Schlussbericht

Verbundvorhaben:	Enzymatische Lacton-Synthese
Teilvorhaben:	Bioverfahrenstechnik der in vitro Biokatalyse
Förderkennzeichen:	22030905
Ausführende Stellen:	Universität Stuttgart, Institut für Technische Biochemie **DECHEMA e. V., Karl-Winnacker-Institut, Frankfurt am Main**

I.1 Aufgabenstellung

Das Gesamtziel des Vorhabens ist die Herstellung von Riech- und Aromastoffen des Lacton-Typs aus Ölen vornehmlich einheimischer Nutzpflanzen mittels regio- und stereoselektiver enzymatischer Oxidation mittel- und langkettiger Fettsäuren. Die Hauptaufgabenstellung am Karl-Winnaker-Institut der DECHEMA e.V. war die Untersuchung einer elektrochemischen Kopplung von Fettsäure-hydroxylierenden Cytochrom P450 Monooxygenasen.

I.2 Voraussetzungen

Am Karl-Winnacker-Institut der DECHEMA e.V. in Frankfurt am Main (KWI) werden in verschiedenen Forschungsprojekten der Arbeitsgruppe Bioverfahrenstechnik Bioprozesse zur mikrobiellen Aromastoffsynthese entwickelt. Die Arbeitsgruppe Elektrochemie befasst sich seit vielen Jahren mit der Herstellung und den Eigenschaften leitfähiger Polymere sowie mit deren Anwendung in technischen Prozessen. Die Arbeitsgruppen verfügen über umfangreiche elektrochemische Erfahrung sowie über die notwendige apparative Ausstattung. Spezifische Analytik für Duft- und Aromastoffe (chirale GC, GC/MS, HPLC) ist am KWI etabliert. Durch die enge Zusammenarbeit der Arbeitsgruppen Bioverfahrenstechnik und Elektrochemie sind am KWI die notwendigen Voraussetzungen zur Bearbeitung von bioelektrochemischen Fragestellungen gegeben.

I.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Die Entwicklung einer Bioelektrokatalyse mit Cytrochrom P450 BM-3 wird durch die gemeinsame Arbeit der Arbeitsgruppen Bioverfahrenstechnik und Elektrochemie des KWI durchgeführt. Der wissenschaftliche Mitarbeiter arbeitet im interdisziplinären Feld zwischen Bioverfahrenstechnik und Elektrochemie und wird folglich von beiden Arbeitsgruppen betreut und bei seinen bioverfahrenstechnischen und elektrochemischen Experimenten unterstützt.

Das KWI übernimmt die aus Stuttgart stammenden rekombinanten Mikroorganismen für alle weiteren Arbeiten im Labormaßstab. Vor dem Hintergrund der angestrebten technischen Realisierung einer in vitro P450 Bioelektrokatalyse sind von Anfang an die in Arbeitspaketen genannten Arbeiten parallel und in enger Vernetzung auszuführen.

Arbeitspaket 1: Optimierung und Validierung der in vitro Biokatalyse mit P450 Monooxygenasen

Nachdem sich die Immobilisierung von P450 in einem leitfähigen Polymer als eine geeignete Möglichkeit zur Substitution des Cofaktors gezeigt hat, wird diese Methode in weiteren Versuchsreihen optimiert. Entsprechende Faktoren sind z. B. Zugabe von Additiven, Variation der Monomere, Einsatz von Monomergemischen und Polymerisationsbedingungen. Der Einfluss dieser Faktoren auf die Enzymaktivität und -Stabilität wird zunächst in klassischen in vitro Assays überprüft (Einsatz von NADPH). Durch Vergleich der Effizienz der Immobilisierung, der Aktivität und Stabilität der Enzyme mit den Ergebnissen des durchgeführten Enzymassays sollen kritische Einflussgrößen der elektrochemisch gekoppelten Biokatalyse erkannt und einer weiteren Optimierung unterzogen werden.

AP 2: Optimierung des Reaktionsmediums

Mögliche Wechselwirkungen der Substrate und Produkte (Fettsäuren und Hydroxyfettsäuren) mit den Elektroden sind an Hand von Modelllösungen zu untersuchen. Ebenso ist zu klären, inwieweit durch Einsatz von Cosolventien oder Tensiden die Substratkonzentration im System erhöht werden kann und welche Reaktionsmedien unter den gegebenen elektrochemischen Bedingungen am geeignetsten sind. Der Sauerstoffgehalt im Medium ist zu optimieren, um einerseits das notwendige Enzymsubstrat zur Verfügung zu stellen und andererseits die Standzeiten des Polymer-Enzymsystems zu erhöhen..

AP 3: Design und Charakterisierung eines dreidimensionalen Enzymreaktors

In einem Scale-up soll das Verfahren auf dreidimensionale Elektroden übertragen werden. Die wesentlichen Optimierungsparameter sollen hier Raum-Zeit-Ausbeuten und Katalysator-Standzeiten sein. Dazu wird die Anlage mit online-Detektoren und Mess- und Regelungstechnik, z. B: für O_2-Detektion und –Steuerung, pH, Leitfähigkeit) ausgestattet.

I.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand zu Projektbeginn

Aufgrund der Ausgangssituation ist die Entwicklung eines in vitro Enzymreaktors unter Einsatz von P450 BM-3 geplant. Im Gegensatz zur Biokonversion mit ganzen Zellen sollen auf diese Weise unerwünschte ausbeutemindernde Effekte durch alternative intrazelluläre Abbauwege der Substrate, signifikante Nebenproduktbildung oder Folgekatabolismus der gewünschten Zielprodukte vermieden werden. Gleichzeitig können im in vitro System die Fettsäuren besser mit den aktiven Zentren der Enzyme in Kontakt gebracht werden, denn es müssen keine Zellbarrieren überwunden werden.

Die elektrochemisch Kopplung von Cytochrom P450-Monooxygenasen wurde inzwischen von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht, um die katalytischen Eigenschaften von Cytochrom P450-Monooxygenasen für Sensorik oder Synthese nutzen zu können, ohne den teuren Cofaktor NAD(P)H einsetzen zu müssen (Estabrook et al., 1996, Zhang et al., 1997, Vilker et al., 1999, Roberts et al., 2001). Gelingt die Substitution des nativen Cofaktors durch „Elektronen aus der Steckdose“, eröffnete sich nicht nur für die hier vorgestellte Lactonsynthese, sondern für eine Vielzahl groß- und feinchemischer Zwischen- und Endprodukte ein völlig neuer biotechnologischer Zugang. Eine wesentliche Voraussetzung hierfür ist die effiziente Elektronenübertragung von Elektroden zum Häm-Eisen des aktiven Zentrums.

Methoden zur Immobilisierung von Enzymen auf Trägerelektroden werden seit langer Zeit intensiv untersucht (Willner und Katz 2000). Eine Möglichkeit ist die Verwendung von leitfähigen Polymeren, wie z. B. Polythiophen, Polypyrrol und Polyanilin (Heinze 1990). Sie zeichnen sich durch vielfältige Derivatisierungsmöglichkeiten aus (Schopf und Koßmehl 1997). Besonders intensiv untersucht werden amperometrische Sensoren zur Detektion von Glucose mit Hilfe der Glucoseoxidase, die z. B. in derivatisiertes Polypyrrol (Bartlett und Cooper 1993, Wallace und Kane-Maguire 2002, Mousty et al. 2001, Curulli und Palleschi 1997, Yasuzawa und Kunugi 1999) oder in Polyethylendioxythiophen (Kros et al. 2001) eingebettet ist. Auch die Kombination zweier Enzyme in einer derivatisierten Polypyrrolschicht (Salicylathydroxylase und Polyphenoloxidase) wird als Salicylat-Sensor beschrieben (Cosnier und Gondran 2001). Der Elektronentransfer von einer Trägerelektrode auf ein Enzym kann über die Ketten des leitfähigen Polymers erfolgen (Ramanavicius et al. 1999); in vielen Fällen werden zusätzlich Redoxmediatoren (z.B. metallorganische Komplexe) verwendet. Um eine Auswaschung aus der Katalysatorschicht zu verhindern, können diese Mediatoren an das Gerüst des leitfähigen Polymers gebunden werden (Habermüller et al. 2000, Foulds und Lowe 1988).

I.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Im Rahmen des Projektes wurde eng mit den Projektpartnern zusammengearbeitet. Durch regelmäßige Projekttreffen und Telefonkonferenzen wurde der Austausch der Informationen sichergestellt. Über die Projektpartner hinaus wurde mit den folgenden Arbeitsgruppen zur Erreichung der Projektziele kooperiert:

- Prof. Mäntele, Universität Frankfurt (spektroelektrochemische Untersuchungen)
- Prof. Gores, Universität Regensburg (Elektrochemische Quarz-Mikrowaage)
- Prof. Schwaneberg, Jacobs Universität Bremen (Biochemie von P450, Nachweisreaktionen)

II.1 Erzielte Ergebnisse

Bestimmung der Kinetik der enzymatischen Fettsäure-Hydroxylierung mittels NADPH-Assays

Da P450 BM-3 eine Fettsäurehydroxylase ist und Fettsäuren der Kettenlänge C12-C22 ihre natürlichen Substrate darstellen, wurden kinetische Konstanten von P450 BM-3 gegenüber Fettsäuren ermittelt. Die Bestimmung erfolgte dabei photometrisch bei 340 nm über den NADPH-Test. Die Grundlage für die Bestimmung der kinetischen Konstanten bildete das Enzymmodell nach Michaelis-Menten. Zur Auswertung wurden die ermittelten Daten in ein Diagramm nach Lineweaver-Burk aufgetragen und hieraus die kinetischen Konstanten bestimmt. Die folgende Abbildung zeigt besipielhaft die NADPH-Verbrauchskurven sowie die Michaelis-Menten- und Lineweaver-Burk-Diagramme für Laurinsäure.

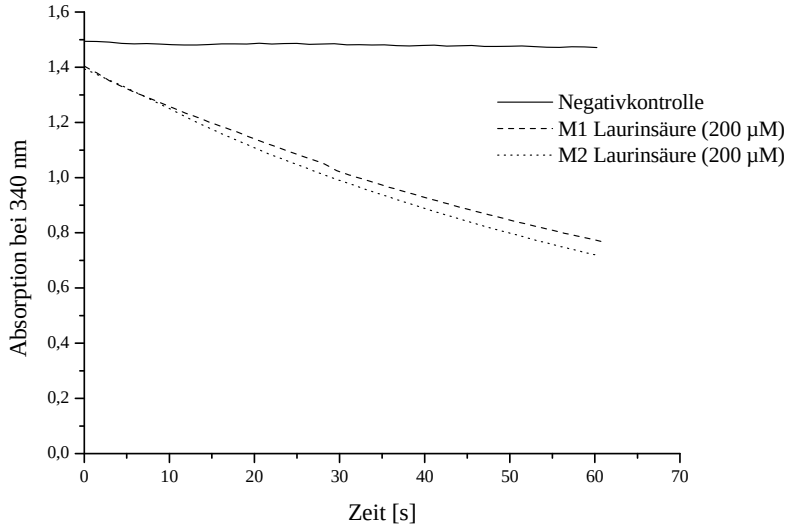

Abbildung 1: NADPH-Test mit Laurinsäure als Substrat für P450 BM-3 WT (wild type). Die Konzentration an Laurinsäure betrug im Test 200 µM. Die P450 BM-3 WT-Konzentration im Test war 0,153 µM. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 300 µM NADPH.

Die Abbildung zeigt das ein NADPH-Verbrauch bei der Umsetzung von Laurinsäure als Substrat für P450 BM-3 WT stattfindet. Dabei wird die negative Steigung im linearen Bereich innerhalb der ersten 15 bis 20 s bestimmt. Bei Durchführung des Tests mit einer Negativkontrolle ohne Laurinsäure ist nur ein sehr geringer NADPH-Verbrauch zu erkennen.

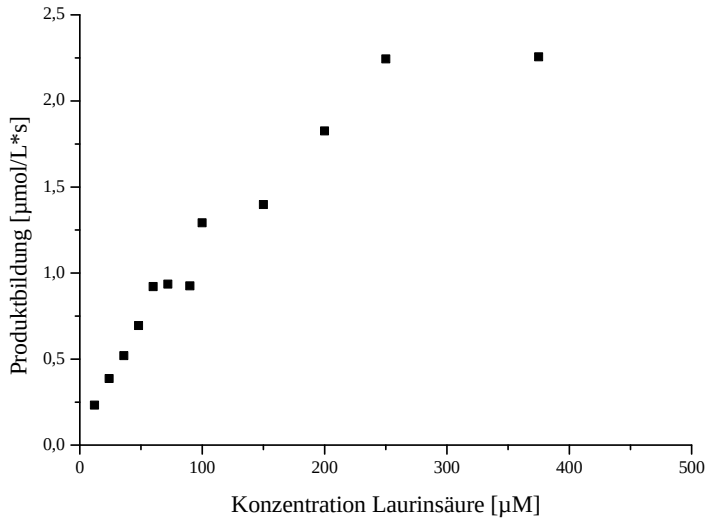

Abbildung 2: Michaelis-Menten Diagramm von P450 BM-3 WT bei verschiedenen Konzentrationen an Laurinsäure.

