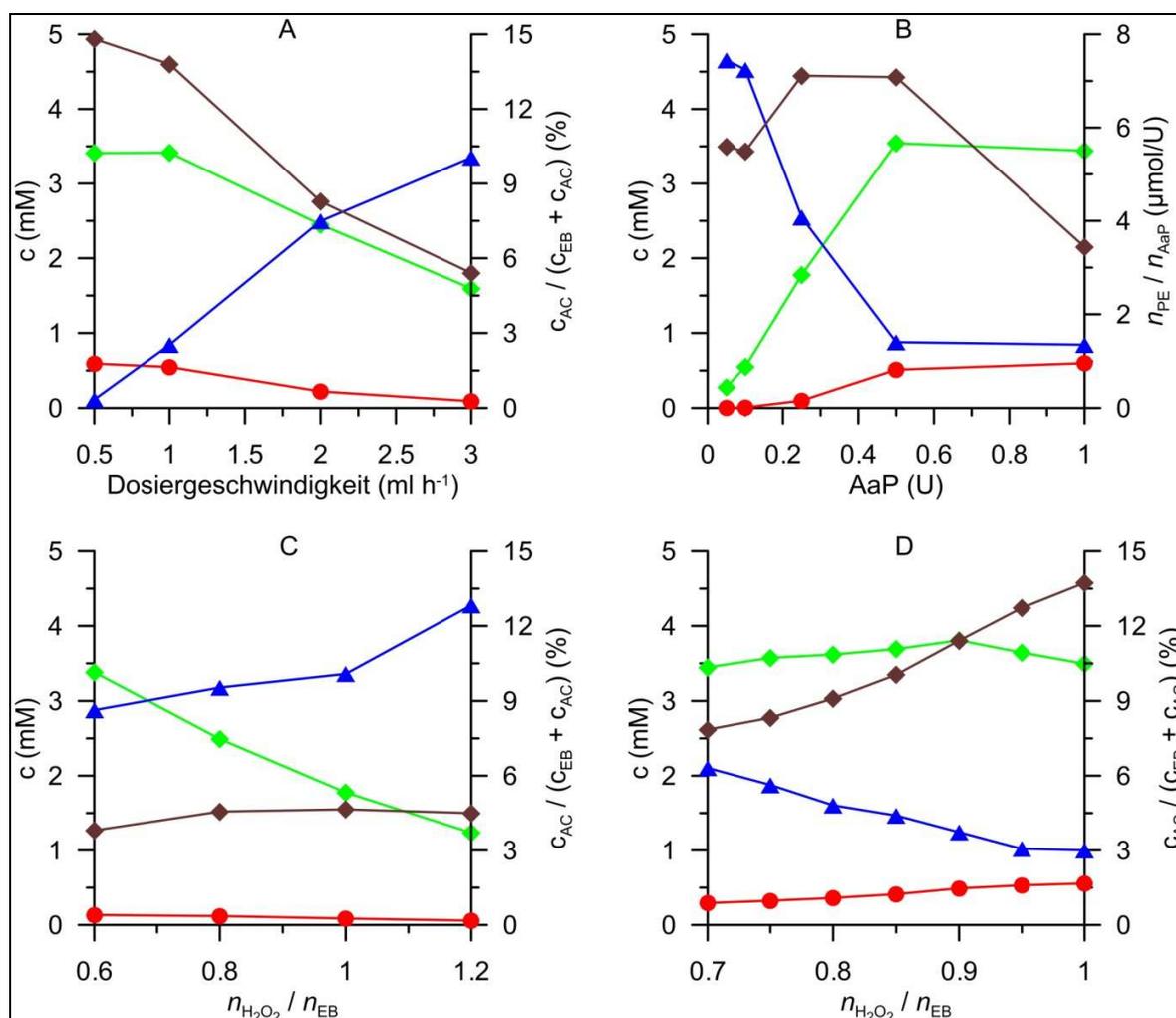


Abb. 13: Dargestellt sind die Endkonzentrationen von Ethylbenzol (EB), Phenylethanol (PE) und Acetophenon (AC) in Abhängigkeit von A) der Dosiergeschwindigkeit bei gleichbleibender Enzymmenge ($0,5\text{ U}$) (rechte Ordinate: Selektivität der Enzymreaktion; Acetophenon/Phenylethanol; braun), B) der eingesetzten AaP-Menge bei gleichbleibender Dosiergeschwindigkeit (3 ml h^{-1}) (rechte Ordinate: AaP-Effizienz bezogen auf Phenylethanol; Phenylethanol/AaP; braun), C) und D) des Stoffmengenverhältnisses von Wasserstoffperoxid und Ethylbenzol ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{EB}$) bei konstanter Flussrate ($C=3\text{ ml h}^{-1}$; $D=1\text{ ml h}^{-1}$) und gleichbleibender Enzym-Menge ($0,25\text{ U}$) (rechte Ordinate Größenachse: Selektivität der Enzymreaktion (Selektivität der Enzymreaktion; Acetophenon/Phenylethanol; braun).

Aus den durchgeführten Untersuchungen konnten folgende Schlussfolgerungen bezüglich der Verbesserung der AaP-Effizienz, bezogen auf die Bildung von Phenylethanol, getroffen werden:

- a) geringe Flussraten (0,5-1,0 mL/h) resultierten in einem hohen Stoffumsatz (*total turnover* ~3,5 mM Phenylethanol 0,25 U AaP) weitgehend unabhängig vom Stoffmengenverhältnis H₂O₂/Ethylbenzol (max = 0,9) (Abb. 13C und 13D)
- b) optimale Enzymmengen für dieses System waren 0,25 bis 0,5 U AaP (~7,1 µmol/U Phenylethanol; Abb. 13B)
- c) H₂O₂-Mangel (Stoffmengenverhältnis = 0,6) bei hoher Dosiergeschwindigkeit (3 ml h⁻¹) resultierten in einem hohen *total turnover* (~3,5 mM Phenylethanol 0,25 U AaP; Abb. 13C)

Optimierung der Wasserstoffperoxid-Dosierung

Die Aufgabenstellung wurde am IHI Zittau durch verschiedene Untersuchungen zur Substrat-Dosierung (primäres Substrat und Co-Substrat H₂O₂) bearbeitet und in den Untersuchungen zu den entsprechenden Modelverbindungen dargestellt.

Etablierung der quantitativen und der chiralen Analytik zum Verfolgen der enzymatischen Umsetzung von Ethylbenzol zu (*R*)-1-Phenylethanol und möglicher Nebenprodukte

Die quantitative und qualitative Analytik zur Verfolgung der enzymatischen Umsetzung von Ethylbenzol zu (*R*)-1-Phenylethanol und möglicher Nebenprodukte wurde durch die Firma Chiracon entwickelt. Für die GC-Analyse wurden 500 µl Probe aus dem wässrigen Reaktionsansatz entnommen und mit dem gleichen Volumen Dichlormethan extrahiert. Anschließend wurde für 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Aus der Methylenchloridphase wurden 100 µl entnommen und in ein HPLC-Vial überführt. Das Probenvolumen, das manuell in die GC-MS-Anlage eingespritzt wurde, betrug 1 µl. Es wurde eine GC-Analytik durch Verwendung einer Cyclodextrinsäule (Cyclodextrin G (6-Me-2,3-Pentylgamma- Cyclodextrin, 60% in PS 086) 25m, ID:0.25µm) etabliert, die es erlaubt, eine basisliniengetrennte gas-chromatographische Aufspaltung der beiden Zielstrukturenantiomere zu erhalten. Abbildung 14 zeigt die basisliniengetrennte gaschromatographische Aufspaltung des Racemats von 1-Phenylethanol woraus der Enantiomerenüberschuss (ee) berechnet werden konnte. Es ergab sich ein Wert von 97,1 % ee. Bei den im Rahmen dieses Projektes untersuchten Versuchsproben ergab sich ein sehr guter durchschnittlicher Enantiomerenüberschuss von 97 – 99,5 %. Die hier

entwickelte Analysenmethode ist nach den *Guidelines* der ICH Q2A bzw. Q2B (Validation of Analytical Methods (Definitions/Terminology) validierungsfähig.

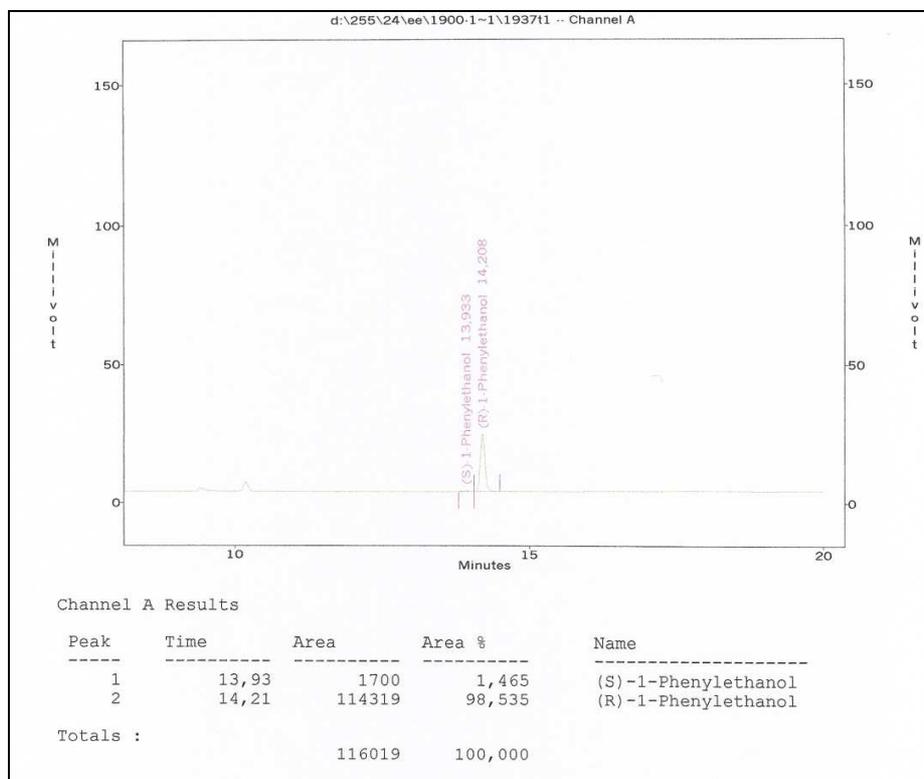


Abb. 14: Basisliniengetrennte gaschromatographische Aufspaltung des Racemats von 1-Phenylethanol

Umsatz- und Prozessentwicklung für die Herstellung von (*R*)-1-Phenylethanol mit Hilfe von Peroxygenasen, Optimierung der Produktgewinnung und Ausbeute

Nach erfolgreicher Etablierung der Biotransformation von Ethylbenzol im Labormaßstab, wurde ein Up-scaling durchgeführt, beginnend mit parallelen Ansätzen (Arbeitsvolumen: 3 l) in einem 4 l Glaskolben mit magnetischer Rührung.

Stöchiometrie der Ansätze:

- 2850 ml Enzymlösung (0,25 U/ml AaP in Kalium-Phosphatpuffer pH 7)
- 150 ml Ethylbenzol (2 g in 120 ml Acetonitril und 30 VE-Wasser, 0,4g H₂O₂)

Die Zugabe von Ethylbenzol erfolgte mit einem Tropftrichter. Zu der stark gerührten Enzymlösung wurde das Ethylbenzol innerhalb von einer Minute vollständig zugetropft. Im Ergebnis dieser Versuche sollten die stöchiometrischen Bedingungen der Transformation optimiert werden, daher erfolgte keine vollständige Aufarbeitung, sondern eine Extraktion mit MTBE (Methyl-tert.-butylether, 250 ml). Nach vollständiger Zugabe von Ethylbenzol wurde die Umsetzung über die Extraktion beendet und die organische Phase, nach Abtrennung und Trocknung über Natriumsulfat, im Vakuum eingengt (ca. 10 ml). In diesem Maßstab wurden insgesamt 12 Versuche durchgeführt.

Der Rückstand wurde direkt zur GC-Untersuchung verwendet (Abb. 15). Im Ergebnis der vorliegenden Versuche wurden durchschnittlich ca. 70-75% des reinen (*R*)-1-Phenylethanol gewonnen.

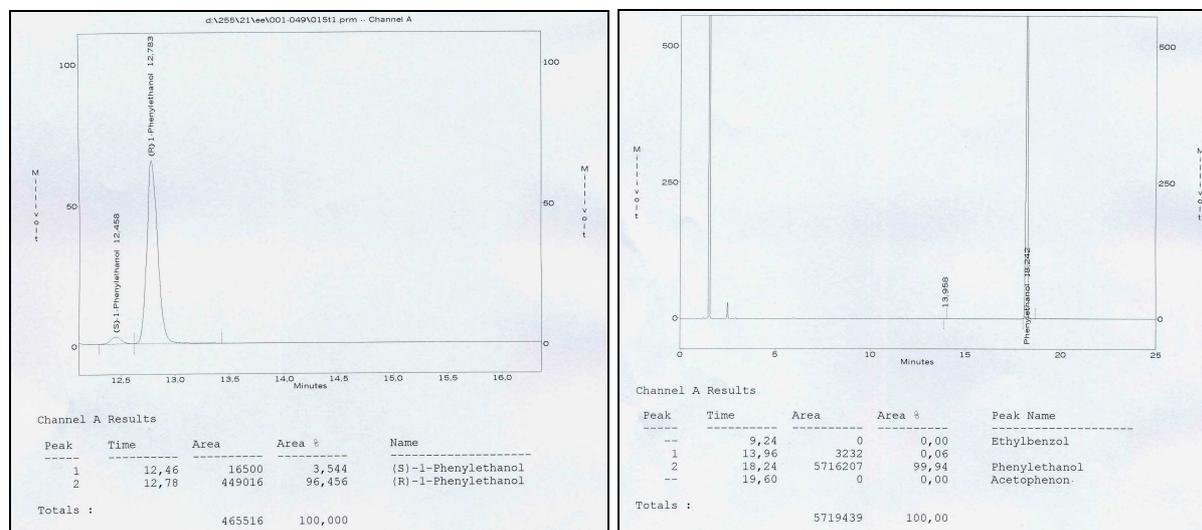


Abb. 15: Gaschromatogramme aus den 3L Versuchen mit Gehalt und Reinheit

Ein weiterer Untersuchungspunkt war der Erhalt der Stabilität des Wasserstoffperoxids in diesen relativ starken Verdünnungen. Zur Überprüfung des Wasserstoffperoxidüberschusses wurden 1,2 Äquivalente des Oxidationsmittels eingesetzt. Der zu erwartende Überschuss wurde nach der Umsetzung unter Verwendung eines Peroxid-Tests-Sets der Firma Merck überprüft. Im Ergebnis wurde festgestellt, dass eine vorzeitige Zersetzung auf Grund der großen Verdünnung des Wasserstoffperoxids nicht bestätigt werden konnte, da es stets möglich war, verbleibendes Peroxid nachzuweisen. Eine Erhöhung der Gesamtkonzentration an H_2O_2 führte zu keiner signifikanten Steigerung der Ausbeute an gewünschtem (*R*)-1-Phenylethanol. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine erhöhte Konzentration an H_2O_2 eine erste Inaktivierung des Enzympräparates bedingt.

Für die weitere Maßstabsvergrößerung wurde ein 30 l Glasreaktor mit Rühraufsatz verwendet. Die stöchiometrischen Verhältnisse wurden nicht verändert, sondern maßstabsgerecht um den Faktor 10 vergrößert. Die Zugabe des Ethylbenzols erfolgte über eine Schlauchpumpe. Die Zugabe und Aufarbeitung erfolgte entsprechend den zuvor beschriebenen Ansätzen mit einem Arbeitsvolumen von 3 Litern. Bei den ersten 30 l Ansätzen wurde nur eine abgekürzte Aufarbeitung, nach Zugabe von einem Liter Methyl-tert-butylether durchgeführt. Nach Phasentrennung konnte die wässrige Phase abgelassen und die organische Phase gewonnen werden. Nach Trocknung über Natriumsulfat und Einengung im Vakuum konnte der Rückstand mit Hilfe der GC

untersucht werden. Es zeigten sich reproduzierbare Produktverhältnisse wie im 3 Liter Maßstab.

Für die GC-Analyse der Enzymsätze wurde ein Vergleichsgemisch aus 300 g 1-Phenylethanol, 30 g Ethylbenzol und 30g Acetophenon eingesetzt.

Nach mehrfacher Extraktion des Versuchsgemisches mit Methyl-tert-butylether (MTBE) und anschließender Trocknung der Extrakte über Natriumsulfat, wurden die vereinigten Extrakte im Vakuum eingengt und einer Aufreinigung durch Destillation zugeführt (Destillationsapparat mit einer Vorlageblase von 1 Liter, Vigreux-Kolonnen von 75 cm in einem Vakuum von 30 mbar fraktioniert destilliert). Dabei wurden 3 Fraktionen separiert. Entsprechend dem Aufarbeitungsprotokoll war die Abtrennung von Ethylbenzol möglich, eine Trennung zwischen 1-Phenylethanol und Acetophenon erwies sich aber als schwierig. Aus den in Tabelle 4 zusammengefassten physikalischen Kenngrößen der zu trennenden Substanzen wird geschlussfolgert, dass der Anspruch an die Trennleistung der Destillationsanlage erhöht werden muss, da die Trennung von Substanzen erreicht werden soll, die sich im Siedepunkt um nur 2 K unterscheiden. Im Vakuum wird diese Differenz noch erniedrigt. Daher wurde eine Derivatisierung des unerwünschten Nebenproduktes Acetophenon, durch Zugabe von Semicarbazidhydrochlorid vorgenommen, wobei das Acetophenon im Destillationssumpf chemisch gebunden werden konnte. In Folge dessen wurde das 1-Phenylethanol abdestilliert und erfolgreich abgetrennt.

