

Anhang zum Abschlussbericht

AZ 13191

Rekombinante Laccasen für die Feinchemie

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



Projektpartner:

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

Projektbeginn: 01.03.2007

Projektlaufzeit: 2 Jahre

Kostenneutrale Verlängerung bis 30.06.2009

Greifswald, 2009

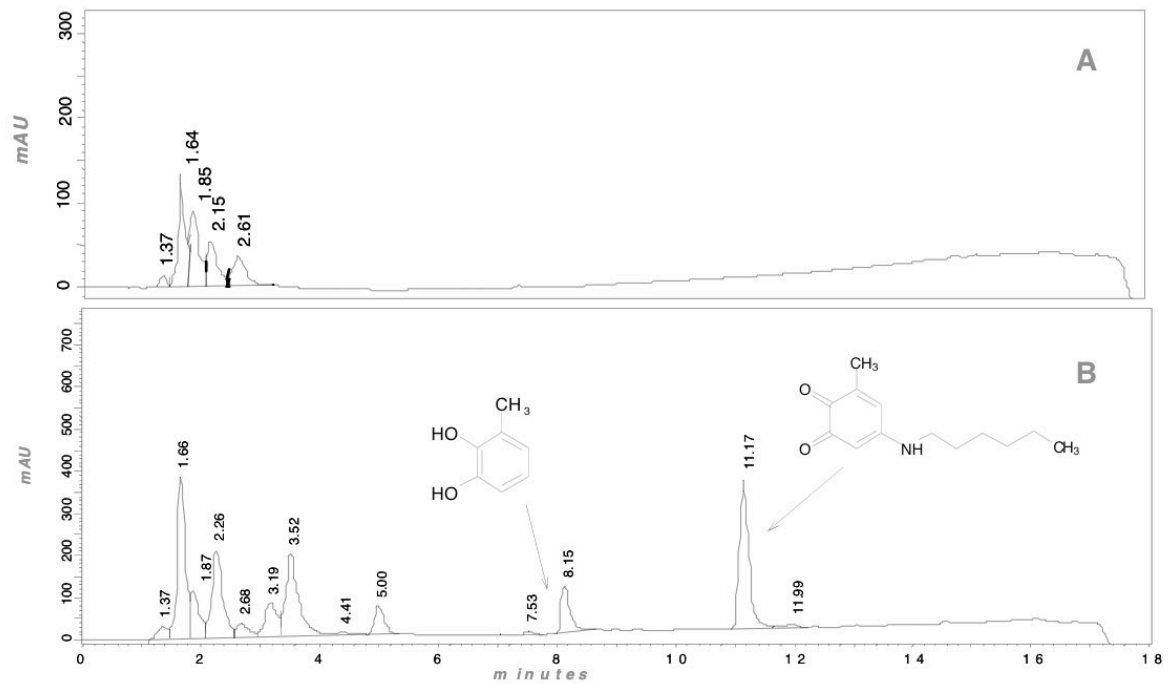


Abbildung 1: HPLC-Elutionsprofil des reinen Enzympräparates (A) und des CotA-vermittelten Umsatzes von 3-Methylbrenzkatechin mit *n*-Hexylamin nach 60 min Reaktionszeit (B).

Natriumborhydrid-Anwendung

Um zu bestätigen, dass das Produkt P1 eine Art Kopplungsprodukt zwischen dem vermutlich nicht vollständig deprotonierten Laccase-Substrat und dem *n*-Hexylamin darstellt, wurde die gereinigte, als Feststoff vorliegende, Zielverbindung (P2) einer reduktiven Behandlung mit Natriumborhydrid unterzogen. Die Wahl entfiel auf das Reduktionsmittel Natriumborhydrid, da dieses vor allem in der organischen Chemie als Hydrierungsmittel eingesetzt wird. Durch Mechanismen der Polarisierung der Bor-Wasserstoff-Bindung kann dieses als Hydridionen-Donator fungieren, wobei der Wasserstoff mit seinem Bindungselektronen übertragen wird. Somit entspricht es einem starken Nukleophil und reagiert sehr leicht mit Carbonylgruppen unter Reduktion dieser in den korrespondierenden Alkohol.

Die Reduktionsversuche mit dem sekundären Amin (Struktur gemäß P2) wurden mit definierten Mengen Natriumborhydrid in Methanol vorgenommen und unter Zufuhr thermischer Energie inkubiert. Nach bestimmten Reaktionszeiten wurde über Chromatographieversuche kontrolliert, ob die Bildung des aus der CotA-vermittelten Reaktion bekannten Produktes P1 erfolgte. Jedoch konnte trotz Minimierung der Farbintensität des gereinigten Stoffes P2 (rot) und des Auftretens anderer Produkte, keine Bildung des Produktes P1 oder des Laccase-Substrates 3-Methylbrenzkatechin in Gegenwart von Natriumborhydrid ersehen werden. Abschließend konnte die Struktur des Produktes P1 unter Anwendung der beschriebenen Methoden nicht näher erschlossen werden.

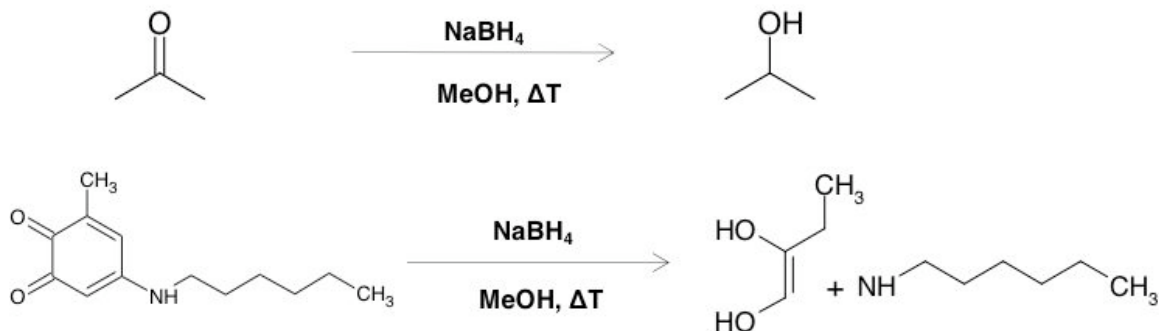


Abbildung 2: Reaktionsschema.