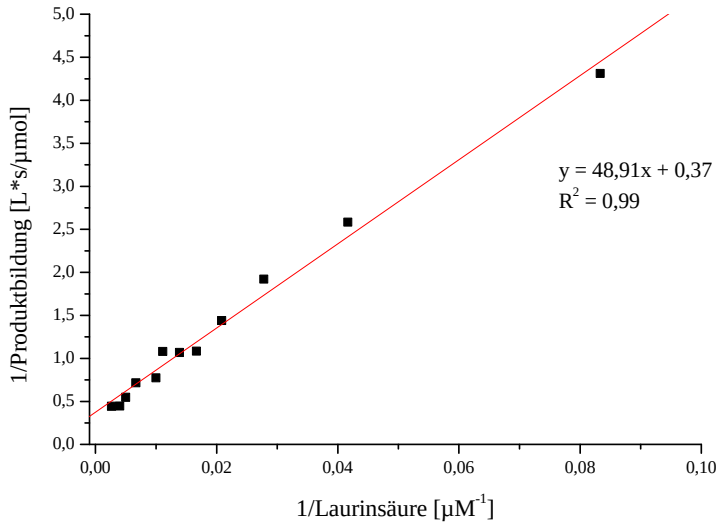

Abbildung 3: Lineweaver-Burk-Diagramm von P450 BM-3 WT bei verschiedenen Konzentrationen an Laurinsäure als Substrat.

Durch Auftragung der reziproken Werte für die verschiedenen Laurinsäurekonzentrationen und für die Produktbildung gegeneinander (doppelt reziproke Darstellung) wird eine Gerade erhalten. Mittels der Geradengleichung wurden die kinetischen Konstanten für die enzymatische Umsetzung von Laurinsäure berechnet.

Die folgende Tabelle zeigt die aus den Lineweaver-Burk-Diagrammen bestimmten kinetischen Konstanten für Laurin,- Myristin,- und Palmitinsäure.

Tabelle 1: Kinetische Konstanten für die Umsetzung von P450 BM-3 WT mit Fettsäuren.

	Laurinsäure	Myristinsäure	Palmitinsäure
KM [µM]	132,19	82,11	282,47
kcat [s^{-1}]	17,64	62,50	27,26
kcat/KM [µM*s^{-1}]	0,133	0,761	0,096

Bestimmung der Aktivität und Stabilität von P450 BM-3 WT bei verschiedenen pH-Werten

Für die potentialabhängige Anbindung von P450 BM-3 WT an einen elektrochemisch schaltbaren Kationenaustauscher, ist die pH-Stabilität des Enzyms von entscheidender Bedeutung. Für die Bestimmung der pH-Stabilität wurde der P450 BM-3 WT in

Pufferlösungen bzw. ungepufferten Lösungen mit verschiedenen pH-Werten von 4,4 bis 9,2 bis zu 80 Stunden inkubiert. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte anhand eine Surrogatsubstrattestes (pNCA-Test). Für den Versuch wurde die Aktivität zum Zeitpunkt t0 als 100 % Aktivität des Enzyms gesetzt. Die Abbildung 4 zeigt die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung von P450 BM-3 WT bei verschiedenen pH-Werten.

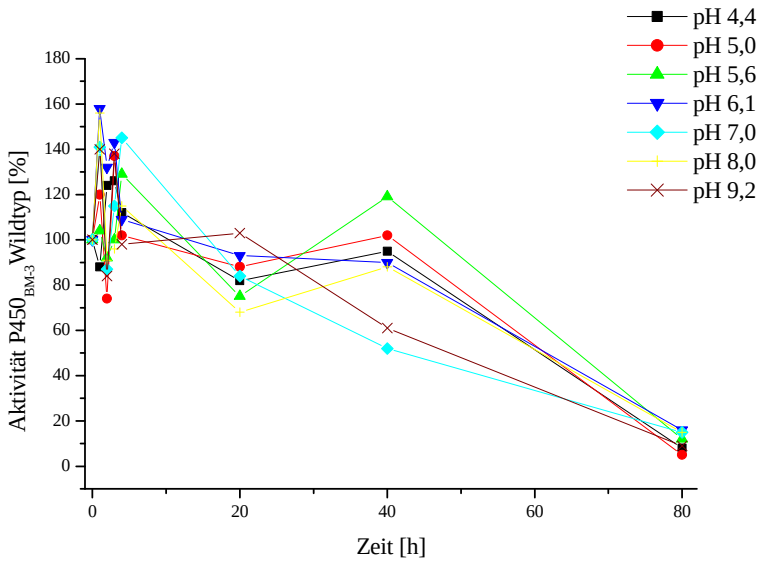

Abbildung 4: P450 BM-3 WT Aktivität in % bei verschiedenen pH-Werten. Die P450 BM-3 Monooxygenase wurde bis zu 80 Stunden in pH-Werten von 4,4 bis 9,2 inkubiert. Die Temperatur bei den Messungen betrug 25°C.

Die Abbildung zeigt, dass es nach 40 Stunden Inkubationszeit des P450 BM-3 WT in verschiedenen pH-Werten von 4,4 bis 9,2 zu keine nennenswerten Aktivitätsverlusten kommt. Lediglich bei pH 9,2 und pH 7,0 fällt die Aktivität der P450 BM-3 Monooxygenase bis auf 60-50 % ab. Bei den anderen pH-Werten ist die gemessene Aktivität entweder konstant bei 80-100 % oder steigt sogar nochmals wie bei pH 4,4, 5,0 oder 5,6 an. Wird P450 BM-3 WT bei bis zu 80 Stunden inkubiert, so beträgt die Aktivität von nur noch maximal 15-5 %.

Die folgende Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus der Abbildung 4. Dargestellt ist die Aktivität von P450 BM-3 WT inkubiert in Puffersystemen bzw. ungepufferten Lösungen mit verschiedenen pH-Werten von 4,4 bis 9,2 in einem Zeitraum von bis zu 4 Stunden.

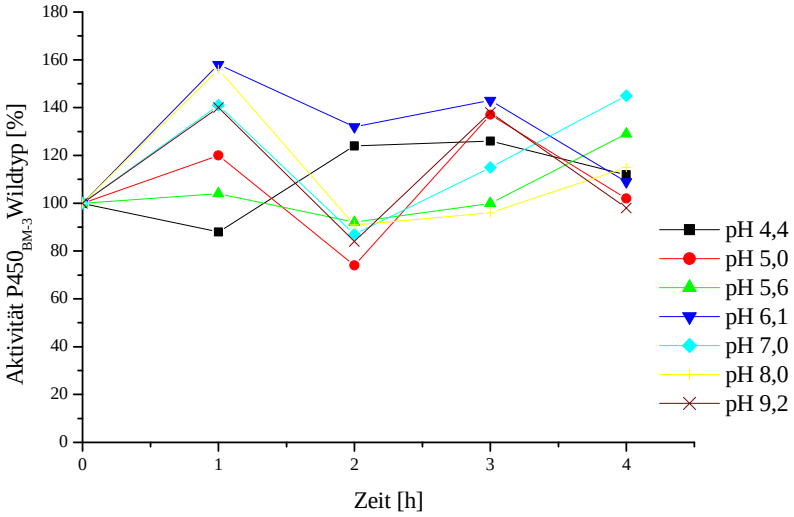

Abbildung 5: Ausschnitt aus der zuvor gezeigten Abbildung 4.13. Aktivität in % von P450 BM-3 WT inkubiert bis zu 4 Stunden bei pH-Werten von 4,4 bis 9,2. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur.

Die Abbildung zeigt, das der WT über die gesamten 4 Stunden bei allen pH-Werten aktiv ist und bleibt. Die Inkubation des P450 BM-3 WT in pH-Werten von 4,4 bis 9,2 zeigt, dass bis zu einer Inkubationsdauer von 40 Stunden keine großen Aktivitätsverluste des Enzyms zu beobachten sind. Das Enzym ist sowohl bei sehr sauren pH-Werten (4,4) als auch bei sehr basischen (9,2) pH-Werten stabil. In der folgenden Abbildung 6 sind die Anfangsaktivitäten von P450 BM-3 WT bei Inkubation in verschiedenen pH-Werten dargestellt.

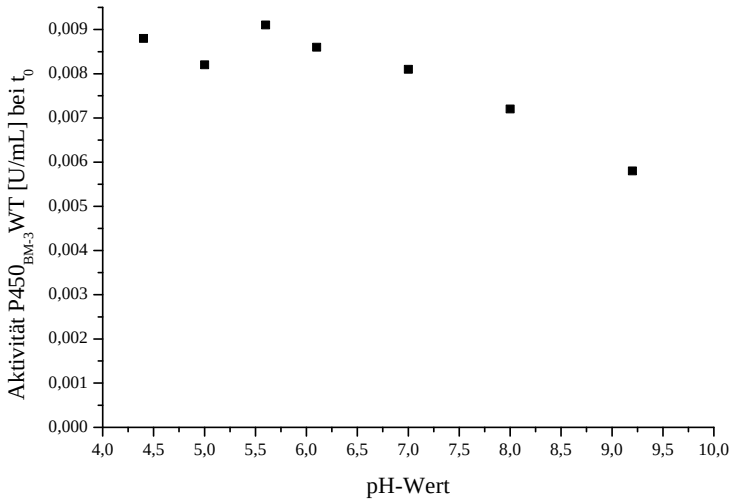

Abbildung 6: Anfangsaktivität von P450 BM-3 WT bestimmt in pH-Werten von 4,4 bis 9,2 mittels des 12-pNCA-Testes.

In der Abbildung wird gezeigt, dass bei einem pH von 5,6 die höchste Anfangsaktivität mit ca. 0,009 U/mL erreicht wird. Danach fällt die Aktivität des Enzyms mit steigendem pH-Wert ab. Bei pH 9,2 beträgt sie ca. 0,006 U/mL.

Bestimmung der Hydroxylierungs-Geschwindigkeit durch Messung der Sauerstoffzehrung mit optischen Sensoren

Mit den beiden folgenden Versuchen sollte geklärt werden ob die Sauerstoffmessung von P450 BM-3 WT über einen O_2-sensitiven Sensor erfolgen kann im Hinblick für den Einsatz in einem elektrochemischen Enzymreaktor. Die Versuche wurden in einem Glasreaktor mit O_2-sensitiven Sensor durchgeführt und erfolgten analog dem NADPH-Test. Hierbei wurde jedoch nicht die Oxidation von NADPH gemessen, sondern die Sauerstoffzehrung des Enzyms bei der Biotransformation von Fettsäuren bestimmt. In einem ersten Versuch wurde die Sauerstoffzehrung vom P450 BM-3 Wildtyp bei der Biotransformation von Palmitinsäure gemessen. Zusätzlich wurden Negativkontrollen erstellt. Diese Negativkontrollen wurden entweder ohne P450 BM-WT, ohne Palmitinsäure oder ohne NADPH durchgeführt. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

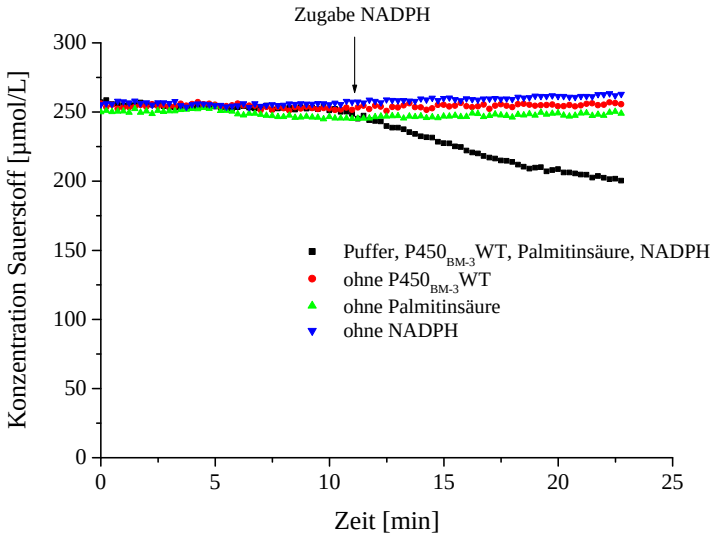

Abbildung 7: Messung der Sauerstoffzehrung von P450 BM-3 Wildtyp bei der Biotransformation von Palmitinsäure mit einem optischen Sauerstoffsensor. Um den natürlichen Abbau von NADPH durch Oxidation mit Sauerstoff zu klären wurde eine Negativkontrolle ohne Palmitinsäure durchgeführt. Weitere Negativkontrollen wurden ohne P450 BM-3 WT, und ohne NADPH durchgeführt. Die Konzentration von P450 BM-3 WT im Test betrug 0,128 µM. Die Endkonzentration an Palmitinsäure betrug 120 µM. Die Endkonzentration an NADPH betrug 120 µM. Der Versuch wurde bei einer Temperatur von 25 °C und in einem Gesamtvolumen von 25 mL durchgeführt.