Tab. 4: Physikalische Daten der nach enzymatischer Umsetzung zu trennenden Substanzen 1-Phenylethanol und Acetophenon

	Siedepunkt in °C	Dichte in g/cm ³
Ethylbenzol	136 °C	0,87
Acetophenon	202°C	1,03
R-1-Phenylethanol	204°C	1,01
2-Phenylethanol	220°C	1,02

Zusätzlich wurde ein Verfahren zur säulenchromatographischen Trennung erprobt. Die enzymatische Synthese von (*R*)-1-Phenylethanol erfolgte dazu in einem Gesamtvolumen von 600 ml. Lösung 1 enthielt in 570 ml - 5 mM Kaliumphosphatpuffer, 142,5 Units AaP-Enzymlösung und 2% Acetonitril. Eine zweite „Feed“-Lösung von 30 ml enthielt 125 mM Ethylbenzol (0,259 g) und 75 mM H₂O₂ gelöst in 80% Acetonitril. Die Feedlösung wurde über einen Zeitraum von 45 Sekunden mit einer Dosiergeschwindigkeit von 3 l h⁻¹ in Lösung 1 überführt. Im Produktgemisch wurden 3,5 mM (*R*)-1-Phenylethanol, 2,6 mM Ethylbenzol und 0,14 mM Acetophenon festgestellt. Zunächst wurde mittels Ultrafiltration

(Cutt-Off 10 KDa) das Enzym von Edukt und Produkten getrennt. Die Produkte im Filtrat wurden kontinuierlich mit 100 ml Dichlormethan im Perforator, über einen Zeitraum von 2,5 Stunden extrahiert. Die Separation erfolgte mittels Säulenchromatographie. Es konnten vier Fraktionen separiert werden, die jeweils mittels GC untersucht wurden. Die Ausbeute an (*R*)-1-Phenylethanol wurde mit 48 % und einer Reinheit von 99,0% bestimmt. Insgesamt konnten so 0,22 g (*R*)-1-Phenylethanol gewonnen werden.

Schwerpunkt: 7-Hydroxymethotrexat

Die Arbeiten zur analytischen und präparativen Darstellung von 7-Hydroxymethotrexat aus Methotrexat erfolgten in Kooperation zwischen IHI Zittau, LGC GmbH und Hochschule Lausitz.

Ermittlung der prozesstechnischen Parameter bezüglich Umsatz und Ausbeute bei der enzymatischen Synthese von 7-Hydroxymethotrexat / Chemische Synthese von Substraten und potentiellen Metaboliten einschließlich der Etablierung der notwendigen Analytik zum Verfolgen der enzymatischen Umsetzung von Methotrexat zur 7-Hydroxymethotrexat und möglicher Nebenprodukte

Es konnte gezeigt werden, dass es mittels Peroxygenase aus *Agrocybe aegerita* und in Gegenwart von Wasserstoffperoxid möglich ist, Methotrexat umzusetzen (Abb. 16). Die höchsten Umsatzraten wurden mit einer Enzymkonzentration von 10 U ml⁻¹ und mit einer H₂O₂-Dosierrate von 6,67 nmol min⁻¹ erzielt. Die Ergebnisse zur Umsatzoptimierung sind in Tabelle 5 dargestellt.

Die chromatographische Analyse ergab die Bildung von sieben, bisher nicht bekannten Metaboliten. Das Chromatogramm und die UV-Vis Spektren sind in Abbildung 17 dargestellt. Das gewünschte 7-Hydroxymethotrexat konnte nicht identifiziert werden. Auf Grund der Ergebnisse wurde Propranolol als weiteres Substrat für die Ermittlung des Biokatalysepotentials der Peroxygenasen gewählt.

Tab. 5: Untersuchungen zum Umsatz von Methotrexat mittels AaP unter Einsatz einer Spritzenpumpe zur H₂O₂-Dosierung

AaP (U/ml)	H ₂ O ₂ (mM)	H ₂ O ₂ nmol min ⁻¹	Umsatz (µM)	Einsatz (µM)
5	0,5	8,3	26,8	250
5	0,5	16,6	24,3	100
5	4,2	6,6	41,5	100
10	4,0	33,3	30,1	100
10	8,0	6,67	49,4	100

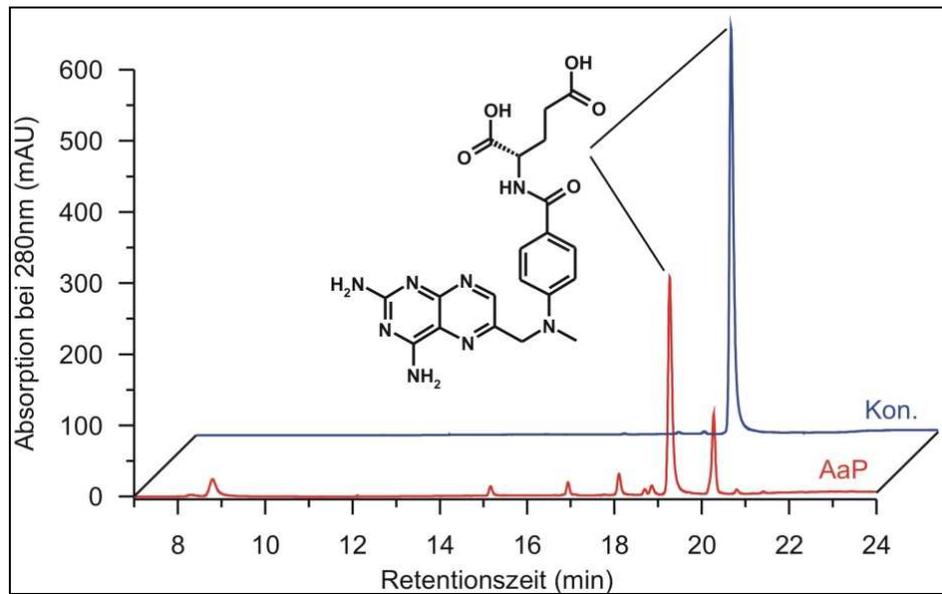


Abb. 16: HPLC-Elutionsprofil (280nm) der Umsetzung von Methotrexat mit AaP (rot) und die Kontrolle ohne Enzym (blau)

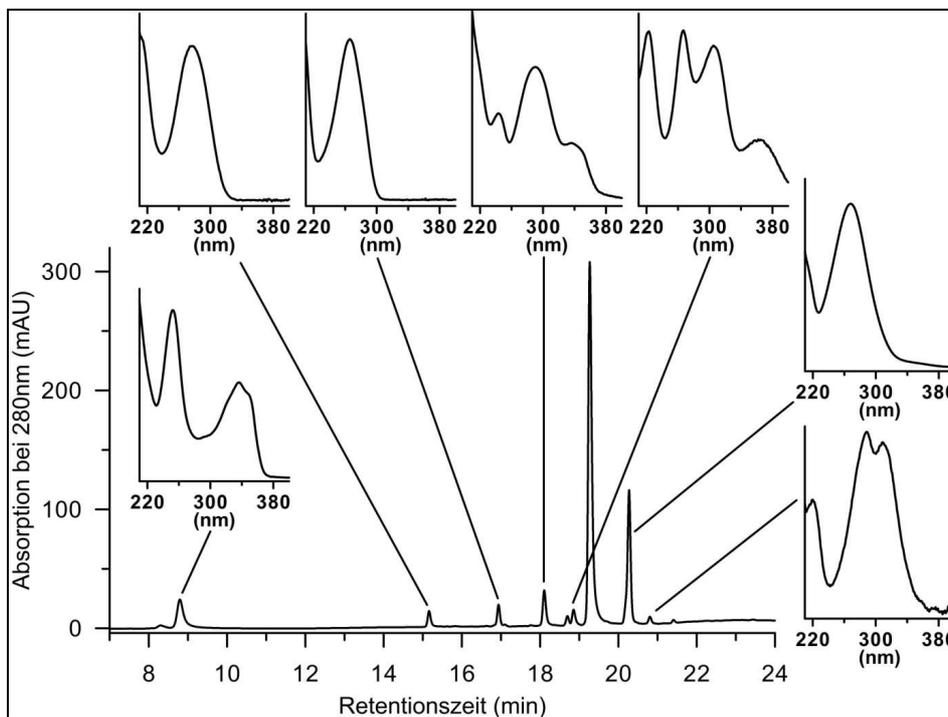


Abb. 17: HPLC-Elutionsprofil (280nm) der Umsetzung von Methotrexat mit AaP (10 U ml^{-1}) und H_2O_2 (theoretische Endkonzentration 8 mM nach $1200 \text{ min} = 400 \text{ nmol h}^{-1}$)

Schwerpunkt: 5-Hydroxypropranolol

Da sich die Analytik, der aus der enzymatischen Umsetzung von Methotrexat resultierenden Reaktionsprodukte als sehr aufwendig und schwierig herausstellte, wurde als weiteres Substrat der Betablocker Propranolol zur enzymatischen Darstellung des humanen Metaboliten 5-Hydroxypropranolol ausgewählt. Die vorliegenden Untersuchungen erfolgten in Kooperation zwischen Hochschule Lausitz und IHI Zittau.

Ermittlung der prozesstechnischen Parameter bezüglich Umsatz und Ausbeute bei der enzymatischen Synthese von 5-Hydroxypropranolol

Um eine Optimierung der Produktausbeute bei der enzymkatalysierten Hydroxylierung von Propranolol zu erreichen, wurden die Katalyseparameter hinsichtlich pH-Wert, Enzymanteil, Konzentration von Substrat und Kosubstrat, einschließlich Dosierung variiert. Die Reaktion wurde bei pH-Werten von 3,0; 4,0; 5,5; 7,0; 8,0 durchgeführt. Die Enzymaktivität der *Agrocybe aegerita* Peroxygenase variierte zwischen 2 U/ml, 5 U/ml und 10 U/ml. Die Eduktkonzentration an Propranolol betrug 0,5; 2,5; 5 und 10 mM. Parallel dazu wurden H₂O₂-Konzentrationen von 0,5; 5 und 10 mM eingesetzt.

Um den Einfluss der Reaktionsführung zu untersuchen, wurden Versuchsansätze mit kontinuierlicher Dosierung über eine Spritzenpumpe (feed-batch) und Ansätze ohne Spritzenpumpe (batch) verglichen. Das Reaktionsvolumen betrug jeweils 10 ml. Bei beiden Verfahren erfolgte die Aufteilung in zwei Reaktionsgefäße. Reaktionsgefäß 1 (Gesamtvolumen: 5 ml) enthielt Propranolol (10 mM), Ascorbinsäure (8 mM), AaP (2 U/ml) gelöst in einem Citrat-Phosphat-Puffer pH 7,0. Reaktionsgefäß 2 (Gesamtvolumen: 5 ml) beinhaltete ausschließlich Wasserstoffperoxid (10 mM) gelöst in H₂O bidest. Im feed-batch wurde der Inhalt von Reaktionsgefäß 2 über einen Zeitraum von 15 min in das Reaktionsgefäß 1 zudosiert. Im batch-Verfahren wurde das gesamte Volumen von Reaktionsgefäß 2 direkt in das Reaktionsgefäß 1 überführt. Die Reaktion erfolgte ebenfalls über 15 min.

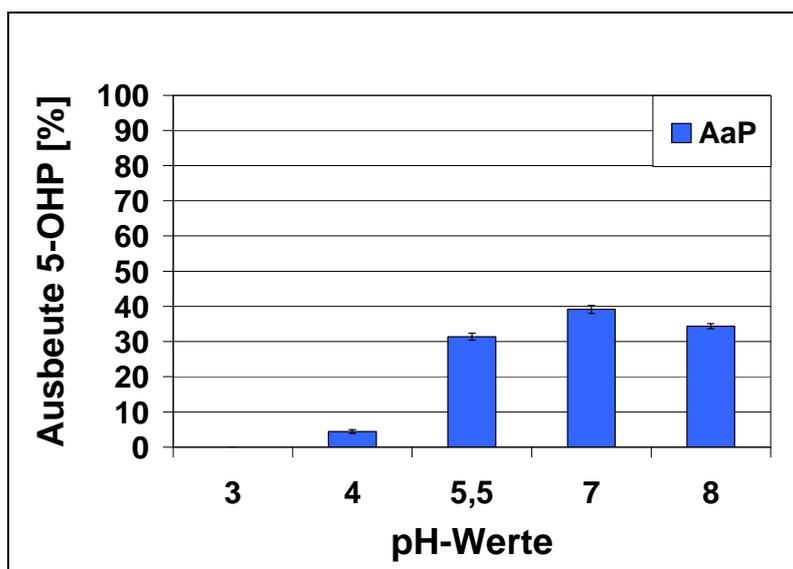


Abb. 18: Erzielte Ausbeuten an 5-Hydroxypropranolol in Prozent nach Umsetzung von Propranolol (0,5 mM) bei verschiedenen pH-Werten, AaP: 2 U/ml, H₂O₂: 5mM über einen Zeitraum von 15 min; batch.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten, dass die Peroxygenasen-vermittelte Synthese von 5-Hydroxypropranolol in einem pH-Bereich von pH 4,0 bis pH 8,0 möglich war (Abbildung 18). Bei pH 3,0 kam es zu keiner Produktbildung. Die höchsten Produktausbeuten mit der AaP (39,3 %) wurden bei pH 7,0, die geringsten bei pH 4,0 (4,4 %) erzielt. Im leicht sauren pH-Bereich (pH 5,5) betrug die Ausbeute 31,4 % und im schwach basischen (pH 8,0) ca. 34,4 %.

Die höchsten Ausbeuten von 39,3 % bei der Umsetzung von 0,5 mM Propranolol wurden bei 2 U/ml AaP und 5 mM Wasserstoffperoxid erreicht. Eine Erhöhung der Enzymaktivität bei dieser Kosubstratkonzentration auf 5 U/ml bzw. 10 U/ml führte zur Abnahme der Ausbeute auf 36,1 % bzw. 34,5 %. Bei einer Enzymaktivität von 2 U/ml und der Steigerung der Peroxidkonzentration von 5 mM auf 10 mM sank die Ausbeute auf 35,3 %. Die geringste Ausbeute von 25,9 % wurde bei 2 mM H_2O_2 und 10 U/ml detektiert. (Abb. 19)

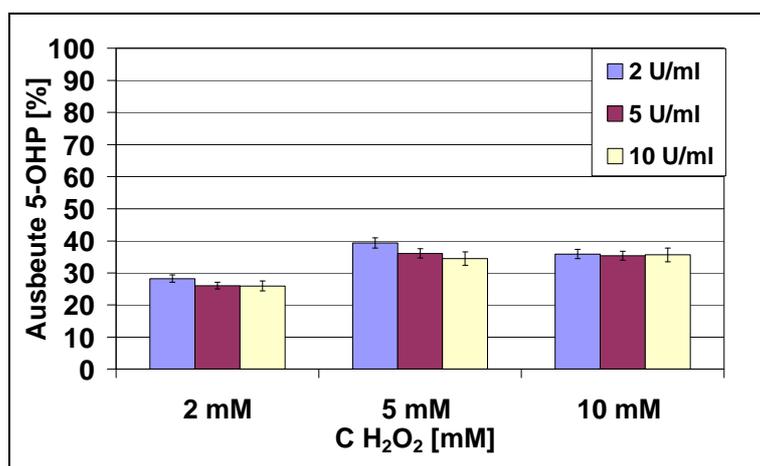


Abb. 19 : Erzielte Ausbeuten an 5-Hydroxypropranolol in Prozent nach Umsetzung von Propranolol (0,5 mM) im 1 ml Maßstab bei verschiedenen Enzymaktivitäten und Peroxidkonzentrationen; batch 15 min, pH 7,0.

Für die Bestimmung der optimalen Propranololkonzentration wurde das Edukt mit 0,5, 2,5, 5 bzw. 10 mM in einem 1 ml Reaktionsansatz mit 5 mM H_2O_2 enzymkatalysiert umgesetzt. Die Enzymaktivität betrug 2 U/ml AaP.

Mit zunehmender Eduktkonzentration sank die Ausbeute an 5-Hydroxypropranolol. Die höchste Ausbeute von 39,3 % wurde bei einer Propranololkonzentration von 0,5 mM gemessen. Der höchste theoretische Gehalt von 0,357 mg/ml konnte bei der AaP-Umsetzung von 5 mM Propranolol erreicht werden. Die Steigerung der Eduktkonzentration auf 10 mM führte zur Abnahme des Gehalts an 5-Hydroxypropranolol auf 0,091 mg/ml. Bei diesem Ansatz wurde weiterhin das Nebenprodukt 1-Naphthol detektiert, dessen Anteil bei 4,4 %, bezogen auf die

Eduktkonzentration, lag. Bei allen anderen hier untersuchten Reaktionsansätzen wurde kein 1-Naphthol mittels HPLC detektiert. (Tab. 6)

Tab. 6: Ausbeuten bei Steigerung der Propranololkonzentration bei konstanten Reaktionsparametern: AaP: 2 U/ml, H₂O₂: 5 mM, batch 15min und pH 7.