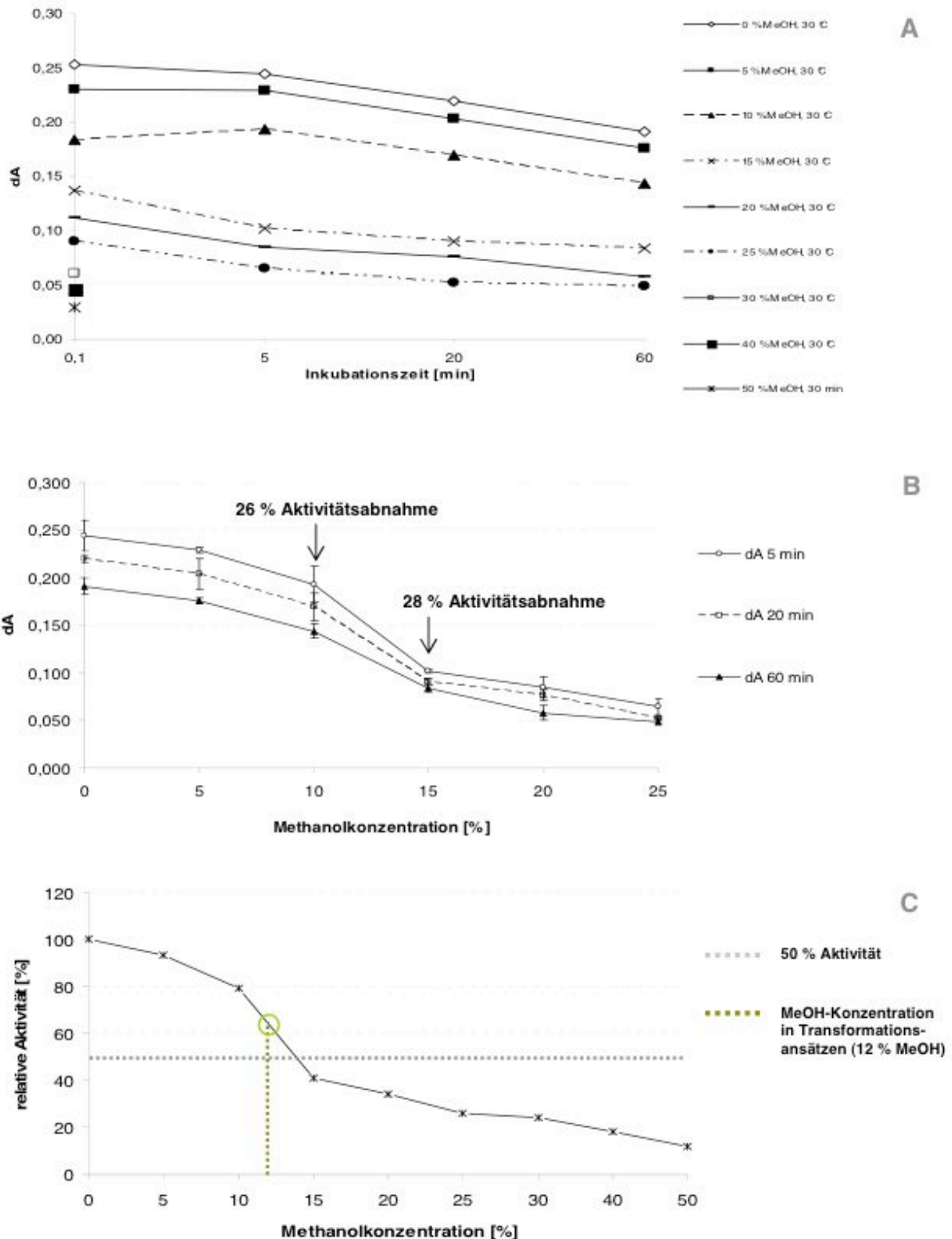


Abbildung 3: (A) und (B) Darstellung der Aktivitäts-Änderung in Abhängigkeit von der zugesetzten Methanolkonzentration (0% - 50% bzw. 0% - 25%) und der Inkubationszeit; (C) Darstellung der relativen Aktivitäten in Abhängigkeit von der Methanolkonzentration (0% bis 25% » dA nach 5 min Inkubation, 30% - 50% » dA nach ~ 10 sec Inkubation).