In Abbildung 7 ist die Abhängigkeit der Konzentration an Sauerstoff von der Zeit bei der Biotransformation von Palmitinsäure, sowie bei den Negativkontrollen dargestellt. Dabei zeigt sich das beim Biotransformationsansatz und bei den Negativkontrollen bis zu einer Zeit von 11 min die Sauerstoffkonzentration im Reaktor konstant bei ca. 253 µmol/L liegt. Nach 11 min wird dem Biotransformationsansatz NADPH zugefügt und die Sauerstoffkonzentration sinkt auf bis zu 200 µmol/L. Bei den Negativkontrollen ist mit Zugabe von NADPH bzw. ohne Zugabe von NADPH kein Absinken der Sauerstoffkonzentration im Reaktor zu beobachten.

Bei einem zweiten Versuch wurde die Messung der Sauerstoffzehrung von P450 BM-3 WT bei der Biotransformation von Palmitin-, Myristin- und Laurinsäure mit dem optischen Sauerstoffsensor durchgeführt. Die Abbildung 8 zeigt die Ergebnisse dieses Versuches.

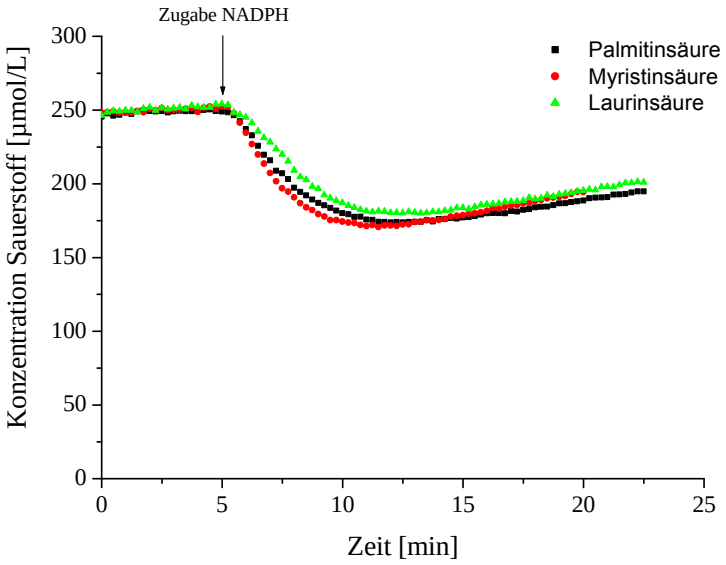

Abbildung 8: Messung der Sauerstoffzehrung von P450 BM-3 WT bei der Biotransformation von Palmitin-, Myristin- und Laurinsäure mit einem optischen Sauerstoffsensor. Die Konzentration von P450 BM-3 WT im Test betrug 0,115 µM. Die Reaktion wurde mit 3 mM NADPH-Lösung gestartet (Konzentration im Test 120 µM). Die Endkonzentrationen der Fettsäuren betrugen jeweils 120 µM. Gemessen wurde bei 25° C und in einem Gesamtvolumen von 25 mL.

Dargestellt ist die Sauerstoffkonzentration als Funktion der Zeit bei der von P450 BM-3 WT katalysierten Biotransformation von Palmitin-, Myristin- und Laurinsäure. In den ersten 5 Minuten beträgt die Konzentration an Sauerstoff im Reaktionsmedium 253 µmol/L. Nach fünf Minuten erfolgt die Zugabe von NADPH in den Reaktor. Dabei zeigt sich, dass mit Zugabe von NADPH die Konzentration an im Reaktionsmedium gelösten Sauerstoff bis auf 180 µmol/L sinkt. Grund hierfür ist der Verbrauch von

Sauerstoff durch die P450 BM-3 Monooxygenase. Nach ca. 12 min steigt die Konzentration an Sauerstoff auf bis zu 196 µmol/L wieder an. Die folgende Tabelle zeigt die ermittelte O_2-Zehrung und O_2-Zehrungsrate bei der Fettsäurebiotransformation von P450 BM-3 WT.

Tabelle 2: O_2-Zehrung und O_2-Zehrungsrate bei der Biotransformation von P450 BM-3 WT mit Palmitin-, Myristin- und Laurinsäure

Substrat	O_2-Zehrung [µmol/L * min]	O_2-Zehrungsrate [µmol O_2/µmol P450 BM-3 * min]
Palmitinsäure	20,02	173,82
Myristinsäure	26,82	232,82
Laurinsäure	16,77	145,57

Die Tabelle zeigt, das bei der Biotransformation der ausgewählten Fettsäuren mit P450 BM-3 WT die O_2-Zehrung und die O_2-Zehrungsrate für Myristinsäure im Vergleich zur Palmitin- und Laurinsäure am höchsten ist.

Etablierung einer GC/MS-Analytik für Fettsäuren und der hydroxylierten Produkte

Die Bestimmung von Palmitin- und Hydroxypalmitinsäure erfolgte über die Gaschromatographische-Massenspektrometrische (GC/MS) Analyse. Dafür mussten vor der Biotransformation Standardsubstanzen bezüglich Retentionszeiten und Massenspektren analysiert werden. Die Biotransformation von Palmitinsäure wurde als Modell für die folgenden Versuche ausgewählt, da hier ein hydroxylierter Produktstandard (16-Hydroxypalmitinsäure) käuflich zu erwerben war. Als Substratstandard wurde Palmitinsäure verwendet. Alle GC Analysen wurden mit n-Dodecan als internem Standard durchgeführt. Vor der GC/MS-Analyse wurden alle Standards mit einem Derivatisierungsreagenz behandelt.

Die folgende Abbildung zeigt ein Gaschromatogramm des internen Standards n-Dodecan, sowie des trimethylsilylierten Substratstandards Palmitinsäure und des trimethsilylierten Produktstandards 16-Hydroxypalmitinsäure.

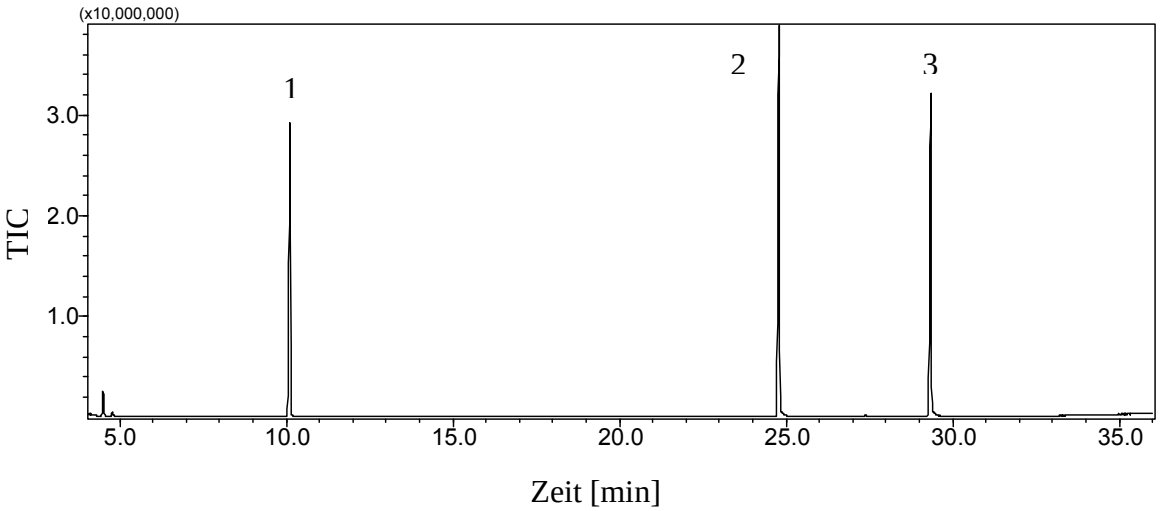

Abbildung 9: Gaschromatogramm vom internen Standard n-Dodecan (Peak 1, Rt = 10,1 min), sowie vom trimethylsilierten Substratstandard Palmitinsäure (Peak 2, Rt = 24,8 min) und trimethylsilierter 16-Hydroxypalmitinsäure als Produktstandard (Peak 3, Rt = 29,3 min).

Das Gaschromatgramm zeigt, dass n-Dodecan nach einer Retentionszeit von 10,1 min, Palmitinsäure nach einer Retentionszeit von 24,8 min und 16-Hydroxypalmitinsäure nach 29,3 min detektiert werden. Die Analyse der Biotransformation von Palmitinsäure durch P450 BM-3 WT erfolgte über den NADPH-Test. Anschließend wurde der Reaktionsansatz aufgearbeitet und sowohl der interne Standard als auch Fettsäuren und mögliche hydroxylierte Fettsäuren derivatisiert. Im Anschluss erfolgte die GC/MS-Analyse des aufgearbeiteten und derivatisierten Reaktionsansatzes.

Herstellung und Einsatz von PPy/PSS-Elektroden zur reversiblen Enzymimmobilisierung

Für die potentialabhängigen Anbindungsversuche vom P450 BM-3 WT mussten Glaskohlenstoffelektroden mit leitfähigem Polypyrrol (PPy) beschichtet werden. Dazu wurde 0,1 M Pyrrol (Py) galvanostatisch (bei konstanter Stromdichte) in Gegenwart von 0,1 M Natriumpolystyrensulfonat (NaPSS) als Gegenion auf zuvor gereinigte Glaskohlenstoffelektroden abgeschieden. Für die Anbindung der P450 BM-3 wurde zusätzlich 0,1 M NiSO4 * 7 H2O zum Py/PSS hinzugegeben und durch galvanostatische Polymerisation wurden PPy/PSS/Ni^{2+}-Filme auf Glaskohlenstoffelektroden abgeschieden. Die Ergebnisse der Herstellung von PPy/PSS bzw. PPy/PSS/Ni^{2+}-Elektroden sind in der folgenden Abbildung gezeigt.

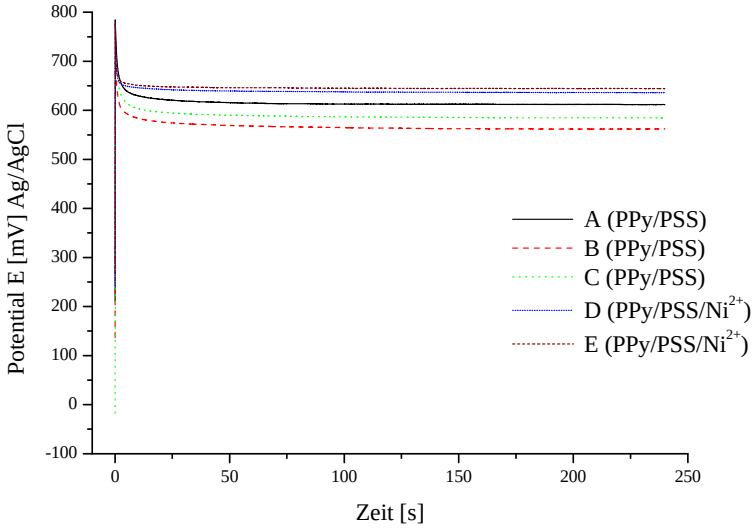

Abbildung 10: Abhängigkeit des Potentials E von der Zeit bei der galvanostatischen Polymerisation von 0,1 M Pyrrol in Gegenwart von 0,1 M NaPSS und 0,1 M $NiSO_4$ * 7 H_2O an Glaskohlenstoffelektroden. Die Stromdichte beträgt konstant 1 mA/cm^2. Die Versuchsdauer betrug 240 s.

Dargestellt ist das Potential in Abhängigkeit von der Versuchsdauer bei einer konstanten Stromdichte von 1 mA/cm^2. Die Abbildung zeigt, dass bei allen Versuchen eine Peakspitze auftritt. Dabei wird für Elektrode A und E das höchste Peakpotential bei 784 mV bzw. 780 mV erreicht. Nach Bildung des Peakpotentials fällt das Potential sofort ab und bleibt für die weitere Versuchsdauer konstant (Plateaupotential). Bei diesem Plateaupotential erfolgt die Polymerisation von Pyrrol hin zu Polypyrrol. Hier werden die höchsten Plateaupotentiale für Elektrode D und E bei 636 mV bzw. 644 mV erhalten. Nach 240 s WURDE die galvanostatische Polymerisation beendet.

