



Charakterisierung einer neuen bakteriellen Laccase und deren Anwendung in einer multi- enzymatischen Kaskade zur Synthese von Lignanen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Esther Ricklefs

aus Rinteln

Düsseldorf, Oktober 2015

Aus dem Institut für Biochemie, Lehrstuhl II
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent:	Prof. Dr. Vlada B. Urlacher
Koreferent:	Prof. Dr. Michael Bott
Tag der mündlichen Prüfung:	10.12.2015

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keinem anderen Institut eingereicht. Des Weiteren habe ich bisher keinen erfolglosen Promotionsversuch unternommen.

Düsseldorf, 16.10.2015

(Esther Ricklefs)

„Probleme kann man niemals mit derselben Denkweise lösen,
durch die sie entstanden sind.“

Albert Einstein

Danksagung

Nach vier Jahren am Institut für Biochemie möchte ich mich bei all den Personen bedanken, die mich während dieser Zeit auf die verschiedenste Art und Weise begleitet und unterstützt haben.

Frau Prof. Dr. Vlada Urlacher danke ich für die Überlassung eines interessanten Promotionsthemas, gute Forschungsbedingungen am Institut, die Betreuung, hilfreiche Diskussionen und zu guter Letzt für die Erstbegutachtung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Michael Bott danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Dr. Katja Koschorreck danke ich für die Hilfe im DBU-Projekt. In diesem Zusammenhang möchte ich mich ebenfalls bei Herrn Prof. Dr. Proksch, Dr. Amal Hassan und Mustapha El Amrani vom Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie bedanken.

Meinen Studenten Anna Olbrich, Nadine Winkler und Malika Oudrhiri-Safiani sowie meiner Kollegin Melanie Wachtmeister danke ich für die Unterstützung bei experimentellen Arbeiten.

Meinen ehemaligen und aktuellen Kollegen am IBCII danke ich für das angenehme Arbeitsklima, konstruktiven Diskussionen und zahlreichen Hilfestellungen. Hierbei gilt mein besonderer Dank Dr. Clemens von Bühler, Priska Le-Huu, Florian Tieves und Dr. Franca Wahrendorff.

Bei Dr. Matthias Gunne bedanke ich mich für das kritische Lesen meiner Arbeit.

Ich danke meinen Lehrern Herrn Korte und Herrn Kuchenbuch, die mein Interesse an den Naturwissenschaften geweckt haben und ohne die ich niemals Biochemie studiert hätte.

Meinen Freunden danke ich für ihre Unterstützung, ihren Rat und vor allem für all die Ablenkungen in den letzten Jahren.

Last but not least gilt mein ganz besonderer Dank meiner Familie, Ivo und Marco.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	1
1. Einleitung	1
1.1. Biokatalyse	1
1.2. Laccasen	2
1.2.1. Vorkommen, Funktion und molekulare Charakteristika	3
1.2.1.1. Pilzliche Laccasen	3
1.2.1.2. Bakterielle Laccasen.....	4
1.2.1.3. Pflanzliche Laccasen	4
1.2.1.4. Laccasen aus Insekten	5
1.2.1.5. Laccasen aus Archaeen	5
1.2.2. Struktur von Laccasen	6
1.2.3. Katalysemechanismus	7
1.2.4. Oxidative Phenolkupplungen	10
1.2.5. Anwendungsgebiete von Laccasen	11
1.2.5.1. Papier- und Textilindustrie.....	12
1.2.5.2. Nahrungsmittelindustrie	12
1.2.5.3. Organische Synthesen	13
1.3. Kaskadenreaktionen zur Synthese von Lignanen	15
1.3.1. Lignane	15
1.3.2. Kaskadenreaktionen	17
1.3.3. Laccasen in Kaskadenreaktionen	17
1.3.4. Vanillylalkoholoxidase.....	20
1.3.5. Pinoresinol- und Pinoresinol/Lariciresinolreduktasen	25
1.4. Ziele der Arbeit	26
2. Manuskripte	28
2.1. Liste der Publikationen	28
2.2. Manuskript 1: Expanding the laccase-toolbox	29
2.2.1. Manuskript	29
2.2.2. Supporting Information.....	38
2.3. Manuskript 2: One-pot synthesis of pinoresinol	45
2.3.1. Manuskript	45
2.3.2. Supporting Information.....	54

2.4.	Manuskript 3: Synthesis of enantiopure pinoresinol	66
2.4.1.	Manuskript	66
2.4.2.	Additional files	78
3.	<i>Diskussion</i>	84
3.1.	Eine neue bakterielle Laccase für die Biokatalyse	85
3.2.	Synthese von (\pm)-Pinoresinol	88
3.3.	Synthese von enantiomerenreinem (+)- und (-)-Pinoresinol	92
3.4.	Zusammenfassung und Schlussfolgerung	94
4.	<i>Literaturverzeichnis</i>	96
5.	<i>Anhang</i>	110

Zusammenfassung

Laccasen (E.C. 1.10.3.2, Benzendiol/Sauerstoffoxidoreduktasen) gehören zur Gruppe der blauen Multikupferoxidasen und kommen in allen drei Domänen des Lebens vor. Sie katalysieren die Ein-Elektron-Oxidation von vier Substraten und koppeln diese an die Vier-Elektronen-Reduktion von Sauerstoff zu Wasser. Als Substrate dienen dabei verschiedenste Phenole, aromatische Amine, aber auch anorganische Ionen. Da Laccasen Sauerstoff als Cosubstrat benutzen und Wasser als einziges Nebenprodukt entsteht, handelt es sich um besonders „grüne“ Biokatalysatoren.

Neben dieser Tatsache sind Laccasen aufgrund ihres breiten Substratspektrums für industrielle Anwendungen attraktiv; bisher werden allerdings lediglich Laccasen aus Pilzen für industrielle Prozesse eingesetzt. Gründe hierfür liegen darin, dass viele pilzliche Laccasen ein hohes Redoxpotential besitzen, gut charakterisiert und kommerziell erhältlich sind. Allerdings sind sie oftmals nur bei sauren Reaktionsbedingungen katalytisch aktiv. Im Gegensatz dazu sind bakterielle Laccasen im neutralen bis basischen pH-Bereich sowie bei höheren Temperaturen katalytisch aktiv. Zusätzlich sind sie oftmals stabiler gegenüber höheren Temperaturen, organischen Lösungsmitteln, Detergenzien und Laccaseinhibitoren. Ein weiterer Vorteil bakterieller Laccasen ist die Möglichkeit der einfachen Produktion im prokaryotischen Expressionssystem *Escherichia coli*.

Derzeit sind ca. 1200 Gene in Prokaryoten als Laccasen annotiert, wodurch ein großer Pool an potentiell interessanten Biokatalysatoren zur Verfügung steht. Durch die biochemische Charakterisierung neuer bakterieller Laccasen mit unterschiedlichen Eigenschaften (z.B. Redoxpotential, pH- und Temperaturstabilität) kann das Wissen über diese Enzyme erweitert und damit das Potential für industrielle Anwendungen erhöht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue bakterielle Laccase aus *Corynebacterium glutamicum* (CgL1) kloniert, charakterisiert und ihr biotechnologisches Potential analysiert. Ein Substratscreening mit typischen und potentiellen Laccasesubstraten zeigte, dass CgL1 verschiedene phenolische Substrate oxidiert. Daneben katalysierte CgL1 die Oxidation von Cu^+ ; dies weist auf eine physiologische Funktion im Bereich der Kupferhomöostase in *C. glutamicum* hin. CgL1 zeigte eine erhöhte Temperaturstabilität mit einer Halbwertszeit von 2 h bei 60°C. Des Weiteren ist CgL1 im neutralen bis alkalischen pH-Bereich mit 71 % bzw. 30 % Restaktivität nach 24 h stabiler als im sauren pH-Bereich. Die Zugabe von 40 – 50 % (v/v) an organischem Lösungsmittel hatte bei 50 % der getesteten Lösungsmittel nach 24 h keinen Einfluss auf die Enzymstabilität; im schlechtesten Fall lag die Restaktivität bei mindestens 55 %. Das Redoxpotential von CgL1 liegt bei 260 mV.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig die Möglichkeit zum Einsatz von bakteriellen Laccasen in multi-enzymatischen Kaskaden zur Produktion von Feinchemikalien am Beispiel der Synthese des Lignans (\pm)-Pinoresinol gezeigt. Dabei wurde im ersten Schritt Eugenol, ein

preiswertes und in großen Mengen verfügbares Substrat, von der Vanillylalkoholoxidase aus *Penicillium simplicissimum* (PsVAO) zu Coniferylalkohol oxidiert. Dieses unterlag im zweiten Schritt einer laccase-initiierten phenolischen Kupplung unter Bildung von (\pm)-Pinoresinol. Aufgrund des pH-Optimums der PsVAO bei pH 10 wurde ein Enzymscreening zur Identifizierung von Laccasen, die Coniferylalkohol im neutralen bis basischen pH-Bereich oxidieren können, durchgeführt. Die Bildung von (\pm)-Pinoresinol konnte dabei für alle getesteten bakteriellen Laccasen (CgL1, CotA, Ssl1, Tth) nachgewiesen werden, nicht jedoch für die kommerziell erhältliche pilzliche Laccase aus *Trametes versicolor*. Nach Optimierung der Reaktionsbedingungen der Kaskade konnten unter Verwendung der Enzyme PsVAO und CgL1 4,4 mM ($1,6 \text{ g l}^{-1}$) (\pm)-Pinoresinol synthetisiert werden. Als besonders effektiv zeigte sich dabei die Verwendung der neu charakterisierten Laccase CgL1 mit geringem Redoxpotential und die Zugabe eines nicht-wassermischbaren organischen Lösungsmittels zur *in-situ*-Produktextraktion. Im semi-präparativen Maßstab wurde eine isolierte Ausbeute von 13 % Produkt erzielt.

Durch Erweiterung der Kaskade um eine enantiospezifische Pinoresinol- bzw. Pinoresinol/Lariciresinolreduktase konnte aus dem produzierten Racemat enantiomerenreines Pinoresinol gewonnen werden. Da die eingesetzten Reduktasen NADPH-abhängig sind, wurde die Anwendung eines Ganzzellbiokatalysators etabliert und optimiert. Je nach Wahl der Reduktase konnte sowohl (+)- als auch (-)-Pinoresinol mit ee-Werten von jeweils $\geq 99 \%$ hergestellt werden. Als „Nebenprodukte“ der Racematspaltung entstanden die hochwertigen Lignane (-)-Lariciresinol und (-)-Secoisolariciresinol mit ee-Werten von 85 % bzw. $\geq 99 \%$. Das System wurde in einem semi-präparativen Maßstab durchgeführt und eine isolierte Ausbeute von 12 % enantiomerenreinem (+)-Pinoresinol erzielt.

Abstract

Laccases (E.C. 1.10.3.2, benzenediol:oxygen oxidoreductases) belong to the group of blue multi-copper oxidases and occur in all three domains of life. They catalyze the one-electron oxidation of four substrates coupled to the four-electron reduction of oxygen to water. Various types of phenols, aromatic amines and inorganic ions are substrates for laccases. As they use oxygen as co-substrate and produce solely water as by-product, they are particularly green biocatalysts.

In addition, their broad substrate spectrum makes laccases to promising candidates for industrial applications; but up to now exclusively fungal laccases are used in industrial processes. The reasons for this are that fungal laccases have higher redox potentials, are well-characterized and commercially available. However, they are mainly active at acidic reaction conditions. In contrast, bacterial laccases are active in the neutral to alkaline pH range as well as stable and active at elevated temperatures. Additionally, they exhibit higher stabilities against organic solvents and laccase inhibitors. A further advantage of bacterial laccases is that they can be produced in the prokaryotic expression system *Escherichia coli*.

Presently, round about 1200 genes in prokaryotes are annotated as laccases, whereby a wide range of potentially interesting biocatalysts is available. The biochemical characterization of novel bacterial laccases with different properties (e.g. redox potential, pH- and temperature stability) enhances the knowledge about these enzymes and increases their potential for industrial applications.

Within this work a novel bacterial laccase from *Corynebacterium glutamicum* was cloned, characterized, and its biochemical potential analyzed. A substrate screening with typical and potential laccase substrates revealed the oxidation of several phenolic substrates by CgL1. In addition, CgL1 catalyzed the oxidation of Cu^+ , which indicates a physiological role in the field of copper homeostasis in *C. glutamicum*. CgL1 showed stability at elevated temperatures with a half-life time of 2 h at 60°C. Moreover, CgL1 is in the neutral to alkaline pH-range with residual activities of 71 % and 30 %, respectively, after 24 h more stable than under acidic conditions. The addition of organic solvents had no influence on enzyme's stability in 50 % of all tested solvents after 24 h incubation, in the worst case the residual activity was at least 55 %. The redox potential of CgL1 is 260 mV.

The use of bacterial laccases in multi-enzymatic cascades for fine chemical production was first shown in this work exemplified by the synthesis of the lignan (\pm)-pinoresinol. In the first step eugenol, an abundant and low cost substrate, was oxidized to coniferyl alcohol by the vanillyl-alcohol oxidase from *Penicillium simplicissimum* (PsVAO) followed by a laccase initiated phenolic coupling to form (\pm)-pinoresinol. Since the pH-optimum of PsVAO is at pH 10 an enzyme screening was carried out to reveal laccases that are able to oxidize coniferyl alcohol in the neutral to alkaline pH-range. The formation of (\pm)-pinoresinol was observed for four tested bacterial laccases, but not for the commercially available fungal laccase from *Trametes versicolor*. After optimizing the reaction conditions of the one-pot process (employing

PsVAO and CgL1) 4.4 mM (1.6 g l⁻¹) (±)-pinoresinol were synthesized. Particularly effective was the application of the novel characterized laccase CgL1 with low redox potential, and the addition of a non-water miscible organic solvent for *in situ* product extraction. In a semi-preparative scale reaction an isolated yield of 13 % product was achieved.

By the addition of an enantiospecific pinoresinol- or pinoresinol/lariciresinol reductase to the cascade enantiopure pinoresinol was gained from racemic mixture. Owing to the NADPH-dependence of the reductases, an application of a whole-cell catalyst was established and optimized. Depending on the reductase used (+)- and (-)-pinoresinol could be produced with ee-values of ≥99 %. As “side-products” of kinetic resolution the lignans (-)-lariciresinol and (-)-secoisolariciresinol were formed with ee-values of 85 % and ≥99 %, respectively. This system was performed in a semi-preparative scale and an isolated yield of 12 % of enantiopure (+)-pinoresinol was achieved.

1. Einleitung

1.1. Biokatalyse

Katalysatoren sind heutzutage in einer Vielzahl unterschiedlicher chemischer und biotechnologischer Prozesse sowie in der Automobilindustrie und Raffinerietechnik unersetzbar; der wohl bekannteste Katalysator ist der Autoabgaskatalysator. Traditionell wird zwischen der chemischen Katalyse (homolog oder heterolog) und der Biokatalyse unterschieden. In der chemischen Katalyse werden anorganische, organometallische oder organische Katalysatoren eingesetzt, wohingegen bei der Biokatalyse Enzyme oder biokatalytisch aktive Zellen (Biokatalysatoren) verwendet werden.^[1,2]

Aufgrund eines Umdenkens in der chemischen Industrie in Richtung „Grüne Chemie“ gewinnen Biokatalysatoren immer mehr an Bedeutung. Gründe für diese Trendwende sind das steigende Bewusstsein gegenüber der Umwelt, der Gesundheit und der Sicherheit.^[1] Ziele sind unter anderem die umweltverträgliche und gefahrlose Produktion von Chemikalien mit geringer Toxizität sowie die Nachhaltigkeit von Prozessen. Ebenfalls soll der Energieverbrauch minimiert werden.^[3] Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, ist die interdisziplinäre Arbeit zwischen Chemikern, Ingenieuren und Biologen von besonderer Bedeutung.^[4]

Die Natur dient als Vorbild mit ihrer Vielzahl an katalysierten Reaktionen, die in Milliarden von Jahren Evolution entstanden sind.^[4,5] Eine Vielzahl an Biokatalysatoren steht zur Verfügung, die aus Biomasse die verschiedenartigsten Verbindungen herstellen können. Enzyme sind hochwertige Katalysatoren, da sie unter milden Reaktionsbedingungen aktiv sind, oft hohe Selektivitäten aufweisen und Chiralitätszentren einführen können. Es sind keine umwelt- oder gesundheitsschädigenden Stoffe notwendig und die Verwendung von Schutzgruppen entfällt.^[2,6,7] Enzyme kombinieren z.T. hochaktive Metall- oder Organokatalysatoren mit einem definierten Reaktionsraum (katalytisches Zentrum), was die oftmals hohe Selektivität erklärt.^[8] All diese Eigenschaften sind von besonderem Interesse für industrielle Prozesse, da zum einen hochwertige Chemikalien aus preiswerten Ausgangsstoffen (wie z.B. Terpene) mit möglichst wenig Zwischenstufen (wie z.B. dem Einfügen und Entfernen von Schutzgruppen) hergestellt werden sollen, und zum anderen oftmals chirale Produkte zur Anwendung benötigt werden, z.B. als Pharmazeutika, Duftstoffe oder Pflanzenschutzmittel.

In der Lebensmittel- und Pharmaindustrie kamen Biokatalysatoren bereits früh zum Einsatz, bspw. bei der Herstellung von Glucose-Fructose-Sirup und semisynthetischem Penicillin.^[2] Für industrielle chemische Prozesse waren Enzyme durch geringe Substratspektren und begrenzte Stabilitäten zunächst nur bedingt einsetzbar.^[9] Seit Ende der 70er Jahre wurden allerdings enorme Fortschritte im Bereich der Biokatalyse erzielt. Die Eigenschaften von Enzymen, wie z.B. Substratspektrum, Stabilität, Aktivität und Selektivität,

können aufgrund der heutigen Möglichkeiten der DNA-Sequenzierung, des *Protein Engineerings* und der Herstellung synthetischer Gene beeinflusst werden.^[6,9,10] Auch der Bereich der Bioinformatik hat enorm an Bedeutung gewonnen. So können mittels computerbasiertem *de-novo*-Design Enzyme für neue, zuvor noch nie für Enzyme beschriebene Reaktionen entwickelt werden.^[11] Die Entwicklung von (automatisierten) Hochdurchsatztechniken ermöglicht zudem ein effektives Screening möglichst vieler Reaktionsbedingungen.^[12] Die kommerzielle Verfügbarkeit von Enzymen ist seit 1945 (Start der Trypsinproduktion bei Novozymes) gestiegen. Zahlreiche weitere Firmen (wie ASA-Enzymes, Biocatalysts, c-LEcta, DSM, Evocatal, Puratos) haben sich seitdem auf die kommerzielle Produktion von Enzymen spezialisiert. Durch diese Entwicklungen wurden mehrere hundert biokatalytische Prozesse in der chemischen Industrie realisiert.^[2,13] Heutzutage werden unter anderem Amide, Alkohole, Amine, Säuren, Aminosäuren, Zucker-Derivate, Epoxide, Penicillin-Derivate oder Bausteine für Pharmazeutika in biokatalytischen Prozessen produziert.^[2,14] Zur Zeit wird die Anwendung von komplexeren Reaktionen, wie z.B. selektive Oxyfunktionalisierungen, Aminierungen oder die Bildung von C-C-Bindungen, in chemo-enzymatischen und multi-enzymatischen Reaktionen erforscht.^[13,15] Aufgrund der steigenden Anzahl von enzymkatalysierten Reaktionen ist auch die Anwendung von Retrosynthesen möglich.^[16]

Enzyme sind also für Chemiker und Biotechnologen wichtige Werkzeuge für die Herstellung von hochwertigen Chemikalien, pharmazeutischen Bausteinen, Biokraftstoffen und Kunststoffen. Trotz all dieser neuen Entwicklungen sollte nicht unerwähnt bleiben, dass der Einsatz von Enzymen und Mikroorganismen von der Menschheit schon seit Jahrtausenden zur Herstellung und Konservierung von Bier, Wein, Käse und Essig genutzt wird. Darüber hinaus werden Enzyme in Waschmitteln und bei der Veredelung von Textilien, Leder und Papier eingesetzt.

1.2. Laccasen

Laccasen sind Benzendiol/Sauerstoffoxidoreduktasen (EC 1.10.3.2) und gehören zur Gruppe der Multikupferoxidasen (MCO). Neben Laccasen werden pflanzliche Ascorbatoxidasen (EC 1.10.3.3) und das Plasmaprotein Ceruloplasmin (EC 1.16.3.1) dieser Gruppe zugeordnet.^[17]

Laccasen katalysieren die Ein-Elektron-Oxidation von vier Substraten bei gleichzeitiger Vier-Elektronen-Reduktion von Sauerstoff zu Wasser; für die katalytische Aktivität sind vier Kupferionen notwendig (siehe 1.2.2. und 1.2.3.). Laccasen wurden erstmalig 1883 von Yoshida in Pflanzenextrakten des japanischen Lackbaumes *Rhus vernicifera* beschrieben.^[18] 1896 wurden Laccasen in Pilzen nachgewiesen^[19] und 1959 gelang mittels Elektronenspinresonanz (EPR) der Nachweis, dass Laccasen kupferhaltige Enzyme sind.^[20]

Sie katalysieren die Oxidation von Phenolen (Mono-, Di- und Polyphenole), aromatischen Aminen (Aminophenole, Polyamine, Aryldiamine) und einiger anorganischer Ionen (Fe^{2+} , Cu^+ , Mn^{2+}). Phenolische Substrate werden zu Phenoxyradikalen oxidiert, welche in nicht-enzymatischen Reaktionen polymerisieren oder zu Chinonen disproportionieren. Das Substratspektrum kann durch die Kombination einer Laccase mit einem Mediator (Laccase/Mediatorssystem) erweitert werden. Mediatoren sind niedermolekulare organische Substanzen, die optimaler Weise gute Laccasesubstrate und in reduzierter sowie oxidiertes Form stabil sind.^[21] Nach Oxidation des Mediators reagiert dieser nachfolgend in einer chemischen (nicht-enzymatischen) Reaktionen mit anderen Substanzen, die für Laccasen z.B. aufgrund ihrer Größe oder ihres Redoxpotentials nicht zugänglich sind.^[21,22]

Bei Laccasen handelt es sich um weit verbreitete Enzyme, die sowohl in Eukaryoten (Pflanzen, Pilzen, Insekten, Algen) als auch in Prokaryoten und Archaeen vorkommen. Sie katalysieren die Kupplung von Monomeren,^[23–26,27,28] den Abbau von Polymeren,^[29] die Funktionalisierung von Polymeren^[30] und die Einführung von Ring-Brüchen.^[31] Laccasen besitzen - wie Tyrosinasen (Monophenolmonooxygenasen; EC 1.14.18.1) und Peroxidasen (hauptsächlich klassifiziert als EC 1.11.1.17) - ein breites Substratspektrum, was die Einordnung neu charakterisierter Enzyme erschwert. Sie werden als Laccasen eingeordnet, wenn sie ein breites Substratspektrum besitzen, kein Wasserstoffperoxid als Cofaktor benötigen und die Oxidation von Syringaldazin - nicht jedoch von Tyrosin - katalysieren.^[19,32]

1.2.1. Vorkommen, Funktion und molekulare Charakteristika

1.2.1.1. Pilzliche Laccasen

Die größte Anzahl an charakterisierten Laccasen wurde aus der Gruppe der Holzfäule-Basidiomyceten beschrieben. Aber auch in Ascomyceten, Deuteromyceten und anderen Gruppen der Basidiomyceten wurden Laccasen nachgewiesen und charakterisiert. In niederen Pilzen konnte bis heute keine Laccaseaktivität nachgewiesen werden.^[33]

Die physiologischen Funktionen von Laccasen in Pilzen sind sehr vielseitig. Sie sind an Stressabwehrreaktionen (wie z.B. dem Abbau von Antibiotika und toxischen Substanzen oder der Detoxifizierung von Schwermetallen), an Pathogen/Wirtsinteraktionen^[19,34] und vermutlich an der pilzlichen Entwicklung und Morphogenese beteiligt.^[19,35,36] Bis heute wird die Beteiligung von pilzlichen Laccasen am Abbau von Lignin^[19,37] und am Huminsäuremetabolismus^[33] diskutiert.

Pilzliche Laccasen haben im Durchschnitt ein Molekulargewicht von 60 – 70 kDa, liegen glycosyliert vor und 88 – 98 % aller pilzlicher Laccasen werden in den extrazellulären Raum sekretiert. Der Glycosylierungsgehalt reicht von 1 – 80 %, beträgt im Mittel aber 10 – 25 %, besteht aus Mannose, *N*-Acetylglucosamin und Galactose und ist *N*-glycosidisch mit der

Polypeptidkette verbunden.^[33,35] Auch besitzen die Holzfäulepilze oftmals mehrere Isoenzyme. Das Redoxpotential liegt zwischen 430 – 790 mV.^[35] Das pH-Optimum bei der Umsetzung von 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS; Standardsubstrat von Laccasen) liegt um pH 3, das Temperaturoptimum dieser Reaktion liegt im Durchschnitt bei 55°C.^[33]

1.2.1.2. Bakterielle Laccasen

Der erste Nachweis von Laccasen in Bakterien wurde Anfang der 90er Jahre von Givaudan *et al.* und Sanchez-Amat *et al.* erbracht. Sie zeigten, dass Zellextrakte von *Azospirillum lipoferum*^[38] und *Marinomonas mediterranea*^[39] typische Laccasesubstrate wie ABTS oder Syringaldazin oxidieren. Die seit Ende der 70er Jahre rasch steigende Zahl an sequenzierten Genomen ermöglichte die Identifizierung von über 1200 laccaseähnlichen Genen in Prokaryoten mittels *in-situ*-Analysen.^[40] Die Anzahl an charakterisierten bakteriellen Laccasen ist zwar innerhalb der letzten Jahre von ca. 11 im Jahr 2007 auf ca. 35 im Jahr 2015 gestiegen, ist aber im Vergleich zu den im Jahr 2007 bereits über 100 charakterisierten pilzlichen Laccasen gering.^[33]

Die meisten Laccasen wurden aus den Gattungen *Bacillus* und *Streptomyces* charakterisiert, die am besten charakterisierte bakterielle Laccase ist CotA aus *Bacillus subtilis*.^[41,42–45] Die Enzymlokalisierung bakterieller Laccase ist divers; sie wurden intrazellulär (z.B. in *Sinorhizobium*), periplasmatisch (z.B. in *Escherichia coli*), extrazellulär (z.B. in *Streptomyces*) oder auch in der Sporenhülle (z.B. in *Bacillus*) nachgewiesen. Das Molekulargewicht beträgt zwischen 32 – 180 kDa,^[46] das Redoxpotential ist im Vergleich zu den pilzlichen Laccasen niedriger und liegt unter 500 mV.^[42,43,47,48] Das pH Optimum bei der Umsetzung von ABTS liegt um pH 5, das Temperaturoptimum im Mittel bei 58°C.^[46]

Die physiologische Funktion in Prokaryoten ist wie bei pilzlichen Laccasen sehr divers. Sie sind an der Morphogenese,^[49] Sporulation und Bildung von zellwandschützenden Substanzen (z.B. Melanin bei der Endosporenbildung) beteiligt.^[44,50] Diese vermitteln der Spore Schutz gegenüber UV-Licht und Wasserstoffperoxid.^[45] In anderen Prokaryoten wie *E. coli*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris* und *Corynebacterium glutamicum* scheinen Laccasen an der Kupferhomöostase beteiligt zu sein,^[51,52,53] in *Pseudomonas putida* an der Manganhomöostase.^[54]

1.2.1.3. Pflanzliche Laccasen

Die erste charakterisierte pflanzliche Laccase wurde aus dem Lackbaum (*R. vernicifera*) isoliert.^[55] Nachfolgend wurden Laccasen in Zinnien (*Zinnia elegans*),^[56] Bergahorne (*Acer pseudoplatanus*),^[57] Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* cv Samsun),^[58] Pappeln (*Populus euramericana*)^[59] und zahlreichen weiteren Pflanzen identifiziert.^[60,61–65] Die meisten

pflanzlichen Laccasen sind biochemisch nicht genauer charakterisiert. Ihre physiologische Funktion ist oftmals ungeklärt, da die meisten Pflanzen unterschiedliche Isoenzyme besitzen, die in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden.^[57,61,62,66] *In-vitro*- und *in-vivo*-Analysen sowie der Nachweis von Laccaseaktivität in lignifizierenden Zellen des differenzierenden Xylems zeigten, dass Laccasen an der Lignifizierung beteiligt sind.^[56,57,59,67,68] Der *in-vivo*-Nachweis in *Arabidopsis thaliana* zeigte, dass Mutationen im Laccasegen *AtLAC15* einen verringerten Ligningehalt in der Samenschale bedingten.^[68] Weitere potentielle Funktionen von pflanzlichen Laccasen liegen in den Bereichen Wundheilung,^[18,34] Lignansynthese,^[69] Eisenaufnahme,^[70] Phytoremediation^[71] oder als Redoxmediator.^[72]

1.2.1.4. Laccasen aus Insekten

Der Nachweis von Laccasen in Insekten erfolgte bereits Ende der 60er Jahre: Aus der Cuticula der Fruchtfliege (*Drosophila virilis*) und der Seidenraupe (*Bombyx mori*) wurden Enzyme isoliert, die als Laccasen identifiziert wurden.^[73] Die Klonierung von cDNA erfolgte erst 40 Jahre später. Die ersten publizierten Laccasegene stammen aus der Schlupfwespe (*Pimpla hypochondriaca*),^[74] dem Tabakswärmer (*Manduca sexta*) und der Malariamücke (*Anopheles gambiae*).^[75] Inzwischen wurden zahlreiche weitere Laccasegene aus Insekten wie der Honigbiene (*Apis mellifera*) kloniert und publiziert.^[76–78,79,80,81]

Die biochemische Charakterisierung ist für die wenigsten Laccasen aus Insekten genauer beschrieben.^[82] Die physiologische Funktion bei der Ausbildung der Cuticula^[76,77,80,81,83] und der Entwicklung der Eierschale^[78] wurde unter anderem mittels RNA-Interferenz analysiert. Die physiologische Funktion von Laccasen außerhalb der Epidermis wurde noch nicht geklärt, sie scheinen aber unter anderem an der Eisen- und Kupferhomöostase beteiligt zu sein.^[75,82]

1.2.1.5. Laccasen aus Archaeen

Erste Hinweise auf Laccasen aus Archaeen wurden 2009 mittels *in-silico*-Analysen erzielt.^[84] Bis heute wurden erst zwei Laccasen aus Archaeen charakterisiert, LccA aus *Haloferax volcanii*^[85] und McoP aus *Pyrobaculum aerophilum*.^[86] Beide Enzyme können heterolog in *E. coli* exprimiert werden und zeichnen sich durch ihre Thermostabilität aus.^[85,87] LccA ist natürlicherweise ein Glycoprotein mit Laccase- und Bilirubinoxidaseaktivität, welches eine hohe Thermo- (Halbwertszeit von 31 h bei 50°C) und Salzstabilität (bis zu 1.4 M NaCl) aufweist sowie in verschiedenen Lösungsmitteln stabil ist.^[85] McoP ist eine thermostabile (Halbwertszeit von ca. 6 h bei 80°C) und thermoaktive (Temperaturoptimum bei 85°C) Distickstoffmonoxidreduktase, welche Laccaseaktivität aufweist. Als Besonderheit kann neben molekularem Sauerstoff auch Distickstoffmonoxid als Elektronenakzeptor dienen.^[86]

1.2.2. Struktur von Laccasen

Aufgrund der vielen potentiellen industriellen Anwendungsmöglichkeiten von Laccasen wurden in den letzten Jahren vermehrt Struktur-Funktionsstudien durchgeführt und eine Reihe an Kristallstrukturen gelöst.^[88] Die erste Kristallstruktur einer Laccase wurde 1997 von Ducros *et al.* publiziert.^[89] Sie kristallisierten eine Laccase des Pilzes *Coprinus cinereus*. 2003 wurde die erste Kristallstruktur der bakteriellen Laccase CotA aus *B. subtilis* veröffentlicht,^[90] 2009 die Struktur einer sogenannten kleinen Laccase (*Small Laccase* = SLAC).^[91] Inzwischen sind 96 weitere Kristallstrukturen in der Proteindatenbank (PDB) veröffentlicht. Dabei handelt es sich sowohl um verschiedene Enzyme (und deren Mutanten) als auch um Enzyme, die mit Inhibitor, Substrat oder Produkt kokristallisiert wurden.

Die Analyse von Sequenzen und Kristallstrukturen ergab, dass die Kupferliganden hoch konserviert sind und in vier Bereichen (L1-L4) vorliegen. Die für die katalytische Aktivität notwendigen vier Kupferionen werden aufgrund ihrer spektroskopischen Eigenschaften klassifiziert: (i) Typ-1-Kupferion, (ii) Typ-2-Kupferion und (iii) zwei Typ-3-Kupferionen.

Das Typ-1-Kupferion (T1) ist paramagnetisch und wird blaues Kupferion genannt, da es im oxidierten Zustand bei ca. 600 nm absorbiert. Dies ist bedingt durch einen Ligand-Metall Charge-Transfer-Komplex, bei dem ein Elektronenübergang vom Schwefel des Cysteins zum Cu(II) erfolgt.^[92] Sowohl die direkte Umgebung vom T1 als auch die zweite Sphäre bestimmen die Elektronendichte und die physikalischen Eigenschaften wie das Redoxpotential der Laccase.^[17] T1 wird dabei mindestens von zwei Histidinen und einem Cystein koordiniert, wobei oftmals an axialer Position noch ein vierter Ligand vorliegt, was eine trigonal tetraedrische Geometrie bedingt. Im Falle von CotA aus *B. subtilis* handelt es sich dabei um Methionin. Befindet sich an dieser Position eine hydrophobe Aminosäure (Phenylalanin, Leucin), wie dies bei pilzlichen oder pflanzlichen Laccasen der Fall ist, ergibt sich eine trigonal planare Struktur.

Das Typ-2-Kupferion (T2) ist paramagnetisch und bildet mit den beiden Typ-3-Kupferionen (T3) das trinucleare Cluster (TNC). T2 wird über zwei Histidine und ein Wassermolekül koordiniert.

Die Typ-3-Kupferionen (T3 α und T3 β) sind diamagnetisch und absorbieren im reduzierten Zustand bei ca. 330 nm.^[93] T3 α und T3 β werden von sechs Histidinen koordiniert und sind über eine Hydroxygruppe (siehe 1.2.3.) miteinander verbunden.

T1 und TNC sind ca. 13 Å voneinander entfernt, wobei T1 und T3 über eine konservierte His-Cys-His-Triade miteinander verbunden sind.^[94] Dieser Cys-His-Weg ermöglicht einen kovalenten Elektronentransfer vom T1 zum T3 über das Proteinrückgrat.^[95,96]

Laccasen - mit Ausnahme von SLAC - sind Monomere, die aus drei Cupredoxin-Domänen bestehen. SLAC besitzen hingegen zwei Cupredoxin-Domänen und sind nur als Homotrimere katalytisch aktiv (siehe Abbildung 1-1). In Cupredoxin-Domänen sind die β -Stränge der zwei

β -Faltblätter im sogenannten *Greek-key*-Motiv angeordnet. Dieses Motiv wurde sowohl in einfachen Kupferproteinen (Plastocyanin, Azurin) als auch in komplexen Multikupferoxidasen (Laccasen, Ascorbatoxidasen, Ceruloplasmin) identifiziert. Es wird angenommen, dass sich die komplexen Proteine durch Genmultiplikation und/oder Geninsertion aus einem gemeinsamen Vorgängerprotein entwickelt haben.^[17]

In Laccasen mit drei Domänen ist T1 in der dritten Domäne koordiniert und TNC zwischen der ersten und der dritten Domäne (siehe Abbildung 1-1). Bei SLAC scheint die Anordnung der Kupferionen proteinabhängig zu sein. T1 wird in SLAC aus *Streptomyces coelicolor* und Ssl1 aus *S. sviveus* in der zweiten Domäne koordiniert,^[47,91] wohingegen in einer mittels Metagenomanalyse-identifizierten SLAC (MgLac) die T1-Koordination in der ersten Domäne stattfindet.^[97] Das TNC ist zwischen den Domänen 1 und 2' koordiniert.

