

# Neue Wege in der Weißen Biotechnologie

Dirk Tischler<sup>1</sup>, Michel Oelschlägel, Juliane Zimmerling, Michael Schlömann

Mikroorganismen sind in der Lage, zahlreiche Xenobiotika abzubauen. Dazu nutzen sie unter aeroben Bedingungen oft einleitend Oxygenasen. Durch diese kann molekularer Luftsauerstoff aktiviert und auf organische Moleküle, wie Phenol oder Naphthalen, übertragen werden. Danach können diese Verbindungen in den Metabolismus der Mikroorganismen eingeschleust und teils oder vollständig abgebaut werden. Am Beispiel des Styrols zeigen wir hier eine solche Abbauroute und wie man diese biotechnologisch nutzen kann, um interessante Verbindungen zu synthetisieren. Zielmoleküle der gesamten Enzymkaskade sind dabei diverse Phenyllessigsäuren.

Weißer Biotechnologie (*White Biotechnology*), Mikrobieller Styrolabbau (*microbial styrene degradation*), Enzymkaskade (*enzyme cascade*), Phenyllessigsäure (*phenylacetic acid*)

Styrol (Styren, Phenylethen) gehört zu den am meisten produzierten und umgesetzten Chemikalien. Es findet hauptsächlich Anwendung in der Polymersynthese. Neben anthropogener Freisetzung infolge seines industriellen Einsatzes als Material kommt Styrol auch natürlicherweise in Pflanzen oder in deren Zersetzungsprodukten vor. Somit kann man festhalten, dass Styrol ubiquitär vorhanden, aber laut zahlreicher Studien nicht persistent ist [1]. Es findet also immer ein Abbau statt. Bereits in den 1970er-Jahren wurden Mikroben mit der Fähigkeit zum Abbau von Styrol beschrieben. In den folgenden Jahren wurden mehr Details zum Styrolabbau bekannt. Verschiedene Bakterienarten aktivieren Styrol mit Hilfe von Dioxygenasen am aromatischen Ring und setzen es unspezifisch weiter über unterschiedliche Abbauelemente des Ringes um. Es gibt jedoch auch einen Styrol-spezifischen Weg, der zum zentralen Metaboliten Phenyllessigsäure führt [1]. Diese kann dann weiter in Intermediate des Tricarbonsäurezyklus umgesetzt werden.

Nachfolgend werden die initialen Enzyme des spezifischen Abbauelementes für Styrol näher beschrieben. Zugleich wird gezeigt, wie man diese im Zuge einer Kaskade von Reaktionsschritten zur Synthese

industriell relevanter Derivate der Phenyllessigsäure nutzen kann. Diese Verbindungen verkörpern wichtige Aroma- und Duftstoffe, Synthesebausteine bzw. schon selbst pharmakologisch wirksame Substanzen. Darüber hinaus ist auch die separate Nutzung der einzelnen Enzyme zur Synthese von relevanten Verbindungen möglich.

## Enzyme des aeroben Styrolabbaus

Das erste Enzym der aeroben Kaskade ist die Styrol-Monooxygenase (SMO; EC 1.14.14.11) [1, 2]. Diese besteht aus zwei Einheiten, wobei die Reduktaseeinheit StyB reduziertes Flavin-Adeninucleotid (FAD) unter Verbrauch von Nicotinamid-Adeninucleotid (NADH) bereitstellt. Dieses wird mittels Diffusion auf die zweite Einheit StyA übertragen und durch ein radikalisches Intermediat molekularer Sauerstoff aktiviert sowie ein Peroxid-FAD-Intermediat erzeugt, das die Epoxidierung von Styrol erlaubt. Da die Bindungstasche des StyA in Kombination mit dem FAD-Intermediat eine chirale Einheit bildet, ist der Umsatz des Styrols enantioselektiv, und es wird hauptsächlich (S)-Styroloxid gebildet. Neben Styrol können auch zahlreiche seiner Derivate epoxidiert sowie aromatische Sulfide sulfoxidiert werden [2, 3]. Alle diese Reaktionen sind enantioselektiv. Diese Selektivität und das breite Substratspektrum machen SMO zu gefragten Katalysatoren in der chemischen Synthese. Kürzlich konnten wir zeigen, dass das Hilfsprotein StyB durch das chemische Reduktionsmittel 1-Benzyl-1,4-Dihydroxycotinamid (BNAH) ersetzt und so FAD direkt an StyA reduziert werden kann [3]. Dies erlaubt viel höhere Umsatzraten und ermöglicht effizientere katalytische Prozesse in einem Maßstab von bis zu 100 mg.

