

# **Nachhaltige Bioproduktion von allergenfreiem Naturlatex und – kautschuk in Zellkulturen**

**LaKaZell**

**Aktenzeichen: 13255**

## **Abschlussbericht zum Projekt:**

### **Nachhaltige Bioproduktion von allergenfreiem Naturlatex und -kautschuk in Zellkulturen - LaKaZell**

**Aktenzeichen: 13255**

#### Projektpartner:

1. Westfälische Wilhelms-Universität Münster  
Institut für Biologie und Biotechnologie der Pflanzen  
Schlossplatz 8, 48143 Münster  
Prof. Dr. Dirk Prüfer  
Tel.: 0251-8322302  
Email: dpruefer@uni-muenster.de
2. Phytowelt GreenTechnologies GmbH  
Kölsumer Weg 33  
41334 Nettetal  
Dr. Guido Jach  
Tel.:0221-987473203  
Email: g.jach@phytowelt.com
3. Technische Universität München  
Lichtenbergstr. 4  
85747 Garching  
PD Dr. Wolfgang Eisenreich  
Tel.: 089-28913336  
Email: wolfgang.eisenreich@ch.tum.de

## Zusammenfassung

Etwa 30% der insgesamt 10,5 Millionen Tonnen produzierten Naturlatex/-kautschuks werden für die Erzeugung von Latexprodukten verwendet. Faktoren wie die sich ausweitende Fahrzeug- und auch Reifenindustrie in China und die Verdrängung von Kautschukbauplantagen durch andere regional lukrativere Pflanzen (z.B. Ölpalme) verteuerten den Rohlatex/-kautschuk in den letzten Jahren um das Dreifache. Produkte wie z. B. Latexhandschuhe oder Kondome sind auf Naturlatex/-kautschuk angewiesen. Der Einsatz von Naturlatex/-kautschuk in Produkten, mit denen der Verbraucher jedoch in direkten Kontakt kommt, wird durch das Auftreten von Allergien bei z. B. bis zu 17% der Arbeitnehmer im Medizinsektor erschwert. Zurzeit gibt es keinen proteinfreien Naturlatex/-kautschuk aus *H. brasiliensis*, der für diese Produkte verwendet werden könnte, da durch die Proteine der Latexpartikel die kolloidale Stabilität der Latexsuspension aufrechterhalten wird.

Das Ziel von LaKaZell war die Produktion eines Naturlatex/-kautschuk in Laticiferen-Zellkulturen von russischem Löwenzahn (*Taraxacum koksaghyz*), der aufgrund seiner Allergenfreiheit eine Anwendung in Spezialprodukten der Medizintechnik haben kann. Im Projektzeitraum konnte eine Laticiferenzellkultur erzeugt werden, die in der Lage ist Naturlatex/-kautschuk zu produzieren. Ein Antigen-Test mit Hilfe von Antikörpern gegen die bekannten *Hevea brasiliensis* (Kautschukbaum) Antigene verlief für alle untersuchten Pflanzen negativ. Eine Charakterisierung des Latex/Kautschuks aus *T. koksaghyz* ergab, dass dieser vergleichbare Eigenschaften wie der aus *H. brasiliensis* besitzt. Die Analyse der metabolischen Flüsse mittels  $^{13}\text{CO}_2$  Markierungsexperimenten zeigte eindeutig die Abhängigkeit der Kautschukbiosynthese vom Mevalonat-Weg auf und schloss gleichzeitig die Beteiligung des Methylerythritolphosphat-Weges aus. In *phytomining*-Ansätzen wurde aufgrund dieses Ergebnisses ein Schwerpunkt auf die Isolierung und Charakterisierung von Schlüsselenzymen des Mevalonat-Weges gelegt, so dass mehrere Kandidatengene zur Optimierung der Kautschuksyntheserate vorliegen. Weiterhin wurden durch gezielte Mutagenese wichtige Ansatzpunkte zur Optimierung der Aktivität von *cis*-Prenyltransferasen, den Enzymen zur Verlängerung der Polyisoprenketten, erarbeitet. Als Routineanalytik zur Quantifizierung von Polyisopren konnte ein robustes und im hohen Durchsatz durchführbares NMR-Verfahren etabliert werden. Die Entwicklung des neuartigen Produktionsverfahrens wurde von Beginn an durch eine Ökoeffizienzanalyse begleitet.

## **Anlass des Projektes**

Natur- und Synthesekautschuk sind elastische Polymere, aus denen Gummi hergestellt wird. Diese bestehen aus polymerisierten Isopreneinheiten von extrem einheitlicher Struktur mit einer außerordentlich hohen Molmasse ( $>2 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$ ) sowie einem *cis*-1,4-Gehalt von über 95%. Durch Vulkanisierung vernetzter Naturkautschuk zeichnet sich durch extrem hohe Elastizität, Kälteflexibilität und Zugfestigkeit aus – Eigenschaften, die bis heute nicht auf synthetischen Weg erzeugt werden konnten. Daher bleibt der Naturkautschuk ein entscheidender Qualitätsfaktor für viele Gummiprodukte.

Naturkautschuk/Latex aus *H. brasiliensis*, der einzigen wirtschaftlich genutzten Quelle, wird bei der Herstellung von medizinischen Produkten aufgrund zunehmender allergischer Reaktionen nicht mehr eingesetzt. Studien belegen, dass bereits bis zu 17% des klinischen Personals unter Latexallergien leidet, wobei die allergische Reaktion entweder direkt durch den Latex ausgelöst wird oder eine Folge der Zugabe stabilisierender Additive wie Thiurame, Carbamate oder Mercaptobenzothiazole bei der Latexprozessierung und Verarbeitung ist. Die Typ-I-Allergie gegen Latex richtet sich gegen eine Vielzahl von Proteinen, die natürlicherweise im Latex von *H. brasiliensis* vorkommen. In den letzten Jahren sind die Proteine mit den stärksten allergenen Eigenschaften, Hev b1, Hev b3, Hev b5 und Hevb6.02, identifiziert und biochemisch charakterisiert worden. Dabei wird besonders den Antigenen Hev b5 und Hev b6 eine dominante Rolle als Allergene in verarbeiteten Produkten wie Handschuhen zugeschrieben. Werden die Proteine vom Latex entfernt, so verliert dieser seine kolloidale Stabilität, wodurch die Verarbeitung zu Latexfilmen sowie das Gießen oder Spritzen von Formen nicht mehr möglich sind. Zurzeit gibt es keinen proteinfreien Latex aus *H. brasiliensis* auf dem Markt. Naturlatex findet sich in vielen elastischen Produkten wie z.B. Luftballons, Schnuller, Babyflaschensauger, Bällen, Wärmflaschen, Haushalthandschuhe, Sport- und Spielzeugartikeln, Kondomen, Gummiringen, elastische Geweben und Litzen, aber auch Matratzen aus Latexschaum. Zudem wird Latex zur Herstellung von medizinischen Artikeln eingesetzt. Zu nennen wären hier vor allem Gummihandschuhe, selbsthaftende Verbände, Katheter und Kofferdam; allesamt Produkte, die in unmittelbare Berührung mit der Haut oder Schleimhaut stehen. Die Latex-Allergie und besonders die Typ-I-Allergie stellt ein erhebliches, zunehmendes

Problem im Gesundheitsbereich in Deutschland wie auch in vielen anderen Industrieländern dar.

Zur Deckung der weltweit gestiegenen allgemeinen Nachfrage und zur Bereitstellung von nicht-allergenem Naturkautschuk wird zurzeit verstärkt nach alternativen Produzenten gesucht. Während des zweiten Weltkrieges sowie in den ersten Jahren nach Kriegsende konnte ein großer Teil des Bedarfes an Naturkautschuk in Europa aus den Milchsaftzellen (Laticiferen) von *Taraxacum koksaghyz* gewonnen werden – einer Pflanzenspezies, die noch weitere Wertstoffe zum Aufbau einer Koppelnutzung beinhaltet. In den Kriegsjahren wurde die Kaiser-Wilhelm Gesellschaft damit beauftragt, effiziente Verfahren zur Isolierung von Naturkautschuk aus *T. koksaghyz* zu entwickeln. Wenn auch noch sehr unwirtschaftlich, so konnten dennoch im Kriegsjahr 1943 von den benötigten 2400 Tonnen Naturkautschuk 200 Tonnen aus *T. koksaghyz* mit dem damaligen Stand der Technik aufgereinigt werden. In der heutigen Zeit wird *T. koksaghyz* neben Guayule (*Parthenium argentatum*) zur Gewinnung von Naturkautschuk vor allem in den USA angebaut. Die Prozessierung von Guayule zur Gewinnung von Latexsuspensionen ist allerdings sehr aufwendig, da während der Separation die Stabilität der Latexpartikel gewährleistet werden muss.

### **Zielsetzung des Projektes**

Das übergeordnete Ziel des Vorhabens verfolgte die Entwicklung eines innovativen biotechnologischen Ganzzellproduktionssystems für die Herstellung von allergenfreiem Naturlatex/-kautschuk und weiterer wirtschaftlich interessanter Verbindungen in *T. koksaghyz* Laticiferenkulturen. Dabei wurden neue Ansätze zu Produktionsverfahren ebenso integriert wie Methoden der Metabolischen Flussanalyse. Die Projektpartner verfolgten drei wesentliche Ziele, um eine zeitnahe und marktrelevante Umsetzung des Vorhabens zu gewährleisten:

1. Entwicklung einer effizienten Latex-/Kautschuk-produzierenden Laticiferenkultur von *T. koksaghyz* (P1; AG Prüfer)
2. Identifizierung und Analyse neuer Wertstoffe und Enzyme in Latex-/Kautschuk-produzierender Laticiferenkultur von *T. koksaghyz* durch „phytomining“ (P2; Phytowelt)
3. Physikochemische Analytik von Naturkautschuk und dessen Bildungswege (P3; AG Eisenreich)

## **Umwentlastung und Ressourcenschonung**

Das beantragte Vorhaben sollte wesentlich zur Umsetzung biotechnologischen Wissens in neue umweltschonende Produktionsverfahren, Produkte und in entsprechende Dienstleistungen beitragen. Mit Hilfe innovativer Ansätze der pflanzlichen Biotechnologie sollten biologische Prozesse unter wirtschaftlichen Bedingungen technisch nutzbar gemacht werden. Als biologische Produktions- bzw. Transformationssysteme kamen pflanzliche Zellkulturen in Betracht. Damit werden sowohl die Entwicklung und Weiterentwicklung umweltfreundlicher biotechnologischer Verfahren zur Substitution bestehender konventioneller industrieller Produktionsverfahren als auch die Entwicklung effizienter umweltfreundlicher biotechnologischer Verfahren für die industrielle Produktion von allergenfreiem Naturkautschuk verfolgt. Im Vordergrund sollten dabei die Orientierung an den Synthesepinzipien der Natur durch Auffindung, Isolierung und Optimierung geeigneter natürlicher Enzymsysteme, die Ausrichtung von Wertschöpfungsketten und Produktionssystemen auf mehr Nachhaltigkeit durch Entwicklung und Nutzung innovativer Verfahren stehen. Das Vorhaben zielte auf eine Ressourcenschonende, biologische Herstellung von Naturkautschuk, -latex und anderen Wertstoffen ab, die ökonomischen und ökologischen Bedürfnissen gerecht wird. Das Projekt erfüllte mit seinen Prozessinnovationen somit alle Dimensionen der Nachhaltigkeit:

Minimierung der Umweltbelastung (ökologische Dimension): Die Gewinnung und Herstellung von Erdöl und daraus gewonnenen Produkten sind energieaufwendig und meist mit vielen Prozessschritten sowie schweren Eingriffen in die Umwelt verbunden. So beträgt der Energieaufwand für die Herstellung von 1 kg Synthetikautschuk 130 MJ gegenüber 13-16 MJ bei Naturkautschuk. Herstellung eines qualitativ höherwertigen Produktes durch zielgerichtete Produktionsverfahren (ökonomische Dimension): aufgrund der stetig ansteigenden Allergenität gegenüber Naturkautschukprodukten aus *H. brasiliensis*, werden zurzeit alle medizinischen Produkte (z. B. Latexhandschuhe, Katheter) aus Synthetikautschuk hergestellt. Die nachhaltige Produktion von allergenfreiem Naturkautschuk würde zu einer Renaissance von Naturkautschukprodukten im medizinischen Sektor beitragen. Zudem wird die Bereitstellung weiterer Grundsubstanzen (z. B. Phenolcarbonsäuren, Terpene) und ihrer Biosyntheserouten zu einer deutlichen Steigerung der

Wertschöpfung führen. Diese Nutzung weiterer Wertstoffe, Enzyme und Biosynthesen sollte zur effizienteren und damit nachhaltigeren Nutzung des Rohstoffes im Sinne einer „Koppelnutzung“ führen. Qualifizierung von Mitarbeitern in Aus- und Weiterbildung im Bereich umweltverträglicher Produktionsverfahren durch Integration in das FuE-Vorhaben stellten die soziale Dimension dar.

## **Verwendete Methoden**

### **1. Entwicklung einer effizienten Latex-/Kautschuk-produzierenden Laticiferenkultur von *T. koksaghyz* (P1; AG Prüfer)**

*P1.1: Etablierung einer pflanzlichen Sterilkultur für verschiedene *T. koksaghyz* Linien, Übergabe aller Pflanzenlinien an die Phytowelt für phytomining-Experimente*

Die Sterilkultur für *T. koksaghyz* wurde in Anlehnung an veröffentlichte Protokolle durch Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen für die Phytohormone BAP (*Benzyl Amino Purine*) und NAA (*1-Naphthalene Acetic Acid*) sowie verschiedene Kohlenstoffquellen zur Regeneration etabliert. Die regenerierten Linien wurden an den Partner 2 (PHY) übergeben.

*P1.2: Aufreinigung von Naturkautschuk aus den verschiedenen Linien zur Bestimmung der Quantität (AG Prüfer) und Qualität (AG Eisenreich)*

Aus *T. koksaghyz* Pflanzen wurde für verschiedene Analytiken (z.B. NMR) Latex und Kautschuk isoliert und dem entsprechenden Partner zur Verfügung gestellt.

*P1.3: Überprüfung der Produkteigenschaften*

Latex von *T. koksaghyz* wurde in einem Antikörper-basierten Test auf seine allergenen Eigenschaften hin durch die Firma Icosagen überprüft.

*P1.4: Etablierung von Zellkulturen im Labormaßstab*

Im Rahmen von LaKaZell soll eine Latex-/Kautschuk-produzierende Laticiferenzellkultur als Ganzzellsystem beim Projektpartner 1 (WWU) etabliert werden. Dazu wurden transgene *T. koksaghyz* Linien mittels *Agrobakterien tumefaciens*-vermittelter Pflanzentransformation erzeugt, denen die eingebrachten Vektoren eine Resistenz gegen das Totalherbizid BASTA (ZK1-Plasmide) oder Kanamycin (ZK2-Plasmide), sowie eine laticiferenspezifische Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin vermittelt. Von den Blättern der Pflanzen aus Sterilkultur wurden durch den Einsatz von Phytohormonen und einer laticiferenspezifischen

Selektion Laticiferenzellkulturen erzeugt. Eine Untersuchung der Inhaltstoffe *in vivo* wurde mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Nilrot durchgeführt.

#### *P1.5: Etablierung einer Laticiferenkultur im Großmaßstab*

Die Etablierte Zellkultur wurde für Analytische Zwecke mit einem Volumen von 100 ml angezogen. Das *scale-up* erfolgte auf ein Kulturvolumen von bis zu 1 L.

#### *P1.6: Latexgewinnung aus Zellkultur*

Aus den Kulturen wurde das cis-1,4-Isopren in Lösung gebracht und zur Analytik eingesetzt.

#### *P1.7: Optimierung der Kautschukbiosynthese durch „Metabolic Engineering“*

Transgene *T. koksaghyz* Pflanzen mit den Konstrukten zur Überexpression der HMGR1 aus *Arabidopsis thaliana* wurden mittels *A. tumefaciens*-vermittelter transformation erzeugt und für die Etablierung als Zellkultur in Sterilkultur angezogen. Des Weiteren wurde das Produkt der HMGR, Mevalonat, der Zellkultur extern zugefüttert, um eine Erhöhung des Polyisoprengehalts zu erzielen.

## **2. Identifizierung und Analyse neuer Wertstoffe und Enzyme in Latex-/Kautschuk-produzierender Laticiferenkultur von *T. koksaghyz* durch „phytomining“ (P2; Phytowelt)**

#### *P2.1: Material und Knowledge-Transfer*

Von Partner 1 erzeugtes und bereitgestelltes Saatgut und Pflanzenmaterial (*T. koksaghyz*) wurde in die Labore und Gewächshäuser der Phytowelt transferiert und wird dort unter der Verwendung der in P1.1 erarbeiteten Protokolle weiter kultiviert.

#### *P2.2: phytomining*

Mittels RT-PCR wurden cDNAs für die Gene des MVA-Stoffwechselweges, *IspC* des MEP-Stoffwechsels und *cis*-Prenyltransferasen amplifiziert. Diese wurden für funktionale Charakterisierungen in verschiedene Expressionsplasmide kloniert und in die entsprechenden Wirtsorganismen (z.B. *E. coli*) transformiert.

#### *P2.3: Enzymatische Kautschuk-Optimierung*

Durch bioinformatische Methoden wurde eine Vorhersage der dreidimensionalen Struktur der *cis*-Prenyltransferasen aus *T. koksaghyz* durchgeführt. Durch gerichtete Mutagenese wurden einzelne Nukleotidsequenzen so verändert, dass an der entsprechenden Stelle im Protein eine Aminosäure mit veränderter funktionaler Gruppe eingebaut wird.



#### *P2.4: Die Optimierung des Latex*

Dieses Arbeitspaket wurde zugunsten der anderen Ansätze zurückgestellt

#### *P2.5: Analyse des industriellen Wertschöpfungspotenzials der Enzyme und weiterer (Wert)Stoffproduktion*

Es wurden Gespräche mit verschiedenen Partner-Firmen aus den Sektoren Medizin (z.B. Cognis-LS) und industrielle Rohstoffe (z.B. Bayer AG) geführt. Weitere Terpene wurden als *added value* der Zellkultur identifiziert.

### **3. Physikochemische Analytik von Naturkautschuk und dessen Bildungswege (P3; AG Eisenreich)**

#### *P3.1: Bestimmung der Qualität von Naturkautschuk aus den verschiedenen Linien mittels ein- und zweidimensionaler <sup>13</sup>C-NMR Spektroskopie*

Zur Bestimmung der Reinheit und des Gehalts von *cis*-Polyisopren in Latexproben und Wurzelextrakten sowie zur Bestimmung der Aktivität von *cis*-Prenyltransferasen wurde die ein- und zweidimensionale <sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C NMR Spektroskopie verwendet. Der Polymerisationsgrad von *cis*-Polyisopren wurde mittels <sup>1</sup>H NMR durch Diffusionsmessungen (diffusion-ordered-spectroscopy, DOSY) abgeschätzt.

#### *P3.2: Vergleichende Analysen von Metabolitprofilen in apolaren und polaren Zellfraktionen („Metabolomics“)*

Mittels <sup>1</sup>H NMR Spektroskopie und GC/MS Spektrometrie wurden Metabolitprofile von Pflanzenextrakten (Metabolomics) bestimmt.

#### *P3.3: Herstellung und Bereitstellung von [3,4,5-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]1-Desoxyxylulose*

Als Vorbereitung für die detaillierte Analytik der metabolen Flüsse in Zellkulturen erfolgte eine enzymatische Synthese von ca. 1 g <sup>13</sup>C-markierter 1-Desoxyxylulose.

#### *P3.4: Messung der Isotopverteilung von Naturkautschuk und deren Vorstufen zur Bestimmung der metabolischen Flüsse bei der Produktion von Naturkautschuk*

Mittels <sup>13</sup>C NMR Spektroskopie und Massenspektrometrie wurde der Einbau von [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glucose in Polyisopren und andere Stoffwechselprodukte aus der etablierten Laticiferenkultur analysiert. Um den Stofffluss der natürlichen Kohlenstoffquelle CO<sub>2</sub> zur Zielverbindung zu bestimmen, haben wir *Taraxacum* Pflanzen in einer Atmosphäre mit <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> unter Belichtung kultiviert. Das *cis*-Polyisopren wurde aus dem Wurzellatex isoliert und mittels eindimensionaler und zweidimensionaler <sup>13</sup>C-NMR Spektroskopie (u.a. INADEQUATE) untersucht.

