

Biotechnologie

Enzymgesteuerte Indigoproduktion

THOMAS HEINE¹, CAROLIN GROßMANN¹, SARAH HOFMANN¹, DIRK TISCHLER^{1, 2}¹ AG UMWELTMIKROBIOLOGIE, TU BERGAKADEMIE FREIBERG² NG MIKROBIELLE BIOTECHNOLOGIE, RUHR-UNIVERSITÄT BOCHUM

Indole is an important compound in nature and is present in many pathways. First, an overview is given on the oxidative conversions of indole and respective products formed. A focus is put on the formation of pure indigo and some derivatives. Thus, flavin-dependent monooxygenases (styrene epoxidases) were employed which allow the selective oxygenation of indole leading to pure products without the formation of by-products as indirubin or isoindigo.

DOI: 10.1007/s12268-018-0938-1
© Springer-Verlag 2018

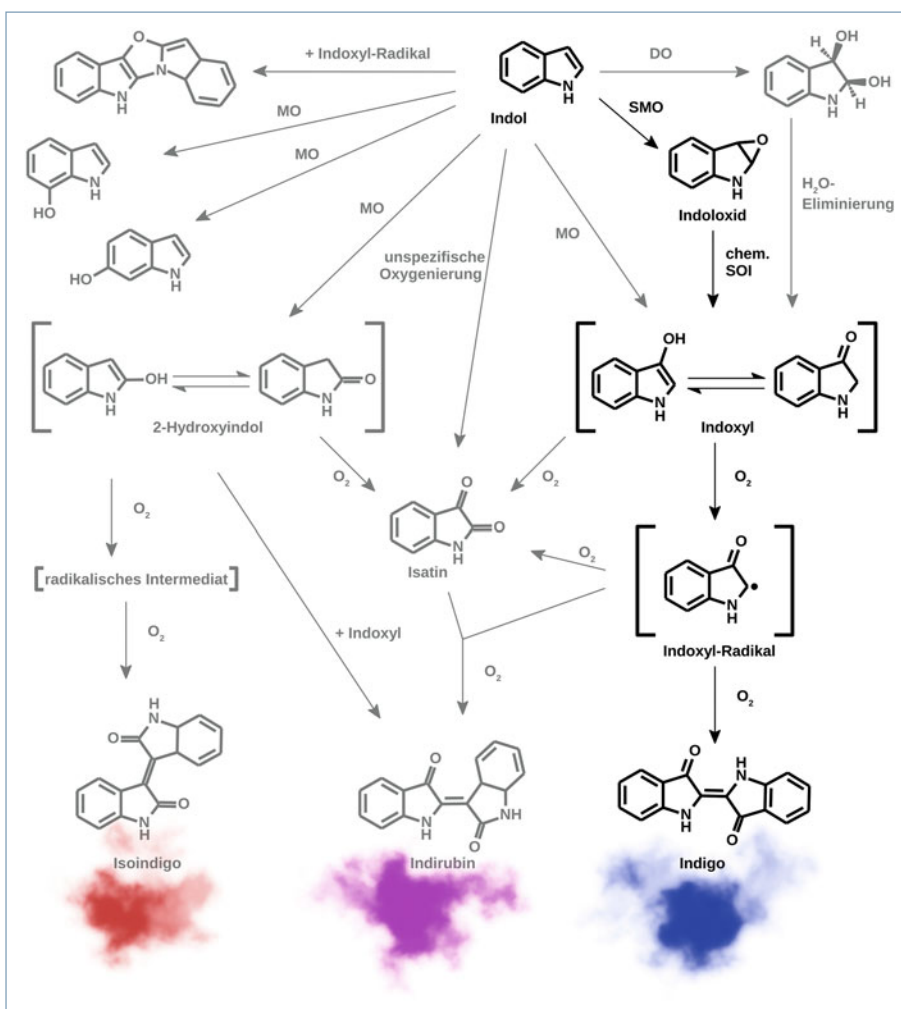
■ Indol ist ein natürliches Produkt aus dem Tryptophanstoffwechsel und wird durch eine Tryptophanase gebildet. Dazu sind zahlrei-

che Mikroorganismen in der Lage, welche oft die überschüssigen Mengen an Indol ausscheiden. Dabei kann es als Signalmolekül