Das gebildete Styroloxid kann dann von der Styroloxid-Isomerase (SOI; EC 5.3.99.7) intramolekular zu Phenylacetaldehyd isomerisiert werden [1, 4]. Das Enzym ist klein, unabhängig von Cofaktoren, äußerst stabil, hochaktiv und wegen seiner Membran-Struktur unter Anwendung spezieller, patentierter Verfahren leicht anzureichern. Alle diese Faktoren machen es zu einem besonders interessanten Biokatalysator. So kann man die SOI nutzen, um aus kostengünstigen racemischen

Epoxiden reine Phenylacetaldehyde zu generieren. Diese sind wiederum wichtige Bausteine für Pharmaka sowie selbst auch Aroma- und Duftstoffe [5, 6]. So konnte in einem wässrigen System mit der SOI aus *Rhodococcus opacus* 1CP ein Produkt titer von fast 10 g l<sup>-1</sup> generiert werden (entspricht ca. 75% Ausbeute). Im Zuge dieser Untersuchungen wurde die SOI auch auf feste Träger aufgebracht und gebunden [5]. Diese Immobilisierung ermöglicht eine bessere Abtrennung des Biokatalysators vom Reaktionsmedium und stabilisiert das Enzym in Gegenwart von organischen Phasen. Für die SOI etablierten wir erstmals ein biotechnologisches Zweiphasen-System aus einem Puffer und dem nicht-toxischen Phthalat-ähnlichen 1,2-Cyclohexan-Dicarboxylsäurediisonyl-ester (Hexamol DINCH). Hierzu war es besonders wichtig, eine umweltverträgliche und nicht-toxische organische Phase auszuwählen. Und dies ist mit dem Hexamol DINCH gelungen, da diese Verbindung z. B. als nicht-toxischer Weichmacher in Kinderspielzeug verwendet wird und sich daher auch besonders für unsere Anwendung in der Aromastoffsynthese eignet.

Den letzten Schritt der Styrolabbau-Kaskade katalysiert die Phenylacetaldehyd-Dehydrogenase (PAD; EC 1.2.1.39) [7]. Hier wird der Aldehyd in einer nicht-reversiblen Reaktion unter Reduktion von NAD zu NADH umgesetzt. Dabei wird Wasser verbraucht und Phenyllessigsäure gebildet. Diese Klasse von Enzymen besitzt zwei Domänen. Eine ist für die Bindung und Umsetzung des Co-Substrats NAD notwendig und bei allen Dehydrogenasen konserviert; die zweite ist für die eigentliche Substratbindung und -umsetzung nötig. Ihre Faltung ist höchst spezifisch, wodurch auch das Substratspektrum der PAD eingeschränkt wird. Dies erlaubt somit nur die Umsetzung Phenylacetaldehyd-analoger Verbindungen. Der detaillierte Wirkmechanismus dieser Enzyme ist noch nicht aufgeklärt. Wir versuchen im Rahmen detaillierter Studien zu verschiedenen PAD Licht in dieses Dunkel zu bringen.

## Funktionelle Annotation von Biokatalysatoren

Dank der oben aufgeführten, bereits charakterisierten Enzyme können wir nun

<sup>1</sup> AG Umweltmikrobiologie, Interdisziplinäres Ökologisches Zentrum (IÖZ), TU Bergakademie Freiberg, Leipziger Str. 29, Freiberg; Tel. 03731-39-4153, Fax 03731-39-3012, Dirk-Tischler@email.de

eine Verbindung zwischen der Funktion und der ihr zugrunde liegenden genetischen Information herstellen. Dies erlaubt es zukünftig, über Sequenzdaten geeignete Enzyme und damit Biokatalysatoren bzw. sogar ganze Prozesskaskaden zu identifizieren und deren Eigenschaften vorherzusagen. Dies haben wir bisher speziell bei SMO und SOI genutzt und so schon zahlreiche neue Biokatalysatoren gewonnen. Zu den in diesem Zusammenhang untersuchten Bakterienstämmen gehören u. a. *Rhodococcus opacus* 1CP, *Gordonia rubripertincta* CWB2 oder *Sphingopyxis fribergensis* Kp5.2. Derzeit werden diejenigen Vertreter, die sich am besten für eine synthetische Route eignen, detailliert untersucht. In erster Linie werden diese Untersuchungen auf der Basis von Ganzzell-Systemen durchgeführt.