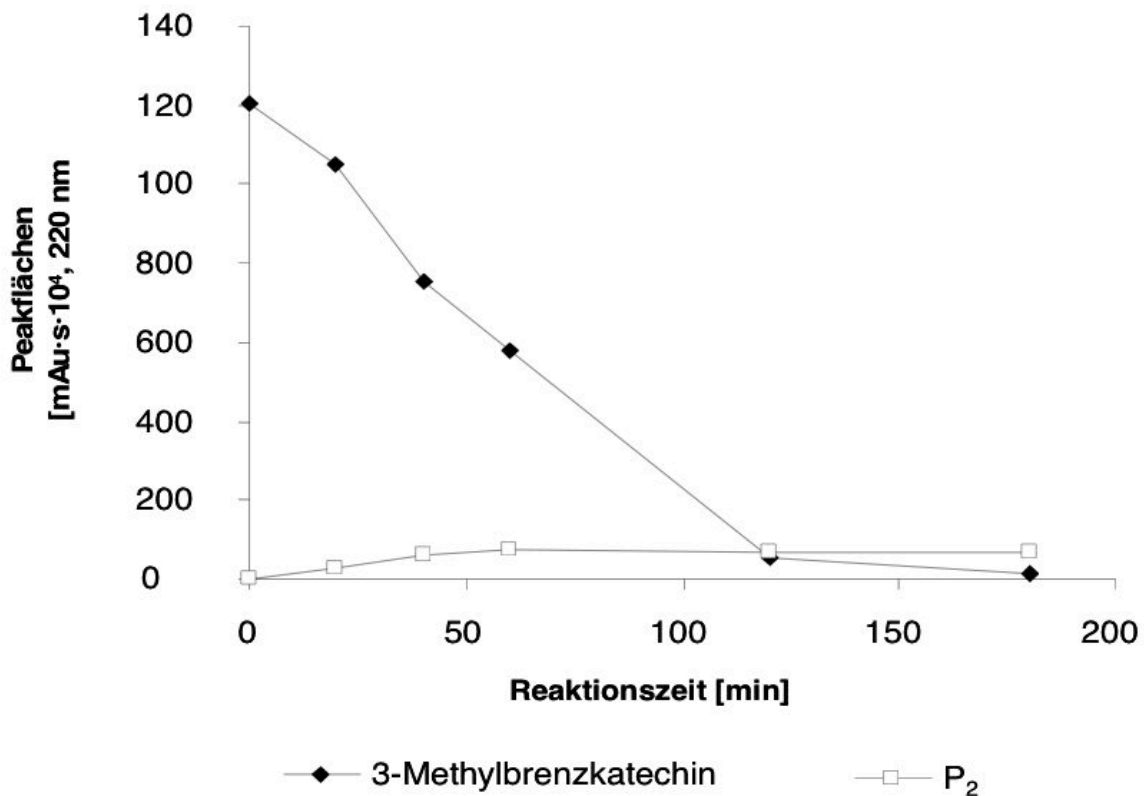
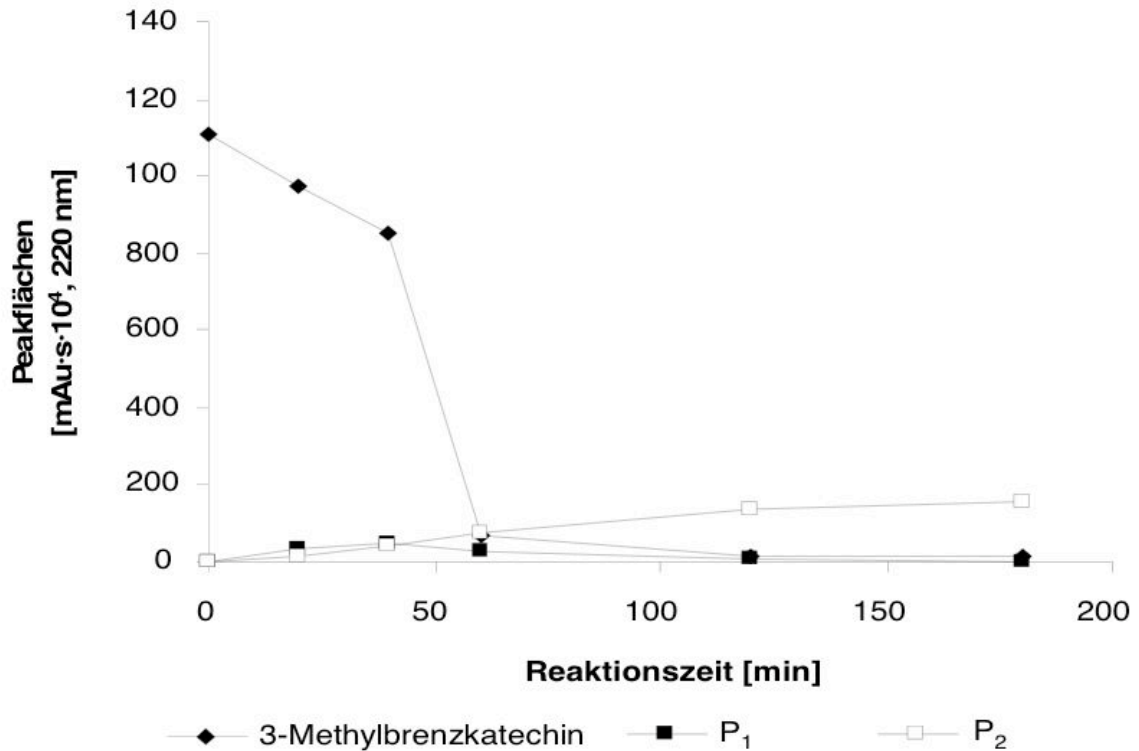


Abbildung 4: Darstellung der mittels HPLC-Analytik detektierten Peakflächen des Laccase-Substrates und der heteromolekularen Kopplungsprodukte in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an Enzympräparat. Oben: 200 mU mL⁻¹ rekombinante Laccase, Unten: 400 mU mL⁻¹ rekombinante Laccase.