## U1: Ökoeffizienzanalyse durch die ifu Hamburg GmbH

Es existieren verschiedene Verfahren, allergenfreien Latex-/Kautschuk zu produzieren. Eine projektbegleitende, vergleichende Ökoeffizienzanalyse durch die ifu Hamburg GmbH soll zeigen, ob das in diesem Projekt zu entwickelnde Verfahren

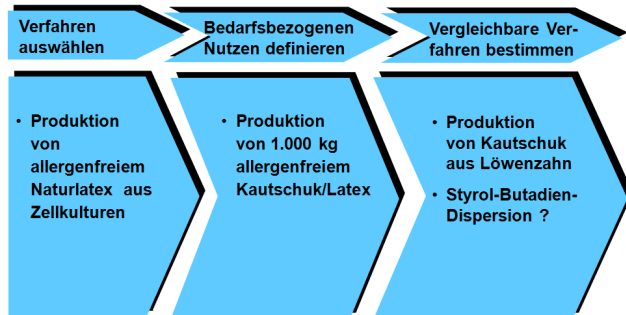


Abbildung 2. Kundennutzen definieren und Bestimmung von geeigneten Vergleichsprozessen

zur Herstellung von Latex aus Laticiferenkulturen von *T. koksaghyz* (im Folgenden Szenario Zellkultur genannt) sowohl ökonomisch, als ökologisch vorteilhafter ist als Vergleichsverfahren, bzw. wo ggf. Optimierungspotenziale liegen. Abbildung 2 zeigt schematisch, wie ausgehend von dem zu bewertenden

Prozess, Referenz-Szenarien bestimmt werden können. In diesem Fall wird als Vergleichsprozess die Herstellung von Latex aus den Wurzeln der Pflanze *Taraxacum koksaghyz* betrachtet

(im Folgenden Szenario Feldanbau). Möglicherweise kann zusätzlich die Herstellung von synthetischem Latex betrachtet werden, auch wenn es sich hierbei nicht um Naturlatex handelt, um einen weiteren Vergleichswert zu erhalten. Der bedarfsbezogene Nutzen wird für diese Studie definiert als „Produktion von 1.000 kg „allergenfreiem Naturlatex“.

Kundennutzen

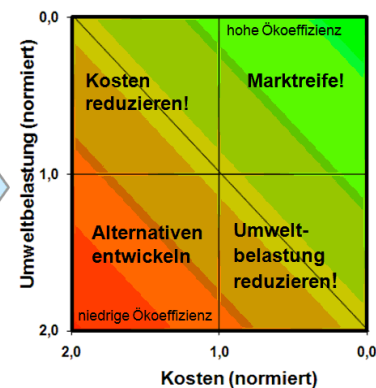


Abbildung 1. Ökoeffizienzportfolio: Betrachtete Szenarien werden je nach Umweltbelastung und Kosten eingefügt

Diese Studie betrachtet alle Aufwendungen von der Rohstoffentnahme bis zum Werkstor. Damit wird als Systemgrenze der ‚cradle to gate‘ Ansatz gewählt. Die Szenarien Zellkultur und Feldanbau werden in Umberto® (ifu Hamburg GmbH) modelliert. Daten hierzu werden von den Projektpartnern zur Verfügung gestellt. Die Vorketten, also die Stoff- und Energieströme, die durch alle Prozesse zur Herstellung der eingesetzten Substanzen und Stoffe in der Produktion verursacht werden,

stammen soweit verfügbar aus der Datenbank Ecoinvent (ecoinvent 2007). Zur Auswertung der ökologischen Belastungen wird die Methode Eco-indicator 99 (EI99) genutzt. Dies wird kombiniert mit der BASF-Methode zur Darstellung der Ökoeffizienz in einem so genannten Ökoeffizienzportfolio, wie es in Abbildung 1 gezeigt wird. Die hierzu nötige Kostenanalyse beschränkt sich auf die Preisangabe, bzw. -abschätzung des Endproduktes da diese Ökoeffizienzanalyse aus Sicht des Verbrauchers/Kunden durchgeführt wird.

## Ergebnisse

### 1. Entwicklung einer effizienten Latex-/Kautschuk-produzierenden Laticiferenkultur von *T. koksaghyz* (P1; AG Prüfer)

#### *P1.1: Etablierung einer pflanzlichen Sterilkultur*

An der WWU Münster (P1) können die *T. koksaghyz* Pflanzen neben der Anzucht im

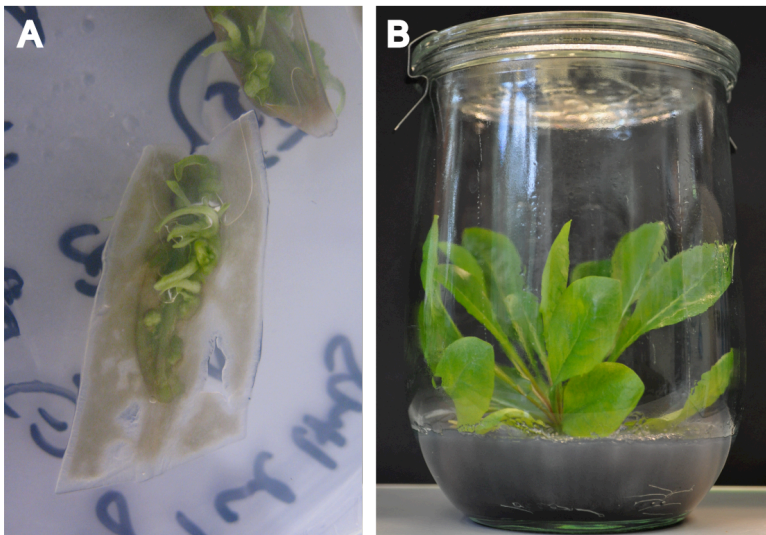


Abbildung 3. Anzucht von *T. koksaghyz* in Sterilkultur. A: Bildung von *shoots* auf einem Blatt von *T. koksaghyz*. B: Sechs Wochen alte *T. koksaghyz* Pflanze in Sterilkultur.

Gewächshaus auch unter kontrollierten Sterilkulturbedingungen angezogen werden, wobei jederzeit mindestens 17 verschiedene Linien zur Verfügung stehen (Abb. 3). Die Pflanzen können dabei sowohl aus Samen, als auch aus oberflächensterilisierten Blättern regeneriert werden.

#### *P1.2: Aufreinigung von Naturkautschuk aus den verschiedenen Linien zur Bestimmung der Quantität (AG Prüfer) und Qualität (AG Eisenreich)*

Eine quantitative Analyse des Kautschukgehalts verschiedener *Taraxacum koksaghyz* Akzessionen durch die „Dry Rubber Content“-Methode ergab, dass der Anteil an Polyisopren bei den *T. koksaghyz* Akzessionen bei ca. 32% (w/v) liegt (M1).

### P1.3: Überprüfung der Produkteigenschaften

Für eine weiterführende Analyse der Eigenschaften des Latex aus *T. koksaghyz* wurden etwa 1000 mL Latexsuspension aus Pflanzen aufbereitet und für die Eignungsprüfung zur Herstellung von Latexfilmen dem Kooperationspartner Synthomer Deutschland GmbH (Marl, Deutschland) anstelle der DEWECO GmbH (wie im Antrag angegeben) übergeben.

Die Synthomer Deutschland GmbH ist der größte Latexverarbeiter weltweit und verfügt über ein weitaus größeres Analyseportfolio, weshalb eine breitere Charakterisierung des Latex aus *T.*

*koksaghyz* möglich wurde. Aus dem zur Verfügung gestelltem Latex wurden durch die Synthomer Deutschland GmbH Latexfilme erstellt und diese für Testungen eingesetzt (MA3, Abb. 4).

Der Latex aus *T. koksaghyz* wurde zudem mittels Antikörper basiertem Testverfahren auf seine Allergenität hin getestet. Als

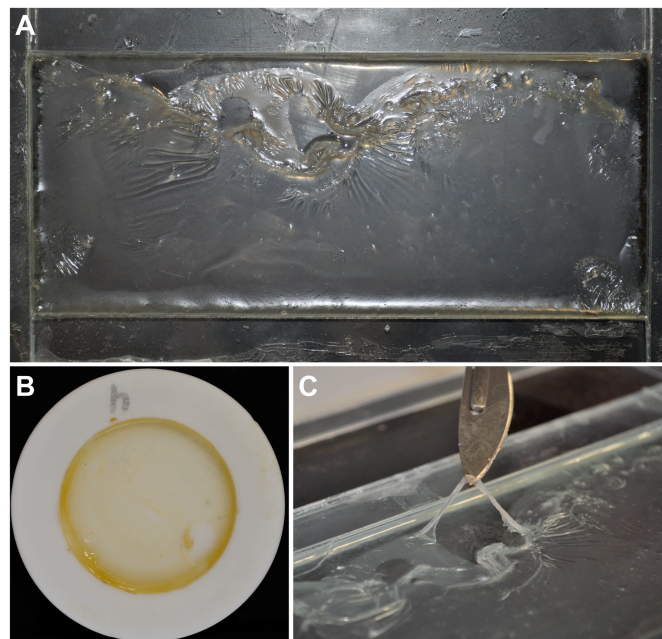


Abbildung 4. Latexfilme aus *T. koksaghyz*. A: Von der Synthomer Deutschland GmbH hergestellter Latexfilm (geschobene Flächen zur Demonstration der Verformung). B: Latexfilm mit Koagulationsagenzien. C: Zur Verdeutlichung der Verformung wurde ein Teil des Latexfilms mit einem Skalpell angehoben.

| CERTIFICATE OF ANALYSIS  |   | No QA11-0056 |              |              |                 |            |
|--|---|--------------|--------------|--------------|-----------------|------------|
| FITkit® TESTING SERVICES   |   |              |              |              |                 |            |
| Customer:  | <b>Department of Plant Biology and Biotechnology, University of Muenster</b><br>Hindenburgplatz 55, 48143 Muenster, Germany |              |              |              |                 |            |
| Description of samples:  | freeze dried samples  |              |              |              |                 |            |
| Arrival date:  | 15 April 2011   |              |              |              |                 |            |
| Testing method:  | Capture enzyme immunoassay method (EIA; IEMA)   |              |              |              |                 |            |
| Compliant with:  | EN 455-3:2006; ASTM D7427 - 08  |              |              |              |                 |            |
| Test Results   |   |              |              |              |                 |            |
| Icosagen code  | Sample code   | Hev b 1 µg/L | Hev b 3 µg/L | Hev b 5 µg/L | Hev b 6.02 µg/L | Total µg/L |
| LAT11086   | Sample 1  | UQ           | UQ           | UQ           | UQ              | UQ         |
| LAT11087   | Sample 2  | UQ           | UQ           | 367.68       | 54900.00        | 55287.68   |
| LAT11088   | Sample 3  | UQ           | UQ           | UQ           | UQ              | UQ         |
| UQ – Unquantifiable  |   |              |              |              |                 |            |
| Limits of quantitation:<br>Hev b 1 < 10 µg/L; Hev b 3 < 10 µg/L; Hev b 5 < 5 µg/L; Hev b 6.02 < 5 µg/L |   |              |              |              |                 |            |
| Note: Samples were incubated in 3 mL of water for 6 hours as requested by customer                     |   |              |              |              |                 |            |

Abbildung 5. Ergebnis der Allergentestung für fünf Hauptlatexallergene aus *Hevea brasiliensis*. Sample 1: *T. koksaghyz* Linie MS03, Sample 2: *Hevea brasiliensis* (Kontrolle), Sample 3: *T. koksaghyz* Linie MS14. UQ = nicht quantifizierbar. Hev b1, Hev b 3, Hev b 5, Hev b 6.02 = Hauptlatexallergene aus *Hevea brasiliensis*.

Kontrolle diente Latex aus dem Gummibaum *H. brasiliensis*. Dabei wurde bei den verschiedenen getesteten *T. koksaghyz* Linien keine quantifizierbare Reaktion und damit keine Kreuzreaktion mit Antikörpern gegen die Hauptallergene aus *H. brasiliensis* nachgewiesen (Abb. 5 für die Linien MS03 und Linie MS14). Der Latex aus *T. koksaghyz* kann somit für die Produktion von latexbasierten Produkten verwendet werden, die die allergenen Produkte von *H. brasiliensis* substituieren können.

#### P1.4: Etablierung von Laticiferen-Zellkulturen im Labormaßstab

Wie im Antrag vorgesehen, wurde ausgehend von transgenen Pflanzen eine Laticiferenzellkultur zunächst im Labormaßstab etabliert. Für die Etablierung der Laticiferenzellkultur wurden junge Blätter der transgenen Pflanzen nach Oberflächensterilisation auf antibiotika- und phytohormonhaltigen Festmedien in Sterilkultur angezogen, bis sich undifferenziertes Gewebe (Kalli) an den die Laticiferen enthaltenden Mittelrippen bildete (ähnlich Abb.3A). Diese Kalli wurden in Flüssigmedium überführt, welches durch Zugabe von Hygromycin die selektive Anreicherung von Laticiferen vermittelte. Von fünf unabhängigen Pflanzen-Linien konnte dadurch bisher eine Zellkultur etabliert werden, bei der es zu einer Anreicherung von pflanzlichen Zellen gekommen ist, die stabil in Kultur gehalten werden können (MA4).

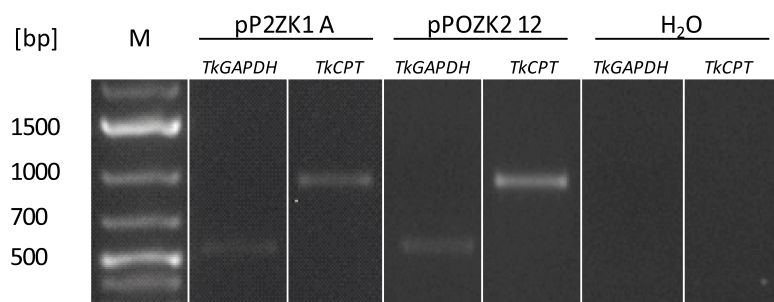


Abbildung 6. Expression der *cis*-Prenyltransferase (CPT) in zwei unabhängigen Zellkulturlinien (pP2ZK1A; pPOZK2 12) von *T. koksaghyz*. *TkGAPDH* = Glycerinaldehyddiphosphat-Dehydrogenase aus *T. koksaghyz* (konstitutiv exprimiertes Referenzgen), *TkCPT* = *cis*-Prenyltransferase aus *T. koksaghyz*, H<sub>2</sub>O = Kontrolle von Kontaminationen in den PCR Reaktionen.

Es handelt sich um jeweils eine Linie der Konstrukte pP2ZK2 und pP2ZK1, sowie um drei Linien des Konstrukts pPOZK2. Durch eine RT-PCR konnte nachgewiesen werden, dass die Zellen das Enzym zur Kettenverlängerung des *cis*-1,4-Polyisoprens, die

*cis*-Prenyltransferase, exprimieren (Abb. 6). Da dieses Enzym in *T. koksaghyz* ausschließlich im Latex exprimiert wird, können wir davon ausgehen, dass es sich bei den angereicherten Zellen um Laticiferen handelt. Die Expression dieser Enzyme bildet die Grundlage und Hauptvoraussetzung für die Produktion von Kautschuk. Des Weiteren zeigen bildgebende Analysen mittels konfokaler *Laser Scanning*

Mikroskopie (CLSM), dass es innerhalb der Zellen zu einer Anreicherung von lipophilen Substanzen kommt (Abb. 7).

Dabei wurden Zellen mit dem Farbstoff Nilrot inkubiert, der lipophile Substanzen, wie z.B. Kautschuk, anfärbt.

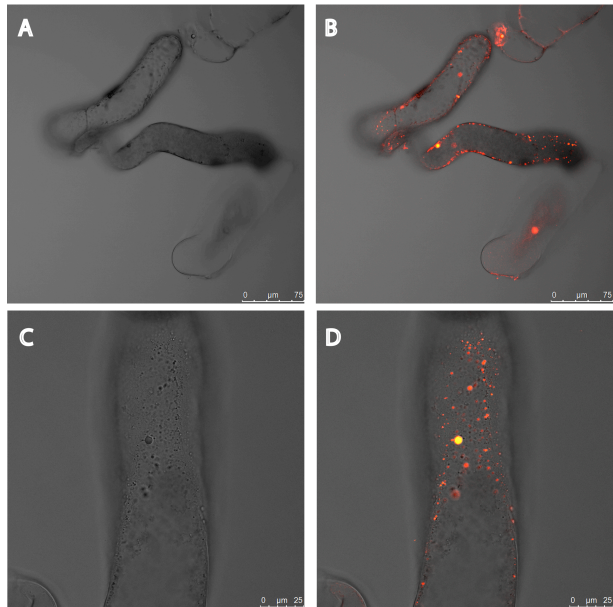


Abbildung 7. Konfokalmikroskopische Aufnahmen einer mit Nilrot gefärbten Laticiferenzellkultur der Linie pPOZK2 12. A, C: Hellfeld, B, D: overlay.

Durch Optimierung der Wachstumsbedingungen (u.a. Medienzusammensetzung, Hormonzugabe) konnte dem Projektpartner 3 (P3, TUM) ausreichend Zellmaterial für eine Inhaltsstoffanalytik zur Verfügung gestellt werden. Durch  $^{13}\text{C}$ - und  $^1\text{H}$ -NMR konnte nachgewiesen werden, dass die Zellkultur *cis*-1,4-isopren, die Grundeinheit des Naturkautschuks, anreichert (Abb 11).

Weitere Analysen mittels DOSY (*diffusion-ordered-spectroscopy*) zeigten, dass das *cis*-Isopren in Form

von Polyisoprenen mit mittlerer Kettenlänge angereichert wird (Abb.12). Diese entsprechen nicht dem hohen Molekulargewicht von dem im Latex enthaltenen Naturkautschuk. Für die Zukunft stehen jedoch noch weitere, bisher ungenutzte, Optimierungsmöglichkeiten offen, die zu einer Synthese und Anreicherung der entsprechenden Polyisoprene mit hoher Kettenlänge führen könnten. Polyisoprene mittlerer Kettenlänge, wie sie in der Zellkultur angereichert werden, haben jedoch selbst ein hohes Wertschöpfungspotential, so werden sie industriell z.B. in Klebstoffen oder Lacken verwendet.

#### *P1.5: Etablierung einer Laticiferenkultur im Großmaßstab*

Die Etablierte Zellkultur wurde für analytische Zwecke mit einem Kulturvolumen von 100 mL angezogen. Das *scale-up* auf ein 10-fach höheres Kulturvolumen von bis zu 1 L war problemlos möglich. Die im Antrag vorgesehene Anzucht im Großmaßstab (100-300 L) wurde im Hinblick auf die Schonung von Ressourcen auf einen späteren Zeitpunkt verschoben, da dieser Schritt erst mit einer optimierten, Kautschuk-

produzierenden, Zellkultur erfolgen sollte. Daher wurde stattdessen vermehrt an der Optimierung von Produktsynthese und -anreicherung gearbeitet (P1.7).

#### *P1.6: Latexgewinnung aus Zellkultur*

Die Gewinnung des Polyisoprens aus der Zellkultur wurde im Projekt zu analytischen Zwecken durchgeführt. Dabei wurde eine mechanische Zerkleinerung in einer Kugelmühle durchgeführt. Durch den Einsatz eines geeigneten Puffers konnte das Polyisopren von Zellbestandteilen mittels Zentrifugation getrennt werden. Eine Gewinnung von Latex aus Kulturen, die hochmolekulares Polyisopren synthetisieren sollte somit möglich sein.

#### *P1.7: Optimierung der Kautschukbiosynthese durch „Metabolic Engineering“*

Die ersten Transformationen zur Erzeugung von Laticiferenkulturen mit verstärkter HMGR Expression wurden in der Phase der Status-Berichterstellung durchgeführt. Transgene *T. koksaghyz* Pflanzen mit den Konstrukten zur Überexpression der HMGR1 aus *Arabidopsis thaliana* wurden erzeugt und in Sterilkultur angezogen. Es zeigte sich jedoch, dass es bei der HMGR zur Abnahme der Aktivität kam, was auf eine feed-back Inhibierung schließen ließ. Durch gezielte Mutagenese der AtHMGR1 konnte eine neue Genvariante erzeugt werden, die diesen regulatorischen Mechanismen nicht mehr zu unterliegen scheint. Mit dieser Genvariante transformierte Taraxacum-Pflanzen stehen in Sterilkultur zur Verfügung. Die veränderte Metaboliten-Zusammensetzung der aus diesen Pflanzen erzeugten Zellkultur, konnte im Projektrahmen nicht abschließend ausgewertet werden. Es konnte jedoch durch NMR- und GC/MS-Metabolitanalysen gezeigt werden, dass die externe Zugabe von Mevalonat (in Form von Mevalonolacton), dem Produkt der HMGR, zu einer 17-fachen Erhöhung des Polyisoprengehalts in der Zellkultur führte. Dabei wurden Polyisoprenmengen von bis zu 2,7 mg/g Zellkulturmaterial erzielt. Für die Zellkulturen mit Überexpression der HMGR1 ist daher ebenfalls eine starke Anreicherung von Polyisopren zu erwarten. Neben der HMGR wurden weitere *targets* zur Steigerung der Polyisoprensynthese identifiziert. So konnte für transgene Löwenzahn Pflanzen mit Überexpression der ATP-Citrat Lyase (ACL) ein bis zu 5-fach höherer Polyisoprengehalt im Vergleich zum Willdtyp nachgewiesen werden. Eine erhöhte Aktivität der ACL in den Zellkulturen stellt daher eine weitere zukünftige Optimierungsmöglichkeit dar.