Lfd.-Nr.	Eduktkonzentration [mM]	Ausbeute 5-OHP [%]	Gehalt 5-OHP [mg/ml]
1	0,5	39,3	0,054
2	2,5	29,3	0,202
3	5	25,9	0,357
4	10	3,3	0,091

Die Art der Reaktionsführung hatte ebenfalls großen Einfluss auf die Menge an entstehendem Produkt. Bei einmaliger Zugabe von Wasserstoffperoxid (batch) wurden im Vergleich zur kontinuierlichen Zudosierung ca. 80% höhere Ausbeuten an 5-Hydroxypropranolol erzielt. Bei der AaP-Biokatalyse sank bei kontinuierlicher Zudosierung des Kosubstrates die Ausbeute an 5-Hydroxypropranolol von 25,9 % (batch) auf 4,9 % (Abb. 20). Zusätzlich wurde im feed-batch 1-Naphthol zu 0,85 % (bezogen auf Eduktkonzentration) detektiert.

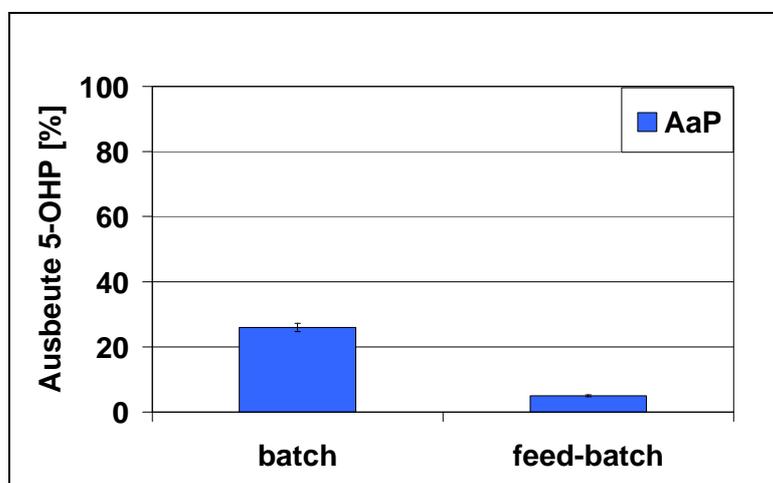


Abb. 20: Gegenüberstellung der Ausbeuten an 5-Hydroxypropranolol in Prozent nach Umsetzung von Propranolol (5 mM) im batch (einmalige Zugabe H₂O₂, Gesamtvolumen: 10ml) und feed-batch (Zudosierung 5ml H₂O₂ – Lösung zu 5ml Puffer/Enzym/Substrat-Vorlage mit Spritzenpumpe: 5ml/h). H₂O₂: 5 mM; AaP: 2 U/m; pH 7,0

Umsatz- und Prozessentwicklung für die enzymkatalysierte Herstellung von 5-Hydroxypropranolol, Optimierung der Produktgewinnung

Für die Umsetzung von Propranolol im Enzym-Membranreaktor wurde eine Eduktkonzentration von 5 mM gewählt. Das Reaktionsvolumen betrug 200 ml. Die Umsetzung von 259,34 mg Propranolol (5mM, eingesetzt als racemisches Hydrochlorid,

298,5 mg) wurde bei Raumtemperatur durch 400 Units AaP in einem Citrat-Phosphat-Puffer (pH 7,0) durchgeführt. Die Ascorbinsäurekonzentration im Ansatz betrug 4 mM. Durch die einmalige Zugabe von Wasserstoffperoxid (batch-Verfahren) wurde die Reaktion gestartet, sodass eine Endkonzentration von 5 mM an H_2O_2 vorlag. Nach 5 min wurde ein Aliquot entnommen und mittels HPLC analysiert. Die Ausbeute an 5-Hydroxypropranolol betrug 21,8 %, was einer Gesamtmasse von 60,16 mg/ 200 ml entspricht. Die im Enzym-Membran-Reaktor erzielte Ausbeute war im Vergleich zu jener, die im 1 ml Maßstab erzielt wurde, um 4,1 % geringer.

Zur Aufarbeitung wurde im ersten Schritt Produkt und Edukt von höhermolekularen Bestandteilen der Reaktionsmischung (Protein aus Enzymlösung) über eine Membran (Ausschlussgrenze: 10 kDa) und einem Druck von 2 bar separiert. Das Filtrat wurde in einem auf Eis gekühltem und dunklem Gefäß aufgefangen, um die licht- und wärmeempfindlichen Substanzen, Propranolol und 5-Hydroxypropranolol, zu schonen (Ebel et al. 1999). Am Rotationsverdampfer (Stickstoff-Atmosphäre, abgedunkelt) wurde die Lösung bei 40 °C und 70 mbar auf 50 ml eingengt. Zur Rückgewinnung von Propranolol wurde der Ansatz mit konzentrierter Natriumhydroxid- und 1 M Natriumcarbonat-Lösung auf einen pH-Wert von 12,0 eingestellt. Bei diesem pH-Wert ist das 5-Hydroxypropranolol durch die phenolische Gruppe wasserlöslich und das Propranolol liegt noch als freie Base vor. Der ausfallende Feststoff wurde mit 3 x 80 ml Cyclohexan für je 5 min im Scheidetrichter extrahiert. Die erhaltenen Cyclohexanphasen wurden vereinigt und über 15 g Natriumsulfat getrocknet. Die Rückgewinnung des Lösungsmittels erfolgte am Rotationsverdampfer (Stickstoff-Atmosphäre, abgedunkelt) bei einer Temperatur von 40 °C und 235 mbar. Der Rückstand wurde anschließend an der Ölpumpe unter Vakuum für 1 h getrocknet. Für die Isolierung von 5-Hydroxypropranolol wurden die verbliebenen 50 ml der wässrigen Phase mit 10 %iger Salzsäure auf einen pH Wert von 9,6 eingestellt, da bei diesem pH die amphotere Verbindung als freie Base vorliegt (Walle et al. 1981) und mit 3 x 50 ml Ethylacetat für je 5 min im Scheidetrichter extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über 12 g Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bei 240 mbar und 40°C (Stickstoff-Atmosphäre, abgedunkelt) entfernt. Schmelzpunktbestimmung, Dünnschichtchromatographie-Analysen und HPLC-Analysen dienen der Charakterisierung des Rückstandes.

Für die folgende qualitative Dünnschichtchromatographie-Analyse (DC) wurde eine Spatelspitze des getrockneten 5-Hydroxypropranolols in 100 µl Ethylacetat aufgenommen und analysiert.

Der gesamte Rückstand wurde in 10 ml 0,5 M Salzsäure gelöst und mittels HPLC analysiert. Die verbliebene wässrige Phase aus der Ethylacetatextraktion wurde ebenfalls durch HPLC analysiert. (Säule: Phenomenex LiChrospher (4.6 x 150 mm); Flussrate: 1 ml/min; Laufmittel: Phosphatpuffer (20 mM, pH 2,8) und Acetonitril, 100:0 über 3 min; gefolgt von einem linearen Gradienten bis 40% Acetonitril über 12 min). In Tabelle 7 ist das Reinigungsprotokoll zur Isolierung von Propranolol und 5-Hydroxypropranolol aus dem enzymatischen Syntheseansatz dargestellt. Mit diesem Verfahren zur Isolierung von Produkt und Edukt aus dem enzymatischen Ansatz konnten 88,4 %, 175,85 mg, an Propranolol als freie Base zurück gewonnen werden. Durch HPLC (Retentionszeit: 8,76 min, Abb. 21) und DC Analyse (DCNP: $R_f = 0,3$; DCRP: $R_f = 0,05$) des farblosen, kristallinen Rückstandes konnten keine Verunreinigungen detektiert werden. Der Schmelzpunkt betrug 92,2 °C (Lit. 92 °C (Ebel et al. 1999)).

Tab. 7: Verfahrensschritte zur Isolierung von Produkt und Edukt

Verfahrensschritt	Bestimmte Gesamtmassen an 5-OHP [mg]	Bestimmte Gesamtmassen an Propranolol [mg]	Volumen [ml]
1. Biomembranreaktor	60,16	198,97	200
2. Rückstand im Bioreaktor	2,27	6,69	5
3. Filtrat nach Membranreinigung	57,89	193,28	195
4. Rückstand aus Cyclohexanextraktion bei pH 12,0	n.d.	175,85	-
5. Rückstand aus Ethylacetatextraktion bei pH 9,6	39,89	0,74	-
6. Rückstand wässrige Phase	1,95	n.d.	50

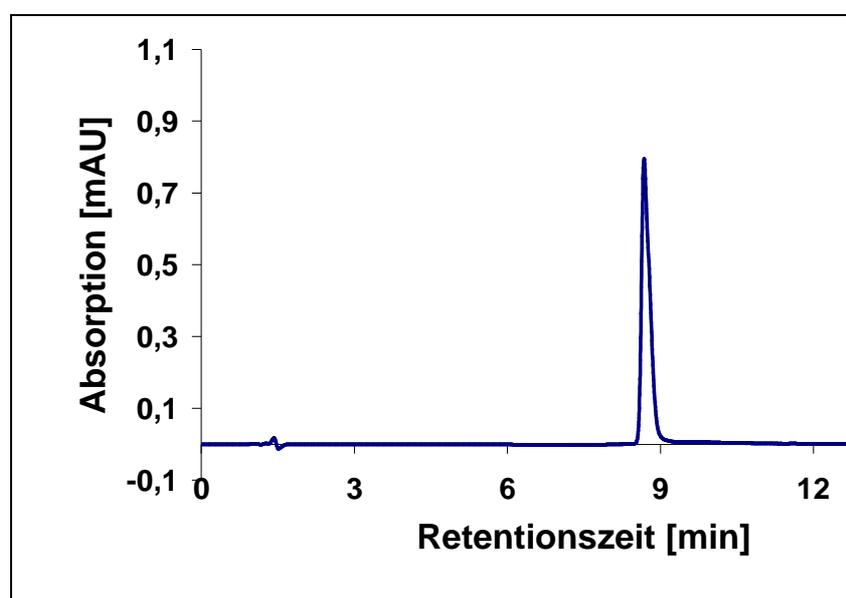


Abb. 21: Chromatogramm des isolierten Propranolols nach Cyclohexanextraktion bei pH12

Bei dem Rückstand (Retentionszeit: 4,22 min, Abb. 22; DCNP: $R_f = 0,6$; DCRP: $R_f = 0,45$), der nach der Ethylacetatextraktion bei pH 9,6 erhalten wurde, handelte es sich um 5-Hydroxypropranolol, dass zu 1,82 % (w/w) mit Propranolol verunreinigt war. Weiterhin wurden noch Spuren von unbekanntem Verunreinigungen (Retentionszeit: 2,8 min; 3,05 min; 11,05 min) detektiert (Abb. 22). Diese stammen hauptsächlich vom Ethylacetat, das vor Gebrauch erst destilliert werden musste und ebenfalls der HPLC-Analyse unterzogen wurde. Schließlich konnten 66,3 % an 5-Hydroxypropranolol bezogen auf die bestimmte Gesamtmenge, die nach der Synthese erhalten wurde, gewonnen werden. Dies entsprach einer Gesamtmenge von ca. 40 mg. Die Raum-Zeit-Ausbeute liegt bei 87,5 g 5-Hydroxypropranolol pro Liter und Tag.

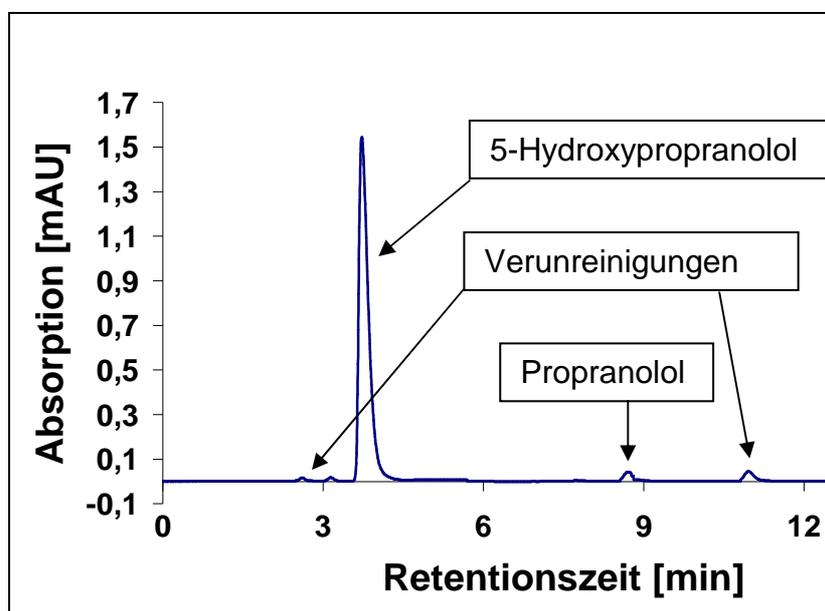


Abb. 22: Chromatogramm des isolierten 5-Hydroxypropranolols. Rückstand aus Ethylacetatextraktion bei pH 9,6

Ermittlung optimaler Zellbiologischer Parameter bei der Herstellung von Metaboliten in Hepa-FHn Zellen

Schwerpunkt der bisherigen Arbeiten lag auf der enzymatischen Darstellung von 5-Hydroxypropranolol durch pilzliche Peroxygenasen. Grundsätzlich ist jedoch davon auszugehen, dass Peroxygenasen nicht alle humanen Metabolite erzeugen können, die auch in Leberzellen zu erwarten sind (Otey et al. 2006, Marvalin et al. 2011). Mittels einer humanen Leberzelllinie, welche alle für den Metabolismus von Medikamenten wesentlichen Phase I Enzyme (CYP1A2, -2B6, -2C8, -2C9, -2C19, -2D6 und -3A4) enthält, sollten nach Inkubation mit Propranolol die möglichen Metabolite identifiziert und mit den Peroxygenase-Versuchsergebnissen verglichen werden. Die Aufnahme von Propranolol in isolierte Ratten Hepatozyten wurde bereits beschrieben (Halifax et al.

2006). In humanen Lebermikrosomen, wie auch mit rekombinant, in Hefezellen exprimierten humanen CYP1D6 konnten die Metabolite 4-Hydroxypropranolol, 5-Hydroxypropranolol und N-Desisopropylpropranolol nachgewiesen werden. Hauptmetabolit war stets das 4-Hydroxypropranolol (Bichara et al. 1996, Masubuchi et al. 1994). In Versuchsansätzen mit rekombinanten CYP102A1/2C11 aus *Bacillus megaterium* oder einem zellbasierten Assay mit *Cunninghamella bainieri* konnten die zuvor beschriebenen Metabolite ebenfalls nachgewiesen werden (Otey et al. 2006, Foster et al. 1989). Zur chromatographischen Metabolitenanalyse der Hepa-FHn Zellen wurden diese vollständig aufgeschlossen.

Hierfür wurde eine $1,35 \times 10^7$ Zellen enthaltende Zellkulturflasche, mit 150 cm^2 Wachstumsfläche genutzt. Die Hepatozyten wurden zunächst zur CypP450 Induktion 24 Stunden mit $50 \text{ }\mu\text{M}$ Rifampicin (für Cyp2C19, Cyp2D6; Cyp3A4) sowie $50 \text{ }\mu\text{M}$ Omeprazol (für Cyp1A2) in 20 ml Hepatozytenmedium inkubiert. Anschließend wurde das Medium durch frisches ersetzt, welches $100 \text{ }\mu\text{M}$ Propranolol enthielt. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgenommen und die adherenten Zellen drei Mal mit jeweils 20 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Die Separation der Zellen vom Flaschenboden erfolgte durch 10 minütige Inkubation mit 4 ml 1x Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA). Die anschließende Zugabe von 16 ml Hepatozytenmedium mit 5 % Fetalem Kälberserum (FBS) diente der Inhibierung des Enzyms Trypsin. Die Suspension mit den Zellen wurde 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch Einfrieren bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ und anschließenden Auftauen bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$ und Ultraschall. Insgesamt wurde dieser Vorgang zwei Mal wiederholt. Die Überstände des Mediums wurden zur Extraktion anschließend 3 x mit dem gleichen Volumen Natriumacetat versetzt, die Überstände des Zellaufschlusses mit jeweils 3 x 1,5 ml Natriumacetat. Die Ansätze wurden nach jedem Extraktionsschritt 5 min bei 8000 rpm zentrifugiert und die organische Phase abgenommen. Diese wurde bei 240 mbar und 40°C am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Die festen Bestandteile wurden in 0,5 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um störende Präzipitate abzutrennen und einer anschließenden Analyse mittels HPLC unterzogen.

Der identifizierte Hauptmetabolit war 4-Hydroxypropranolol-Glucuronid. Bedingt durch die ebenfalls in den Zellen enthaltene Phase II Enzyme (UDP-glucuronosyltransferasen) wurde bei dem hier beschriebenen Verfahren die glucuronidierte Form von 4-Hydroxypropranolol als Nachfolgemetabolit der Phase I P450 Monooxygenasen nachgewiesen. Viele UDP-glucuronosyltransferasen (UGT) sind angewiesen auf die Phosphorylierung durch die Protein Kinase C (PKC) für

glucuronidierende Aktivität in Phase II. Die Inhibition der UGT Phosphorylierung durch PKC Inhibitoren stellt somit einen möglichen Schlüssel für die Gewinnung der Metabolite aus Phase I dar (Volak et al. 2010). Auf Grund der geringen Ausbeute konnte noch keine Aussage über die entstanden Mengen oder weitere Metabolite getroffen werden. In Zusammenarbeit mit dem IHI Zittau erfolgt zur Zeit eine quantifizierende Analyse (HPLC-MS) der entstandenen Metabolite.