Reversible Immobilisierung von Enzymen und Metallionen

Eine mit leitfähigem Polypyrrol (PPy) beschichtete Elektrode kann als Kationenaustauscher wirken. Aufgrund von Reduktions- und Oxidationsvorgängen am Polypyrrol, erwirkt durch einstellen des Elektrodenpotentials können Kationen, z. B. positiv geladene Enzyme adsorbiert und desorbiert werden.

Für den Versuch wurde die Anbindung des P450 BM-3 WT in einer spektroelektrochemische Zelle an eine PPy/PSS-Glaskohlenstoffelektrode untersucht. Die folgende Abbildung zeigt das Ergebnis eines Versuches zur potentialabhängige Anbindung

(reversiblen Immobilisierung) von P450 BM-3 WT an die PPy/PSS-Glaskohlenstoffelektrode.

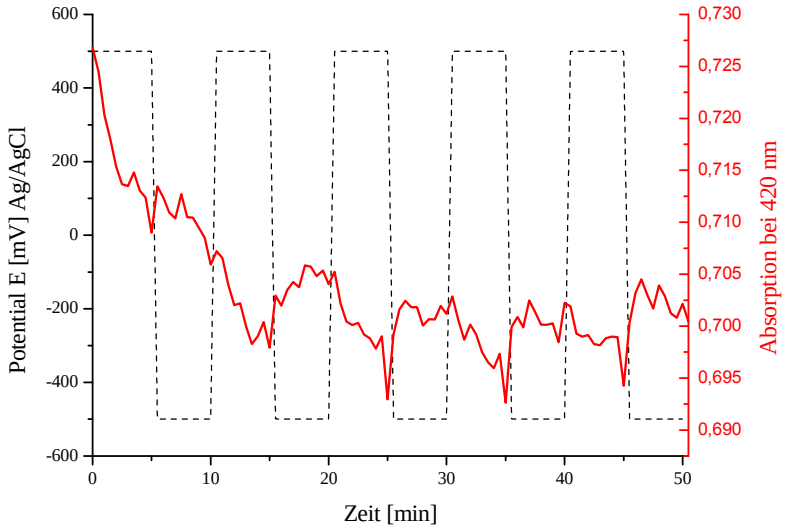

Abbildung 11: Anbindung von P450 BM-3 WT an eine mit PPy/PSS beschichtete Glaskohlenstoffelektrode. Einfluss des Potentials auf die Absorption der P450 BM-3 Monooxygenase bei 420 nm in der Lösung, gemessen in einer spektroelektrochemischen Zelle. Das Potential wurde von +500 mV bis –500 mV geschaltet. Der Versuch erfolgte in einem Puffer mit pH-Wert 5,6.

Abbildung 11 zeigt, dass die Elektrode für 5 min positiv auf +500 mV geschaltet wird. Danach wird für weitere 5 min das Potential negativ auf –500 mV geschaltet. Zu sehen ist, das insgesamt 10 Polarisationszyklen gefahren werden in denen das Potential immer abwechselnd von +500 mV auf –500 mV geschaltet wird. Dabei wird die Absorption der P450 BM-3 Monooxygenase in der Lösung bei 420 nm gemessen. Es zeigt sich das die Absorption in der Lösung in den ersten 13 min abnimmt. Nach 13 min steigt die Absorption der P450 BM-3 Monooxygenase wieder an und sinkt daraufhin bei positivem Potential wieder ab. Dieser Effekt ist noch dreimal zu beobachten. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein erneuter Versuch durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt.

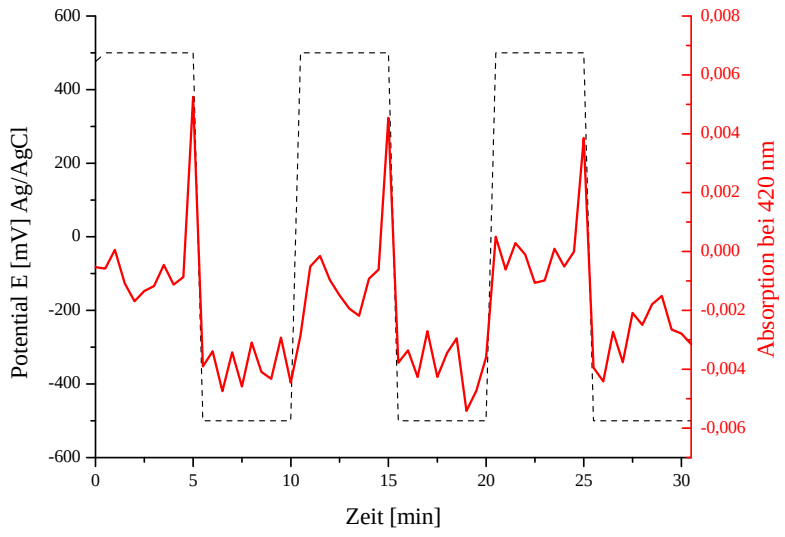

Abbildung 12: Anbindung von P450 BM-3 WT an eine mit PPy/PSS beschichtete Glaskohlenstoffelektrode. Einfluss des Potentials auf die Absorption der P450 BM-3 Monooxygenase bei 420 nm in der Lösung, gemessen in einer spektroelektrochemischen Zelle. Das Potential wurde alle 5 min abwechselnd von +500 mV bis –500 mV geschaltet. Der Versuch erfolgte in einem Puffer mit pH-Wert 5,6.

Aus der Abbildung geht hervor, dass nach 5 min bei einem Potential von +500 mV die Absorption in der Lösung fällt. Bei einem negativem Potential von –500 mV bleibt sie konstant. Wird nach 10 min wieder ein positives Potential von +500 mV an die Elektrode angelegt, ist ein Anstieg der Absorption in der Lösung zu beobachten. Bei wiederholtem negativen Potential sinkt die Absorption wieder, bleibt einige Zeit konstant und steigt mit anlegen eines positiven Potentials wieder an.

Reversible Immobilisierung von nativem und denaturiertem Lysozym an eine PPy/PSS-Elektrode

Aufgrund der vorherigen Ergebnisse, sollte Lysozym als Modellenzym für die potentialabhängige Anbindungsversuche verwendet werden. Ausschlaggebend für die Verwendung von Lysozym mit seinem isoelektrischen Punkt (pI) von 10,5 bis 11 ist, das wenn Lysozym in einem Puffer mit sehr sauren pH-Wert gelagert wird es als mehrfach geladenes Kation vorliegt. Aus diesem Grund sollte die Anbindung von nativem Lysozym sowohl in einem Puffer mit pH 1,3 als auch in einem Puffer mit pH 5,6 erfolgen. In einem weiteren Versuch wurde Lysozym mit SDS und ß-Mercaptoethanol denaturiert. Grund hierfür ist die Annahme, dass die für die Anbindung erforderliche positive Ladung des Lysozyms im inneren des Proteins liegt und somit das Lysozym nach außen hin scheinbar negativ geladen sein könnte.

Durch Behandlung des Lysozyms mit Denaturierungsreagenzien würde die Proteinstruktur aufgebrochen und die positive Ladung nach außen gebracht werde. Die folgende Abbildung zeigt die Anbindungsversuche mit nativem, nicht denaturierten Lysozym in einem Puffer mit pH-Wert 1,3.

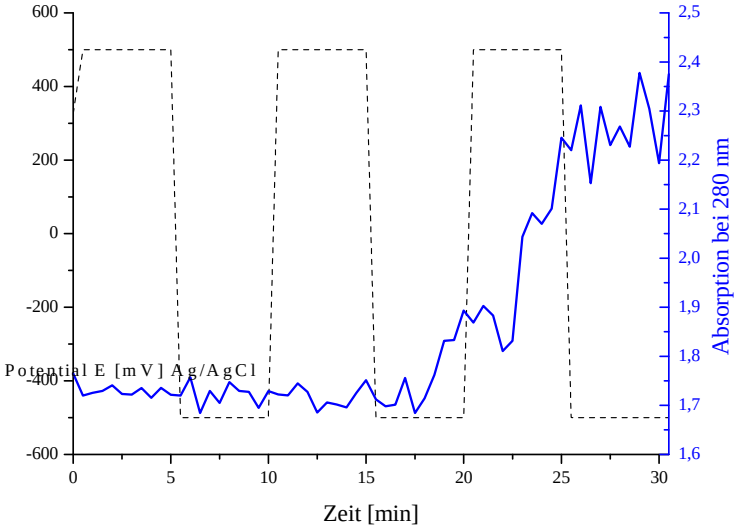

Abbildung 13: Potentialabhängige Anbindung von nativem Lysozym an eine PPy/PSS-Glaskohlenstoffelektrode. Das Lysozym befindet sich in einem Puffer mit pH-Wert 1,3 und liegt somit als Kation vor. Die Anbindung wird bei einer Wellenlänge von 280 nm untersucht, da viele tryptophanhaltige Proteine u. a. auch Lysozym in diesem Wellenlängenbereich absorbieren. Die Potentialsprünge erfolgen von +500 mV bis –500 mV.

Die Abbildung zeigt, dass obwohl Potentialsprünge erfolgen, die Absorption von Lysozym in der Lösung in den ersten 17 min konstant bei ca. 1,7 Absorptionseinheiten bleibt. Bis hierhin scheint es keinen Einfluss der Potentialänderungen auf die Absorption von Lysozym zu geben. Erst ab 17 min ist eine Absorptionszunahme bis auf ca. 2,4 Absorptionseinheiten zu erkennen. Eine wichtige Beobachtung wurde zum Ende des Versuchs gemacht. Es wurden kleine schwarze Bröckchen in der Spektroelektrochemischen Messzelle beobachtet, die vermutlich von abgelösten PPy stammen könnten, das aufgrund der starken Protonierung durch den sehr sauren Puffer brüchig wird und von der Elektrode abblättert.

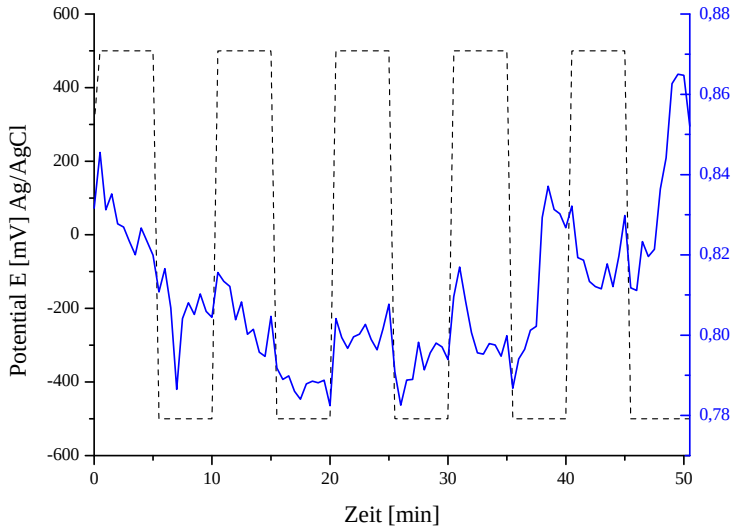

Abbildung 14: Potentialabhängige Anbindung von nativem Lysozym an eine PPy/PSS-Glaskohlenstoffelektrode. Das Lysozym befindet sich in einem Puffer mit pH-Wert 4,4 und liegt somit als Kation vor. Die Anbindung wird bei einer Wellenlänge von 280 nm untersucht, da viele tryptophanhaltige Proteine u. a. auch Lysozym in diesem Wellenlängenbereich absorbieren. Die Potentialsprünge erfolgen von +500 mV bis –500 mV.

Die folgende Abbildung zeigt den Anbindungsversuch mit, aufgrund von Behandlung mit SDS und ß-Mercaptoethanol, denaturiertem Lysozym an die PPy/PSS-Glaskohlenstoffelektrode.

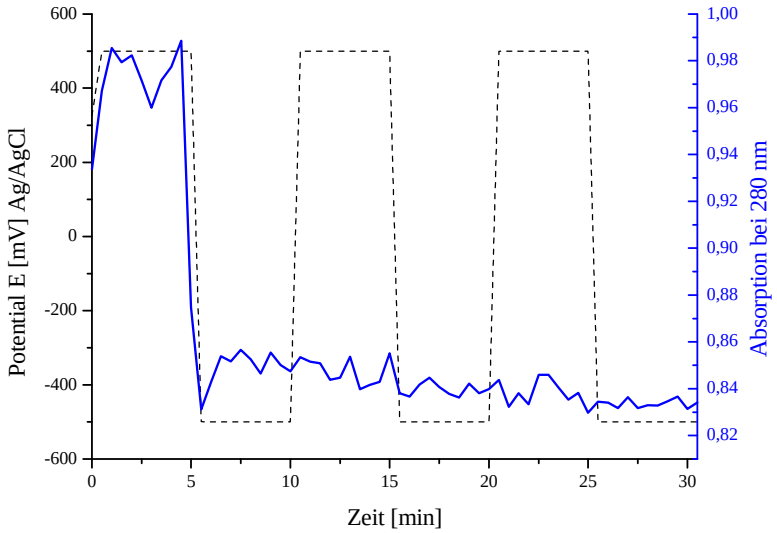

Abbildung 15: Potentialabhängige Anbindung von mit SDS und ß-Mercaptoethanol denaturiertem Lysozym. Der Versuch wurde in einem Puffer mit pH 5,6 durchgeführt. Die Absorption wurde bei 280 nm gemessen. Die Potentialsprünge erfolgten wieder von +500 mV bis –500 mV.