## **2. Identifizierung und Analyse neuer Wertstoffe und Enzyme in Latex-/Kautschuk-produzierender Laticiferenkultur von *T. koksaghyz* durch „phytomining“ (P2; Phytowelt)**

### *P2.1: Material und Knowledge-Transfer*

Von Partner 1 erzeugtes und bereitgestelltes Saatgut und Pflanzenmaterial (*Taraxacum koksaghyz*) wurde in die Labore und Gewächshäuser der Phytowelt transferiert und wird dort weiter kultiviert. Neben den Pflanzen wurden auch die *Taraxacum*-Gene für die *cis*-Prenyltransferasen 1 bis 3 (TkCPT1-3) in Form von gereinigter Plasmid-DNA und ein Plasmid für die Expression des MVA-Stoffwechsels zur Evaluierung der Wertstoffe einschließlich den zugehörigen Dokumenten zur Verfügung gestellt.

Das know-how zur Latex-Extraktion und zur Präparation von RNA aus Latexproben wurde durch Übermittlung der entsprechenden Arbeitsvorschriften, sowie durch praktische Anleitungen in den Laboren der WWU Münster an die Mitarbeiter der Phytowelt weitergegeben.

### *P2.2: phytomining*

Wie in P3.4 erarbeitet erfolgt in Laticiferen die Synthese und Bereitstellung der für die Kautschuksynthese benötigten Grundbausteine IPP und DMAPP hauptsächlich über den MVA-Biosyntheseweg. Das Enzym HMG-CoA-Reduktase (HMGR) ist als geschwindigkeitsbestimmender Schritt dieses Weges beschrieben worden. Da HMGR in *Taraxacum*-Laticiferen nur schwach exprimiert wird, liegt hier ein idealer Ansatzpunkt zur Ausbeuteoptimierung der Kautschukbiosynthese vor. Die vorgelagerte HMG-CoA-Synthase (HMGS) koppelt diesen Syntheseweg an den zellulären Grundstoffwechsel an und übernimmt somit eine wichtige Rolle bei der Versorgung des Synthesewegs mit den benötigten Intermediaten. Diese beiden Schritte werden in der Literatur üblicherweise als *upper portion* des MVA-Stoffwechsels bezeichnet. Die weiteren Schritte zur Synthese von IPP und DMAPP – die sog. *lower portion* – werden von den Enzymen Mevalonat-Kinase (MVK), Phosphomevalonatkinase (PMK) und Diphosphomevalonatkinase (MVD) katalysiert. Mit Hilfe dieser Enzyme kann erstmals ein nur aus pflanzlichen Enzymen aufgebauter, synthetischer MVA-Weg für bakterieller Expressionssysteme erstellt werden, was wirtschaftliche Verwertungsmöglichkeiten eröffnet und aus



wissenschaftlicher Sicht prinzipiell aufgrund höherer spezifischer Enzymaktivitäten und/oder unterschiedlicher biochemischer Regulation Potential zur Herstellung eines optimierten Stoffwechsels bietet. Ein zuvor etabliertes System zur  $\beta$ -Carotin-Synthese diente als Basis zur Bestimmung der Enzymaktivitäten und ihren Einfluss auf die Produktausbeute. In ersten Versuchen konnte gezeigt werden, dass die zusätzliche Expression des MVA-Weges die erzielbaren  $\beta$ -Carotinausbeuten erhöht. Aufgrund dieser Tatsachen wurden HMGR, HMGS, MVL, PMK und MVD als Zielenzymklassen für phytomining-Ansätze zur Identifizierung von Enzymvarianten mit Nutzungspotential bei der Optimierung der Kautschuk/Latexproduktion ausgewählt.

Für diese Enzymklassen wurden mehrere Kandidatengene identifiziert, erfolgreich kloniert und mittels DNA-Sequenzierung verifiziert. Vier HMGR-Proteine (2 aus *S. cerevisiae* (Hefe) und je eine aus *S. lycopersicum* (Tomate) und *P. trichocarpa* (Pappel), sowie zwei HMGS-Proteine (Tomate und Pappel) wurden zur vergleichenden Untersuchung der Aktivitäten und des Einfluss auf die Produktausbeute.

Die Enzym-Analyse erfolgte in einem zuvor etablierten bakteriellen System, in dem ein zur  $\beta$ -Carotin-Synthese eingesetzt. Die Coexpression den MVA-Stoffwechsels führte zu einer Steigerung der  $\beta$ -Carotinsynthese um etwa 75%.

Um die Enzymaktivitäten der Kandidaten-HMGS zu bestimmen, wurden die HMGS aus *Staphylococcus aureus* im vom Projektpartner erhaltenen MVA-Plasmid gegen die entsprechenden Homologen ausgetauscht. Pappel- und Tomate-HMGS führen zwar zu weniger  $\beta$ -Carotin-Synthese als SaHMGS, können jedoch mit 30-40 % mehr  $\beta$ -Carotin gegenüber der Kontrolle als funktionelle Enzyme betrachtet werden (Abb. 8).

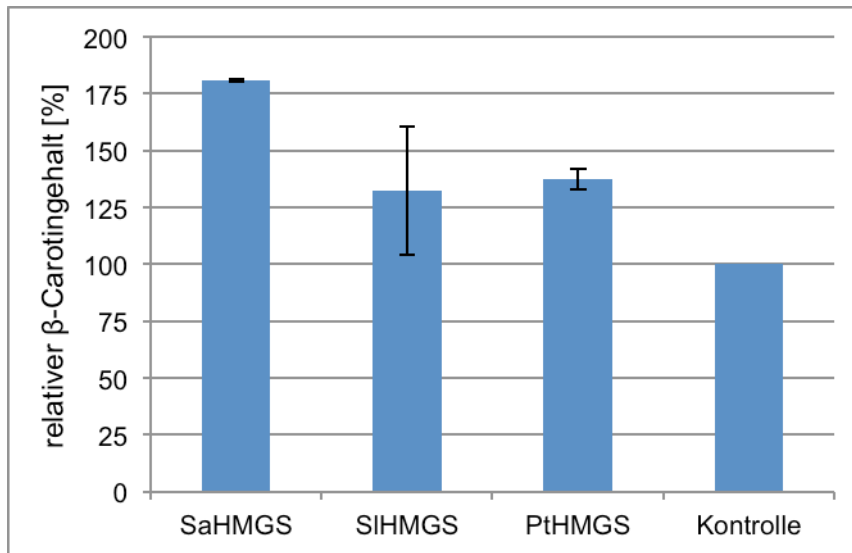


Abbildung 8: relativer  $\beta$ -Carotingehalt aus Co-Expressionskulturen von Reporterplasmid zur  $\beta$ -Carotin-Synthese und MVA-Plasmidvarianten bzw. Kontrolle ohne MVA-Plasmid. SaHmgS: MVA-Plasmid mit Hmg-CoA-Synthase (HmgS) aus *Staphylococcus aureus* (Original-Plasmid), PtHmgS: MVA-Plasmid mit HmgS aus *Populus trichocarpa*, Pappel, SIHmgS: MVA-Plasmid mit HmgS aus *Solanum lycopersicum*. Tomate.

Die Syntheseleistung der verschiedenen HMGR wurde analog zu den HMGS-Analysen durchgeführt. In Koexpression mit dem Reporterplasmid führen die HMGR-Varianten gegenüber der Kontrolle zu einer etwa 1,7 bis 2-fachen  $\beta$ -Carotin-Synthese, daher kann davon ausgegangen werden, dass alle HMGR-Enzyme funktional sind.

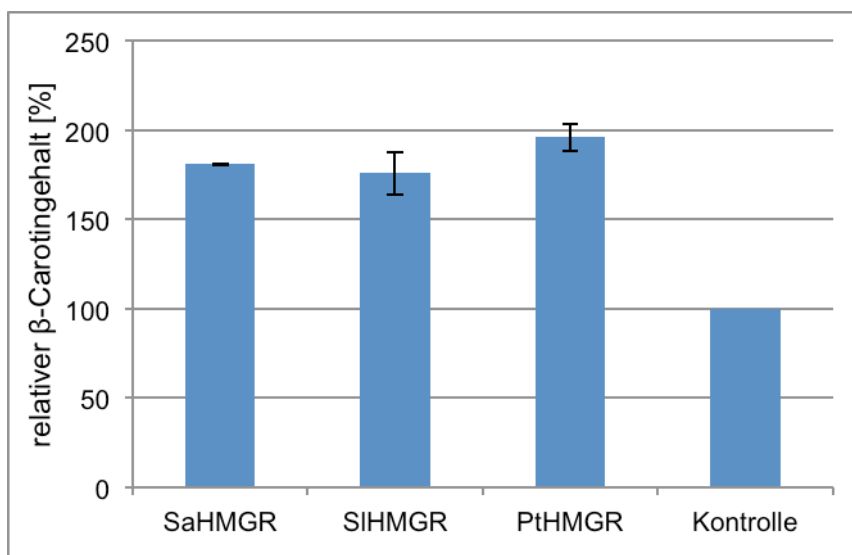


Abbildung 9: relativer  $\beta$ -Carotingehalt aus Co-Expressionskulturen von Reporterplasmid zur  $\beta$ -Carotin-Synthese und MVA-Plasmidvarianten bzw. Kontrolle ohne MVA-Plasmid. SaHmgR: MVA-Plasmid mit Hmg-CoA-Reduktase (HmgR) aus *Staphylococcus aureus* (Original-Plasmid), PtHmgR: MVA-Plasmid mit HmgR aus *Populus trichocarpa*, Pappel, SIHmgR: MVA-Plasmid mit HmgR aus *Solanum lycopersicum*. Tomate.

Für HMGR aus Tomate (SIHmgR) konnte kein signifikanter Unterschied gegenüber dem Referenzprotein aus *Staphylococcus aureus* festgestellt werden. HmgR aus Pappel führt zu einer signifikant höheren Aktivität und scheint damit für den Aufbau eines optimierten MVA-Plasmids am besten geeignet zu sein (Abbildung ).

Kandidaten für *lower portion* des MVA-Wegs wurden aus Tomate und Pappel ausgewählt, für PMK auch aus *A. thaliana* und *T. brevicorniculatum*. Die Enzyme konnten heterolog exprimiert werden und lagen nach aufwändiger Optimierung als lösliche Proteine vor. Nach Aufgereinigung über Affinitätschromatographie wurden ihre Aktivitäten photometrisch bestimmt. Diese sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht der Enzymaktivitäten von MVK, PMK und MVD. Das aktivste Enzym der jeweiligen Enzymklasse ist fett hervorgehoben.

| Enzym | Aktivität                             |
|-------|---------------------------------------|
| SaMVK | 8,7 U*mg <sup>-1</sup> Protein        |
| SIMVK | <b>10,3 U*mg<sup>-1</sup> Protein</b> |
| PtMVK | nicht aktiv                           |
| SaPMK | 0,065 U*mg <sup>-1</sup> Protein      |
| SIPMK | nicht aktiv                           |
| PtPMK | nicht aktiv                           |
| AtPMK | <b>5,5 U*mg<sup>-1</sup> Protein</b>  |
| TbPMK | 3,9 U*mg <sup>-1</sup> Protein        |
| SaMVD | <b>6,4 U*mg<sup>-1</sup> Protein</b>  |
| SIMVD | 1,8 U*mg <sup>-1</sup> Protein        |
| PtMVD | 1,3 U*mg <sup>-1</sup> Protein        |

Für jede Enzymklasse des MVA-Stoffwechsels sind nun aktive Enzyme aus Pflanzen vorhanden, die in den meisten Fällen höhere Aktivitäten zeigen, als ihre Homologen aus *Staphylococcus*. Von den Enzymen der *lower portion* wurden jeweils die besten pflanzlichen Kandidaten ausgewählt. Für die Enzyme des *upper portion* wurden alle pflanzlichen HMGS und HMGR kombiniert. Somit liegen 4 funktionelle, neuartige Plasmidvarianten vor, deren Syntheseleistung im Rahmen der Projektlaufzeit jedoch nicht mehr quantifiziert werden konnte.

Entsprechend der Vorhabensbeschreibung wurden in weiteren Arbeiten zudem weitere *cis*-Prenyltransferasen ermittelt. Kandidatengene aus Reis (*Oryza sativa*,

OsUPP) und Tomate (*Solanum lycopersicum*, SlUPP) wurden erfolgreich kloniert und die Sequenzen verifiziert.

Zur Etablierung der rekombinanten Expression der Prenyltransferasen TkCPT1-3 im bakteriellen Wirt *E. coli* wurden die von Partner 1 zur Verfügung gestellten Gene zunächst in PHY-Expressionsvektoren umklontiert und die erhaltenen genetischen Konstrukte für erste Expressionsstudien eingesetzt. Unter den Standardkulturbedingungen (Lac-Promotor, Expression bei 37°C) erfolgte in *E. coli* keine signifikante Expression von löslichen CPT-Proteinen. In der Folge wurde der Einfluss verschiedener Proteinliganden, sowie verschiedener Bakterienstämme und Kulturbedingungen untersucht (Abbildung ).

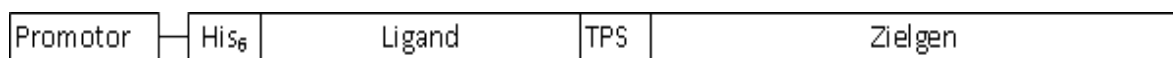


Abbildung 10: Aufbau der zur Proteinexpression eingesetzten Konstrukte. (HIS6 = HIS-Tag, TPS = Protease-Schnittstelle)

Für 47 Konstrukte wurde die Expression in verschiedenen *E. coli*-Stämmen unter unterschiedlichen Bedingungen getestet. Durch Variation der genannten Parameter konnte erfolgreich lösliches Protein exprimiert werden. Entscheidend dafür ist zum einen die Fusion an verschiedene Proteine als Löslichkeitsverbessernde

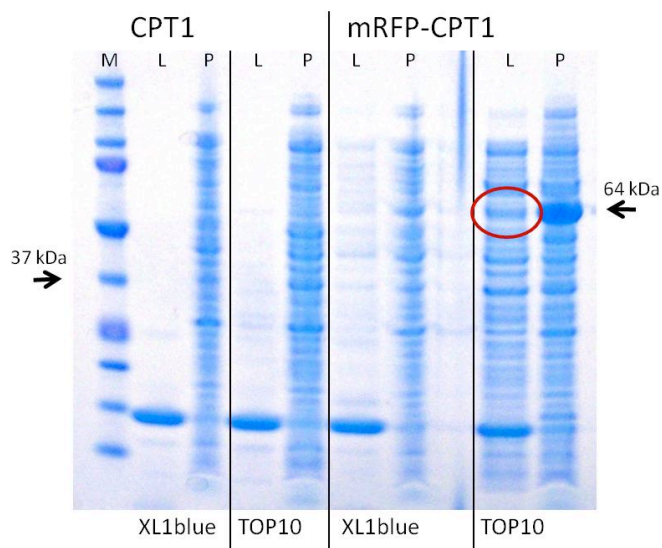


Abbildung 11: SDS-PAGE, beispielhafter Vergleich der CPT1-Expression in *E. coli*-Stämmen XL1blue und TOP10 mit und ohne Fusionsprotein mRFP.

M: Protein-Standard, L: Lösliche Proteinfraction des Zelllysates, P: unlösliche Proteinfraction des Zelllysates.

Komponenten, getestet wurden dabei mRFP, GFP, NusA und MalE. Zum anderen spielen auch die Anzuchtbedingungen und die verwendeten Expressionsstämme eine wichtige Rolle. Abbildung zeigt deutlich den Einfluss der verschiedenen Parameter auf den Expressionserfolg. Der Nachweis von löslichem mRFP-CPT1 erfolgte mittels Western-Blot (ohne Abbildung).

Zusätzlich zu Fusionsproteinen wurden verschiedene Mutationen durchgeführt. Zunächst erfolgte

durch *error prone*-PCR eine zufällige Mutation der codierenden Sequenz, so konnten

jedoch eine sehr geringe Anzahl an Klonen generiert werden, von denen keine zu einer besseren Löslichkeit des Proteins führte.

Weiterhin wurden verschiedene zielgerichtete Mutationen durchgeführt. Eine Austausch der aminoterminalen Aminosäure Glutamin an Position 2 gegen Glutamat führte zu keiner verbesserten Löslichkeit, ebenso die Verwendung alternativer TPS-Erkennungssequenzen und verschiedener Linker-Peptide zwischen Fusionsprotein und *cis*-Prenyltransferase.

Die zellfreie Proteinsynthese stellt ein weiteres, alternatives Expressionssystem für die Zielenzyme dar. Da die zellfreie Proteinsynthese zudem eine enorme Zeitersparnis gegenüber der bakteriellen Expression bietet, wurden hierzu erste Versuche durchgeführt. Die Synthese von TkCPT1 im wheat germ CECF System (5Prime) brachte geringe Mengen an exprimiertem Protein, das im Gegensatz zum heterolog in *E. coli* exprimierten Protein nahezu vollständig (ca. 90%) löslich war. Die prinzipielle Eignung dieses Systems ist damit gezeigt, allerdings konnten die Ausbeuten nicht soweit gesteigert werden, um aussagekräftige Enzymassays durchzuführen.

Zur Funktionsprüfung der Prenyltransferasen wurden, entsprechend der von Partner 1 erhaltenen Protokolle, *in vitro* Assays mit den heterolog exprimierten Proteinproben und aus Latex präparierten Kautschukpartikeln, sowie zugesetztem IPP und FPP durchgeführt. Als negative Kontrollen wurden Hitze-inaktivierte Proteinproben, ProteinaseK-verdautes Protein, nicht aktives Reporterprotein, Proben ohne IPP bzw. FPP-Zugabe, sowie Kombinationen dieser Ansätze verwendet. Die erhaltenen Reaktionsprodukte wurden zur weiteren Analyse und Charakterisierung an Partner 3 übermittelt. Der Nachweis von *cis*-Polyisopren erfolgte durch <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopie (Details siehe unter 3.). Zusätzlich wurden entsprechende aufgereinigte Proteinproben an den Projektpartner 1 übergeben, um Enzymassays mit <sup>13</sup>C-IPP durchzuführen.

Als wichtigste Ergebnisse können festgehalten werden:

(a) Die Empfindlichkeit und Messzeit des NMR-Assays ist geeignet zur Durchführung von großen Probenserien. (b) Der Abstand von Hintergrundsignalen zu Produktsignalen beträgt mindestens 100 %. (c) Negativkontrollen (Konstrukte mit Leervektoren oder Reaktionen mit abgekochten Enzympräparationen) belegen die Validität des Assays. (d) Die Aktivität des Enzyms TkCPT1 kann eindeutig und

reproduzierbar nachgewiesen werden. (e) Im Assay ist die Anwesenheit von Latexpartikeln essentiell. (f) Für die volle Aktivität wird IPP als Substrat im Assay benötigt. (g) TkCPT-Proteine mit geänderten Aminosäureresten im aktiven Zentrum zeigen verminderte Aktivitäten. Die Analyse der mit TkCPT2, TkCPT3, OsUPP und SIUPP erhaltenen Reaktionsprodukte ist derzeit in Arbeit und wird in Kürze abgeschlossen sein. Damit ist die wissenschaftliche Grundlage zur weiteren Bearbeitung dieser Enzymklasse etabliert und verfügbar.

### *P2.3: Enzymatische Kautschuk-Optimierung*

Entsprechend der mit den Partnern im *kick-off-meeting* vereinbarten Arbeitsziele wurde der Fokus bei den Arbeiten zu diesem Paket zunächst auf die enzymatische Steuerung der Kettenlänge gelegt. Für eine *cis*-Prenyltransferase aus *E. coli* konnte von Ko und Kollegen (2001) gezeigt werden, dass die Länge der Polyisoprenketten durch die Seitenkette der Aminosäure auf Position 137 beeinflusst wird. Wie im dreidimensionalen Modell des Proteins ersichtlich befindet sich diese Aminosäure auf dem Boden des aktiven Zentrums dieses Proteins.