Schwerpunkt: Ökoeffizienzanalyse

Umweltbewertung und Wirtschaftlichkeitsbetrachtung im Vergleich zu bestehenden Verfahren

Ob ein neu entwickeltes, biochemisches Verfahren tatsächlich nachhaltiger und mit geringeren Gefahren für die Umwelt verbunden ist als ein vergleichbarer chemischer oder biotechnologischer Produktionsprozess, muss für jeden Einzelfall untersucht werden. Zudem werden die wesentlichen Faktoren, die Produktionskosten und ökologische Belastungen späterer Produktionsverfahren bestimmen, in sehr frühen Phasen der Prozessentwicklung festgelegt (Heinzle et al. 2006). Daher wurden die vorgestellten Peroxygenase-Verfahren projektbegleitend mittels einer Ökoeffizienzanalyse untersucht. Für die Erstellung der Ökoeffizienzanalyse wurden drei verschiedene Programme hinsichtlich Aufgabenstellung und Zielsetzung des Projektes verglichen:

- EATOS (M. Eissen und J.O. Metzger), ein kostenloses Programm, welches momentan nicht weiterentwickelt wird
- Sabento (ifu Hamburg GmbH), als Internet-Demo verfügbar
- SuperPro Designer (Intelligen, Inc.), eine kostenlose lauffähige Probeversion für die Testung von Programmaufbau und Bedienbarkeit

Die für die vorliegenden Studien eingesetzte Software Sabento (ifu Hamburg GmbH) wurde in Bezug auf vergleichsweise schnell zu ermittelnde Eingangsdaten als gut geeignet ausgewählt. Mit Hilfe einer auf ihrem Gefährdungspotential basierenden Klassifizierung der verwendeten Stoffe (Abb. 23), ließen sich kritische Punkte der zu entwickelnden Verfahren gut identifizieren und es konnten noch während der Verfahrensentwicklung Hinweise zur Verbesserung der Nachhaltigkeit vorgenommen werden (Brinkmann et al. 2010).

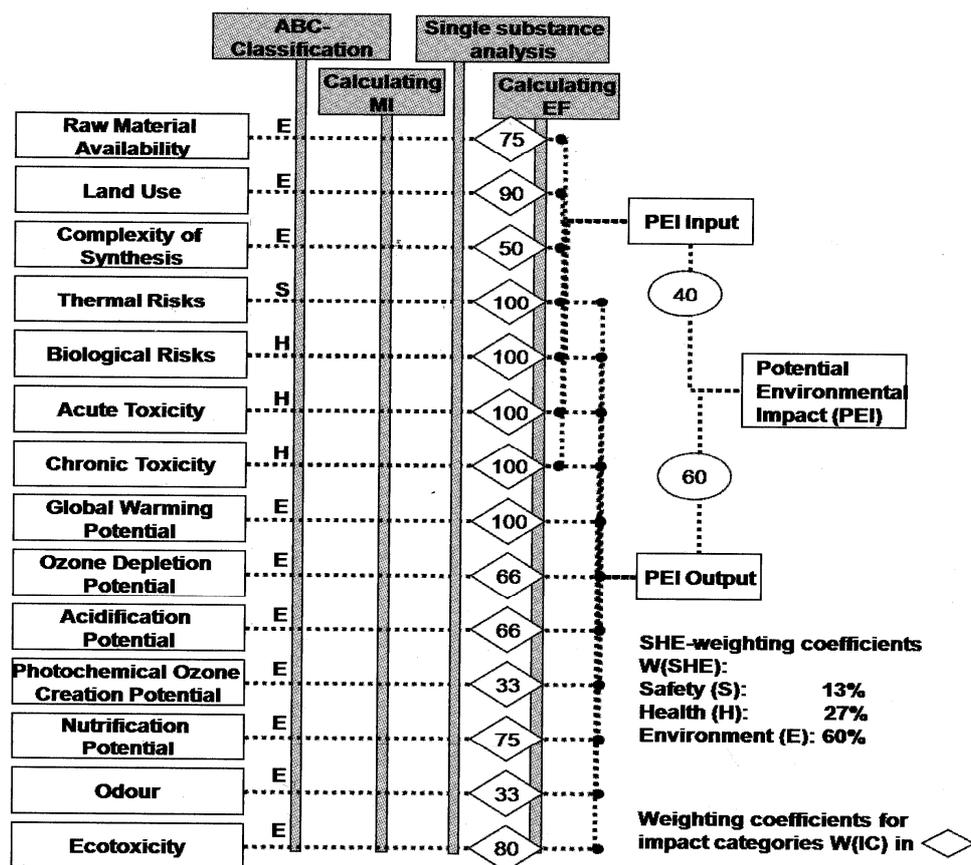


Abb. 23: Ökologisches Bewertungssystem von Sabento (aus Brinkmann et al. 2010, nach Heinzle et al. 2006). Hiernach wird jeder Stoff bezüglich 14 Wirkungskategorien (wie z.B. Rohstoffverfügbarkeit, Landverbrauch) jeweils einer von 3 Bewertungsklassen nach einer qualitativen ABC Klassifizierung (problematisch, wenig problematisch, unproblematisch) zugeordnet. Über Wichtungskoeffizienten (W(IC)) werden die einzelnen Wirkungskategorien untereinander gewichtet, mit dem Ziel, einen Gesamtindikator zur Umweltbewertung zu erhalten. Hiernach erhält das thermische Risiko mit einem Wichtungskoeffizienten von 100 eine doppelt so hohe Bedeutung wie z.B. die Komplexität der Synthese mit 50. In einem arithmetischen Verfahren wird mit diesen Angaben für jeden Stoff nun jeweils für die sieben Bewertungskategorien der Input- und jeweils elf Kategorien der Outputseite ein Umweltfaktor (EF) berechnet. Für jeden Stoff ist in Sabento zudem auch der Massenindex (MI) ermittelt worden, der aussagt, wieviel kg eines Stoffs pro kg Produkt verbraucht werden. Durch Multiplikation des Umweltfaktors mit dem Massenindex jedes einzelnen Stoffes und anschließender Addition der Werte aller Stoffe der Input- bzw. der Outputseite ergeben sich die Umweltbewertungszahlen für den Input (PEI Input) und Output (PEI Output). Mit einem Wichtungsverhältnis von Input zu Output von 40:60 werden die beiden Werte zu einer Gesamtbewertungszahl (PEI) für einen Prozess zusammengefasst. Diese bezieht sich immer auf die Herstellung von 1 kg Produkt. Bei der Ermittlung des Umweltfaktors (EF) kann jede Bewertungskategorie zusätzlich nach SHE-Kriterien (Safety 13%, Health 27% und Environment 60%) gewichtet werden, so dass sich eine SHE-gewichtete Bewertungszahl ergibt. Für genauere Informationen wird auf die Veröffentlichung verwiesen.

(R)-1-Phenylethanol

Im vorliegenden einstufigen Peroxygenase-Verfahren erfolgte die asymmetrische Synthese von (R)-1-Phenylethanol aus der prochiralen Ausgangsverbindung Ethylbenzol innerhalb von 45 Sekunden unter sehr milden Bedingungen, bei Raumtemperatur und einem pH-Wert von 7 (Flussdiagramm des Verfahrens, Abb. 24). Das Reaktionsprodukt wurde nach Zentrifugation und Ultrafiltration zur Abtrennung des Enzyms aus dem

wässrigen Reaktionsmedium, in einem Perforator unter ständigem Rückfluss des Lösungsmittels Dichlormethan extrahiert. Im Anschluss erfolgte eine säulenchromatografische Abtrennung des Produktes vom Edukt sowie die Eliminierung des Nebenproduktes Acetophenon. Gegenüber dem ursprünglichen, bereits im Zwischenbericht (2009) beschriebenen Verfahren zur Darstellung von (*R*)-1-Phenylethanol sind bezüglich der Nachhaltigkeit durch die fortlaufende, projektbegleitende ökologische Bewertung wesentliche Fortschritte erzielt worden:

- Eine Reduzierung des Acetonitrilgehaltes im Reaktionsansatz von ursprünglich 25% auf 3%, da sich dieses Lösungsmittel besonders negativ auf die Bilanz des Gesamtprozesses, ausgedrückt in einer hohen Umweltbewertungszahl, auswirkte. Eine geringe Acetonitrilmenge wurde jedoch auch weiterhin zur Erhöhung der Löslichkeit des Ethylbenzols im wässrigen Medium benötigt.
- Eine Reduzierung der für die Extraktion des Produktes benötigten Lösungsmittelmenge um die Hälfte, erzielt durch die kontinuierliche Extraktion im Perforator.
- Die säulenchromatografische Trennung von Edukt und Produkten ermöglichte den Verzicht auf den Einsatz von Semicarbazidhydrochlorid, welches zuvor zur Derivatbildung und Entfernung des Nebenproduktes Acetophenon benötigt wurde.

Durch diese Verbesserungen konnte die Umweltbewertungszahl des Peroxygenase-Verfahrens von ursprünglich 14431 auf 832, also um dem Faktor 17 gesenkt werden (Tab. 8). Die Produktausbeute fällt aufgrund der sehr kurzen Reaktionszeit von 45 s etwas geringer aus. Gleichzeitig konnte hierdurch die Menge des unerwünschten Nebenproduktes Acetophenon auf ein Drittel gesenkt werden. Die Analyse der Abfallströme ergab, dass das Acetonitril obwohl es in geringeren Mengen eingesetzt und recycelt wird, nach wie vor bei der Einzelstoffbetrachtung am stärksten ins Gewicht fällt. Alle weiteren in diesem Verfahren verwendeten Substanzen trugen kaum zu einer Umweltbelastung bei.

Enzymatische Umsetzung von Ethylbenzol zu (*R*)-1-Phenylethanol mittels Peroxygenase (AaP)

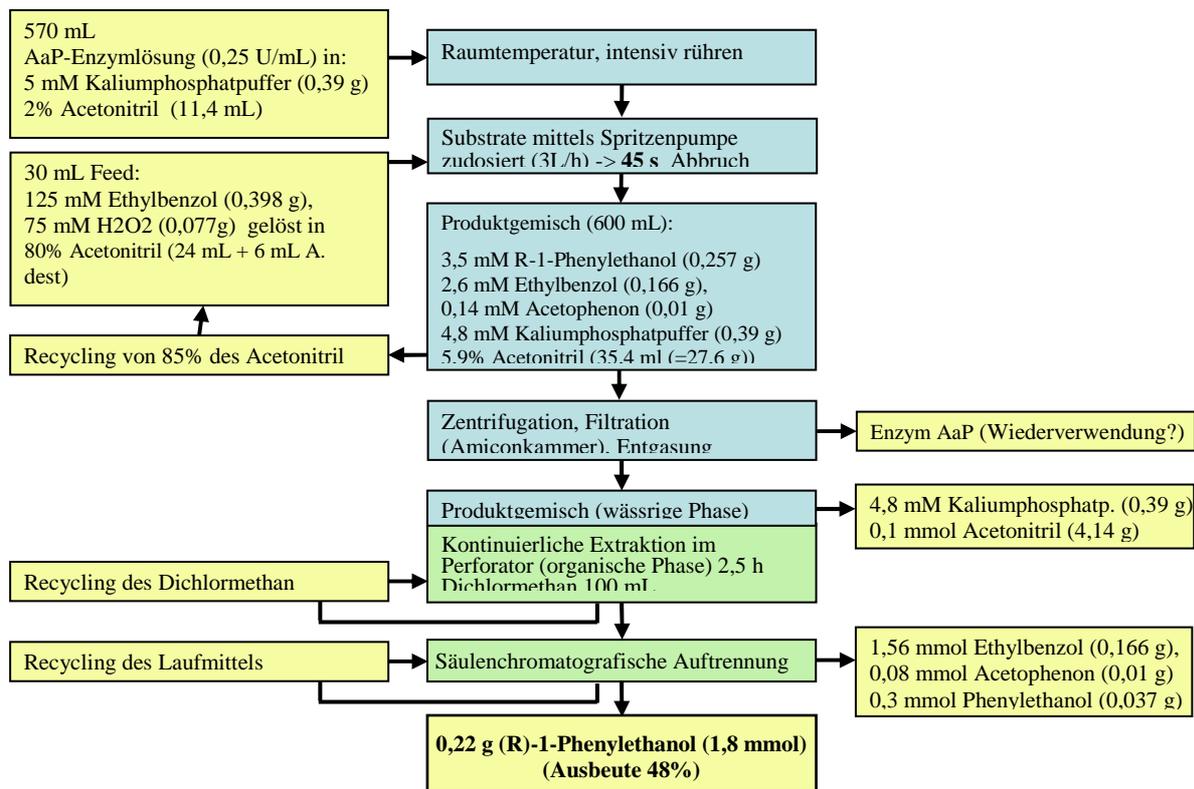


Abb. 24: Enzymatische Umsetzung von Ethylbenzol zu (*R*)-1-Phenylethanol mittels Peroxygenase (AaP)

Mikrobielle Umsetzung von Acetophenon zu (*R*)-1-Phenylethanol mittels *E. coli*- Stamm BL21(DE)/AW-9 (Weckbecker, Dissertation 2005)

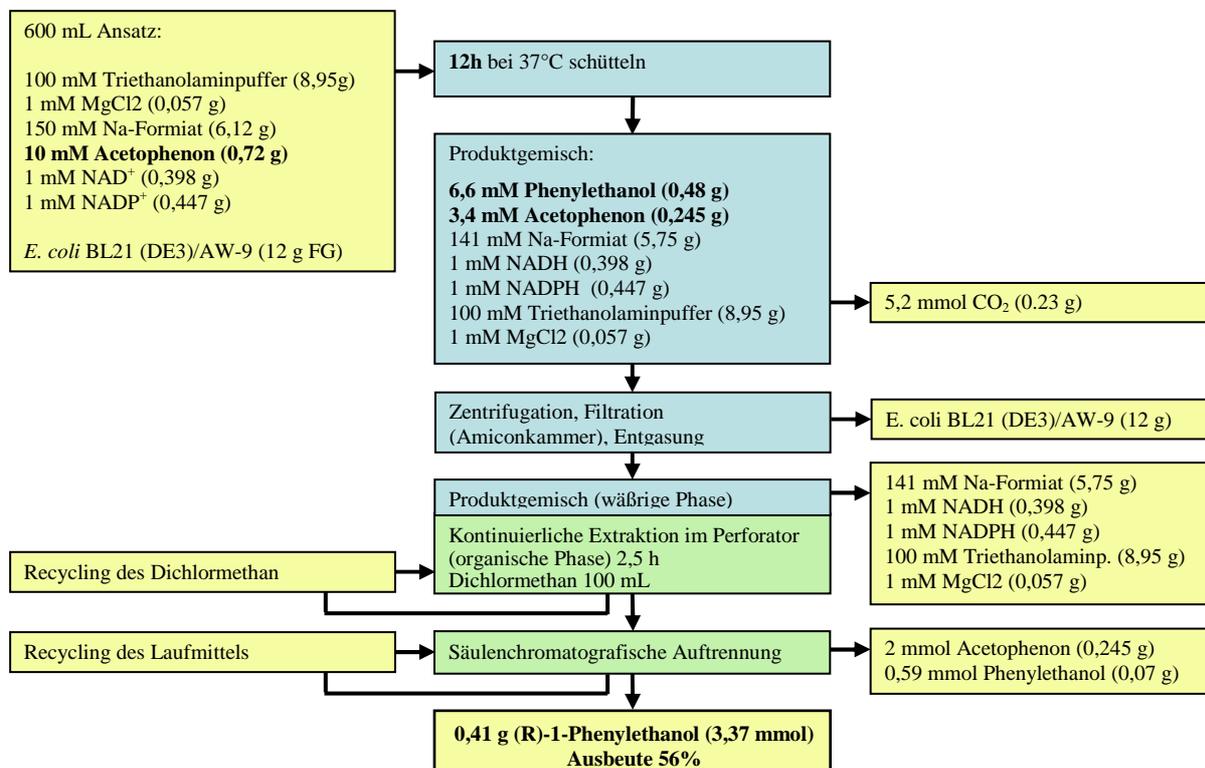


Abb. 25: Mikrobielle Umsetzung von Acetophenon zu (*R*)-1-Phenylethanol mittels *E. coli*- Stamm BL21(DE)/AW-9 (Weckbecker, Dissertation 2005)

Tab. 8: Vergleich der Gesamtausbeute in % (bezogen auf das Edukt) und der ökologischen Bewertung verschiedener Verfahren zur Herstellung von (*R*)-1-Phenylethanol anhand der mit Sabento ermittelten Gesamtumweltbewertungszahlen (UBZ). Zur Beschreibung der Verfahren siehe Text.

Verfahren	Ausbeute	UBZ
ursprüngliches Peroxygenase-Verfahren	63	14431
verbessertes Peroxygenase-Verfahren	48	832
chemisches Verfahren mit anschließender dynamisch kinetischer Racematspaltung	64	7260
mikrobielles, ganzzellbasiertes Verfahren mit <i>E. coli</i> -Stamm BL21(DE)/AW-9	56	1489

Als Vergleichsverfahren wurden die chemische Synthese von 1-Phenylethanol aus Acetophenon mit anschließender dynamisch kinetischer Racematspaltung und ein mikrobielles, ganzzellbasiertes Verfahren mit *E. coli*-Stamm BL21(DE)/AW-9 (Weckbecker 2005) herangezogen.