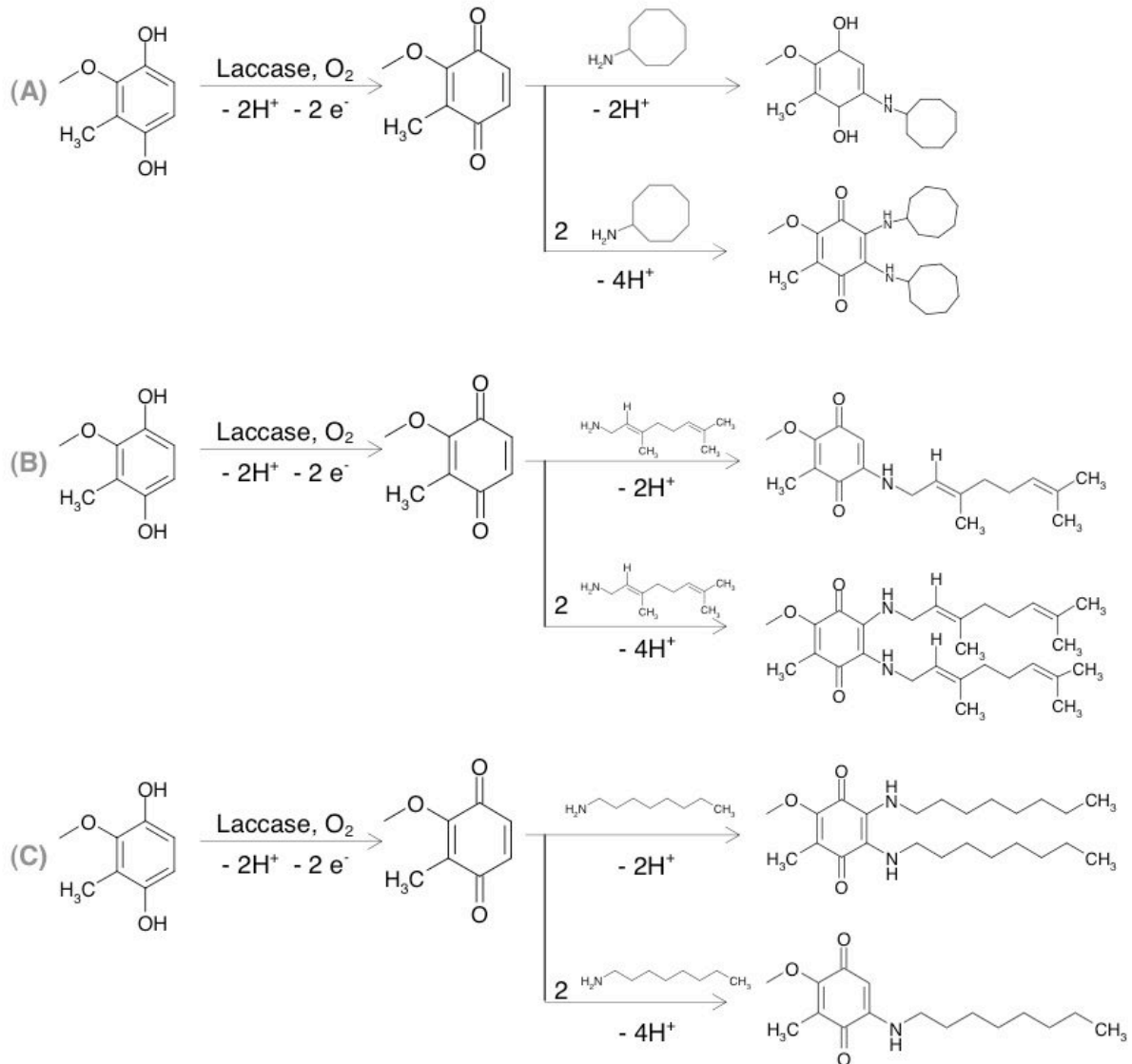


Abbildung 5: Darstellung der postulierten Strukturen der monoaminierten und diaminierten heteromolekularen Kopplungsprodukte der Laccase-vermittelten Reaktionen zwischen dem *para*-dihydroxylierten Laccase-Substrat 2-Methoxy-3-methylbenzendiol mit Cyclooctylamin (A), Geranylamin (B) und *n*-Octylamin (C).

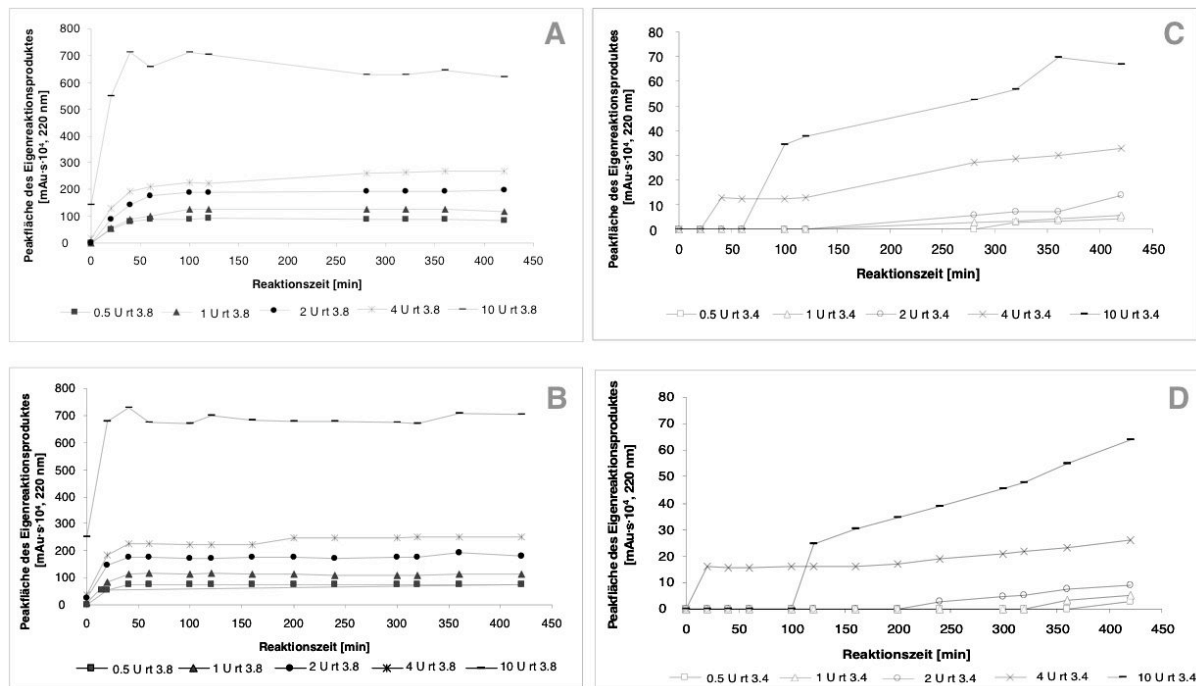


Abbildung 6: Graphische Darstellung der mittels HPLC-Analytik detektierten Peakflächen der Eigenreaktionsprodukte, welche nach 3,4 min und 3,8 min eluierten. Die Abbildungen A und B zeigen den Verlauf des Eigenreaktionsproduktes mit einer Retentionszeit von 3,8 min in äquimolarer Konzentration der Reaktanden (oben), sowie mit *n*-Hexylamin im Überschuss (unten). Auf der rechten Seite ist das Eigenreaktionsprodukt rt 3,4 min im Verlauf der Inkubationszeit in einem äquimolarem Edukt-Verhältnis (C) bzw. mit überschüssigem aliphatischem Amin (D) dargestellt.

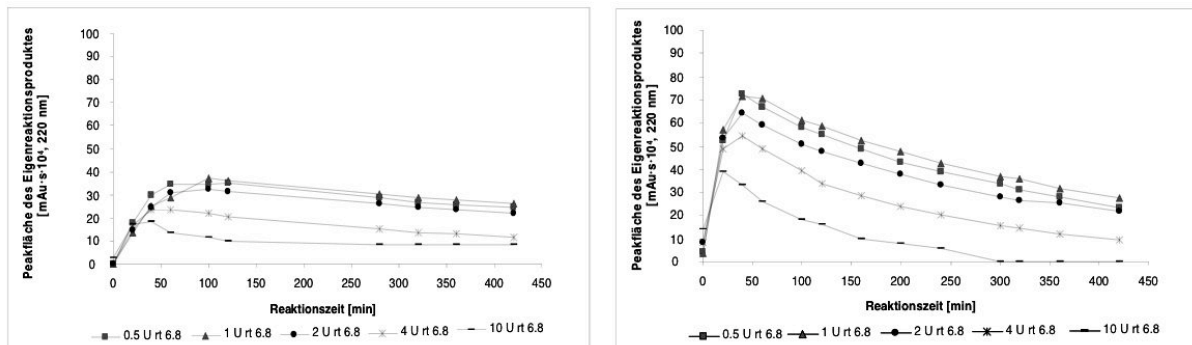


Abbildung 7: Darstellung der Peakflächen des Reaktionsproduktes mit einer Retentionszeit von 6,8 min in einem äquimolaren Reaktionsansatz (links) und mit *n*-Hexylamin in 5 mM Konzentration in Abhängigkeit der eingesetzten Enzymaktivität.