Im Rahmen des Projekts durchgeführte *homology modelings* zeigten, dass das pflanzliche CPT1-Protein aus *T. koksaghyz* und die UPP aus *E. coli* eine sehr hohe Ähnlichkeit in ihrer 3D-Struktur aufweisen (Abbildung ) und dass die Aminosäure 172 des pflanzlichen Enzyms die analoge Position einnimmt. Mittels gerichteter Mutagenese wurden verschiedene Mutanten für die CPT1-Proteine erzeugt, bei denen das mutmaßlich an der Steuerung der Polyisopren-Kettenlänge beteiligte Threonin172 zunächst durch die alternativen Aminosäuren Alanin (Ala), Tyrosin (Tyr) oder Leucin (Leu) ersetzt worden ist. Diese CPT-Proteine wurden unter den definierten optimalen Bedingungen (s.o.) in entsprechenden transgenen Bakterienstämmen rekombinant exprimiert und hieraus erzeugte Proteinproben, in Zusammenarbeit mit Partner 3, auf ihre Funktion überprüft. Wie die Ergebnisse zeigen ist CPT1-Ala nicht mehr aktiv. Für die Varianten CPT1-Tyr und CPT1-Leu konnten nur noch deutlich verminderte Aktivitäten nachgewiesen werden. In weiteren



Abbildung 12: Alignment / homology modeling von *E. coli* UPP (hellgrün, Leu137 rot) und *T. koksaghyz* CPT1 (dunkelgrün, Tyr 172 blau) zeigt eine hohe strukturelle Ähnlichkeit der Enzyme auf. Die Position 172 wurde als Ziel für gerichtete Mutagenese des Proteins ausgewählt.

Klonierungen wurde an der entsprechenden Position alle weiteren Aminosäuren eingefügt.

#### *P2.4: Die Optimierung des Latex*

Dieses Arbeitspaket zielte auf die Reduktion kontaminierender Komponenten im Latex, insbesondere des Enzyms Polyphenoloxidase (PPO), die die Hauptproteinkomponente darstellt und durch seine Aktivität im extrahierten Latex zur dessen raschen Verbräunung und Verklumpung führt und ihn so unbrauchbar macht. Diese Arbeiten wurde allerdings im Projektverlauf zugunsten der anderen Ansätze zurückgestellt, da zum einen bei Partner WWU PPO-freie bereits transgene Pflanzenlinien erzeugt wurden, die diese Problematik lösen und zum anderen bei den erzeugten Laticiferen-Kulturen die Verbesserung der Latex-Ausbeute vorrangig war/ist. Darüber hinaus stand für Partner PHY die Nutzung der Wertstoffenzyme zur Entwicklung mikrobieller Terpen-Produktionssysteme im Vordergrund, da diese als enabling-Technologie eine breitere wirtschaftliche Verwertung ermöglichen.

#### *P2.5: Analyse des industriellen Wertschöpfungspotenzials der Enzyme und weiterer (Wert)Stoffproduktion*

Die beiden Verbindungen IPP und DMAPP sind Grundbausteine nicht nur der Polyisoprene des Kautschuk, sondern der Gesamtheit der terpenoiden Verbindungen. Dementsprechend sind Enzyme, wie die HMG-CoA-Synthase und – Reduktase, sowie Mevalonat-Kinase, Phosphomevalonatkinase und Diphosphomevalonatkinas, die einen Organismus in die Lage versetzen große Mengen dieser Verbindungen für die Terpensynthese bereitzustellen hoch interessante Wertstoffe (MA2). Tatsächlich stellt die Kombination von fermentierbaren Mikroorganismen mit geeigneten Enzymen des MVA-Stoffwechsels und weiteren Biosyntheseenzymen eine *enabling* Technologie für biotechnologische Terpen-Produktionssysteme dar. Da viele Terpenverbindungen interessante pharmakologische Eigenschaften (Entzündungshemmung, Krebshemmung etc.) aufweisen kommt einer solchen *enabling* Technologie hohe wirtschaftliche Bedeutung zu. Aber auch andere Bereiche sind interessant: Neben der in diesem Projekt adressierten Kautschukproduktion ist beispielsweise die Bereitstellung von Harzsäure (Diterpene) für die Klebstoffindustrie zur Verbesserung der Rohstoffversorgung und zur Qualitätssicherung von Interesse.

Des Weiteren ist aus wirtschaftlicher Sicht der Aufbau eines biotechnologischen Produktionssystems für die Herstellung des natürlichen Terpens Squalen sehr interessant. Squalen findet vielfältige Anwendungen als Schmierstoff in der Computerbranche und als Grundstoff für die kosmetische Industrie (Feuchtigkeitscremes, Haarfarben, Surfactants ('*surface-active agents*')). Traditionell wird das Öl der Haifisch-Leber als Squalenquelle genutzt (Squalenanteil 60%). Squalen gehört zu den unverseifbaren Komponenten in pflanzlichen Ölen, wie Olivenöl, Weizenkeimöl und Reiskleieöl. Derzeit werden auch diese Quellen intensiv genutzt. Squalen hat mit einem Jahresumsatz von ca. 150 Mio. USD eine hohe wirtschaftliche Bedeutung. Industriell werden jährlich ca. 2000 Tonnen industriell verwendet. Im Hinblick auf die Verfügbarkeit und Extraktion dieser Substanz, sowie die sich verschärfenden Tierschutzgesetze, ist die Suche nach alternativen Ressourcen notwendig. Aufgrund des hohen globalen Bedarfs an dieser multifunktionellen Substanz kam es in den letzten Jahren immer wieder zu einer Verknappung des Basismaterials aus Olivenöl und damit zu starken Preisschwankungen (derzeit zwischen 40 und 50 USD kg<sup>-1</sup>). Grundvoraussetzung für eine konkurrenzfähige biotechnologisch ökonomische Herstellung des Squalens ist neben der Ausbeute für medizinische Anwendungen vor allem der Reinheitsgrad. Neben der direkten Nutzung des Squalens ist seine Verwendung als Ausgangssubstanz zur Herstellung weiterer pharmakologisch interessanter Verbindungen, insbesondere Steroide, von hohem Wert. Das wichtigste Steroid bei Menschen und Tieren ist das Cholesterin, was in Pflanzen nicht vorhanden ist. Aus Cholesterin werden Lipoproteine und Steroidhormone aufgebaut, wie die Hormone der Nebennierenrinde (Corticosteroide). Die Synthese dieses schmerz- und entzündungslindernden Steroidhormons Cortison ist ein Beispiel für die erfolgreiche Kombination biotechnologischer und chemischer Syntheseschritte. Die Verwertungspläne zielten zunächst auf den Aufbau von Basis-Produktionsstämmen für die Synthese terpenoider Verbindungen ab. Im Vordergrund stand die Etablierung eines synthetischen MVA-Biosynthesewegs in Bakterien (i.a. *E. coli*) unter Verwendung pflanzlicher Enzyme und Selektion der Klone mit den höchsten Ausbeuten. Basierend auf den Daten aus P2.2 wurden 4 Expressionsplasmide aufgebaut, die alle Kombinationsmöglichkeiten der getesteten pflanzlichen HMGS und HMGR umfassen und für die *lower portion* des MVA-Stoffwechsels das jeweils bestgeeignete pflanzliche Enzym enthalten. Welches der Plasmide die beste



Syntheseleistung bietet, konnte im Rahmen der Projektlaufzeit jedoch nicht mehr analysiert werden.

### **3. Physikochemische Analytik von Naturkautschuk und dessen Bildungswege (P3; AG Eisenreich)**

#### *P3.1: Qualitätskontrolle und Gehaltsbestimmung von cis-Polyisopren in natürlichen Latexproben und in Rohextrakten von Produzenten*

Zum Zeitpunkt der Antragsstellung wurde u.a. die  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektroskopie zur Bestimmung der Qualität und des Gehalts an *cis*-Polyisopren in Latexproben oder Rohextrakten eingesetzt. Die  $^{13}\text{C}$ -NMR chemischen Verschiebungen von *cis*- bzw. *trans*-Polyisopren zeigen für die Positionen 4 und 5 Unterschiede von mehr als 5 ppm auf. Das  $^{13}\text{C}$ -Verfahren ist daher sehr eindeutig bezüglich der Unterscheidung von *cis*- bzw. *trans* konfigurierten Polyisopren. Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch die intrinsisch schlechte Empfindlichkeit der  $^{13}\text{C}$ -NMR Messung, was in der Regel zu langen Messzeiten (mehrere Stunden) für jede einzelne Messung führt. Um den im Rahmen des Projekts hohen und schnellen Durchsatz an Proben zur Bestimmung der Reinheit und der Gehalte an *cis*-Polyisopren zu gewährleisten, wurde eine alternative und empfindlichere Methode etabliert. Hierzu erwies sich die empfindliche Detektion von Polyisoprenen mittels  $^1\text{H}$ -NMR als richtungsweisend. Durch zweidimensionale NMR Verfahren wurden zunächst die Signale von *cis*- bzw. *trans*-Polyisopren eindeutig zugeteilt. Während die  $^1\text{H}$ -Signale von H-1 und H-4 eng zusammenfallen und auch keine spezifischen Unterschiede zwischen *cis*- und *trans*-Polyisopren zeigen, werden für die Signale H-2 und H-5 zwar kleine, aber signifikante und reproduzierbare Unterschiede in den chemischen Verschiebungen gemessen. Glücklicherweise sind die Signale von H-5 und H-2 auch in den typischen  $^1\text{H}$  NMR Spektren von pflanzlichen Rohextrakten (z.B. Wurzel- oder Zellextrakte mit Hexan, Toluol oder Dichlormethan) gemessen in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  kaum durch Signale von anderen apolaren Verbindungen überlagert, sodass die Bestimmung von *cis*-Polyisopren auch in Rohextrakten mittels  $^1\text{H}$  NMR das Verfahren der Wahl in der schnellen Qualitätskontrolle darstellte und die Prüfung einer großen Anzahl an Proben erlaubte. Im Laufe des Projektes wurden auf diese Weise ca. 1.000 Proben analysiert und quantifiziert.

Die Methode wurde intensiv zur Analyse von Wurzelextrakten und Latexisolaten genutzt. So konnten quantitative Aussagen zu Polyisopren-Gehalten in Wurzeln und Latexisolaten von verschiedenen *Taraxacum ssp.* und entsprechenden Zuchtlinien vorgenommen werden, um die geeignetsten Pflanzen für die Etablierung der

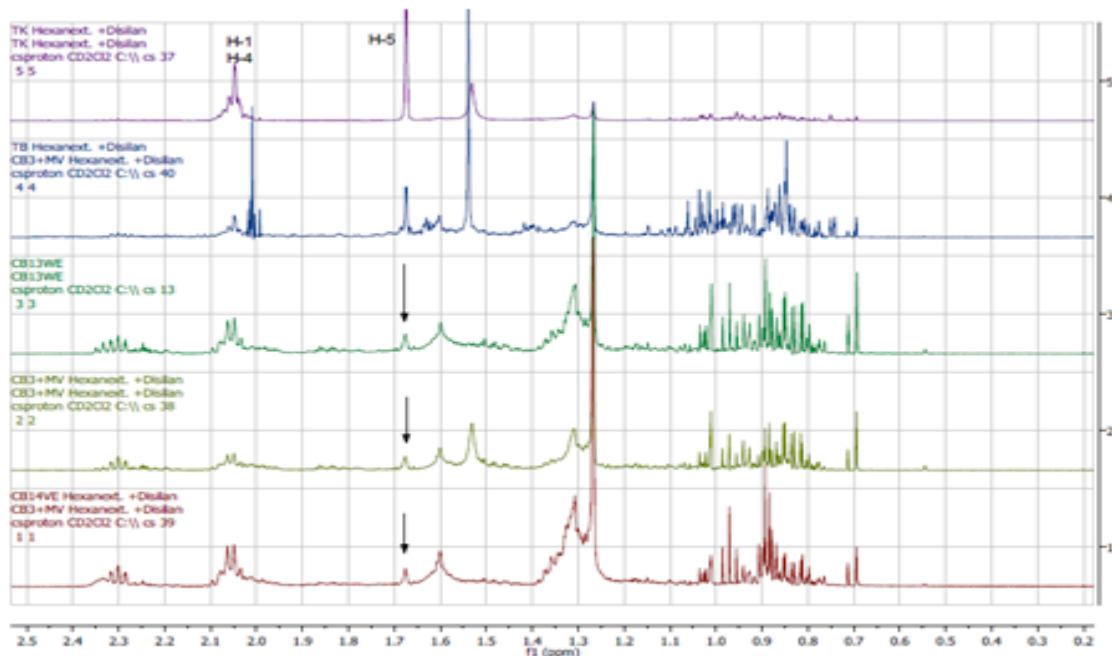


Abbildung 13. Ausschnitte aus <sup>1</sup>H NMR Spektren von Extrakten mittels Hexan von *T. koksaghyz* und *T. brevicorniculatum* Wurzel (oben) sowie von 3 Laticiferen-Zellkulturen. Die angezeigten Signale im oberen Spektrum zeigen die Resonanzen der H-Atome 1/4 und 5 von *cis*-Polyisopren. Die mit einem Pfeil markierten Signale in den unteren Spuren zeigen Signale für *cis*-Polyisopren.

Zellkulturen auszuwählen. Von besonderer Bedeutung war die Analyse der Extrakte der entwickelten Laticiferenkulturen, die eindeutige Signal-Signaturen für *cis*-Polyisopren aufwiesen (Abb. 13). Das Molekulargewicht der Isolate konnte durch DOSY Messungen abgeschätzt werden (Abb. 14)

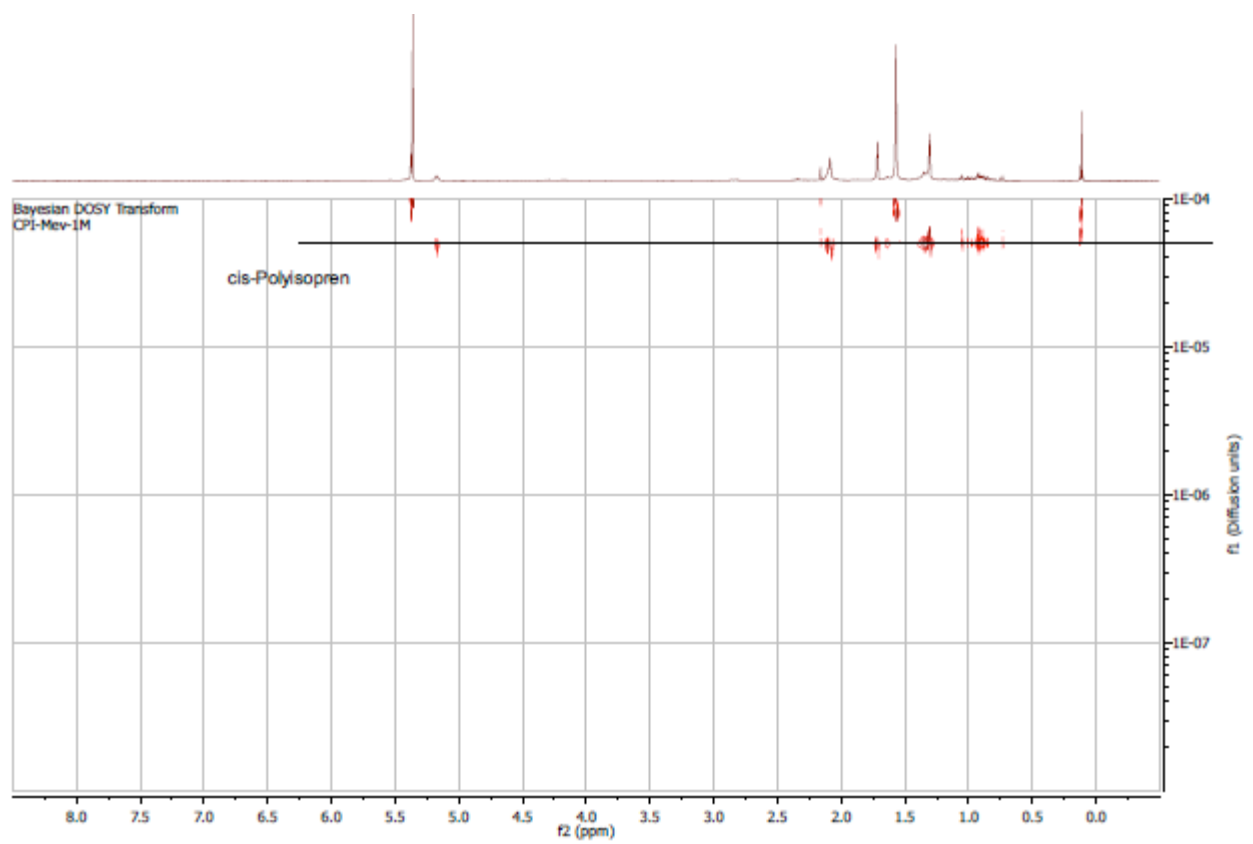
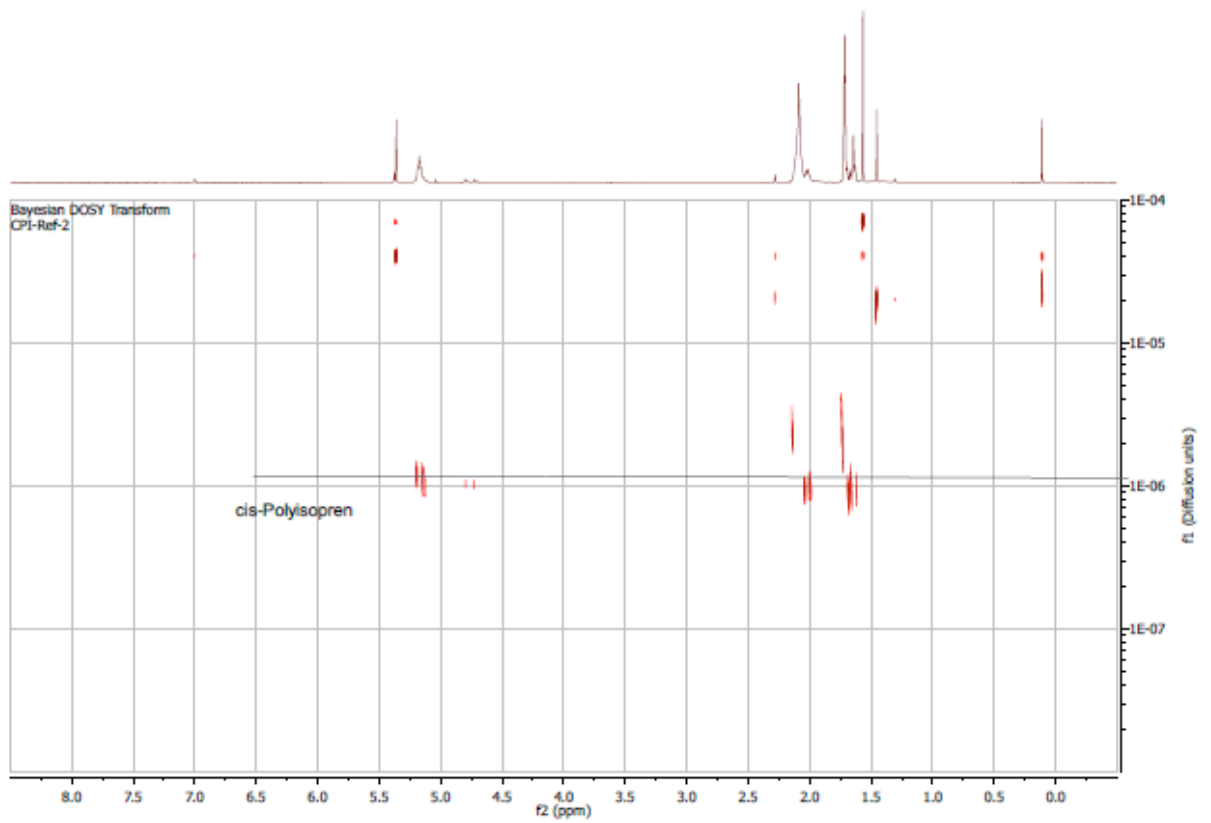


Abb. 14: DOSY Messung an einem cis-Polyisoprenstandard (oben) und cis-Polyisopren, das aus einer mit Mevalonat angereicherten Latificerenkultur stammt (unten).