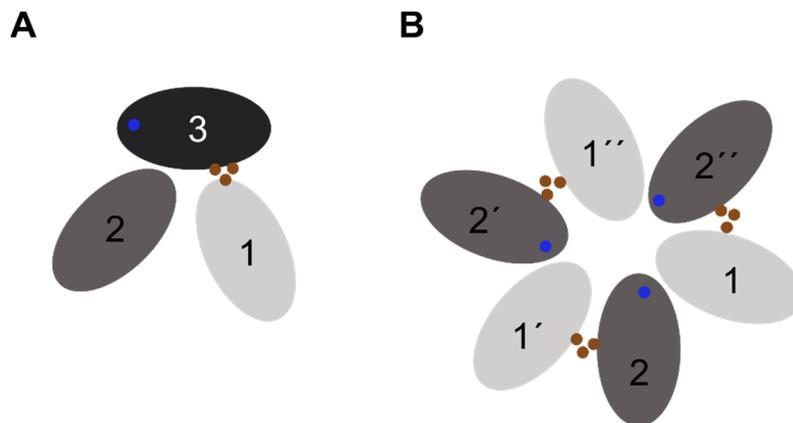


Abbildung 1-1. Schematische Darstellung des Domänenaufbaus in Drei- und Zwei-Domänen-Laccasen. A) Laccase bestehend aus drei Cupredoxin-Domänen, B) Laccase bestehend aus zwei Cupredoxin-Domänen; diese sind funktionell aktiv als Homotrimer. Die verschiedenen Cupredoxin-Domänen sind in verschiedenen Farben dargestellt. Typ-1-Kupferion ist in blau, das trinucleare Cluster in braun dargestellt.

1.2.3. Katalysemechanismus

Der Katalysemechanismus von MCO kann in drei Schritte unterteilt werden (siehe Abbildung 1-2):

- I. Oxidation von Substraten am T1
- II. Kovalenter Elektronentransfer vom T1 auf das TNC über den Cys-His-Elektronentransferweg
- III. Reduktion von molekularem Sauerstoff zu zwei Molekülen Wasser am TNC

T1 ist der primäre Elektronenakzeptor im Reaktionsmechanismus von Laccasen. Dieser Schritt ist geschwindigkeitsbestimmend und wird unter anderem von der Differenz des Redoxpotentials zwischen Substrat und T1 bestimmt.^[98] Da sich T1 in einer hydrophoben

Mulde nahe der Oberfläche befindet, können dort verschiedenste Substrate gebunden werden. Der Katalysemechanismus von MCO - insbesondere die Sauerstoffreduktion - wurde in den letzten Jahren mittels Kristallographie (X-Ray und EXAFS = *extended X-ray absorption fine structure*), Spektroskopie (EPR, UV-Vis), kinetischen und computerbasierten Studien intensiv untersucht, diskutiert und ist bis heute nicht eindeutig geklärt.^[92,95,96,99] Solomon *et al.* untersuchten insbesondere die Laccase aus *R. vernicifera* (RvL) und das laccaseähnliche Enzym Fet3p aus *Saccharomyces cerevisiae*.

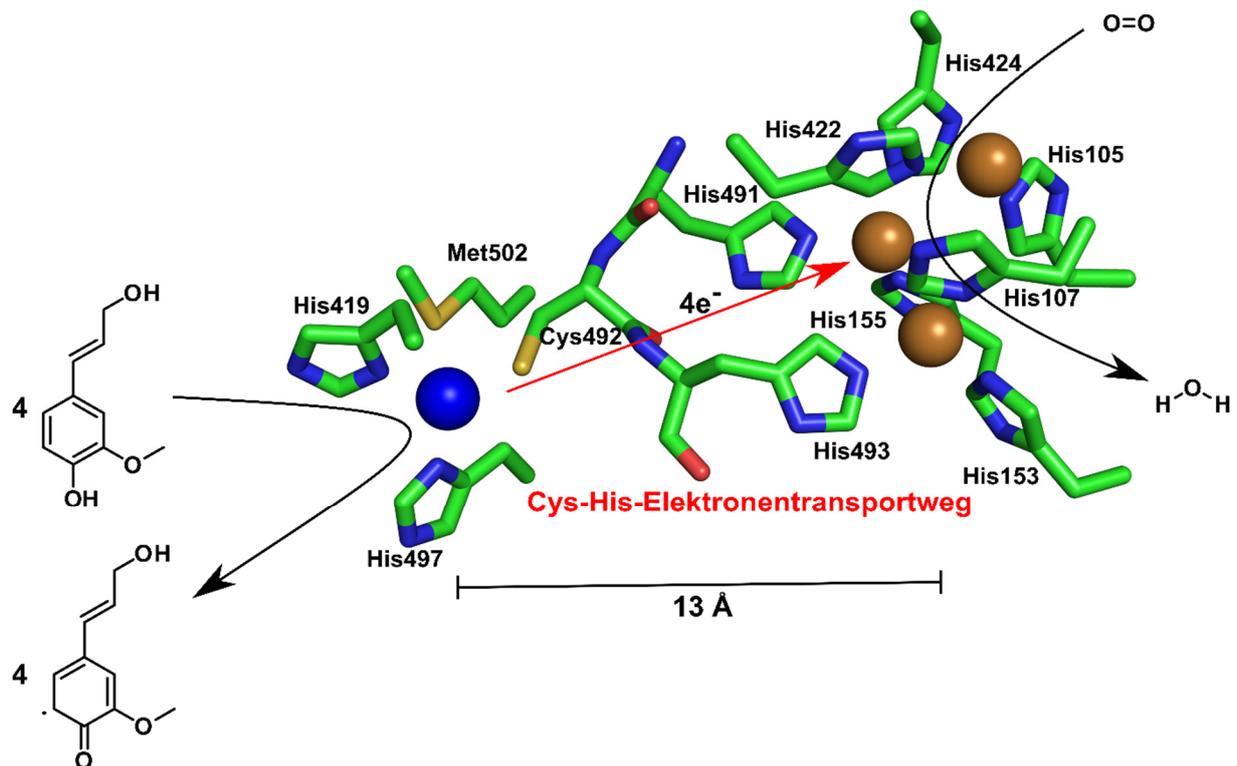


Abbildung 1-2. Schematische Darstellung des Mechanismus von laccasekatalysierten Reaktionen. Vier Substratmoleküle (hier dargestellt: Coniferylalkohol) werden am Typ-1-Kupferion (T1) oxidiert und die Elektronen werden über einen konservierten Bereich bestehend aus His-Cys-His auf das trinucleare Cluster (TNC) übertragen. An diesem findet die Reduktion von Sauerstoff zu zwei Molekülen Wasser statt. Dargestellt sind die konservierten Kupferliganden sowie T1 (blau) und das TNC (braun). (Modifiziert nach Solomon *et al.*)^[96]

In Abbildung 1-3 wird der katalytische Mechanismus der Sauerstoffreduktion von MCO nach Solomon *et al.* dargestellt.^[96] Dieser umfasst vier enzymatische Zustände, die z.T. bereits in verschiedenen Enzyme bzw. Enzymvarianten nachgewiesen wurden (RvL,^[100] Fet3p,^[101] CueO aus *E. coli*,^[102] CotA aus *B. subtilis*,^[103] Bilirubinoxidase aus *Myrothecium verrucaria*^[104] und Ceruloplasmin^[105]).

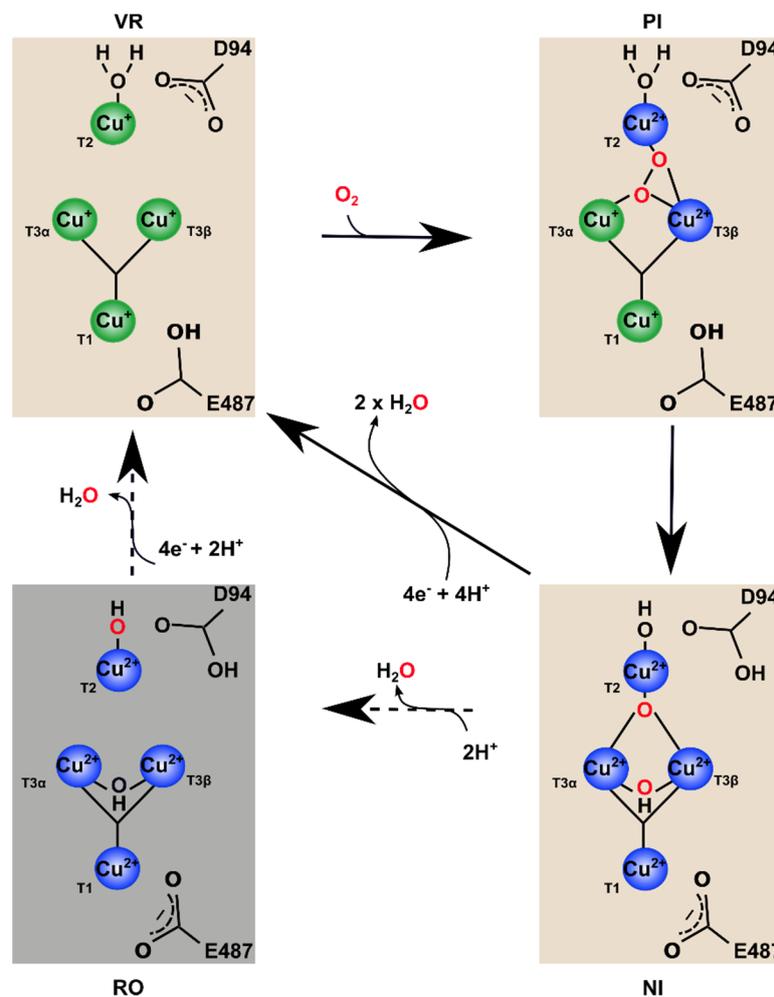


Abbildung 1-3. Katalysenmechanismus der Sauerstoffreduktion von MCO. In Anwesenheit von Substrat werden die Kupferionen reduziert, das vollständig reduzierte Enzym reagiert mit Sauerstoff unter Bildung eines Peroxidintermediates, wobei T2 und T3 β Elektronen abgeben. Durch Übertragung zweier weiterer Elektronen auf das Peroxidintermediat erfolgt die Sauerstoffspaltung unter Bildung des nativen Intermediates. In Anwesenheit von Substrat erfolgt eine schnelle Reduktion unter Freisetzung zweier Wassermoleküle zum vollständig reduzierten Zustand. Ist kein Substrat vorhanden, zerfällt das native Intermediat langsam und geht in den vollständig reduzierten Zustand über. Pfeile kennzeichnen katalytisch relevante Schritte, gestrichelte Pfeile den Zerfall des nativen Intermediates und die initiale Reduktion der Kupferionen. RO = ruhender oxidiertes Zustand; VR = vollständig reduzierter Zustand; PI = Peroxidintermediat; NI = natives Intermediat. (Modifiziert nach Solomon, Augustine und Yoon und Heppner, Kjaergaard und Solomon)^[96,106]

Im ruhenden oxidierten Zustand (RO) liegen alle Kupferionen zweifach oxidiert ($\text{Cu}(\text{II})$) vor. In Anwesenheit von Substrat wird $\text{Cu}(\text{II})$ zu $\text{Cu}(\text{I})$ reduziert und das Enzym liegt vollständig reduziert vor (VR). Die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser erfolgt dann in zwei Zwei-Elektronen-Schritten. Das reduzierte Enzym reagiert mit molekularem Sauerstoff unter Bildung des Peroxidintermediates (PI), wobei T2 und T3 β Elektronen abgeben.^[101] Für diesen Schritt ist eine Asparaginsäure in räumlicher Nähe zu diesen Kupferionen notwendig (Fet3p:

Asp94,^[107] Laccase aus *T. versicolor*. Asp77,^[101] CotA aus *B. subtilis*: Asp116^[103]). Die negative Ladung dieser Aminosäure erniedrigt das Reduktionspotential und ermöglicht somit die Abgabe zweier Elektronen von T2 und T3 β . Das gebundene Peroxid überbrückt bei MCO alle drei Kupferionen des TNC.^[108]

Im nächsten Schritt zerfällt das Peroxidintermediat unter Bildung des nativen Intermediates (NI). Dabei erfolgt die reduktive Spaltung der O-O-Bindung unter Übertragung zweier Elektronen und eines Protons auf das Sauerstoffatom, welches T3 α und T3 β verbindet. Für diesen Protonierungsschritt ist die Aminosäure Glutaminsäure in räumlicher Nähe zu T3 α und T3 β (Glu487 in Fet3p)^[109] essentiell. Der reduzierte Sauerstoff bleibt in Form von μ 3-Oxo- und μ 2-Hydroxo-Liganden im TNC gebunden. Bei Anwesenheit von Substrat werden die Kupferionen wieder reduziert und das Enzym geht unter zweifacher Wasserabspaltung vom nativen Intermediat in den vollständig reduzierten Zustand über. Für diese schnelle Reduktion der Kupferionen ist der - bei der Sauerstoffspaltung gebildete - μ 3-Oxo-Ligand verantwortlich, der eine Elektronendelokalisierung über alle drei Kupferionen des TNC ermöglicht.^[96] Ist kein weiteres Substrat vorhanden, erfolgt eine langsame Wasserabspaltung und das Enzym geht in den oxidierten Ruhezustand über.

1.2.4. Oxidative Phenolkupplungen

Laccasen katalysieren oxidative Phenolkupplungen: Das Substrat wird zunächst oxidiert und ein mesomeriestabilisiertes Phenoxyradikal gebildet. Im nachfolgenden Schritt können die Radikale mit einem weiteren Radikal, einem Nucleophil oder einem Dienophil reagieren.^[110] Dabei werden Dimere, höhere Oligomere oder Polymere gebildet. Aufgrund der Spindichte am Arylring finden Kupplungen an der *ortho*- und *para*-Position statt. In Abbildung 1-4 ist dies beispielhaft für die Oxidation einer Phenylverbindung dargestellt.

Im Bereich der Naturstoffsynthese werden oxidative Kupplungen chemisch mittels Eisenchlorid, Kupferchlorid, Kupfersulfat oder Silberoxid^[111,112] oder enzymatisch mittels Laccasen^[113] oder Peroxidasen^[114] katalysiert.

Durch oxidative Phenolkupplungen werden in der Natur Lignane (siehe 1.3.1.), Lignine, Catechin-Gerbstoffe und Alkaloide mit aromatischen Ringen synthetisiert. Da diese Art der Kupplung Zugang zu C-C-gekuppelten Phenolen und Naturstoffen ermöglicht, wird sie bereits seit über einem Jahrhundert intensiv untersucht. Bereits 1871 wurde die oxidative Phenolkupplung von Gallussäure und Gallussäureethylester zu Ellagsäure beschrieben.^[115] 1957 wurde die Hypothese aufgestellt, dass die oxidative Phenolkupplung an der Synthese von Naturstoffen aus phenolischen Grundbausteinen beteiligt ist.^[116]

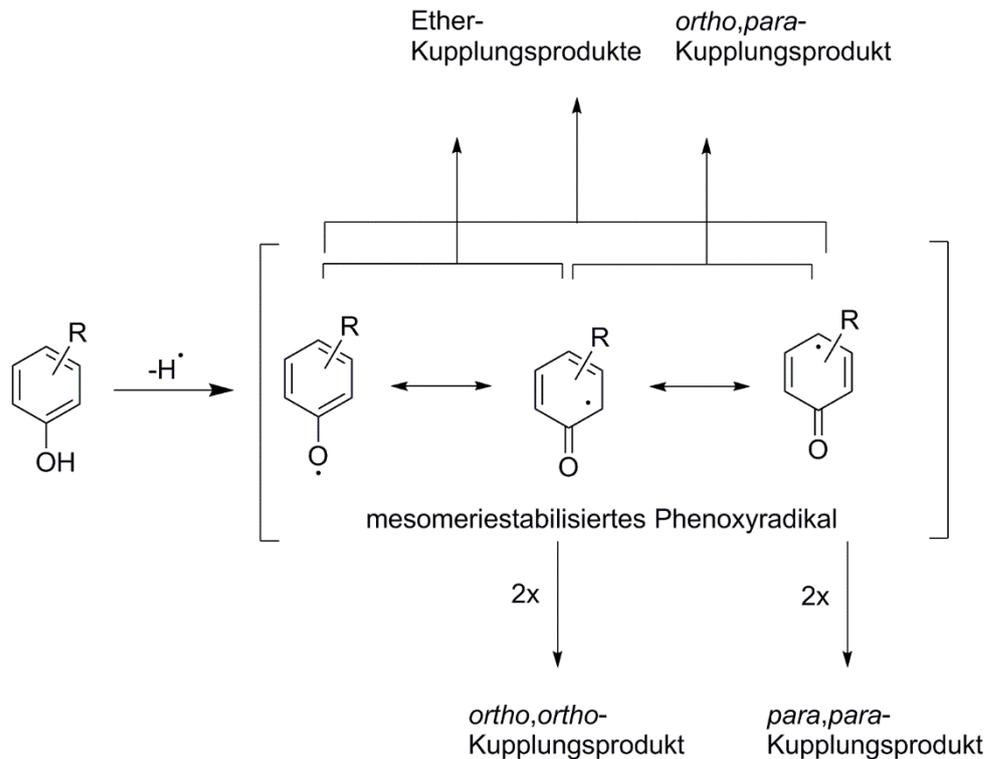


Abbildung 1-4. Oxidative Phenolkupplung. Nach Substratoxidation entsteht ein mesomeriestabilisiertes Phenoxyradikal. Aufgrund der unterschiedlichen mesomeren Grenzstrukturen bilden sich symmetrische (*ortho,ortho*- oder *para,para*-) und unsymmetrische (*ortho,para*- oder Etherverbindungen) Kupplungsprodukte.

1.2.5. Anwendungsgebiete von Laccasen

Laccasen sind für biotechnologische Anwendungen aufgrund ihres breiten Substratspektrums, der Vielzahl an katalysierten Reaktionen sowie der Tatsache, dass lediglich Wasser als Nebenprodukt gebildet wird und dass keine teuren Cofaktoren wie NADPH notwendig sind, von Bedeutung.^[93,98] Die Fachzeitschrift *Green Chemistry* widmete im September 2014 (Heftnummer 9) ihr Titelbild Laccasen als „grüne“ Alternative zur chemischen Oxidation von aromatischen Aminen.^[117] Potentielle Anwendungen von Laccasen werden in den verschiedensten industriellen Bereichen untersucht; dazu gehören Anwendungen im Bereich Papier- und Textilindustrie (siehe 1.2.5.1.), Nahrungsmittelindustrie (siehe 1.2.5.2.), Kosmetikindustrie, aber auch der medizinischen Diagnostik.^[118] Weitere vielversprechende Anwendungsgebiete liegen im Gebiet der organischen Synthesen (siehe 1.2.5.3.), Nanobiotechnologie, Bioremediation und der Herstellung von Biokraftstoffen und Biobrennstoffzellen.^[118,119]

Die potentielle biotechnologische Anwendung von pilzlichen Laccasen wurde intensiv untersucht; für die Lebensmittel-, Papier- und Textilindustrie wird eine Vielzahl von Laccasen kommerziell hergestellt.^[120] Bakterielle Laccasen sind für biotechnologische Anwendungen

aufgrund der höheren Stabilität und Aktivität bei erhöhten Temperaturen und neutralen bis basischen pH-Werten interessant. Aber auch ihre erhöhte Stabilität in organischen Lösungsmitteln, gegenüber Detergenzien und bei erhöhten Salzkonzentrationen trägt zum biotechnologischen Interesse an bakteriellen Laccasen bei. Die biotechnologische Anwendung von pflanzlichen Laccasen wurde lediglich im Bereich der Entfärbungen beschrieben.^[121,122]

1.2.5.1. Papier- und Textilindustrie

Zur Herstellung von weißem Papier ist der Abbau von Lignin im Zellstoff erforderlich, wofür bis Ende der 1980er Jahre Chlor verwendet wurde. Call und Mücke zeigten, dass die Verwendung eines Laccase/Mediatorsystems eine mögliche umweltfreundliche Alternative zur traditionellen Zellstoffbleiche ist. In einem Pilotprojekt konnte eine Delignifizierung von 67 % in Holzpulpe erzielt werden.^[123] Dieses System war auf Qualitätspulpe aus Leinen zur Herstellung von Papier übertragbar.^[124]

Die erste industrielle Laccase war DeniLite® (Novozymes, Dänemark), welche in Kombination mit Mediatoren für die Jeansbleiche eingesetzt wird. Indigo wird durch die laccasekatalysierte Reaktion zweifach oxidiert unter Bildung von Dehydroindigo. Aufgrund eines nucleophilen Angriffs von Wasser wird dieses an zwei Positionen hydroxyliert. Zwei weitere von Laccasen katalysierte Oxidationen bedingen eine C-C-Spaltung unter Bildung zweier Moleküle Isatin.^[125]

1.2.5.2. Nahrungsmittelindustrie

Phenole in Saft, Bier und Wein haben zwar aufgrund ihrer Eigenschaft als Antioxidantien positive Gesundheitseffekte, allerdings verursachen sie Trübungen, bräunliche Verfärbungen und geschmackliche Veränderungen (oft beschrieben als muffig, schimmelig oder erdig).^[126,127] Ursache hierfür ist die Tatsache, dass Phenole und Polyphenole polymerisieren und mit Proteinen interagieren.^[127,128] Die Anwendung von Laccasen zur Entfernung von Phenolen - zur Erhöhung der Lagerstabilität - wurde bereits für verschiedene Getränke (Tee, Wein, Säfte und Bier) gezeigt.^[129] Geschmackliche Veränderungen wurden auch in mit Kork verschlossenen Getränken beobachtet. Die Behandlung von Weinkorken mit Phenoloxidasen (z.B. Laccasen, Peroxidasen) verringerte geschmackliche Veränderungen und erhöhte deren wasserabweisende Eigenschaft; der Grund hierfür ist vermutlich die Polymerisierung von Phenolen im Korken.^[130]

Im Bäckerhandwerk wird eine Vielzahl von Enzymen (z.B. Amylasen, Sulfhydryloxidasen, Glucoseoxidasen oder Laccasen) als Additive zur Verbesserung der Qualität des Teiges getestet und z.T. bereits eingesetzt. Dies ist besonders bei der Herstellung von glutenfreien

Produkten von Interesse. Die Zugabe von Laccasen verbessert die Glutenstruktur - und somit die Robustheit des Teiges - und vermindert die Klebrigkeit. Brote, deren Teig mit Laccase behandelt worden war, waren größer und weicher als Brote aus unbehandeltem Teig.^[131,132]

Laccasen eignen sich ebenfalls für die Herstellung von Aromastoffen (z.B. Nootkaton)^[133] und Geschmacksverstärkern (z.B. Divanillin).^[134]

1.2.5.3. Organische Synthesen

Der Einsatz von Laccasen in der organischen Chemie wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht, da laccasekatalysierte Reaktionen zur umweltfreundlichen Synthese von Feinchemikalien, biologisch aktiven Verbindungen oder Biomaterialien geeignet sind. Dies spiegelt sich in der Anzahl publizierter Reviews innerhalb der letzten 12 Jahre wider.^[135] Laccasen können in der organischen Chemie für eine Vielzahl von Reaktionen genutzt werden, dazu gehören Dimerisierungen, Polymerisierungen, Cyclisierungen, Aminierungen, Sulfidierungen und Oxidationen.^[22,118,132,135,136,137] Nachfolgend werden für alle genannten Reaktionen Beispiele vorgestellt.

Laccasen werden in der organischen Chemie für oxidative Kupplungen und Kreuzkupplungen von substituierten Catecholen und Hydrochinonen mit Stickstoff-, Schwefel- oder Kohlenstoff-Nucleophilen eingesetzt. Neben C-O- und C-C-Bindungen werden auch C-N- und C-S-Bindungen geknüpft.

Aufgrund der antioxidativen und/oder anticancerogenen Wirkung einiger Phenolsäuren (z.B. Sinapinsäure)^[138] und Flavonoide (z.B. Catechin)^[139] wurden laccasekatalysierte homomolekulare und heteromolekulare Kupplungen zur Synthese biologisch aktiver Derivate verwendet. Dazu gehören unter anderem die homomolekularen Kupplungen von Sinapinsäure, Ferulasäure, Gallussäure, Catechin, Esculin oder Rutin^[28,30,135,140] und die heteromolekulare Kupplung von Catechin mit Hydrochinon.^[141] Mittels laccasekatalysierter phenolischer Kupplung wurden auch funktionalisierte Biaryle,^[142] Dimere des Steroidhormons Östradiol^[26] sowie verschiedene Naturstoffe wie das Lignan Pinoresinol (siehe 1.3.1.)^[143] oder das Stilbenoligomer ϵ -Viniferin synthetisiert.^[144]

Eine Vielzahl laccasekatalysierter Aminierungen wurde bereits analysiert. Eines der wichtigsten Beispiele ist die Modifikation von bekannten Antibiotika für die Synthese neuer Antibiotika, die aufgrund der steigenden Zahl an Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*-Stämmen von globalem Interesse sind. In verschiedenen Studien wurden laccasekatalysierte Aminierungen zur Synthese neuer β -Lactamantibiotika verwendet. Unter anderem wurden Catechin, Benzoessäure sowie *para*- und *ortho*-dihydroxylierte aromatische Säuren für heteromolekulare Kupplungen verwendet.^[23,145,146] Weitere Beispiele für Aminierungsreaktionen sind die Derivatisierung von Aminosäuren (Tryptophan und Phenylalanin),^[147] die Aminofunktionalisierung von *para*-Benzochinonen^[148] oder die Synthese

von Diaminobenzochinonen.^[149] Ebenfalls wurden laccasekatalysierte Cyclisierungen bei der Synthese von Phenoxazin-Derivaten beschrieben.^[117,150] Dabei werden zunächst zwei Substrate oxidiert, anschließend erfolgt eine Disproportionierung der Radikale unter Bildung eines Substrates und eines Chinonimins, welche miteinander reagieren und über eine C=N-Bindung und eine C-O-Bindung Phenoxazin-Derivate bilden.

Für laccasekatalysierte Cyclisierungen gibt es zahlreiche weitere Beispiele, unter anderem die Synthese von Cyclohepten,^[151] Cycloocten^[151] oder Benzimidazol-Derivaten.^[152] Neben C-N-Kupplungen wurde die Anwendung von Laccasen für C-S-Kupplungen für die Synthese von substituierten Catecholthioethern oder 2,3-Ethylendithio-1,4-chinon gezeigt.^[153] Beim zuletzt genannten Beispiel handelt es sich ebenfalls um eine Cyclisierungsreaktion, in der zwei C-S-Bindungen gebildet werden.

Weitere Anwendungen sind Kreuzkupplungen von Catechol und Hydrochinon-Derivaten mit Kohlenstoff-Nucleophilen und laccasekatalysierte Diels-Alder-Reaktionen. Beispiele hierfür sind die Alkylierungen von Nitrilen, cyclischen β -Dicarbonylen, oder die Synthese von O-Heterocyclen, *p*-Benzochinon-Derivaten und Benzofuran-Derivaten.^[154,155] Die Alkylierung von 3,4-Dihydrocumarinen erfolgte in einer chemo-enzymatischen Kaskade mit einer pilzlichen Laccase (siehe 1.3.3.).^[154] Laccase-initiierte Diels-Alder-Reaktionen ermöglichen die Synthese von cyclisierten Produkten wie Naphthochinonen aus Dienen und Chinonen.^[156]

In der Polymerchemie können Laccasen die herkömmlichen Katalysatoren - Übergangsmetalle oder Metalle der Seltenen Erden - ersetzen.^[157] Polymere sind heutzutage in den verschiedensten Bereichen (wie z.B. in Elektronik, Kommunikationstechnik oder Pharmazie) unerlässlich.^[157] Die Synthese von homomolekularen Polymeren aus Syringasäure,^[158] Catechol^[159] oder Anilin,^[160] aber auch von heteromolekularen Polymeren aus Catechol und Diaminobenzolsulfonsäure^[161] wurde mittels Laccasen gezeigt. Zur Synthese von artifiziellem Urushi - als erneuerbare und umweltfreundliche Alternative zu Phenolharzen - wurden Catechol-Derivate mit ungesättigten Alkylresten verwendet.^[162] Neben der Synthese von Polymeren ist ein weiterer Aspekt deren Funktionalisierung. Dazu gehört z.B. die Modifikation und Verknüpfung von Lignocellulosefasern, um Fasern mit neuen und verbesserten Eigenschaften zu synthetisieren.^[136]

Für die Oxidation von benzyllischen, allyllischen, propargyllischen oder aliphatischen Alkoholen können Laccasen in Kombination mit dem Mediator (2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-yl)-oxyl (TEMPO) verwendet werden (siehe auch 1.3.3.).^[113] Alkene, Ether, Amide und aromatische Methylgruppen können ebenfalls mit Laccase/Mediatorsystemen oxidiert werden.^[113]

Im Bereich der Peptidsynthese können Laccasen Schutzgruppen wie Phenylhydrazin von α - und γ -Carboxylgruppen oder Methoxyphenyl von primären Aminen entfernen.^[163] Dies ist ein effektives System zum Entschützen *N*-benzylierter primärer Amine.^[164]

1.3. Kaskadenreaktionen zur Synthese von Lignan

1.3.1. Lignane

Lignane sind biologisch aktive, pflanzliche Sekundärmetabolite mit hoher Diversität. Sie wurden in mehr als 60 verschiedenen Familien der vaskulären Pflanzen nachgewiesen und sind 8-8', 8-5' und 8-O-4' gekoppelte Dimere der Phenylpropanoide.^[165–169] Die 8-8'-Bindung ist dabei die am weitesten verbreitete Dilignolbindung. Verschiedene Monomere, verschiedene Bindungen und verschiedene Modifizierungen ermöglichen diese enorme Diversität an natürlich vorkommenden Lignan.^[170]

Zahlreiche Studien zeigten die Vielseitigkeit ihrer physiologischen Funktionen. Antimikrobielle, fungizide und antivirale Eigenschaften sowie ihre Wirkung als Antioxidans und Fraßschutz vermitteln der Pflanze Schutz vor Pathogenen und Fressfeinden.^[168,171] In der Rotzeder (*Thuja plicata*) wird z.B. bei der Verholzung das Lignan Plicatsäure (siehe Abbildung 1-5) eingelagert, welches Schutz vor Pathogenen vermittelt, aber auch die Farbe, Qualität und Härte des Holzes beeinflusst.^[172] Außerdem sind Lignane sind als Cytokine und Intermediate der Lignifizierung vermutlich an der Zellentwicklung und am Zellwachstum beteiligt.^[168]

Für die Medizin und die pharmazeutische Industrie sind Lignane vor allem für die Behandlung von hormonabhängigen Krankheiten wie Osteoporose, Brust- und Prostatakrebs sowie Herzkreislauferkrankungen von Bedeutung.^[173,174–176] Lignanhaltige Ernährung (wie Leinsamen oder Olivenöl) wird mit gesundheitsfördernden Effekten verbunden.^[169,176,177,178,179] Zum einen besitzen Lignane antioxidative Eigenschaften, zum anderen werden vom Menschen aufgenommene Lignane von der Mikroflora des Darmes in die humanen Enterolignane Enterolacton und Enterodiol umgesetzt, welche als Phytoöstrogene den Hormonhaushalt der Körpers beeinflussen.^[180,181] Zusätzlich wurden für einige Lignane auch direkte Wirkungen beschrieben. So verhindert Pinoresinol, dass der *nuclear factor-κB* durch den *tumor necrosis factor α* aktiviert wird, was eventuell die HIV-1 Transkription inhibieren kann.^[182] Zudem wird das Wachstum von verschiedenen Krebszelllinien inhibiert.^[183] Die Hemmung von Maltasen durch Pinoresinol ermöglicht eine Anwendung als blutzuckersenkendes Mittel.^[184] Aber auch Anwendungen bei Hautpigmentationen, mikrovaskulären Schäden oder pilzlichen Infektionen sind möglich.^[185–187] Weitere antiproliferative Lignane sind bspw. Sesamin^[188] und Podophyllotoxin.^[172]

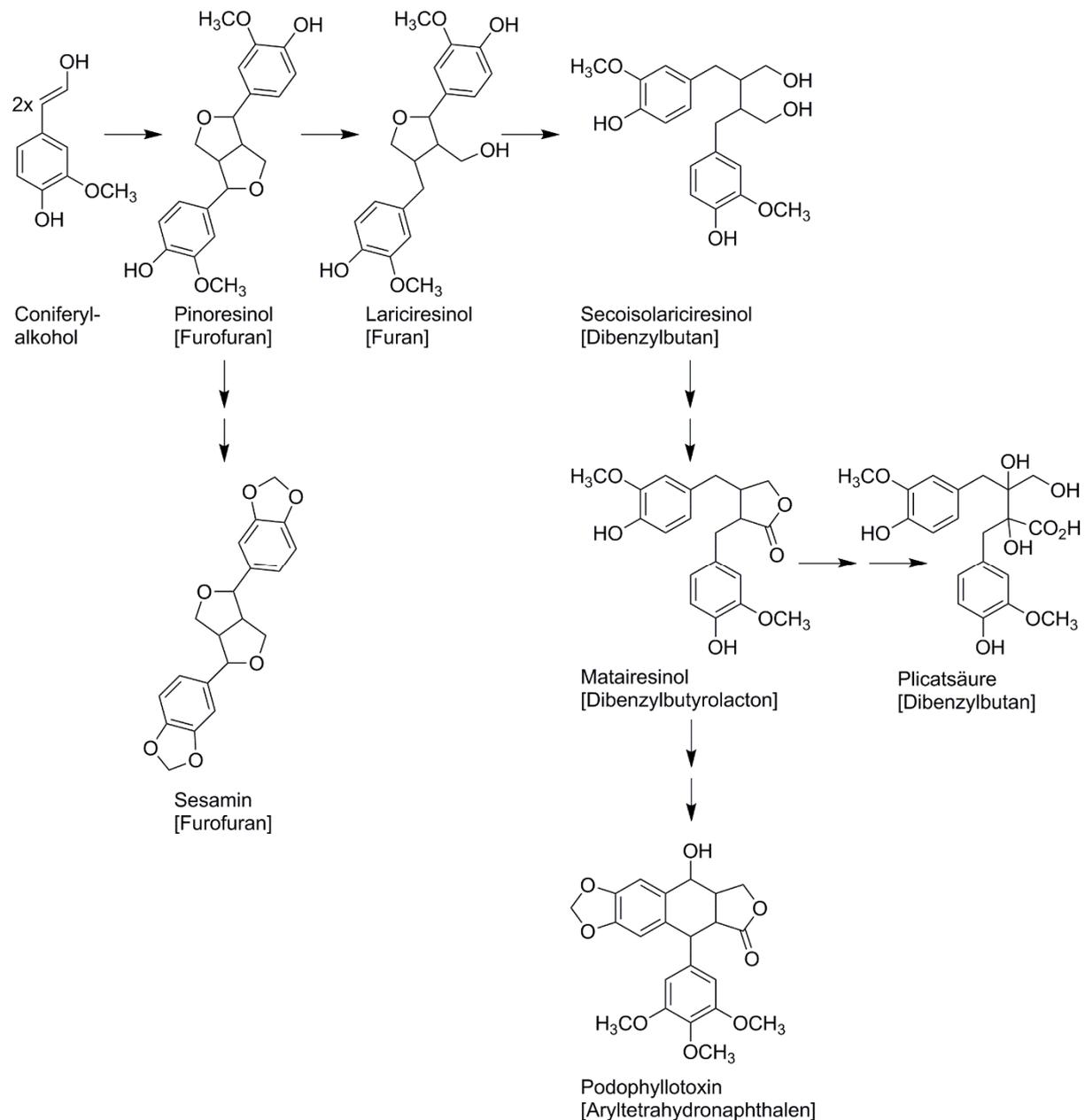


Abbildung 1-5. Hypothetische biokatalytische Synthesewege verschiedener Lignane in Pflanzen. Das gebildete Endprodukt ist pflanzenabhängig. Pfeil: Einschrittreaktion, zwei Pfeile: Mehrschrittreaktion. (Modifiziert nach Fujita *et al.* und Dinkova-Kostova *et al.*)^[168,172]

Das einfachste Lignan ist das Furofuran Pinoresinol, welches in Pflanzen über die oxidative Phenolkupplung von zwei Molekülen Coniferylalkohol synthetisiert wird (siehe Abbildung 1-5). Es ist die Vorstufe der verschiedensten 8-8' gekoppelten Lignane (wie Furane, Dibenzylbutane, Dibenzylbutyrolactone und Aryltetrahydronaphthalene). Die sequentielle Reduktion von Pinoresinol zu Secoisolariciresinol über das Intermediat Lariciresinol wird von Pinoresinol- bzw. Pinoresinol/Lariciresinolreduktasen (siehe 1.3.5.) katalysiert. Die Dehydrierung von Secoisolariciresinol ergibt Matairesinol, welches unter anderem die Vorstufe von Podophyllotoxin und Plicatsäure ist.

