

Biokatalyse

Chirale Epoxidierung von Aryl-Alkyl-Ethern aus Lignin

DANIEL EGGERICHS¹, ANNA C. LIENKAMP¹, THOMAS HEINE², CAROLIN MÜGGE¹, DIRK TISCHLER¹¹ NG MIKROBIELLE BIOTECHNOLOGIE, RUHR-UNIVERSITÄT BOCHUM² AG UMWELTMIKROBIOLOGIE, TU BERGAKADEMIE FREIBERG

Processing of lignin provides access to mono-aromatic compounds with a styrene-like structure. The vinyl sidechain can be attacked by monooxygenases, such as styrene or indole monooxygenases, to yield enantiopure epoxides. The obtained epoxides can be converted into valuable products, either enzyme- or non-enzyme driven. This provides access to drug-like molecules and technically relevant synthesis precursors. Herein, we report the setup of a simple screening strategy for useful epoxidases.

DOI: 10.1007/s12268-019-0219-7
© Springer-Verlag 2019

■ Auf der Suche nach langfristig etablierbaren Alternativen zu einer vorwiegend petrochemiebasierten Wirtschaft werden Technologien, die nachwachsende Rohstoffe in Plattformchemikalien umwandeln können, immer wichtiger. Lignocellulosebasierte Verfahren bieten interessante und vielversprechende Optionen, konventionelle Prozesse zu ergänzen oder gar zu ersetzen [1, 2]. Dabei spielen

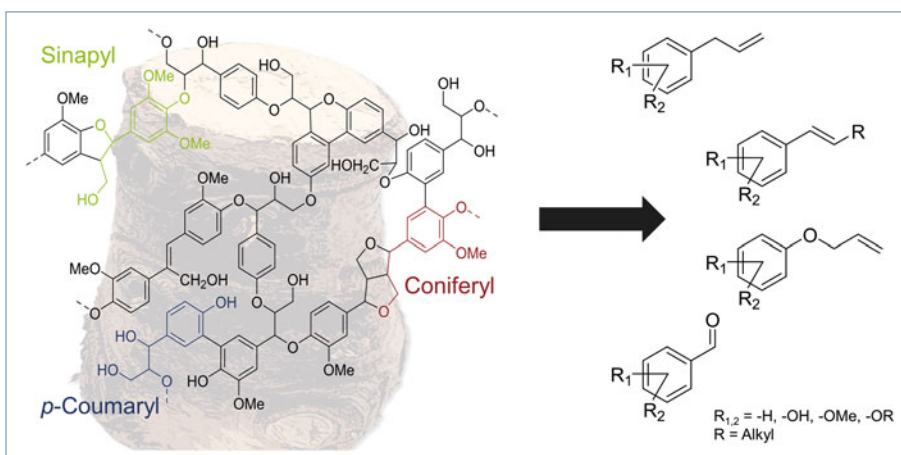
zwei Aspekte eine entscheidende Rolle: Lignocellulose ist erstens ein nachwachsender Rohstoff, der vielfach als Abfallprodukt in der Agrarwirtschaft anfällt. Zweitens stellt Lignocellulose diverse Bausteine für verschiedene Prozesse bereit, da es in eine aromatische Fraktion – Lignin – und Cellulosen gespalten werden kann. Aktuell wird hauptsächlich die in Verfahren wie dem Kraft- oder

Soda-Verfahren generierte Cellulose technisch genutzt, etwa zur Papier- oder Biotreibstoffherstellung [3]. Die aromatische Fraktion solcher Prozesse, etwa 50 Millionen Tonnen Lignin jährlich, findet kaum Anwendung – sie wird vielfach zur Energiegewinnung genutzt und verbrannt [1]. Dabei stellt Lignin den wohl größten natürlichen Lieferanten für aromatische Bausteine dar (Abb. 1), dessen Potenzial bis dato nicht einmal ansatzweise ausgenutzt wird.