Hier zeigte sich, dass die Hauptanteile der cis-Polyisoprenfraktion ein mittleres Molekulargewicht mit bis zu 20 Isopreneinheiten aufwies. Für weitere Details sei an dieser Stelle auf die Originalpublikation verwiesen (Post et al., 2013). Ein im Antrag adressiertes Arbeitspaket (P3.2) war die Metabolitanalyse in Zellfraktionen von cis-Polyisoprenproduzenten, insbesondere in *Taraxacum* Linien bzw. Laticiferenkulturen. Hierzu wurden Verfahren der <sup>1</sup>H-NMR und GC/MS-Metabolomics auf das Untersuchungsobjekt optimiert und im Folgenden auf ca. 50 Proben angewendet. Von besonderem Interesse war hier die Bestimmung der Inulingehalte in den verschiedenen Proben. (Abb. 15)

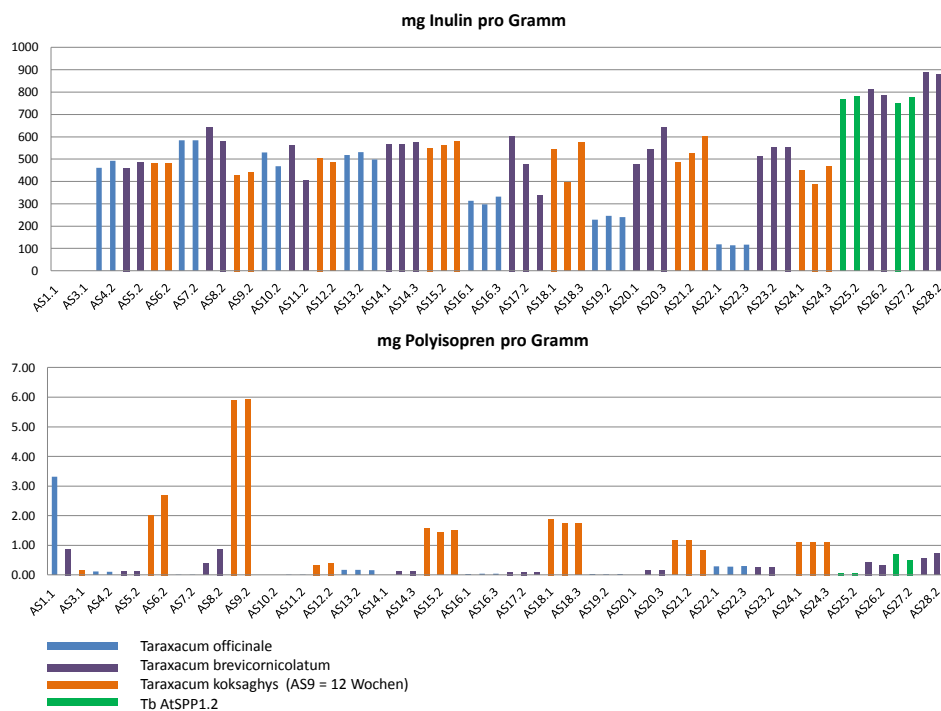


Abb. 15: Inulin- und Polyisoprengehalte in den Wurzelextrakten verschiedener *Taraxacum* Pflanzen in Abhängigkeit vom Alter der Pflanzen.

Es zeigte sich, dass der Speicherstoff in großen Mengen in den Wurzeln der Löwenzahnpflanzen produziert wurde (Abb. 15), nicht jedoch in den Laticiferenzellkulturen. Als Hauptkomponenten wurden hier Saccharose und Glucose identifiziert. Diese Befunde sind von großer Bedeutung, da hiermit gezeigt werden kann, dass eine mögliche Produktion von Inulin in Laticiferenkulturen für die Stoffflussbilanz keine Rolle spielt und nicht konkurrieren sollte gegenüber der gewünschten Konversion von Zucker in Polyisopren.

**P3.3: Herstellung und Bereitstellung von [3,4,5-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]1-Desoxyxylulose für Markierungsexperimente in Zellkultur**

3 Gramm der Zielsubstanz wurden enzymatisch in einem 1-Topfverfahren nach etablierten Protokollen ausgehend von [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glucose synthetisiert. Die Substanz soll nach Etablierung einer Elite-Laticiferenkultur eingesetzt werden, um die Anteile des MEP-Weges an der Polyisoprensynthese zu bestimmen. (Abb. 16)

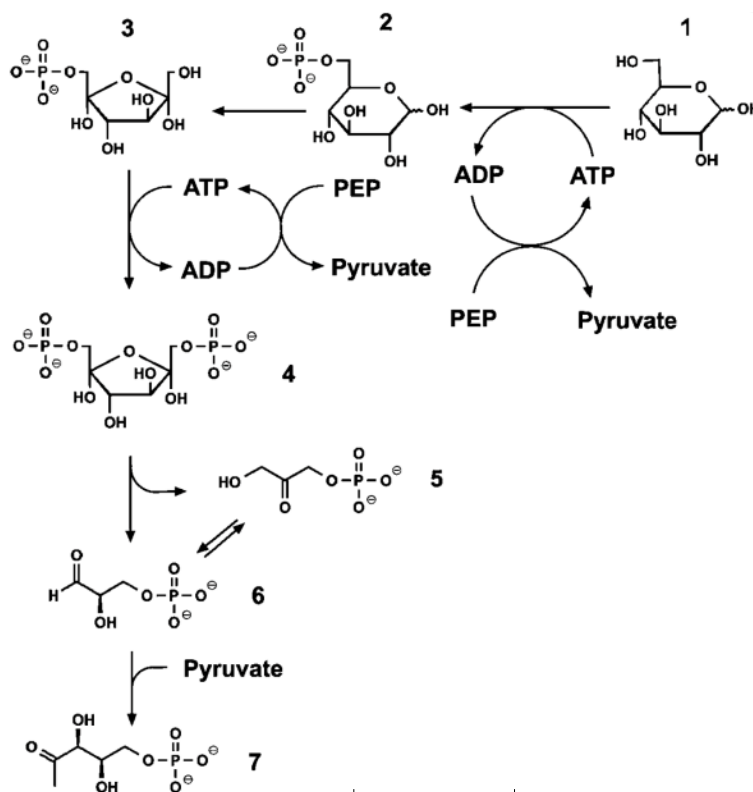


Abb. 16: Enzymatische Eintopfsynthese von [3,4,5-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]1-Desoxyxylulose (7) ausgehend von [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glucose (1) nach Christoph A. Schuhr, Stefan Hecht, Klaus Kis, Wolfgang Eisenreich, Juraithip Wungsintaweekul, Adelbert Bacher, Felix Rohdich Studies on the Non-Mevalonate Pathway – Preparation and Properties of Isotope-Labeled 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-Cyclodiphosphate; Eur. J. of Org. Chem. Volume 2001, Issue 17, pages 3221–3226, September 2001

**P3.4: Messung der Isotopverteilung von Naturkautschuk und deren Vorstufen zur Bestimmung der metabolischen Flüsse bei der Produktion von Naturkautschuk**

Da die etablierten Laticiferenkulturen bisher nur kleine Mengen an cis-Polyisopren produziert, wurde auf ein Markierungsexperiment mit der o.g. bereitgestellten <sup>13</sup>C-markierten 1-Desoxyxylulose zum jetzigen Zeitpunkt verzichtet. Es wurden jedoch Experimente mit [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]Glucose durchgeführt, die einen Einbau der zugeführten

markierten Glucose in die Laticiferenkultur belegt. So konnten  $^{13}\text{C}$ -angereicherte Einfachzucker und Aminosäuren in den Extrakten nachgewiesen werden. Die auf dieser Basis erstellte metabolische Flusskarte belegt, dass die Laticiferen in der Lage sind Glucose aufzunehmen und zu verstoffwechseln. Die markierten Aminosäuren zeigten, dass ein aktiver Zuckerabbau via Glycolyse stattfindet und dass eine effiziente Konversion des Zuckers in aktivierte Essigsäure auftritt. Somit sollte das Anfluten der Polyisoprenvorstufe Acetyl-CoA (via Mevalonatweg) kein Flaschenhals bei der Stoffkonversion zugeführter Zucker in Polyisopren darstellen. Die weitere Umwandlung von Acetyl-CoA in cis-Polyisopren konnte aus diesem Experiment nicht weiter abgebildet werden, da die Menge an extrahierbarem Polyisopren für eine NMR Analyse zu niedrig waren. Wir mussten daher ein entsprechendes Markierungsexperiment an ganzen Löwenzahnpflanzen unternehmen, um mehr über den Bildungsweg von cis-Polyisopren in Löwenzahn zu erfahren. Hierzu haben wir eine Methode verwendet, bei der ganze Pflanzen in einem Puls-Chase Experiment mit  $^{13}\text{CO}_2$  kultiviert werden (Details zur Methode siehe in Eisenreich et al., 2013). Der Schwerpunkt lag dabei auf der Untersuchung des Biosynthesewegs in intakten Pflanzen von *T. brevicorniculatum*. Zur Erstellung einer metabolischen Flusskarte wurden erneut lösliche Zucker und Aminosäuren, aber auch Daten für Polyisopren und Phytosterole (Sitosterol und Stigmasterol) analysiert. Zucker und Aminosäuren reflektierten effiziente Stoffströme von  $\text{CO}_2$  über photosynthetisch gebildete Zucker in den Zentralstoffwechsel und den Baustein Acetyl-CoA. Das in den NMR Spektren von Polyisopren beobachtete spezifische Muster der  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  Kopplungen war in vollem Einklang mit der Konversion von Acetyl-CoA in die Isoprenvorstufen DMAPP und IPP über den Mevalonatweg. Eindeutig detektiert werden konnten z.B.  $[3,5\text{-}^{13}\text{C}_2]$ - und  $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ -Isotopologe von cis-Polyisopren (Abb. 17). C-4 zeigte keine  $^{13}\text{C}$ -Kopplungen zu den benachbarten Atomen.

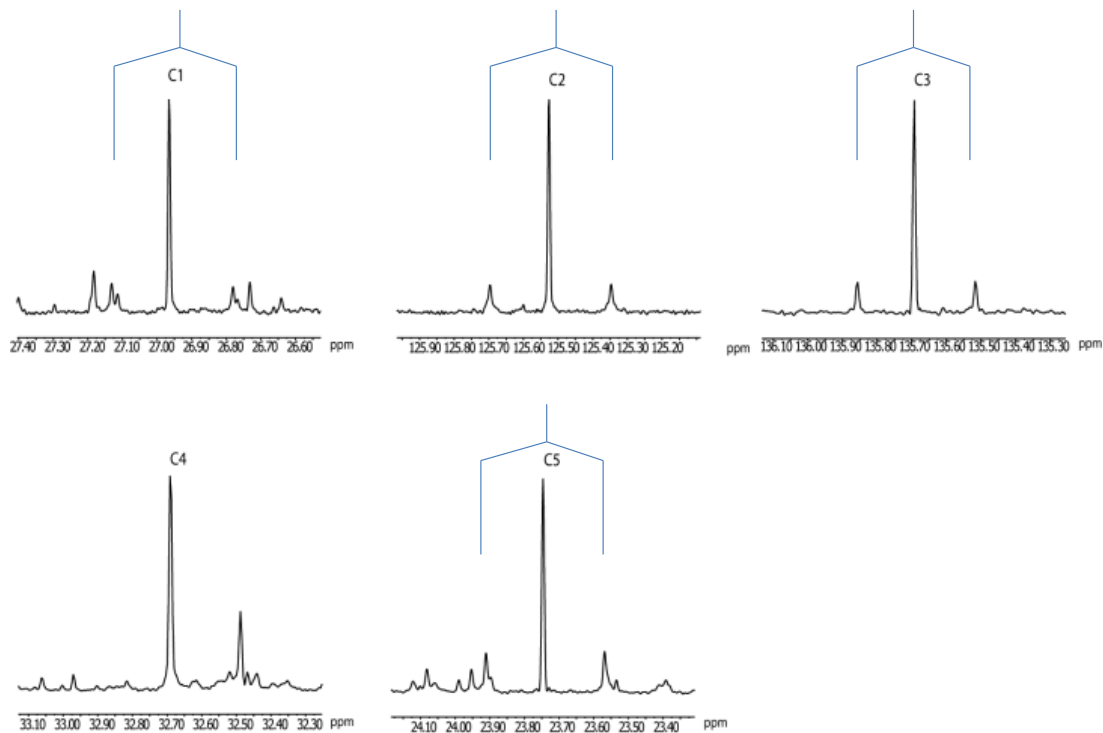


Abbildung 17.  $^{13}\text{C}$ -NMR Signale von *cis*-Polyisopren gewonnen aus Wurzeln von *T. brevicorniculatum* Pflanzen, die mit  $^{13}\text{CO}_2$  markiert wurden. Die gekennzeichneten Signale sind Satelliten, die durch Kopplung zweier  $^{13}\text{C}$ -Atome zustande kommen. Der Abstand (44.2 Hz) ist spezifisch für eine Kopplung mit C-1 (und nicht mit C-3, das ein Satellitenpaar mit dem Abstand von ca. 60 Hz bedingen würde). Aufgrund dieser Signatur und der analogen Signatur für C-1 kann auf die Bildung von  $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ *cis*-Polyisopren geschlossen werden. Signale aufgrund von Kopplungen mit weiteren C-Atomen (z.B. mit  $^{13}\text{C}$ -4, das den MEP Weg anzeigen würde) fehlen völlig.

Die beiden zweifach- $^{13}\text{C}$ -markierten Isotopologen können über den Mevalonatweg zurückgeführt werden auf zwei  $^{13}\text{C}_2$ -markierte Acetyl-CoA Bausteine. Signaturen, die für einen Beitrag des MEP-Wegs sprechen, wie ein  $[1,2,4-^{13}\text{C}_3]$ -Isotopolog konnten dagegen nicht beobachtet werden. Somit ist als wichtiges Ergebnis festzuhalten, dass unter physiologischen Bedingungen in intakten Pflanzen *cis*-Polyisopren vollständig oder nahezu (> 90%) über den Mevalonatweg entsteht. Es kann erwartet werden, dass Laticiferenkulturen entsprechend das Polyisopren über den Mevalonatweg bilden. Dieser Beleg ist von enormer Bedeutung für die weitere Optimierung von Pflanzenlinien bzw. von Laticiferenkulturen, indem z.B. die entsprechenden Vorstufen (Einfachzucker) und/oder Bausteine (Acetat, Mevalonat) für die Polyisoprensynthese über das Kulturmedium zugefüttert werden oder indem die Biosynthese über den Mevalonatweg hochreguliert wird und gleichzeitig erreicht

wird, dass die benötigten Substrate (hier Acetyl-CoA) und Cofaktoren (hier NADPH) nicht limitierend werden.

So zeigten bereits Latificerenkulturen, die in Anwesenheit von Mevalonolacton kultiviert wurden, eine deutliche Steigerung (Faktor 17) der cis-Polyisoprensynthese (Abb. 18).

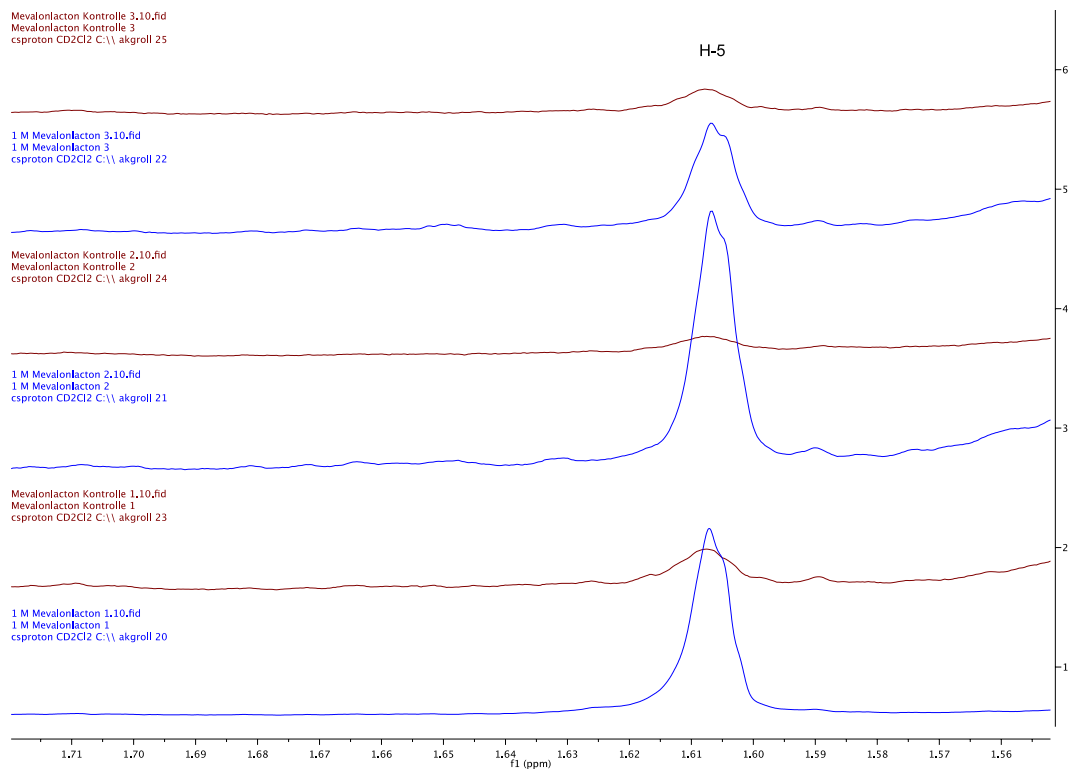


Abbildung 18. Signal bei 1.61 ppm zur Veranschaulichung der gesteigerten Polyisoprenproduktion in den Latificerenkulturen durch Anwesenheit von Mevalonolacton im Medium (blaue Spuren)



## KP1: Anwendungstechnische Charakterisierung durch die Synthomer

Dr. Alexandra Abele  
Synthomer Deutschland GmbH - R&D 5



### Short report:

### Zusammenfassung erste Ergebnisse zum Naturlatex aus kaukasischen Löwenzahn

Aus russischem Löwenzahn isolierter Naturlatex wurde von der Universität Münster an die Synthomer Deutschland GmbH übergeben. Naturlatex auf Basis von Löwenzahn stellt eine interessante Alternative dar zu Naturlatex auf Basis von *Hevea brasiliensis*. Um das Thema der Latexallergie



Bild 1. Isolierte Latexfilme

in einigen medizinischen Anwendungen sicher zu umgehen, muss zum Beispiel auf synthetischen Polyisopren-Latex ausgewichen werden.

Die zur Verfügung gestellten Muster hatten einen Feststoffgehalt von ca. 8 – 10%, Naturlatex liegt nach Aufarbeitung bei ca. 65% Feststoff. Eine Aufkonzentrierung war

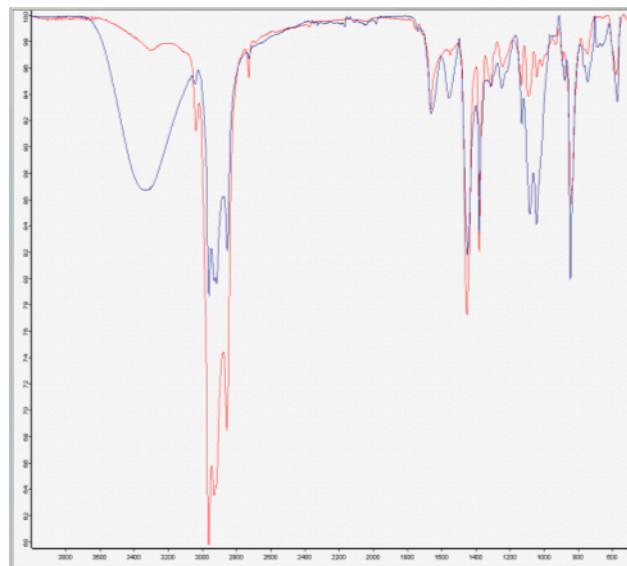


Bild 2. IR-Messung von Naturlatex aus *T. koksaghyz* (blau) im Vergleich zu Latex aus *Hevea brasiliensis* (rot).

aufgrund der noch nicht optimierten Stabilität nicht möglich, an der Oberfläche bildete sich Koagulat bzw. setzte Verfilmung ein. Durch diese Eigenschaft war es allerdings möglich, den Kautschukanteil an der Oberfläche in Form eines Films zu isolieren (Bild 1). Die Vorgehensweise kann ähnlich einer Gefrierkoagulation beschrieben werden.

Dieser Film zeigte im Vergleich zur eingedampften Probe im IR-Spektrum eine deutlich höhere Übereinstimmung mit Latex aus *Hevea brasiliensis* (Bild 2). Die charakteristischen Banden der *cis*-Isopren-Einheiten sind vorhanden.

Neben der Struktur wurde auch die Teilchengröße der Latexpartikel bzw. deren Verteilung analysiert. Naturlatex aus *T. koksaghyz* zeigt eine Verteilung, die dem Naturlatex aus *Hevea brasiliensis* ähnlich ist. Zum Vergleich wurde die Verteilung eines synthetischen Polyisopren-Latex beigefügt. Diese zeigt deutliche Unterschiede zu den beiden Naturlatex-Typen.