Aufgrund der zahlreichen biologischen Aktivitäten von Lignanen wurden chemische und biokatalytische Synthesen entwickelt. Diese nutzen unter anderem die oxidative Phenolkupplung (siehe 1.2.4.) ausgehend von Coniferylalkohol; dabei kann CuSO_4 als homogener Katalysator^[112] oder aber auch Laccasen^[189] und Peroxidasen^[182] als Biokatalysatoren verwendet werden. In der Natur wird Coniferylalkohol über den Shikimate- und den Phenylpropanoidbiosyntheseweg synthetisiert mit Coniferylaldehyd als direkter Vorstufe; dieses wird von der Coniferylaldehyddehydrogenase zu Coniferylalkohol reduziert.^[190] Eine weitere Möglichkeit ist die Synthese von Coniferylalkohol ausgehend von Eugenol, welches von der Vanillylalkoholoxidase hydroxyliert wird (siehe 1.3.4.). Diese Biosynthesewege können einer Kaskadenreaktion zur Synthese von Lignanenzugrunde gelegt werden.

1.3.2. Kaskadenreaktionen

Kaskadenreaktionen sind in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus von Wissenschaft und Industrie gerückt, vor allem in Bezug auf die Nachhaltigkeit von Prozessen.^[191] Dabei dient die Natur - genauer gesagt die lebende Zelle - als Vorbild. In der Zelle läuft in einem Reaktionsraum, dem Cytosol, eine Vielzahl an enzymatischen Reaktionen parallel, effizient und selektiv ab. Die einzelnen Reaktionen werden durch Enzyme katalysiert, die oftmals miteinander kompatibel sind. In Kaskadenreaktionen sollen - analog wie in der Zelle - verschiedene Syntheseschritte kombiniert und idealerweise in einem Topf ohne Aufarbeitung der Zwischenprodukte durchgeführt werden.^[191,192] Diese Art von Reaktion wird auch Eintopfsynthese genannt. Es ist sowohl die Kombination von verschiedenen enzymatischen Schritten als auch die Kombination von Enzymen mit Organo- oder Metallkatalysatoren denkbar. Beide Konzepte wurden bereits erfolgreich demonstriert.^[191,193] Dies ermöglicht neben einer Kostenreduktion aufgrund des Wegfalls von Aufarbeitungsschritten auch die Erhöhung der Umweltverträglichkeit, da weniger Chemikalien und Energie benötigt werden.^[192]

Zahlreiche Enzyme wie Dehydrogenasen, Ketoreduktasen, Transaminasen, P450-Monooxygenasen, Enoatreduktasen, Baeyer-Villiger-Monooxygenasen, Flavoprotein-oxidasen (siehe 1.3.4.), Aldolasen, Hydroxynitrilysasen und Laccasen (siehe 1.3.3.) wurden bereits zur Synthese der verschiedensten Substanzen verwendet.^[191,193,194,195]

1.3.3. Laccasen in Kaskadenreaktionen

Für Laccasen wurden in der Literatur chemo-enzymatische und multi-enzymatische Kaskaden beschrieben. Zur Acylierung von Cumarinen wurde ein konsekutiver Eintopfprozess beschrieben. Im ersten Schritt wurden Cumarine in einem Durchflussreaktor hydriert, um in

einem nachfolgenden Schritt mittels laccase-initiiertes Michael-Addition acyliert zu werden (Abbildung 1-6 A).^[154] Ebenfalls ist die Acylierung von Aldehyden mittels Laccasen in Eintopfprozessen möglich (Abbildung 1-6 B).^[196]

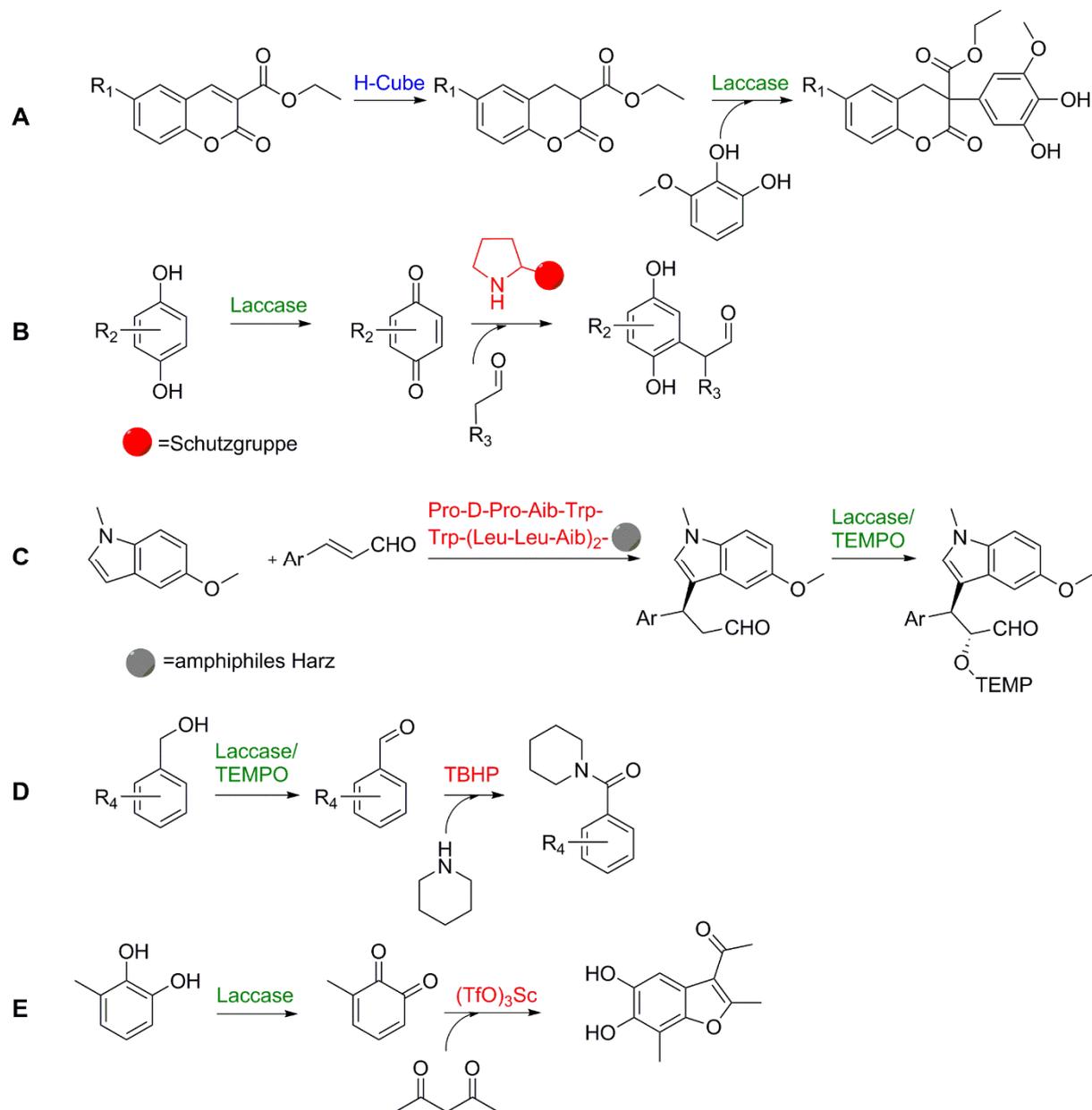


Abbildung 1-6. Chemo-enzymatische Eintopfsynthesen unter Verwendung von Laccasen. Grün: Biokatalysator, rot: Organokatalysator, blau: Metallkatalysator. A) Acylierung von Cumarin-Derivaten,^[154] B) Acylierung von Aldehyden,^[196] C) Oxyfunktionalisierung von Indol-Derivaten,^[197] D) Oxidative Aminierung von Alkoholen,^[198] E) Synthese von Benzofuran.^[199]

Oxyfunktionalisierte Indol- und Pyrrol-Derivate wurden in sequentiellen Eintopfprozessen mit einem Peptidkatalysator und einem Laccase/Mediatorsystem synthetisiert. Dabei wurde eine peptidkatalysierte Friedel-Crafts-ähnliche Alkylierung von α,β-ungesättigten Aldehyden mit einer α-Oxyaminierung gekoppelt (Abbildung 1-6 C).^[197,200] Ebenfalls können Laccasen zur

Synthese von Amiden aus Alkoholen eingesetzt werden.^[198] Der Alkohol wurde durch ein Laccase/TEMPO-System im ersten Schritt zum Aldehyd oxidiert, anschließend erfolgte die oxidative Amidierung mit Hilfe des Oxidationsmittels *tert*-Butylhydroperoxid (Abbildung 1-6 D). Für die Synthese von Benzofuran wurde erst eine chemo-enzymatische Kaskade bestehend aus laccasekatalysierter Oxidation von Catechol und Sc(OFT)₃-katalysierter Michael-Addition (siehe Abbildung 1-6 E) und anschließend eine multi-enzymatische Kaskade bestehend aus laccasekatalysierter Oxidation und lipasekatalysierter Michael-Addition entwickelt.^[199,201]

Die Arbeitsgruppe von Prof. Frank Hollmann (Technische Universität Delft) zeigte am Beispiel eines Laccase/ABTS-Systems, dass die Kombination von Laccase und Mediator für die Cofaktorregenerierung von NAD(P)⁺ bei der Oxidation von Alkoholen mittels Alkoholdehydrogenasen (ADH) genutzt werden kann (siehe Abbildung 1-7 A).^[202]

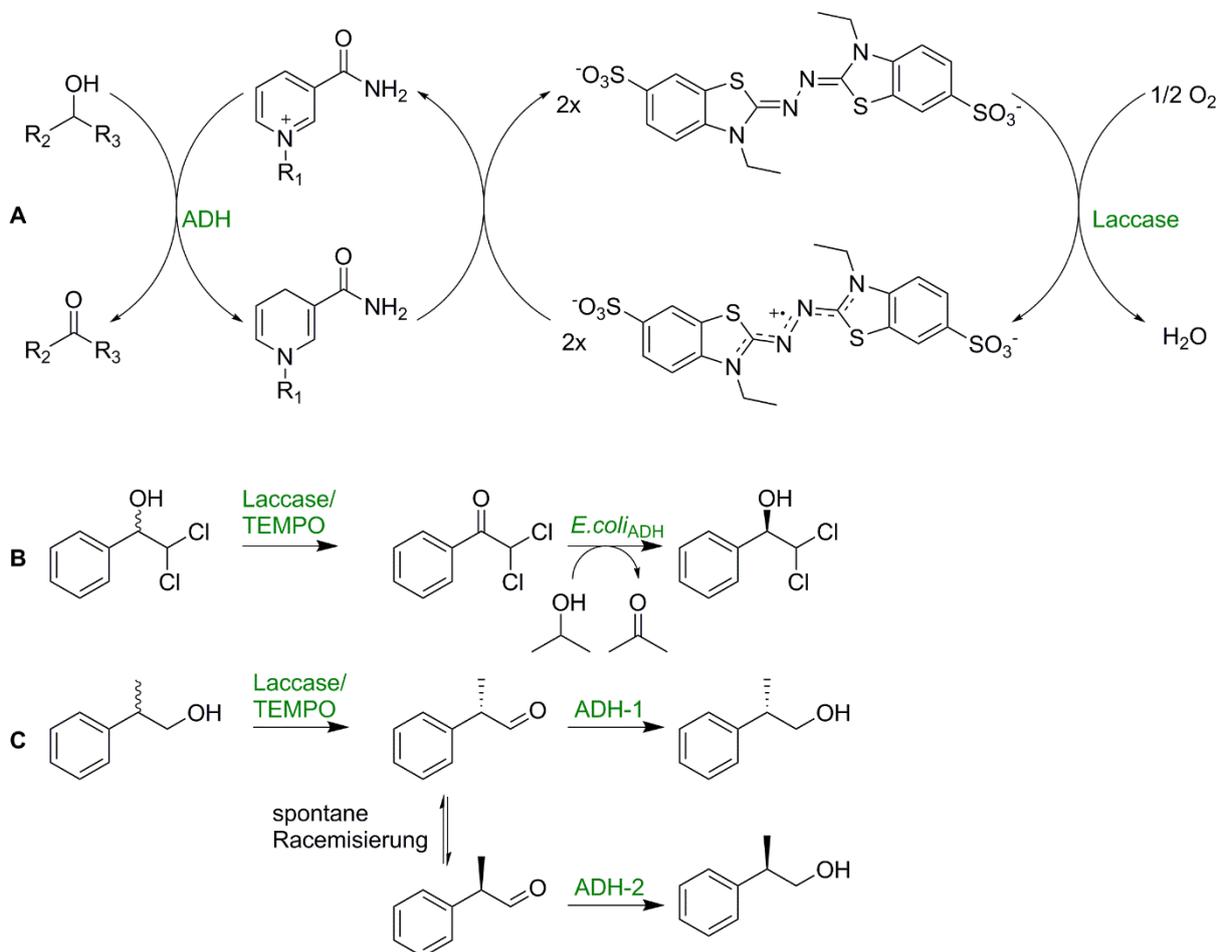


Abbildung 1-7. Multi-enzymatische Eintopfsynthesen unter Verwendung von Laccasen. A) Laccase/Mediatorsystem zur Cofaktorregenerierung,^[202] B) Laccase/TEMPO-System zur Deracemisierung von 2,2-Dichloro-1-phenylethanol,^[203] C) Laccase/TEMPO-System zur Deracemisierung von *rac*-2-Phenyl-1-propanol.^[204]

Neben dem genannten Laccase/Mediatorsystem eignen sich auch andere Substrate als Mediatoren zur Cofaktorregenerierung, wie z.B. Meldolablauf, Acetosyringon, Syringaldehyd, Syringaldazin oder Kaffeesäure.^[205]

Die Kombination von Laccase und dem Mediator TEMPO ermöglicht die Deracemisierung von *rac*-2,2-Dichloro-1-phenylethanol und *rac*-2-Phenyl-1-propanol (siehe Abbildung 1-7 B und C). Das Laccase/Mediatorsystem oxidiert den Alkohol unabhängig von der Konfiguration des Substrates zum Aldehyd, welches nachfolgend in Abhängigkeit von der verwendeten ADH enantioselektiv reduziert wird.^[203,204] Die Oxidation von Alkoholen mit dem Laccase/TEMPO-System wurde auch mit einer D-Fructose-6-Phosphataldolase-katalysierten Aldoladdition gekoppelt.^[206]

1.3.4. Vanillylalkoholoxidase

Die Vanillylalkoholoxidase (VAO; E.C. 1.1.3.38) ist der Prototyp der Flavoprotein-oxidasen, welche ein Flavinadeninucleotid (FAD) als prosthetische Gruppe besitzen. Sie katalysieren die Oxidation phenolischer Substrate, ohne dass weitere Cofaktoren notwendig sind.^[207] In der ersten Hälfte des Katalysemechanismus wird Flavin vom Substrat reduziert und in der zweiten Hälfte mit Hilfe von Sauerstoff unter Bildung von Wasserstoffperoxid wieder oxidiert.^[208]

Die VAO aus *Penicillium simplicissimum* (PsVAO) wurde in den Arbeitsgruppen von Prof. Willem J.H. van Berkel (Universität Wageningen) und Prof. Andrea Mattevi (Universität Pavia) intensiv erforscht. 1992 wurde das Enzym aus dem Pilz isoliert und charakterisiert,^[209] 1997 wurde die Kristallstruktur von PsVAO als erste Struktur einer flavinabhängigen Arylalkoholoxidase publiziert.^[210,211] Die PsVAO ist ein Homooctamer mit einem Molekulargewicht von 520 kDa. Jede Untereinheit enthält ein über His422 kovalent gebundenes 8 α -(N³-Histidyl)-FAD.^[209] Das kovalent gebundene FAD erhöht die Langzeitstabilität von PsVAO^[212] und beeinflusst das Redoxpotential (+55 mV) und somit die katalytische Effizienz.^[213] Zusätzlich hängt die Protein-assemblierung des Holoenzym zum Octamer vom FAD ab.^[214] Das pH-Optimum des Enzyms liegt zwischen pH 9 – 10,5, das Temperaturoptimum bei 38°C.^[209]

Die PsVAO katalysiert eine Vielzahl von Reaktionen (Abbildung 1-8), wie die Oxidation von 4-Hydroxybenzyl-Derivaten, die oxidative Demethylierung und Deaminierung von Phenol-Derivaten, die Hydratisierung und Dehydrierung von Alkylphenolen sowie die Hydroxylierung von Allylphenolen.^[215] Die Art der Katalyse wird dabei vom C α -Atom des Substrates bestimmt. Am aktivsten ist PsVAO gegenüber 4-Allylphenolen (z.B. Eugenol).

Strukturanalysen zeigten, dass der Aufbau der Substratbindetasche unter anderem das Substratspektrum bestimmt. Die Größe der Substratbindetasche bedingt, dass nur Phenol-Derivate mit aliphatischen Ketten bis zu sieben C-Atomen umgesetzt werden können und dass maximal eine Methoxygruppe an der *ortho*-Position vorhanden sein darf.^[211]

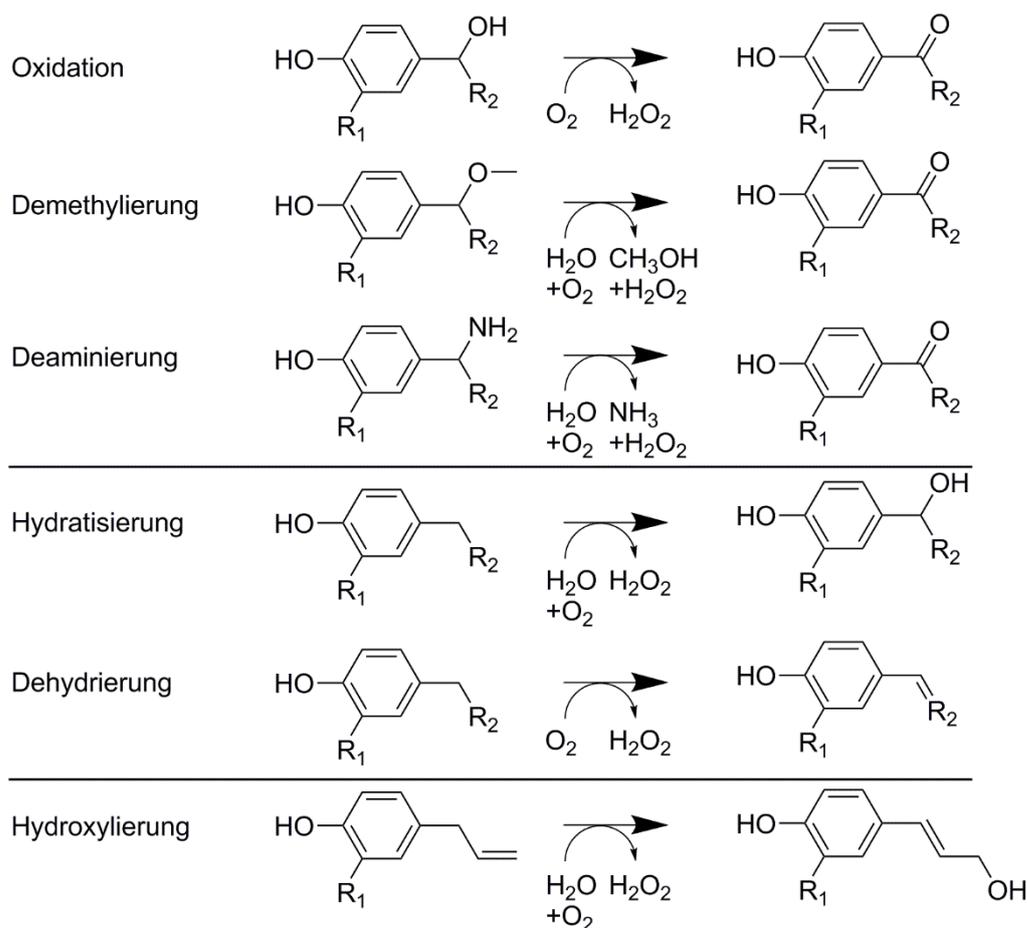


Abbildung 1-8. PsVAO-katalysierte Reaktionen. (Modifiziert nach van den Heuvel *et al.*)^[212,216]

Die physiologische Funktion der PsVAO ist nicht eindeutig geklärt, allerdings weisen die Induktion der Genexpression durch 4-Methoxymethylphenol sowie der von *P. simplicissimum* katalysierte Abbau von 4-Methoxymethylphenol darauf hin, dass PsVAO am Metabolismus von phenolischen Methylethern beteiligt ist.^[217]

Der Katalysemechanismus wurde für verschiedene Substrate mit Hilfe von Isotopenmarkierungen und *Stopped-Flow-Analysen* genauer untersucht. Isotopenmarkierungen (H_2^{18}O) zeigten, dass der bei der oxidativen Demethylierung eingebrachte Sauerstoff von Wasser und nicht von molekularem Sauerstoff stammt.^[208] Dies gilt ebenfalls für die Hydratisierung von Allylphenolen^[215] und die Hydroxylierung von Alkylphenolen.^[218] Das Substrat wird also erst aktiviert, und anschließend erfolgt der nucleophile Angriff von Wasser am α -Atom des Substrates.

Bei allen untersuchten Substraten erfolgte in der reduktiven Teilreaktion zunächst die Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes mit nachfolgendem Hydridtransfer vom α -Atom auf das N5-Atom des Flavins bei gleichzeitiger Bildung eines binären Komplexes aus reduziertem Enzym und *p*-Chinonmethid (Abbildung 1-9 und Abbildung 1-10). Oftmals ist die Reduktion des Flavins geschwindigkeitsbestimmend. In Abhängigkeit vom Substrat erfolgt die

Re-Oxidation des Flavins entweder über den ternären Komplexmechanismus (Abbildung 1-9, in blau dargestellt) oder den Ping-Pong-Mechanismus (Abbildung 1-9, in grün dargestellt).

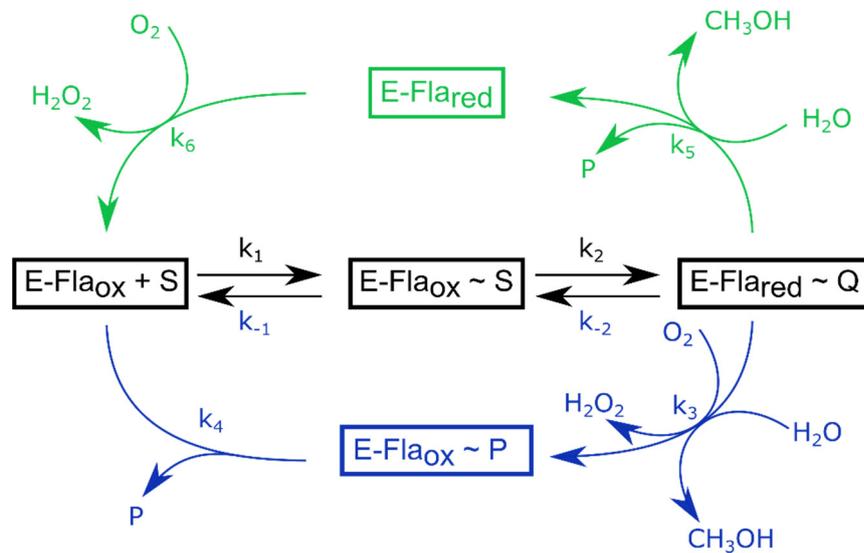


Abbildung 1-9. Schematische Darstellung des kinetischen Mechanismus der PsVAO am Beispiel einer oxidativen Demethylierung. Schwarz: reduktiver Teil des Katalysemechanismus; blau: Oxidation über den ternären Komplexmechanismus; grün: Oxidation über den Ping-Pong-Mechanismus. (Modifiziert nach Fraaije und van Berkel)^[208]

So erfolgt die Umsetzung des physiologischen Substrates 4-(Methoxymethyl)phenol über den ternären Katalysemechanismus; in der oxidativen Teilreaktion wird FAD durch molekularen Sauerstoff unter Freisetzung von H_2O_2 schnell reoxidiert. Dies bedingt eine geringfügige Änderung in der Substratbindetasche, wodurch der Zugang von Wasser in die Bindetasche ermöglicht wird. Das Intermediat wird zum Produkt umgesetzt und das Produkt anschließend aus der Bindetasche entlassen. Im Gegensatz dazu erfolgt die Oxidation von Vanillylalkohol über den Ping-Pong-Mechanismus. Dabei zerfällt der reduzierte Enzym/*p*-Chinon-Komplex unter Bildung des Produktes ohne vorherige Re-Oxidation des Flavins.

Kristallstrukturanalysen zeigten, dass PsVAO eine ausgedehnte hydrophobe Bindetasche besitzt. Die Aktivierung des Substrates erfolgt in der Anionenbindetasche mittels der Aminosäuren Tyr503, Tyr108 und Arg504. Diese stabilisieren die Phenolatform über ionische Wechselwirkungen. Nach dem Hydridtransfer und der Bildung des reduzierten Enzym/*p*-Chinon-Komplexes stabilisieren Arg504 und Asp170 die reduzierte anionische Form des Flavins und somit das Intermediat (siehe Abbildung 1-10).

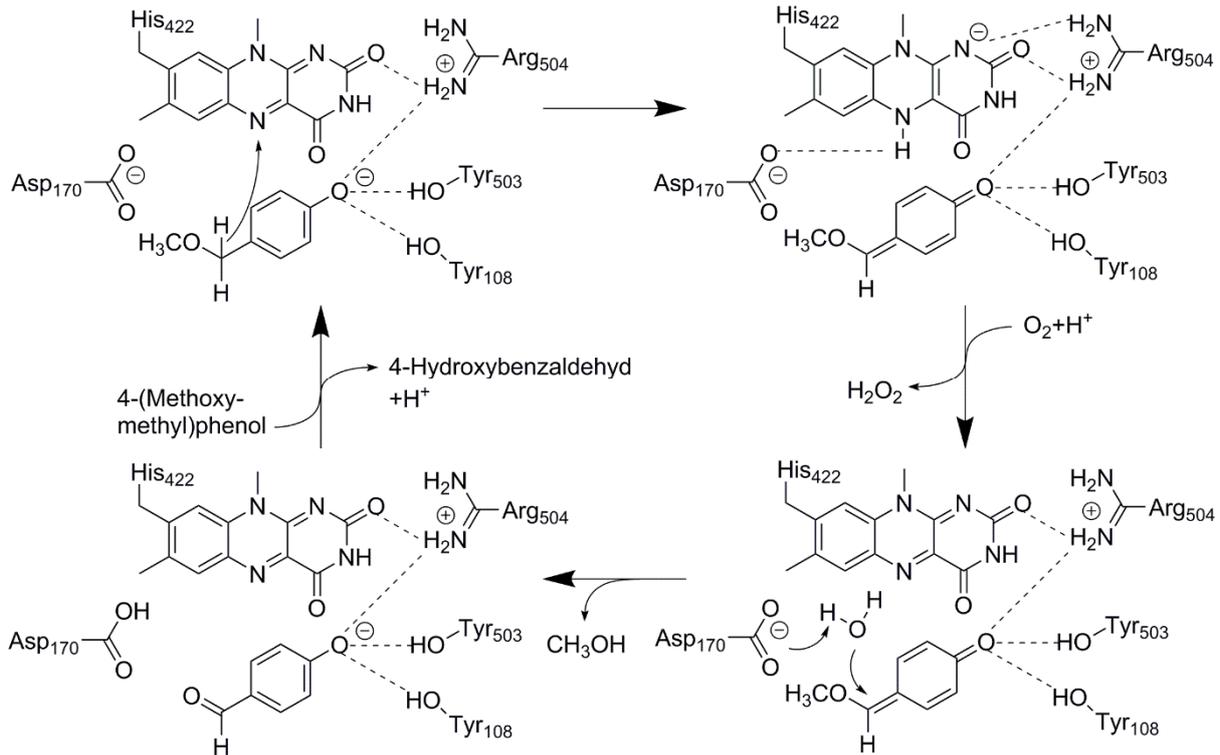


Abbildung 1-10. PsVAO-katalysierte Umsetzung von 4-(Methoxymethyl)phenol. Im ersten Schritt erfolgt die Flavindereduktion durch einen Hydridtransfer vom C α -Atom des Substrates auf das N5-Atom des Flavins. Der gebildete Komplex aus *p*-Chinon und reduziertem Enzym wird von den Aminosäuren Arg504 und Asp170 stabilisiert. Die Re-Oxidation erfolgt durch Sauerstoff unter Bildung von Wasserstoffperoxid. Nachfolgend erfolgt ein nucleophiler Angriff des Wassers an das allylische C α -Atom. (Modifiziert nach van den Heuvel *et al.*)^[219]

Wie in Abbildung 1-10 dargestellt, liegt die Aminosäure Asp170 in der aktiven Bindetasche der PsVAO in räumlicher Nähe zum N5-Atom des Flavins und zum reaktiven C α -Atom des Substrates und ist aus zwei Gründen von besonderer Bedeutung für das Enzym: Es beeinflusst (i) die autokatalytische Bindung des FADs und (ii) das Redoxpotential. Im Vergleich zu anderen Flavoproteinen ist eine saure Aminosäure an dieser Position ungewöhnlich.^[219,220] Mutationen an dieser Position erniedrigen das Redoxpotential (WT: +55 mV, D170E: +6 mV, D170S: -91 mV), was zu einer langsameren Reduktion des Flavins und somit zu verringerten k_{cat} -Werten im Vergleich zum Wildtyp führt.^[219] Außerdem wurde gezeigt, dass Mutationen an dieser Position zur Folge haben, dass der erste Schritt des Katalysemechanismus - die Reduktion des Flavins - reversibel wird. Dies lässt auf eine verminderte Stabilisierung des reduzierten Enzym/*p*-Chinon-Komplexes schließen, da Asp170 im Wildtyp mit dem protonierten N5-Atom eine Wasserstoffbrückenbindung bildet.

Aus biotechnologischer Sicht ist PsVAO hinsichtlich der Produktion von „natürlichem“ Vanillin von besonderem Interesse. Vanillin kann aus verschiedensten Substraten (wie Vanillylalkohol, 2-(Methoxymethyl)phenol, Vanillylamin, Capsaicin, Cresol, Eugenol)

synthetisiert werden.^[194,221] Capsaicin, Cresol und Eugenol sind aufgrund der hohen Verfügbarkeit und des damit verbundenen günstigen Preises als Ausgangssubstanzen für biotechnologische Prozesse besonders geeignet.^[194,221] Die Umsetzungen von Cresol und Capsaicin zu Vanillin erfolgen in zweistufigen Prozessen. Cresol wird im ersten Schritt von PsVAO zu Vanillylalkohol hydroxyliert und dann weiter zu Vanillin oxidiert (siehe Abbildung 1-11 A). Diese Umsetzung ist allerdings sehr langsam, da im ersten Schritt ein stabiles FAD-N5-Cresol-Addukt entsteht, welches nur langsam zu Vanillylalkohol zerfällt. Mittels fehlerhafter Polymerasekettenreaktion (*error-prone-PCR*) wurde eine Mutante generiert, deren katalytische Effizienz für den ersten Schritt im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 40 besser ist.^[222] Bei der Umsetzung von Capsaicin katalysiert eine Carboxylesterase (z.B. aus der Leber von Ratten) die Spaltung der Säureamidbindung unter Freisetzung von Vanillylamin und 8-Methylnon-6-ensäure. Vanillylamin wird im zweiten Schritt unter Bildung von Vanillin durch PsVAO deaminiert (siehe Abbildung 1-11 B).^[194] Eine weitere Alternative ist die Synthese von Vanillin in einer multi-enzymatischen Synthese ausgehend von Eugenol (siehe Abbildung 1-11 C). Dieses wird mittels PsVAO zu Coniferylalkohol hydroxyliert, welches in vier weiteren enzymatischen Schritten zu Vanillin umgesetzt wird.^[221]

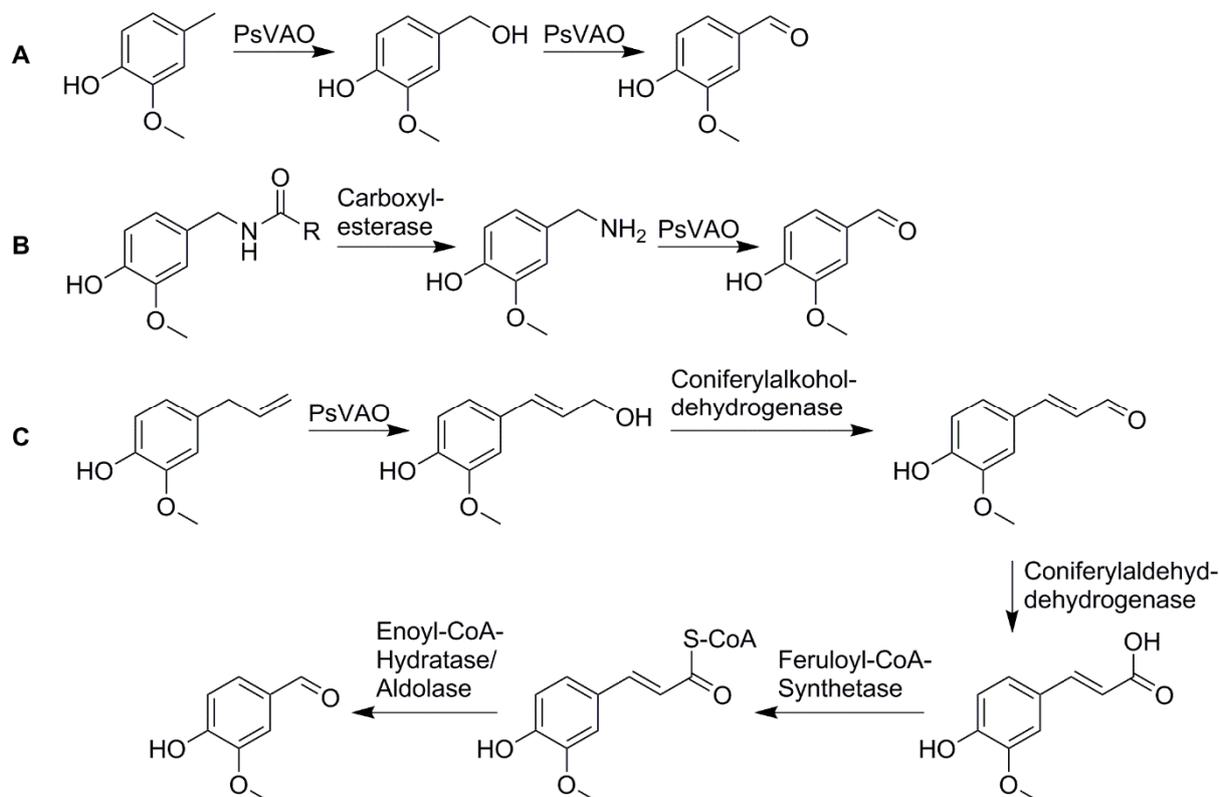


Abbildung 1-11. Synthese von Vanillin mittels PsVAO ausgehend von verschiedenen Substraten. A) Umsetzung von Cresol in einem zweistufigen Prozess, in dem beide Schritte von PsVAO katalysiert werden,^[194] B) Umsetzung von Capsaicin in einem zweistufigen Prozess mittels einer Carboxylesterase und PsVAO,^[194] C) Umsetzung von Eugenol in einem multi-enzymatischen Prozess.^[221]

1.3.5. Pinoresinol- und Pinoresinol/Lariciresinolreduktasen

Pinoresinolreduktasen (PrR) katalysieren die Reduktion des Furofurans Pinoresinol zum Furan Lariciresinol; Pinoresinol/Lariciresinolreduktasen (PLR) katalysieren in einem weiteren Schritt die Reduktion von Lariciresinol zu Secoisolariciresinol. PrR und PLR (E.C. 1.23.1.1-4) wurden hauptsächlich in verschiedenen Pflanzenarten nachgewiesen,^[165,166,168,170,172,223–226] bis auf zwei Enzyme, welche in Sphingomonaden identifiziert wurden.^[227,228] Sie sind natürlicherweise an der Lignanbiosynthese beteiligt (zu Lignan siehe Kapitel 1.3.1.).