Das im chemischen Verfahren mit einem titanhaltigen Katalysator (Patent US 5227538: *Catalytic asymmetric reduction of ketones using metal catalists*) gewonnene Racemat vom 1-Phenylethanol wird durch selektive Veresterung mit Hilfe einer Lipase in den *R*-Ester und das unveränderte *S*-Enantiomer des Alkohols getrennt. Diese Methode wird zur industriellen Produktion chiraler Alkohole verwendet (Breuer et al. 2004). Da im Racemat die einzelnen Enantiomere zu je 50% vorliegen, konnte bis vor kurzem bei diesem Verfahren maximal 50% des gewünschten Enantiomers gewonnen werden (Patent EP 0716712B1: *Lipase katalysierte Acylierung von Alkoholen mit Diketenen*). Durch eine dynamisch kinetische Racematspaltung (*dynamic kinetic resolution*), bei der das nicht zum Ester umgesetzte (*S*)-1-Phenylethanol *in situ* fortlaufend wieder zur *R*-Form racemisiert, kann durch die Lipase bis zu 100% des Substrats zum Ester von (*R*)-1-Phenylethanol umgesetzt werden (Bogár et al. 2007). Die *in situ* Racemisierung erfolgt unter Verwendung des kostenintensiven Übergangsmetallkatalysators Ruthenium unter Argonatmosphäre. Durch Esterspaltung kann anschließend das Produkt (*R*)-1-Phenylethanol gewonnen werden. Die für dieses chemische Verfahren mit anschließender dynamisch kinetischer Racematspaltung ermittelte Umweltbewertungszahl liegt mit 7260 um den Faktor 9 über dem für das verbesserte Peroxygenase-Verfahren ermittelten Wert von 832 (Tab. 8). Als nachteilig für die Verwendung von (*R*)-1-Phenylethanol als Feinchemikalie stellt sich die im chemischen Verfahren enthaltene Verunreinigung durch Acetophenon heraus, die nicht gesondert entfernt wird. Bei einer weiteren Aufreinigung würde, neben einer Erhöhung der Umweltbewertungszahl, auch die Gesamtausbeute des chemischen Verfahrens sinken.

In Abbildung 25 ist das Flussdiagramm der mikrobiellen Umsetzung von Acetophenon zu (*R*)-1-Phenylethanol mittels *E. coli*- Stamm BL21(DE)/AW-9 dargestellt (Weckbecker 2005). In diesem Verfahren sind für 10 mM Substratumsatz je 1 mM der teuren Kosubstrate NAD^+ sowie NADP^+ nötig. Da die Veröffentlichung sich auf die Analyse der nach 12 h bei 37 °C im Reaktionsansatz enthaltenen Produktmenge beschränkt, wurde für die Berechnungen der Umweltbewertungszahlen das gleiche Aufreinigungsschema mit Perforator wie beim verbesserten Peroxygenase-Verfahren angenommen. Unterschiede in der Umweltbewertungszahl sind daher lediglich auf Unterschiede im mikrobiellen/enzymatischen Teil der Verfahren zurückzuführen. Beim mikrobiellen Verfahren, das bezüglich der Umweltbewertungszahl mit 1489 gegenüber dem verbesserten Peroxygenase-Verfahren mit 832 etwa doppelt so hohe Werte aufweist (Tab. 8), stellten sich bei der Einzelstoffbetrachtung Triethanolamin sowie die, gegenüber Wasserstoffperoxid teuren Kosubstrate NADP^+ und NAD^+ als Stoffe mit Optimierungspotential heraus.

5-Hydroxypropranolol

5-Hydroxypropranolol kann mit Hilfe der pilzlichen Peroxygenase aus *Agrocybe aegerita* (AaP) in einem einzigen enzymatischen Schritt regioselektiv aus Propranolol dargestellt werden (Flussdiagramm des Verfahrens, Abb. 26). Im vorliegenden Verfahren wurden unter sehr milden Reaktionsbedingungen in nur 5 Minuten ca. 20 % des Betablockers Propranololhydrochlorid zum gewünschten Produkt umgesetzt (Kinne et al. 2009). Die zugesetzte Ascorbinsäure verhinderte eine Folgepolymerisation des Produktes. Die Reinigung wurde wie folgt durchgeführt (Scharschuh, 2011): Das wässrige Reaktionsmedium wurde zunächst mittels Ultrafiltration vom Enzymprotein getrennt, am Rotationsverdampfer eingeeengt und mit NaOH auf pH 12 eingestellt. Durch dreimaliges Ausschütteln mit Cyclohexan wurde das nicht umgesetzte Propranolol aus der wässrigen Phase extrahiert und durch Einengen am Rotationsverdampfer (Recycling des Lösungsmittels) zu 88,4% zurückgewonnen. Nach Einstellen der verbliebenen wässrigen Phase auf pH 9,6 wurde das Produkt mit Ethylacetat (dreimaliges Ausschütteln) extrahiert und durch Einengen am Rotationsverdampfer mit einer Ausbeute von 15,5%, bezogen auf das Edukt gewonnen (Abb. 26). Die Peroxygenase von *Agrocybe aegerita* kann im Membranreaktor mehrmals verwendet werden, da in einem Enzymkatalyseschritt mit anschließender Enzym-Rückgewinnung über Ultrafiltration nur zwischen 10 und 20 % der Aktivität verloren gehen. Diese wurde anschließend wieder zudosiert.

Enzymatische Umsetzung von Propranolol zu 5-Hydroxypropranolol mittels Peroxygenase (AaP)

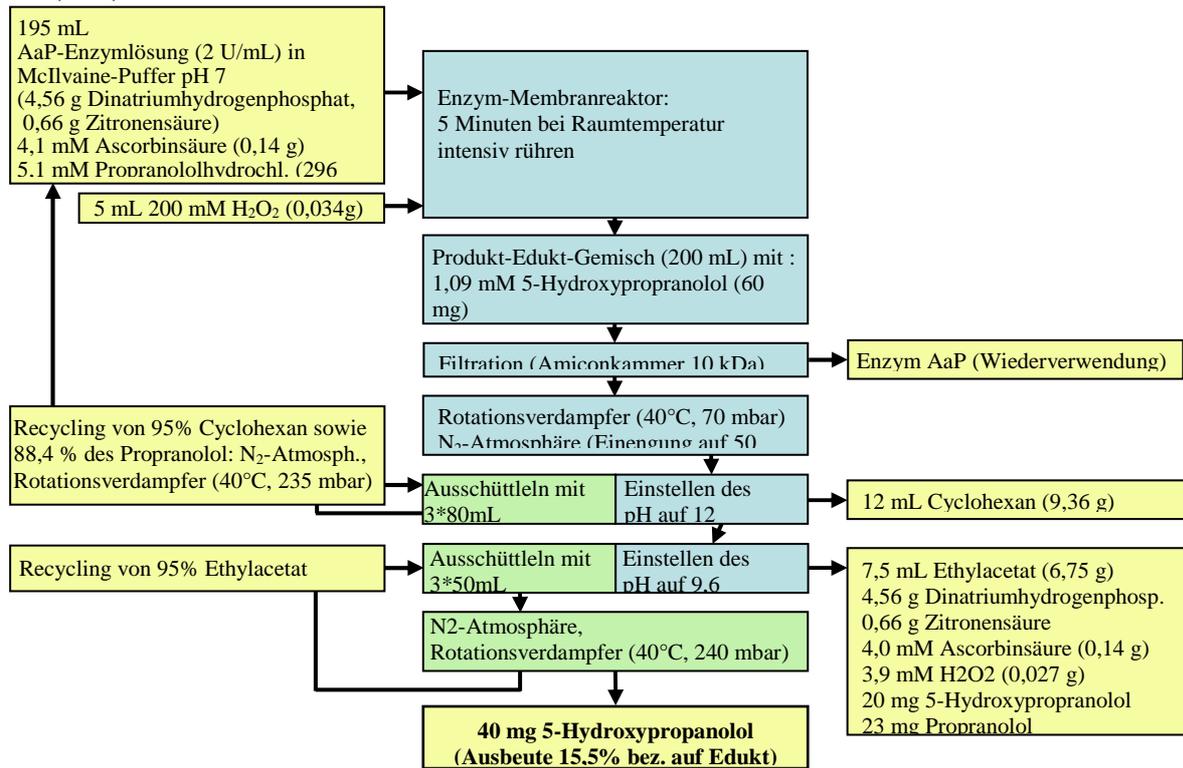


Abb. 26: Enzymatische Umsetzung von Propranolol zu 5-Hydroxypropranolol mittels Peroxygenase (AaP)

Mikrobielle Umsetzung von Propranolol zu 5-Hydroxypropranolol mittels *Cunninghamella spec.*

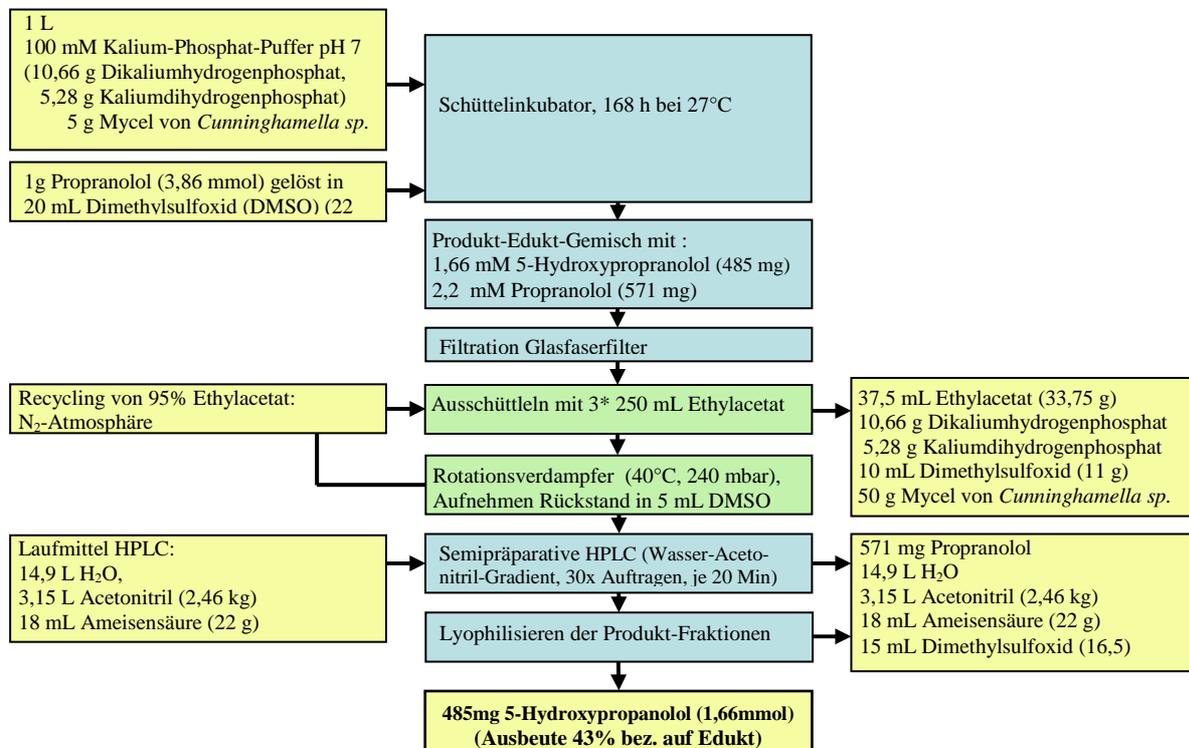


Abb. 27: Mikrobielle Umsetzung von Propranolol zu 5-Hydroxypropranolol mittels *Cunninghamella spec.*

Enzymatische Umsetzung von Propranolol zu 5-Hydroxypropranolol mittels rekombinanten *Bacillus megaterium* CYP102A1 (Variante 2C11)

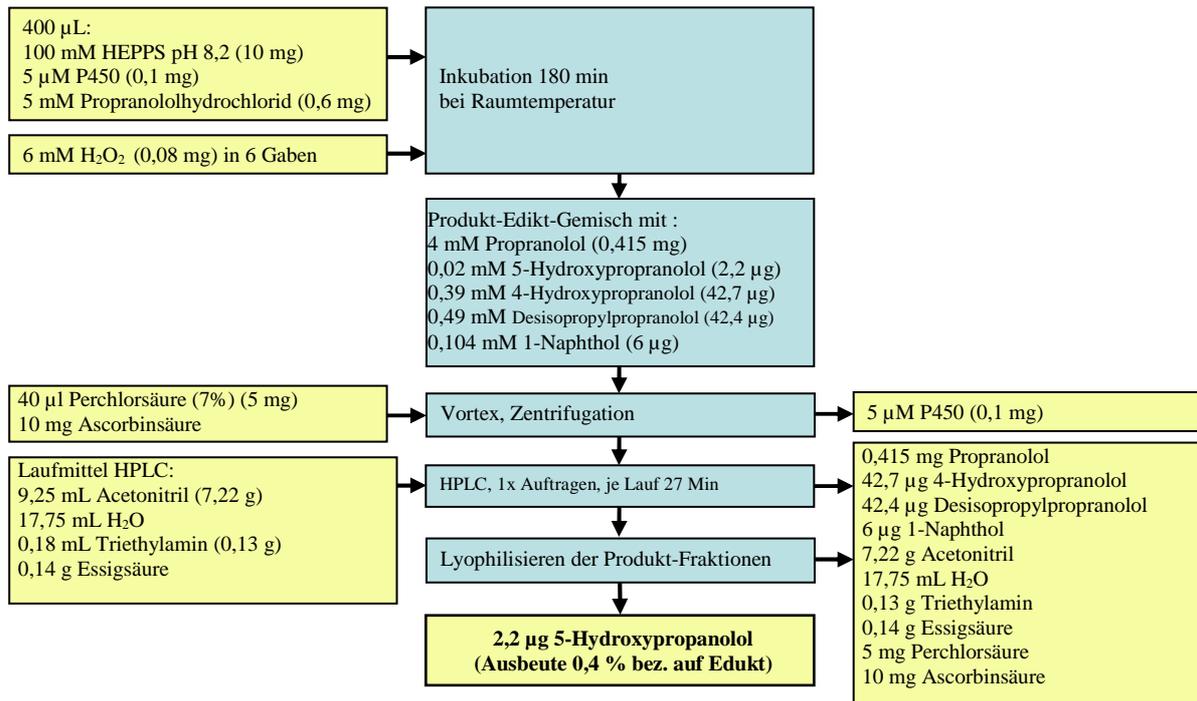


Abb. 28: Enzymatische Umsetzung von Propranolol zu 5-Hydroxypropranolol mittels rekombinanten *Bacillus megaterium* CYP102A1 (Variante 2C11)

Chemische Darstellung von 5-Hydroxypropranolol aus 1,5-Naphthalendiol

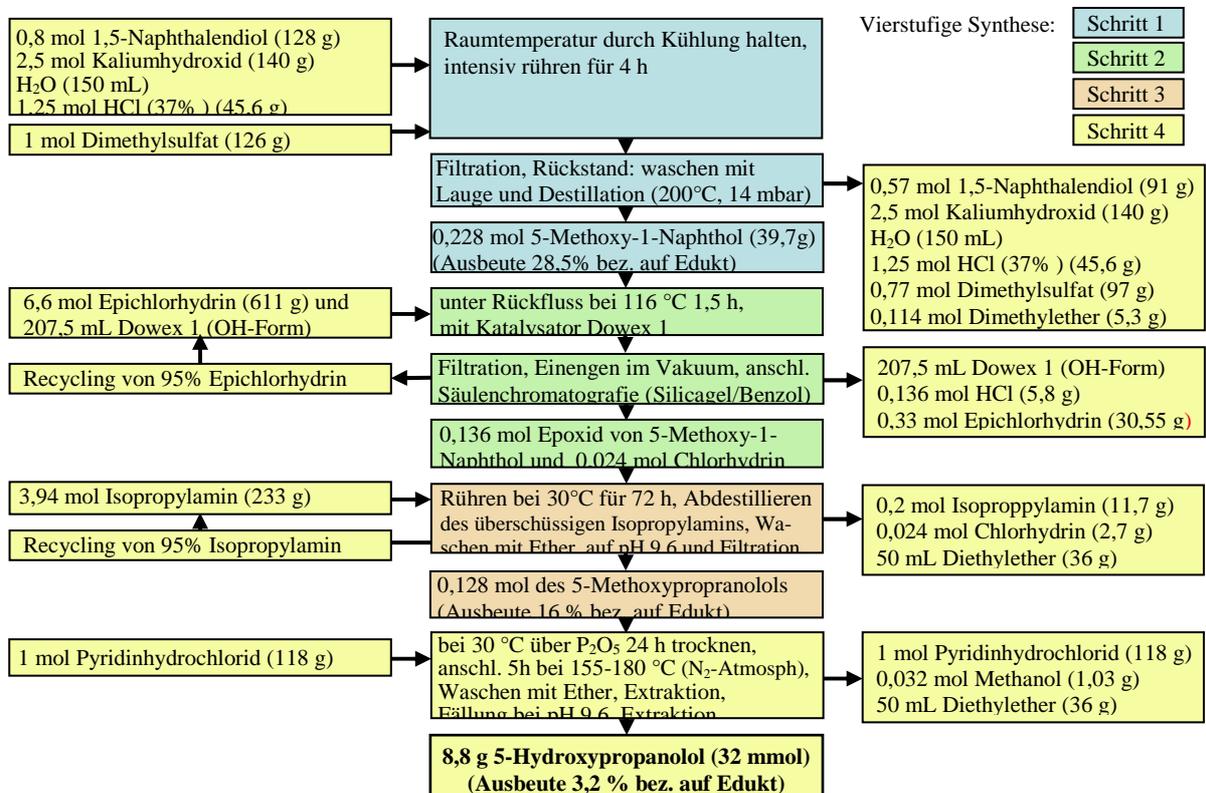


Abb. 29: Chemische Darstellung von 5-Hydroxypropranolol aus 1,5-Naphthalendiol

Die Menge der recycelten Lösungsmittel wurde für die ökoeffiziente Bewertung des Verfahrens mittels Sabento mit 2 unterschiedlichen Recyclingraten von 95% und 99% analysiert. Bei der Einzelstoffbetrachtung hatten die für die Extraktion eingesetzten brennbaren Lösungsmittel auf Grund der thermischen Risiken die größten Auswirkungen auf die Umweltbewertungszahl. Diese wurde bei Zugrundelegung einer Recyclingrate von 95% mit UBZ: 19 581 und bei 99% Lösemittelrecycling mit UBZ: 4 923 bestimmt (Tab. 9).