### Produktion von Phenylelessigsäuren über eine Enzymkaskade

Styrol kann unter Einwirkung der o.g. Enzyme zu Phenylelessigsäure umgesetzt werden [1, 8]. Die dabei ablaufende natürliche Kaskade enzymkatalysierter Schritte wird „oberer Styrolabbauweg“ genannt. Die entstandene Phenylelessigsäure wird normalerweise weiter metabolisiert. Die Kaskade ist unabhängig von zusätzlichen Cofaktoren (Abb. 1), da der NADH-Verbrauch durch die SMO infolge der NADH-Bildung der PAD kompensiert wird. Die SOI benötigt, wie bereits erwähnt, keine Cofaktoren. Jüngst konnten wir zeigen, dass über den „oberen Styrolabbauweg“ auch substituierte Styrole umgesetzt werden, aber nur bis zur Stufe der Phenylelessigsäure-Derivate [8]. Um dieses System aktiv zu halten, bedarf es lediglich einer kleinen, regelmäßigen Zugabe von Styrol für den Unterhalt des normalen Zellstoffwechsels. Dies eröffnet uns zahlreiche Möglichkeiten. So wurden einige Bakterienstämme (z. B. *Gordonia rubripertincta* CWB2, *Pseudomonas fluorescens* ST, *Rhodococcus opacus* 1CP, *Sphingopyxis fribergensis* Kp5.2) mit dieser Kaskade in Bezug auf den erzielbaren Umsatz substituiertes Styrole (u. a. halogenierter Styrole, 4-Isobutyl- $\alpha$ -Methylstyrol) getestet. So wächst zum Beispiel *Pseudomonas fluorescens* ST sehr gut auf Styrol, und man kann dadurch viel Biomasse und damit reichlich Ganzzellbiokatalysatoren gewinnen. Anschließend Tests haben gezeigt, dass mit diesem Stamm eine Vielzahl von substituierten Phenylelessigsäure-Derivaten synthetisierbar ist. Diese Produkte werden nachfolgend im Medium angereichert, was