PrR und PLR haben hohe Sequenzidentitäten zu Isoflavonreduktasen und Phenylcumarinbenzylether-Reduktasen. Sie besitzen am N-Terminus eine konservierte NADPH-Bindedomäne (GxxGxxG/GxGxxG) und sechs konservierte hydrophobe Aminosäuren.^[168,223] Da Lignane im Gegensatz zu Isoflavonoiden in der Pflanzenwelt weit verbreitet sind, wird davon ausgegangen, dass sich die Isoflavonreduktasen aus den Lignanreduktasen entwickelt haben.^[168]

Die erste PLR wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Norman G. Lewis (Washington State Universität) Anfang der 90er nachgewiesen. Bei Zugabe von Coniferylalkohol, Wasserstoffperoxid und NADPH zum Zellextrakt von *Forsythia intermedia* wurde die Bildung von enantiomerenreinem (-)-Pinoresinol und (-)-Secoisolariciresinol beobachtet.^[229] Daraus wurde geschlossen, dass Coniferylalkohol zu (±)-Pinoresinol gekuppelt wird, aber lediglich (+)-Pinoresinol anschließend zu (+)-Lariciresinol und weiter zu (-)-Secoisolariciresinol reduziert wird (siehe Abbildung 1-12). In nachfolgenden Studien wurden zwei Isoformen des NADPH-abhängigen Enzyms charakterisiert und als PLR identifiziert, welche den selektiven Hydridtransfer vom NADPH zur Reduktion von (+)-Pinoresinol und (+)-Lariciresinol katalysieren. Dabei werden Hydride auf die chiralen C7-Atome des Furanringes übertragen, wodurch diese achiral werden.^[230]

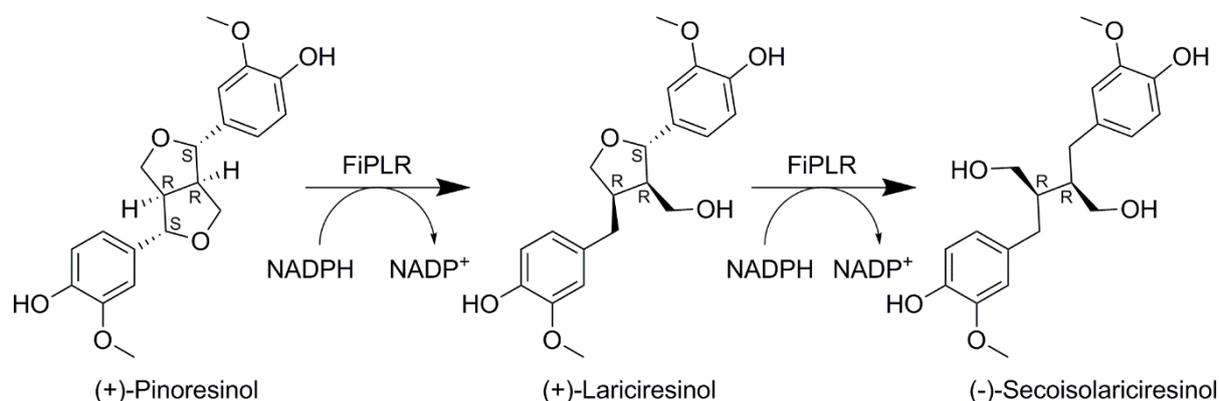


Abbildung 1-12. Umsetzung von (+)-Pinoresinol zum Produkt (-)-Secoisolariciresinol mittels PLR aus *F. intermedia*.

Inzwischen wurden weitere PLR identifiziert, die enantiospezifisch (-)-Pinoresinol und (-)-Lariciresinol^[172,226] oder unspezifisch beide Enantiomere von Pinoresinol reduzieren.^[166,227] Interessanterweise wurden in einigen Pflanzen sowohl (+)-spezifische als auch (-)-spezifische Reduktasen nachgewiesen, worin sich die enorme Komplexität des pflanzlichen Zellmetabolismus widerspiegelt.^[172,231] Dies zeigt sich z.B. in der Großen Klette (*Arctium lappa*) und dem Staudenlein (*Linum perenne*). Im Blattstiel von *A. lappa* akkumuliert hauptsächlich (+)-Secoisolariciresinol, in den Samen hingegen (-)-Secoisolariciresinol.^[232] Die PLR aus *L. perenne* reduziert bevorzugt (+)-Pinoresinol, im nachfolgenden Schritt aber bevorzugt (-)-Lariciresinol.^[165]

Die Anzahl gut charakterisierter PrR und PLR ist allerdings gering, ebenso wurde bis heute lediglich eine Kristallstruktur aufgeklärt, und zwar die der PLR aus *T. plicata*.^[233] Dies bedingt, dass der genaue Reaktionsmechanismus und die Aminosäuren, die die unterschiedlichen Enantioselektivitäten bestimmen, noch unbekannt sind.

1.4. Ziele der Arbeit

Laccasen sind für industrielle Anwendungen aufgrund ihres breiten Substratspektrums, der Verwendung von Sauerstoff als Cosubstrat und Wasser als einzigem Nebenprodukt sowie der Tatsache, dass sie Cofaktor-unabhängig sind, von großem Interesse.

Pilzliche Laccasen wurden bereits Ende des 18. Jahrhunderts nachgewiesen und seitdem intensiv charakterisiert und hinsichtlich der verschiedensten Anwendungen analysiert. Der erste Hinweis auf bakterielle Laccasen erfolgte dagegen erst ein Jahrhundert später (vor ca. 25 Jahren). Die Anzahl bisher charakterisierter bakterieller Laccasen ist gering, obwohl diese hinsichtlich der Anwendung in industriellen Prozessen vielversprechende Eigenschaften zeigen. Sie können im Gegensatz zu pilzlichen Laccasen im einfach zu handhabendem und gut etabliertem Expressionssystem *E. coli* produziert werden und sind bei erhöhten Temperaturen und im neutralen bis basischen pH-Bereich stabil. Auch ihre Stabilität gegenüber Lösungsmitteln, hohen Salzkonzentrationen sowie Detergenzien macht sie zu potentiellen Kandidaten für industrielle Anwendungen.

Das Potential von bakteriellen Laccasen in der Biokatalyse sowie in multi-enzymatischen Kaskaden wurde trotz des vermehrten Interesses der Industrie und der Wissenschaft bisher kaum analysiert. Die Anwendung einer bakteriellen Laccase in einem multi-enzymatischen Prozess zur Synthese von Feinchemikalien wurde (nach bestem Wissen) noch nicht in der Literatur beschrieben.

In diesem Zusammenhang wurden folgende Ziele aufgestellt:

- I. Um das Spektrum an charakterisierten bakteriellen Laccasen zu erweitern, soll ein als Multikupferoxidase annotiertes Enzym aus *Corynebacterium glutamicum* kloniert, in

- E. coli* produziert und charakterisiert werden. Hinsichtlich eines potentiellen biokatalytischen Einsatzes soll das Substrat- und Produktspektrum analysiert werden.
- II. Des Weiteren soll der Einsatz bakterieller Laccasen für die Kupplung von Coniferylalkohol analysiert werden. Im Falle eines positiven Ergebnisses soll eine multi-enzymatische Kaskade in Kombination mit der Vanillylalkoholoxidase aus *P. simplicissimum* zur Synthese des Lignans (\pm)-Pinoresinol entwickelt und optimiert werden.
 - III. Im letzten Schritt soll getestet werden, ob die Methode der kinetischen Racematspaltung für die Synthese von enantiomerenreinem Pinoresinol (und weiteren Lignanen) geeignet ist. Dafür soll die multi-enzymatische Kaskade um eine enantiospezifische Pinoresinolreduktase oder Pinoresinol/Lariciresinolreduktase erweitert werden.

2. Manuskripte

2.1. Liste der Publikationen

- (1) E. Ricklefs, N. Winkler, K. Koschorreck and V.B. Urlacher, 2014, Expanding the laccase-toolbox: A laccase from *Corynebacterium glutamicum* with phenol coupling and cuprous oxidase activity, *Journal of Biotechnology*, 191(10):46-53.
- (2) E. Ricklefs, M. Girhard, K. Koschorreck, M.S. Smit and V.B. Urlacher, 2015, Two-step One-pot Synthesis of Pinoresinol from Eugenol in an Enzymatic Cascade, *ChemCatChem*, 7(12):1857-1864.
- (3) E. Ricklefs, M. Girhard and V.B. Urlacher, 2016, Three-steps in one-pot: whole-cell biocatalytic synthesis of enantiopure (+)- and (-)-pinoresinol via kinetic resolution, *Microbial Cell Factories*, 15:78.

2.2. Manuskript 1: Expanding the laccase-toolbox

2.2.1. Manuskript

Titel: Expanding the laccase-toolbox: A laccase from *Corynebacterium glutamicum* with phenol coupling and cuprous oxidase activity

Autoren: Esther Ricklefs, Nadine Winkler, Katja Koschorreck, Vlada B. Urlacher

Publiziert in: *Journal of Biotechnology*, **2014**, 191, 46-53

DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.05.031

Beitrag: Expression und Aufreinigung von CgL1, Bestimmung der kinetischen Daten der Cu⁺-Oxidation, Bestimmung des Temperaturoptimums, *Up-Scaling*-Experimente und Strukturaufklärung des Produktes, Betreuung der Bachelorarbeit von Nadine Winkler (Bestimmung des Redoxpotentials, Substratscreening und Stabilität in organischen Lösungsmitteln), Schreiben des Manuskriptes

Bemerkung: Nachgedruckt mit der Erlaubnis von Elsevier (Lizenznummer: 3724251144699).

Das Originalmanuskript kann unter folgender URL eingesehen werden:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165614002776>



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Biotechnology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jbiotec

Expanding the laccase-toolbox: A laccase from *Corynebacterium glutamicum* with phenol coupling and cuprous oxidase activity



Esther Ricklefs, Nadine Winkler, Katja Koschorreck, Vlada B. Urlacher*

Institute of Biochemistry, Heinrich-Heine University Düsseldorf, Universitätsstr. 1, 40225 Düsseldorf, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 March 2014

Received in revised form 23 May 2014

Accepted 30 May 2014

Available online 6 June 2014

Keywords:

Laccase

Corynebacterium glutamicum

Phenol coupling

Dimerization

Cu⁺ oxidation

ABSTRACT

Laccases are oxidases with potential for application in biotechnology. Up to now only fungal laccases have been applied in technical processes, although bacterial laccases are generally easier to handle and more stable at alkaline pH values and elevated temperatures. To increase the toolbox of bacterial laccases and to broaden our knowledge about them, new enzymes have to be characterized. Within this study, we describe the new bacterial laccase CgL1 from *Corynebacterium glutamicum*. CgL1 was found to oxidize typical laccase substrates like 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), syringaldazine and 2,6-dimethoxyphenol. The enzyme also demonstrates cuprous oxidase activity. Furthermore, CgL1 is active for several hours at temperatures up to 60 °C and at alkaline pH, as well as stable in different organic solvents. This makes CgL1 a potential candidate for technical applications. In addition, CgL1 was found to catalyze the C–C/O– coupling of several phenolic compounds which can serve as precursors for the synthesis of natural products like antibiotics and phytohormones. This activity and product distribution were influenced by pH value and mediators used.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Laccases (benzenediol:oxygen oxidoreductases, EC 1.10.3.2) belong together with ascorbate oxidases and ceruloplasmins to the group of multicopper oxidases (MCO). They catalyze one-electron oxidation of four substrate molecules with concomitant four-electron reduction of molecular oxygen to water. Most MCOs consist of three cupredoxin-domains and contain four copper atoms (Murphy et al., 1997; Nakamura and Go, 2005), which are necessary for catalytic activity (Messerschmidt, 1997; Solomon et al., 1996). Type I copper is responsible for the typical blue color of laccases and for substrate oxidation. Type II and III copper are forming a trinuclear cluster (Claus, 2003) and transfer the electrons abstracted from the substrate to oxygen as final acceptor. Laccases are known since the early 1880th, when they were first identified from the sap of *Rhus vernicifera* (Yoshida, 1883). Although laccases generally display only a low sequence similarity, the copper binding

sites, as well as their two-dimensional structures and the catalytic mechanism are highly conserved (Nakamura and Go, 2005).

Beside plants laccases occur also in other organisms. In insects laccases are involved in sclerotization of cuticle (Andersen et al., 1996; Dittmer et al., 2004) and may also play a role in the insects' immune response and iron metabolism (Gregorio et al., 2001; Nichol et al., 2002). Fungal laccases are involved in morphogenesis, stress defense and fungi–plant interaction (Thurston, 1994). Recent genome sequencing projects revealed that laccases are also widespread in bacteria. Although the number of described bacterial laccases is increasing (Gunne et al., 2012; Koschorreck et al., 2008; Machczynski et al., 2004; Telke et al., 2009; Zheng et al., 2013), their role in bacteria remains not completely understood. Apparently, bacterial laccases play a role in cell pigmentation, resistance of endospores against UV light and hydrogen peroxide (Sharma et al., 2007), as well as in copper homeostasis (Schelder et al., 2011; Singh et al., 2011).

Regarding the substrate spectra laccases oxidize *ortho*- and *para*-diphenols, aminophenols, polyphenols, polyamines and aryl amines (Morozova et al., 2007; Solomon et al., 1996). The substrate spectrum can further be increased by addition of low molecular weight compounds, so called mediators (Camarero et al., 2005; Eggert et al., 1996). The oxidized substrates form reactive radicals, which can either be released as oxidized products or undergo polymerization to di-, oligo- or polymers (Claus, 2003). Further reactions that have been described in literature are ring cleavage

Abbreviations: ABTS, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid); SGZ, syringaldazine; 2,6-DMP, 2,6-dimethoxyphenol; MCO, multi-copper oxidase; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; PCR, polymerase chain reaction; HOBt, 1-hydroxybenzotriazole.

* Corresponding author. Tel.: +49 211 81 13889; fax: +49 211 81 13117.

E-mail address: vlada.urlacher@uni-duesseldorf.de (V.B. Urlacher).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.05.031>

0168-1656/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

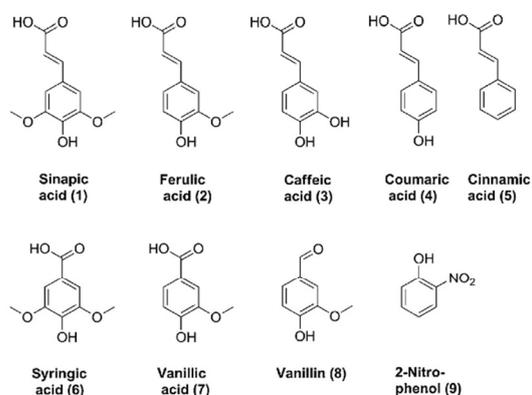


Fig. 1. Substances used for substrate screening of CgI1.

and degradation or functionalization of polymers (Bourbonnais and Paice, 1990; Camarero et al., 2005; Kawai et al., 1988). Additionally it has been shown that inorganic/organic metal compounds can be oxidized (Höfer and Schlosser, 1999; Singh et al., 2004).

Among the broad substrate range of laccases, the environmentally-friendly aspect of these enzymes makes them quite attractive for biotechnological applications. They produce water as only by-product and do not require cofactors. Based on registered patents, potential applications of laccases in biotechnology are very versatile and include different industrial branches (Budolfsen et al., 2013; Chakar and Ragauskas, 2001; Conrad et al., 2000; Ferneth et al., 2005; Hall et al., 1999; Johansen, 2000; Lang, 1998). In the paper and textile industry laccases can be used for decolorization (Call and Mücke, 1997; Hall et al., 1999). Additional applications emerge in the fields of bioremediation, biofuel cells and in the pharmaceutical and cosmetic industry. In organic synthesis the production of antibiotic derivatives via laccase catalyzed phenol coupling has been proven (Mikolasch and Schauer, 2009). However, up to now the commercial exploitation of laccases is limited, and so far only fungal laccases are used in technical processes (Rodríguez Couto and Toca Herrera, 2006).

Reasons for the application of fungal laccases are their generally high redox potential, considerable knowledge about these enzymes available in the literature and their commercial availability (Santhanam et al., 2011). Limiting are the requirement for their expression in eukaryotic host systems and their applicability only under mesophilic and acidic reaction conditions (Morozova et al., 2007; Xu, 1997). Bacterial laccases often exhibit lower redox potentials than their fungal counterparts, but are more stable at elevated temperatures (Santhanam et al., 2011). Furthermore, in contrast to fungal laccases bacterial laccases are often active under neutral to alkaline conditions, which allows broader biotechnological applications (Gunne et al., 2012; Machczynski et al., 2004; Santhanam et al., 2011). Available gene sequences of bacterial laccases, protein engineering and expression in bacterial hosts enable to overcome drawbacks like low redox potential (Santhanam et al., 2011).

In order to increase the toolbox of bacterial laccases from different subfamilies a new bacterial laccase, CgI1 from *Corynebacterium glutamicum*, was cloned, heterologously expressed, purified and characterized regarding its stability at different temperatures, pH-values, and in the presence of organic solvents. Besides, kinetic parameters and the redox potential of CgI1 were determined. Various substrates (Fig. 1) were tested with CgI1 and the structure of the main coupling product of sinapic acid was resolved by NMR. Furthermore, the influence of pH and mediators on substrate conversion and product distribution was investigated.

2. Material and methods

2.1. Bacterial strains, expression vectors, enzymes and chemicals

All chemical reagents were of analytical grade or higher and purchased from Appli Chem (Darmstadt, Germany), Fluka (Buchs, Switzerland), Sigma-Aldrich (Schnellendorf, Germany) or VWR (Darmstadt, Germany). Enzymes were obtained from Fermentas (St. Leon-Rot, Germany) or New England Biolabs (Massachusetts, USA). *Escherichia coli* strain DH5 α (F^- supE44 Δ lacU169 (φ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1relA1) was purchased from Clontech (Saint-Germain-en-Laye, France), *E. coli* strain BL21 (DE3) (F^- ompT hsdSB(r_B^- m B^-) gal dcm (DE3)) and the pET-16b vector were purchased from Novagen (Madison, USA).

2.2. Cloning of the *cgl1* gene

Genomic DNA of *C. glutamicum* ATCC 13032 was kindly provided by Prof. M. Bott, Institute of Bio- and Geosciences IBG-1: Biotechnology; Forschungszentrum Jülich, Germany. The *cgl1* gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from the genomic DNA with the primers 5'-CACCATGGGTCCTCCCTTCGCC-3' and 5'-CGGGATCCTCCTTACTCGTAGCGAAGCGAG-3'. Recognition sites for *Nco*I and *Bam*HI are underlined; start and stop codon are marked in bold. The PCR was performed with *Pfu* DNA polymerase under the following conditions: 95 °C for 5 min, 25 cycles of (95 °C for 45 s, 51 °C for 45 s, 72 °C for 5 min), 72 °C for 4 min. The PCR product was purified, digested with *Nco*I and *Bam*HI and ligated into corresponding sites of the linearized pET-16b vector, resulting in pET-16b.cgl1. The correct insertion was verified by automated DNA sequencing (GATC Biotech, Cologne, Germany).

2.3. Expression optimization and purification of CgI1

E. coli BL21 (DE3) cells carrying pET-16b.cgl1 were grown in 5 ml LB-medium supplemented with ampicillin (100 μ g ml $^{-1}$) at 37 °C and shaking at 180 rpm overnight. 500-ml shake flasks containing 50 ml TB-medium supplemented with ampicillin were inoculated with 500 μ l of the overnight culture and incubated at 37 °C, 180 rpm. At an optical density at 578 nm (OD_{578}) of 1.6 the medium was supplemented with 1 to 5 mM CuSO $_4$ and laccase expression was induced by addition of 0.25 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG). Cells were incubated at 18 °C, 25 °C or 30 °C at 120 rpm overnight. Cells were harvested by centrifugation (3220 \times g, 30 min, 4 °C) and resuspended in 5 ml 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5, containing 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 0.3 mM CuSO $_4$. Cell disruption was performed by sonification on ice. The cell debris was removed by centrifugation (48,000 \times g, 30 min, 4 °C).

The supernatant was incubated at 50 °C for 10 min and denatured proteins were removed by centrifugation (48,000 \times g, 30 min, 4 °C).

Purification was performed on an Äkta purifier (GE Healthcare Life Science, Freiburg, Germany). The protein sample was applied on a 30 ml DEAE Sepharose FF column (GE Healthcare Life Science), pre-equilibrated with 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5. Proteins were eluted from the column with a step gradient from 100 to 400 mM NaCl in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5. Fractions containing laccase activity (measured with 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid as substrate (so called ABTS assay)) were pooled and concentrated by ultrafiltration (membrane cut-off 10 kDa).

The protein solution was incubated with 2 mM CuSO $_4$ for 2 h and purified by gel filtration using a PD MidiTrap G-25 column (GE Healthcare Life Science). Total protein concentrations were

determined using the Bradford assay and bovine serum albumin as standard.

2.4. Biochemical characterization of CgI1

The thermostability of CgI1 was determined by incubation of the enzyme in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5 at temperatures from 25 °C to 70 °C. At appropriate time points aliquots were taken, immediately chilled on ice and the residual activity was determined at 25 °C using the ABTS assay (as described in Supplementary material).

For determination of temperature optima the ABTS assay was performed at temperatures from 20 °C to 80 °C.

The stability of CgI1 at different pH-values was determined by incubating the enzyme at 25 °C in 0.1 mM sodium acetate buffer (pH 5.0), 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5), or 50 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0), respectively. At appropriate time points samples were taken and enzyme activity was measured using the ABTS assay.

For determination of the stability in organic solvents CgI1 was incubated in mixtures of 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5) and an organic solvent (50% *n*-hexane, 50% isooctane, 40% DMSO, 40% ethanol, 40% 2-propanol, 40% acetonitrile, or 40% acetone; v/v) for a time period of 24 h and the residual activity was measured with ABTS.

Kinetic parameters of purified CgI1 were determined at 25 °C using different concentrations of ABTS (0.25 to 5 mM), syringaldazine (SGZ, 1 to 50 μM), 2,6-dimethoxyphenol (2,6-DMP, 0.1 to 10 mM), or Cu²⁺ (25 to 500 μM) (see Supplementary material). The resulting data were fitted to the Hill equation [$y = (v_{\max} \times x^n) / (k^{0.5} + x^n)$] with OriginPro software (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

All experiments were done in triplicates.

2.5. Determination of redox potential

Redox titrations were performed in a GloveBox (Glovebox Systemtechnik, Malsch, Germany) under nitrogen atmosphere in 10 mM HEPES (pH 7.0) with NAD⁺/NADH as redox mediators. Prepared buffers and the purified enzyme were incubated under anaerobic conditions to get oxygen-free solutions. 50 μM CgI1 was oxidized by at least 10 times excess of NAD⁺ and reduced by at least 10 times excess of NADH. First, the absorption spectrum of fully oxidized CgI1 was recorded in the range of 400 to 620 nm on a diode array-spectrophotometer (Tidas NMC 301, J&M, Aalen, Germany). Small amounts of the reduced CgI1 were added stepwise and the spectrum was measured, as well. The redox potential of CgI1 was determined by following the change in absorption at 600 nm and fitting the resulting data to the Boltzmann fit ($y = A2 + (A1 - A2) / (1 + \exp((x - x_0) / dx))$) using OriginPro 8.5 software.

The experiments were performed in duplicate.

2.6. Oxidation of phenolic and non-phenolic substrates

All experiments were performed at 1 ml scale in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5 containing 1 mM substrate (from an 50 mM stock solution dissolved in DMSO) and 20 mU ml⁻¹ CgI1 (determined using the ABTS assay). After 2 h the reaction was stopped by adding 20 μl of 6 N HCl. For quantification 1 mM of the internal standard salicylic acid was added and the reaction mixture was extracted twice with 400 μl ethyl acetate. The solvent was evaporated to dryness, the residue was dissolved in 200 μl methanol and samples were analyzed by LC-MS. Control reactions were performed in the same manner but without laccase.

Conversion of sinapic acid was investigated in detail. All reactions contained 10 mU ml⁻¹ CgI1. The first set of experiments was conducted at different pH-values: pH 5.0 (100 mM sodium acetate buffer) and pH 7.0 (50 mM potassium phosphate buffer). In a second set of experiments mediators ABTS and 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) were added to a final concentration of 1 mM. Reactions were run at 25 °C for 10 to 30 min in round bottom flasks.

Afterwards, the reaction mixture was acidified to pH 2–3 using 6 N HCl, and salicylic acid (1 mM, internal standard) was added. The samples were extracted twice with ethyl acetate, evaporated, redissolved in acetonitrile and analyzed by liquid chromatography–mass spectroscopy (LC-MS). Control reactions were performed in the same manner but without laccase.

For NMR analysis 5 mM sinapic acid (22.4 mg) was added to 20 ml 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5, supplemented with 2% DMSO. The reaction was started by the addition of 5 mU ml⁻¹ CgI1 (determined using the ABTS assay), stirred at room temperature for 3 h, extracted with ethyl acetate (2 × 8 ml) and evaporated. The material was purified by high-performance liquid chromatography (HPLC) as described below.

2.7. Product analysis and identification

2.7.1. Qualitative and quantitative LC-MS analysis

All reaction mixtures were analyzed by LC-MS measurements on a LCMS-2020 (Shimadzu, Duisburg, Germany) equipped with a Chromolith Performance RP-18e column (length 100 mm, diameter 4.6 mm, Merck, Darmstadt, Germany) according to the methods described in Supplementary material.

2.7.2. Product purification by HPLC

The sinapic acid dehydrodimer **1c** was purified by HPLC equipped with an Eurospher II column (300 × 8 mm, 10 μm particle size, Knauer, Germany). The substances were fractionated with a solvent gradient of methanol (A) and 0.1% formic acid (B) starting from 10% A to 40% A in 7 min, further increase to 60% within 12 min, 100% A within 1 min and hold for 3 min. For product identification ¹H NMR, ¹³C NMR and HMBC were measured and analyzed (Supplementary material, Table S1).

3. Results

3.1. Identification of the *cgl1*-gene

Laccases can be grouped into 11 different superfamilies. In *C. glutamicum* five multicopper oxidase proteins are known and classified into the Superfamilies SUBFamily B (Ascomycete-like MCO) and SUBFamily J (Bacterial CueO) (Sirim et al., 2011). To date, prokaryotic laccases of Ascomycete-Like MCO are rarely described in literature and so far no bacterial three-domain laccase structure of this SUBFamily is known. We therefore focused on CgI1 from *C. glutamicum*. The open reading frame of the *cgl1*-gene (GenBank NC_003450.3 (3169415..3170896)) encodes a 493 amino acid protein annotated as secreted multicopper oxidase.

Sequence alignments carried out with UniProt revealed that CgI1 contains four highly conserved copper binding regions of laccases, namely HXHG, HXH, HXXHXH and HCHXXXHXXXM/L/F (Supplementary material, Fig. S1) (Reiss et al., 2013). Furthermore, the sequence of CgI1 is very distinct when compared to other prokaryotic laccases like CotA from *Bacillus licheniformis* (15.5% sequence identity) or *Bacillus subtilis* (15.9%), and CueO from *Escherichia coli* (22.1%). Even lower identities were found to the laccases from *Thermus thermophilus* (9.5%) and SLAC from *Streptomyces coelicolor* (13.3%).

3.2. Gene cloning, expression and purification of CgL1

The *cgl1*-gene was amplified from genomic DNA of *C. glutamicum* ATCC 13032 without the first 111 nucleotides encoding the TAT-secretion signal. The PCR product was inserted into the pET-16b expression vector under control of the T7-phage promoter. For optimal gene expression different expression temperatures and CuSO_4 concentrations were tested as described in the Material and Method section. The highest volumetric activity against ABTS of 177 mU ml^{-1} was reached in TB medium supplemented with 3.0 mM CuSO_4 after 16 h at 30°C .

After cell lysis by sonification, the supernatant was heated at 50°C for 10 min to partially precipitate the *E. coli* proteins. Measurements of the volumetric activity before and after this treatment revealed a slight increase of the volumetric activity (~20%) which might be due to an activation of CgL1 upon heat treatment. After purification of CgL1 by anion exchange and gel filtration chromatography, approximately 35 mg of purified CgL1 was obtained from 1 l culture.

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of the enzyme showed a band with a molecular weight of ~59 kDa (Supplementary material, Fig. S2). The specific activity of purified CgL1 was 110 U mg^{-1} with ABTS and 40 mU mg^{-1} with 2,6-DMP as well as with syringaldazine. These data indicate that CgL1 is a laccase. Furthermore, it could be excluded that CgL1 is a tyrosinase, because no conversion of tyrosine could be detected.

The UV/vis spectrum of CgL1 (Supplementary material, Fig. S3) reveals typical laccase absorption maxima with a peak at 600 nm and a slight shoulder at 330 nm. These absorption maxima correspond to the paramagnetic Type I copper and the diamagnetic Type III copper pair.

3.3. Biochemical characterization of CgL1

3.3.1. Temperature and pH stability of CgL1

CgL1 was incubated at different temperatures and pH-values for time periods of up to 24 h. After incubation the residual activities of CgL1 against ABTS were measured.

Although the temperature optimum for CgL1 is at 60°C (Fig. 2A), the enzyme was inactivated after 5 h at this temperature (Fig. 2B). Therefore, the stability of CgL1 was determined in the range of 25°C to 70°C by incubation for a period of 24 h at pH 7.5 (Fig. 2B). The highest stability was observed at 25°C (71% residual activity after 24 h). With increasing temperatures, a continuous decrease in activity was observed, however, CgL1 was moderately stable at 40°C (30% residual activity after 24 h) and even at 50°C (54% residual activity after 7 h). The half-life time of CgL1 at 60°C was 2 h, and 1 h at 70°C .

3.3.2. Kinetic constants

Kinetic parameters of CgL1 were determined for the routinely used laccase substrates ABTS, SGZ and 2,6-DMP. Furthermore, the oxidation of Cu^+ was investigated pH-Stability of CgL1 was determined at 25°C at pH 5.0, 7.5, and 9.0 (Fig. 3A). After 1 h incubation at pH 5.0 the residual activity was 50%, 78% at pH 9.0, and 98% at pH 7.5. The highest stability was observed at pH 7.5 (71% residual activity after 24 h), however, CgL1 is moderately stable under alkaline conditions (30% residual activity after 24 h at pH 9.0).

In organic solvents the enzyme stability was tested as described in Section 2. Ethanol, *n*-hexane, isooctane and propanol have no influence on the stability of CgL1; 80–90% of enzymatic activity remained after 24 h, which is comparable to the enzyme performance in pure buffer (Fig. 3B). Highest loss in activity was detected when DMSO was added (55% residual activity after 24 h). However, in acetone the volumetric activity increased by 20%.

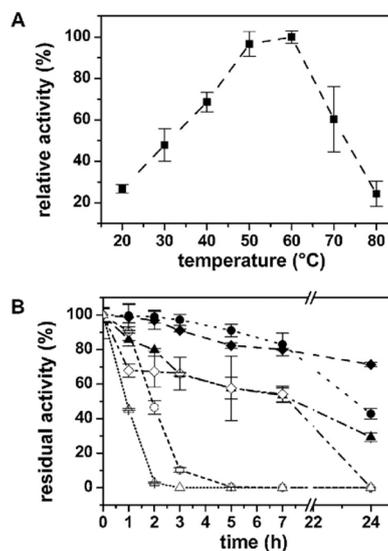


Fig. 2. Activity and stability of CgL1 at different temperatures (determined with ABTS as substrate). (A) Temperature optimum of CgL1. The activities were normalized to the value of optimal temperature. (B) Thermostability in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5. The activities were normalized to the initial activity before the incubation. Filled hash key: 25°C , filled squares: 30°C , filled triangle: 40°C , open hash key: 50°C , open square: 60°C , open triangle: 70°C .

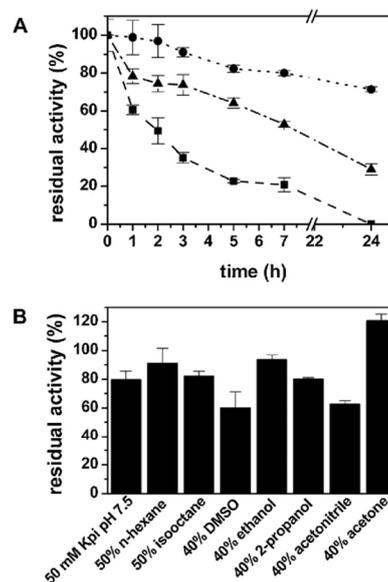


Fig. 3. Stability of CgL1 (determined with ABTS as substrate). (A) pH-stability at different pH-values at 25°C . The activities were normalized to the initial activity before the incubation. Square: pH 5.0, circle: pH 7.5, triangle: pH 9.0. (B) Stability against organic solvents. The enzyme was incubated for 24 h in the presence of an organic solvent (v/v in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5) and residual activities were determined.

Table 1
Determined kinetic properties of Cg1 in comparison with those of other laccases.

Substrate	Parameter	Cg1	CueO ^{ab}	CueO _{RE} ^a	CotA Bl ^c	Ssl1 ^d
ABTS	K_M (mM)	2.2	20.2 ^a	218.7	0.01	0.4
	k_{cat} (min ⁻¹)	96.4	107.2 ^a	1329.2	83.0	443.0
	k_{cat}/K_M (min ⁻¹ × mM ⁻¹)	44.8	5.3 ^a	6.1	12769.2	1230.6
SGZ	K_M (mM)	0.1	n.d.	n.d.	0.0043	0.0015
	k_{cat} (min ⁻¹)	13.2	n.d.	n.d.	100.0	3.5
	k_{cat}/K_M (min ⁻¹ × mM ⁻¹)	125.8	n.d.	n.d.	23255.8	231.3
2,6-DMP	K_M (mM)	3.5	2.7 ^a	0.3	56.7	0.9
	k_{cat} (min ⁻¹)	115.2	29.9 ^a	0.2	28.0	19.3
	k_{cat}/K_M (min ⁻¹ × mM ⁻¹)	33.0	11.0 ^a	0.4	0.5	21.7
Cu ⁺ as Cu(I)(BCA) ₂	K_M (mM)	0.2	0.165 ^b	0.1	n.d.	n.d.
	k_{cat} (min ⁻¹)	2.4	914.0 ^b	9.3	n.d.	n.d.
	k_{cat}/K_M (min ⁻¹ × mM ⁻¹)	12.8	5539.4 ^b	116.3	n.d.	n.d.

n.d. Not determined.

^a Values taken from Classen et al. (2013).^b Values taken from Singh et al. (2004).^c Values taken from Koschorreck et al. (2008).^d Values taken from Gunne et al. (2012).

The dependence of the initial rate from the substrate concentration followed Michaelis–Menten kinetics. Table 1 summarizes the determined kinetic constants. Highest catalytic efficiency of Cg1 was observed for SGZ (126 min⁻¹ mM⁻¹), while for ABTS (45 min⁻¹ mM⁻¹), 2,6-DMP (33 min⁻¹ mM⁻¹) and Cu⁺ (13 min⁻¹ mM⁻¹) laccase activities were lower. The K_M values of ABTS (2.15 mM⁻¹) and 2,6-DMP (3.5 mM⁻¹) were comparable, whereas those of SGZ (0.11 mM⁻¹) and Cu⁺ (0.19 mM⁻¹) were approximately 30 times lower. The turnover rates (k_{cat}) of Cg1 for 2,6-DMP (115.3 min⁻¹) were approximately 50 times higher than for Cu⁺ (2.4 min⁻¹).

3.3.3. Redox potential

Redox titrations started with fully oxidized laccase, step by step reduced laccase was added and the spectral properties were monitored. Cg1 remained completely stable and soluble during the experiment. The spectrum of oxidized laccase showed a peak at 600 nm corresponding to the Type I copper. By gradual addition of reduced laccase this peak decreased (Supplementary material, Fig. S4A). The calculated midpoint potential was 260 mV (Supplementary material, Fig. S4B).

3.4. Substrate conversions with Cg1

3.4.1. Substrate screening

Since laccases belong to the group of polyphenol oxidases they are able to oxidize aromatic compounds (Mayer, 1986). The capability of Cg1 to oxidize such compounds was investigated by activity screening against different aromatic substrates (Fig. 1).

Up to 100% conversion of 1 mM sinapic acid and caffeic acid was achieved within 2 h (Table 2). Conversions of ferulic acid and syringic acid were 75% and 85%, respectively, within the same period of time. In contrast, vanillic acid, coumaric acid and vanillin

Table 2
Conversion of substrates with structural similarity to sinapic acid.