Aus Verfahren wie dem Organosolv- oder Soda-Verfahren isoliertes Lignin kann zur Generierung von Sinapylalkohol, Coniferylalkohol, *p*-Coumarylalkohol und anderen mehrfach substituierten aromatischen Substanzen in großen Mengen genutzt werden. Zudem ist es auch möglich, aromatische Bausteine mit der Grundstruktur des Styrols zu gewinnen, wie Eugenol, Isoeugenol und andere Aryl-Alkyl-Ether mit nicht-aromatischen Doppelbindungen [4–6]. Je nach Behandlungsverfahren und Ligninquelle erhält man unterschiedliche Anteile dieser Bausteine, eine Kanalisierung hin zu einheitlichen Produkten ist daher recht aufwendig [7]. In der Regel wird eine Mischung von Hauptkomponenten erhalten, die zudem schwer löslich in wässrigen Systemen sind (z. B. Eugenol: 2,46 g/l bei 25 °C). Daher bedarf es spezieller selektiver und stabiler Katalysatoren für eine weitere Wertschöpfung, die idealerweise eine große Substratbreite hin zu wenigen, strukturell sinnvollen Bausteinen umwandeln können. Hier fokussieren wir uns auf solche, die nur den Styrolgrundkörper erkennen und selektiv an der nicht-aromatischen Doppelbindung epoxidieren: Flavin-abhängige Monooxygenasen der Gruppe E [8, 9].

Selektive Monooxygenasen für die chirale Epoxidierung

Beispielhaft wurden zwei Flavin-abhängige Monooxygenasen (EC 1.14.14.11) zur Untersuchung ausgesucht, eine Styrol-Monooxygenase (SMO, *GrStyA*, *Accession*: ASR05591) [10] und eine Indol-Monooxygenase (IMO, *GnIndA*, *Accession*: WP_028028710) [11]. Das



▲ **Abb. 1:** Lignin stellt die größte nachwachsende Quelle an aromatischen Grundbausteinen dar und ist unter anderem aus Sinapyl-, Coniferyl- und *p*-Coumaryl-Bausteinen aufgebaut. Abhängig vom Verfahren werden beim Aufschluss von Lignin unterschiedliche aromatische Verbindungen erhalten, welche neben dem aromatischen Kern stets mehrere Etherfunktionalitäten gemeinsam haben.

Enzym *GrStyA* aus *Gordonia rubripertincta* CWB2 ist das einleitende Enzym des Styrolabbauweges dieses Stamms. Dabei ist ungewöhnlich, dass *G. rubripertincta* Styrol über einen Glutathion-abhängigen Weg metabolisiert und sich durch ein besonders breites Substratspektrum auszeichnet. Das Enzym *GnIndA* aus *Gemmobacter nectariphilus* DSM 15620 aktiviert Indol zu einem Epoxid während des Indolabbaus [9, 11]. Beiden ist gemein, dass die assoziierte Reduktase das reduzierte Flavin NADH-abhängig zur Verfügung stellt oder diese auch mithilfe alternativer Elektronendonoren angetrieben werden kann. Das macht die Monoxygenase/Reduktase-Systeme zu interessanten Enzymen für potenzielle Anwendungen.

Beide Enzyme wurden als rekombinante Varianten mit einem Histidin-10-Tag produziert (15–50 mg/l Expressionskultur) und via Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Mithilfe von Standardenzymtests konnte die spezifische Aktivität einfach ermittelt werden (**Tab. 1**, [11, 12]).

Aus früheren Versuchen war bekannt, dass man die Konzentration an Elektronendonoren und -akzeptoren für jedes Enzym optimieren muss [11, 12]. Da die Enzyme verschiedenartig substituierte Styrolanaloga umsetzen sollen, musste auch der Test dahingehend optimiert werden. Dazu sollte zum einen die Substratverfügbarkeit über den Einsatz von Lösungsmitteln erhöht und zum anderen das Anwendungsfenster für den Biokatalysator ermittelt werden (**Tab. 1**). Mit dem optimierten Test sollte dann der Umsatz potenzieller Substrate überprüft werden und Auskunft liefern, ob Methoxy-substituierte Styrolanaloga selektiv epoxidiert werden können.