Fazit:

Erste analytische Ergebnisse zeigen eine interessante Übereinstimmung des Naturlatex aus *T. koksaghyz* mit Naturlatex aus *Hevea brasiliensis*. Weitere Arbeiten sind notwendig, um die Aufarbeitung und Stabilisierung zu verbessern. Anwendungstechnische Untersuchungen werden zeigen, ob sich die analytischen Ergebnisse bei der Verwendung des Naturlatex aus *T. koksaghyz* als Alternative zu dem bekannten Naturlatex bestätigen.

## **U1: Ökoeffizienzanalyse durch die ifu Hamburg GmbH**

Nachhaltige Bioproduktion von allergenfreiem Naturlatex und -kautschuk  
in Zellkulturen - LaKaZell

### **Ökoeffizienzanalyse - Einleitung**

Im Rahmen des Projekts "Nachhaltige Bioproduktion von allergenfreiem Naturlatex und -kautschuk in Zellkulturen" (LaKaZell) wurde eine Ökoeffizienzanalyse durchgeführt um die Umweltauswirkungen des entwickelten Verfahrens zu evaluieren ohne dabei ökonomische Aspekte zu vernachlässigen. Ziel hierbei war der Vergleich des entwickelten Prozesses mit Alternativ-Verfahren um beurteilen zu können, ob der entwickelte Prozess im Sinne der Ökoeffizienz Vorteile bietet.

Im Folgenden wird zunächst das Vorgehen im Rahmen der Ökoeffizienzanalyse beschrieben. Anschließend wird auf die behandelten Szenarien eingegangen um abschließend die Ergebnisse darzustellen, zu diskutieren und daraus ein Fazit zu ziehen.

### **Vorgehen zur Durchführung der Ökoeffizienzanalyse**

Der Begriff der Ökoeffizienzanalyse ist auf Schaltegger und Sturm (1990) zurückzuführen, sie forderten eine "ökologische Rationalität" (erneut beschrieben in [1]). Weiter wurde der Begriff maßgeblich von Saling et al. geprägt. Die Beschreibung der Methode aus dem Jahr 2002 [2] bildet eine Grundlage auch für diese Ökoeffizienzstudie. Die genutzte Methodik ist angelehnt an die Methode von Saling et al., es wurden jedoch einige Anpassungen vorgenommen. Das Vorgehen wird im Folgenden erläutert, bevor die zu vergleichenden Szenarien vorgestellt werden.

Die Ökoeffizienz eines Produktes wird gemessen, indem die verursachten Umweltauswirkungen ins Verhältnis zu einem ökonomischen Indikator gesetzt werden. Wird dieser Wert für verschiedene Produkt- oder Prozessalternativen berechnet, können die Ergebnisse in einem Ökoeffizienzportfolio dargestellt werden um so einen Vergleich der Alternativen zu ermöglichen.

In der vorliegenden Studie wurden die ökologische Dimension angelehnt an ISO 14040 [3] und ISO 14044 [4] evaluiert. Die Normen zur Ökobilanzierung beschreiben die Ermittlung aller potenziellen Umweltauswirkungen eines Produkts. Zur

Berechnung wurden drei Szenarien als Stoffstromnetze mit der Software Umberto [5] modelliert. Als Hintergrundsystem wurden Daten aus der Sachbilanz-Datenbank ecoinvent v2.2 [6] verwendet. Zur Bewertung der Szenarien wurde die Methode Ecoindicator 99 [7] verwendet. Dieser berechnet einen sogenannten Single-Score-Indikator. Dies ermöglicht die Darstellung im Ökoeffizienz-Portfolio.

Als Systemgrenze wurde 'cradle-to-gate' gewählt. Somit werden alle Aufwendungen von der Rohstoffentnahme bis zum Werkstor betrachtet. Von Saling et al. wird hier die Betrachtung des gesamten Lebenszyklus empfohlen. Was im vorliegenden Fall dagegen spricht ist jedoch, dass der weitere Lebenszyklus der Produkte völlig unbekannt ist. Somit würde an dieser Stelle eine zu große Szenarienunsicherheit auftreten. Die Systemgrenze für die Kostenbetrachtung endet ebenfalls am Werkstor. Die Kostenanalyse beschränkt sich auf Kosten für Materialien, Energie und Services (etwa Transport, Entsorgung von Abfällen).

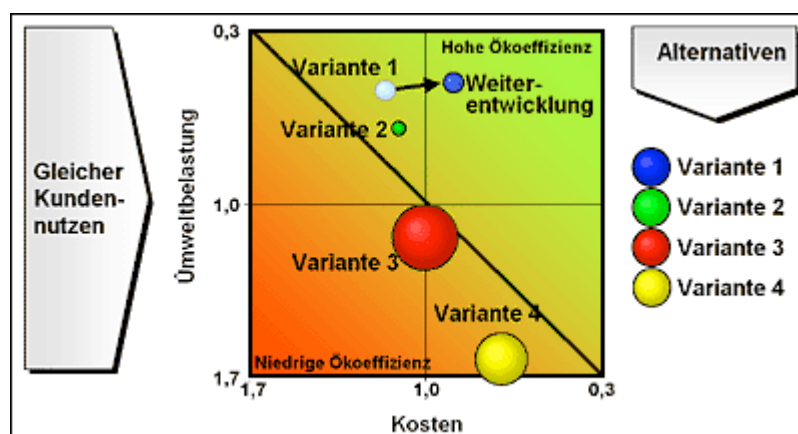


Abbildung 1: Ökoeffizienz Portfolio [8].

Zum abschließenden Vergleich können die Ergebnisse in einem Ökoeffizienzportfolio dargestellt werden. **Abbildung** zeigt beispielhaft ein solches Ökoeffizienzportfolio (Abbildung von BASF [8]). Verschiedene Varianten werden nach ihrer Umweltbelastung (normiert) sowie den verursachten Kosten (ebenfalls normiert) in das Portfolio eingetragen. Dabei werden auf der X-Achse die Kosten, auf der Y-Achse die Umweltbelastung aufgetragen.

Die Prozesse (bzw. Produkte) mit niedriger Ökoeffizienz (hohe Kosten verbunden mit hoher Umweltbelastung) befinden sich im unteren linken Quadranten, die Alternativen mit hoher Ökoeffizienz (also wenig Umweltauswirkungen bei wenig Kosten) finden sich im oberen rechten Quadranten. Eine Alternative ist umso ökoeffizienter, je weiter der Punkt im 90°-Winkel entfernt oberhalb der diagonalen Linie liegt. Demnach kann die Ökoeffizienz verbessert werden, indem entweder die

Kosten reduziert werden (dies ist ein Optimierungsvorschlag für Prozesse im oberen linken Quadranten) oder alternativ dazu die Umweltauswirkungen reduziert werden (die Handlungsempfehlung für Prozesse im unteren rechten Quadranten).

### **Betrachtete Szenarien**

Für den vorliegenden Vergleich wurden drei verschiedene Szenarien betrachtet, die jeweils eine Möglichkeit, allergenfreien Latex/Kautschuk herzustellen beschreiben.

Zunächst wurde der im Rahmen des Projektes LaKaZell entwickelte Prozess der Herstellung mittels Zellkultur modelliert. Dieses Szenario wird im Folgenden als Szenario "Zellkultur" bezeichnet.

Als Vergleich wird die Gewinnung aus *Taraxacum koksaghyz* abgebildet. Aus den Wurzeln dieser Löwenzahnart kann Kautschuk gewonnen werden. Das Szenario wird im Folgenden als Szenario "Pflanze" behandelt.

Daten zu diesen beiden Szenarien wurden von den Projektpartnern zur Verfügung gestellt.

Um eine weitergehende Einordnung dieser beiden Szenarien zu ermöglichen wurde eine Datenrecherche durchgeführt mit dem Ziel Ökobilanzdaten zu synthetisch hergestelltem Latex zu erhalten. In der Datenbank Ecoinvent [6] ist ein Datensatz „latex, at plant“ vorhanden. Es handelt sich hierbei um Styrol-Budatadien-Dispersion. Aus Datenschutzgründen ist jedoch keine Dokumentation vorhanden und der Prozess kann nur in aggregierter Form („Result-Process“) geladen werden, d.h., eine Darstellung der einzelnen Beiträge zur Produktion („Unit-Processes“) ist nicht möglich.

Dies erschwert die Einschätzung über die Anwendbarkeit dieses Datensatzes. Bei Nutzung des Datensatzes könnte nur eine aggregierte Bewertung vorgenommen werden. Eine Betrachtung beispielsweise darüber, welche Vorketten maßgeblich zur Umweltwirkung beitragen, könnte nicht durchgeführt werden. Weitere Informationen zu diesem Datensatz sind nicht erhältlich. Aus diesem Grund wurde die synthetische Herstellung ebenfalls modelliert (im Folgenden Szenario "Synthese"). Es handelt sich um einen Laborversuch, um der Tatsache Rechnung zu tragen, dass der untersuchte Prozess sowie das Szenario "Feldanbau" ebenfalls nicht in großskaligen Maßstäben umgesetzt sind.

Für Materialien (als solche werden in diesem Kontext auch Energie, Services etc. betrachtet), die wiederholt auftauchen wie beispielsweise Elektrizität oder Entsorgung

von Abwasser wurden selbstverständlich stets die gleichen Datensätze und Preise genutzt.

Nachfolgend werden die drei zu vergleichenden Szenarien jeweils kurz beschrieben.

### Szenario Zellkultur

Hierbei handelt es sich um den im Projekt entwickelten Prozess. Die Daten zur Modellierung wurden von der Universität Münster zur Verfügung gestellt. **Abbildung** zeigt das fertige Stoffstromnetz.

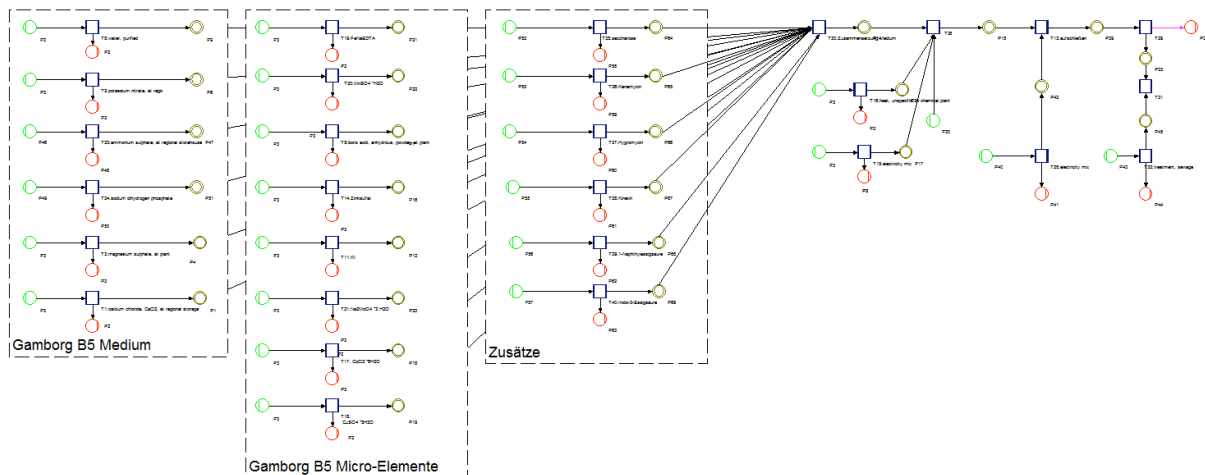


Abbildung 2: Das Stoffstromnetz des Szenarios Zellkultur, Beschreibung im Fließtext.

Die Anzucht erfolgt im Medium Gamborg B5 (Fa. Duchefa). Die genaue Zusammensetzung des Mediums wurde [9] und [10] entnommen. In der **Abbildung** sind die ist die Zusammensetzung aus [9] im Rechteck "Gamborg B5 Medium" dargestellt. Die einzige Ausnahme bildet hier der Punkt "Micro-Elements". Um diesen aggregierten Fluss noch einmal aufzuschlüsseln wurde die Zusammensetzung der Spurenelemente aus [10] genutzt. Die Spurenelemente sind im Rahmen "Gamborg B5 Micro-Elements" enthalten.

Weitere, dem Medium zugesetzte Stoffe finden sich im Rahmen "Zusätze".

Tabelle 2: Die Stoffe, die in den drei Rahmen in Abbildung zusammengefasst werden. Die erste Spalte ist [9] entnommen (das Stoffstrommodell enthält zusätzlich Wasser), die zweite aus [10]. Die Stoffe in der dritten Spalte wurden im Rahmen des Projektes mitgeteilt. Die Mischung deutscher und englischer Sprache ergibt sich, da die Verbindungen so aus den Originalquellen entnommen wurden.

| Gamborg B5 Medium   | Micro-Elements (B5)*   | Zusätze  |
|---|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Potassium Nitrate</li> <li>• Ammonium Sulphate</li> <li>• Sodium Dihydrogen Phosphate</li> <li>• Magnesium Sulphate Anhydrous</li> <li>• Gamborg B5 Micro Elements*</li> <li>• Calcium Chloride Anhydrous</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ethylenediaminetetraacetate ferric sodium</li> <li>• Manganese sulfate monohydrate</li> <li>• Borsäure</li> <li>• Zinksulfat (wasserfrei)</li> <li>• Potassium iodide</li> <li>• Sodium molybdate dihydrate</li> <li>• Cobalt chloride hexahydrate</li> <li>• Kupfersulfat</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Saccharose</li> <li>• Kanamycin</li> <li>• Hygromycin</li> <li>• Kinetin</li> <li>• 1-Naphthylessigsäure (NAA)</li> <li>• Indol-3-essigsäure (IAA)</li> </ul> |

\* Gamborg B5 Micro Elements ist als Summe in dieser Spalte aufgeführt und in der mittleren Spalte auf die einzelnen Stoffe aufgegliedert.

**Tabelle 2** gibt einen Überblick über die Stoffe in den drei Rahmen in **Abbildung** . Das verbleibende Stoffstromnetz enthält Energiebedarf (Strom und Wärme) zur Anzucht. Unter der Annahme, dass Zellwachstum von 50 g/L (Trockengewicht) erreicht wird und dieses 4 mg/g Trockengewicht Polyisopren enthält, sind in einem Liter Medium 200 mg Polyisopren enthalten. Es folgen Aufschluss und chromatographische Aufbereitung sowie die Behandlung der anfallenden Abfälle. Energiebedarfe für den Fermenter, Aufschluss und Chromatographie wurden mit Richtwerten aus [11] und [12] abgeschätzt.

Für die Kostenanalyse wurden die verwendeten Materialien bei verschiedenen Händlern von Laborbedarf recherchiert. Nach Möglichkeit wurden große Gebindegrößen gewählt und ein Mittelwert über verschiedene Händler gebildet. Der Preis für Elektrizität wurde einer Statistik von EuroStat [13] entnommen, für Abwasserentsorgung ebenfalls auf statistische Durchschnittswerte zurückgegriffen.

### Szenario Pflanze

Abbildung zeigt das Modell des Szenarios Pflanze. Es wurde der Anbau, die Ernte und die Verarbeitung der Pflanzen (*Taraxacum koksaghyz*) modelliert. Das Schema in **Abbildung** wurde bereits zu Beginn des Projekts von der Universität Münster zur Verfügung gestellt und als Grundlage des Stoffstrommodells genutzt.

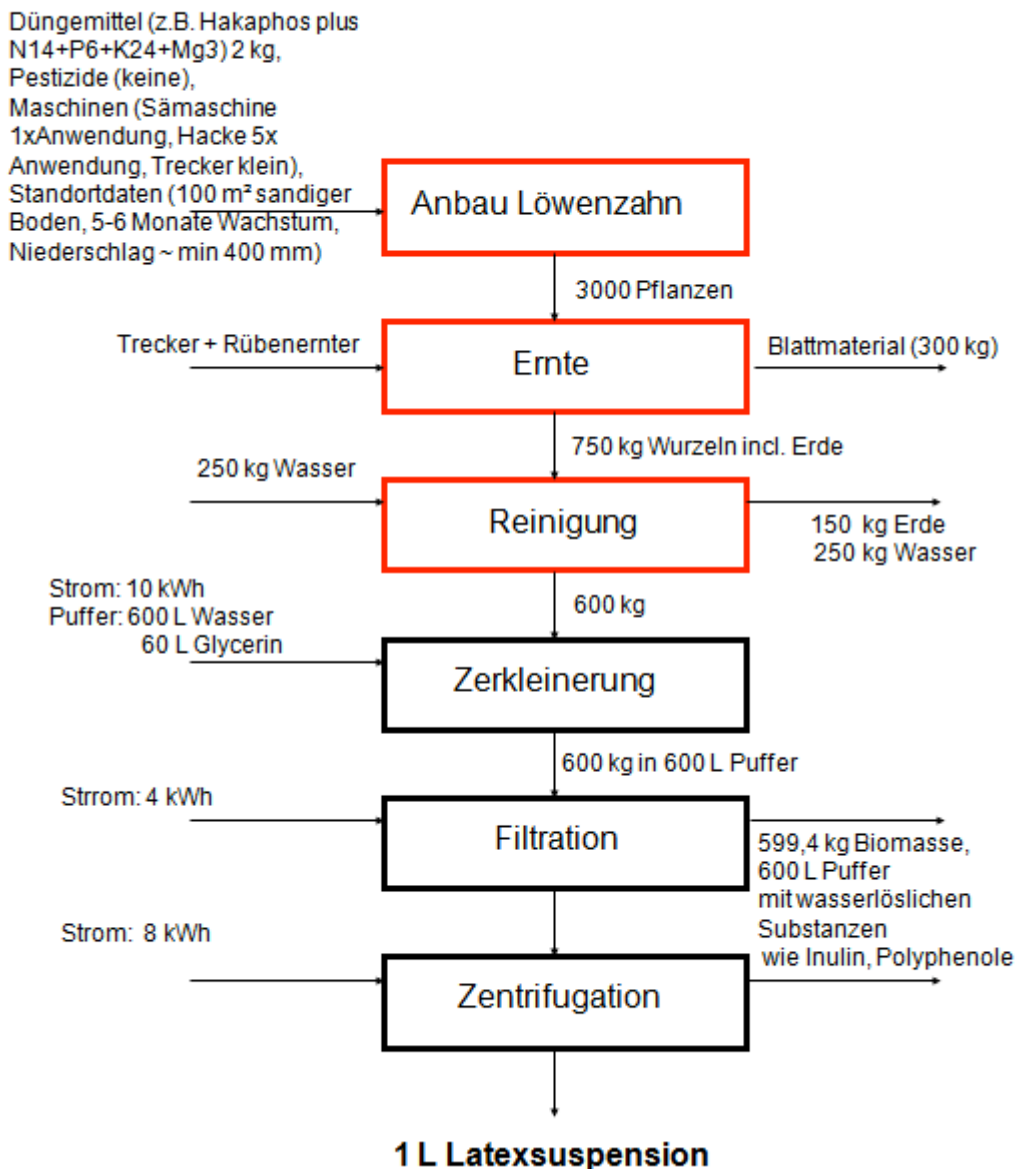


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Herstellung von Kautschuk aus Löwenzahn. Das Schema wurde vom Projektpartner WWU erstellt.

Das Stoffstromnetz des Szenarios wird in **Abbildung** gezeigt. Die Rahmen dieser Abbildung fassen den Anbau des Löwenzahns inklusive Ernte (oberer Rahmen) sowie die Entsorgung und Behandlung verschiedener Abfallströme (unterer Rahmen) zusammen.

Die verbleibenden Prozesse beziehen sich auf die Gewinnung der Latexsuspension aus den Wurzeln. Das Schema in **Abbildung** zeigt die Stoff- und Energiemengen, die für die Herstellung von 1 L Latexsuspension benötigt werden. Nach [14] wird ein Kautschukgehalt von 30 % in der Latexsuspension angenommen und dieser als Referenzfluss genutzt um mit den anderen Szenarien vergleichbar zu sein.

Zur Kostenanalyse wurden die nötigen Bearbeitungsschritte auf dem Feld als Service-Input modelliert. Als Preis wurde jeweils die Mitte der auf [15] angegebenen



Preisspanne angenommen. Für die Entsorgung der Biomasse wurde ein Preis von 0 € angenommen.