Dem Peroxygenase-Verfahren wurden vier weitere Verfahren zur Herstellung 5-Hydroxypropranolol gegenübergestellt:

- ein mikrobielles Verfahren mit *Cunninghamella spec.*,
- ein enzymatisches Verfahren mit rekombinatem *B. megaterium* CYP102A1,
- die klassische chemische Synthese,
- ein Ansatz mit proliferierenden humanen Leberzellen (Hepa-FHn).

Tab. 9: Vergleich des Abfallindex (kg Abfall pro kg Produkt), Gesamtausbeute (bezogen auf das Edukt) und der ökologischen Bewertung verschiedener Verfahren zur Herstellung von 5- Hydroxypropranolol anhand der mit Sabento ermittelten Gesamtumweltbewertungszahl (UBZ). Zur Beschreibung der Verfahren siehe Text.

Verfahren	Abfallindex (abzüglich Wasser)	Ausbeute [%]	UBZ
Peroxygenase-Verfahren mit 95% Recycling der Lösungsmittel	5478 (738)	15,5	19 581
Peroxygenase-Verfahren mit 99% Recycling der Lösungsmittel	4995 (254)	15,5	4 923
mikrobielles Verfahren mit <i>Cunninghamella spec.</i>	37 981 (5 381)	43	129 744
enzymatisch mit rekombinatem <i>B. megaterium</i> CYP102A1	11 661 344 (3 415 336)	0,4	84 185 448
klassische chemische Synthese	188 (171)	3,2	3 502

Beim mikrobiellen Verfahren mit *Cunninghamella spec.* (Marvalin und Azared 2011) wird abfiltriertes pilzliches Myzel (geschätzt: 5 g) in Phosphatpuffer resuspendiert, das in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöstes Propranolol zugegeben und für sieben Tage im Schüttler inkubiert (Flussdiagramm des Verfahrens, Abb. 27). Im Anschluss wird der Reaktionsansatz abfiltriert und dreimal mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die hierfür benötigte Menge wurde entsprechend dem Verbrauch im Peroxygenase-Verfahren berechnet. Nach Abtrennung des Lösungsmittels im Rotationsverdampfer

(angenommenes Recycling 95%) wird der Rückstand in DMSO aufgenommen und eine semipräparative HPLC durchgeführt. Nach der Lyophilisation der Produktfraktionen wird eine Ausbeute von 43% erreicht (Tab. 9). Aufgrund des hohen Materialeinsatzes bei der Reinigung errechnet sich bei diesem Verfahren eine Umweltbewertungszahl von 129 744. Das für die HPLC benötigte Acetonitril erwies sich bei der Einzelstoffbetrachtung als der mit Abstand problematischste Stoff.

Das enzymatische Vergleichsverfahren mit rekombinantem *B. megaterium* CYP102A1, exprimiert in *E. coli* (Otey et al. 2006) ist im Flussdiagramm der Abbildung 28 dargestellt. Dabei wurde die P450 BM3 Häm-Domäne der Monooxygenase durch *Directed Evolution* so modifiziert, dass entsprechend der Peroxygenase-Katalyse ausschließlich Wasserstoffperoxid als Kosubstrat nötig ist. Nach 180 Minuten Reaktionszeit, während der im 30 Minuten-Takt Wasserstoffperoxid zugesetzt wird, wurde die Reaktion durch Zusatz von Perchlorsäure (Denaturieren der Proteine) beendet und der Reaktionsansatz zentrifugiert. Für die Berechnung der Ökobilanz wurde angenommen, dass das Volumen des Reaktionsansatzes zur chromatographischen Trennung der gebildeten Metabolite auf 50 µl eingengt werden kann. Die Ausbeute an 5-Hydroxypropranolol beträgt bei diesem Verfahren 0,4%, bezogen auf den Gesamtumsatz (Tab. 9). Die extrem hohe Umweltbewertungszahl von 84 185 448 hat mehrere Ursachen, wie eine sehr geringe Ausbeute, die einen entsprechend hohen Materialeinsatz bedingt (Tab. 9). Die für die HPLC verwendeten Laufmittel Acetonitril und Triethylamin stellten sich auch in diesem Verfahren entsprechend der Einzelstoffbetrachtung als problematisch heraus. Die aufwendige Gewinnung der rekombinanten *B. megaterium* CYP102A1-Monooxygenasen wurde in der Effizienzstudie nicht berücksichtigt.

Die klassische chemische Synthese nach Oatis et al. (1981) erfolgt über vier Stufen (Flussdiagramm des Verfahrens, Abb. 29). Hierzu wird zunächst 1,5-Naphthalendiol durch Methylierung mit Dimethylsulfat in 5-Methoxy-1-Naphthol überführt. Im zweiten Schritt erfolgt die Umsetzung mit Epichlorhydrin zum entsprechenden Epoxid. Für die Ökoeffizienzanalyse wurde angenommen, dass das als Katalysator eingesetzte Dowex 10 mal verwendet werden kann. Mangels Angaben wurde davon ausgegangen, dass für die anschließende Säulenchromatografie pro Gramm zu trennenden Epoxids je 50 g Silicagel und 50 ml Benzol benötigt werden. Das Epoxid wird im dritten Schritt mit Isopropylamin zum 5-Methoxypropranolol umgesetzt. Durch die Reaktion mit Pyridinhydrochlorid erhält man im vierten Schritt 5-Hydroxypropranolol. Die Ausbeute des chemischen Verfahrens, bezogen auf das Edukt, liegt mit 3,2 % bei einem Fünftel

der Ausbeute des Peroxygenase-Verfahrens (Tab. 8). Bezüglich der berechneten Umweltbewertungszahl von UBZ: 3502 stellt sich dieses Verfahren als am nachhaltigsten heraus, obwohl viele der verwendeten Stoffe (Dimethylsulfat, Epichlorhydrin, Benzol, Chlorhydrin, Kaliumhydroxid) als akut oder chronisch toxisch eingeordnet werden. Toxische Stoffe tragen bei diesem Verfahren auf der Inputseite der Umweltbewertungszahl zu 68% bei, während das Wirkungspotential dieser toxischen Stoffe mit 27% beim Peroxygenase-Verfahren mit 99% Recycling der Lösungsmittel um den Faktor 2,5 niedriger liegt (Abb. 30). Bei letzterem haben die thermischen Risiken (Brennbarkeit der Lösungsmittel) den größten Anteil an der Gesamtumweltbewertungszahl.

Zusammenfassend ist zu berücksichtigen, dass die Systemgrenze bei Sabento der Prozess selbst ist, das heißt die Energie- und Stoffbilanzen für die Herstellung der im Prozess verwendeten Substanzen fließen nicht in die Umweltbewertung des betrachteten Verfahrens ein.

Das Ganzzellverfahren mit humanen Leberzellen (Hepa-FHn) wurde mit der Induktion der CypP450-Monooxygenasen über 24 Stunden mittels Rifampicin sowie Omeprazol in einem Hepatozytenmedium gestartet. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit Propranolol über weitere 24 Stunden. Als Hauptmetabolit konnte 4-Hydroxypropranolol-Glucuronid nachgewiesen werden. Dieser Metabolit ist bereits das Folgeprodukt der 4-Hydroxypropranolol Umsetzung durch die zelleigenen Phase II Enzyme. Da auch der humane Hauptmetabolit 5-Hydroxypropranolol nicht nachweisbar war, konnte die Kalkulation des Material- und Energieaufwands für das Hepa-FHn-Ganzzellverfahren noch nicht abgeschlossen werden.

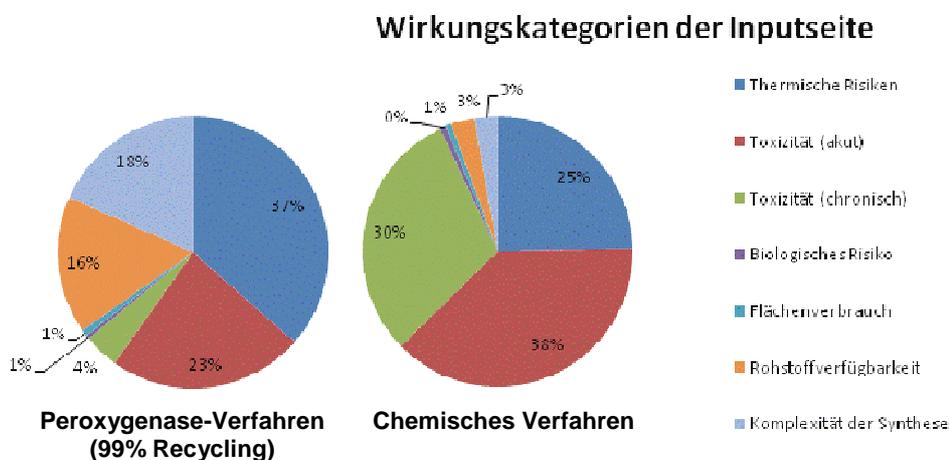


Abb. 30: Vergleich der Wirkungspotenziale der Wirkungskategorien (Inputseite) auf die Gesamtbewertungszahl

Im Anschluss an die ökologische Betrachtung wurde für die beiden Verfahren mit den geringsten Umweltbewertungszahlen eine ökonomische Analyse durchgeführt. Aufgrund der hohen Bedeutung der Materialkosten mit 45,4 % (Abb. 31) wird in dieser Analyse der Fokus auf die Berechnung der Materialpreise gelegt. Die Produktionskosten lassen sich über die Verdopplung dieses Wertes abschätzen. Der Verkaufspreis von 5-Hydroxypropranolol beträgt 120 € /mg (Bertin Pharma).

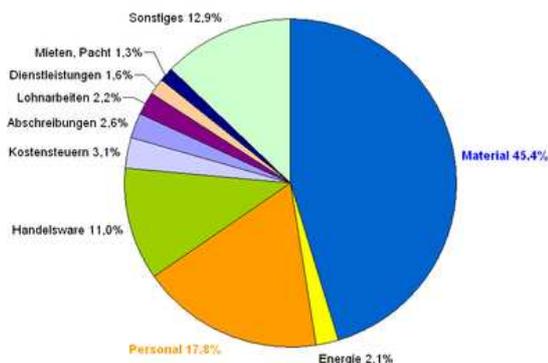
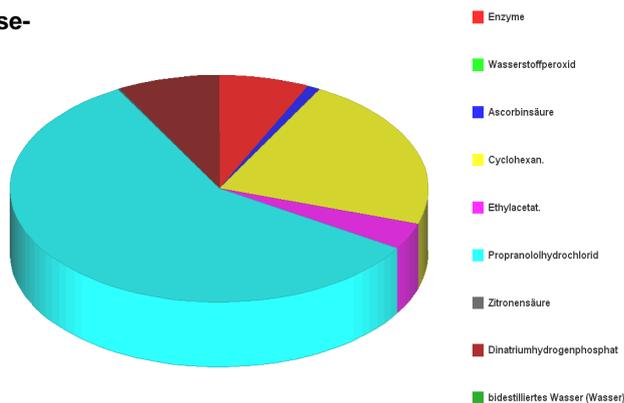


Abb. 31: Kostenstruktur im Verarbeitenden Gewerbe in Deutschland (Quelle: statistisches Bundesamt 2009)

Peroxygenase-Verfahren



Chemisches Verfahren

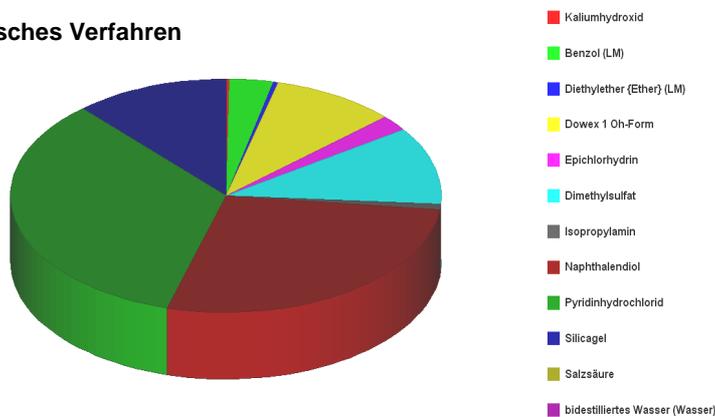


Abb. 32: Kostenanteile der eingesetzten Materialien

Um ein Kilogramm dieser Verbindung zu produzieren wären für das chemische Verfahren 171 kg Reagentien zu einem Gesamtpreis von 7665 € nötig, wobei auf Naphthalendiol und Pyridinhydrochlorid über 50% der Materialkosten entfallen (Abb. 32).

Für das Peroxygenase-Verfahren würden 254 kg Reagentien zu einem Gesamtpreis von 34652 € benötigt, wobei auf Propranololhydrochlorid als Substrat deutlich mehr als die Hälfte der Materialkosten entfallen (Abb. 32). Insgesamt betragen die Produktionskosten für 1 mg 5-Hydroxypropranolol im chemischen Verfahren 0,0076 €, im Peroxygenase-Verfahren 0,034 €.

4 Diskussion

Soll-/Ist- Vergleich der bearbeiteten Arbeitspakete

In Tabelle 10 sind die Meilensteine und der Status der durchgeführten Arbeiten zusammengefasst. Dargestellt sind erfolgreich abgeschlossene Meilensteine (+), Meilensteine mit positiven, weiterführenden Ergebnissen (O) und Meilensteine, für die innerhalb des Projektverlaufes kein positiver Abschluss erreicht werden konnte (-).

Partner: Hochschule Lausitz (1); IHI Zittau (2); JenaBios GmbH (3); Chiracon GmbH (4); LGC GmbH (5); Novozymes (6)

Partner	Meilensteine, Deliverables	Zeitpunkt (Monat)
1	Erfolgreiche Peroxygenase-Induktion und Laccase-Abtrennung	+ / o
4, 5	Test-Integrierbare Analytik für (S)- und (R)-1-Phenylethanol und weiterer Metaboliten der Ethylbenzumsatzung; Analytik Propranolol und seiner Metaboliten; Analytik der Methotrexatumsatzung	+
2, 6	Mindestens ein funktionierendes Vektorsystem für die heterologe Expression pilzlicher Peroxygenasen	+
3	Stabile Peroxygenase-Produktion mit dem Wildstamm <i>Agrocybe aegerita</i> A1K im Rührkessel-Bioreaktor (bis 30 Liter)	+
1	Geeignete Trägermaterialien für die Immobilisierung	+
1, 2	Spezifische Enzym-Kenndaten und -Konstanten für die beiden biokatalytischen Modellsubstrate: (R)-1-Phenylethanol- und 5-Hydroxypropranolol	+
4, 5	Detaillierte Beschreibung der Prozesse: Enzymeinsatz und Produktgewinnung sowie <i>In-vitro</i> -Umsatz und Ausbeute mit Wildstamm-Peroxygenasen	+
6	Funktionierendes System zur heterologen Expression der neuartigen Peroxygenasen	+ / o
1,2 (Extern)	Optimiertes System zur Peroxid-Dosierung	+
alle	Statusbericht	+
1	Katalytisch aktive, freie und immobilisierte Peroxygenase-Präparate	+
4, 5	Funktionierende Prozesse mit integrierter Produktaufarbeitung unter Verwendung rekombinanter Peroxygenase-Präparate	+ / o

6, 2	Ausreichend rekombinante Peroxygenasen für die enzymatische Synthese im Gramm-Maßstab	+ / o
1, 2	Überblick über den Einsatz von Peroxygenasen in der Biokatalyse (<i>A. aegerita</i> , <i>C. radians</i>)	+
4	(<i>R</i>)-1-Phenylethanol als Industriechemikalie	+
5, 1	5-Hydroxypropranol als Feinchemikalie für die pharmazeutische Industrie, Neues enzymatisches Wirkstoff-Testsystem	+
6, 2	Optimierte Katalysatoren (heterolog exprimiert)	-
Extern	Ökoeffizienzanalyse hinsichtlich präparativer Herstellung von (<i>R</i>)-1-Phenylethanol / 5-Hydroxypropranolol	+
alle	Abschlussbericht	+

Peroxygenase-Induktion und Laccase-Abtrennung (+)

Die Kultivierung der Basidiomyceten *Agrocybe aegerita* und *Coprinellus radians* erfolgte auf komplexen Medien. Dabei wurden durch Leguminosenzusätze Aktivitäten zwischen 700 und 1400 U l⁻¹ AaP und zwischen 170 und 2200 U l⁻¹ CrP erreicht. Die detaillierten induktiven Vorgänge, die zur Enzyymbildung führen, sind weiterhin ungeklärt. Hinsichtlich der Bildung einer Häm-Peroxidase ist zum jetzigen Zeitpunkt lediglich die gezielte Induktion der Manganperoxidase mittel Manganchlorid beschrieben (Nüske et al. 2002). Durch die Wahl eines geeigneten Induktors könnte bereits während der Kultivierung die Ausscheidung weiterer Enzyme vermieden und die Isolation der Peroxygenasen aus der komplexen Kulturflüssigkeit erleichtert werden.