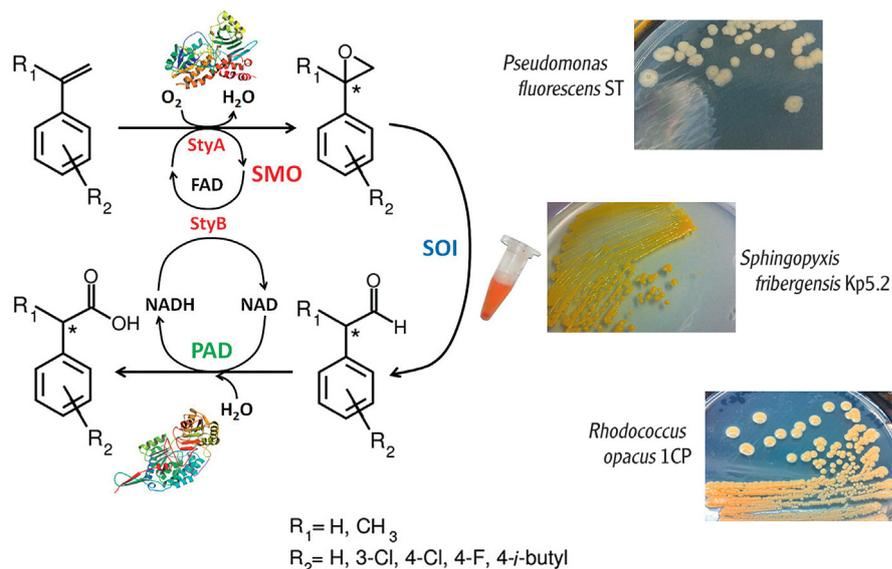


Abb. 1: Bakterien mit einem funktionellen Styrolabbauweg, wie *Rhodococcus opacus* 1CP und *Sphingopyxis fribergensis* Kp5.2, metabolisieren Styrol über Styroloxid und Phenylacetaldehyd zu Phenylelessigsäure, die dann weiter abgebaut werden kann. Daran sind die Enzyme Styrol-Monooxygenase (SMO), Styroloxid-Isomerase (SOI) und Phenylacetaldehyd-Dehydrogenase (PAD) beteiligt. Durch eine geeignete Substitution an Position R1 und/oder R2 werden die gebildeten Metabolite bzw. Phenylelessigsäuren nicht weiter oder lediglich in nur geringem Umfang weiter verstoffwechselt, wodurch sie sich im Medium anreichern und von dort abgetrennt werden können.

im Anschluss daran eine einfache Produktextraktion ermöglicht. Exemplarisch war es so möglich, über 350 Tage hinweg die Biotransformation von 4-Chlorstyrol mit Stamm ST durchzuführen und so einen Produkttiter von  $4.7 \text{ g l}^{-1}$  (87% Ausbeute) zu erzeugen. Auch der Stamm *Gordonia rubripertincta* CWB2 transformiert einige Styrole, wobei er als einziger nennenswerte Umsätze von 4-Isobutyl- $\alpha$ -Methylstyrol bewirkt. Das erhaltene Produkt 4-Isobutyl- $\alpha$ -Methylphenylelessigsäure, das unter dem Namen Ibuprofen besser bekannt ist, konnte so erstmals auf diese Weise dargestellt werden. Hier ist noch bemerkenswert, dass der Stamm CWB2 kein SOI-ähnliches Gen besitzt. Wir vermuten deshalb die Existenz eines alternativen, neuen Abbaupfades, den es jetzt aufzuklären gilt.

### Zusammenfassung

Auf Basis der hier präsentierten Erkenntnisse ist es möglich, die Gene und damit die Enzymaktivitäten von „Styrolabbauern“ vorherzusagen. Diese Erkenntnisse können nun gezielt genutzt werden, um durch biotechnologische Verfahren Styrole in pharmakologisch relevante Phenylelessigsäuren umzusetzen, u. a. auch zur Synthese von Ibuprofen. In zukünftigen Studien möchten wir diese Abbaupfade weiter in Bezug auf eine Steigerung der Produktivität optimieren. Zudem möchten wir das Prinzip der Identifizierung von

Biokatalysatoren weiter verfeinern, um noch weitere Syntheserouten für industriell relevante Verbindungen zu erschließen, wie beispielweise für Metallophore.

Danksagung: Wir bedanken uns bei der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) für die Förderung von Promotionsstipendien, durch welche die Untersuchung von Enzymen und deren Anwendung auf die hier gezeigte Weise ermöglicht wurde. Zudem danken wir dem Verein der Praxispartner des IÖZ der TU Bergakademie Freiberg für die Förderung des Sequenzierungsprojekts zu Stamm 1CP.

### Literatur

1. D. Tischler, S.R. Kaschabek (2012) In *Microbial Degradation of Xenobiotics*, Ed. by S.N. Singh, Springer, Berlin Heidelberg.
2. S. Montersino, D. Tischler, G.T. Gassner, W.J.H. van Berkel (2011) *Adv. Synth. Catal.* 353:2301-2319.
3. C.E. Paul, D. Tischler, A. Riedel, T. Heine, N. Itoh, F. Hollmann (2015) *ACS Catal.* 5:2961-2965.
4. M. Oelschlägel, J.A.D. Gröning, D. Tischler, S.R. Kaschabek, M. Schlömann (2012) *Appl. Environ. Microbiol.* 78:4330-4337.
5. M. Oelschlägel, A. Riedel, A. Zniszczoł, K. Szymańska, A.B. Jarzębski, M. Schlömann, D. Tischler (2014) *J. Biotech.* 174:7-13.
6. M. Oelschlägel, J. Zimmerling, M. Schlömann, D. Tischler (2014) *Microbiology* 160:2481-2491.
7. A. Ferrández, M.A. Prieto, J.L. García, E. Díaz (1997) *FEBS Lett.* 406:23-27.
8. M. Oelschlägel, S.R. Kaschabek, J. Zimmerling, M. Schlömann, D. Tischler (2015) *Bio-technol. Rep.* 6:20-26.