Erfreulicherweise konnte das Screeningssystem an verschiedenen Stellen optimiert werden (**Tab. 1**, oberer Teil). Zum einen zeigte sich eine breite Verträglichkeit der Enzyme mit verschiedenen wassermischbaren organischen Lösungsmitteln, zum anderen konnte 1-Benzyl-1,4-dihydronikotinamid (BNAH) als synthetischer Elektronendonoren effizient genutzt werden. Dieser bietet eine kostengünstige Alternative zur Nutzung von nikotinamidbasierten Kofaktoren.

Biotransformationen mit Styrolanaloga

Zum Umsatz der verschiedenen Substrate wurden die Enzyme *GrStyA* und *GnIndA* in *Escherichia coli* überproduziert und affinitätschromatographisch gereinigt. Biotransformationen fanden im 200-Mikroliter-Maß-

Tab. 1: Ausgewählte Enzymparameter der Monoxygenasen *GrStyA* und *GnIndA* für die Epoxidierung von Styrol zu (*S*)-Styroloxid zur Optimierung des Enzymtests (oben) und Umsatz anderer Substrate unter optimierten Standardbedingungen (unten) [12]. Die Umsatzbestimmungen erfolgten mittels HPLC-Analyse.

Parameter	Typ Monoxygenase:		SMO	IMO
	Bezeichnung:		<i>GrStyA</i>	<i>GnIndA</i>
Beobachtete Aktivität ^a	Styrol als Substrat [nmol min ⁻¹ mg ⁻¹]		50 ± 8	212 ± 7
Elektronendonoren	Optimale BNAH-Konzentration [mM]		10	15
Elektronenakzeptoren	Optimale FAD-Konzentration [µM]		62,5	50
Biotransformation	Maximaler Umsatz nach [min]		80	30
Enantioselektivität	ee [%]		> 95	80
Lösungsmittelstabilität	%Aktivität ^b	Methanol (10 Vol.-%)	42 ± 4	156 ± 5
		Ethanol (10 Vol.-%)	91 ± 11	130 ± 5
		Aceton (10 Vol.-%)	20 ± 2	65 ± 2
		DMSO (10 Vol.-%)	83 ± 8	64 ± 3
		Acetonitril (10 Vol.-%)	0 ± 0	122 ± 7
Biotransformation	Produktbildungsrate [%] ^c	Styrol	100	100
		3-Methoxystyrol	88	60
		4-Methoxystyrol	< 1	–
		4-Hydroxystyrol	–	–
		3,4-Dimethoxystyrol	–	–
		4-Allyl-1,2-Dimethoxybenzol	–	–
		Allylphenylether	7	2
		Eugenol	–	–
		Isoeugenol	–	–

^a Produktbildungsrate nach 2 h Biotransformation in Gegenwart von 4 Vol.-% Methanol.

^b Produktbildungsrate von Styroloxid aus Styrol bezogen auf die Standardaktivität (100 %) unter gleichen Bedingungen, Standardabweichung bezogen auf 100-%-Wert.

^c Rate an gebildetem Epoxid relativ zur gebildeten Menge an Styroloxid unter optimalen Bedingungen (*GrStyA*: 4 Vol.-% DMSO; *GnIndA*: 10 Vol.-% MeOH).

SMO: Styrol-Monoxygenase; IMO: Indol-Monoxygenase.