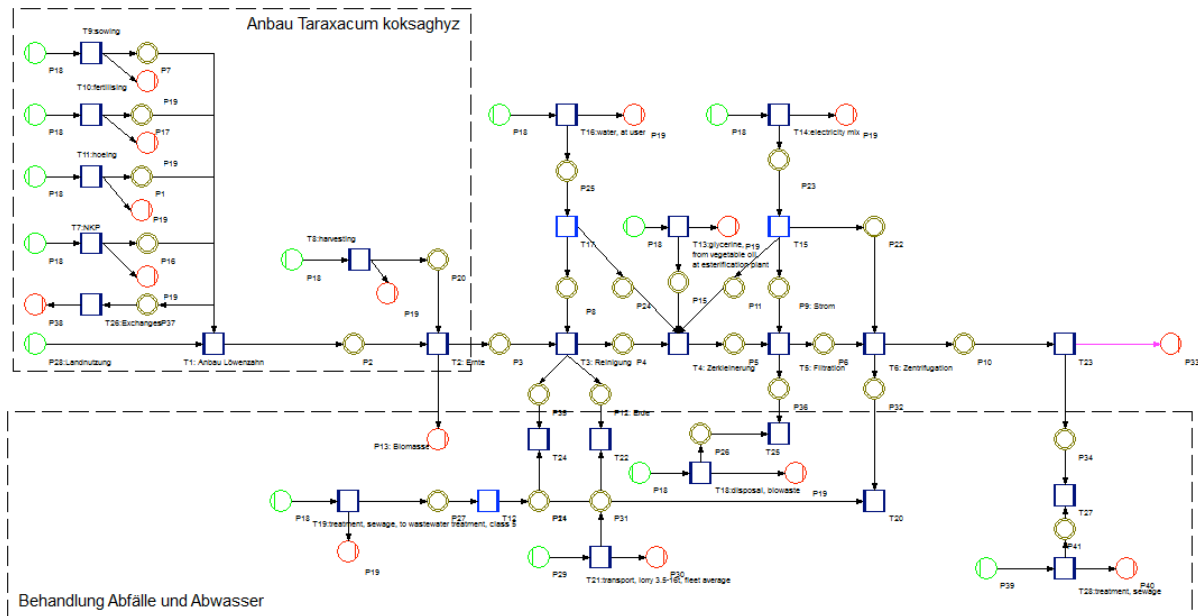


Abbildung 4: Stoffstromnetz des Szenarios Pflanze. Beschreibung im Fließtext

### Szenario Synthese

Zum weiteren Vergleich wurde die Herstellung von Polyisoprenen auf Basis einer Arbeitsvorschrift für die Polymersynthese [16] modelliert. Es handelt sich um einen Laborversuch. So wird eine größere Vergleichbarkeit mit den anderen beiden Szenarien erreicht.

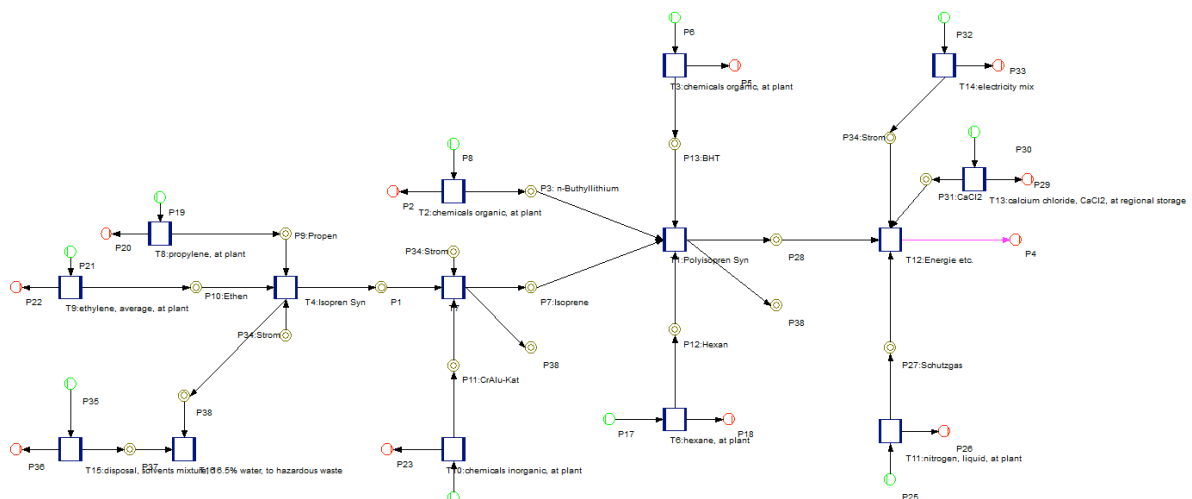


Abbildung 5: Stoffstrommodell des Szenarios Synthese

Das modellierte Stoffstromnetz wird in **Abbildung** gezeigt. Bei der Modellierung des Prozesses wurde die Herangehensweise aus einem Artikel zur Ökobilanzierung von Chemikalien bei unterschiedlicher Datenlage [12] berücksichtigt.

Isopren hat einen Masseanteil von über 40% an den während des Versuchs eingesetzten Stoffen. In ecoinvent v2.2 ist jedoch kein geeigneter Datensatz vorhanden. Die Herstellung von Isopren wurde daher näherungsweise aus der Reaktion von Propen und Ethen zu 2-Methylbuten mit der anschließenden Reaktion über einem Chromoxid-Aluminiumoxid-Katalysator modelliert. Es wird ein Umsatz von 95% angenommen.

Weitere verwendete Stoffe, für die keine ecoinvent-Datensätze vorlagen wurden mit dem generischen Datensatz "chemicals organic, at plant [GLO]" abgebildet. So werden die geringen Anteile von BHT (0,013 %) und N-Butyllithium (0,02 %) zumindest näherungsweise berücksichtigt. Laut ISO 14044 [4] könnte hier auch ein Abschneidekriterium eingesetzt und die Stoffe vernachlässigt werden.

Der Versuch findet unter Schutzgas (Stickstoff) statt, auch dessen Verbrauch wird bilanziert. Energiebedarfe wurden teils analog zu [12] angenommen, teils mit Hilfe von Datenblättern von Laborgeräten abgeschätzt.

Wie auch bei den vorangegangenen Szenarien wurden Preisrecherchen bei verschiedenen Händlern durchgeführt und nach Möglichkeit durchschnittliche Preise berechnet. Der Preis zur Entsorgung von Lösungsmittelhaltigen Abfällen wurde von [17] übernommen. Für den Preis von Ethen wurde der geschätzte Preis (über [18]) genutzt, die Preise der weiteren Gase wurden aus den Marktinformationen von ecoinvent v3 [19] entnommen.

### **Analyseergebnisse**

Im Folgenden werden die Ergebnisse der berechneten und mittels Ecoindicator 99 bewerteten Szenarien dargestellt.

Zu bedenken ist, dass es sich bei allen drei Szenarien um Prozesse handelt, die im Labormaßstab durchgeführt werden. Die Herstellung von 1 kg Kautschuk (diese Menge wurde als Referenzfluss genutzt) wird in aller Regel so nicht durchgeführt. Nichtsdestotrotz werden im Folgenden die Ergebnisse auf diese Größe bezogen dargestellt, zunächst eine Zusammenfassung in **Tabelle 3**:

Tabelle 3: Tabellarische Zusammenfassung der Bewertung aller Szenarien mittels Ecoindicator. Die Szenarien beziehen sich jeweils auf einen Referenzfluss von 1 kg Kautschuk oder Polyisopren. Alle Werte sind in der Einheit "points" angegeben. Es werden Zwischensummen und die Gesamtsumme angegeben..

| Szenario          |                                 | Zellkultur   |       | Pflanze      |       | Synthese     |       |
|-------------------|---------------------------------|--------------|-------|--------------|-------|--------------|-------|
|                   |                                 |              |       |              |       |              |       |
| ecosystem quality | ecotoxicity                     | 0,96         | 14,18 | 0,46         | 32,16 | 1,19         | 2,07  |
|                   | land occupation                 | 12,61        |       | 30,08        |       | 0,27         |       |
|                   | Acidification, & eutrophication | 0,60         |       | 1,61         |       | 0,61         |       |
| human health      | carcinogenics                   | 4,42         | 11,85 | 3,41         | 10,60 | 5,50         | 17,12 |
|                   | climate change                  | 3,13         |       | 1,42         |       | 3,34         |       |
|                   | ionising radiation              | 0,13         |       | 0,04         |       | 0,26         |       |
|                   | respiratory effects             | 4,17         |       | 5,73         |       | 8,02         |       |
|                   | ozone layer depletion           | 7,5E-04      |       | 5,5E-4       |       | 7,4E-4       |       |
| resources         | fossil fuels                    | 6,91         | 7,02  | 9,63         | 9,74  | 9,86         | 9,98  |
|                   | mineral extraction              | 0,11         |       | 0,11         |       | 0,12         |       |
| <b>SUMME</b>      |                                 | <b>33,05</b> |       | <b>52,50</b> |       | <b>29,16</b> |       |

Diese Werte (**Tabelle 3**) sollen nun graphisch veranschaulicht werden. **Abbildung** zeigt ein gestapeltes Balkendiagramm, welches die Summe über alle Wirkungskategorien für jedes Szenario zeigt.

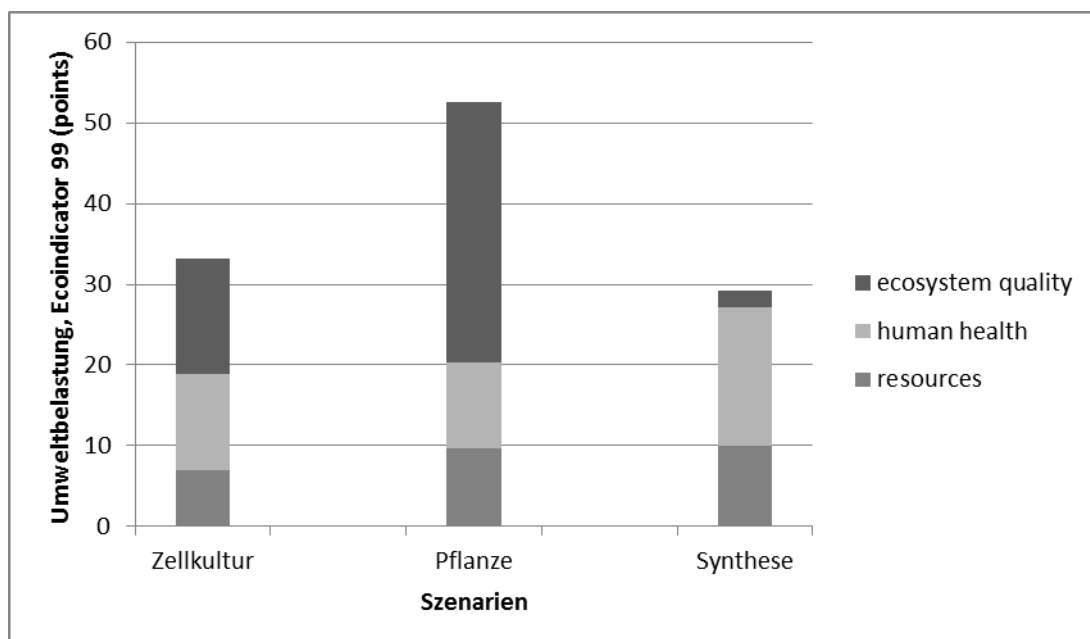


Abbildung 6: Darstellung der Bewertungsergebnisse als Balkendiagramm. Die Umweltauswirkungen sind in der Einheit "points" angegeben.

Um die Ergebnisse im nachfolgenden Abschnitt genauer diskutieren zu können, werden sie zudem als Netzdiagramm dargestellt. Saling et al. [2] bezeichnen eine solche Abbildung auch als "Fingerabdruck". Für alle Wirkungskategorien wird jeweils der Quotient aus dem Wert des Szenarios sowie dem größten Wert aller Szenarien

gebildet. So erhält das Szenario mit der größten Umweltauswirkung jeweils den Wert 1 und die Werte der anderen Szenarien sind entsprechend kleiner.

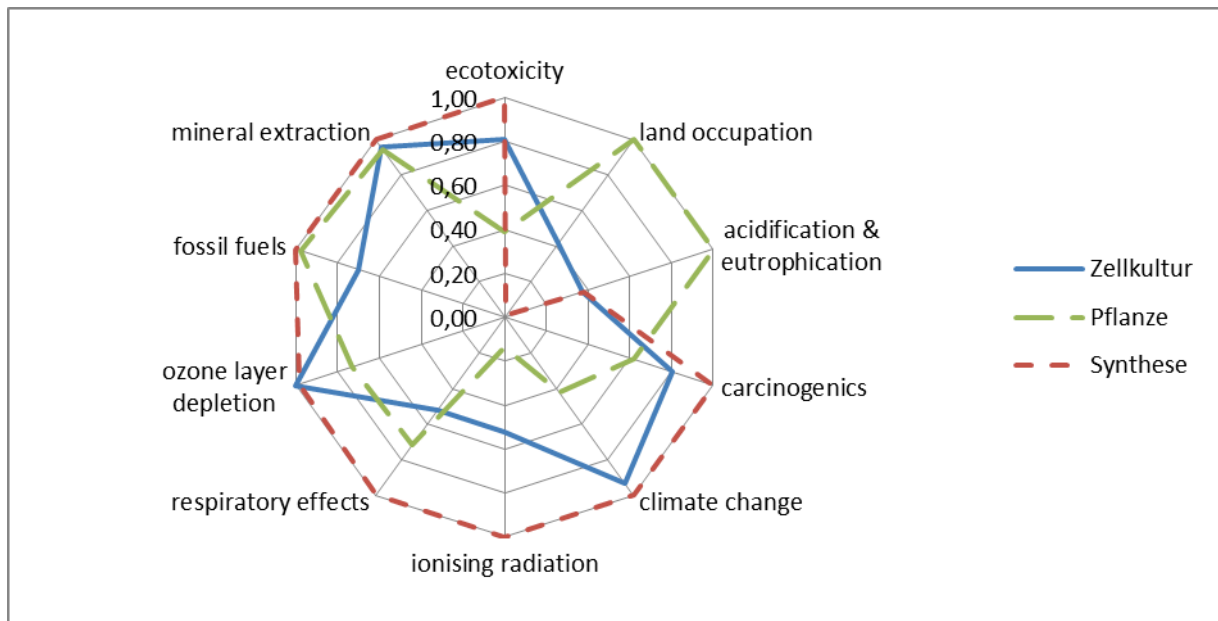


Abbildung 7: Darstellung der Ergebnisse als Netzdiagramm.

Anschließend sollen die Umweltauswirkungen mit den verursachten Kosten ins Verhältnis gesetzt werden. **Abbildung** zeigt das Ökoeffizienzportfolio der drei Szenarien Zellkultur, Pflanze und Synthese.

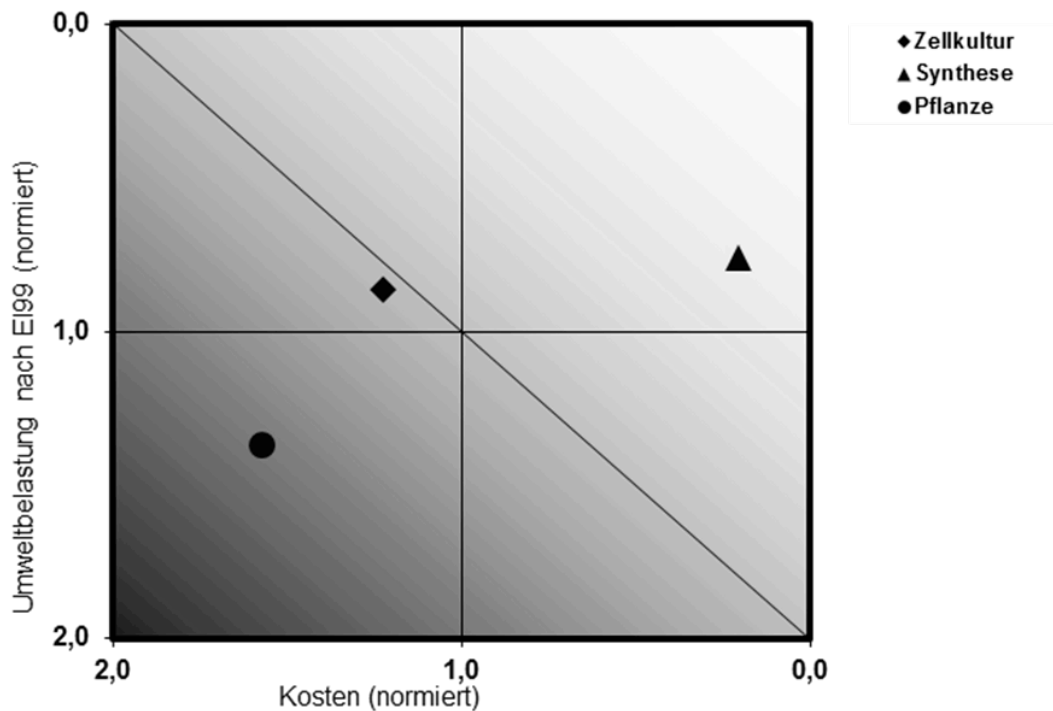


Abbildung 8: Ökoeffizienzportfolio der drei Szenarien Zellkultur, Pflanze und Synthese

Das Ökoeffizienzportfolio zeigt, dass das Szenario Synthese die geringsten Umweltauswirkungen verursacht. Etwas mehr Umweltbelastung hat das Szenario Zellkultur und deutlich mehr das Szenario Pflanze. Bei den Kosten besteht die gleiche Reihenfolge. Demnach ist das Szenario Synthese das ökoeffizienteste dieser drei Alternativen, gefolgt vom Szenario Zellkultur. Das Szenario Pflanze weist die geringste Ökoeffizienz auf.

## Diskussion und Fazit

Der Abschnitt Ergebnisse zeigt, dass das Szenario Synthese die höchste Ökoeffizienz aufweist. Schaut man sich die Wirkungskategorien einzeln an, ergibt sich ein interessantes Bild: Tatsächlich zeigt das Netzdiagramm ("Fingerabdruck") in **Abbildung**, dass jedes Szenario mindestens in einer Wirkungskategorie mehr Umweltauswirkungen als die anderen beiden Szenarien verursacht. **Tabelle 4** zeigt die Daten, die zur Erstellung des Netzdiagramms verwendet wurden.

Tabelle 4: Normalisierte Bewertungsergebnisse der drei Szenarien. Diese Tabelle wurde verwendet um das Netzdiagramm (Abbildung) zu erstellen.

| Szenario \ Wirkungskategorie   | Zellkultur  | Pflanze     | Synthese    |
|--------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| ecotoxicity                    | 0,81        | 0,39        | <b>1,00</b> |
| land occupation                | 0,42        | <b>1,00</b> | 0,01        |
| acidification & eutrophication | 0,38        | <b>1,00</b> | 0,38        |
| carcinogenics                  | 0,80        | 0,62        | <b>1,00</b> |
| climate change                 | 0,94        | 0,42        | <b>1,00</b> |
| ionising radiation             | 0,52        | 0,14        | <b>1,00</b> |
| respiratory effects            | 0,52        | 0,71        | <b>1,00</b> |
| ozone layer depletion          | <b>1,00</b> | 0,73        | 0,99        |
| fossil fuels                   | 0,70        | 0,98        | <b>1,00</b> |
| mineral extraction             | 0,96        | 0,95        | <b>1,00</b> |

Das Szenario Synthese, welches insgesamt die niedrigsten Umweltauswirkungen verursacht, erhält den Wert 1 in den meisten (7 von 10) Wirkungskategorien. Insgesamt liegt hat das Szenario jedoch nach Ecoindicator 99 die niedrigste Umweltauswirkung. Dies verdeutlicht die Gewichtung der Wirkungskategorien gegeneinander innerhalb dieser Methode. Hiermit ist natürlich eine gewisse Subjektivität verbunden: Wie ist der Verbrauch fossiler Ressourcen im Vergleich zu

Landverbrauch oder Eutrophierung zu bewerten? Mit Verwendung einer Bewertungsmethode, die einen Single-Score-Indikator berechnet werden diese Gewichtungen akzeptiert. Dass dieses Szenario die niedrigsten Umweltauswirkungen verursacht ist nicht ganz überraschend, da petrochemische Verfahren oft sehr effizient arbeiten, seit langem etabliert sind und kontinuierlich verbessert wurden. Auch wenn hier im Vordergrundsystem ein Laborversuch dargestellt wird, die Ausbeuten werden als recht hoch angenommen und für die Vorketten enthalten sehr effiziente petrochemische Prozesse

Das Szenario Pflanze hat in den Wirkungskategorien Versauerung und Eutrophierung sowie Landnutzung einen deutlich höheren Wert als die beiden anderen Szenarien. Nachdem es sich hier um einen Prozess, der einen deutlichen landwirtschaftlichen Anteil aufweist, handelt, ist dieses Ergebnis erwartungsgemäß. Die Ressource Land, welches genutzt werden kann, sollte nicht unterschätzt werden. Schmitz und Paulini [20], die verschiedene in Ökobilanzen gebräuchliche Wirkungskategorien hierarchisiert haben, ordnen die "Naturraumbeanspruchung" der Gruppe mit der höchsten Priorität zu. Die Begrenztheit des Raums führt leicht zu Diskussionen, wofür das vorhandene Land genutzt werden sollte (im Fall von Energiepflanzen auch unter "Tank oder Teller?" behandelt).