Stabile Peroxygenase-Produktion mit dem Wildstamm *Agrocybe aegerita* A1K im Rührkessel-Bioreaktor (bis 30 Liter) (+)

Die Kultivierung des Basidiomycten *Agrocybe aegerita* konnte erfolgreich vom Erlenmeyerkolben (0,2 Liter) auf ein Arbeitsvolumen von 30 Liter übertragen werden. Dabei wurden Enzymaktivitäten (Substrat: Veratrylalkohol) zwischen 700 und 1400 U l⁻¹ erzielt.

Geeignete Trägermaterialien für die Immobilisierung / Katalytisch aktive, freie und immobilisierte Peroxygenase-Präparate (+)

Als geeignetes Verfahren für die Immobilisierung der Peroxygenase stellte sich die Verwendung von Alginat und Calcium-Gluconat heraus. Dabei konnte die AaP mit einer spezifischen Aktivität von 0,0053 U/mg Alginat immobilisiert werden. Während der Versuchsansätze konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des eingebundenen Enzymes über mehrere Anwendungen stabil bleibt.

Spezifische Enzym-Kenndaten und -Konstanten für die beiden biokatalytischen Modellsubstrate: (R)-1-Phenylethanol und 5-Hydroxypropranolol / Detaillierte Beschreibung der Prozesse: Enzymeinsatz und Produktgewinnung sowie In-vitro-Umsatz und Ausbeute mit Wildstamm-Peroxygenasen (+)

Die prozesstechnischen Parameter für die enzymvermittelte Katalyse von (R)-1-Phenylethanol konnten vollständig dargestellt werden. Aus den gewonnenen Daten konnten folgende Rückschlüsse gezogen werden: Geringe Flussraten (0,5-1,0 mL/h) führten zu einem hohen Stoffumsatz (0,25 U AaP), der weitgehend unabhängig vom Stoffmengenverhältnis H_2O_2 /Ethylbenzol (max. = 0,9) war. Die Enzymmengen innerhalb des beschriebenen Systems liegen bei 0,25 bis 0,5 U AaP. Unter H_2O_2 -Mangel ($X = 0,6$) und gleichzeitig hoher Dosiergeschwindigkeit (3 ml h^{-1}) konnten die höchsten Umsätze (ca. 3,5 mM Phenylethanol, 0,25 U AaP) bezogen auf einen Einsatz von 5 mM Ethylbenzol erreicht werden. Die Optimierung der Selektivität der Reaktion im Hinblick auf die Minimierung des Acetophenon/Phenylethanol-Verhältnisses wurde aufgrund der geringen Mengen an entstandenem Acetophenon (max. 15%) nicht primär verfolgt, da beide Stoffe präparativ voneinander getrennt werden konnten.

Für die Synthese von 5-Hydroxypropranolol wurde die Enzymaktivität, die Edukt- und die Peroxidkonzentration variiert. Im Verlauf des vorliegenden Projektes konnte die Ausbeute somit von 20 % auf 39 % gesteigert werden (Kinne et al. 2009). Unter Einsatz von 2 U/ml AaP stellte sich ein Überschuss an Wasserstoffperoxid (5 mM anstelle von 2 mM) als optimal heraus, um 0,5 mM Propranolol erfolgreich umzusetzen (Ausbeute 5-OHP: 39% / 0,054 mg/ml). Der höchste Gehalt an 5-Hydroxypropranolol konnte bei einer Propranolol-Konzentration von 5 mM erzielt werden (Ausbeute 5-Hydroxypropranolol: 26% / 0,357 mg/ml).

Die Verfahren zur Aufarbeitung und Produktgewinnung führten am Beispiel von (R)-1-Phenylethanol zu 48 % Produktgewinn und am Beispiel von 5-Hydroxypropranolol zu 15,5 % in Bezug auf das eingesetzte Edukt.

(R)-1-Phenylethanol als Industriechemikalie (+)

Mit dem hier entwickelten Verfahren war es möglich (R)-1-Phenylethanol enzymatisch dazustellen und präparativ zu isolieren. Mit dem beschriebenen Verfahren zur Maßstabsvergrößerung wurde bei Versuchsansätzen bis 30 l Phenylethanol mit einer Reinheit von 70-75 % gewonnen, wobei die Aufarbeitung hauptsächlich durch Extraktion und Destillation erfolgte. Mit dem beschriebenen Verfahren zur säulenchromatographischen Trennung konnte Phenylethanol mit einer Reinheit von 99,0% und einer Ausbeute von 48 % gewonnen werden. Als problematisch im 30 l-Maßstab stellt sich der

Einsatz von Semicarbazidhydrochlorid zur Bindung des entstandenen Acetophenons heraus, da es sich um einen Gefahrstoff mit gesundheits- und umweltgefährdendem Potenzial handelt. Für den industriellen Maßstab würde sich daher ein auf die Destillation folgender säulenchromatographischer Aufreinigungsschritt eignen, der zudem zu einer Effizienzerhöhung durch die höheren Gesamtausbeuten führen könnte.

5-Hydroxypropranolol als Feinchemikalie für die pharmazeutische Industrie (+)

Auf Grundlage der vorliegenden Untersuchungen konnte erstmalig die präparative Synthese von 5-Hydroxypropranolol in einem Enzym-Membran-Reaktor durchgeführt werden. Die im 1 ml-Maßstab erhaltenen Ergebnisse konnte erfolgreich und mit vergleichbaren Produktausbeuten auf ein den 200 ml-Maßstab übertragen werden. Durch das Membranreaktorverfahren konnte sowohl der Biokatalysator zurückgehalten und weiterverwendet, als auch nicht umgesetztes Substrat zurück gewonnen werden. Durch die extraktive Isolierungsmethode konnte 5-Hydroxypropranolol fast vollständig und in reiner Form isoliert werden (66,3 %). Insgesamt konnten mit einem Ansatz ca. 40 mg 5-Hydroxypropranolol isoliert werden. Vorteile gegenüber der einstufigen Hydroxylierung von Propranolol unter Verwendung von „engineered cytP450s BM3“ (Otey et al. 2006) sind die kürzere Reaktionszeiten und die höhere Ausbeute an 5-Hydroxypropranolol. Bei dem von Otey et al. vorgestellten Verfahren wurden nach 180 min insgesamt 4 Produkte detektiert (0,02 mM 5-OH-Propranolol, 0,09 mM 4-OH-Propranolol, 0,74 mM Desisopropylpropranolol und 0,05 mM 1-Naphthol), mit einer Ausbeute von 0,013 mg/ml 5-Hydroxypropranolol (18 %). Unter diesen Bedingungen ergibt sich eine Raum-Zeit-Ausbeute von $4,22 \times 10^{-3}$ mg 5-Hydroxypropranolol pro Milliliter und Stunde Die Raumzeitausbeute des Peroxygenase-Verfahrens beträgt 3,65 mg 5-Hydroxypropranolol pro Milliliter und Stunde, und damit ca. das 865-fache des Vergleichsverfahrens.

Optimiertes System zur Peroxid-Dosierung (+)

Die Dosierung von Wasserstoffperoxid erfolgte optimal durch die Verwendung einer medizinische Dosierpumpe im Gegensatz zur manuellen Dosierung über verschiedene Zeiträume oder dem Einsatz entsprechend hoher Startkonzentrationen im Katalysesystem.

Test-Integrierbare Analytik für (S)- und (R)-1- Phenylethanol und weiterer Metaboliten der Ethylbenzolumsetzung; Analytik Propranolol und seiner Metaboliten (+)

Die erfolgreiche Analytik von Propranolol und Ethylbenzol, einschließlich ihrer chiralen Metabolite erfolgte mittels HPLC und Gaschromatographie/MS. Die zur Analytik notwendigen Standardsubstanzen standen ebenfalls zur Verfügung.

Analytik der Methotrexat-Umsetzung (+)

Es konnte gezeigt werden, dass eine enzymatische Umsetzung von Methotrexat möglich ist, wobei Umsätze bis zu $6,67 \text{ nmol min}^{-1}$ erzielt wurden. Leider konnte bei der Analyse der Vielzahl der entstandenen Produkte das gewünschte 7-Hydroxymethotrexat nicht identifiziert werden. Auf Grund dieser unspezifisch verlaufenden enzymatischen Hydroxylierung von Methotrexat wurde eine weitere Modellverbindung (Propranolol) zur regioselektiven Hydroxylierung zu 5-Hydroxypropranolol ausgewählt. Mittels humaner proliferierbarer Leberzell-Linien soll zukünftig die Synthese von 7-OH-Methotrexat nochmals untersucht werden.

Mindestens ein funktionierendes Vektorsystem für die heterologe Expression pilzlicher Peroxygenasen (+)

Das Plasmid ist in *E.coli* für in vitro Translation vorhanden.

Funktionierendes System zur heterologen Expression der neuartigen Peroxygenasen (+)

Zwei Peroxygenase Gene aus *Coprinus cinereus* konnten erfolgreich in *Aspergillus* Expressionsvektoren kloniert und transformiert werden. Die beiden heterolog exprimierten Peroxygenasen zeigten eine geringe (WT392) bis keine Aktivität (WT393) gegenüber Naphthalen. WT392 erreicht zum Zeitpunkt des Berichtes ca. 20% der AaP Performance. Die Expression der Isoformen AaP 1 und AaP 2 in *Apergillus spec.* führte trotz Expression nicht zur Isolation eines katalytisch aktiven Proteins.

Optimierte Katalysatoren (heterolog exprimiert) (-)

Nach anfänglichen Schwierigkeiten in der heterologen Expression der AaP Isoformen 1 und 2 konnten erst mit fortgeschrittener Projektlaufzeit durch die Klonierung zweier Peroxygenasen aus *Coprinus cinereus* zwei katalytisch aktive Proteine exprimiert werden. Bedingt dadurch war ein erfolgreicher Abschluss der molekularbiologischen

Arbeiten zur Verbesserung der Peroxygenase-Eigenschaften im Rahmen des Projektes nicht möglich.

Funktionierende Prozesse mit integrierter Produktaufarbeitung unter Verwendung rekombinanter Peroxygenase-Präparate / rekombinante Peroxygenasen für die enzymatische Synthese im Gramm-Maßstab (+ / o)

Während der gesamten Projektlaufzeit standen den Projektpartnern rekombinant hergestellte Peroxygenasen in geringen Mengen mit geringer katalytischer Performance zur Verfügung. Aus diesem Grund konnte deren Einsatz in der enzymatischen Synthese bisher noch nicht umfassend untersucht werden.

Überblick über den Einsatz von Peroxygenasen in der Biokatalyse (*A. aegerita*, *C. radians*) (+)

Während der Projektlaufzeit wurde in mehreren Veröffentlichungen das Potential der Peroxygenasen beschrieben. In Abbildung 33 sind alle Reaktionen zusammen gefasst, die mittels Peroxygenasen katalysiert werden können.

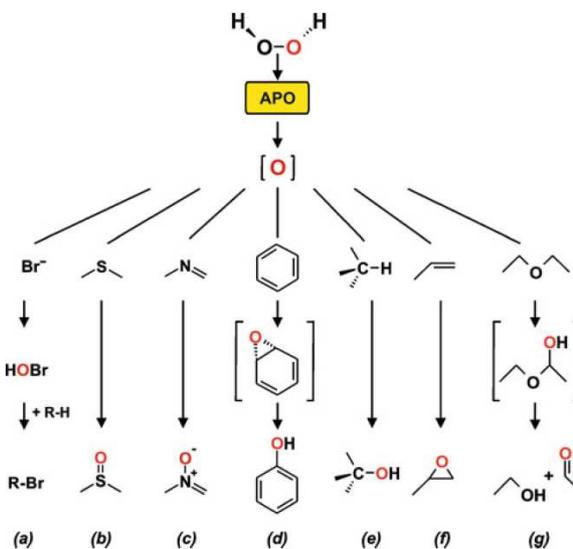


Abb. 33: (a) Oxidation von Bromid zu Hypobromit und folgender Halogenierung; (b) Sulfoxidation; (c) N-Oxygenierung; (d) Hydroxylierung über instabiles Epoxid zum Phenol; (e) Hydroxylierung von Aliphaten, (f) Epoxidierung von Doppelbindungen; (g) Etherspaltung (Hofrichter und Ullrich 2010)

Neues Wirkstoff-Testsystem

Die proliferierende Hepatozyten-Zelllinie wurde zur Induktion der CYP-Proteine mit Omebrazol bzw. Rifampicin und anschließend mit Propranolol inkubiert. Anschließend wurden sowohl das Medium als auch die Zellen selbst für die Analyse der Metabolite aufgearbeitet. Die Analyse ergab mehrere Metabolite, als Hauptmetabolit wurde 4-

Hydroxypropranolol-Glucoronidid nachgewiesen. Die Protokolle zur Extraktion der Metabolite müssen im Weiteren erarbeitet werden.

Ökoeffizienzanalyse hinsichtlich präparativer Herstellung von (*R*)-1-Phenylethanol / 5-OH-Propranolol (+)

Zusammenfassend lässt sich für (*R*)-1-Phenylethanol feststellen, dass das vorliegende, biotechnische Peroxygenase-Verfahren zur Herstellung von (*R*)-1-Phenylethanol während der Projektlaufzeit bezüglich der ökologischen Bewertung der Produktion entscheidend verbessert werden konnte. Verglichen mit weiteren Verfahren wird eine sehr gute Umweltbewertungszahl erreicht, womit ein entscheidender Beitrag zur Umweltentlastung geleistet werden kann.

Zusammenfassend lässt sich für die Darstellung von 5-Hydroxypropranolol feststellen, dass aus ökologischer Sicht das chemische Verfahren im Vergleich zu den drei herangezogenen biotechnologischen Varianten am umweltschonendsten ist. Das vorgestellte Peroxygenase-Verfahren erzielt jedoch im Vergleich mit den biologischen Verfahren die beste Umweltbewertung. Ein Vorteil des Peroxygenase-Verfahrens gegenüber dem chemischen Verfahren ist der Zeitaspekt und die Flexibilität der Produktion im Enzymmembransystem. Durch die gut lagerfähige und für viele verschiedene Umsetzungen einsetzbare Peroxygenase kann 5-Hydroxypropranolol auf Anfrage in 1-2 Tagen in der benötigten Menge und daneben weitere Spezialchemikalien hergestellt werden. Aus ökonomischer Sicht stehen die Materialpreise zum Verkaufserlös in einem sehr günstigen Verhältnis, sodass die im Peroxygenase-Verfahren gegenüber dem chemischen Verfahren höheren Materialkosten nicht entscheidend für den Erfolg des Verfahrens sein sollten.

5 Kooperationen innerhalb des Projektes

Innerhalb des Projektverbundes waren akademische Kooperationspartner, industrielle KMU und Großunternehmen involviert. Das Konzept, die Arbeitspakete potentieller Enzymproduzenten und Enzymanwender miteinander zu verknüpfen, gestaltete sich sehr erfolgreich. Zur Sicherung einer engen Zusammenarbeit wurden monatlich Projekttreffen einzelner Kooperationspartner und mindestens einmal im Jahr aller Kooperationspartner durchgeführt.

Über die gesamte Laufzeit des Projektes wurden insgesamt zwölf dieser Treffen in Deutschland und zwei in Kopenhagen abgehalten. Während dieser Meetings wurden

Inhalte aktueller Ergebnisse diskutiert, neue Methoden ausgetauscht und mögliche Versuchsansätze diskutiert. Weiterhin wurden Konzepte zur Veröffentlichung der Ergebnisse in Form von Publikationen, Vorträgen und Patenten erarbeitet. Die Treffen dienten auch der Weitergabe und dem Transport von Proben, sowie der Durchführung gemeinsamer Versuche. Nachfolgend sind publizierte Ergebnisse des Verbundes in referierten Fachzeitschriften und weitere Präsentationen zusammengefasst.

Artikel in referierten Fachzeitschriften, Publikationen

Hofrichter, M., Ullrich, R. (2010): "New and classic families of secreted fungal heme peroxidases." *Applied Microbiology and Biotechnology* 87: 871-897.

Hofrichter, M. (2010): *The Mycota. A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research. Volume 10 - 2nd Edition*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg

Aranda, E., Ullrich, R., Hofrichter, M. (2010): Conversion of polycyclic aromatic hydrocarbons, methyl naphthalenes and dibenzofuran by two fungal peroxygenases. *Biodegradation* 21:267-281

Kinne, M., Zeisig, C., Ullrich, R., Kayser, G., Hammel, K. E. & Hofrichter, M. (2010): Stepwise oxygenations of toluene and 4-nitrotoluene by a fungal peroxygenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 397: 18-21

Ullrich, R., Liers, C., Schimpke, S. & Hofrichter, M. (2009): Purification of homogeneous forms of fungal peroxygenase. *Biotechnology Journal* online: DOI 10.1002/biot.200900076

Pecyna, M. J., Ullrich, R., Clemens, A., Bittner, B., Scheibner, K., Schubert, R., Hofrichter, M. (2009): Molecular characterization of aromatic peroxygenase from *Agrocybe aegerita*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, DOI 10.1007/s00253-009-2000-1.