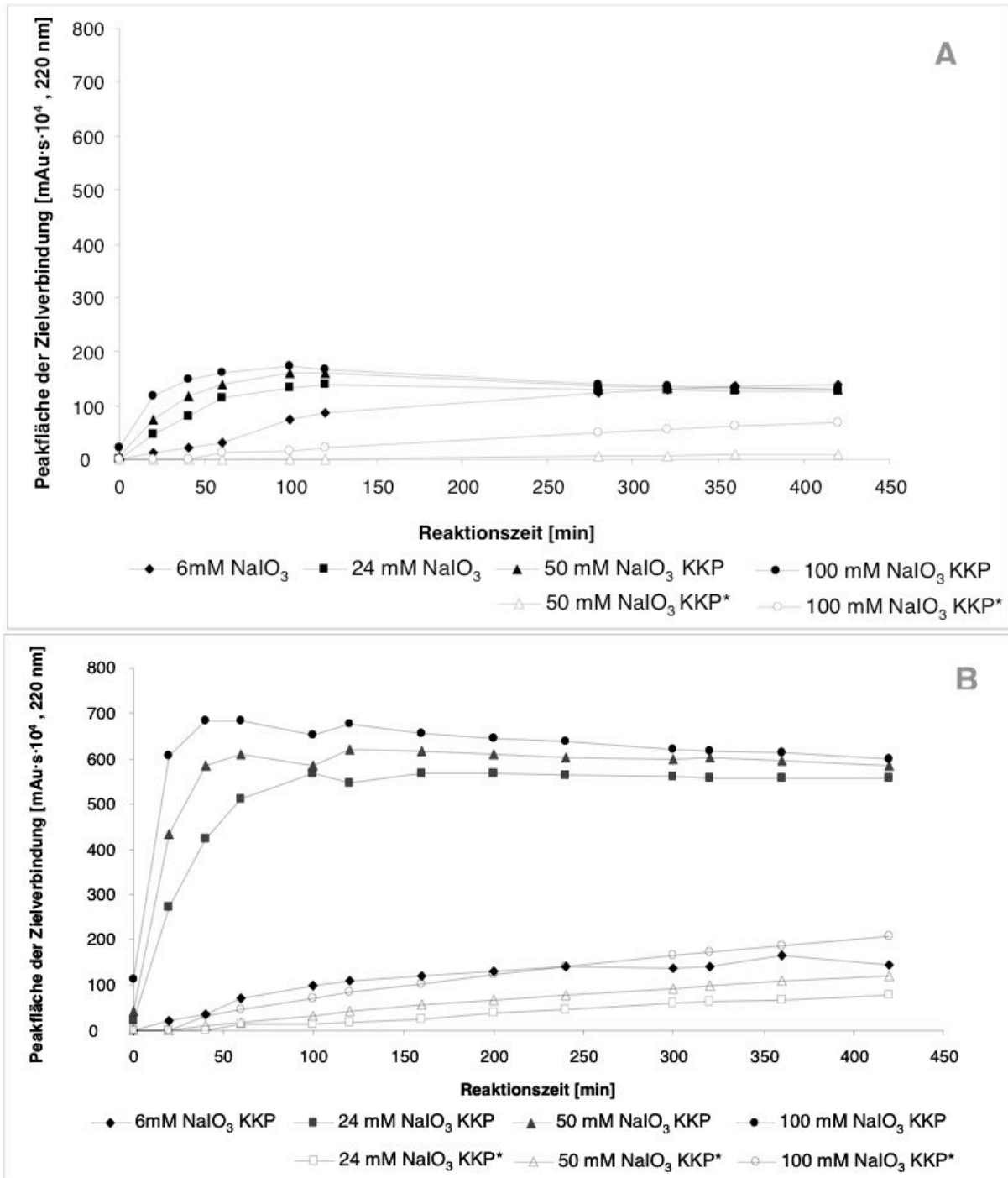


Abbildung 8: Graphische Darstellung der mittels HPLC-Analytik detektierten Peakflächen des Syntheseproduktes der Natriumiodat-katalysierten Modellreaktion II in Abhängigkeit der eingesetzten Natriumiodat-Konzentration und der Molaritäten (A: äquimolares Verhältnis, B: *n*-Hexylamin im Überschuss der Reaktionspartner).

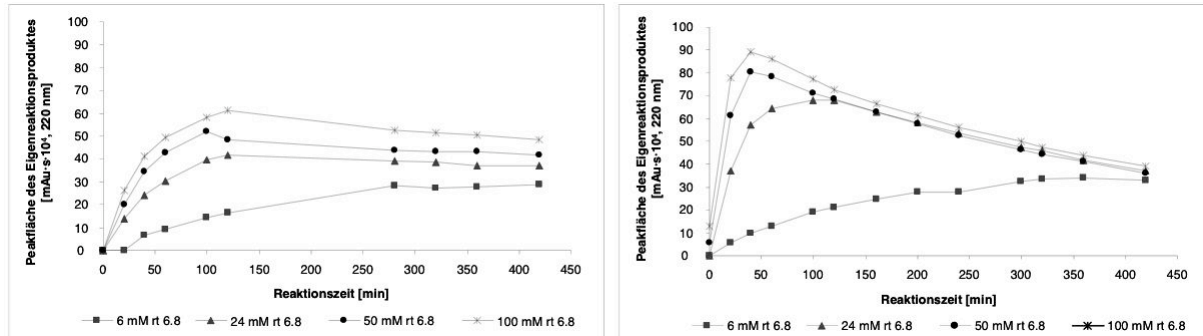


Abbildung 9: Verlauf des Reaktionsproduktes rt 6,8 min in Abhängigkeit der Molarität der Edukte (links: äquimolarer Reaktionsansatz, rechts: *n*-Hexylamin im Überschuss) und der Konzentration an Natriumiodat.