wirken und verschiedenste zelluläre Prozesse beeinflussen. Der genaue Wirkmechanismus dazu ist noch nicht aufgeklärt, könnte aber auf Interaktion des hydrophoben Indols mit Zellmembranen zurückzuführen sein [1]. Um Stress zu vermeiden, können einige Mikroben Indol als Kohlenstoffquelle nutzen, wohingegen andere es durch Bildung von Indigo entgiften. Letzteres ist nahezu unlöslich in Wasser und daher nicht bioverfügbar. Für beide mikrobiellen Aktivitäten ist eine initiale Aktivierung durch Sauerstoff nötig. Es ist also nicht überraschend, dass zahlreiche Enzyme (Dioxygenasen [DO]: Naphthalin-DOs, Toluol-DOs; Monooxygenasen [MO]: P450-MOs, Styrol-MOs, Baeyer-Villiger-MOs, Toluol-MOs) in der Lage sind, Indole und seine Derivate zu oxygenieren (**Abb. 1**). Typischerweise liefern Enzyme aber neben Indigo weitere Produkte wie Indirubin und Isoindigo. Eine selektive Indigobildung ist daher schwer zugänglich. Die ist aber von großer Bedeutung, da zahlreiche Indigoderivate pharmakologisch aktiv sind oder potenzielle Bausteine für die chemische- und Halbleiterindustrie darstellen [2–4]. Im letzteren Fall wurden z. B. dünne Filme aus Indigo als organischer Halbleiter verwendet. Darüber hinaus sind Indigo und seine Derivate bedeutende Farbstoffe in der Textil- und Nahrungsmittelindustrie (E 132). Das seit der Antike bekannte Purpur (6,6'-Dibromindigo) ist bis heute einer der teuersten verwendeten Farbstoffe.

Geeignete Enzyme für eine selektive Indigoproduktion

Bei der Produktion von Styrol-Monooxygenasen (SMOs) wird in Komplexmedium oft die Bildung von Indigo beobachtet, was auf einer Oxygenierung von Indol und dessen Umsetzung zu Indigo in Gegenwart von Luftsauer-



◀ **Abb. 1:** Enzymatische Oxygenierung von Indol zu Indigo. Der Weg zu reinem Indigo, wie er von Gruppe-E-Flavoprotein-Monooxygenasen katalysiert wird, ist in Schwarz dargestellt. Weitere Möglichkeiten, Indol zu aktivieren, sind in Grau angegeben. MO: Monooxygenase; DO: Dioxygenase; SMO: Styrol-Monooxygenase; SOI: Styroloxid-Isomerase; chem.: Umlagerungsreaktion/autokatalytisch.

stoff zurückzuführen ist. Allerdings entsteht nach der SMO-katalysierten Reaktion – im Gegensatz zu anderen Oxygenasen – ein reiner Farbstoff, und es konnten bisher keine Nebenprodukte detektiert werden [5]. Dies galt es genauer zu untersuchen, um so zu klären, ob diese Epoxidasen wirklich nur ein Produkt liefern und wie das mechanistisch möglich ist.

Es wurden vier Epoxidasen (*GpStyA*, *RoStyA1*, *VpStyA1* und *AbStyA*) ausgewählt und entsprechend bereits publizierter Methoden kloniert und mittels eines pET-Systems in *Escherichia coli* BL21 (DE3) exprimiert [6]. Diese Enzyme stammen alle aus Bodenbakterien und können der Gruppe E der Flavoprotein-Monooxygenasen (Styrol-Monooxygenasen u. Ä.) zugeordnet werden [7]. Sie nutzen reduziertes Flavinadenindinukleotid für ihre Katalyse, welches durch eine assoziierte Nikotinamid-abhängige (NADH) Reduktase bereitgestellt wird. Alle bisher untersuchten Vertreter sind in der Lage, Indigo zu bilden. Jedoch ist die physiologische Rolle der meisten bisher untersuchten Gruppe-E-Enzyme die Initiation des Styrolabbaus, und daher ist die Epoxidierung von Indol nur auf die hohe Strukturähnlichkeit zurückzuführen. Neueste Untersuchungen legen allerdings nahe, dass einige Vertreter dieser Gruppe tatsächlich in den Abbau und die Detoxifizierung von Indol involviert sind [1]. Drei der untersuchten Epoxidasen (*RoStyA1*, *VpStyA1* und *AbStyA*) sind in ebenso einem Gencluster situiert. Der evolutionäre Hintergrund ist bisher unklar und genauso, inwieweit substratabhängige Anpassungen auf Proteinebene erfolgt sind. Beim Vergleich der Aktivitäten und Umsatzraten sind diesbezüglich keine klaren Tendenzen zu erkennen (**Tab. 1**).