Es ist zu erkennen, dass bei einem positiven Potential von +500 mV in den ersten 5 min die Absorption von Lysozym in der Lösung steigt. Dieser Effekt entspricht den allgemein angenommenen Erwartungen. Nach 5 Minuten wird das Potential auf –500 mV geschaltet und eine Absorptionsabnahme bis auf ca. 0,84 Absorptionseinheiten wird beobachtet. Nach einem erneuten Potentialsprung auf +500 mV steigt die Absorption weiter auf ca. 0,86 und bleibt, obwohl weitere Potentialsprünge von positiv auf negativ erfolgen, nahezu konstant bei ca. 0,85 Absorptionseinheiten bis zum Endes des Versuchs nach 30 min. Dabei ist die Änderung der Absorption während der ersten 5 min sicher auf einen Effekt des Enzym mit der Elektrode zurückzuführen, während die minimalen Absorptionsänderungen eher auf ein Geräterauschen hindeuten.

Reversible Immobilisierung von Ni^{2+} an eine PPy/PSS-Elektrode

Mit diesem Versuch sollte die potentialabhängige Anbindung von Ni^{2+}-Ionen an eine PPy/PSS beschichtete Glaskohlenstoffelektroden untersucht werden. Das Ziel war eine Anbindung der P450 BM-3 5M über den His(6)-Tag an die PPy/PSS/Ni^{2+} Glaskohlenstoffelektrode. Dazu wurde 0,1 M $NiSO_4$ * 6 H_2O in die spektroelektrochemische Messzelle gegeben. Die Potentialsprünge erfolgten dabei alle 5 min von +500 mV auf –500 mV. Die Anbindung wurde bei 395 nm untersucht, da Nickel bei dieser Wellenlänge sein Absorptionsmaximum besitzt.

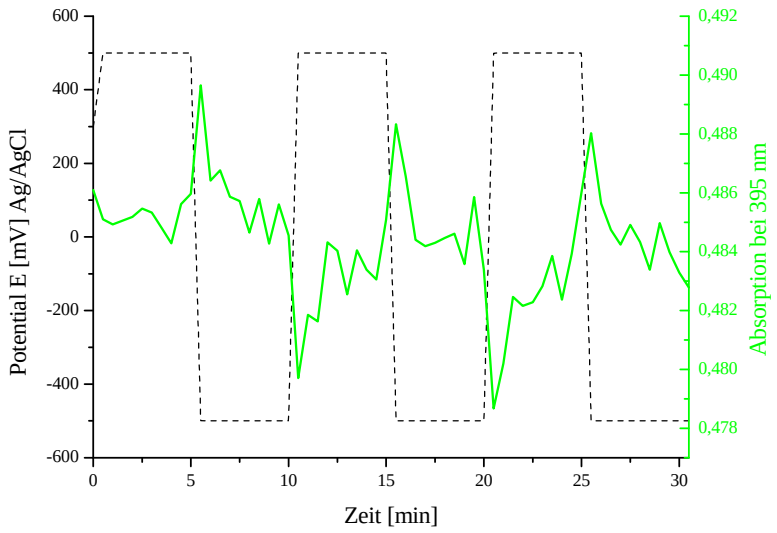

Abbildung 16: Potentialabhängige Anbindung von Ni^{2+}-Ionen an eine PPy/PSS-Glaskohlenstoffelektrode. Die Absorption in der Lösung wurde bei 395 nm gemessen, da hier Nickel sein Absorptionsmaximum besitzt. Potentialsprünge erfolgten alle 5 min von +500 mV auf –500 mV.

Es ist zu erkennen das bei einem Potential von +500 mV in den ersten 5 min keine signifikante Absorptionsänderung von Nickel in der Lösung zu erkennen ist. Bei Umschalten des Potentials nach 5 min auf –500 mV steigt die Absorption bis auf einen Absorptionswert von ca. 0,49 an um bei einem negativen Elektrodenpotential von –500 mV sofort wieder auf einen Absorptionswert von ca. 0,48 zu fallen. Dieses Verhalten wird während des Versuches noch 2 mal beobachtet.

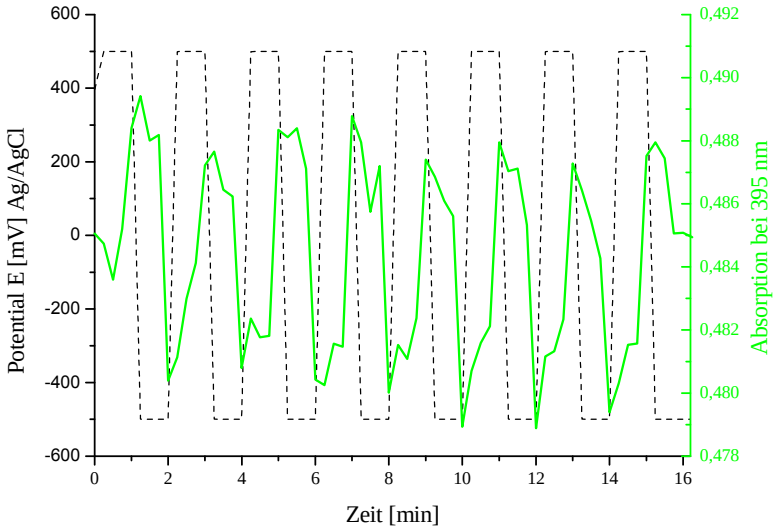

Abbildung 17: Potentialabhängige Anbindung von Ni^{2+}-Ionen an eine PPy/PSS-Glaskohlenstoffelektrode. Die Absorption in der Lösung wurde bei 395 nm gemessen, da hier Nickel sein Absorptionsmaximum besitzt. Der Test dauerte 16 min. Potentialsprünge erfolgten jede Minute von +500 mV auf –500 mV.

Bei diesem Versuch zeigen sich deutliche Absorptionssprünge in der Lösung bei 395 nm. Nach 1 min wird das Potential von +500 mV auf –500 mV umgeschaltet. Dabei ist zu sehen, dass während eines positiven Elektrodenpotentials die Absorption in der Lösung steigt, während bei einem negativen Potential eine Absorptionsabnahme in der Lösung erfolgt.

Reversible Immobilisierung von P450 BM-3 5M mit His(6)-Tag an eine PPy/PSS/Ni^{2+}-Elektrode

In diesem Versuch kamen PPy/PSS-Glaskohlenstoffelektroden zum Einsatz in die zusätzlich noch Ni^{2+}-Ionen beim Herstellungsprozess einpolymerisiert wurden. Ziel war hier eine mögliche Anbindung der P450 BM-3 5-fach Mutante (5M) über den His(6)-Tag an die PPy/PSS/Ni^{2+}-Glaskohlenstoffelektrode zu erhalten. Des weiteren

wurde die Aktivität der P450 BM-3 5M über den 12-pNCA-Test bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 und Abbildung 19 dargestellt.

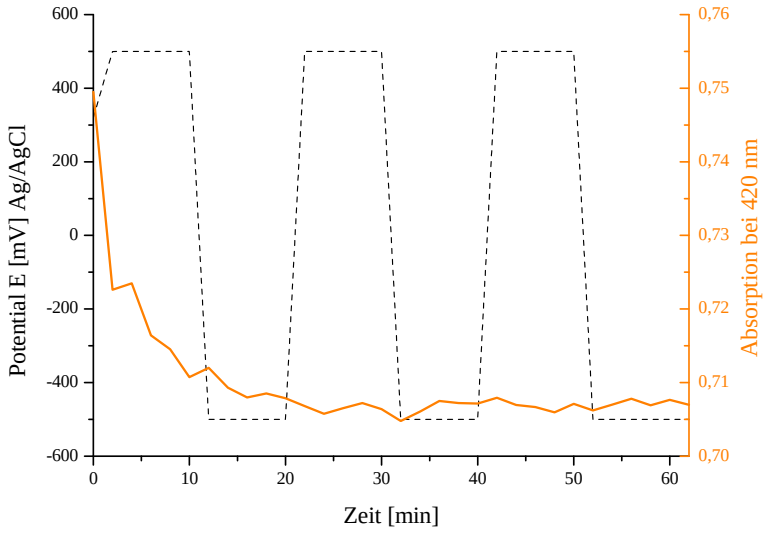

Abbildung 18: Anbindung der P450 BM-3 5M über ihren His(6)-Tag an eine mit PPy/PSS und Ni^{2+}-Ionen beschichtete Glaskohlenstoffelektrode. Die Versuchsdauer betrug 60 min. Die Potentialsprünge erfolgten alle 10 min von +500 mV bis –500 mV. Die Absorption der P450 BM-3 Monooxygenase in der Lösung lag bei 420 nm. Diese Wellenlänge wurde für die Auswertung des Versuchs herangezogen.

Zu sehen ist, dass bei Start der Messung die Absorption der P450 BM-3 5-fach Mutante bei ca. 0,75 Absorptionseinheiten liegt und kontinuierlich abnimmt bis auf einen Wert von ca. 0,71 obwohl Potentialsprünge von +500 mV bis –500 mV erfolgen. Anscheinend gibt es bei diesem Versuch keinen Einfluss des eingestellten Potentials auf die Absorptionsänderung in der Lösung. Eine mögliche Enzymimmobilisierung sollte durch die Bestimmung der Aktivität der P450 BM-3 Monooxygenase über den 12-pNCA-Test erfolgen.

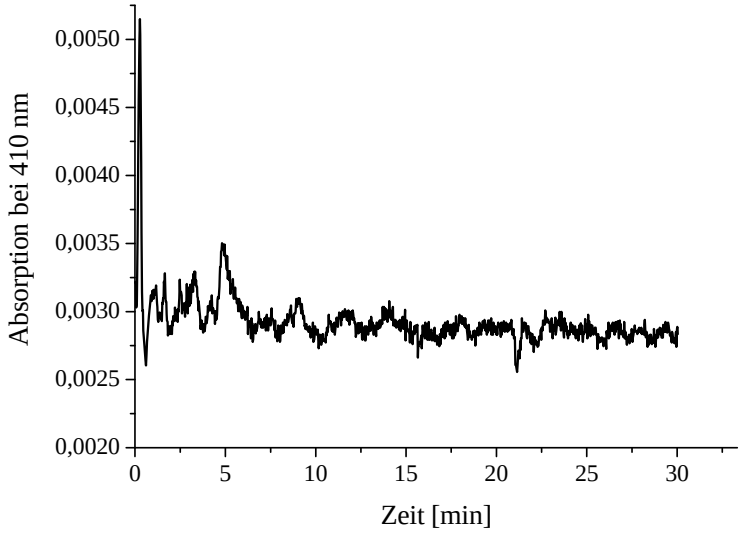

Abbildung 19: 12-pNCA-Test mit auf der PPy/PSS/Ni2+-Glaskohlenstoffelektrode immobilisierter P450 BM-3 5M. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 410 nm, da hier die Bildung des entstehenden p-Nitrophenolats detektiert wird. Die Testdauer beträgt 30 min und wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

In Abbildung 19 wird gezeigt das es zu keiner Änderung der Absorption bei einer Wellenlänge von 410 nm kommt. Daher ist davon auszugehen das die P450 BM-3 5M nicht mehr aktiv ist oder kein Enzym gebunden wurde. Das Ergebnis dieses Versuches lässt darauf schließen das die Absorptionsabnahme nach Abbildung 4.31 andere Ursachen hat.