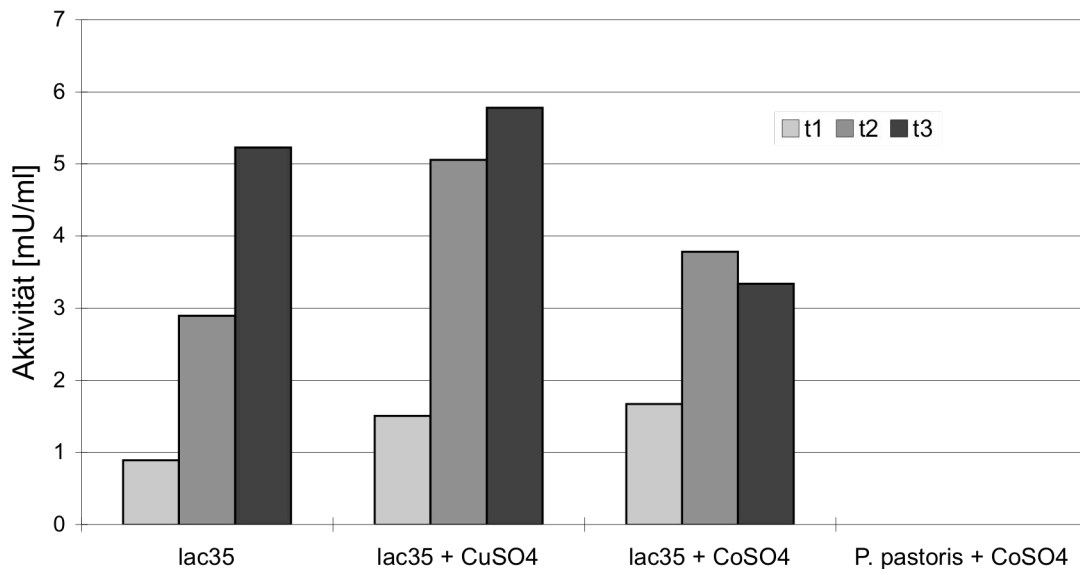


Abbildung 10: Einfluss von Cobalt- und Kupferionen-Zugabe zum Medium zur Expression der rekombinanten Laccase aus *Pycnoporus cinnabarinus* (lac35) in *Pichia pastoris*. Als Kontrolle diente eine *Pichia pastoris* ohne integriertes Laccase-Gen, sowie eine Kultivierung ohne Zugabe von Cobalt- bzw. Kupferionen.

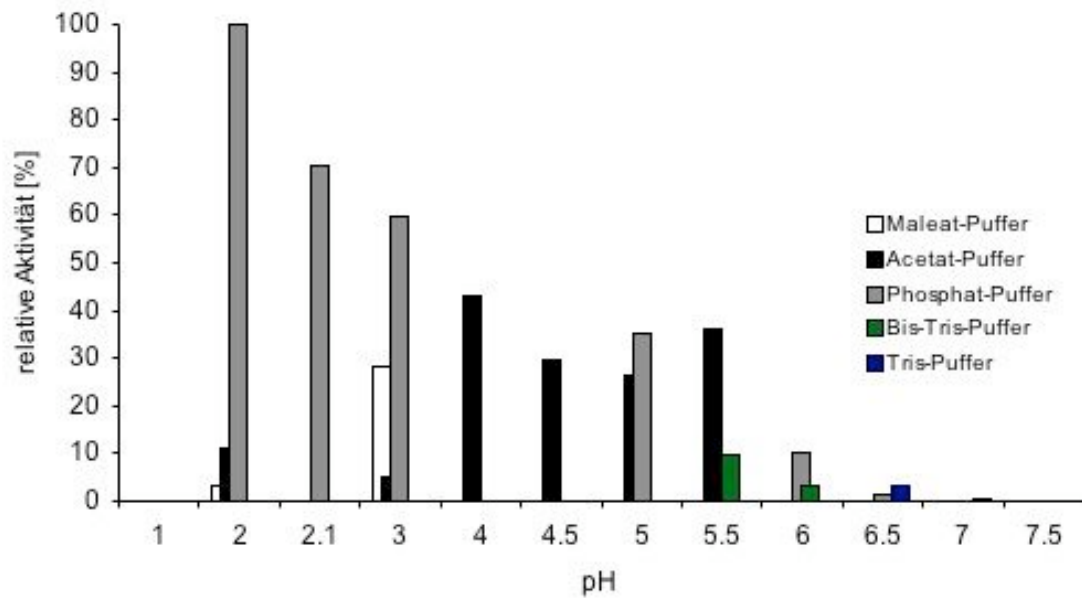


Abbildung 11: pH-Profil von *Trametes versicolor* Laccase (TvL), direkt aus dem Pilz gewonnen.