Substrate	Conversion	Number of products	Type of products
Sinapic acid	+++	4	Dimer
Caffeic acid	+++	6	Dimer
Ferulic acid	++	4	Dimer
Syringic acid	++	5	Dimer to pentamer
Vanillic acid	+	1	Dimer
Coumaric acid	+	1	Dimer
Vanillin	+	1	Dimer
2-Nitrophenol	-	0	
Cinnamic acid	-	0	

+++ Conversion >90%, ++ conversion 75–90%, + conversion <10%, - no conversion.

were poor substrates (conversion less than 10% within 2 h). 2-Nitrophenol and cinnamic acid were not accepted by Cg1.

LC-MS analysis revealed several product peaks after the conversion of sinapic acid, caffeic acid, ferulic acid and syringic acid. For vanillic acid, coumaric acid and vanillin only one product peak was detected. According to the mass-to-charge ratio almost all new peaks could be assigned as substrate-dimers. In the case of syringic acid further polymerization was obtained.

3.4.2. Detailed investigation of sinapic acid conversion and product identification

The dimerization activity of Cg1 for the conversion of sinapic acid **1** was investigated in detail: The influence of different pH-values and mediators on the substrate conversion and product distribution was tested. Sinapic acid conversion was performed at pH 5.0 for comparability to the data obtained earlier with the bacterial laccase CotA (Koschorreck et al., 2008) and at pH 7.0 at which the highest stability of Cg1 was observed. LC-MS analysis of the reaction mixtures revealed several new peaks in addition to sinapic acid (Fig. 4). According to the m/z ratio all new peaks could be assigned as dimers of sinapic acid. Furthermore, product **1e** was identified as dehydrodisinapic acid dilactone (*r*-1*H*-2*c*,6*c*-bis-(4'-hydroxy-3',5'-dimethoxyphenyl)-3,7-dioxabicyclo-[3,3,0]-octane-4,8-dione) by comparison with an authentic reference compound. The main product **1c** was purified by HPLC and identified as a sinapic acid dehydrodimer, namely (*Z*)-4-(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzylidene)-2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-5-oxotetra-hydrofuran-3-carboxylic acid, by

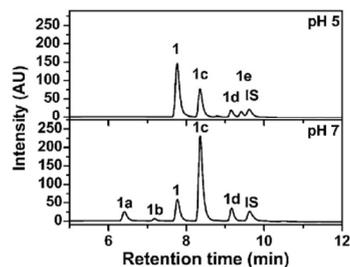


Fig. 4. PDA diagrams at 254 nm of sinapic acid conversions by Cg1. Conversion of 1 mM sinapic acid was carried out at pH 5.0 (100 mM sodium acetate buffer; upper diagram) and pH 7.0 (50 mM potassium phosphate buffer; lower diagram) for 30 min without mediator. Numbered peaks represent sinapic acid **1**; sinapic acid dehydrodimer **1c**; dehydrodisinapic acid dilactone **1e**; dimers of sinapic acid with unknown structure (**1a**, **1b** and **1d**); internal standard salicylic acid IS.

NMR and HMBC measurements (Supplementary material, Table S1).

Interestingly, formation of the dilactone **1e** was only observed at pH 5.0, whereas the dimers **1a** and **1b** were detected at pH 7.0 only (Fig. 4). The efficiencies of sinapic acid conversion depended on the pH-value, as well as on the addition of mediator. Without mediator, CgL1 oxidized 80% sinapic acid within 30 min at pH 7.0, and 60% at pH 5.0 (Supplementary material, Fig. S5). Addition of a mediator significantly increased conversion: At pH 5.0 quantitative conversion was achieved within 30 min, when the mediator ABTS was added, while at pH 7.0 almost 100% conversion was obtained when HOBt was added.

4. Discussion

The growing availability of genome sequences and the progress in bioinformatics lead to an increasing number of annotated bacterial laccase genes. However, up to now the available toolbox of bacterial laccases is marginal, although there is an industrial market potential for laccases as environmentally benign biocatalysis, for example in the field of biofuels or chemical synthesis.

In this study the new bacterial laccase CgL1 from *C. glutamicum* was heterologously expressed in *E. coli* in soluble form. Increasing expression temperature and expression time enhanced the achieved volumetric activity. The addition of 3 mM CuSO₄ had a positive effect on the activity, though higher CuSO₄ concentrations caused a slight decrease of cell growth. Under optimized conditions the expression level of CgL1 was comparable to those of the previously reported CotA from *B. licheniformis* (Koschorreck et al., 2008) and Ssl1 from *Streptomyces sviveus* (Günne et al., 2012). The absorption spectrum of purified CgL1 exhibits the typical absorption maximum of laccases at 600 nm and a slight shoulder at 330 nm due to Type I and Type III coppers, respectively. The oxidation of syringaldazine by CgL1 and the absence of activity towards tyrosine justified its classification as laccase.

Notably, CgL1 was shown to oxidize Cu⁺. The *K_M* value is comparable to that of CueO, but the catalytic efficiency of CgL1 is about 1000-fold lower. It can be assumed that the physiological role of CgL1 is in the copper homeostasis of *C. glutamicum*. This presumption is in accordance with the recent study of Schelder et al. (2011). The authors investigated the response of *C. glutamicum* to copper excess stress, the copper homeostasis itself and its regulation. A copper responsive two-component system has been identified as regulatory system for copper resistance. Two gene clusters are regulated by this system, wherein one gene (cg3287 based on CoryneTegNet annotations) encodes for CgL1. The native TAT-signal indicates that CgL1 is secreted into the extracellular medium, where the protein can oxidize Cu⁺ to the less toxic Cu²⁺.

The temperature optimum of CgL1 (60 °C) is comparable to that of CueO from *E. coli* (55 °C) (Roberts, 2002), whereas the laccases from *T. thermophilus* (92 °C) (Miyazaki, 2005) and *B. licheniformis* (85 °C) (Koschorreck et al., 2008) have higher temperature optima. The thermostability of CgL1 at 70 °C matches those of CotA from *B. licheniformis* (43% residual activity after 1 h incubation) (Koschorreck et al., 2008). So far the most thermostable is the laccase from *T. thermophilus* (half-live 868 min at 80 °C) (Miyazaki, 2005). Such enhanced stabilities at elevated temperatures are interesting for protein purification procedures from *E. coli* lysate and also advantageous for industrial processes.

Moreover, CgL1 preserved its activity for 24 h at neutral to alkaline pH values and in the presence of different organic solvents, which indicates possible applications of this enzyme in the

decolorization of textile wastewater. Wastewater is characterized by an alkaline pH value (7.0–11.0) (Manu and Chaudhari, 2002). Laccase stability might further be improved by immobilization (Fernández-Fernández et al., 2013).

Incubation at 40% acetone seemed to activate CgL1. Such a positive effect of the polar acetone on enzyme activity is rather unexpected, because water-miscible organic solvents usually remove water and strip the hydration shell from enzyme molecules causing their denaturation (Gorman and Dordick, 1992; Zaks and Klibanov, 1985). However, similar to CgL1 a positive effect of the polar organic solvent DMSO on the enzymatic activity was observed for Ssl1 (Günne et al., 2012). Furthermore, it has been reported previously that acetone and several other water-miscible organic solvents have a positive effect on the stability of proteases (Ogino and Ishikawa, 2001). This effect should be investigated in more detail.

Caused by the redox potential of the copper T1 site of 260 mV CgL1 is classified as low potential laccase. Compared to other bacterial laccases (e.g. 525 mV of CotA from *B. subtilis* (Durão et al., 2008)) this redox potential is low. The laccase can abstract an electron only from substrates with redox potential comparable to the potential of T1. This obstacle can be circumvented by addition of redox mediators (Riva, 2006). On the other hand, the low redox potential might be advantageous, since generated reaction products may not be oxidized by CgL1 and do not undergo further polymerization. CgL1 was able to oxidize several phenolic substrates. All accepted phenolic acids except for syringic acid were exclusively dimerized without further polymerization. Oligomerization or polymerization of phenolic compounds is due to the catalytic mechanism of laccases in which cation radicals are produced (Claus, 2004; Manda et al., 2007; Solomon et al., 1996). Oligomerization occurs during the further reaction process. This process can nicely be seen for conversion of syringic acid: The formed products were identified by their *m/z* ratios (*m/z* 168, 334, 350, 486, 639 and 791) (Leonowicz et al., 1984). This data indicates the possible application of CgL1 for the production of poly(*p*-phenylene ether) (PPE), a high-performance plastic used in medical technology or automobile industry (Hohmann and Hielscher, 1998; Platt, 2003).

The differences in substrate conversion that have been observed can be explained via charge distribution influenced by mesomeric and inductive effects. The chosen substrates differ in their substituents at *para*- and *ortho*-position of the phenol derivatives resulting in different electron densities. Highest conversions were achieved with sinapic acid containing two methoxy groups at the *ortho*-position, and caffeic acid containing a hydroxyl group at this position. The mesomeric effect (+M) of these groups leads to a stabilization of the formed radical cation and thereby facilitates electron abstraction by the laccase. Conversions were similar for syringic acid and ferulic acid. This is due to the –M-effect of the carboxy group and the lower +M-effect of methoxy groups compared to the hydroxyl group. The stabilization of the radical cations of syringic acid and ferulic acid are lower compared to sinapic acid. Low conversions were detected with vanillic acid, vanillin and coumaric acid. The +M-effects of these substrates are low and therefore the electron abstraction is less preferred.

Interestingly, under optimized conditions the oxidative coupling of sinapic acid **1** leads to the formation of sinapic acid dehydrodimer **1c** as the main product (Fig. 5). It has been shown that this component has higher antioxidative effects than sinapic acid and in addition inhibits the growth of HL-60 cells (Liu et al., 2007). In contrast conversion of sinapic acid by CotA leads to a dehydrodisinapic acid dilactone **1e** (Koschorreck et al., 2008).

In summary, the new laccase CgL1 from *C. glutamicum* with interesting properties expands the toolbox of available bacterial laccases. Its potential for various applications has been demonstrated.

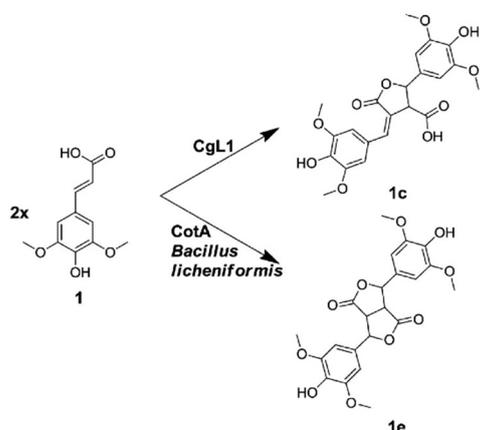


Fig. 5. Sinapic acid conversion by Cg1L and CotA from *Bacillus licheniformis*.

Acknowledgements

DBU (project AZ 13262) and Heinrich-Heine University Düsseldorf (Grant No. AZ 13262) are acknowledged for financial support. We wish to thank Prof. Michael Bott and Dr. Melanie Brocker (Institute of Bio- and Geosciences IBG-1: Biotechnology; Forschungszentrum Jülich, Germany) for providing genomic DNA of *C. glutamicum*. We are also thankful to Dr. Amal Hassan (Institute of Pharmaceutical Biology and Biotechnology, Heinrich-Heine University, Düsseldorf, Germany) for NMR analysis.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.05.031>.

References

- Andersen, S.O., Peter, M.G., Roepstorff, P., 1996. Cuticular sclerotization in insects. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 113 (4), 689–705.
- Bourbonnais, R., Paice, M.G., 1990. Oxidation of non-phenolic substrates an expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.* 267 (1), 99–102.
- Budolfsen, G., Jensen, M., Heldt-Hansen, H.P., Stringer, M.A., 2013. Method of preparing a heat-treated product. In: *BT US8507246*.
- Call, H.P., Mücke, I., 1997. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process). *J. Biotechnol.* 53 (2–3), 163–202.
- Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, M.J., Martínez, A.T., 2005. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (4), 1775–1784.
- Chakar, F.S., Ragauskas, A.J., 2001. Methods of reducing fluorescences in paper-containing samples. In: *US6294047*.
- Classen, T., Pietruszka, J., Schuback, S.M., 2013. A new multicopper oxidase from Gram-positive bacterium *Rhodococcus erythropolis* with activity modulating methionine rich tail. *Protein Expression Purif.* 89 (1), 97–108.
- Claus, H., 2003. Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Arch. Microbiol.* 179 (3), 145–150.
- Claus, H., 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* 35 (1–2), 93–96.
- Conrad, L.S., Sponholz, W.R., Berker, O., 2000. Treatment of cork with a phenol oxidizing enzyme. In: *US6152966*.
- Dittmer, N.T., Suderman, R.J., Jiang, H., Zhu, Y.-C., Gorman, M.J., Kramer, K.J., Kanost, M.R., 2004. Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34 (1), 29–41.
- Durão, P., Chen, Z., Fernandes, A.T., Hildebrandt, P., Murgida, D.H., Todorovic, S., Pereira, M.M., Melo, E.P., Martins, L.O., 2008. Copper incorporation into recombinant CotA laccase from *Bacillus subtilis*: characterization of fully copper loaded enzymes. *J. Biol. Inorg. Chem.* 13 (2), 183–193.

- Eggert, C., Temp, U., Eriksson, K.E., 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (4), 1151–1158.
- Fernández-Fernández, M., Sanromán, M.Á., Moldes, D., 2013. Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnol. Adv.* 31 (8), 1808–1825.
- Ferneth, W.E., Hasty, N.M., Damore, M.B., Christolm, D.A., 2005. Oxygen scavenging composition and methods of use. In: *US20050205840*.
- Gorman, L.A., Dordick, J.S., 1992. Organic solvents strip water off enzymes. *Biotechnol. Bioeng.* 39 (4), 392–397.
- Gregorio, E.de, Spellman, P.T., Rubin, G.M., Lemaitre, B., 2001. Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (22), 12590–12595.
- Gunne, M., Urlacher, V.B., Maga, G., 2012. Characterization of the alkaline laccase Ssl1 from *Streptomyces viceus* with unusual properties discovered by genome mining. *PLoS One* 7 (12), e52360.
- Hall, G.K., Stewart Charles, W., Screws, G.A., 1999. Enzymatic discharge printing of dyed textiles. In: *US105951714*.
- Höfer, C., Schlosser, D., 1999. Novel enzymatic oxidation of Mn²⁺ to Mn³⁺ catalyzed by a fungal laccase. *FEBS Lett.* 451 (2), 186–190.
- Hohmann, A., Hielscher, W., 1998. *Lexikon der Zahntechnik*. Verlag Neuer Merkur, München.
- Johansen, C., 2000. A basic protein composition for killing or inhibiting microbial cells. In: *EP 0778733 B1*.
- Kawai, S., Umezawa, T., Shimada, M., Higuchi, T., 1988. Aromatic ring cleavage of 4,6-di(tert-butyl)guaiaicol, a phenolic lignin model compound, by laccase of *Cortium versicolor*. *FEBS Lett.* 236 (2), 309–311.
- Koschorreck, K., Richter, S.M., Ene, A.B., Roduner, E., Schmid, R.D., Urlacher, V.B., 2008. Cloning and characterization of a new laccase from *Bacillus licheniformis* catalyzing dimerization of phenolic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79 (2), 217–224.
- Lang, G., 1998. Dyeing composition containing laccase and keratinous fibre dyeing method. In: *EP1047378B2*.
- Leonowicz, A., Edgehill, R.U., Bollag, J.-M., 1984. The effect of pH on the transformation of syringic and vanillic acids by the laccases of *Rhizoctonia praticola* and *Trametes versicolor*. *Arch. Microbiol.* 137 (2), 89–96.
- Liu, H.-L., Wan, X., Huang, X.-F., Kong, L.-Y., 2007. Biotransformation of sinapic acid catalyzed by *Momordica charantia* peroxidase. *J. Agric. Food Chem.* 55 (3), 1003–1008.
- Machczynski, M.C., Vijgenboom, E., Samyn, B., Canters, G.W., 2004. Characterization of SLAC: a small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity. *Protein Sci.* 13 (9), 2388–2397.
- Manda, K., Kördes, D., Mikolasch, A., Hammer, E., Schmidt, E., Thurov, K., Schauer, F., 2007. Carbon-oxygen bond formation by fungal laccases: cross-coupling of 2,5-dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamide with the solvents water, methanol, and other alcohols. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76 (2), 407–416.
- Manu, B., Chaudhari, S., 2002. Anaerobic decolorisation of simulated textile wastewater containing azo dyes. *Bioresour. Technol.* 82 (3), 225–231.
- Mayer, A.M., 1986. Polyphenol oxidases in plants—recent progress. *Phytochemistry* 26 (1), 11–20.
- Messerschmidt, A., 1997. *Multi-Copper Oxidases*. World Scientific, Singapore.
- Mikolasch, A., Schauer, F., 2009. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82 (4), 605–624.
- Miyazaki, K., 2005. A hyperthermophilic laccase from *Thermus thermophilus* HB27. *Extremophiles* 9 (6), 415–425.
- Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Gorbacheva, M.A., Shleev, S.V., Yaropolov, A.I., 2007. Blue laccases. *Biochemistry (Mosc)* 72 (10), 1136–1150.
- Murphy, M.E., Lindley, P.F., Adman, E.T., 1997. Structural comparison of cupredoxin domains: domain recycling to construct proteins with novel functions. *Protein Sci.* 6 (4), 761–770.
- Nakamura, K., Go, N., 2005. Function and molecular evolution of multicopper blue proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 62 (18), 2050–2066.
- Nichol, H., Law, J.H., Winzerling, J.J., 2002. Iron metabolism in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 47, 535–559.
- Ogino, H., Ishikawa, H., 2001. Enzymes which are stable in the presence of organic solvents. *J. Biosci. Bioeng.* 91 (2), 109–116.
- Platt, D.K., 2003. *Engineering and High Performance Plastics Market Report: A Rapra Market Report*. Rapra Technology Ltd., Shawbury, Shropshire, UK.
- Reiss, R., Ihssen, J., Richter, M., Eichhorn, E., Schilling, B., Thöny-Meyer, L., 2013. Laccase versus laccase-like multi-copper oxidase: a comparative study of similar enzymes with diverse substrate spectra. *PLoS One* 8 (6), e56333.
- Riva, S., 2006. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends Biotechnol.* 24 (5), 219–226.
- Roberts, S.A., 2002. Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *P. Natl. A. Sci.* 99 (5), 2766–2771.
- Rodríguez Couto, S., Toca Herrera, J.L., 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnol. Adv.* 24 (5), 500–513.
- Santhanam, N., Vivanco, J.M., Decker, S.R., Reardon, K.F., 2011. Expression of industrially relevant laccases: prokaryotic style. *Trends Biotechnol.* 29 (10), 480–489.
- Schelder, S., Zaade, D., Litsanov, B., Bott, M., Brocker, M., 2011. The two-component signal transduction system CopRS of *Corynebacterium glutamicum* is required for adaptation to copper-excess stress. *PLoS One* 6 (7), e22143.
- Sharma, P., Goel, R., Capalash, N., 2007. Bacterial laccases. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23 (6), 823–832.

- Singh, G., Bhalla, A., Kaur, P., Capalash, N., Sharma, P., 2011. Laccase from prokaryotes: a new source for an old enzyme. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 10 (4), 309–326.
- Singh, S.K., Grass, G., Rensing, C., Montfort, W.R., 2004. Cuprous oxidase activity of CueO from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186 (22), 7815–7817.
- Sirim, D., Wagner, F., Wang, L., Schmid, R.D., Pleiss, J., 2011. The Laccase Engineering Database: a classification and analysis system for laccases and related multicopper oxidases. Database (Oxford) 2011, bar006.
- Solomon, E.I., Sundaram, U.M., Machonkin, T.E., 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* 96 (7), 2563–2606.
- Telke, A.A., Kalyani, D.C., Jadhav, U.U., Parshetti, G.K., Govindwar, S.P., 2009. Purification and characterization of an extracellular laccase from a *Pseudomonas* sp. LBC1 and its application for the removal of bisphenol A. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 61 (3–4), 252–260.
- Thurston, C.F., 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140 (1), 19–26.
- Xu, F., 1997. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. *J. Biol. Chem.* 272 (2), 924–928.
- Yoshida, H., 1883. Chemistry of lacquer (urushi). *J. Chem. Soc. Trans.* 43, 472.
- Zaks, A., Klibanov, A.M., 1985. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 82 (10), 3192–3196.
- Zheng, X., Ng, I.-S., Ye, C., Chen, B.-Y., Lu, Y., 2013. Copper ion-stimulated McoA-laccase production and enzyme characterization in *Proteus hauseri* ZM44. *J. Biosci. Bioeng.* 115 (4), 388–393.

2.2.2. Supporting Information

Material and Methods

Laccase activity assays

Routinely, laccase activity was assayed at room temperature (25 °C) using the typical laccase substrates ABTS, SGZ and 2,6-DMP as follows: Oxidation of ABTS was followed by absorbance increase at 420 nm ($\epsilon_{420} = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The assay was carried out in 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 with 0.5 mM ABTS. Oxidation of SGZ was monitored at 525 nm ($\epsilon_{525} = 65 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The assay mixture contained 50 μM SGZ (dissolved in dimethyl sulfoxide) in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5. Oxidation of 2,6-DMP was followed at 468 nm ($\epsilon_{468} = 49.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and performed with 0.5 mM 2,6-DMP in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5.

Oxidation of Cu^+ was monitored at 562 nm in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5 with 200 μM Cu^+ ($\epsilon_{562} = 7.9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Cu^+ was added as $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{BCuF}_4\text{N}_4$. Stock solutions were prepared freshly under anaerobic conditions. 200 mM solution of copper salt in nitrogen-flushed acetonitrile was prepared. This solution was mixed with 55.55 mM Na_2BCA in a ratio of 9:1, resulting in Cu(I)[BCA]_2 . A final concentration of 20 mM Cu^+ was adjusted.

The activity against tyrosine was tested at several pH-values; either in 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.0, or 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5, or 50 mM glycine-sodium hydroxide buffer, pH 9.0. The reaction mixture contained 0.2 mM tyrosine and oxidation of substrate was monitored at 280 nm ($\epsilon_{280} = 4.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Volumetric activities are given in units (U), where one unit is defined as the amount of enzyme that oxidizes 1 μmol of a substrate per minute.

All assays were performed in triplicates.

Product analysis and identification

Qualitative and quantitative LC-MS analysis

Method A: A solvent gradient of methanol (A) and 0.1% formic acid (B), starting from 10% A to 90% A in 10 min, hold for 2 min followed by reconditioning of the column for 6 min was used at a flow rate of 0.5 ml min^{-1} for separation of compounds. The temperature of the column was hold at 30 °C. A photo diode array was used for analysis from 190-800 nm. Mass spectroscopy was performed in positive and negative scan mode using electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization source with the following settings: detector voltage 1,15 kV, probe voltage 4,5 kV, nebulizing gas flow 1,5 l min^{-1} , curve dissolution line temperature 275 °C and heat block 400 °C. For analyzing the reactions PDA chromatograms at 254 nm were recorded. All peaks were normalized to the internal standard. Calculations of substrate consumptions were done by formation of the quotient of the normalized peak area

from substrate and negative control. Substrates and salicylic acid were identified by their characteristic absorption spectra, retention times and m/z values based on authentic reference compounds.

Method B: For detailed analysis of the oxidation of sinapic acid a solvent gradient of acetonitrile (A) and 0.1% formic acid (B), starting from 30% A to 75% A in 9 min followed by reconditioning of the column for 10 min, was used at a flow rate of 0.5 ml min^{-1} for separation of compounds. The temperature of the column was hold at $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Photo diode array was used for analysis from 190-800 nm. Mass spectroscopy was performed as described in method A.

For quantitative LC-MS the “single ion mode” (SIM) was calibrated with the internal standard salicylic acid utilizing method B. Mixtures of 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0, containing the substrate sinapic acid for calibration in final concentrations of 0.2 to 1.0 mM together with the internal standard in the final concentration of 1 mM were extracted and analyzed as described. The ratio of the area of the substrate to that of the internal standard was plotted against the substrate concentration to give a straight-line calibration plot. Sinapic acid, salicylic acid and dehydrodisinapic acid dilactone were identified by their characteristic absorption spectra, retention times and m/z values.

Figures and Tables

Table S1. NMR spectroscopic data of sinapic acid dehydrodimer **1c** at 600 (^1H) and 150 (^{13}C) MHz in $\text{DMSO-}d_6$ (δ in ppm, multiplicity, J in Hz).

Position	δ_{C}	δ_{H}	HMBC
1	123.5		
2	108.5	7.03, s	1, 3, 4, 6
3	148.1		
4	138.6		
5	148.1		
6	108.5	7.03, s	1, 2, 4, 5
7	139.8	7.60, s	2/6, 8, 9, 8'
8	119.5		
9	170.9		
1'	129.4		
2'	103.6	6.50, s	1', 3', 4', 6', 7'
3'	147.9		
4'	136.1		
5'	147.9		
6'	103.6	6.50, s	1', 2', 4', 5', 7'
7'	80.4	5.68, d (6.0)	2'/6', 9'
8'	52.8	4.25, d (6.0)	8, 9, 1', 7', 9'
9'	171.7		
3/5-OCH ₃	56.1	3.73, s	3/5
3'/5'-OCH ₃	56.0	3.79, s	3'/5'
4-OH		9.18, s	3/5, 4
4'-OH		8.57, s	3'/5', 4'
9'-OH		13.30, br s	

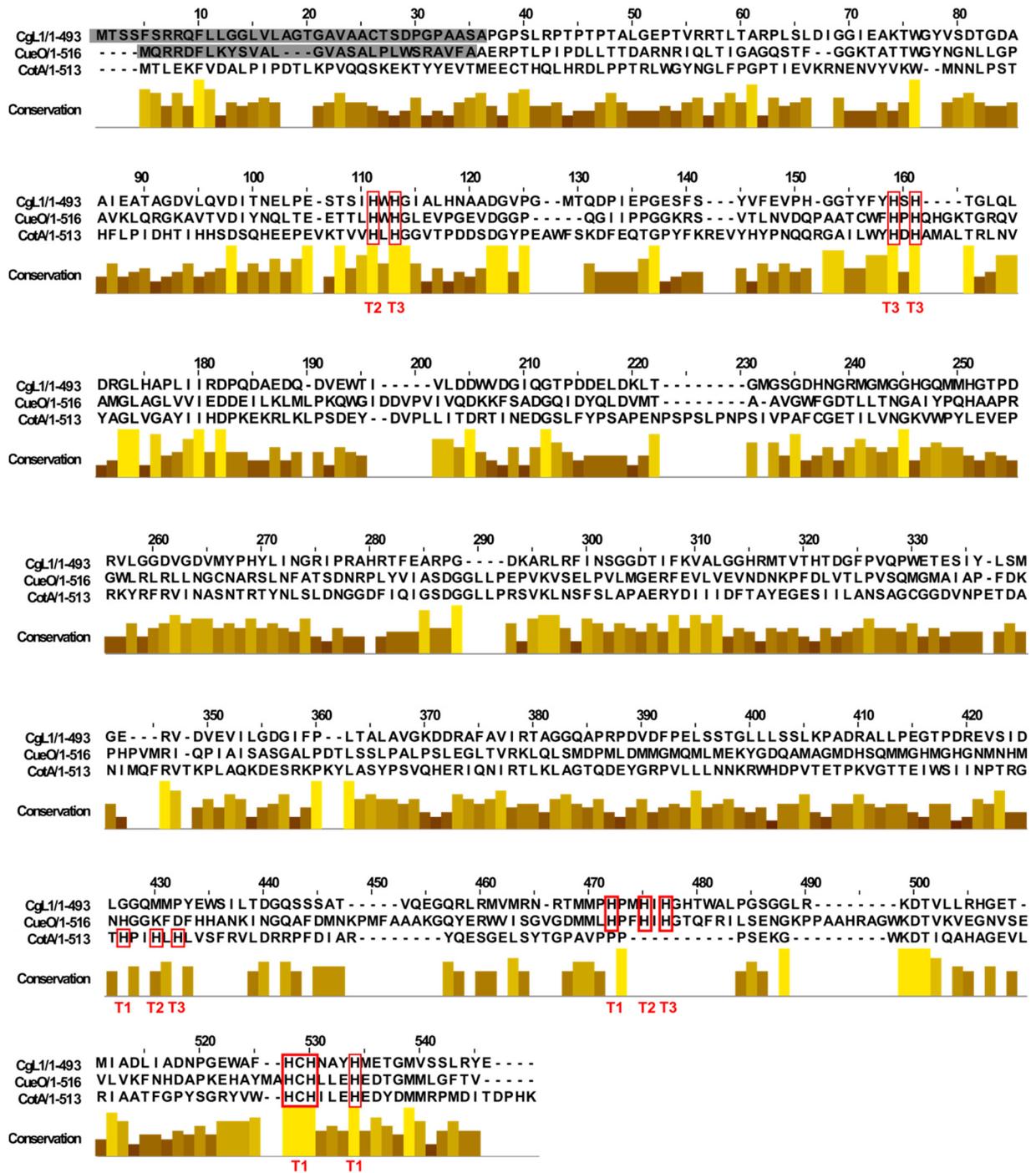


Fig. S1. Sequence alignment of laccases from *C. glutamicum*, *E. coli* and *B. subtilis*. The enzymes belong to different superfamilies. The conserved copper binding sites are highlighted in red. The twin-arginine secretion signal is highlighted in grey.

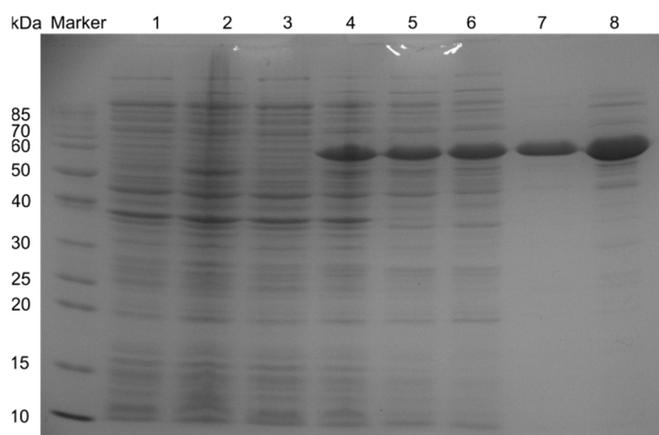


Fig. S2. 12.5% SDS-PAGE of CgL1 expression and purification. Line 1: cell extract of control expression (*E. coli* cells without *cgl1*-gene) before induction with IPTG, 2: cell extract of control expression after 16 h, 3: cell extract of cells carrying pET-16b_cgl1 before induction, 4: cell extract of cells carrying pET-16b_cgl1 after 16 h expression, 5: soluble protein fraction after cell disruption, 6: soluble protein fraction after heat treatment, 7: anion exchange eluate, 8: desalting eluate

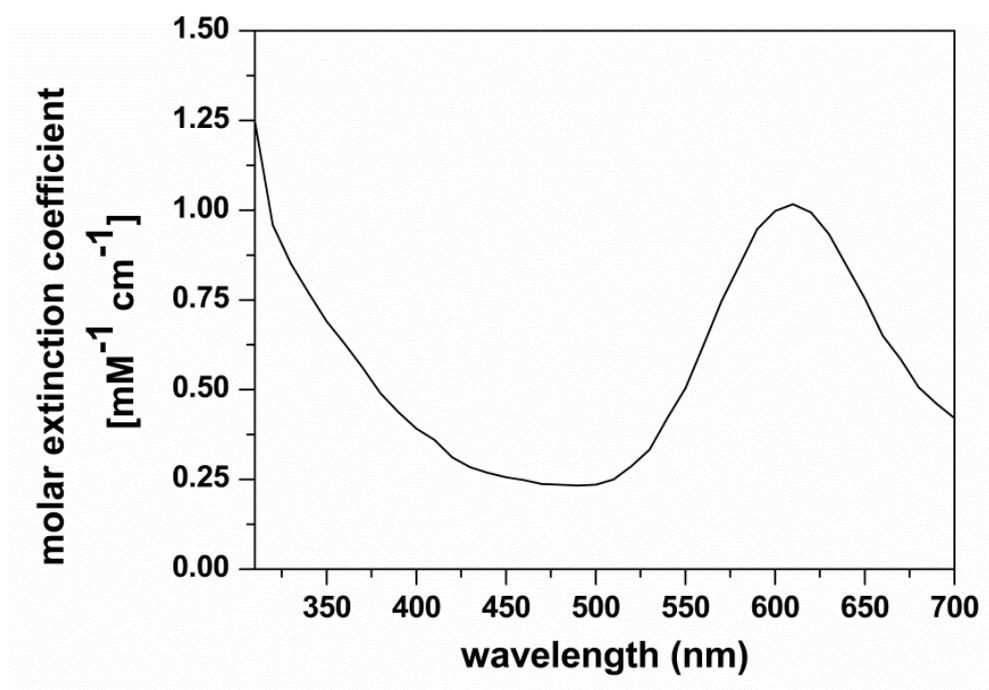


Fig. S3. UV/Vis spectrum of CgL1. The absorption maximum at 600 nm belongs to type 1 copper, the shoulder at 330 nm to type 3 copper pair.

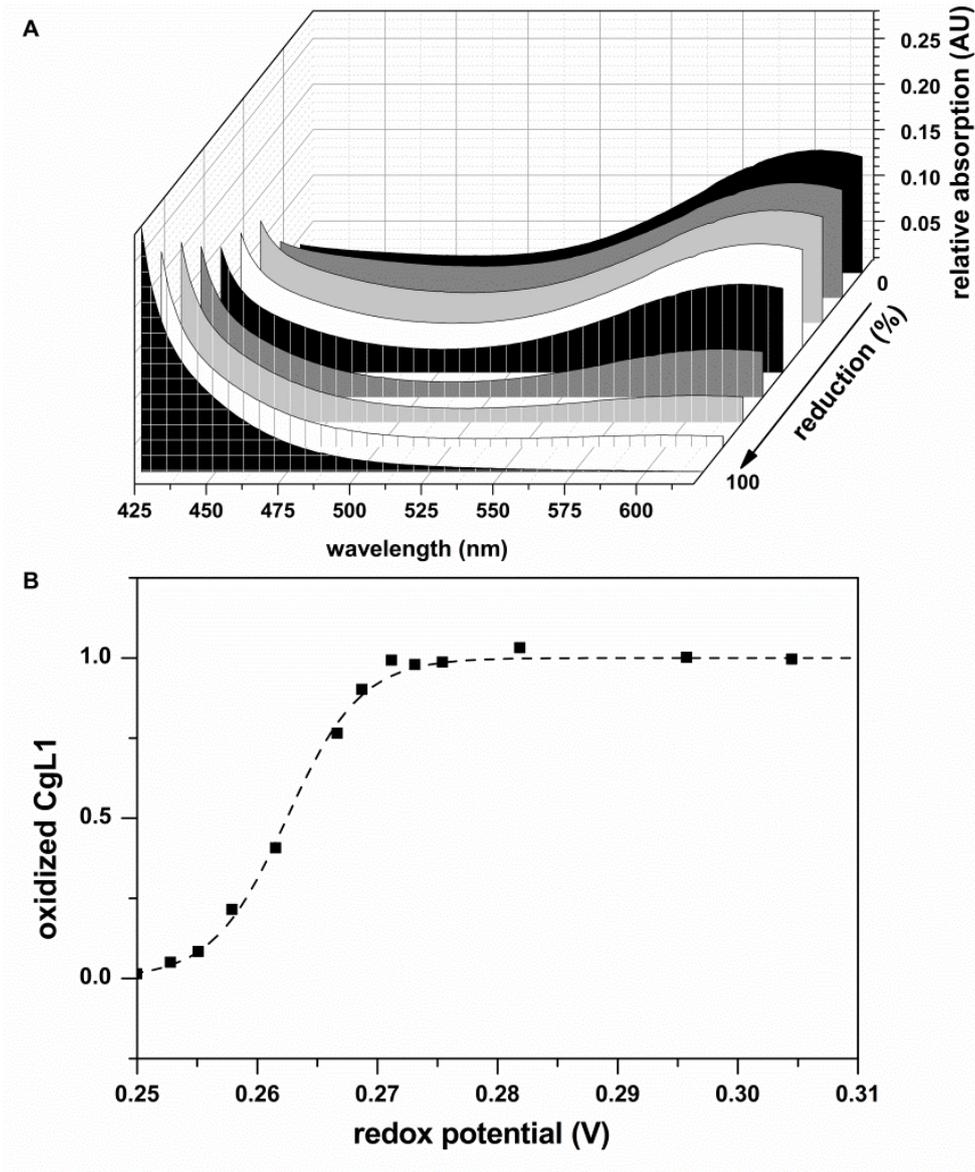


Fig. S4. Determination of redox potential. (A) Spectral properties of CgL1 during redox titrations. UV/Vis spectra were recorded after addition of reduced laccase during the redox titration. (B) Redox titration curve of CgL1. NAD^+/NADH were used as redox mediators.