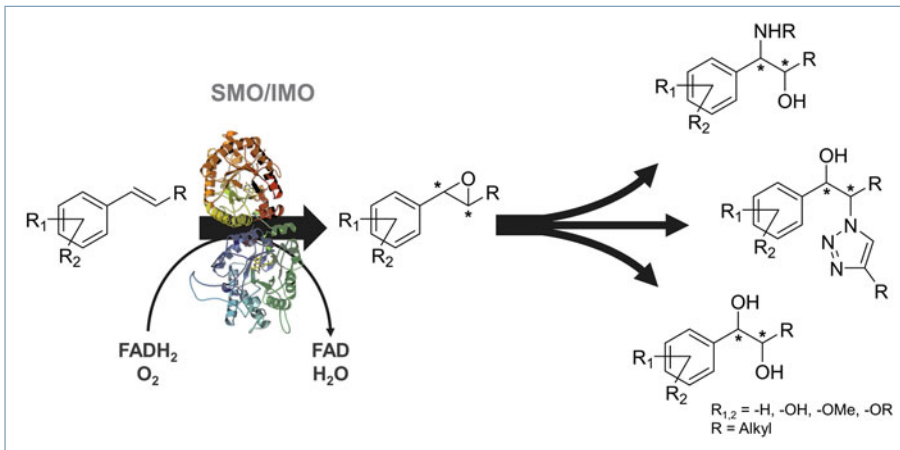
stab unter optimierten Bedingungen für zwei Stunden bei 30 °C statt (*GrStyA*: 3,5 µM; *GnIndA*: 2,7 µM); der Umsatz wurde direkt durch Flüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt (**Tab. 1**, unterer Teil). Förderlich hierbei ist die Möglichkeit, Lösungsmittel, im speziellen Methanol und Ethanol, bis zu 20 Prozent als Vermittler für die schwer wasserlöslichen Substrate einzusetzen. Dies bietet Optimierungsräume für spätere Umsetzungen. Damit konnte ein simples Screening für Flavin-abhängige Monoxygenasen zur enantioselektiven Epoxidierung von Aryl-Alkyl-Ethern erarbeitet werden.

Perspektive für die Wirkstoffsynthese

Die Oxyfunktionalisierung von Ligninmonomeren durch FAD-abhängige Monoxygenasen stellt einen Schlüsselschritt zur Produktion von wichtigen Feinchemikalien aus regenerativen Rohstoffquellen dar. Die produzierten Epoxide können in Folgereaktionen elegant in chirale β-substituierte Alkohole mit weitreichenden Funktionalisierungen umgewandelt werden und bieten so eine Plattform für vielseitige Produktklassen,

welche sonst nur schwierig zugänglich sind (**Abb. 2**). Chirale Aminoalkohole sind als Agonisten und Antagonisten von β-adrenergen Rezeptoren bekannt. Wirkstoffe dieser Klasse werden beispielsweise unter den Handelsnamen Metoprolol, Isoprenalin oder Terbutalin eingesetzt. Ebenso besitzen Triazole eine breite Anwendung insbesondere im Bereich des Pflanzenschutzes.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sowohl Indol- als auch Styrol-Monoxygenasen Methoxy-substituierte Styrolanaloga, wie sie aus Lignin gewonnen werden, selektiv epoxidieren können. Die Kombination aus wassermischbaren Lösungsmitteln, synthetischen Nikotinamid-Mimetika und aktiver Epoxidasen erlaubt bereits jetzt ein schnelles Bereitstellen ausgewählter Epoxide im Milligramm- bis Gramm-Bereich. Problematisch ist der Umsatz von Substraten mit Substituenten in *p*-Position, welcher zukünftig über gerichtete Evolution ermöglicht und gesteigert werden soll. Dies wird uns in die Lage versetzen, die anschließenden Derivatierungen für die Wirkstoffsynthese umfangreich zu untersuchen.