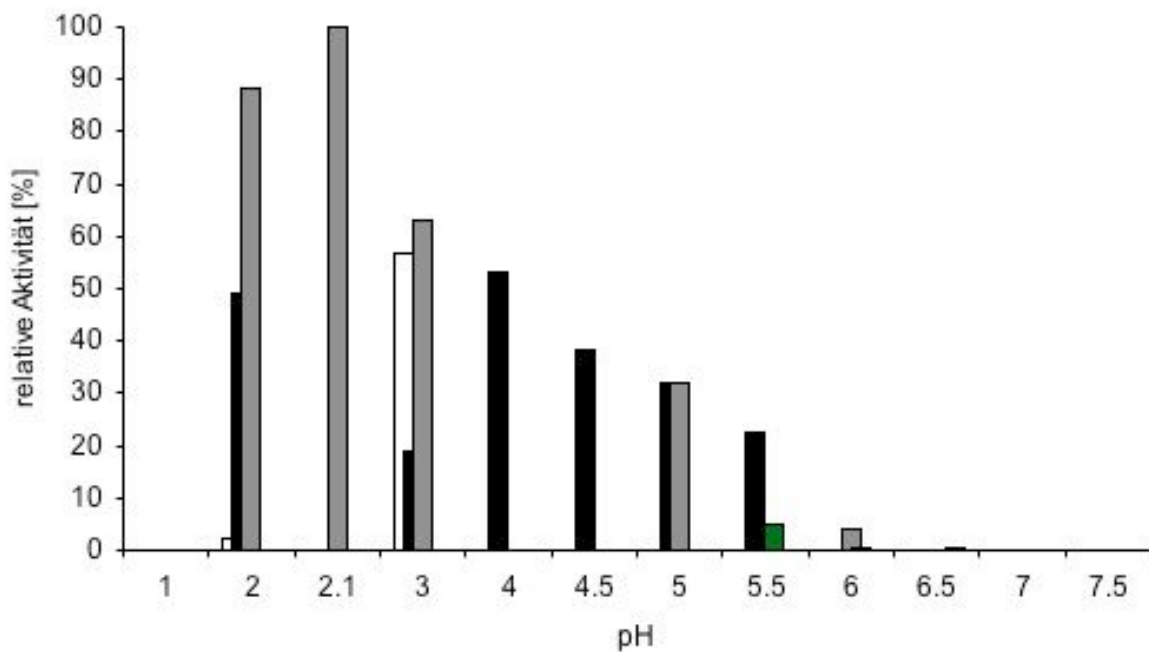


Abbildung 12: pH-Profil der rekombinanten *Trametes versicolor* Laccase (lac5).

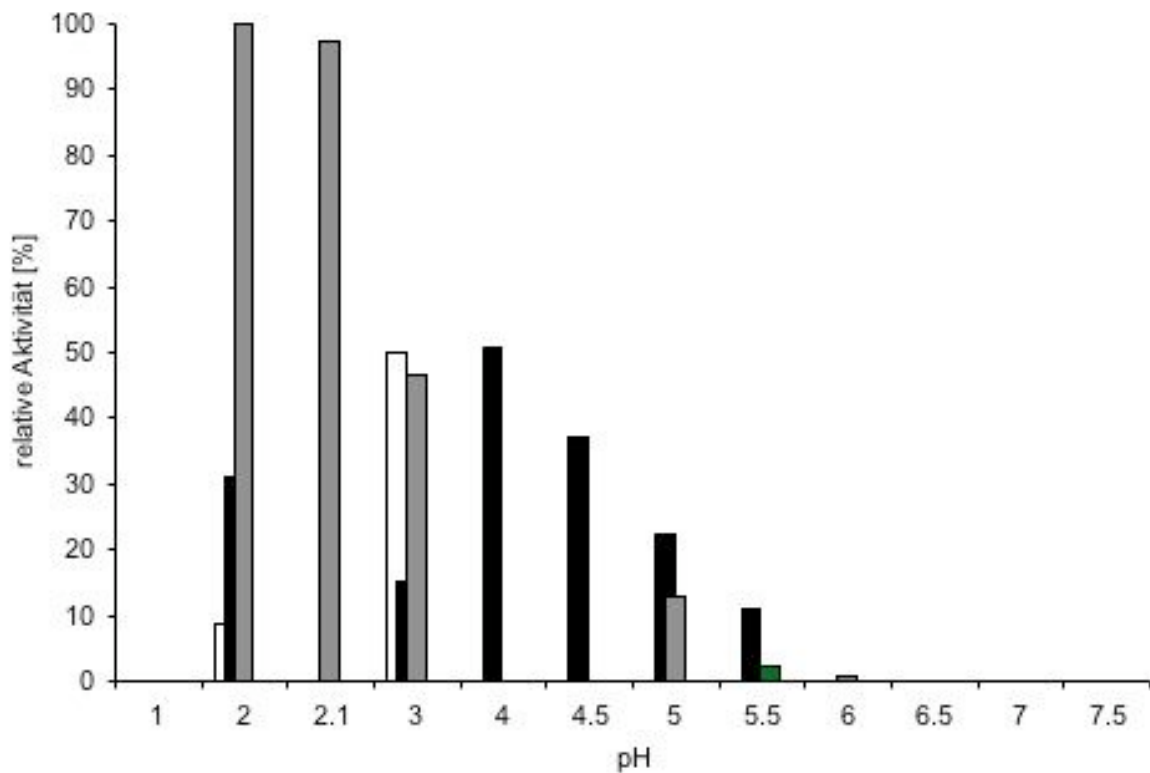


Abbildung 13: pH-Profil der rekombinanten *Trametes versicolor* Laccase (lac10).

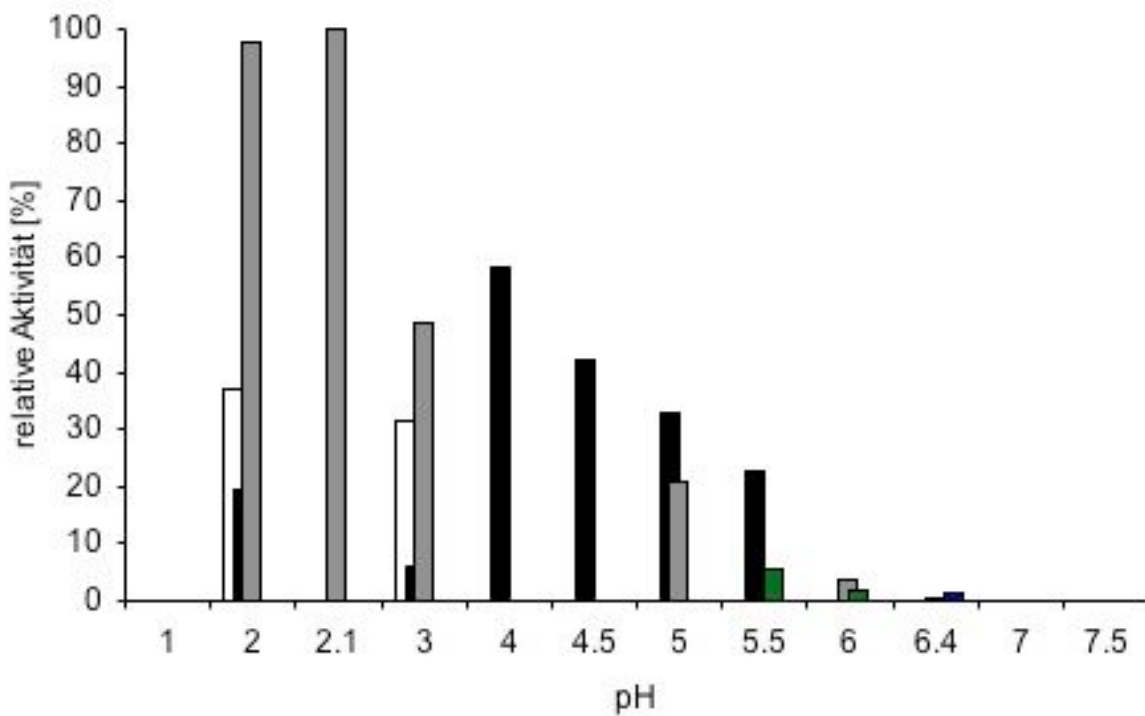


Abbildung 14: pH-Profil von *Pycnoporus cinnabarinus* Laccase (PcL), direkt aus dem Pilz gewonnen.