Problematik der Aufarbeitung von indigoiden Farbstoffen

Da Indigo praktisch wasserunlöslich ist und in vielen gängigen organischen Lösungsmitteln schlecht aufgenommen werden kann, ergeben sich einige Herausforderungen bei der Aufreinigung des Farbstoffs. Zur Textilfärbung wird dieser üblicherweise durch Reduktion in die wasserlösliche, farblose Leukoform überführt und im Anschluss wieder zu Indigo oxidiert. Die reduzierte Form ist jedoch insbesondere im Fall von substituierten Derivaten häufig instabil und kann zum Zerfall bzw. Verlust der Substituenten führen. Daher eignen sich polare organische Lösungsmittel eher für die Extraktion der indigoiden Farbstoffe.

Tab. 1: Auswahl von Indolen, die durch Gruppe-E-Epoxidasen umgesetzt werden können. Das Modellsubstrat Styrol wird von allen Enzymen zu (*S*)-Styroloxid oxidiert. Verschiedene Indolderivate konnten erfolgreich zur Indigobildung herangezogen werden, wohingegen andere nicht umgesetzt wurden (z. B. 4-Methoxyindol, 5- und 7-Nitroindol).

Substrat	Produkt	Kenngroße	<i>GpStyA</i>	<i>RoStyA1</i>	<i>VpStyA1</i>	<i>AbStyA</i>
Styrol	Styroloxid	Aktivität [mU mg ⁻¹]	570 ± 90	121 ± 22	121 ± 9	139 ± 16
Indol	Indigo λ _{max} : 670 nm	Aktivität [mU mg ⁻¹] [8]	38	21	97	85
6-Fluorindol	6,6'-Difluorindigo λ _{max} : 500 nm	Relative Aktivität [%]	59	10	30	39
6-Chlorindol	6,6'-Dichlorindigo λ _{max} : 520 nm	Relative Aktivität [%]	60	106	18	54
6-Bromindol	6,6'-Dibromindigo λ _{max} : 520 nm	Relative Aktivität [%]	46	100	17	41

Die relative Aktivität für halogenierte Farbstoffe bezieht sich auf die gemessene Indigobildung für das jeweilige Enzym.

Das Substratspektrum der eingesetzten Monooxygenasen wurde zunächst in kleinem Maßstab eruiert. Im Anschluss wurden Scale-up-Versuche (25 ml, 6 mg Substrat, 3 mg Enzym) mit gereinigtem Enzym für verschiedene halogenierte und Methoxy-substituierte Indole durchgeführt. Dabei wurde das benötigte NADH durch das wesentlich preiswertere Analogon 1-Benzyl-1,4-dihydronikotinamid (BNAH) ersetzt. Dieses konnte in stöchiometrischen Mengen eingesetzt werden und ermöglicht die Vereinfachung des Reaktionssystems, da auf eine Regeneration des Kofaktors verzichtet werden konnte [9]. Zudem wurden Ganzzellumsätze mit entsprechenden rekombinanten Konstrukten untersucht. Bei diesen war aber die Aufarbeitung der Produkte nicht ohne hohe Verluste möglich und daher keine umfassende Analyse.

Die erhaltenen indigoiden Farbstoffe wurden zunächst durch wiederholte Zentrifugation pelletiert und gewaschen, um eine möglichst hohe Reinheit zu gewährleisten, getrocknet und gewogen. Es konnten Ausbeuten von bis zu 67 Prozent erreicht werden (*GpStyA* 6-Fluorindol: 31 %, 6-Chlorindol: 41 %, 6-Bromindol: 52 %; *VpStyA1* Indol: 43 %, 5-Methoxyindol: 67 %, 6-Methoxyindol: 51 %, 7-Methoxyindol: 16 %). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass im Fall von halogenierten Indolen größere und/oder elektronegativere Substituenten bevorzugt werden. Außerdem beeinflusst die Position der Substituenten am Ring die Gesamtausbeute.

Es konnte auch gezeigt werden, dass es mit Einsatz der SMO möglich ist, gemischt substituierte Indigoderivate herzustellen. So wurde für *VpStyA1* nach Zugabe eines Substrat-

gemisches von Indol und 6-Bromindol ein Umsatz zu 6-Bromindigo von 50 Prozent erreicht. Die Reinheit der erhaltenen Produkte vom Scale-up wurde mittels ¹H-NMR verifiziert. Es können auch Ganzzellumsätze in Betracht gezogen werden, was sich positiv auf die Langzeitstabilität und Ausbeute auswirken sollte. Hier muss dann allerdings eine aufwendigere Isolation der Produkte etabliert werden.