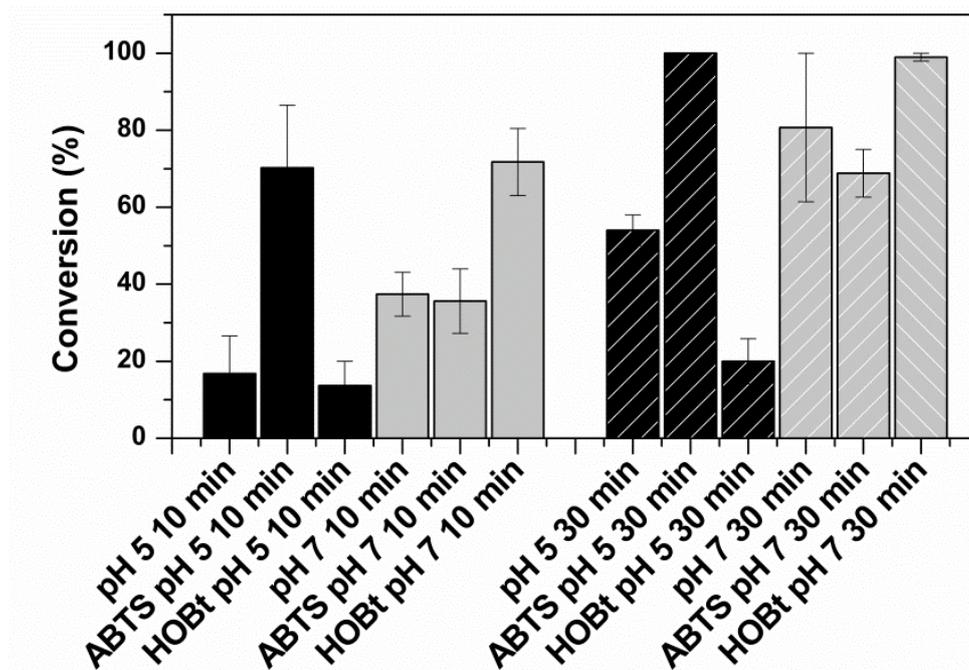


Fig. S5. Conversion of sinapic acid with CgL1 at different reaction conditions. Black: conversion at pH 5.0, grey: conversion at pH 7.0, non-shaded: reaction time 10 min, white shaded: reaction time 30 min. Reactions were performed with 1 mM sinapic acid, 10 mU/ml CgL1 with and without the addition of mediators (HOBt, ABTS).

2.3. Manuskript 2: One-pot synthesis of pinoresinol

2.3.1. Manuskript

Titel: Two-Step One-Pot Synthesis of Pinoresinol from Eugenol in an Enzymatic Cascade

Autoren: Esther Ricklefs, Marco Girhard, Katja Koschorreck, Martha S. Smit, Vlada B. Urlacher

Publiziert in: *ChemCatChem*, **2015**, 7, 1857-1864

DOI: 10.1002/cctc.201500182

Beitrag: Gesamte experimentelle Arbeit, Schreiben des Manuskriptes

Bemerkung: Nachgedruckt mit der Erlaubnis von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (Lizenznummer: 3724250795568).

Das Originalmanuskript kann unter folgender URL eingesehen werden:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cctc.201500182/abstract>

Two-Step One-Pot Synthesis of Pinoresinol from Eugenol in an Enzymatic Cascade

Esther Ricklefs,^[a] Marco Girhard,^[a] Katja Koschorreck,^[a] Martha S. Smit,^[b] and Vlada B. Urlacher^{*,[a]}

The phytoestrogen pinoresinol is a high-value compound that has a protective effect against diverse health disorders, and thus is of interest for the pharmaceutical industry. Isolation of pinoresinol from plants suffers from low yields, and its chemical synthesis involves several work-up steps. In this study we devised a novel two-step one-pot enzymatic cascade combining a vanillyl-alcohol oxidase and a laccase for the production of pinoresinol from eugenol via the intermediate coniferyl alcohol. Along with the well-characterized vanillyl-alcohol oxidase

from *Penicillium simplicissimum* used to catalyze the oxidation of eugenol, enzyme screening revealed three bacterial laccases that were appropriate for the synthesis of pinoresinol from coniferyl alcohol. The cascade was optimized regarding enzyme ratios, pH value, and the presence of organic solvents. Under optimized conditions, pinoresinol concentration achieved 4.4 mM (1.6 g l⁻¹), and this compound was isolated and analyzed.

Introduction

Recently, a focus in biocatalysis has been the development of biocatalytic cascade reactions. This is reflected by the rising number of published reviews^[1–3] and books^[4] on this topic. The simplest definition of the term “cascade reaction” is a combination of several (bio)synthetic reaction steps leading to a product. Peculiarly attractive are so-called one-pot processes. General advantages of such one-pot systems are reduced time, effort, and simplification of multistep synthetic reactions because no isolation and purification of intermediates (which might be toxic or instable) are required.^[2,5] In addition, cascade reactions often allow simultaneous regeneration of cofactors if redox enzymes are applied.^[3]

One of the first cascades, reported in 1976, combined a biotransformation and a chemical step for the synthesis of enantiomeric pure C₁₆-juvenile hormone from methyl 10,11-epoxyfarnesate.^[6] In the same year an in vitro cascade reaction combining six enzymes for the synthesis of threonine from aspartic acid was published.^[7]

Up to now most published enzymatic cascades involve mainly dehydrogenases, ketoreductases, transaminases, and amino acid dehydrogenases for the production of chiral alcohols,^[8] amines,^[9] amides,^[10] or amino acids.^[11] More recently, cy-

tochrome P450 monooxygenases, enoate reductases and Baeyer–Villiger monooxygenases have also become candidates for the implementation in synthetic cascade reactions.^[12] In addition, the use of aldolases and hydroxynitrile lyases for C–C coupling reactions in cascades was reported.^[13] Laccases were also used in cascade reactions for cofactor regeneration.^[14] Very recently, a *Trametes versicolor* laccase/2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxyradical (TEMPO) system was applied in an one-pot process for deracemisation of *rac*-2-phenyl-1-propanol.^[15] The implementation of a laccase into a linear enzymatic cascade process for C–C or C–O coupling has, however, to the best of our knowledge not been described in literature.

Herein, we describe the application of a novel enzymatic cascade combining a vanillyl-alcohol oxidase (VAO) (EC 1.1.3.38) and a bacterial laccase (EC 1.10.3.2) for the production of the complex and high-value compound pinoresinol from inexpensive starting material. Besides its high market value, pinoresinol production is also interesting regarding possible applications in the medical field. Pinoresinol is one of the simplest lignans belonging to the group of phytoestrogens. It is a precursor of the mammalian lignans enterolactone and enterodiol, which are produced in the mammalian proximal colon and for which health-supporting effects have been intensively discussed.^[16,17] These lignans may reduce the risk of hormone-dependent cancer in different organs,^[16,18] of osteoporosis,^[19] and of cardiovascular diseases^[20] owing to their antioxidant and (anti)estrogenic properties.^[21] It has been shown that pinoresinol inhibits proliferation and induces differentiation of human HL60 leukemia cells.^[22] Furthermore, the inhibitory effect of pinoresinol on HIV-1 replication can be interesting for chemotherapy.^[23] Pinoresinol is also a potential candidate as a hypoglycemic, antimelanogenic, and antifungal agent.^[24]

[a] E. Ricklefs, Dr. M. Girhard, Dr. K. Koschorreck, Prof. Dr. V. B. Urlacher
Institute of Biochemistry
Heinrich Heine University
Universitätsstraße 1, 40225 Düsseldorf (Germany)
E-mail: vlada.urlacher@uni-duesseldorf.de

[b] Prof. Dr. M. S. Smit
Department of Microbial, Biochemical and Food Biotechnology
University of the Free State
205 Nelson Mandela Drive, Bloemfontein 9300 (South Africa)

Supporting Information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/cctc.201500182>.

Pinoresinol can be isolated from seeds of flax and sesame, or whole-grain cereals, legumes, fruits, and some vegetables. However, the isolation from plants is not very effective and the yields are quite low (e.g. 29 mg from 100 g fresh weight of sesame seeds).^[25] The chemical synthesis of pinoresinol from cheap materials is often quite complex, involving many individual (and work-up) steps.^[26] Promising biocatalytic approaches have been reported that employ laccases or peroxidases as catalysts and coniferyl alcohol as starting material.^[23,27–29] A general drawback of these reactions is that they suffer from low selectivity and, therefore, low product concentrations (isolated yields of 4 or 10%).^[23,29] Moreover, the starting compound for this reaction, coniferyl alcohol, is quite expensive.

The novel enzymatic cascade described in this study utilizes in the first step the inexpensive and abundant precursor eugenol **1**, which is converted by VAO from *Penicillium simplicissimum* (PsVAO) into the intermediate coniferyl alcohol **2**.^[30] In the second step **2** is oxidized by a bacterial laccase and undergoes dimerization by means of C–C and C–O coupling, leading to pinoresinol **3** (Scheme 1). Reaction parameters, such as enzyme of choice, reaction time, pH value, enzyme ratios, and addition of additives (e.g. organic solvents) were optimized at an analytical scale to increase the product yield. Finally, pinoresinol **3** was produced and isolated on a semipreparative scale.

Results and Discussion

Enzyme screening for conversion of coniferyl alcohol

Earlier studies reported laccases from plants^[31] and fungi^[27,29,31] that are capable of dimerizing coniferyl alcohol **2** to pinoresinol **3**. In addition, horseradish peroxidase (HRP) has been described to catalyze this reaction.^[23] To the best of our knowledge no bacterial laccase has been reported for this reaction to date, therefore, we decided to assess the potential of these enzymes for the conversion of **2** into **3**. Advantages of bacterial laccases compared with their eukaryotic counterparts are that the former can more easily be expressed in *Escherichia coli* and are generally active at neutral to alkaline pH values, whereas eukaryotic laccases often have acidic pH optima.^[32] The latter point is of special importance for the development of the projected enzymatic cascade, because the pH optimum reported for PsVAO is in the alkaline region.^[33] If a fungal lac-

case is used in this process an additional acidification step is mandatory.

For initial experiments the following bacterial laccases from the institute's enzyme collection were investigated: Cg1 from *Corynebacterium glutamicum*,^[34] CotA mutant K316N/D500G (with improved expression in *E. coli*) from *Bacillus licheniformis* (CotA),^[35] Ssl1 from *Streptomyces sviveus*,^[36] and Tth from *Thermus thermophilus*.^[37] Additionally, the fungal laccase Lcc from *Trametes versicolor*, as well as HRP (both commercially available) were also tested because these enzymes have been shown to catalyze the oxidation of **2** and, therefore, could be used for comparison.

All enzymes were tested for their ability to produce **3** from **2** at different pH values (5.0, 7.5, and 9.0). The formation of **3** was observed with all bacterial laccases at pH 7.5 and pH 9.0, but fungal Lcc showed no activity at these pH values. In contrast, at pH 5.0 **3** was produced by fungal Lcc as well as by bacterial CotA and Tth, but not by Ssl1 and Cg1. HRP was active at all pH values tested and formation of **3** was observed.

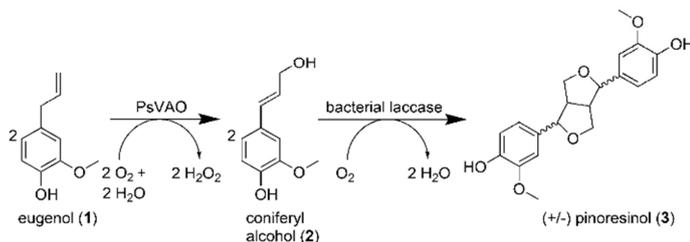
In all cases racemic **3** was produced. Besides **3**, two other products were formed by all enzymes, owing to the catalytic mechanism generating radicals (Figures S5 and S7B, Supporting Information), as also observed previously.^[23,29]

Development of the enzymatic cascade

Because PsVAO has its pH optimum at pH 10.0,^[33] and on the basis of the screening results, the laccases Cg1, CotA, and Ssl1, as well as HRP, were chosen first for investigation of the one-pot cascade in combination with PsVAO (for further explanation see the Supporting Information). Initial experiments were performed at an analytical scale and comprised 1 mM eugenol **1**, 10 mU ml⁻¹ PsVAO (volumetric activity was determined with **1**), and 10 mU ml⁻¹ of either laccase or HRP (volumetric activity was determined with ABTS) at different pH values (5.0, 7.5, and 9.0). As expected, no conversion of **1** was observed at pH 5.0 because of the lack of PsVAO activity. In contrast, at pH 7.5 and 9.0 conversion of **1** was completed within 2.5 h and formation of the intermediate coniferyl alcohol **2** was observed. Enzyme-catalyzed conversion of **2** proceeded smoothly over time yielding the desired product pinoresinol **3** (Figure 1A). Depending on the enzyme used, the time point at which complete conversion of the intermediate **2** was achieved varied (Table S2 in the Supporting Information).

The highest yields of **3** were obtained at pH 7.5, and were at comparable levels for all laccases, whereas HRP produced lower amounts of **3** under the same conditions (Figure 1B). The product yields achieved at pH 9.0 were generally lower for all combinations and are summarized in the Supporting Information (Figure S1).

For reactions at pH 7.5 with CotA 53 μM of **3** was detected



Scheme 1. Formation of pinoresinol **3** in a linear one-pot cascade including PsVAO and a bacterial laccase. Although PsVAO produces solely **2** from **1**, it should be noted that for the conversion of **2** by laccases, other products as well as **3** were detected (Figure S5 and S7B, Supporting Information).

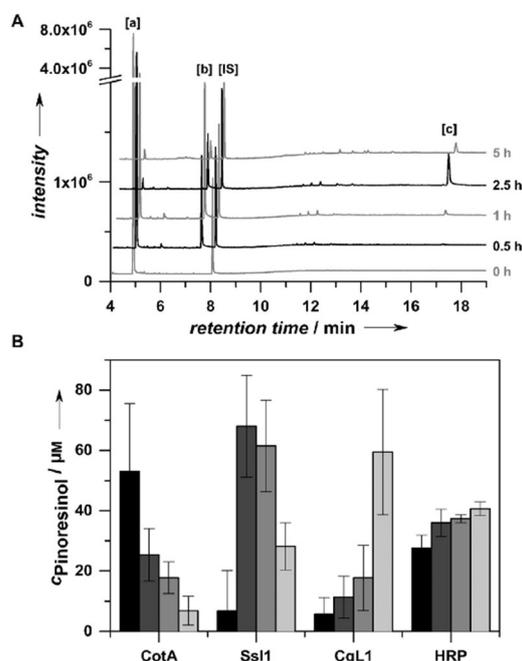


Figure 1. Representative GC–MS chromatograms of the cascade reaction and achieved pinoresinol **3** concentrations. Reaction conditions: pH 7.5, 1 mM of **1**, 10 mU ml⁻¹ PsVAO, 10 mU ml⁻¹ of either a bacterial laccase or HRP. A) Reaction progress of the one-pot cascade combining PsVAO and CotA. Peak numbers: [a] = eugenol, [b] = coniferyl alcohol, [c] = (±)-pinoresinol, [IS] = internal standard. B) Concentrations of **3** determined for laccases (CotA, Ssl1, CgL1) and HRP. Black: 2.5 h, dark grey: 5 h, grey: 7.5 h, light grey: 24 h.

after 2.5 h, for Ssl1 68 μM after 5 h, for CgL1 60 μM after 24 h, and for HRP 40 μM after 24 h. Furthermore, it was observed for Ssl1 and CotA that the amount of **3** decreased once the maximum concentration was achieved (Figure 1B). The control reaction comprising only cell lysate of *E. coli* not expressing recombinant genes was negative (no formation of **2** and **3** was observed), whereas for the control reaction comprising cell lysate containing recombinant PsVAO low amounts of **3** were detected (below 10 μM after 24 h). This background activity can probably be attributed to the native laccase CueO from *E. coli*.^[38]

The depletion of **3** that was observed during the reaction can be explained by its further oxidation by the laccases. This was confirmed by setting up control reactions containing **3** as substrate (100 μM) and a laccase (CotA, Ssl1, or CgL1). All laccases converted **3**, although to different extents (Figure 2). After 24 h conversions of **3** were 86 and 71% with CotA and Ssl1, respectively. In contrast, CgL1 converted only 6% of **3** after 24 h. This might be explained by the lower redox potential of CgL1 of 260 mV^[34] compared to that of Ssl1 (375 mV).^[36] The redox potential of CotA from *Bacillus licheniformis* is not known, but for CotA from *Bacillus subtilis* redox potentials of 525^[39] and 455 mV^[40] have been reported (depending on the analytical method used). The high sequence identity between

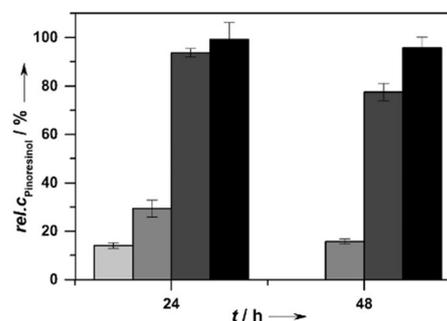


Figure 2. Residual pinoresinol **3** after incubation with bacterial laccases for 24 and 48 h. Reaction conditions: pH 7.5, 100 μM of **3**, 10 mU ml⁻¹ laccase. Determined concentrations of **3** are normalized to the concentration at $t = 0$ h. Light grey: CotA, grey: Ssl1, dark grey: CgL1, black: control reaction without enzyme.

these two CotA laccases of 63% enables the assumption that their redox potentials are in the same range. Therefore, it might be concluded that the conversion of **3** increases with increasing redox potential of the laccase. To avoid depletion of **3** over time, we decided to focus on the laccases CgL1 and Ssl1 for further optimization of the cascade reaction.

Optimization of reaction conditions

Not only coniferyl alcohol **2**, but also pinoresinol **3** are accepted as substrates by the laccases, therefore, determination of the optimal ratios of PsVAO and laccase is important regarding fast conversion of **1** into **2**, and also to ensure high concentrations of **3**. For reactions with Ssl1 a ratio of PsVAO/Ssl1 of 1:1 (10 mU ml⁻¹ each) yielded the highest concentration of **3** (Figure 3A), whereas for reactions with CgL1 a ratio PsVAO/CgL1 of 1:5 (10:50 mU ml⁻¹) was found to be optimal (Figure 3B). Especially for Ssl1, it was noticed that when applied at higher concentrations (50–100 mU ml⁻¹) the achieved concentrations of **3** dropped to 20 μM.

To protect **3** from further oxidation by laccases, the addition of organic solvents was investigated with the aim of in situ product extraction. Moreover, previous studies have shown that addition of organic solvents can affect phenol coupling reactions with regard to product ratios and the type of coupling (C–C or C–O coupling).^[41] The water-miscible organic solvents methanol, acetonitrile, acetone, and ethanol, as well as the water-immiscible organic solvents toluene, 3-methyl-1-butanol, ethyl acetate, isooctane, and *tert*-butyl methyl ether (*t*BME) were investigated.

Analysis of the effect of 20% (v/v) organic solvents on PsVAO activity revealed only a minor impact of isooctane, methanol, acetone, and ethanol on conversions of **1** (less than 5% deviation from control reaction without organic solvent). In the presence of acetonitrile, toluene, and *t*BME, conversion of **1** achieved 60–80% of that in the aqueous system, whereas conversion of **1** was reduced to 30 or 20% after addition of 3-methyl-1-butanol or ethyl acetate, respectively (Figure S2, Supporting information).

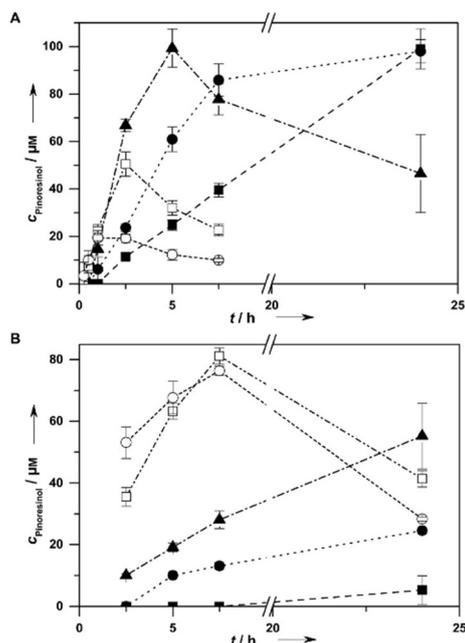


Figure 3. Concentrations of pinoresinol **3** in the one-pot reaction containing different ratios of PsVAO and a bacterial laccase. Reaction conditions: pH 7.5, 1 mM of **1**, 10 mU ml⁻¹ PsVAO, 1–100 mU ml⁻¹ laccase. A) Ssl1, B) CgL1. ■: 1 mU ml⁻¹, ●: 5 mU ml⁻¹, ▲: 10 mU ml⁻¹, □: 50 mU ml⁻¹, ○: 100 mU ml⁻¹.

Regarding production of **3** by Ssl1 the addition of acetone, ethanol, and acetonitrile, as well as toluene and ethyl acetate resulted in decreased yields. In the case of methanol and 3-methyl-1-butanol the achieved product yields were in the same range as in the aqueous system, whereas the addition of isooctane and tBME resulted in a slight increase of **3** compared to the aqueous system (Figure 4).

Based on these results, reactions with PsVAO and Ssl1 and either tBME or isooctane were performed, and the concentration of **1** was increased to 10 mM. In the aqueous system the concentration of **3** reached a maximum of 300 µM after 24 h (and then decreased), whereas in the systems with 20% isooctane or tBME the concentration of **3** reached 340 and 660 µM after 24 h and further increased up to 540 and 940 µM after 72 h, respectively (Figure 5). Moreover, the depletion of **3** that was observed in the aqueous system was not detected in the biphasic systems.

These results are consistent with the determined partition coefficients of **3**: In the biphasic system with 20% tBME the log *P* of **3** was 2.26, whereas its log *P* in the system with 20% isooctane was -1.99 (Table S3, Supporting Information). Obviously, in situ extraction of **3** into the organic phase is more efficient in the system with tBME. Thus, product **3** is no longer available in the aqueous phase as a substrate for laccases, leading to its accumulation at higher concentrations.

When the individually optimized reaction conditions (20% tBME, 1:5 ratio of PsVAO/CgL1, 10 mM of **1**) were combined,

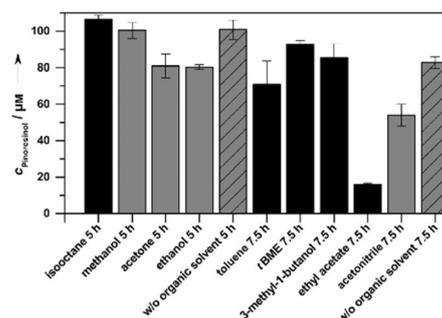


Figure 4. Concentrations of pinoresinol **3** in one-pot reactions with 20% (v/v) of an organic solvent and 1 mM of **1**. Reaction conditions: pH 7.5 in the aqueous phase, 10 mU ml⁻¹ PsVAO, 10 mU ml⁻¹ Ssl1, 20% (v/v) of an organic solvent. The reaction time for organic solvents resulting in conversions of **1** below 80% after 2.5 h (see Figure S2) was prolonged to 7.5 h. Grey: water-miscible organic solvents, grey shaded: control reaction without organic solvent, black: water-immiscible organic solvents.

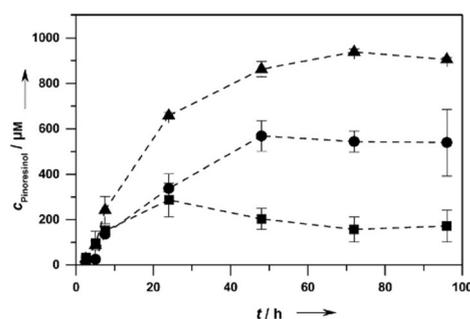


Figure 5. Concentrations of pinoresinol **3** in the one-pot cascade with 20% (v/v) of an organic solvent and 10 mM of **1**. Reaction conditions: pH 7.5 in the aqueous phase, 10 mU ml⁻¹ PsVAO, 10 mU ml⁻¹ Ssl1. ■: aqueous system; ●: 20% isooctane; ▲: 20% tBME.

but the laccase CgL1 was applied instead of Ssl1, the yield of **3** was further increased to 1.25 mM after 96 h.

Considering that complete conversion at 10 mM of **1** was achieved by PsVAO, we assumed that a substantial amount of H₂O₂ was produced that potentially could be harmful to the enzymes. Therefore, in an additional experiment catalase was added to the optimized reaction cascade (20% tBME, 1:5 ratio of PsVAO/CgL1, 10 mM of **1**) for scavenging of H₂O₂. In this case, however, the yield of **3** achieved was in the same range as that without catalase (Figure S3, Supporting Information).

Another approach is the addition of peroxidases because H₂O₂ can be utilized as a cosubstrate. HRP was applied in the one-pot process with PsVAO (20% tBME, 10 mU ml⁻¹ PsVAO, 10 mU ml⁻¹ HRP, 10 mM of **1**). This process yielded 0.7 mM of **3** (Figure S4, Supporting information).

Finally, we also investigated a sequential mode of operation: When **1** was almost completely converted by PsVAO to **2**, laccase was added. When applying bacterial CgL1 under these conditions, however, the concentration of **3** could not be further increased (Figure S5, Supporting Information). Additional-

ly, the sequential application of fungal Lcc from *T. versicolor* was tested; in this case, the laccase was added after adjustment of the pH to 5.0. Complete conversion of **2** was achieved 7.5 h after addition of Lcc and at this time point the highest concentration of **3** was achieved (850 μM). Thereafter, complete depletion of **3** was observed within 16 h.

Experiments on a semipreparative scale

Encouraged by the above results, we performed further experiments on the one-pot cascade with PsVAO and CgL1 at higher eugenol **1** concentrations (25, 50, and 100 mM; Figure S6, Supporting Information). When starting with 25 mM **1** the two-step cascade reached complete conversion within 120 h, and 2.7 mM of pinoresinol **3**, corresponding to $\approx 1 \text{ g l}^{-1}$, was determined. At higher concentrations of **1** (50 and 100 mM) conversions of **1** reached 88 and 53%, respectively, and in both cases 4.4 mM of **3**, corresponding to $\approx 1.6 \text{ g l}^{-1}$, was produced.

Finally, the reaction volume was increased (Figure S6, Supporting Information) and the cascade was performed on a semipreparative scale under the optimized reaction conditions: 25 ml, 102.5 mg of **1** (25 mM), 20% (v/v) tBME, and PsVAO/CgL1 in a ratio of 1:5. With this setup, 47% conversion of **1** was achieved after 120 h and 13 mg of **3** (corresponding to an isolated yield of 13%) could be isolated from the reaction mixture by semipreparative HPLC (Figure S7, Supporting Information) and analyzed by NMR spectroscopy (Figure S8, Supporting Information).

In a previous study reported by Pickel et al. 10% isolated yield of **3** was reported for a biocatalytic reaction converting coniferyl alcohol **2** by the commercially available laccase Lcc from *T. versicolor*.^[29] In another study, Mitsuhashi et al. performed the same reaction with horseradish peroxidase and reported an isolated product yield of 4%.^[23] In comparison with these studies our reaction employs an inexpensive and abundant starting material (**1** is 98% cheaper than **2**), and the isolated yield of **3** could be increased by 30 and 225%, respectively.

Conclusions

In conclusion, we have established a novel one-pot cascade containing PsVAO and bacterial laccases for the synthesis of pinoresinol **3**. To the best of our knowledge this is the first cascade that combines such enzymes for the production of fine chemicals. The reaction conditions have been optimized and the application of the cascade on a semipreparative scale has been demonstrated.

Experimental Section

Chemicals and enzymes

All chemical reagents were of analytical grade or higher and purchased from Appli Chem (Darmstadt, Germany), Fluka (Buchs, Switzerland), Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Germany), or VWR (Darmstadt, Germany). Laccase of *Trametes versicolor* (Lcc) and peroxidase from horseradish (HRP) were from Sigma-Aldrich. Restriction enzymes,

Pfu-DNA-polymerase, and T4-ligase were from Thermo Scientific (Schwerte, Germany). Oligonucleotides were from Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany).

Bacterial strains and plasmids

Expression of the bacterial laccases and PsVAO was performed in *E. coli* BL21 (DE3) (F^- *ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm* (DE3)) (Novagen, Darmstadt, Germany), except for Ssl1, which was produced in *E. coli* BL21-Codon Plus (DE3)-RP (F^- *ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) dcm + Tet^r gal λ (DE3) *endA Hte [agrU proL Cam^r]* (Stratagene, Waldbronn, Germany). Construction of the plasmids pET-16b_cgl1 (NC_003450 region 3169415.3170896, GenBank: BAC00361.1),^[34] pET22K316N/D500G (NCBI RefSeq Protein: YP_077905.1, GenBank: AAU22267.1),^[35] and pET22-ssl1 (SSEG_02446; GenBank: EDY55866.1)^[42] for expression of CgL1, CotA, and Ssl1, respectively, has been reported previously. The gene encoding PsVAO (GenBank: Y15627.1), obtained from Prof. Marco W. Fraaije (Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute, University of Groningen, Netherlands), was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the oligonucleotides*

5'-GCT AGC ATG TCC AAG ACA CAG GAA TTC AGG-3' and

5'-GGA AGC TTT TAC AGT TTC CAA GTA ACA TGAC-3'

and the amplicon was cloned into pET-28b(+) via restriction sites *NheI* and *HindIII* to give plasmid pET-28b_psvao. The gene *tth* (NCBI RefSeq Protein: YP_005339.1, GenBank: BAE16261.1) was amplified by PCR from the genomic DNA of *T. thermophilus* without the native TAT-secretion signal. The oligonucleotides

5'-GGA ATT CCA TAT GCT GGC GCG CAG GAG CTT-3' and

5'-CGG GAT CCT TAA CCC ACC TCG AGG ACT CCC-3'

were used. The PCR fragment was cloned into the plasmid pET-22b(+) via *NdeI* and *BamHI* restriction sites resulting in the expression plasmid pET22b_tth. The gene sequences and their insertion into the vectors were verified by automated DNA sequencing (psvao—Inqaba Biotech, Pretoria, South Africa; tth—Eurofins MWG, Ebersberg, Germany).

Heterologous gene expression in *E. coli*

Expression of the bacterial laccases and heat denaturation of *E. coli* endogenous proteins (for laccase purification) was performed as described elsewhere.^[34,35,42] Detailed information on expression is summarized in Table S1 (Supporting information). PsVAO was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) cells carrying pET-28b_psvao in 50 ml TB-medium supplemented with kanamycin (34 $\mu\text{g ml}^{-1}$) at 37 °C, 180 rpm. Protein expression was induced at an optical density at 600 nm (OD_{600}) of 0.6 by addition of 0.5 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG). Thereafter, incubation conditions were shifted to 30 °C, 140 rpm for 16 h. Cell harvesting was conducted at 3200 \times g, 4 °C for 30 min and the pellet was resuspended in 5 ml 50 mM KPi (pH 7.5), supplemented with 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). Cells were lysed by sonification on ice and cell debris was removed by centrifugation (48 000 \times g, 30 min, 4 °C). All enzyme preparations were employed as cleared cell lysates without further purification.

Enzyme screening for conversion of coniferyl alcohol

The volumetric activities of laccases and HRP were determined with the substrate 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) as described in the Supporting Information. Screening for the production of **3** from **2** was carried out with 1 mM of **2** [from a 50 mM stock solution dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO)] and 10 mU ml⁻¹ of either laccase (CotA, SsL1, CgL1, Tth, or Lcc) or HRP in 100 mM NaOAc (pH 5.0), 50 mM KPi (pH 7.5), or 50 mM Tris-HCl (pH 9.0). Reaction mixtures were incubated for 30 min at 25 °C, extracted twice with 300 µl ethyl acetate and analyzed by GC-MS.

Cascade reaction

Development of the enzymatic cascade

The volumetric activities of laccases and HRP were determined with ABTS as described above. The volumetric activity of PsVAO was determined with **1** as substrate as described in the Supporting Information. Reactions at analytical scale (1 ml reaction volume) contained 1 mM of **1** (from a 50 mM stock solution dissolved in DMSO), 10 mU ml⁻¹ PsVAO and 10 mU ml⁻¹ laccase or HRP in 100 mM NaOAc (pH 5.0), 50 mM KPi (pH 7.5), or 50 mM Tris-HCl (pH 9.0). Reactions were performed in an overhead shaker at 25 °C, 20 rpm. Samples were taken after 2.5, 5, 7.5, and 24 h. After addition of an internal standard (see below), reaction mixtures were extracted twice with 300 µl ethyl acetate and analyzed by GC-MS.

All reactions were performed in triplicate. Control reactions were performed with cleared cell lysate of *E. coli* not containing heterologous proteins.

Optimization of reaction conditions

For determination of the optimal enzyme ratio 1 mM of **1** and 10 mU ml⁻¹ PsVAO were supplemented with a bacterial laccase (SsL1 or CgL1) of different volumetric activities (1, 5, 10, 50, or 100 mU ml⁻¹).

To analyze the influence of organic solvents 20% (v/v) of an organic solvent was added to 50 mM KPi (pH 7.5) containing (i) 1 mM of **1** and 10 mU ml⁻¹ PsVAO, or (ii) 1 mM or 10 mM of **1**, 10 mU ml⁻¹ PsVAO, and 10 mU ml⁻¹ SsL1.

Based on the determined optimum reaction parameters (10 mM of **1**, biphasic system with 20% tBME) the reaction was repeated with CgL1 (50 mU ml⁻¹) or HRP (10 mU ml⁻¹) instead of SsL1 (10 mU ml⁻¹). Optionally, the reaction with CgL1 was supplemented with 600 U ml⁻¹ catalase.

In the one-pot sequential reaction mode 10 mM of **1** in a biphasic system was supplemented with 10 mU ml⁻¹ PsVAO, and after a reaction time of 72 h 10 mU ml⁻¹ laccase was added. In the case of Lcc pH adjustment was performed by dropwise addition of HCl.

After addition of an internal standard, reaction mixtures were extracted twice with 300 µl ethyl acetate and analyzed by GC-MS.

Experiments on a semipreparative scale

Concentration scale-up was performed in biphasic systems with 50 mM KPi (pH 7.5), 20% (v/v) tBME, PsVAO and CgL1 (10:50 mU ml⁻¹), and different concentrations of **1** (25, 50, or 100 mM) in a reaction volume of 0.5 ml. After addition of an inter-

nal standard, reaction mixtures were extracted twice with 1 ml ethyl acetate and analyzed by GC-MS.

For volumetric scale-up 102.5 mg of **1** (corresponding to 25 mM) in a reaction volume of 25 ml was used. Reactions were performed in biphasic systems containing 50 mM KPi (pH 7.5), 20% (v/v) tBME, PsVAO and CgL1 in a ratio of 1:5 (10:50 mU ml⁻¹). After 120 h the reaction mixture was extracted four times with 12.5 ml ethyl acetate, evaporated and resuspended in 8 ml of a methanol/0.1% formic acid mixture in a ratio of 7:1. Pinosresinol **3** was isolated by semipreparative HPLC (Figure S4, Supporting Information). For product verification high-resolution mass spectrometry (HRMS) (Table S4, Supporting Information), ¹H NMR (Figure S6A, Supporting Information), ¹³C NMR (Figure S6B, Supporting Information), HMBC, COSY, and HSQC spectroscopy were performed and the data were analyzed (further information is given in the Supporting Information).