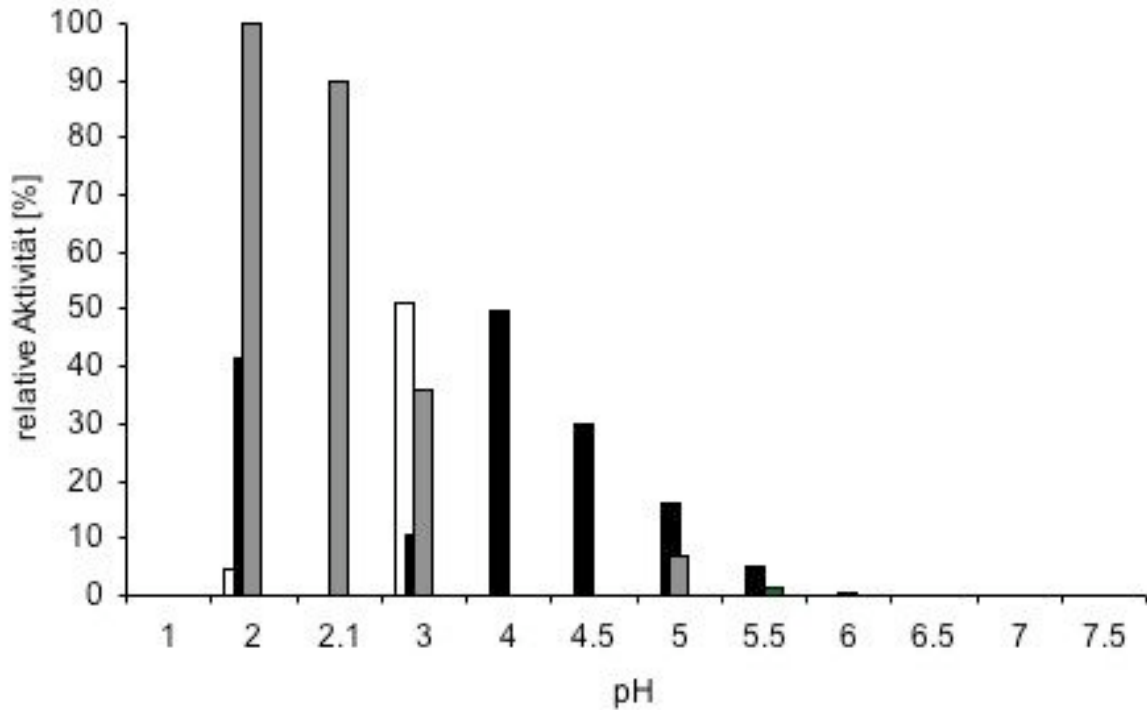


Abbildung 15: pH-Profil der rekombinanten *Pycnoporus cinnabarinus* Laccase (lac35).

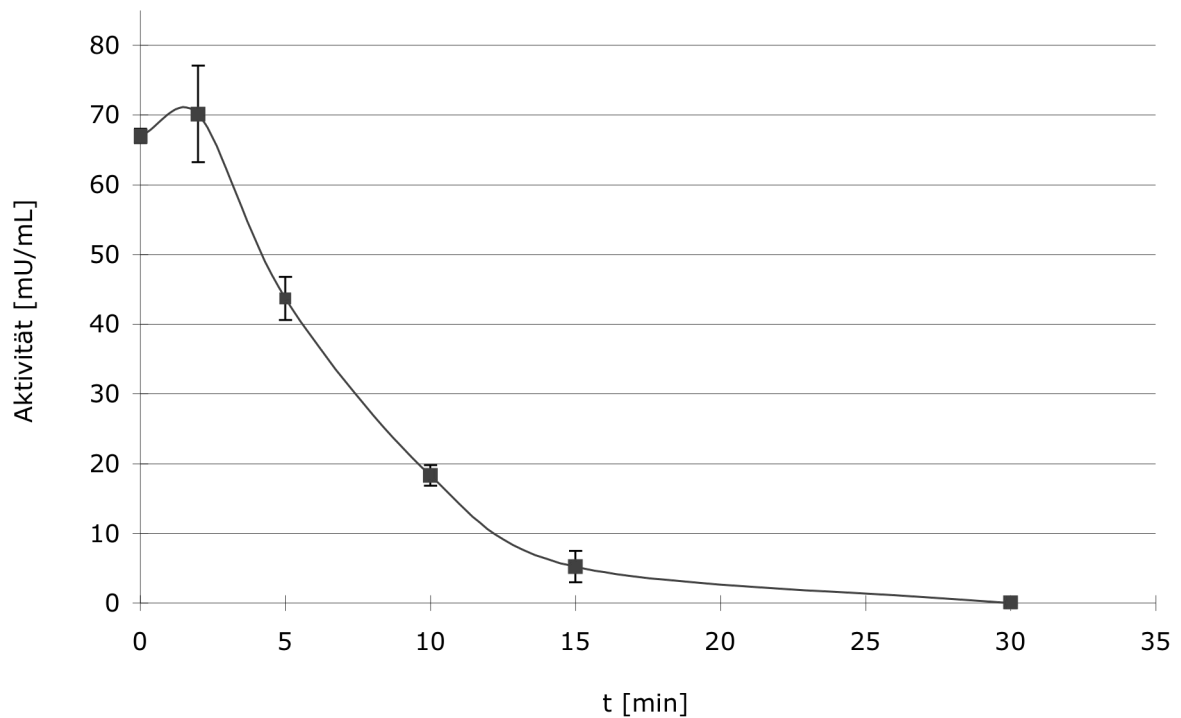


Abbildung 16: Temperaturstabilität der rekombinanten Laccase aus *Pycnoporus cinnabarinus* bei 65°C.