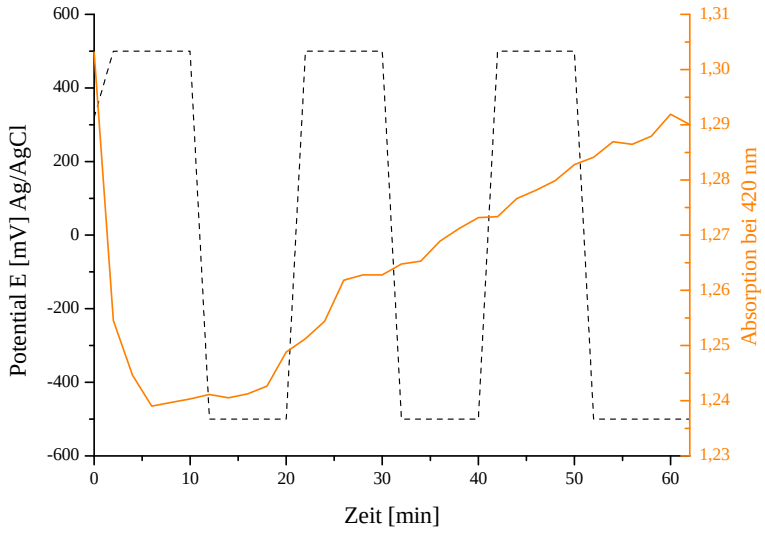

Abbildung 20: Anbindung der P450 BM-3 5M über ihren His(6)-Tag an eine mit PPy/PSS und Ni2+-Ionen beschichtete Glaskohlenstoffelektrode. Die Versuchsdauer betrug 60 min. Die Potentialsprünge erfolgten alle 10 min von +500 mV bis –500 mV. Die Absorption der P450 BM-3 Monooxygenase in der Lösung lag bei 420 nm.

Die Abbildung zeigt, dass die Absorption in der Lösung bei 420 nm in den ersten 5 min bei positivem Potential abnimmt und nach 5 min kontinuierlich zunimmt, obwohl Potentialsprünge erfolgen. Ein nach dem Versuch erfolgter, hier nicht dargestellter 12-pNCA-Test zeigte keine enzymatische Aktivität.

Reversible Immobilisierung von P450 BM-3 5M mit His(6)-Tag an eine PPy/PSS/Zn^{2+}-Elektrode

In diesem Versuch sollte die P450 BM-3 5M statt an Ni^{2+}-Ionen an Zn^{2+}-Ionen über den His(6)-Tag binden. Während bei Nickel das Standardreduktionspotential bei –0,23 mV zu finden ist, hat Zink sein Standardreduktionspotential bei –0,76 mV. Für den Versuch wurde daher 0,1 M $ZnSO_4$ * 7 H_2O in die spektroelektrochemische Messzelle gegeben und das Potential während der gesamten Versuchsdauer konstant negativ bei -400 mV gehalten. Ein Abscheidung von elementaren Zink ist daher nicht möglich. Es folgten Wasch- bzw. Verdünnungsschritte in denen das 0,1 M $ZnSO_4$ * 7 H_2O nach 15 min entfernt und durch Puffer ersetzt und später durch Puffer mit Enzym ersetzt wurde. Erst danach wurde der eigentliche Versuch gestartet.

In Abbildung 21 ist das Ergebnis der Potentialabhängigen Anbindung der P450 BM-3 5M mit His(6)-Tag an die mit PPy/PSS/Zn^{2+}-Ionen beschichtete Glaskohlenstoffelektrode zu sehen.

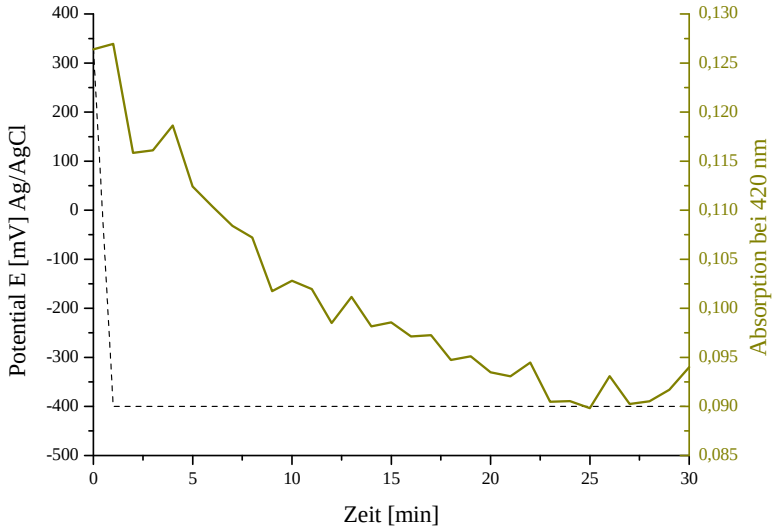

Abbildung 21: Potentialabhängige Anbindung der P450 BM-3 5M mit His(6)-Tag an eine PPy/PSS/Zn^{2+}-Ionen beschichtete Glaskohlenstoffelektrode. Das Potential wird konstant bei –400 mV gehalten. Es wird die Absorption in der Lösung bei 420 nm untersucht. Die Versuchsdauer beträgt 30 min.

In der Abbildung wird gezeigt, dass bei einem konstant negativen Potential von –400 mV die Absorption der P450 BM-3 Monooxygenase in der Lösung bei einer Wellenlänge von 420 nm von ca. 0,126 auf 0,094 Absorptionseinheiten abfällt. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da aufgrund des konstant negativen Potentials von –400 mV die P450 BM-3 5M angebunden wird und so die Absorption in der Lösung abnimmt. Die Aktivität des immobilisierten Enzyms wurde über den 12-pNCA-Test bestimmt (Abbildung 22).

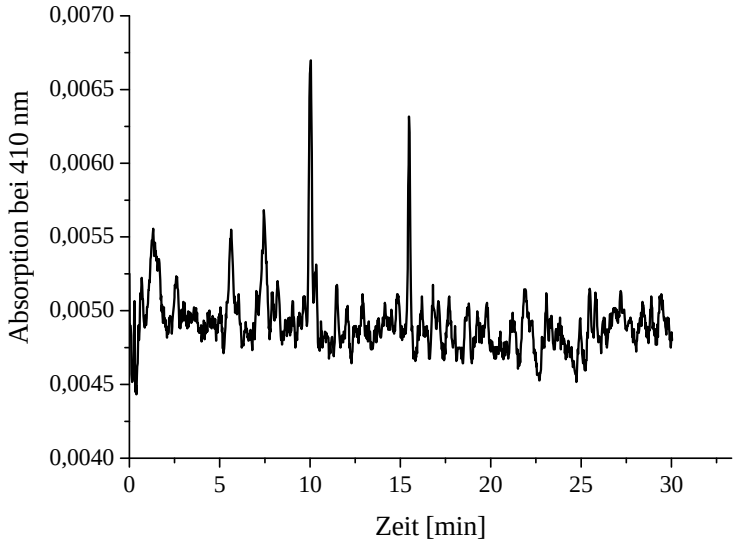

Abbildung 22: 12-pNCA-Test mit auf der PPy/PSS/Zn^{2+}-Glaskohlenstoffelektrode immobilisierter P450 BM-3 5M. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 410 nm, da hier die Bildung des entstehenden p-Nitrophenolats detektiert wird.

Die Abbildung zeigt das es zu keiner Änderung der Absorption bei einer Wellenlänge von 410 nm kommt und daher davon auszugehen ist das die P450 BM-3 5M nicht mehr aktiv ist bzw. kein Enzym gebunden wurde. Die Absorptionsabnahme im vorherigen Versuch und das Ergebnis dieses Versuches haben vermutlich andere. Die Abbildung 23 zeigt das Ergebnis einer Wiederholung des Versuchs.

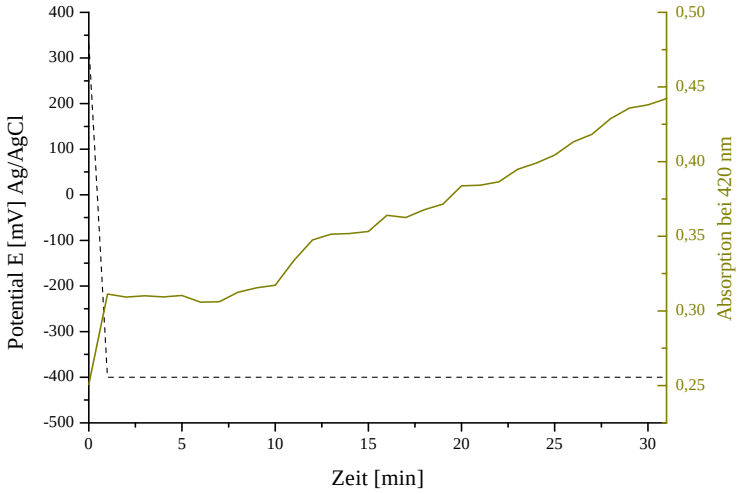

Abbildung 23: Potentialabhängige Anbindung der P450 BM-3 5M mit His(6)-Tag an eine PPy/PSS/Zn^{2+}-Ionen beschichtete Glaskohlenstoffelektrode. Das Potential wird konstant bei –400 mV gehalten. Es wird die Absorption in der Lösung bei 420 nm untersucht.

Die Wiederholung des Versuches zeigt, das während der gesamten Versuchsdauer die Absorption von P450 BM-3 in der Lösung trotz negativer Polarisation der Elektrode steigt. Nach Ende des Versuches wurde eine deutlich sichtbare weiße Trübung in der Messzelle beobachtet. Möglicherweise reagieren die Zinkionen mit dem Puffer, so das Zinkphosphat ausfällt. Aus diesem Grund wurde ein weiteres Anbindungsexperiment unternommen. Hierbei wurde die Anbindung der P450 BM-3 5M in 0,1 M NaCl-Puffer pH 4,4 als P-Puffer Ersatz untersucht. Das erhaltene Ergebnis ist in der folgenden Abbildung gezeigt.

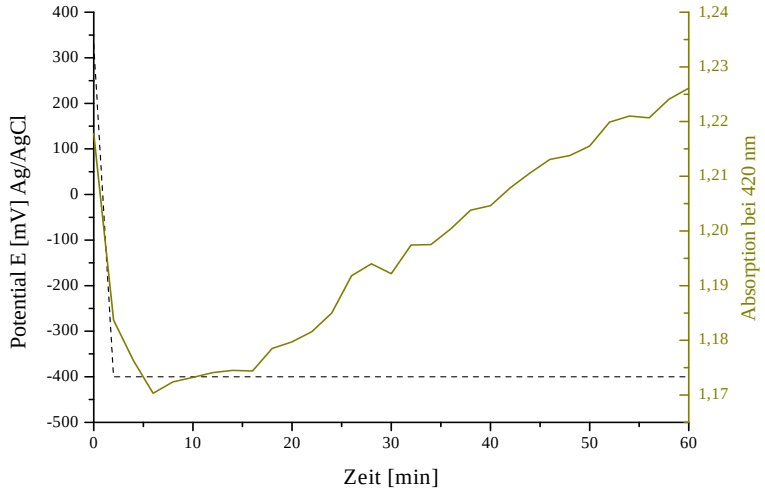

Abbildung 24: Potentialabhängige Anbindung der P450 BM-3 5M mit His(6)-Tag an eine PPy/PSS/Zn^{2+}-Ionen beschichtete Glaskohlenstoffelektrode. Die Anbindung der P450 BM-3 5M wurde in 0,1 M NaCl-Puffer untersucht. Das Potential wird konstant bei –400 mV gehalten. Es wird die Absorption in der Lösung bei 420 nm untersucht. Die Versuchsdauer beträgt 30 min.

Die Abbildung zeigt deutlich eine Absorptionszunahme bei 420 nm, obwohl das Elektrodenpotential während der gesamten Versuchsdauer negativ gehalten wurde. Nach Ende des Versuches wurde wieder eine deutlich sichtbare Trübung in der Messzelle beobachtet.

Untersuchungen zum Scale-up

Für technische Synthesen muss ein Scale-up des Reaktionssystems erfolgen. Am KWI wurden Polypyrrol-beschichtete dreidimensionale Elektroden mit einer erheblich größeren Oberfläche (V = 400 cm³, A = 35 m²) auf Basis von Kohenlstoff-Vliesen untersucht. Die werden zunächst mit einer Schicht aus leitfähigen Polymer beschichtet. In einem weiteren Schritt sollen die Enzyme in Analogie zu den oben beschriebenen Verfahren angebunden werden.

Die chemische Polymerisation von Pyrrol erfolgt mit Hilfe eines Oxidationsmittels. Häufig werden Eisen-Salze ($FeCl_3$, $Fe(NO_3)_3$) oder Peroxodisulfate ($(NH_4)_2S_2O_8$, $Na_2S_2O_8$) verwendet. Dabei entstehen Polymer-Pulver, bzw. Kolloide mit Partikel-Größen im Mikro- und Nanometer-Bereich. Die Größe dieser Partikel lässt sich unter anderem durch die Konzentration des Oxidationsmittels steuern. Diese leitfähigen Polymer-Partikel besitzen starke attraktive intermolekulare Wechselwirkungen.