(±)-Pinosresinol **3**: ¹H NMR (600 MHz, CD₃COCD₃): δ = 6.98 (d, ⁴J (H_{2,2'},H_{6,6'}) = 1.9 Hz, 2H; 2,2'-H), 6.83 (ddd, ³J (H_{5,5'},H_{6,6'}) = 8.1, ⁴J (H_{2,2'},H_{6,6'}) = 2.0 Hz, ⁴J (H_{6,6'},H_{7,7'}) = 0.7 Hz, 2H; 6,6'-H), 6.78 (d, ³J (H_{5,5'},H_{6,6'}) = 8.1 Hz, 2H, 5,5'-H), 4.66 (d, ³J (H_{7,7'},H_{8,8'}) = 4.0 Hz, 2H; 7,7'-H), 4.21–4.18 (m, 2H; 9,9'-H), 3.83 (s, 6H; 3,3'-OCH₃), 3.79 (dd, ³J (H_{8,8'},H_{9,9'}) = 9.1, ⁴J (H_{7,7'},H_{9,9'}) = 3.8 Hz, 2H, 9,9'-H), 3.11–3.04 ppm (m, 2H, 8,8'-H); ¹³C NMR (151 MHz, CD₃COCD₃): δ = 148.30 (C-3,3'), 146.82 (C-4,4'), 134.17 (C-1,1'), 119.61 (C-6,6'), 115.50 (C-5,5'), 110.60 (C-2,2'), 86.64 (C-7,7'), 72.21 (C-9,9'), 56.25 (3,3'-OCH₃), 55.25 ppm (C-8,8'); HRMS (ESI, neg.) calculated for C₂₀H₂₁O₆ [M-H]⁻ m/z: 357.1344, found: 357.1343

Determination of partition coefficients

For determination of partition coefficients (log *P*), 4 ml 50 mM KPi (pH 7.5) was supplemented with 2% (v/v) DMSO and 1 ml of an organic solvent (tBME or iso-octane). 10 mM eugenol **1**, 5 mM coniferyl alcohol **2** or 0.275 mM pinosresinol **3** were added, and incubated in an overhead shaker at 25 °C for 2 h. 600 µl of the organic and the aqueous phases were taken for analysis and 2 mM of the internal standard ferulic acid methyl ester (FSME) (from a 100 mM stock solution in ethanol) was added. The aqueous sample was extracted with 600 µl ethyl acetate. The samples from the organic and aqueous phase were analyzed by GC-MS. For calculation of the partition coefficient the peak areas (pa) of the substances were normalized to the internal standard and the following mathematical formula was used:

$$\log P = \log(\text{pa}_{\text{organic}}) - \log(\text{pa}_{\text{aqueous}}).$$

Product analysis and identification

Qualitative and quantitative GC-MS analysis

Reaction mixtures were analyzed by GC-MS measurements on a GC-MS 2010 (Shimadzu, Duisburg, Germany) equipped with an FS-Supreme-5 column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm, Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Germany) and helium as carrier gas. 0.5 µl of a sample was injected with a split of 5 and an injection temperature of 300 °C. For separation of the compounds the temperature program started at 130 °C. The temperature was held for 2 min, increased with a rate of 20 °C min⁻¹ to 300 °C and held for 8.5 min. Compounds were identified by their characteristic mass-fragmentation patterns and retention times compared to authentic reference compounds.

For quantitative analysis of **3** a calibration curve was recorded utilizing FSME as internal standard: (i) 100 μM from a 5 mm stock solution in DMSO in case of reactions with 1 mm or 10 mm of **1**, or (ii) 2 mm from a 100 mm stock solution in case of higher concentrations of **1**. Two calibration curves were recorded: (i) with final concentrations of **3** of 20 to 100 μM and FSME in final concentration of 100 μM ; (ii) with final concentrations of **3** of 0.1 to 2.5 mm and FSME in final concentration of 2 mm. The ratios of the peak area of **3** to that of the internal standard were plotted against the concentration of **3** to give a straight-line calibration plot.

Pinoresinol purification by semipreparative HPLC

Pinoresinol **3** was purified by HPLC equipped with an Eurospher II 100-10-C18 column (300 \times 8 mm, pore size 100 \AA , 10 μm particle size, Bischoff, Leonberg, Germany). A solvent gradient of methanol (B) and 0.1% formic acid (A) was applied as follows: Starting from 20% B to 35% B in 10 min, hold for 10 min, increase to 70% B within 28 min, then to 90% B within 1 sec, hold for 2 min.

Acknowledgements

Heinrich-Heine University is acknowledged for financial support. We wish to thank Prof. Dr. Marco W. Fraaije (Laboratory of Biochemistry, Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute, University of Groningen, Netherlands) for providing the gene *psvao*.

Keywords: bacterial laccase • biocatalysis • C–C coupling • enzymes • natural products

- [1] a) E. Ricca, B. Brucher, J. H. Schrittwieser, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2239–2262; b) R. C. Simon, N. Richter, E. Busto, W. Kroutil, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 129–143; c) J. Muschiol, C. Peters, N. Oberleitner, M. Mihovilovic, U. Bornscheuer, F. Rudroff, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 5798–5811.
- [2] A. Bruggink, R. Schoevaart, T. Kieboom, *Org. Process Res. Dev.* **2003**, *7*, 622–640.
- [3] S. Kara, J. H. Schrittwieser, F. Hollmann, M. B. Ansorge-Schumacher, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 1517–1529.
- [4] a) S. Riva, W.-D. Fessner, *Cascade biocatalysis. Integrating stereoselective and environmentally friendly reactions*, Wiley-VCH, Weinheim, **2014**; b) E. Garcia-Junceda, *Multi-step enzyme catalysis. Biotransformations and chemoenzymatic synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**.
- [5] J. M. Woodley, *Trends Biotechnol.* **2008**, *26*, 321–327.
- [6] K. Imai, S. Marumo, T. Ohtaki, *Tetrahedron Lett.* **1976**, *17*, 1211–1214.
- [7] M. Szczesniol, D. E. Wampler, *Biochemistry* **1976**, *15*, 2236–2244.
- [8] a) C. V. Voss, C. C. Gruber, K. Faber, T. Knaus, P. Macheroux, W. Kroutil, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13969–13972; b) S.-Y. Chen, C.-X. Yang, J.-P. Wu, G. Xu, L.-R. Yang, *Adv. Synth. Catal.* **2013**, *355*, 3179–3190; c) V. Gauchot, W. Kroutil, A. R. Schmitzer, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 6748–6751; d) T. Sehl, H. C. Hailes, J. M. Ward, U. Menyes, M. Pohl, D. Rother, *Green Chem.* **2014**, *16*, 3341–3348; e) J. H. Schrittwieser, F. Coccia, S. Kara, B. Grischek, W. Kroutil, N. d'Alessandro, F. Hollmann, *Green Chem.* **2013**, *15*, 3318–3331; f) M. Schallmey, R. J. Floor, B. Hauer, M. Breuer, P. A. Jekel, H. J. Wijma, B. W. Dijkstra, D. B. Janssen, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 870–881; g) D. Kalaitzakis, I. Smonou, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 8658–8661; h) C. V. Voss, C. C. Gruber, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 741–745; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 753–757.
- [9] a) M. Schrewe, N. Ladkau, B. Bühler, A. Schmid, *Adv. Synth. Catal.* **2013**, *355*, 1693–1697; b) E. O'Reilly, C. Iglesias, D. Ghislieri, J. Hopwood, J. L. Galman, R. C. Lloyd, N. J. Turner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 2447–2450; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 2479–2482.
- [10] F. van Rantwijk, A. Stolz, *J. Mol. Catal. B* **2015**, *114*, 25–30.
- [11] a) W. Hummel, H. Schütte, E. Schmidt, C. Wandrey, M.-R. Kula, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1987**, *26*, 409–416; b) H.-S. Bae, S.-G. Lee, S.-P. Hong, M.-S. Kwak, N. Esaki, K. Soda, M.-H. Sung, *J. Mol. Catal. B* **1999**, *6*, 241–247; c) M. Fuchs, D. Koszelewski, K. Tauber, W. Kroutil, K. Faber, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5500–5502; d) E.-S. Park, J.-Y. Dong, J.-S. Shin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 651–660.
- [12] a) R. Agudo, M. T. Reetz, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 10914–10916; b) C. A. Müller, B. Akkapurathu, T. Winkler, S. Staudt, W. Hummel, H. Gröger, U. Schwaneberg, *Adv. Synth. Catal.* **2013**, *355*, 1787–1798; c) S. Gargiulo, D. J. Opperman, U. Hanefeld, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 6630–6632; d) T. Classen, M. Korpak, M. Schölzel, J. Pietruszka, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 1321–1331; e) M. Gall, M. Thomsen, C. Peters, I. V. Pavlidis, P. Jonczyk, P. P. Grünert, S. Beutel, T. Scheper, E. Gross, M. Backes, T. Geißler, J. P. Ley, J.-M. Hilmer, G. Krammer, G. J. Palm, W. Hinrichs, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1439–1442; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 1463–1466; f) N. Oberleitner, C. Peters, J. Muschiol, M. Kadow, S. Saß, T. Bayer, P. Schaaf, N. Iqbal, F. Rudroff, M. D. Mihovilovic, U. T. Bornscheuer, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 3524–3528; g) A. Pennec, F. Hollmann, M. S. Smit, D. J. Opperman, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 236–239; h) S. Schulz, M. Girhard, S. K. Gaßmeyer, V. D. Jäger, D. Schwarze, A. Vogel, V. B. Urlacher, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 601–604; i) S. Schmidt, C. Scherkus, J. Muschiol, U. Menyes, T. Winkler, W. Hummel, H. Gröger, A. Liese, H.-G. Herz, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 2784–2787; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 2825–2828.
- [13] a) M. Pešić, C. López, J. López-Santín, G. Alvaro, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 7173–7183; b) I. Sánchez-Moreno, V. Hélaine, N. Poupard, F. Charmantray, B. Légeret, L. Hecquet, E. Garcia-Junceda, N. Wohlgenuth, C. Guérard-Hélaine, M. Lemaire, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 1725–1730; c) S. Baum, F. van Rantwijk, A. Stolz, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 113–122; d) S. van Pelt, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 397–404; e) T. Sehl, H. C. Hailes, J. M. Ward, R. Warden-ga, E. von Lieres, H. Offermann, R. Westphal, M. Pohl, D. Rother, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6772–6775; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 6904–6908.
- [14] a) E. E. Ferrandi, D. Monti, I. Patel, R. Kittl, D. Haltrich, S. Riva, R. Ludwig, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 2821–2828; b) S. Aksu, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 1211–1216.
- [15] A. Díaz-Rodríguez, N. Ríos-Lombardia, J. H. Sattler, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, W. Kroutil, V. Gotor, *Catal. Sci. Technol.* **2015**, *5*, 1443–1446.
- [16] H. Adlercreutz, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2007**, *44*, 483–525.
- [17] a) A. M. Duncan, W. R. Phipps, M. S. Kurzer, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2003**, *17*, 253–271; b) R. A. Dixon, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2004**, *55*, 225–261; c) T. Cornwell, W. Cohick, I. Raskin, *Phytochemistry* **2004**, *65*, 995–1016.
- [18] a) A. Ayella, S. Lim, Y. Jiang, T. Iwamoto, D. Lin, J. Tomich, W. Wang, *Nutr. Res.* **2010**, *30*, 762–769; b) S. Jafari, S. Saeidnia, M. Abdollahi, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2014**, *15*, 409–421; c) M. Azrad, R. T. Vollmer, J. Madden, M. Dewhirst, T. J. Polascik, D. C. Snyder, M. T. Ruffin, J. W. Moul, D. E. Brenner, W. Demark-Wahnefried, *J. Med. Food* **2013**, *16*, 357–360.
- [19] a) J. Feng, Z. Shi, Z. Ye, *Biol. Pharm. Bull.* **2008**, *31*, 1067–1070; b) S. M. Sacco, L. U. Thompson, B. Ganss, W. E. Ward, *J. Med. Food* **2011**, *14*, 1208–1214.
- [20] a) J. L. Adolphe, S. J. Whiting, B. H. Juurlink, L. U. Thorpe, J. Alcorn, *Br. J. Nutr.* **2010**, *103*, 929–938; b) J. Peterson, J. Dwyer, H. Adlercreutz, A. Scalbert, P. Jacques, M. L. McCullough, *Nutr. Rev.* **2010**, *68*, 571–603.
- [21] E. Aehle, U. Müller, P. C. Eklund, S. M. Willför, W. Sippl, B. Dräger, *Phytochemistry* **2011**, *72*, 2396–2405.
- [22] M. V. Sepporta, T. Mazza, G. Morozzi, R. Fabiani, *Nutr. Cancer* **2013**, *65*, 1208–1218.
- [23] S. Mitsuhashi, T. Kishimoto, Y. Uraki, T. Okamoto, M. Ubukata, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 2645–2650.
- [24] a) A. Wikul, T. Damsud, K. Kataoka, P. Phuwapraisrisan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 5215–5217; b) K. H. Kim, E. Moon, S. Y. Kim, K. R. Lee, *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 4779–4785; c) B. Hwang, J. Lee, Q.-H. Liu, E.-R. Woo, D. G. Lee, *Molecules* **2010**, *15*, 3507–3516.
- [25] I. E. Milder, I. C. Arts, B. van de Putte, D. P. Venema, P. C. Hollman, *Br. J. Nutr.* **2005**, *93*, 393–402.
- [26] a) S. C. Roy, K. K. Rana, C. Guin, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3242–3248; b) A. Pelter, R. S. Ward, D. J. Watson, P. Collins, I. T. Kay, *J. Chem. Soc. Perkin*

- Trans. 1* **1982**, 175–181; c) J. Maruyama, M. Kobayashi, M. Miyashita, I. Kouno, H. Irie, *Heterocycles* **1994**, *37*, 839–845.
- [27] M. Lahtinen, L. Viikari, P. Karhunen, J. Asikkala, K. Kruus, I. Kilpeläinen, *J. Mol. Catal. B* **2013**, *85*, 169–177.
- [28] F. De Angelis, R. Nicoletti, N. Spreti, F. Veri, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1283–1285; *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1364–1367.
- [29] B. Pickel, M.-A. Constantin, J. Pfannstiel, J. Conrad, U. Beifuss, A. Schaller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 202–204; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 207–209.
- [30] M. W. Fraaije, C. Veeger, W. J. van Berkel, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *234*, 271–277.
- [31] T. Shiba, L. Xiao, T. Miyakoshi, C.-L. Chen, *J. Mol. Catal. B* **2000**, *10*, 605–615.
- [32] P. Baldrian, *FEMS Microbiol. Rev.* **2006**, *30*, 215–242.
- [33] E. de Jong, W. J. van Berkel, R. P. van der Zwan, J. A. de Bont, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *208*, 651–657.
- [34] E. Ricklefs, N. Winkler, K. Koschorreck, V. B. Urlacher, *J. Biotechnol.* **2014**, *191*, 46–53.
- [35] K. Koschorreck, R. D. Schmid, V. B. Urlacher, *BMC Biotechnol.* **2009**, *9*, 12.
- [36] M. Gunne, A. Höppner, P.-L. Hagedoorn, V. B. Urlacher, *FEBS J.* **2014**, *4307*–4318.
- [37] K. Miyazaki, *Extremophiles* **2005**, *9*, 415–425.
- [38] G. Grass, C. Rensing, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *286*, 902–908.
- [39] P. Durão, Z. Chen, C. S. Silva, C. M. Soares, M. M. Pereira, S. Todorovic, P. Hildebrandt, I. Bento, P. F. Lindley, L. O. Martins, *Biochem. J.* **2008**, *412*, 339–346.
- [40] E. P. Melo, A. T. Fernandes, P. Durão, L. O. Martins, *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35*, 1579–1582.
- [41] a) A. Intra, S. Nicotra, S. Riva, B. Danieli, *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 973–977; b) S. Ncanana, L. Baratto, L. Roncaglia, S. Riva, S. G. Burton, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1507–1513.
- [42] M. Gunne, V. B. Urlacher, *PLoS ONE* **2012**, *7*, e52360.

Received: February 24, 2015

Revised: April 7, 2015

Published online on June 3, 2015

2.3.2. Supporting Information

1 Experimental procedures

1.1 Heterologous gene expression in *Escherichia coli*

Table S1. Expression conditions of enzymes utilized within the study.

Enzyme (origin)	Expression strain	Expression conditions	Reference
CgL1 (<i>Corynebacterium glutamicum</i>)	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pET16b_cgl1	50 ml TB _{Amp} , 37 °C, 180 rpm; at OD ₆₀₀ of 1.6 addition of 0.25 mM IPTG, 3 mM CuSO ₄ ; shift to 30 °C, 140 rpm, 16 h	[1]
CotA mutant K316N/D500G (<i>Bacillus licheniformis</i>)	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pET22K316N/D500G	50 ml TB _{Amp} , 37 °C, 180 rpm; at OD ₆₀₀ of 1.6 addition of 0.25 mM IPTG, 2 mM CuSO ₄ ; shift to 18 °C, 140 rpm, 16 h	[2]
Ssl1 (<i>Streptomyces sviveus</i>)	<i>E. coli</i> BL21- CodonPlus (DE3)-RP pET22ssl1	50 ml TB _{Amp+Cam} , 30 °C, 140 rpm; at OD ₆₀₀ of 1.0 addition of 40 µM IPTG, 2 mM CuSO ₄ ; shift to 25 °C, 140 rpm, 8 h	[3]
Tth (<i>Thermus thermophilus</i>)	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pET22_tth	50 ml TB _{Amp} , 37 °C, 180 rpm; at OD ₆₀₀ of 1.6 addition of 0.25 mM IPTG, 2 mM CuSO ₄ ; shift to 25 °C, 140 rpm, 16 h	This work
PsVAO (<i>Penicillium simplicissimum</i>)	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pET28b_psvao	50 ml TB _{Amp} , 37 °C, 180 rpm; at OD ₆₀₀ of 0.6 addition of 0.5 mM IPTG; shift to 30 °C 140 rpm, 16 h	[4]

After cell disruption by sonification and subsequent centrifugation the supernatant containing laccases was pre-purified by heat denaturation. The soluble fraction containing CgL1 was incubated for 10 min at 50 °C, CotA for 15 min at 70 °C, Ssl1 for 20 min at 65 °C, and Tth for 15 min at 70 °C. Denaturated proteins of *E. coli* were removed by centrifugation (48,000 x g, 30 min, 4 °C).

1.2 Activity assays

The volumetric activities of laccases, horse radish peroxidase (HRP) and PsVAO were analyzed at 25 °C.

The volumetric activities of laccases and HRP were determined by the ABTS assay. The assay was performed with 0.5 mM ABTS in 0.1 M NaOAc, pH 5.0. Optionally, 0.5 mM H₂O₂ was added when using HRP. The oxidation of ABTS was followed photometrically at 420 nm ($\epsilon_{420} = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

The volumetric activity of PsVAO was determined by conversion of eugenol **1** to coniferyl alcohol **2**. The assay mixture contained 1 mM eugenol **1** (from a 50 mM stock solution in ethanol) in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0. The formation of coniferyl alcohol **2** was followed at 300 nm ($\epsilon_{300} = 7.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

1.3 HPLC analysis

The reaction was analyzed by HPLC equipped with a Chromolith® Performance RP-18e column (length 100 mm, diameter 4.6 mm, Merck, Darmstadt, Germany) and a flow rate of 0.5 mL min⁻¹. A solvent gradient of methanol (B) and 0.1 % formic acid (A) was applied as follows: Starting from 20 % B to 35 % B in 5 min, hold for 5 min, increase to 70 % B within 15 min, then to 90 % B within 1 sec, hold for 1 min.

1.4 NMR and High-resolution mass spectrometry

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a Bruker Avance III (600 MHz) on CD₃COCD₃ solutions using residual solvent as internal standard ($\delta = 2.05$ ppm and 2.84 ppm in ¹H-NMR spectra, $\delta = 29.84$ ppm and 206.26 in ¹³C-NMR spectra). Chemical shifts (δ) are reported in parts per million (ppm) relative to the signal of the residual protic solvents.

Coupling constants J [Hz] were directly taken from the spectra and are not averaged. Splitting patterns are designated as s (singlet), d (doublet), dd (doublet of doublets), ddd (doublet of doublets of doublets) and m (multiplet). Peak assignment was based on correlation experiments.

High-resolution mass spectrometry (HR/MS) was recorded on maXis in the negative mode with a scan from 50-1500 m/z and the following settings: Source Type ESI, Set Capillary 2800 V, Set End Plate Offset: -500 V, Nebulizer 0.4 Bar, Dry Heater; 180 °C, Dry gas 4.0 L min⁻¹.

2 Additional results

2.1 Establishing of the one-pot process for the production of pinoresinol

While all laccases tested produced pinoresinol **3** to a similar extent, Tth was excluded from further experiments because its volumetric activity against ABTS is very low. Since the same volumetric activity of all laccases was applied for the initial screening, the volume of Tth solution in the screening experiments was much higher compared to those of other laccases tested. Therefore, Tth was excluded from further experiments.

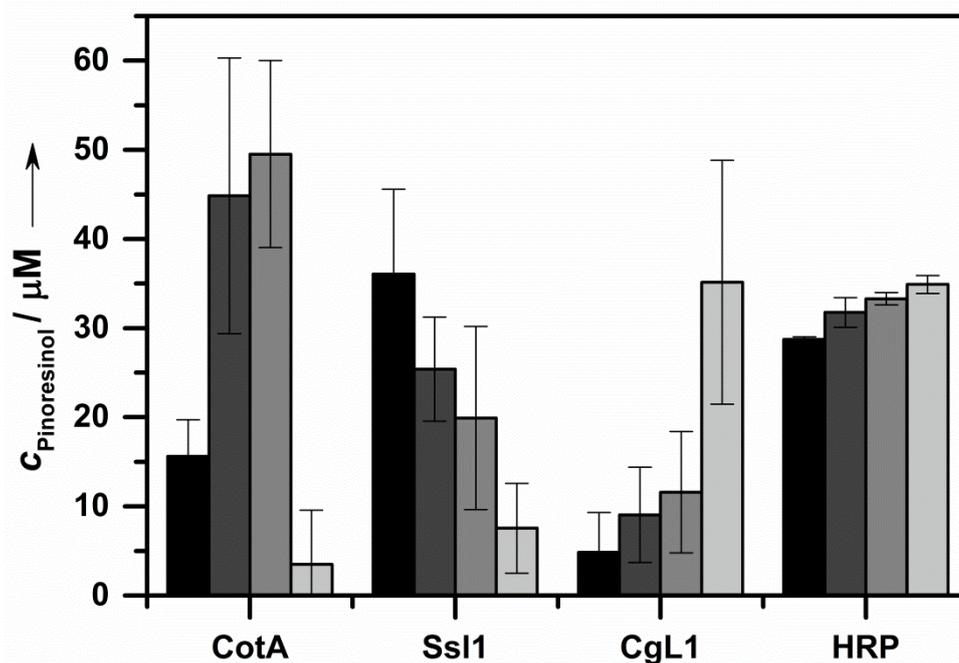


Figure S1. Concentrations of **3** produced with either a bacterial laccase (CotA, Ssl1, CgL1) or HRP in the one-pot cascade at pH 9.0. Reaction conditions: 1 mM eugenol **1**, 10 mU mL⁻¹ PsVAO, 10 mU mL⁻¹ laccase or HRP. Black: 2.5 h, dark grey: 5 h, grey: 7.5 h and light grey: 24 h.

Table S2. Conversion of eugenol **1** and coniferyl alcohol **2** in the one-pot cascade containing PsVAO and bacterial laccase or HRP at pH 7.5.

laccase	time [h]	eugenol conversion [%]	coniferyl alcohol conversion [%]
CgL1	2.5	100	1.71
	5	100	11.77
	7.5	100	24.18
	24	100	77.80
CotA	2.5	100	85.80
	5	100	97.30
	7.5	100	97.53
	24	100	98.53
SsL1	2.5	100	81.23
	5	100	97.10
	7.5	100	97.78
	24	100	98.30
HRP	2.5	100	81.2
	5	100	81.5
	7.5	100	81.7
	24	100	82.95

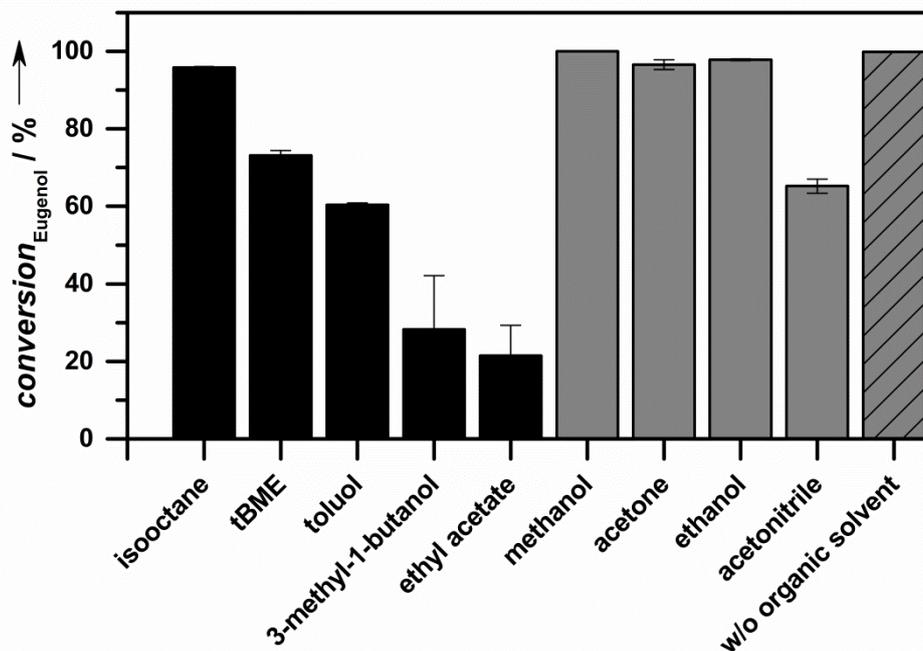


Figure S2. Influence of organic solvents on conversion of eugenol **1** by PsVAO. Reaction conditions: pH 7.5, 1 mM eugenol **1**, 10 mU mL⁻¹ PsVAO, 20 % (v/v) of an organic solvent, t = 2.5 h. Grey: water-miscible organic solvents, grey shaded: control reaction without organic solvent, black: non-water-miscible organic solvents.

Table S3. Partition coefficients of eugenol **1**, coniferyl alcohol **2**, and pinoresinol **3** determined for the biphasic systems with 20 % tBME and 20 % isooctane (v/v).

	log <i>P</i> tBME/buffer	log <i>P</i> isooctane/buffer
Eugenol 1	1.57	0.81
Coniferyl alcohol 2	0.48	-2.55
Pinoresinol 3	2.26	-1.99

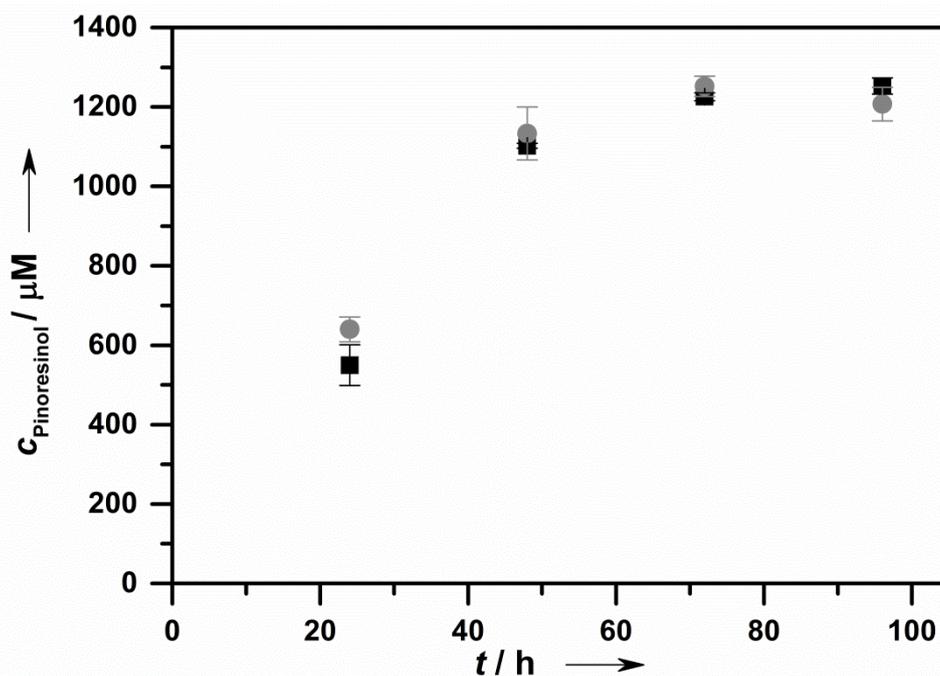


Figure S3. Concentrations of pinoresinol **3** in the optimized one-pot cascade with and without catalase. Reaction conditions: pH 7.5, 10 mU mL⁻¹ PsVAO, 50 mU mL⁻¹ CgL1, 10 mM of **1**, 20 % (v/v) of *t*BME. Square: without catalase; circle: with 600 U mL⁻¹ catalase.

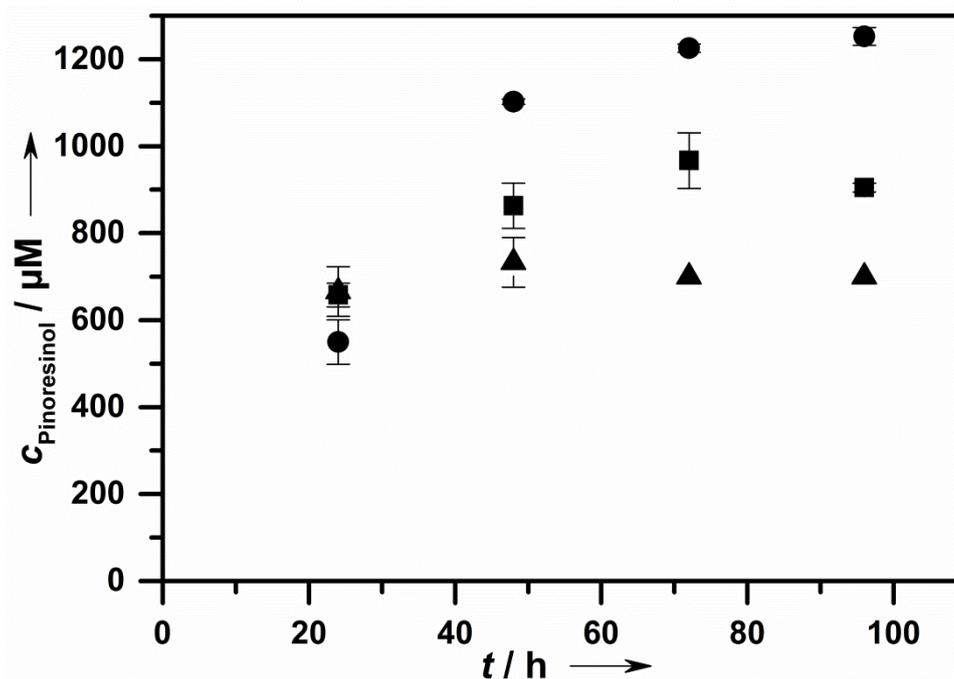


Figure S4. Concentrations of pinoresinol **3** in the optimized one-pot cascade with laccase or HRP. Reaction conditions: pH 7.5, 10 mU mL⁻¹ PsVAO, 10 mM of **1**, 20 % (v/v) of *t*BME. Square: 10 mU mL⁻¹ Ssl1; circle: 50 mU mL⁻¹ CgL1; triangle: 50 mU mL⁻¹ HRP.

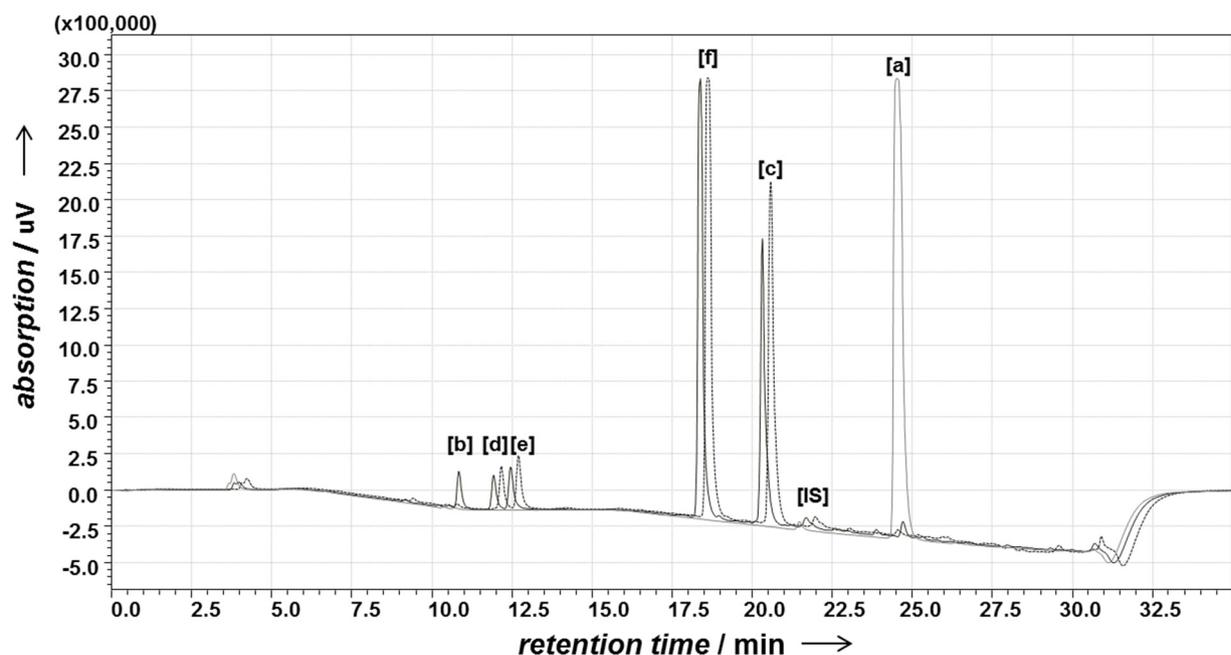


Figure S5. Representative HPLC chromatograms at 205 nm of the one-pot cascade and the corresponding one-pot sequential process. Reaction conditions: pH 7.5, 10 mU mL^{-1} PsVAO, 50 mU mL^{-1} CgL1, 10 mM of **1**, 20 % (v/v) of *t*BME. grey: without enzymes added; black: sequential mode, CgL1 was added after 72 h; black dotted: one-pot cascade reaction. Peak numbers: [a] = eugenol, [b] = coniferyl alcohol, [c] = (\pm)-pinoresinol, [d,e] = (\pm)-*erythro/threo*-guaiacylglycerol 8-O-4'-coniferyl alcohol ether, [f] = (\pm)-dehydroconiferyl alcohol.

2.2 Upscaling experiments and semi preparative scale

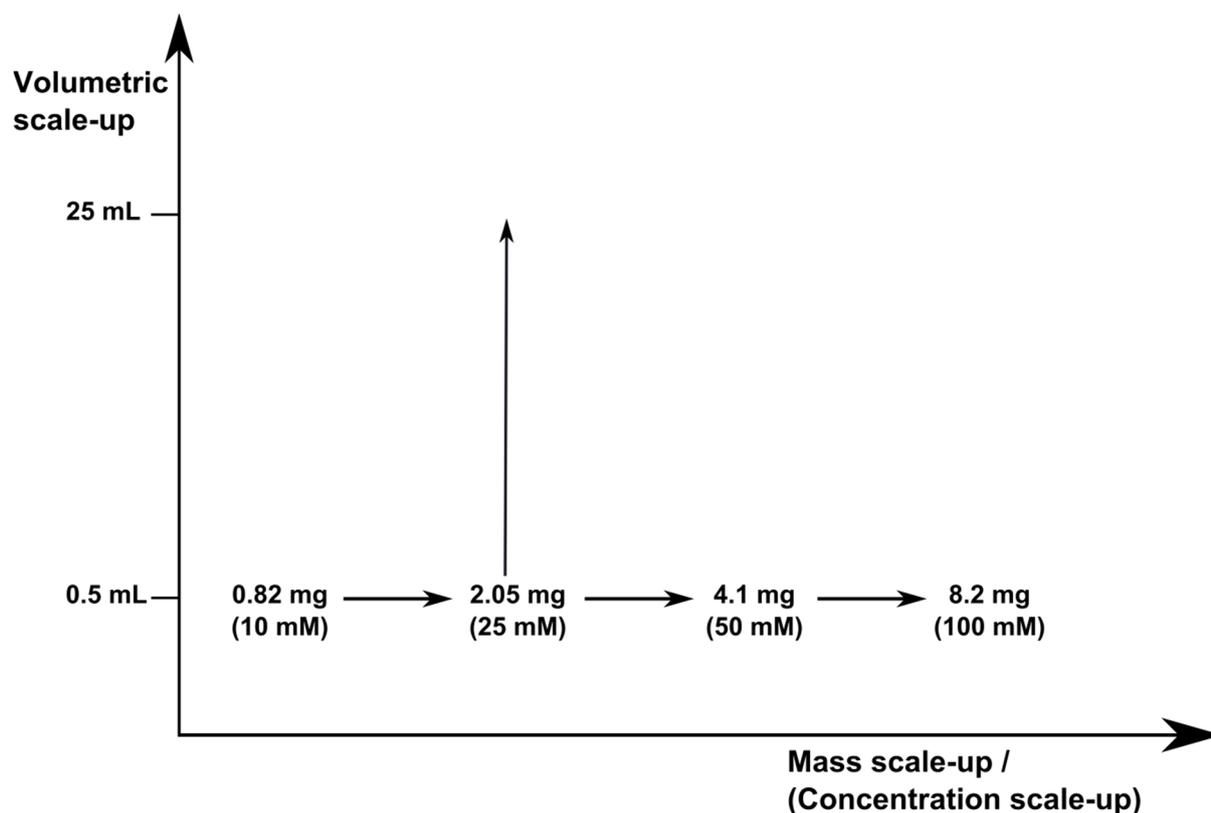


Figure S6. Schematic procedure for the projected upscaling experiments.