Kinne, M., Poraj-Kobielska, M., Aranda, E., Ullrich, R., Hammel, K. E., Scheibner, K., Hofrichter, M. (2009): Regioselective preparation of 5-hydroxypropranolol and 4-hydroxydiclofenac with a fungal peroxygenase. *Biorg. Biomed. Chem. Lett.*, Vol. 19: 3085–3087.

Kinne, M., Ullrich, R., Hammel, K.E., Scheibner, K. & Hofrichter, M. (2008): Regioselective Preparation of (R)-2-(4-pydroxyphenoxy)propionic Acid with a Fungal Peroxygenase. *Tetrahedron Letters* Volume 49: 5950-5953

Kluge, M., Dolge, C., Ullrich, R., Scheibner, K., Hofrichter, M. (2008): Hydroxylation of naphthalene by aromatic peroxygenase from *Agrocybe aegerita* proceeds via oxygen transfer from H₂O₂ and intermediary epoxidation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81: 1071-6.

Patente

Marek Pecyna, Rene Ullrich, Katrin Scheibner, Martin Kluge, Martin Hofrichter, Kirk M. Schnorr (2008) „Peroxygenases“ PCT WO 2008 / 119780 A2 Anmelder: NovoZymes A/S 09/2008

Präsentationen

Gröbe, G., Ullrich, R., Scheibner, K., Hofrichter, M. (10/2010): “Production, purification and characterization of an extracellular Peroxygenase from the agaricomycete *Marasmius rotula* with promising potential in regio- und stereoselective biocatalysis.” Symposium - Biotransformation by Fungal Cells or Fungal Enzymes / Hochschule Lausitz (FH), Senftenberg

Hofrichter, M. (04/2010): “Aromatic Peroxygenases (APO): Extracellular Fungal Biocatalysts that Efficiently Transfer Oxygen Functionalities.” BITs Inaugural Symposium on Enzymes & Biocatalysis, Shanghai (China)

Hofrichter, M., Ullrich, R., Pecyna, M., Kinne, M., Kluge, M., Aranda, E., Liers, C., Poraj-Kobielska, M., Gröbe, G., Scheibner, K., Bittner, B., Schubert R. & Hammel, K. (6/2009): „Aromatic peroxygenases from mushrooms: extracellular heme-thiolate proteins of a new enzyme sub-subclass?“ 16th International Conference on Cytochrome P450, *Okinawa, Japan*

Hofrichter, M., Scheibner, K., Ullrich, R., (6/2009): „Extracellular peroxygenases: production, characterization and mechanism of biotransformation“, *NovoZymes A/S Bagsvaerd, Denmark*

Scheibner, K. (5/2009): „Peroxygenasen für die Arzneimittel-Transformation“ LGC GmbH, Biotechnologiepark, *Luckenwalde*

Hofrichter, M. (04/2009): “Oxygen transfer reactions catalyzed by fungal peroxygenases.” Gastvortrag am Institut für Biotechnologie, Karl-Franzens-Universität, Graz (Austria)

Hofrichter, M., Ullrich, R., Pecyna, M., Kinne, M., Kluge, M., Aranda, E., Liers, C., Gröbe, G., Scheibner, K. (2/2009): „Aromatic peroxygenases from mushrooms: extracellular heme-thiolate proteins of a new enzyme sub-subclass“ FSU, Jena

Liers, C., Gröbe, G., Scheibner, K., Hofrichte, M. (12/2008): „Digestion of Rape straw by fungal enzyme cocktails. 2nd Annual Workshop “Enzymatic fiber modification and hydrolysis” EU-COST FP0602 Biel, Switzerland

Scheibner, K. (12/2008): „Neue Enzyme für die Biokatalyse?“ Eingeladene Referentin, *BioBilanz*, Biotechnologiepark Luckenwalde

Scheibner, K. (10/2008): „Entwicklung eines innovativen Produktionsverfahrens zur umweltfreundlichen Synthese der Modellverbindungen (R)-1-Phenylethanol und 7-Hydroxymethotrexat durch Peroxygenasen“ *Kickoff Meeting ChemBioTech* Verbund, Deutsche Bundesstiftung Umwelt, Osnabrück

Posterpräsentationen

Kluge, M., Ullrich, R., Scheibner, K. & Hofrichter, M. (06/2010): Stereoselective epoxygenation of styrene derivates by *Agrocybe aegerita* aromatic peroxygenase (AaeAPO). 9th International Symposium on Peroxidases, Leipzig (Germany), S. 87 (Poster-Präsentation, P 3.13)

6 Fazit

In dem abgeschlossenen Projekt konnte das Potential der pilzlichen Peroxygenasen aus *Agrocybe aegerita* und *Coprinellus radians* erstmalig als ein zellfreies, selektiv oxyfunktionalisierendes Enzymsystem verfügbar gemacht werden. Für die hier beschriebenen Modellsubstanzen (R)-1-Phenylethanol und 5-Hydroxypropranolol konnte ein völlig neuer Lösungsansatz zur enzymatischen Gewinnung dieser Verbindungen aufgezeigt werden. Die ermittelten Umweltbewertungszahlen sind bei beiden Peroxygenase-Verfahren gleichwertig oder deutlich besser als bisherige chemische oder biotechnologische Verfahren. Erwähnenswert hierbei ist, dass durch die fortlaufende ökoeffiziente Weiterentwicklung des Verfahrens zur Darstellung von Phenylethanol ein entscheidender Beitrag zur Umweltentlastung erzielt werden konnte. Änderungen in der Zielsetzung wurden insoweit notwendig, da nach Umsetzung von Methotrexat kein 7-Hydroxymethotrexat identifiziert werden konnte. Bedingt dadurch wurde diese Modellverbindung durch Propranolol ersetzt. Die Herstellung der Peroxygenasen konnte für *Agrocybe aegerita* erfolgreich bis in den 30 l Maßstab überführt werden. Die

heterologe Expression der pilzlichen Peroxygenasen ist ein sehr komplexes und aufwendiges Verfahren, welches von vielen Faktoren abhängt. Letztendlich konnte auch dieses Problem durch die Expression zweier Peroxygenasen aus *Coprinus cinereus* gelöst werden. Die in diesem Projekt produzierten und charakterisierten Peroxygenasen sind hinsichtlich ihres Spektrums an selektiven Oxyfunktionalisierungsreaktionen, ihrer einfachen Handhabbarkeit und Umwelteffizienz als sehr innovativ einzustufen. Auf Basis der im Projektzeitraum publizierten Ergebnisse und der entwickelten Methoden und Verfahren werden weiterführende Untersuchungen in einem BMBF-unterstützten Forschungs- und Entwicklungskooperationsverbund durchgeführt. Zusammenfassend kann das abgeschlossene Forschungsverbundvorhaben als erfolgreich eingestuft werden.

Quellenverzeichnis

Aehle, W. (Ed.) (2004) Enzymes in Industry. Wiley-VCH, Weinheim

Anh, D.H., Ullrich, R., Benndorf, D., Svatos, A., Muck, A., Hofrichter, M. (2007): The coprophilous mushroom *Coprinus radians* secretes a haloperoxidase that catalyzes aromatic peroxygenation. *Appl Environ Microbiol* 73:5477-5485

Aranda, E., Kinne, M., Kluge, M., Ullrich, R., Hofrichter, M. (2009): Conversion of dibenzothiophene by the mushrooms *Agrocybe aegerita* and *Coprinellus radians* and their extracellular peroxygenases. *Appl Microbiol Biotechnol* 82:1057-1066

Bichara, N., Ching, M.S., Blake, C.L., Ghabrial, H., Smallwood, R.A. (1996): Propranolol hydroxylation and N-desisopropylation by cytochrome P4502D6: studies using the yeast-expressed enzyme and NADPH/O₂ and cumene hydroperoxide-supported reactions. *Drug Metab Dispos* 24:112–118.

Bogár, K., Martín-Matute, B., Bäckvall, J.E. (2007): Large-scale ruthenium- and enzyme-catalyzed dynamic kinetic resolution of (rac)-1-phenylethanol. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* 3:50.

Breuer, M., Ditrich, K., Habicher, T., Hauer, B., Keßeler, M., Stürmer, R., Zelinski, T. (2004): Industrial methods for the production of optically active intermediates. *Angew. Chem. Int. Ed.* 43:788-824.

Brinkmann, T., Rubbeling, H., Fröhlich, P., Katzberg, M., Bertau, M. (2010): Application of Material and Energy Flow Analysis in the Early Stages of Biotechnical Process

- Development – A Case Study. *Chemical Engineering & Technology. Material and Energy Flow Analysis* 33:618-628.
- Buchholz, K., Kasche, V., Bornscheuer, U.T. (2005): *Biocatalysts and Enzyme Technology*. Wiley-VCH Weinheim, 27-108.
- Buthe, A., Hartmeier, W., Ansorge-Schuhmacher, M.B. (2004): Novel solvent-based method for preparation of alginate beads with improved roundness and predictable size. *Journal of Microencapsulation*, Vol. 21, No. 8, pp. 865-876.
- Campestrini, S., Tonellato, U. (2005) *Selective Catalytic Oxidations in Supercritical Carbon Dioxide*. *Current Organic Chemistry* 9:31-47
- Ebel, S., von Bruchhausen F. (1999): *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis Folgeband 4: Stoffe A-K*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, (kostenlose Onlinevollversion unter <http://books.google.de>) Stand 08.10.2010
- Eiben, S., Kaysser, L., Maurer, S., Kühnel, K., Urlacher, V.B., Schmid, R.D. (2006): Preparative use of isolated CYP102 monooxygenases – A critical appraisal. *J. Biotechnol.* 124: 662-669
- Federsel, H.-J. (1993): Chirale Arzneimittel- Scale-up, Kontrolle und deren Bedeutung für die pharmazeutische Forschung, *Chemie in unserer Zeit*. 27, 2, 78-87
- Foster, B.C., Buttar, H.S., Qureshi, S.A., McGilveray, I.J. (1989): Propranolol metabolism by *Cunninghamella bainieri*. *Xenobiotica* 19:539–546.
- Gonzalez, F.J. (2005): Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutat Res* 569:101–110
- Guengerich, F.P. (2005): Human Cytochrome P450 Enzymes. In: Ortiz de Montellano, P.R. [ed.] *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. 3rd Edition, pp. 377-530, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York
- Hallifax, D., Houston, J. B. (2006): Uptake and intracellular binding of lipophilic amine drugs by isolated rat hepatocytes and implications for prediction of in vivo metabolic clearance. *Drug Metab Dispos* 34(11): 1829-1836
- Heinzle, E., Biber, A., Eissen, M., Abdul Kholiq, M. (2006): Bewertung biotechnologischer Prozesse in frühen Phasen der Entwicklung hinsichtlich Risiken bezüglich Ökologie, Sicherheit und Gesundheit. *Chemie Ingenieur Technik* 78: 301-305.

- Hofrichter M., Ullrich R. (2006): Heme-thiolate haloperoxidases: versatile biocatalysts with biotechnological and environmental significance. *Appl Microbiol Biotechnol* 71:276-288
- Hofrichter M, Ullrich R, Pecyna M, C. L, Lundell T (2010): New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87:871-897
- Holland, H.L. (1998) Hydroxylation and dihydroxylation. In: H.-J. Rehm, G. Reed and D.R. Kelly Editors, *Biotechnology, Vol. 8a: Biotransformations I* Wiley-VCH, Weinheim, pp. 475–533
- Kinne M., Poraj-Kobielska M., Ralph S.A., Ullrich R., Hofrichter M., Hammel K.E. (2009): Oxidative cleavage of diverse ethers by an extracellular fungal peroxygenase. *J Biol Chem* 284:29343-9
- Kinne, M., Poraj-Kobielska, M., Aranda, E., Ullrich, R., Hammel, K.E., Scheibner, K., Hofrichter, M. (2009): Regioselective preparation of 5-Hydroxypropranolol and 4'-Hydroxydiclofenac with a fungal peroxygenase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 19: 3085–3087.
- Kluge M.G., Ullrich R., Scheibner K., Hofrichter M. (2007): Spectrophotometric assay for detection of aromatic hydroxylation catalyzed by fungal haloperoxidase-peroxygenase. *Appl Microbiol Biotechnol* 75:1473-1478
- Kluge M., Ullrich R., Dolge C., Scheibner K., Hofrichter M. (2008): Hydroxylation of naphthalen by aromatic peroxygenase from *Agrocybe aegerita* proceeds via oxygen transfer from H₂O₂ and intermediary epoxidation; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 1071-1076
- Krause, N., (1995): *Metallorganische Chemie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin Oxford
- Masubuchi, Y., Hosokawa, S., Horie, T., Suzuki, T., Ohmori, S., Kitada, M., Narimatsu, S. (1994): Cytochrome P450 isozymes involved in propranolol metabolism in human liver microsomes. The role of CYP2D6 as ring-hydroxylase and CYP1A2 as N-desisopropylase. *Drug Metab Dispos* 22:909–915.
- Marvalin, C., Azared, R. (2011): Microbial production of phase I and phase II metabolites of Propranolol. *Xenobiotica*. 41:175-86. Epub 2010 Nov 26.

- Mitsudome, T., Nosaka, N., Mori K., Mizugaki, T., Ebitani, K., Kaneda, K. (2005): Liquid-phase Epoxidation of Alkenes Using Molecular Oxygen Catalyzed by Vanadium Cation-exchanged Montmorillonite. *Chemistry Letters* 34:1626-1631
- Oatis, J.E., Russell, M.P., Knapp, D.R., Walle, T. (1981): Ring-hydroxylated propranolol: synthesis and β -receptor antagonist and vasodilating activities of the seven isomers. *J. Med. Chem.* 24:309–314.
- Otey, C.R., Bandara, G., Lalonde, J., Takahashi, K, Arnold, F.H. (2006): Preparation of Human Metabolites of Propranolol Using Laboratory-Evolved Bacterial Cytochromes P450. *Biotechnology and Bioengineering* 93:494–499.
- Pecyna M.J., Ullrich R., Bittner B., Clemens A., Scheibner K., Schubert R., Hofrichter M. (2009): Molecular characterization of aromatic peroxygenase from *Agrocybe aegerita*. *Appl Microbiol Biotechnol* 84:885-897
- Scharschuh, H. (2011): Anwendung pilzlicher Peroxygenasen in der enantio- und regioselektiven Synthese. Master Thesis 2011, Hochschule Lausitz.
- Smith GC, Tew DG, Wolf CR (1994): Dissection of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase into distinct functional domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8710-8714
- Smidsrød, O., Skjåk-Bræk, G. (1990): Alginate as immobilisation matrix for cells. *Tibtech*, 8, 71–78.
- Spohn, U., Janasek, D. (1998): Posöses glas als Enzymträger. *Bioforum* 3, 108-109
- Ullrich R, Nüske J, Scheibner K, Spantzel J, Hofrichter M (2004): Novel haloperoxidase from the agaric basidiomycete *Agrocybe aegerita* oxidizes aryl alcohols and aldehydes. *Appl Environ Microbiol* 70:4575-4581
- Ullrich R, Hofrichter M (2005): The haloperoxidase of the agaric fungus *Agrocybe aegerita* hydroxylates toluene and naphthalene. *FEBS Lett* 579:6247-6250
- Ullrich, R., Hofrichter, M. (2007) Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds (invited review), *Cell. Mol. Life Sci.* 64:271-293
- Ullrich R, Liers C, Schimpke S, Hofrichter M (2009): Purification of homogeneous forms of fungal peroxygenase. *Biotechnol J* 4:1619-1626

- Urlacher, V.B., Lutz-Wahl, S., Schmid, R.D. (2004): Microbial P450 enzymes in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 317-25.
- Volak, L.P., Court, M.H. (2010): Role for protein kinase C delta in the functional activity of human UGT1A6: implications for drug-drug interactions between PKC inhibitors and UGT1A6. *Xenobiotica.* 40(5):306-18.
- Walle T., Oatis J. E. Jr., Walle U. K., Knapp D. R. (1981): New ring-hydroxylated metabolites of propranolol - species differences and stereospecific 7-hydroxylation". *Drug Metabol. And Dispos.*;10,2, 122-127.
- Warner, J.C., Cannon; A.S., Dye; K.M. (2004): Green chemistry. *Environmental Impact Assessment Review*, 24:775-799
- Waxman, D.J., Chang, K.H. (2005) Hormonal regulation of liver cytochrome P450 enzymes. In: Ortiz de Montellano, P.R. [ed.] *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry.* 3rd Edition, pp. 347-376, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York
- Weckbecker, A. (2005): Entwicklung von Ganzzellbiokatalysatoren zur Synthese von chiralen Alkoholen. Dissertation 2005.
- You, J.O., Park, S.B., Park, H.Y., Haam, S., Chung, C.H., Kim, W.S. (2001): Preparation of regular sized Ca-alginate microspheres using membrane emulsification method. *J Microencapsulation* 18: 521–532.
- Yoshinaria K., Uedaa R., Kusanob K., Yoshimurab T., Nagataa K. und Yamazoea Y. (2008): Omeprazole transactivates human CYP1A1 and CYP1A2 expression through the common regulatory region containing multiple xenobiotic-responsive elements *Biochemical Pharmacology* Volume 76, Issue 1, 139-145
- Zehentgruber, D. (2009): Biotransformationen mit Cytochrom P450 Monooxygenasen. Dissertation