Es ist bisher nicht klar, wieso Gruppe-E-Monooxygenasen die Bildung von nur einem Produkt forcieren. Es wird angenommen, dass in Analogie zum Styrolumsatz auch ein Epoxid gebildet wird (Indol-2,3-oxid), welches zu Indoxyl zerfällt und unter Sauerstoffeinwirkung spontan zu Indigo dimerisiert. Jedoch konnten bisher weder Indol-2,3-oxid noch Indoxyl analytisch nachgewiesen werden. Neuere Untersuchungen legen zudem die Bildung eines Diols anstelle eines Epoxids nahe [1]. Um letztlich die Bildung von Derivaten wie Indirubin oder Isoindigo zu verhindern, muss das instabile Indoxyl von Zerfalls- und Nebenprodukten wie Isatin abgeschirmt werden (**Abb. 1**). Daher ist es wahrscheinlich, dass die Dimerisierung noch innerhalb der schützenden Umgebung des Enzyms stattfindet. Es bleiben allerdings noch Fragen offen, um den Reaktionsverlauf vollständig abbilden zu können.

Neue Perspektiven für indigoide Farbstoffe

Die industrielle Synthese von Indigo geschieht heute auf Basis eines fast 100-jährigen Verfahrens im Maßstab von mehreren Tausend Tonnen pro Jahr. Einige Untersuchungen konnten zeigen, dass darüber hinaus auch

Derivate des Indigos von großem industriellen Interesse sein können. Jedoch sind diese schlechter zugänglich, da die chemische Synthese wesentlich aufwendiger ist. Die enzymatische Produktion indigoide Farbstoffe bzw. Synthesebausteine kann hier ansetzen und diese in ökologischen Prozessen bereitstellen. Insbesondere Gruppe-E-Monooxygenasen sind hierbei hervorzuheben, da mit diesen erstmalig eine Minimierung von Nebenprodukten erzielt werden konnte.

Danksagung

Wir danken der AG Umweltmikrobiologie und Lucas Siegel (TU Bergakademie Freiberg) für die Unterstützung bei der Analytik. Das Projekt wurde durch Sächsische Aufbaubank (100263733) und DECHEMA (Max-Buchner Stipendium MBFSt 3339 für Dirk Tischler) gefördert. ■

Literatur

- [1] Sadauskas M, Vaitekūnas J, Gasparavičiūtė R et al. (2017) Indole biodegradation in *Acinetobacter* sp. strain O153: genetic and biochemical characterization. *Appl Environ Microbiol* 83, doi: 10.1128/AEM.01453-17
- [2] Dua A, Chauhan K, Pathak H (2014) Biotransformation of indigo pigment by indigenously isolated *Pseudomonas* sp. HAV-1 and assessment of its antioxidant property. *Biotechnol Res Int*, doi: 10.1155/2014/109249
- [3] Glowacki ED, Voss G, Leonat L et al. (2012) Indigo and tyrian purple – from ancient natural dyes to modern organic semiconductors. *Isr J Chem* 52:540–551
- [4] He B, Pun AB, Zherebetskyy D et al. (2014) New form of an old natural dye: bay-annulated indigo (BAI) as an excellent electron accepting unit for high performance organic semiconductors. *J Am Chem Soc* 136:15093–15101
- [5] Heine T, Tucker K, Okonkwo N et al. (2017) Engineering styrene monooxygenase for biocatalysis: reductase-epoxidase fusion proteins. *Appl Biochem Biotechnol* 181:1590–1610
- [6] Riedel A, Heine T, Westphal AH et al. (2015) Catalytic and hydrodynamic properties of styrene monooxygenases from *Rhodococcus opacus* 1CP are modulated by cofactor binding. *AMB Express* 5:112
- [7] Tischler D, Gröning JAD, Kaschabek SR et al. (2012) One-component styrene monooxygenases: an evolutionary view on a rare class of flavoproteins. *Appl Biochem Biotechnol* 167:931–944
- [8] Li QS, Schwaneberg U, Fischer P et al. (2000) Directed evolution of the fatty-acid hydroxylase P450 BM-3 into an indole-hydroxylating catalyst. *Chemistry* 6:1531–1536
- [9] Paul CE, Tischler D, Riedel A et al. (2015) Nonenzymatic regeneration of styrene monooxygenase for catalysis. *ACS Catal* 5:2961–2965



Thomas Heine, Carolin Großmann, Sarah Hofmann und Dirk Tischler (v. l. n. r.)

Korrespondenzadresse:

Jun.-Prof. Dr. Dirk Tischler
 NG Mikrobielle Biotechnologie
 Ruhr-Universität Bochum
 Universitätsstraße 150
 D-44780 Bochum
 Tel.: 0234-32-22656
 dirk.tischler@rub.de