Das Szenario Zellkultur hat lediglich einmal den Wert 1 zugeordnet bekommen, in der Wirkungskategorie "ozone layer depletion". Großen Anteil hieran hat der Energieverbrauch. Dieser wiederum wird maßgeblich von der Menge des Mediums beeinflusst. Anders herum gesagt, eine höhere Produktausbeute im Medium könnte die Ökoeffizienz maßgeblich verbessern. Durch eine höhere Produktausbeute könnten gleichzeitig Umweltauswirkungen vermindert und Kosten gesenkt werden.

Der letztgenannte Punkt (Kostensenkung) ist auch ein Ziel, was sich konkret aus dem Ökoeffizienzportfolio ableiten lässt.

Das Szenario Pflanze erreicht im vorliegenden Vergleich die schlechteste Ökoeffizienz.

Es ist zu beachten, dass alle berechneten Ergebnisse Unsicherheiten unterliegen. Es wird angenommen, dass die Unsicherheiten bei der Kostenanalyse größer sind als bei der Bewertung der Umweltauswirkungen. Weiter ist davon auszugehen, dass das Szenario Pflanze der größten Unsicherheit unterliegt da hierzu die schlechteste Datenlage vorhanden war.

Insgesamt lässt sich aber ein sehr deutlicher Trend hinsichtlich der Ökoeffizienz absehen.

Zusätzlich lassen sich aus den Ergebnissen Hotspots erkennen, die hinsichtlich der Ökoeffizienz besonderes Verbesserungspotenzial versprechen. Als Hotspot beim Szenario Pflanze lässt sich der landwirtschaftliche Anbau identifizieren. Ein höherer Ertrag und/oder Kautschukgehalt der Wurzeln könnte diese Wirkungen natürlich vermindern, es ist jedoch relativ unwahrscheinlich, dass dies in einem Ausmaß erreicht wird, der zu einer deutlichen Verbesserung der Ökoeffizienz führt. Einfacher wäre es wahrscheinlich, die eingesetzten Mengen von Wasser und vor allem Glycerin zu verringern.

Beim Szenario Zellkultur zählen der Energieverbrauch und die Ausbeute von Polyisopren zu den größten Stellschrauben. Vor allem eine höhere Ausbeute würde sich auch maßgeblich auf die zu erwartenden Kosten niederschlagen und somit einen doppelten Gewinn bei der Ökoeffizienz darstellen.

Bei einem Upscaling sind in der Regel sowohl geringere Kosten (bezogen auf eine Einheit des Produkts) als auch geringere Umweltauswirkungen zu erwarten. Insgesamt ist festzustellen, dass der Prozess Zellkultur für das relativ frühe Stadium seiner Entwicklung (Labormaßstab) gutes Potenzial zeigt, mit weiterer Entwicklung und Optimierung zu einem ökoeffizienten Verfahren zu werden und eine Alternative zu synthetischen Verfahren darzustellen.

## Quellen Ökoeffizienzanalyse

- [1] Schaltegger, S.; Sturm, A. (1999): Ökologieorientierte Entscheidungen in Unternehmen. Bern, Schweiz: Paul Haupt.
- [2] Saling P, Kicherer A, Dittrich-Krämer B, Wittlinger R, Zomlik W, Schmidt I. Eco-efficiency Analysis by BASF: The Method. Life Cycle Management 2002.
- [3] International Organization for Standardization (2006): Environmental management - Life cycle assessment - Principles and framework (ISO 14040).
- [4] International Organization for Standardization (2006): Environmental management - Life cycle assessment - Requirements and guidelines (ISO 14044). ISO 14040.
- [5] ifu Hamburg GmbH: Umberto v5.6: know the flow.
- [6] ecoinvent Centre: ECOINVENT v2.2. Dübendorf, Schweiz.
- [7] Goedkoop M.; Spriensma R. (2001): The Eco-indicator 99: A damage oriented method for Life Cycle Impact Assessment. Methodology Report. Leiden, Niederlande.
- [8] BASF: Ökoeffizienzportfolio (Abbildung). Unter: <http://www.basf.com/group/corporate/de/function/conversions:/publish/content/sustainability/eco-efficiency-analysis/images/Portfolio.gif> (10.06. 2013)
- [9] GoldBiotechnology, Inc (2009): Certificate of Analysis. Gamborg B5 Medium. Unter: <https://www.goldbio.com/pdf/3903-Certificate%20of%20Analysis.pdf> (10.06.2013)
- [10] Duchefa Biochemie B.V. (2012): Sicherheitsdatenblatt. Gamborg B5 Medium (Micro and Macro elements). Unter: <http://www.duchefa-biochemie.nl/msds/download/letter/G/id/1946> (18.06.2013)
- [11] Biwer A. (2003): Modellbildung, Simulation und ökologische Bewertung in der Entwicklung biotechnologischer Prozesse. Dissertation. Saarbrücken.

- [12] Hischier R.; Hellweg S.; Capello C., Primas A. (2005): Establishing Life Cycle Inventories of Chemicals Based on Differing Data Availability. *Int J Life Cycle Assessment* 10(1): S. 59–67. doi:10.1065/lca2004.10.181.7.
- [13] EuroStat. Electricity prices for industrial consumers, from 2007 onwards - bi-annual data. Unter: [http://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do?dataset=nrg\\_pc\\_205&lang=en](http://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do?dataset=nrg_pc_205&lang=en) (04.07.2013)
- [14] Jvan Beilen J.; Poirier Y. (2007): Establishment of new crops for the production of natural rubber. *Trends in Biotechnology* 25(11):522–9. doi:10.1016/j.tibtech.2007.08.009.
- [15] Agrardienstleistungen MV: Preisspannen: Richtwerte für bestimmte Dienstleistungen. Unter: <http://www.lmsberatung.de/agrardienstleistungen/categories/costs>. (02.08.2013)
- [16] Slugovc. C. (2011): Arbeitsvorschrift Polymersynthese: Stereospezifische Polymerisation von Isopren mit n-Butyllithium. TU Graz, Österreich Unter : [http://ictm.tugraz.at/files/attachments/6848/122703\\_av\\_che161.pdf](http://ictm.tugraz.at/files/attachments/6848/122703_av_che161.pdf) (13.05.2013)
- [17] GIB-Entsorgung: Schadstoffentsorgung Preisliste. Unter: <https://www.gibentsorgung.de/geschaeftskunden/dienstleistungen/schadstoffentsorgung/preisliste/> (02.08.2013)
- [18] Marketizer.com: Preise von Ethen Ethylen. Unter: <http://de.marketizer.com/produkte/ethen-ethylen-62426073680/preise.htm>. (19.08.2013)
- [19] ecoinvent Centre (2013):. ECOINVENT: v3. Dübendorf, Schweiz.
- [20] Schmitz, Stefan; Paulini, Inge (1999): Bewertung in Ökobilanzen. Methode des Umweltbundesamtes zur Normierung von Wirkungsindikatoren, Ordnung (Rangbildung) von Wirkungskategorien und zur Auswertung nach ISO 14042 und 14043. Hg. v. Umweltbundesamt. Berlin.



## Soll-/Ist-Vergleich

Die im Projektzeitplan (Abb.19) enthaltenen Meilensteine sind in Tabelle 3 als Soll-/Ist-Vergleich aufgeführt.

| Partner    | Aufgabe | Jahr 1 |  |    |     | Jahr 2 |  |  |     | Jahr 3 |  |  |  |
|------------|---------|--------|--|----|-----|--------|--|--|-----|--------|--|--|--|
| P1:<br>WWU | 1.1     |        |  |    |     |        |  |  |     |        |  |  |  |
|            | 1.2     |        |  | M1 |     |        |  |  |     |        |  |  |  |
|            | 1.3     |        |  |    |     |        |  |  |     |        |  |  |  |
|            | 1.4     |        |  |    |     | M2     |  |  |     |        |  |  |  |
|            | 1.5     |        |  |    |     |        |  |  | M3  |        |  |  |  |
|            | 1.6     |        |  |    |     |        |  |  | M4  |        |  |  |  |
|            | 1.7     |        |  |    |     |        |  |  | M5  |        |  |  |  |
| P2:<br>PHY | 2.1     |        |  |    |     |        |  |  | M6  |        |  |  |  |
|            | 2.2     |        |  |    | M7  |        |  |  |     |        |  |  |  |
|            | 2.3     |        |  |    |     |        |  |  |     |        |  |  |  |
|            | 2.4     |        |  |    |     |        |  |  | M8  |        |  |  |  |
|            | 2.5     |        |  |    |     |        |  |  |     |        |  |  |  |
| P3:<br>TUM | 3.1     |        |  | M9 |     |        |  |  |     |        |  |  |  |
|            | 3.2     |        |  |    |     |        |  |  |     |        |  |  |  |
|            | 3.3     |        |  |    | M11 |        |  |  | M10 |        |  |  |  |
|            | 3.4     |        |  |    |     |        |  |  | M12 |        |  |  |  |

Abb. 19. Projektzeitplan mit Meilensteinen

Alle angestrebten Arbeiten konnten erfolgreich durchgeführt werden. Die Skalierung der Kultivierung auf größere Volumina wurde nicht durchgeführt, da das Produkt der Zellkultur und deren Produktionsrate zunächst weiter verbessert werden sollen.

Es gab keine Abweichung zu den geplanten Arbeiten (Tab. 1).

**Tabelle 3: Soll-/Ist-Vergleich der Meilensteine. Bis zum Statusseminar zu erreichende Meilensteine sind grau hinterlegt.**

| Meilenstein | Monat | Soll   | Ist  |
|-------------|-------|--|--|
| M1          | 6     | geeignete <i>T. koksaghyz</i> Linien identifiziert, Allergenfreiheit mittels Antigen-Test erneut überprüft | zwei <i>T. koksaghyz</i> und einen <i>T. brevicorniculatum</i> mit hohem Kautschukgehalt (>30% dry rubber content) identifiziert; Antigen-Test negativ |
| M2          | 12    | Naturlatex aus Pflanzen aufgereinigt und Eignungsprüfung zur Herstellung von Latexfilmen                   | 1 L Latexsuspension aus Pflanzen an Synthomer Deutschland GmbH geliefert, Latexfilme erzeugt   |
| M3          | 18    | Kautschuk-produzierende Zellkulturen im Kleinmaßstab etabliert   | Zellkulturen etabliert, Schlüsselenzymexpression nachgewiesen, Anreicherung von Polyisopren nachgewiesen   |
| M4          | 27    | Latex/Kautschuk-produzierende Laticiferenkultur im Großmaßstab etabliert                                   | Kultivierung bis 1L durchgeführt   |

|     |    |  |   |
|-----|----|--|---|
| M5  | 27 | Verfahren zur Gewinnung von Latex aus Zellkultur etabliert   | Verfahren mit mechanischem Aufschluss und Separation mittels Zentrifugation erstellt  |
| M6  | 27 | Syntheseleistung der Zellkultur durch Metabolic Engineering verbessert   | Hydroxymethylglutaryl-CoA Reduktase überexprimierende Taraxacum-Pflanzen mit ZK Konstrukten transformiert, Erhöhung des Polyisoprengehalts um das 17-fache durch Vorstufen-Fütterung mit Mevalonat            |
| M7  | 12 | Bekanntes/vorhandene Wertstoffe/Gene/Enzyme bzgl. ihres Zusatzpotenzials analysiert                            | Analyse jeweils mehrere Isoformen der Enzyme Hydroxymethylglutaryl-CoA Synthase, Hydroxymethylglutaryl-CoA Reduktase  |
| M8  | 27 | Neue Wertstoffe/Gene/Enzyme identifiziert  | Niedermolekulare Terpene mit hohem Wertschöpfungspotenzial ermittelt  |
| M9  | 6  | Qualitätsbestimmung der Linien von Partner 1 durchgeführt  | Mittels $^{13}\text{C}$ - und $^1\text{H}$ NMR Analysen cis-1,4-Polyisopren in Reinheiten >95% nachgewiesen   |
| M10 | 27 | Metabolitprofile der unterschiedlichen Kautschukproduzierenden Zellkulturen                                    | Hauptkomponenten identifiziert und quantifiziert  |
| M11 | 12 | Synthese von $^{13}\text{C}$ -markierten Metaboliten   | $^{13}\text{C}$ -markierte 1-Deoxyxylulose im Gramm-Maßstab synthetisiert   |
| M12 | 27 | Metabolische Flusskarten zum Verständnis der Synthesewege von Naturkautschuk in den verschiedenen Zellkulturen | Markierungsexperimente mit $^{13}\text{CO}_2$ an Pflanzen und $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$ mit Zellkulturen durchgeführt. Markierungsmuster in Polyisopren bestimmt. Mevalonatweg identifiziert |
| M13 | 14 | Statusseminar mit anschließender Evaluierung   | Statusbericht angefertigt   |

## **Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen**

Zurzeit gibt es kein Verfahren zur Herstellung von allergiefreiem Naturlatex/-kautschuk aus *H. brasiliensis*. Somit fällt es schwer, wie auch im Kapitel zur Ökoeffizienzanalyse angedeutet, eine vergleichende Betrachtung tatsächlicher alternativer und konkurrierender Verfahren und Produkte durchzuführen. Dennoch kann angeführt werden, dass der aktuelle Naturkautschuk-Preis ein Rekordniveau erreicht hat. In 1998 kostete ein Kilogramm Naturkautschuk 1,20 Euro während der Preis heute um ein Vielfaches höher liegt. Ende 2010 wurde die Rekordmarke von über 3,50 Euro pro Kilogramm erreicht. Besonders im letzten Jahrzehnt zeichnet sich ein sehr deutlicher Preisanstieg ab. Alleine in 2008 hat sich der Preis für Naturkautschuk um 111% erhöht. Grund für den steigenden Preis sind Angebotsausfälle sowie die stetig steigende Nachfrage.

Die Verfügbarkeit von Hevea-Kautschuk nimmt stetig ab, aufgrund von weniger Beschäftigten und der Konkurrenz mit anderen Anbaupflanzen wie beispielsweise der Ölpalme. Die Hauptabnehmer von Naturkautschuk sind China, die USA, Deutschland, Japan und Frankreich. In der Volksrepublik China beispielsweise steigt der Naturkautschuk-Verbrauch bedingt durch die boomende Automobil- und Reifenindustrie drastisch an. Um diesen gesteigerten Bedarf zu decken investiert China verstärkt in die Erweiterung von Anbauflächen, besonders in Laos, Myanmar und Kambodscha. Insgesamt heißt dies, dass durch den erhöhten Bedarf an Naturkautschuk die Produktion und Verfügbarkeit von Naturlatexsuspensionen abnehmen wird und Alternativen dringend erforderlich sind. Die Preissteigerung des Naturlatex/-kautschuks relativiert die im Antrag prognostizierten Kosten von ca. 5-6 €/kg für Latex/Kautschuk aus einer Laticiferen-Zellkultur erheblich, so dass eine Marktfähigkeit in jedem Fall gegeben sein wird. Dieses wird auch bereits jetzt durch die Anfragen seitens der Industrie deutlich. Zudem muss berücksichtigt werden, dass der Naturkautschuk aus *T. koksaghyz* allergen-frei ist und somit auf den Weltmärkten ein Alleinstellungsmerkmal haben sollte.

## **Diskussion der Abweichungen im Vergleich zum Antrag**

Die im Antrag vorgesehene Anzucht der Zellkultur im Großmaßstab (P1.5) wurde bisher nicht durchgeführt, da die Synthese ausreichender Mengen hoch-polymeren Naturkautschuks mit der Zellkultur noch nicht hinreichend gegeben war. Um Ressourcen zu schonen, wurde daher von der Anzucht im 100 L Maßstab bisher

abgesehen. Stattdessen wurde intensiv in die Optimierung der Kautschuksynthese im Labormaßstab investiert (P1.7). Die Prozessierung größerer Mengen Zellkultur zur Latexgewinnung (P1.6) wurde demzufolge ebenfalls zunächst zurückgestellt, jedoch konnte der Prozess zum Aufschluss und zur Separation von Latex erstellt werden.

Aufgrund der noch geringen Kautschuk-Ausbeuten der erzeugten Zellkulturen wurden die geplanten Arbeiten zur Latex-Optimierung (AP2.4) zugunsten der anderen verfolgten Ansätze zurückgestellt. Die im Antrag geplante Markierung mit  $^{13}\text{C}$ -Desoxyxylulose wurde zurückgestellt, um die wertvolle Verbindung aufzusparen, bis eine hochproduzierende Laticiferenkultur zur Verfügung steht. Das entsprechende Arbeitspaket wurde durch aufwändige Experimente mit  $^{13}\text{CO}_2$  an ganzen Pflanzen von *T. brevicorniculatum* ergänzt, das uns vergleichbare Befunde zur Synthese von cis-Polyisopren geliefert hat.

Zur anwendungstechnischen Charakterisierung des Latex aus *T. koksaghyz* wurde nicht wie im Antrag vorgesehen der Partner DEWECO Dr. Wüsthoff & Co. sondern die Synthomer Deutschland GmbH als Kooperationspartner eingebunden. Die Synthomer Deutschland GmbH (ehemals PolymerLatex) mit Sitz in Marl ist weltweit führend auf dem Gebiet der Herstellung von synthetischen Latex- und Naturlatexdispersionen und -produkten. Sie ist damit ein geeigneterer Partner als Primärabnehmer für den Rohlatex aus Zellkulturen als ein Endprodukthersteller wie die DEWECO.

### **Kooperation innerhalb des Projektes**

Die Kooperation zwischen den Projektpartnern ist sehr gut und es findet eine regelmäßige Abstimmung per Telefonkonferenz und Email statt. Der Material- und Wissenstransfer verläuft dadurch reibungslos. Das Engagement der Projektpartner an gemeinschaftlich zu bearbeitenden Arbeitspaketen ist hoch und führte immer zu schnellen Fortschritten. Über die Projekttreffen am 06.07.2010 in Köln, 10.01.2011 im Vorfeld des Kick-off Meetings in Osnabrück, 26.07.2011 in Köln, 23.07.2012 Garching und 09.04.2013 in Köln hinaus kam es zu regelmäßigen Besuchen einzelner Mitarbeiter bei den verschiedenen Partnern, um vor Ort einen Einblick in die Arbeiten in den Laboren zu erhalten. Ebenso erfolgreich und unkompliziert verläuft die Zusammenarbeit mit dem Kooperationspartner Synthomer Deutschland GmbH (Frau Dr. Alexandra Abele) und dem Unterauftragnehmer für die

Ökoeffizienzanalyse, der ifu Hamburg GmbH (Herr Tobias Brinkmann, Frau Mieke Klein).

### Präsentationen/Patente

Das Projekt LaKaZell wurde bei verschiedenen Veranstaltungen und in den Medien präsentiert:

06.07.2010, FESPB, Valencia, Spanien

24.10.2010, CLIB Forum, Düsseldorf

15.11.2010, Seminarvortrag, Konstanz

24.05.2011, TerpNet-Tagung, Kalmar, Schweden (bestes Poster von 180 Beiträgen)

26.05.2011, Deutsche Biotechnologietage, München

21.09.2011, Botanikertagung, Berlin

10.10.2011, Deutsch-Russischer Workshop Biotechnica, Hannover

29.07.-03.08.2012, Freiburg FESPB Kongress

28.10.2012, BioRubber2012, Wageningen, Niederlande

01.-05.06.2013, TerpNet Meeting, Kreta, Griechenland

25.09.2013, PlantLink Day, Lund, Schweden

### Publikationen

Folgende Publikationen sind aus dem Projekt hervorgegangen:

- Janina Post, Wolfgang Eisenreich, Claudia Huber, Richard M. Twyman, Dirk Prüfer, Christian Schulze Gronover (2013). **Establishment of an *ex vivo* laticifer cell suspension culture from *Taraxacum brevicorniculatum* as a production system for *cis*-isoprene.** J. Mol. Catal. B: Enzym. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.07.013>
- Katrin Schullehner, Peter Welters, Guido Jach (2013). **Pflanzliche Enzyme für die Synthetische Biologie.** BIOSpektrum, Volume 19, Issue 2, pp 214-215 DOI:10.1007/s12268-013-0293-1
- Wolfgang Eisenreich, Claudia Huber, Erika Kutzner, Nihat Knispel, Nicholas Schramek (2013). **Isotopologue Profiling – Towards a better understanding of metabolic pathways.** In The Handbook of Plant Metabolomics (Wolfram Weckwerth and Günther Kahl, Eds.). Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Germany, pp. 25-56.