Die in dieser Arbeit untersuchten Polypyrrol-Partikel wurden durch Oxidation in Pyrrol-Lösung mit und ohne Zusatz von Na-Polystyrensulfonat (NaPSS) als Gegenion und oberflächenaktiver Substanz in den folgenden Zusammensetzungen hergestellt:

x Py + y $Na_2S_2O_8$ + z NaPSS mit x, y = 0,1 bis 0,5 mol L^{-1}
und z = 0 bis 0,5 mol L^{-1}

Ohne NaPSS entstand wenige Minuten nach der Zugabe des Oxidationsmittels zur Monomer-Lösung ein schwarzer Niederschlag aus Polypyrrol, der die bei der Reduktion des Oxidationsmittels entstehenden Sulfationen (14) als Gegenionen enthält. Nach ca. 90 Minuten wurde der Niederschlag abfiltriert. Die Reinigung des Niederschlags erfolgte durch Filtration und Waschen bis in der Waschlösung keine Sulfationen mehr durch $BaCl_2$ als weißer $BaSO_4$-Niederschlag nachweisbar waren.
Wurde der Monomer-Lösung vor der Zugabe des Oxidationsmittels Na-PSS zugesetzt, fiel das feinkörnige Polymer nicht mehr als Niederschlag aus, sondern bildete ein stabiles Kolloid. Die Reinigung dieses PPy(PSS)-Kolloids erfolgte nach der Zugabe von Ethanol zur Reaktionslösung im Verhältnis 1:3 durch Sedimentation der Nano-Partikel in der Ultrazentrifuge bei 9.000 U min^{-1}. Das Zentrifugat wurde verworfen, das Sediment mit Wasser aufgeschlämmt und nach Ethanol-Zugabe erneut zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt. Die so gereinigten Polypyrrol-Partikel wurden in wässriger Lösung aufbewahrt.
Die leitfähigen PPy-Partikel wurden in elektrisch leitende Kohlenstoff-Vliese eingebracht, die eine elektrochemische Untersuchung und die Polarisation der Partikel für den Einsatz in der Wasserbehandlung ermöglichten. Vor dem Einbringen der Partikel wurden die Kohlenstoff-Vliese mit Ethanol und Wasser im Ultraschallbad gewaschen, bei 50°C getrocknet und durch Auftropfen von Ethanol (99,8 %) oder Polytetrafluorethylen (PTFE)-Dispersion (60 % in Wasser, Aldrich) vorbehandelt, um ein Eindringen der wässrigen Lösungen in das zunächst hydrophobe Vlies zu ermöglichen.
Die Beladung der Kohlenstoff-Vliese mit Polypyrrol-Partikeln erfolgte nach zwei verschiedenen Methoden (Abbildung 25):

I) Eine bestimmtes Volumen an wässriger Partikel-Dispersion wurde auf ein vorbehandeltes Kohlenstoff-Vlies aufgetropft und von diesem aufgesogen.

Diese Methode wird im folgenden als indirekte Beladung bezeichnet. Danach wurde das Vlies bei 50°C getrocknet und an der Luft aufbewahrt.

II) Auf ein vorbehandeltes Vlies wurde zunächst ein bestimmtes Volumen der Oxidationsmittel-Lösung und danach die Monomer-Lösung mit Na_2SO_4 oder NaPSS als Elektrolyt aufgetropft. Die Polymerisation fand so direkt im Vlies statt. Diese Methode wird im folgenden als direkte Beladung bezeichnet. Nach einigen Stunden Reaktionszeit wurde das Vlies bei Temperaturen bis 50°C getrocknet und an der Luft aufbewahrt.

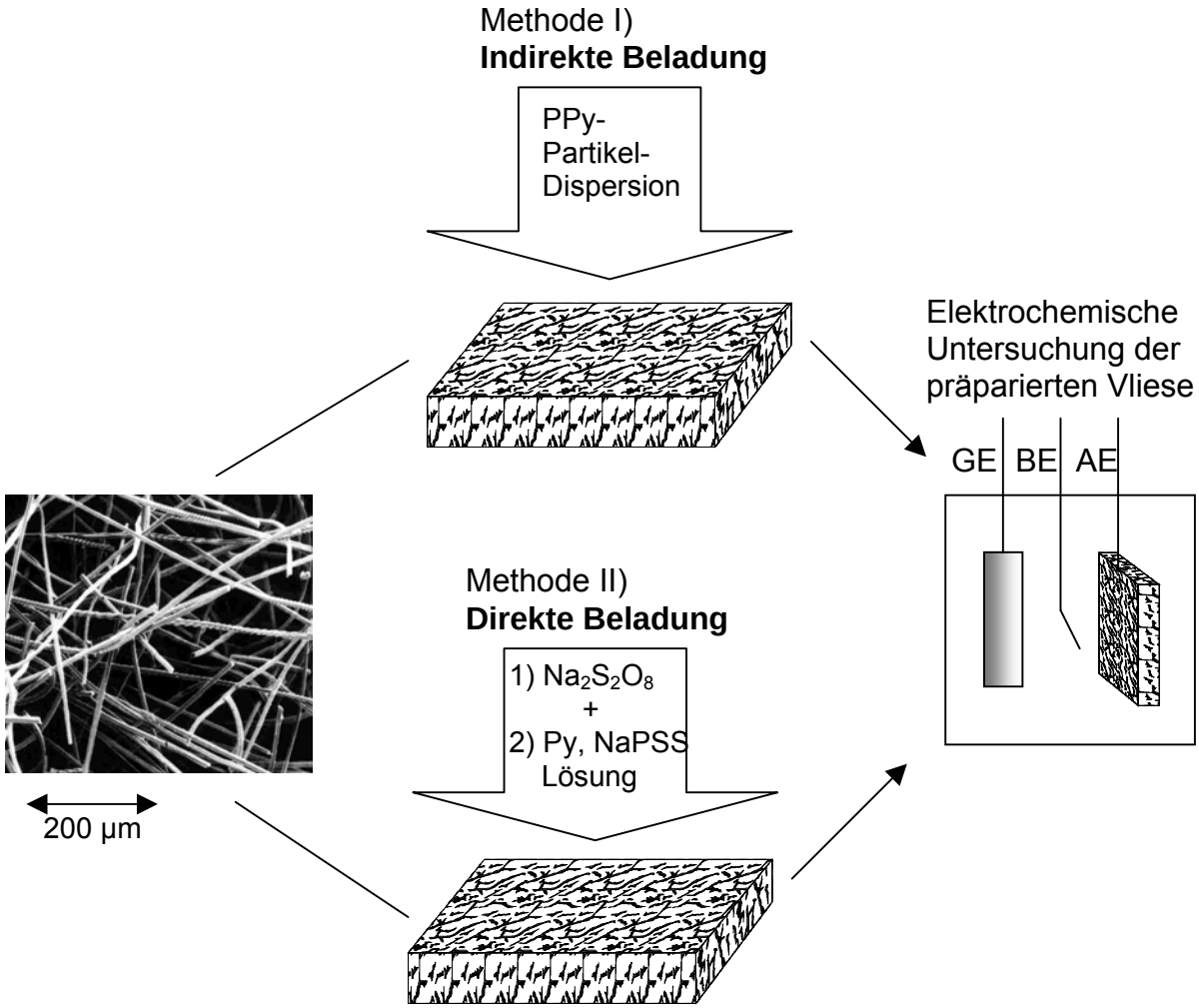

Abbildung 25: Methoden zur Beladung von Kohlenstoff-Vliesen (REM-Bild) mit Polypyrrol-Partikeln und Aufbau zur elektrochemischen Untersuchung der beladenen Vliese.

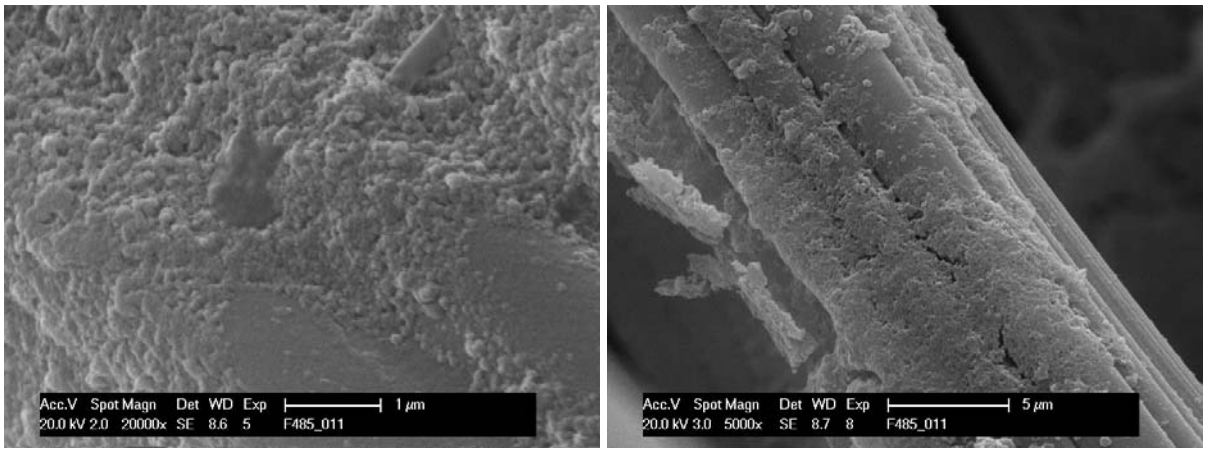

Abbildung 26: Mit Polypyrrol beschichtetet Kohlenstoff-Vliese in REM-Aufnahmen

Mit diesen Elektroden stehen dreidimensionale Elektroden mit einer erheblich größeren Oberfläche zur Verfügung, die je nach Anforderungen an das elektrochemische System für enzymatische Synthesen angepasst werden können.

Festlegung des Reaktordesign für die elektrochemische Untersuchungen gekoppelt mir einer online Analyse der Enzymaktivität mittels optischer Sensoren

Basierend auf den bisherigen Ergebnissen wurde ein Reaktordesign für den elektrochemischen Prozess entworfen. Die Abbildung 27 zeigt das entsprechende Verfahrensschaubild. Kernstück des System ist ein Reaktors mit immobilisierten P450 Monooxygenasen. Als Immobilisierungsmatrix dient ein Kohlenstoffvlies, dieses wird zunächst in einem elektrochemischen Schritt mit einem leitfähigen Polymer beschichtet. Als leitfähiges Polymer wurden bisher Polypyrrol oder Derivate von Polypyrrol untersucht, es können ebenfalls weitere leitfähige Polymere wie zum Beispiel Polyanilin eingesetzt werden. Das Kohlenstoffvlies (20 x 20 x 1 cm Kohlenstoffvlies GFA 10 von SGL Carbon) befindet sich in einem Modul aus Plexiglas. Ein Modul hat die Außenabmessung 25 x 25 x 4 cm und fasst etwa 1 l Lösung. Die elektrochemische Steuerung erfolgt mit einem Potentiostaten.
Zur Messung der Aktivität der Enzyme werden optische Sauerstoffsensoren eingesetzt (OXY-4 mini, Fa. Presens). Die Sensorscheibchen werden am Ein- und Ausgang sowie in dem Modul aufgeklebt. Dieser Sensor ändert seine optischen Eigenschaften mit veränderter Sauerstoffkonzentration. Über die Sauerstoffkonzentrationen kann die Aktivität der Enzyme bestimmt werden. Nach den Ergebnisse der Sauerstoffmessung kann die Verweilzeit der Substratlösung und das elektrische Potential angepasst werden.

Das Modul wird von unten mit der Substratlösung durchströmt. Diese Substratlösung wird zuvor mit Sauerstoff oder Luft begast. So wird sichergestellt, dass das Ko-Substrat der Monooxygenasen in einer ausreichenden Stoffmenge zur Verfügung steht. In dem Konzept ist optional eine Begasung in dem Reaktionsmodul vorgesehen.

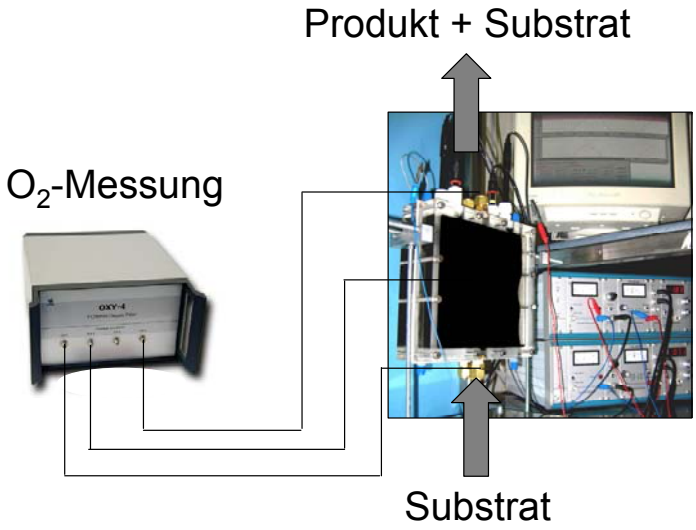

Abbildung 27: Reaktordesign und Verfahrensschema der Hydroxylierung von Fettsäuren mit immobilisierten P450 Monooxygenasen

Die Reaktionsprodukte lassen sich von nicht umgesetzten Substraten destillativ entfernen. Ölsäure ($C_{18}H_{34}O_2$) hat beispielsweise einen Siedepunkt von 360 °C, die hydroxylierte Rizinolsäure ($C_{18}H_{34}O_3$) weist einen Siedpunkt von 245 °C auf. Das Substrat kann anschließend in den Reaktor zurückgeführt werden. Durch die vorherige Immobilisierung der Enzyme und den Verzicht auf den Zusatz von Mediatoren und weiteren Substanzen sind bei der Abtrennung der Reaktionsprodukte neben dem Lösungsmittel keine weiteren Komponenten zu beachten.