▲ **Abb. 2:** Aus Lignin gewonnene Aromaten können mit den FAD-abhängigen Styrol- und Indolmonoxygenasen (SMO und IMO) selektiv epoxidiert werden. Dazu wird FAD in Lösung durch 1-Benzyl-1,4-dihydroxynicotinamid (BNAH) reduziert und vom Enzym gebunden. Dies erlaubt die Aktivierung von Luftsauerstoff mit anschließender Epoxidierung. Das Epoxid kann als Ausgangspunkt für weitere Reaktionen verwendet werden, um z. B. chirale Aminoalkohole, Triazole oder Diole darzustellen.

Danksagung

Das Projekt wird in Teilen durch das Ministerium für Innovation, Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen (PtJ_TRI/1141ng006) und das DFG Graduiertenkolleg GRK 2341 „Microbial Substrate Conversion (MiCon)“ gefördert. ■

Literatur

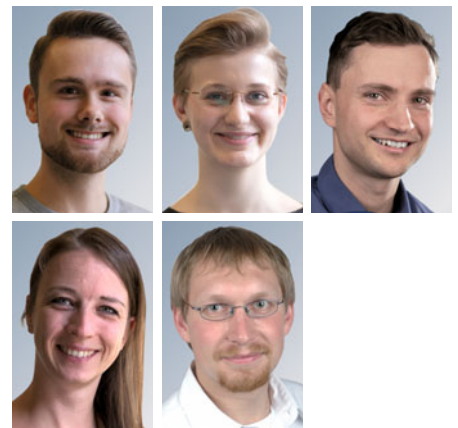
- [1] Ragauskas AJ, Beckham GT, Biddy MJ et al. (2014) Lignin valorization: improving lignin processing in the biorefinery. *Science* 344:1246843
 [2] Chandel AK, Garlapati VK, Singh AK et al. (2018) The path forward for lignocellulose biorefineries: bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization. *Bioresour Technol* 264:370–381
 [3] Tuck CO, Pérez E, Horváth IT et al. (2012) Valorization of biomass: deriving more value from waste. *Science* 337:695–699

- [4] Shukla S, Lochab B (2017) Lignin-based phenols: Potential feedstock for renewable benzoxazines. In: Ishida H, Froimowicz P (Hrsg.) *Advanced and Emerging Polybenzoxazine Science and Technology*. Elsevier, Amsterdam, S 473–498
 [5] Verma AM, Kishore N (2018) A succinct review on upgrading of lignin-derived bio-oil model components. In: De S, Bandyopadhyay S, Assadi M et al. (Hrsg.) *Sustainable Energy Technology and Policies: A Transformational Journey*, Vol. 1. Springer, Singapur, S 315–334
 [6] Molina-Gutiérrez S, Manseri A, Ladmiral V et al. (2019) Eugenol: a promising building block for synthesis of radically polymerizable monomers. *Macromol Chem Phys* 220:1900179
 [7] Grossman A, Vermerris W (2019) Lignin-based polymers and nanomaterials. *Curr Opin Biotechnol* 56:112–120
 [8] Heine T, Van Berkel WJH, Gassner G et al. (2018) Two-component FAD-dependent monoxygenases: current knowledge and biotechnological opportunities. *Biology* 7:42
 [9] Heine T, Großmann C, Hofmann S et al. (2018) Enzymgesteuerte Indigoproduktion. *BIOspektrum* 24:446–448
 [10] Heine T, Zimmerling J, Ballmann A et al. (2018) On the enigma of glutathione-dependent styrene degradation in

Gordonia rubripertincta CWB2. *Appl Env Microbiol* 84:e00154-18

[11] Heine T, Großmann C, Hofmann S et al. (2019) Indigoid dyes by group E monoxygenases: mechanism and biocatalysis. *Biol Chem* 400:939–950

[12] Paul CE, Tischler D, Riedel A et al. (2015) Nonenzymatic regeneration of styrene monoxygenase for catalysis. *ACS Catal* 5:2961–2965



Daniel Eggerichs, Anna C. Lienkamp, Thomas Heine, Carolin Mügge 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