Die zuvor gewonnenen hydroxylierten Fettsäuren werden anschließend einer Lactonisierung unterzogen (Wärme und pH-Wert). Bei der Lactonisierung handelt es sich um einen Ringschluss innerhalb des Substratmoleküls.

Wirtschaftlichkeit der elektrochemischen Kopplung von Fettsäure-hydroxylierenden Cytochrom P450 Monooxygenasen

Die Forschungsarbeiten im Rahmen des Teilprojektes am Karl-Winnacker-Institut zielten auf die Übertragung der positiven Laborergebnisse in einen technischen Maßstab. Zur Erreichung dieses Zieles wurde die Verbesserung der Immobilisierungseffizienz untersucht, da diese in den aktuellen Untersuchungen als eine

kritische Größe für den Transfer in einen technischen Maßstab ermittelt wurde. Die Wirtschaftlichkeit des Projektes hängen im Wesentlichen von der Erreichung dieses Ziels ab. Im Rahmen des Projektes wurde dieses Ziel nicht in einem ausreichenden Maß erreicht. In weiteren Untersuchungen sollte durch die Kombination von elektrochemischen, verfahrenstechnischen und molekularbiologischen Arbeiten diese Optimierung weiter angestrebt werden. Gelingt die optimierte Anbindung der Enzyme in einem quantitativen Maßstab werden die Erfolgsaussichten eines entsprechenden Prozesses als hoch angesehen. Die Abbildung 28 zeigt einen Vergleich der Kosten für Elektronen-Äquivalente. Es zeigt sich, dass durch die Substitution des natürlichen Cofaktors NADPH erhebliche Einsparungen möglich werden. Diese Einsparungen werden eine Vielzahl von neuen Prozessen in einem wirtschaftlichen Maß ermöglichen.

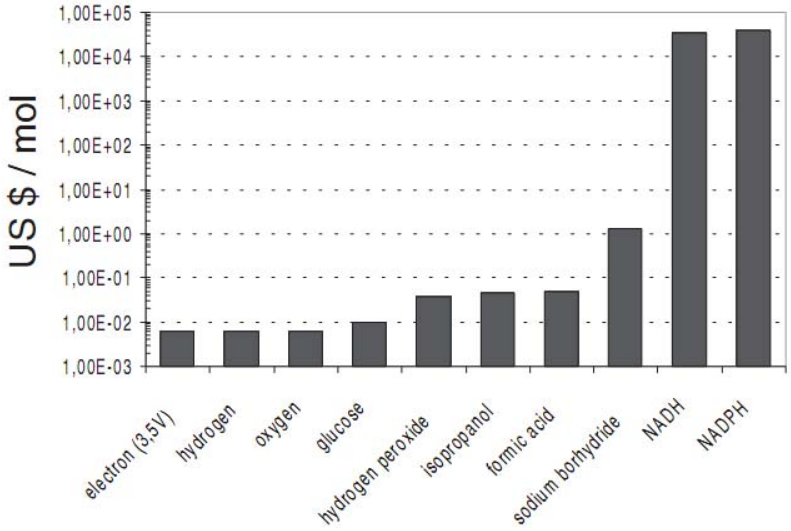

Abbildung 28: Vergleich der Kosten für Elektronen-Äquivalente nach Wandrey (2004)

II.2 Voraussichtlicher Nutzen der Forschungsergebnisse - Verwertungsplan

Die wissenschaftliche Anschlussfähigkeit ergibt sich aufgrund der Tatsache, dass es sich beim anvisierten Verfahren um eine Plattformtechnologie für biotechnologische Synthese der Riechstoffe der Lactonreihe handelt: durch Variation des als Substrat eingesetzten Fettsäure und des als Katalysator eingesetzten Enzyms sollen die unterschiedlichsten, aroma-aktiven Lactone auf Basis dieser Technologie erzeugt werden. Die Enzyme der Familie der Cytochrome P450 Monooxygenasen katalysieren eine Vielzahl von synthetisch hochinteressanten Oxyfunktionalisierungen, die neben der Lactonsynthese nicht nur in anderen Bereichen der Aromaindustrie, sondern auch in der feinchemischen und pharmazeutischen Industrie von potentieller

Bedeutung sind, da überall chirale Oxidationsprodukte von enormer Bedeutung als Ziel- oder Zwischenprodukte sind. Die wissenschaftlichen Erkenntnisse könnten somit auf die anderen wirtschaftlich bedeutende Industriebranchen ausstrahlen. Im Erfolgsfall können andere regio- und stereoselektive Hydroxylierungen mit Monooxygenasen entwickelt werden. Dieser Enzymtyp ist für entsprechende Reaktionen prädestiniert und führt zu Selektivitäten, die mit organisch-chemischer Synthese nicht erreicht werden können.

Die geplanten Biokonversionen im Enzymreaktor haben das Potential einer weitreichenden Nutzbarkeit in den verschiedensten Anwendungsgebieten, die über das konkrete Beispiel der Lactonsynthese hinausgeht. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass P450 BM-3 durch gezieltes „Enzyme Engineering“ weitere Substrate, ebenfalls nachwachsende Rohstoffe, regio- und stereoselektiv umsetzen kann. So ist es möglich, mit diesem Enzym isoprenoide Naturstoffe gezielt zu hydroxylieren und auf diese Weise bioaktive Wertstoffe zu gewinnen (z.B. Monoterpenoide, C13-Norisoprenoide).
Außerdem sollte nach Realisierung einer elektrodengestützten P450 BM-3 Biokonversion das elektrochemische Grundprinzip auf andere, katalytisch interessante Cytochrom P450-Monooxygenasen und weitere Oxidoreduktasen übertragbar sein.

Die Marktsituation der Zielprodukte hat sich seit der Antragsstellung nicht wesentlich verändert, so dass weiterhin der Markt für die Lactone als Riech- und Aromastoffe eine hohe wirtschaftliche Bedeutung hat. Beispielsweise wird γ-(R)-Decalacton als Pfirsich- und Fruchtgeschmacksstoff bzw. Riechstoff in Mengen von einigen 100 Tonnen industriell hergestellt. Neben der chemischen Synthese erfolgt die Produktion des natürlichen Aromastoffes durch partiellen mikrobiellen Abbau von Ricinolsäure (Δ-9-(R)-12-Hydroxystearinsäure), einem Bestandteil des vor allem aus Indien importierten Ricinusöls. Der Bedarf für das natürliche Produkt liegt bei ca. 20 t/a bei einem Preis von ca. 250 €/kg.

Die DECHEMA e.V. eignet sich in idealer Weise als Multiplikator für die kurzfristige Verbreitung der wissenschaftlichen Ergebnisse innerhalb der wissenschaftlich-technischen Gemeinde. Das Karl-Winnacker-Institut der DECHEMA als Institut der industriellen Gemeinschaftsforschung versteht sich als Bindeglied zwischen Forschung und Industrie. Die überwiegende Anzahl der hier bearbeiteten Projekte sind Kooperationsprojekte mit industriellen Partnern oder direkte Aufträge aus der Industrie. Zu den Projektpartnern aus der chemischen und biotechnischen Industrie,

der Lebensmittelindustrie und dem Anlagen- und Apparatebau gehören hierbei sowohl Großunternehmen (z.B. BASF, Degussa, Wacker) als auch mittelständische und kleine Unternehmen (z.B. Symrise, Bitburger Brauerei, Lange Group, Dr. Rieks GmbH, Erich Ziegler GmbH, Schmack Biogas GmbH). Aufgrund dieser Struktur ist auch nach Ende der Projektlaufzeit ein Transfer der Ergebnisse in Industrie und Forschung sichergestellt.

II.3 Fortschritt auf dem Forschungsgebiet bei anderen Stellen

Auf dem Forschungsgebiet der Substitution oder Regenerierung von Cofaktoren der P450 Monooxygenasen ist neben dem KWI der DECHEMA eine Anzahl an weiteren Gruppen aktiv. Hier werden allerdings andere Strategien (z. B. enzymatische Regenerierung) untersucht, so dass die hier vorgestellten Ergebnisse lediglich am Rande von diesen Entwicklungen beeinflusst werden.

II.4 Veröffentlichungen

Die Ergebnisse des Projektes und des Vorgängerprojektes wurden und werden auf den folgenden Veranstaltungen vorgestellt:

12.10.05	Symposium Biokonversion der FNR, Frankfurt am Main (Vortrag)
24.07.06	10th Fischer Symposium on Electrochemical Aspects of Biological and Nanoscopic Structures, Benediktbeuern (Vortrag)
29.08.06	6th European Symposium on Biochemical Engineering Science, Salzburg, Österreich (Vortrag)
27.09.06	24. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Wiesbaden (Vortrag)
20.06.07	15th International Conference on Cytochromes P450, Bled, Slowenien (Vortrag)
17.-19.02.08	Industrielle Nutzung nachwachsender Rohstoffe - Chemie, Biotechnologie, Verfahrenstechnik (Poster)
10.09.08	7th European Symposium on Biochemical Engineering Science, Faro, Portugal (Vortrag)
08.10.08	Electrochemistry - Crossing Boundaries, Gießen (Vortrag)

Die Ergebnisse und theoretischen Grundlagen der Bioelektrokatalyse mit Monooxygenasen wurden in den folgenden Veröffentlichungen beschrieben:

- D. Holtmann, K.-M. Mangold, J. Schrader (2007) Electrochemically driven bio catalysis with P450BM3 entrapped in polypyrrole as conductive polymer. In M. Seliskar and D. Rozman (eds) Cytochromes P450 - Biochemistry, biophysics,

functional genomics. Faculty of Medicine, University of Ljubljana. ISBN 978-961-6264-89-1. 84-85.

- D. Holtmann, J. Schrader (2007) Approaches to Recycling and Substituting NAD(P)H as a CYP Cofactor. In: R.D. Schmid and W. Urlacher (eds) Modern Biooxidation . Enzymes, Reactions and Applications. Wiley, Weinheim. ISBN 978-3-527-31507-9. 265-290.

Eine weitere Publikationen der Ergebnisse wurde bei dem Journal „Electrochemical communication“ eingereicht.

7. Literatur

Bartlett PN, Cooper JM. *J. Electroanal. Chem*., 1993, 362, 1.
Cosnier S, Gondran C, Watelet J-C. *Electroanalysis*, 2001, 13, 906.
Curulli A, Palleschi G. *Electroanalysis*, 1997, 9, 1107.
Estabrook RW, Faulkner KM, Shet MS, Fisher CW. In: Johnson EF, Waterman MR (eds.) 1996: *Methods in Enzymology vol. 272*, Acad. Press, New York, 44-51
Foulds NC, Lowe CR. *Anal. Chem*., 1988, 60, 2473.
Habermüller K, Ramanavicius A, Laurinavicius V, Schuhmann W. *Electroanalysis*, 2000, 12, 1383.
Heinze J. *Topics in Curr. Chem*., 1990, 152, 1.
Kros A, van Hövell SWFM, Sommerdijk NAJM, Nolte RJM. *Adv. Mater*, 2001, 13, 1555.
Mousty C, Galland B, Cosnier S. *Electroanalysis*, 2001, 13, 186.
Ramanavicius A, Habermüller K, Csöregi D, Laurinavicius V, Schuhmann W. *Anal. Chem*., 1999, 71, 3581.
Roberts G, Abbott A, Cullis P, Ahmed F, Primrose W. 2001, Patent no. EP1119693
Schopf G, Koßmehl G. Adv. in Polymer Sci., Vol. 129, Springer, Berlin, 1997.
Vilker VL, Reipa V, Mayhew M, Holden MJ. *JAOCS* 1999, 76(11), 1283-1289
Wallace GG, Kane-Maguire LAP. *Adv. Mater*., 2002, 14, 953.
Wandrey, C. *Chem Rec*. 2004, 4(4), 254
Willner I, Katz E. *Angew. Chem., Int. Ed*., 2000, 39, 1180.
Yasuzawa M, Kunugi A. *Electrochem. Commun*., 1999, 1, 459
Zhang Z, Nassar AF, Zhongqing L, Schenkman JB, Rusling JF. 1997, *J Chem Soc,* Faraday Trans. 1997, 93(9), 1769-1774