2.3 Analysis of reactions on a semi-preparative scale

2.3.1 GC/MS, HPLC analysis and High-resolution mass spectrometry (HR/MS)

In comparison to GC/MS measurements (Figure S7A), HPLC chromatograms of semi-preparative conversions of eugenol **1** to pinoresinol **3** (Figure S7B) revealed additional product peaks.

The peaks of the GC/MS chromatogram were identified by authentic reference substances as eugenol **[a]**, coniferyl alcohol **[b]**, and pinoresinol **[c]** (Figure S7A). In the same manner, some peaks of the HPLC chromatogram could be identified by authentic reference substances as coniferyl alcohol **[b]**, pinoresinol **[c]**, and eugenol **[a]** (Figure S7B).

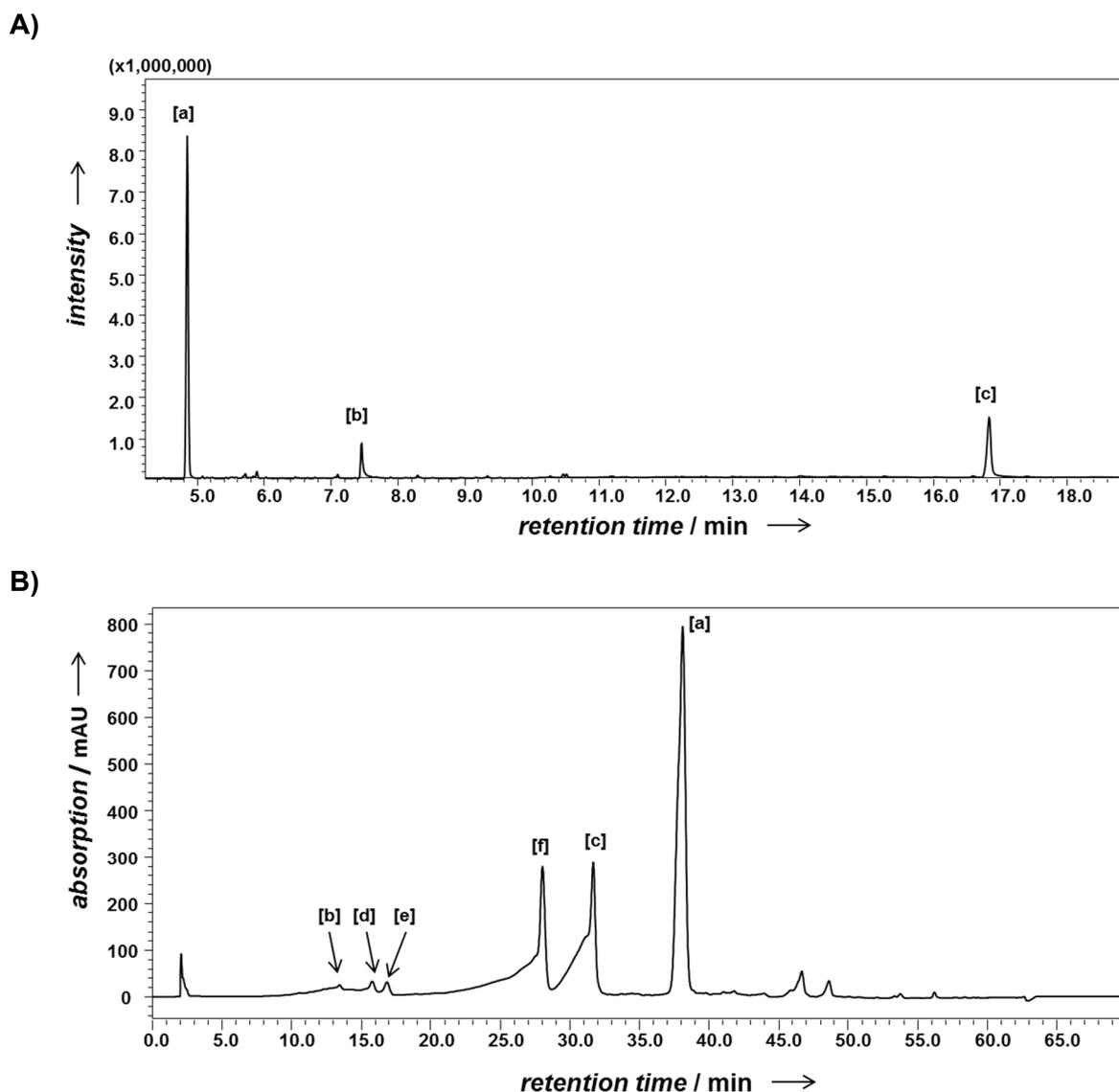


Figure S7. Analysis of the semi-preparative scale conversion from eugenol **1** in the cascade process combining PsVAO and CgL1. **(A)** GC/MS chromatogram, **(B)** HPLC chromatogram at 205 nm. Peak numbers: **[a]** = eugenol, **[b]** = coniferyl alcohol, **[c]** = (\pm)-pinoresinol, **[d,e]** = (\pm)-*erythro/threo*-guaiacylglycerol 8-O-4'-coniferyl alcohol ether, **[f]** = (\pm)-dehydroconiferyl alcohol.

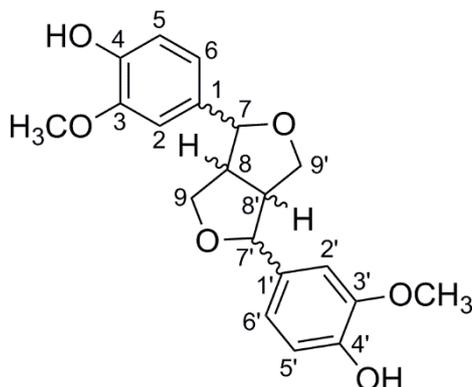
Peaks **[d]**, **[e]** and **[f]** were purified, and HR/MS enabled to assign them as dimers of coniferyl alcohol (Table S4). In previously published studies these products were identified as (\pm)-*erythro/threo*-guaiacylglycerol, 8-O-4'-coniferyl alcohol ether and (\pm)-dehydroconiferyl alcohol (Table S4).^[5] The appearance of these products can be attributed to the reaction mechanism of laccases producing radicals of the monomer that can undergo different resonance stabilization and consequently allow multiple forms of dimerization.

Table S4. Results of HR/MS of formed products. HR/MS acquisition parameters: (ESI, neg.) m/z calculated for [M-H]⁻.

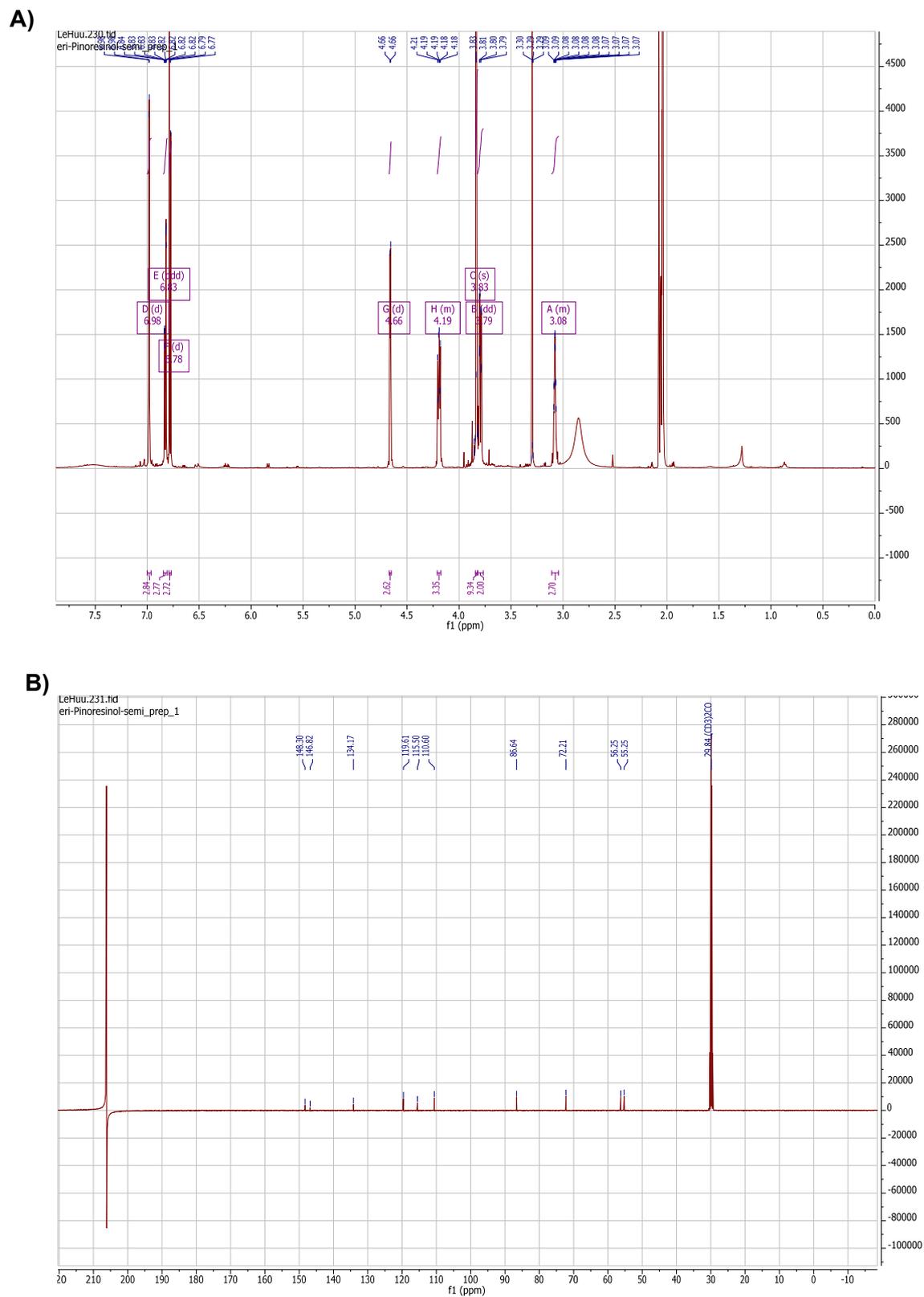
Peak	Meas. m/z	Ion Formula	m/z	err [ppm]	Product
c	357.1343	C ₂₀ H ₂₁ O ₆	357.1344	0.1 ppm	(±)-pinoresinol
d	375.1445	C ₂₀ H ₂₃ O ₇	375.1449	-1.2 ppm	(±)- <i>erythro</i> / <i>threo</i> -guaiacylglycerol 8-O-4'-coniferyl alcohol ether
e	375.1442	C ₂₀ H ₂₃ O ₇	375.1449	-1.8 ppm	(±)- <i>erythro</i> / <i>threo</i> -guaiacylglycerol 8-O-4'-coniferyl alcohol ether
f	357.1341	C ₂₀ H ₂₁ O ₆	357.1344	-0.7 ppm	(±)-dehydroconiferyl alcohol

2.3.2 NMR analysis of pinoresinol

(±)-Pinoresinol **3**: Reaction of 102.5 mg (25 mM, 0.625 mmol) eugenol with 10 mU mL⁻¹ PsVAO and 50 mU mL⁻¹ CgL1 in 25 mL 50 mM KPi (pH 7.5) afforded 13 mg pinoresinol (isolated yield 13 %) as pale yellow oil.



¹H NMR (600 MHz, CD₃COCD₃): δ = 6.98 (d, ⁴J (H_{2,2'},H_{6,6'}) = 1.9 Hz, 2H; 2,2'-H), 6.83 (ddd, ³J (H_{5,5'},H_{6,6'}) = 8.1, ⁴J (H_{2,2'},H_{6,6'}) = 2.0 Hz, ⁴J (H_{6,6'},H_{7,7'}) = 0.7 Hz, 2H; 6,6'-H), 6.78 (d, ³J (H_{5,5'},H_{6,6'}) = 8.1 Hz, 2H, 5,5'-H), 4.66 (d, ³J (H_{7,7'},H_{8,8'}) = 4.0 Hz, 2H; 7,7'-H), 4.21-4.18 (m, 2H; 9,9'-H), 3.83 (s, 6H; 3,3'-OCH₃), 3.79 (dd, ³J (H_{8,8'},H_{9,9'}) = 9.1, ⁴J (H_{7,7'},H_{9,9'}) = 3.8 Hz, 2H, 9,9'-H), 3.11-3.04 (m, 2H, 8,8'-H); ¹³C NMR (151 MHz, CD₃OCD₃): δ = 148.30 (C-3,3'), 146.82 (C-4,4'), 134.17 (C-1,1'), 119.61 (C-6,6'), 115.50 (C-5,5'), 110.60 (C-2,2'), 86.64 (C-7,7'), 72.21 (C-9,9'), 56.25(3,3'-OCH₃), 55.25 (C-8,8'); HR/MS (ESI, neg.) calculated for C₂₀H₂₁O₆ [M-H]⁻ m/z: 357.1344, found: 357.1343.



References (to supporting information; chapter 2.3.2.)

- [1] E. Ricklefs, N. Winkler, K. Koschorreck, V. B. Urlacher, *J. Biotechnol.*, **2014**, *191*, 46-53
- [2] K. Koschorreck, R. D. Schmid, V. B. Urlacher, *BMC Biotechnol.*, **2009**, *9*, 12
- [3] M. Gunne, V. B. Urlacher, *PLoS ONE* **2012**, *7*, e52360
- [4] Newlandè von Rooyen, PhD thesis, University of the Free State, Bloemfontein 9300, **2012**.
- [5] B. Pickel, M.-A. Constantin, J. Pfannstiel, J. Conrad, U. Beifuss, A. Schaller, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 207-209; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 202-204

2.4. Manuskript 3: Synthesis of enantiopure pinoresinol

2.4.1. Manuskript

Titel: Three-steps in one-pot: whole-cell biocatalytic synthesis of enantiopure (+)- and (-)-pinoresinol via kinetic resolution

Autoren: Esther Ricklefs, Marco Girhard, Vlada B. Urlacher

Publiziert in: *Microbial Cell Factories*, **2016**, 15:78

Beitrag: Gesamte experimentelle Arbeit, Schreiben des Manuskripts

Bemerkung: Dieser Artikel ist ein Artikel mit öffentlichem Zugang und unterliegt den Bedingungen der *Creative Commons Attribution 4.0 International License* (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Das Originalmanuskript kann unter folgender URL eingesehen werden: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-016-0472-0>

RESEARCH

Open Access



Three-steps in one-pot: whole-cell biocatalytic synthesis of enantiopure (+)- and (–)-pinosresinol via kinetic resolution

Esther Ricklefs, Marco Girhard and Vlada B. Urlacher*

Abstract

Background: Pinosresinol is a high-value plant-derived lignan with multiple health supporting effects. Enantiomerically pure pinosresinol can be isolated from natural sources, but with low efficiency. Most chemical and biocatalytic approaches that have been described for the synthesis of pinosresinol furnish the racemic mixture. In this study we devised a three-step biocatalytic cascade for the production of enantiomerically pure pinosresinol from the cheap compound eugenol. Two consecutive oxidations of eugenol through vanillyl-alcohol oxidase and laccase are followed by kinetic resolution of racemic pinosresinol by enantiospecific pinosresinol reductases.

Results: The addition of the enantiospecific pinosresinol reductase from *Arabidopsis thaliana* for kinetic resolution of (±)-pinosresinol to an in vitro cascade involving the vanillyl-alcohol oxidase from *Penicillium simplicissimum* and the bacterial laccase CgL1 from *Corynebacterium glutamicum* resulted in increasing ee values for (+)-pinosresinol; however, an ee value of 34 % was achieved in the best case. The ee value could be increased up to ≥99 % by applying *Escherichia coli*-based whole-cell biocatalysts. The optimized process operated in a one-pot “two-cell” sequential mode and yielded 876 μM (+)-pinosresinol with an ee value of 98 %. Switching the reductase to the enantiospecific pinosresinol lariciresinol reductase from *Forsythia intermedia* enabled the production of 610 μM (–)-pinosresinol with an ee value of 97 %.

Conclusion: A new approach for the synthesis of enantiomerically pure (+)- and (–)-pinosresinol is described that combines three biotransformation steps in one pot. By switching the reductase in the last step, the whole-cell biocatalysts can be directed to produce either (+)- or (–)-pinosresinol. The products of the reductases’ activity, (–)-lariciresinol and (–)-secoisolariciresinol, are valuable precursors that can also be applied for the synthesis of further lignans.

Keywords: Laccase, Vanillyl-alcohol oxidase, Pinosresinol reductase, Pinosresinol lariciresinol reductase, Eugenol, Coniferyl alcohol, Pinosresinol, Lignan, Biocatalysis, Kinetic resolution

Background

The phytoestrogen pinosresinol **3** consists of two monolignol units and belongs to the class of lignans. Multiple health supporting effects of pinosresinol **3** have been reported including prevention and/or treatment of cancer [1–3], hyperglycaemia [4], HIV [3], skin-pigmentation [5], microvascular damage [6], and fungal infections [7]. Besides that, pinosresinol **3** is a precursor of the mammalian lignans enterodiol and enterolactone, for which

health supporting effects were also reported [8–10]. Additionally, pinosresinol **3** can be used as antifungal agent for the treatment of *Fusarium* head blight causing high mycotoxin levels in wheat [11].

Currently, pinosresinol **3** is mainly isolated from seeds, fruits, and vegetables with low efficiency, but sometimes with high enantiopurity [12–14]. For example, 15 kg perisperm of *Sesamum indicum* are required for isolation of 162 mg enantiopure (+)-pinosresinol **3a**, or 114 g *Daphne odora* for 20.6 mg (–)-pinosresinol **3b** [12, 14].

Additionally, a number of chemical and enzymatic approaches for the synthesis of (±)-pinosresinol **3** have

*Correspondence: vlada.urlacher@uni-duesseldorf.de
Institute of Biochemistry, Heinrich-Heine University, Universitätsstraße 1,
40225 Düsseldorf, Germany

been described. Generally, these synthetic approaches start from simple and abundant low-value compounds (for example methyl acetoacetate), but require multiple steps and intensive work-up [15]. Alternatively, the number of required steps can be reduced by the use of more complex, but rare and expensive starting compounds (for example coniferyl alcohol **2**) [16]. The absence of an inexpensive production process and the large number of potential applications make pinoresinol **3** a high-value compound with growing interest from an economic point of view.

Recently, we have described an in vitro two-step one-pot biocatalytic route for the synthesis of (\pm)-pinoresinol **3** starting from the inexpensive substrate eugenol **1** [17]. This one-pot cascade combines the vanillyl-alcohol oxidase from *Penicillium simplicissimum* (PsVAO) that converts eugenol **1** into the intermediate coniferyl alcohol **2** and a bacterial laccase for oxidation of coniferyl alcohol **2** leading to (\pm)-pinoresinol **3**. The best results were achieved with the laccase CgL1 from *Corynebacterium glutamicum*. In the present study we describe the implementation of this cascade into whole-cell biocatalysts and the addition of a third enzymatic step allowing the synthesis of enantiopure (+)-pinoresinol **3a** or (-)-pinoresinol **3b**.

Generally, two strategies are possible for the production of enantiopure pinoresinol **3**: (1) Addition of a dirigent protein, or (2) kinetic resolution of (\pm)-pinoresinol **3**. Lewis and colleagues demonstrated that dirigent proteins are responsible for enantioselective production of pinoresinol **3** in plants [18, 19]. The mechanism of their action has not been elucidated in detail yet, but it is assumed that dirigent proteins capture the radicals of oxidized coniferyl alcohol **2** and give them a defined orientation for coupling [20]. Therefore, the application of dirigent proteins for selective oxidative phenol coupling seems attractive, but is hampered by the fact that the expression levels achieved in recombinant hosts (e.g. *Pichia pastoris*, *Solanum peruvianum*, *Drosophila melanogaster*) are very low [21–23] and that their isolation from natural sources is not feasible [24, 25]. Furthermore, it has been described that the addition of dirigent proteins to in vitro reactions for the synthesis of (+)-pinoresinol **3a** from coniferyl alcohol **2** leads to improved ee values of maximum ~86 % [22, 23, 26].

We decided to use an enantiospecific enzyme for kinetic resolution of (\pm)-pinoresinol **3**. Pinoresinol reductases (PrR) and pinoresinol lariciresinol reductases (PLR) are NADPH-dependent enzymes capable of reducing pinoresinol **3** to lariciresinol **4** [27, 28]. In a second step PLR can further reduce lariciresinol **4** to secoisolariciresinol **5** [27]. Both, lariciresinol **4** and secoisolariciresinol **5**, are high-value compounds. Almost all

PrRs and PLRs characterized so far originate from plants [27–32], except two PrRs that were discovered in sphingomonads [33]. Some PrRs and PLRs were reported to display enantioselectivity: PrR from *Arabidopsis thaliana* (NCBI Reference Sequence: NP_193102.1; AtPrR2) converts preferably (-)-pinoresinol **3b** to (-)-lariciresinol **4b** [28], while PLR from *Forsythia intermedia* (GenBank AAC49608; FiPLR) reduces preferably (+)-pinoresinol **3a** to (+)-lariciresinol **4a** [and further to (-)-secoisolariciresinol **5a**] [27]. In this work we investigated the potential of kinetic resolution for the enrichment of enantiopure (+)-pinoresinol **3a** by AtPrR2 and (-)-pinoresinol **3b** by FiPLR. This step was incorporated into a one-pot three-step synthesis starting from the inexpensive substrate eugenol **1** (Scheme 1).

Results and discussion

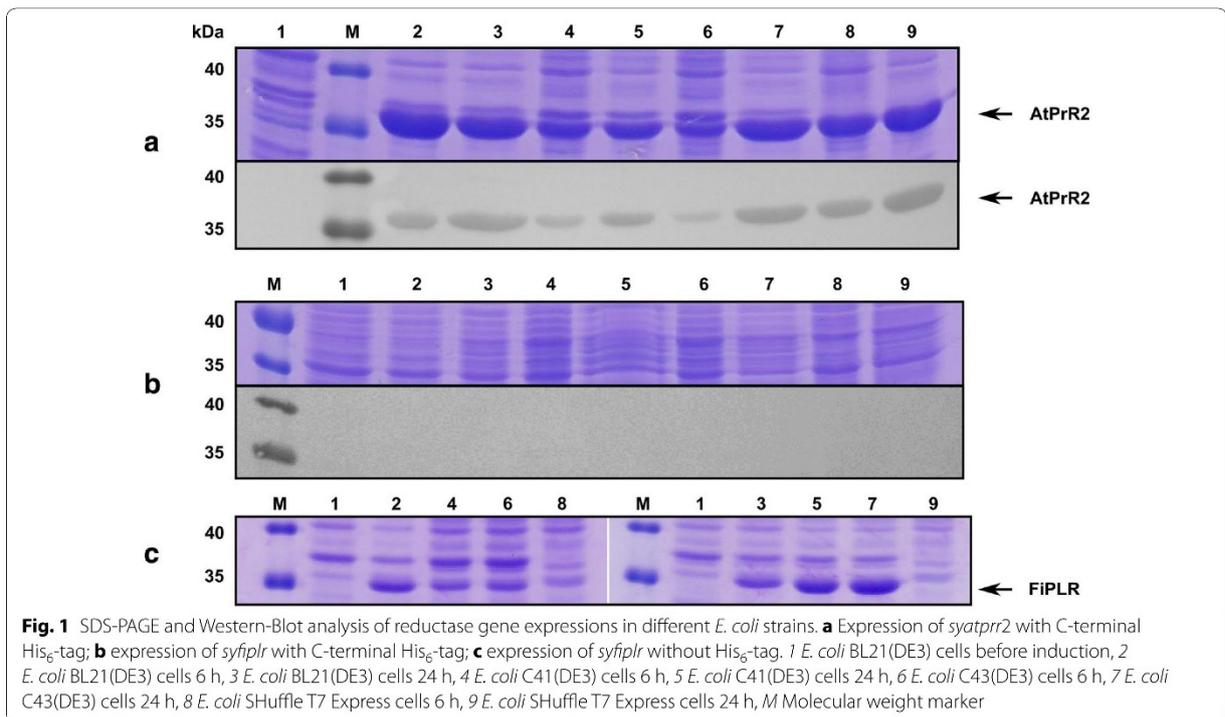
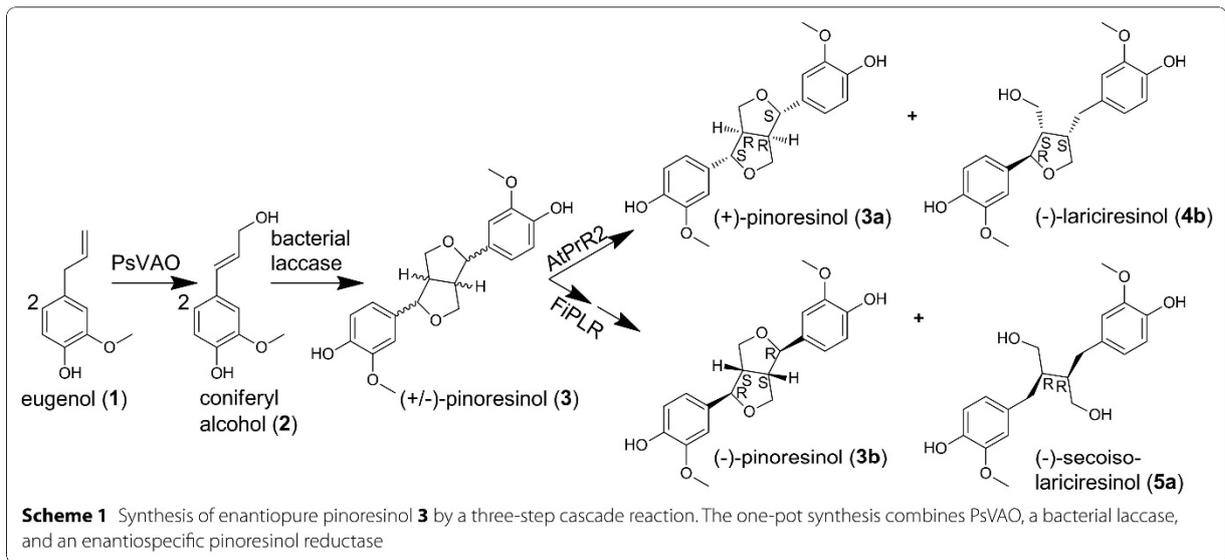
Expression of reductases

The genes *syatprrr2* and *syfiplr* coding for the reductases AtPrR2 and FiPLR, respectively, were cloned and expressed in recombinant *Escherichia coli*. In order to achieve high expression levels of the reductases, codon optimized genes (see Additional file 1) were used, and the expression in several *E. coli* strains was compared (Fig. 1).

SDS-PAGE and Western-Blot revealed that both reductases could be expressed in a soluble form (Fig. 1). Activity assays with pinoresinol **3** (see “Methods” section) demonstrated that the highest conversions were achieved when the soluble protein fractions (cleared cell lysates) after the heterologous expressions of AtPrR2 and FiPLR in *E. coli* strains C41(DE3) or C43(DE3) were deployed (see Additional file 2).

In vitro one-pot three-step cascade reaction for the synthesis of enantiopure pinoresinol

In a first trial to synthesize enantiopure pinoresinol **3**, the vanillyl-alcohol oxidase PsVAO and the bacterial laccase CgL1 used in the previously established one-pot cascade were combined with AtPrR2 from *A. thaliana* and tested in vitro under the conditions best suited for the first two bioconversion steps [17]. Unexpectedly, no reduction of (-)-pinoresinol **3b** to (-)-lariciresinol **4b** was observed under these conditions (ee = 0 %; data not shown). Also a sequential reaction set-up (addition of AtPrR2 to the PsVAO-CgL1 cascade after 22 h) resulted only in a minor conversion of (-)-pinoresinol **3b**; the achieved ee value of the remaining (+)-pinoresinol **3a** was 34 %. A prolonged reaction time did not lead to increased ee values. As *tert*-butylmethylester (*t*BME) was added to the previously established PsVAO-CgL1 cascade to enhance the yield of (\pm)-pinoresinol **3**, we supposed that this organic solvent could negatively affect AtPrR2 activity. Indeed, when we set up the activity assay for conversion of pinoresinol **3** by



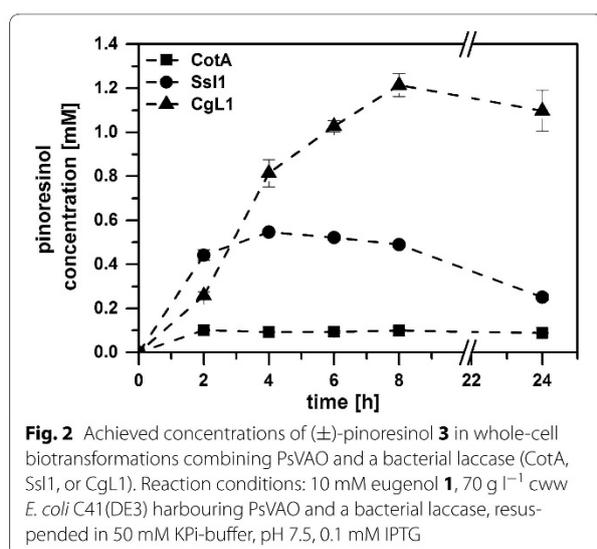
AtPrR2 in the presence of *t*BME, the pinosresinol **3** conversion was decreased (53 % with *t*BME vs 98 % without *t*BME), which allows the assumption that AtPrR2 is not stable in the presence of this organic solvent. In addition, it was found that the presence of eugenol **1** also

negatively affects the conversion of pinosresinol **3** by AtPrR2 (only 60 % conversion). Obviously, the use of the selected isolated enzymes in an in vitro one-pot mode is not suitable to achieve high enantiopurity of pinosresinol **3**.

Laccase screening for establishment of whole-cell biocatalysts

Based on these results, in the next set of experiments the focus was shifted to the design of whole-cell biocatalysts. Besides enhancing enzyme stability, whole cells provide the advantage that the cofactor for the NADPH-dependent reductases is regenerated through the cell metabolism. For the construction of *E. coli* whole-cell biocatalysts, the strain C41(DE3) was chosen due to the high expression levels (and thus resulting in high activities) of AtPrR2 and FiPLR (Additional file 2), as well as PsVAO (data not shown).

Our previous results demonstrated that an adjustment of PsVAO and bacterial laccase activities was essential for increasing the yield of (\pm)-pinoresinol **3** in vitro [17]. Therefore, in a first step, the most suitable laccase for the conversion of coniferyl alcohol **2** in the in vivo process had to be identified. Resting *E. coli* cells expressing PsVAO and one of the three bacterial laccases (CotA from *Bacillus licheniformis*, Ssl1 from *Streptomyces sviveus* or CgL1 from *Corynebacterium glutamicum*) were tested for the conversion of 10 mM eugenol **1** to (\pm)-pinoresinol **3**. For the co-expression of PsVAO and CotA almost no formation of (\pm)-pinoresinol **3** was observed, although eugenol **1** and the intermediate coniferyl alcohol **2** were converted completely. During co-expression of PsVAO and Ssl1 the formation of (\pm)-pinoresinol **3** reached 550 μ M after 4 h and decreased thereafter. The highest yield of (\pm)-pinoresinol **3** of 1.2 mM was achieved with *E. coli* cells co-expressing PsVAO and CgL1 (Fig. 2). The low yields of (\pm)-pinoresinol **3** in the reactions containing CotA or Ssl1 can presumably be explained by the further oxidation of (\pm)-pinoresinol **3** by these laccases [17].



Higher expression levels of CotA (3400 mU ml⁻¹) and Ssl1 (900 mU ml⁻¹) compared to CgL1 (177 mU ml⁻¹), as well as higher redox potentials of CotA and Ssl1 result in faster oxidation of (\pm)-pinoresinol **3** [17].

In vivo one-pot “one-cell” cascade reaction for the synthesis of enantiopure (+)-pinoresinol

In a first trial all enzymes (PsVAO, CgL1, and AtPrR2) were co-expressed in the *E. coli* strain C41(DE3) to furnish enantiopure (+)-pinoresinol **3a** by a whole-cell biocatalyst. The cells were harvested after enzyme expression, resuspended in 50 mM potassium phosphate (KPi)-buffer, pH 7.5, and supplemented with eugenol **1**. The addition of 1 mM or 2.5 mM eugenol **1** yielded (+)-pinoresinol **3a** with ee values of 74 and 88 %, respectively (Table 1, entries 1, 2), whereas with 10 mM of eugenol **1** the ee value reached only 4 % (Table 1, entry 3). In search of an explanation for the decreased ee value at a high concentration of eugenol **1**, it was found that eugenol **1** had previously been described to be toxic for *E. coli* [34, 35]. Indeed, cell growth analysis in the presence of different concentrations of eugenol **1** (1, 2.5, 5, or 10 mM) revealed that concentrations of eugenol **1** above 5 mM were highly toxic (no further cell growth was observed; see Additional file 3). The addition of 2.5 mM eugenol **1** reduced cell growth by about 70 %, whereas 1 mM eugenol **1** had the slightest effect on cell growth (25 % reduced OD₆₀₀ compared to control reaction without eugenol **1**). In addition, cell viability tests with resting *E. coli* cells revealed that eugenol **1** concentrations of 10 mM were highly toxic and led to cell lysis (Fig. 3). Upon cell lysis AtPrR2 gets exposed to high concentrations of eugenol **1** and additionally the cofactor regeneration by the cell metabolism is no longer assured, which presumably explains the loss of its function.

To circumvent the limitation of substrate toxicity, a step-wise addition of eugenol **1** was applied to the “one-cell” system with resting *E. coli* cells harbouring all three enzymes (PsVAO, CgL1, and AtPrR2) (Fig. 4a). The cells were first supplemented with low concentrations of eugenol **1** (1 or 2.5 mM) and incubated for 1 h. After that, doses of 1 or 2.5 mM of eugenol **1** were added every 1 h for a time period of 9 h. Compared to the initial experiments with 10 mM of eugenol **1** added at once, the ee value could be increased up to 37 % (Table 1, entries 4, 5). A slower addition of 1 mM eugenol **1** every 2 h (Table 1, entry 6) or every 4 h (Table 1, entry 7) resulted in ee values of 44 and ≥ 99 %, respectively, but the concentrations of (+)-pinoresinol **3a** achieved were lower (190 and 63 μ M, respectively). In all cases, the obtained ee values were in accordance with the observed cell viability; they were increasing with increasing viability of the cells, which points out the importance that intact cells are required in order to achieve high AtPrR2 activity.

Table 1 Concentrations of pinosresinol **3** and corresponding ee values achieved in the three-step one-pot system

Entry	Added concentration of 1 ^a	Addition of	Concentration of 3 (μM)	ee value (%)
1	1 × 1 mM ^b	–	6 ± 5	74 [(+)- 3a]
2	1 × 2.5 mM ^b	–	32 ± 8	88 [(+)- 3a]
3	1 × 10 mM ^b	–	995 ± 119	4 [(+)- 3a]
4	10 × 2.5 mM ^b	1 every 1 h	2730 ± 10	25 [(+)- 3a]
5	10 × 1 mM ^b	1 every 1 h	1030 ± 70	37 [(+)- 3a]
6	5 × 1 mM ^b	1 every 2 h	190 ± 20	44 [(+)- 3a]
7	3 × 1 mM ^b	1 every 4 h	63 ± 9	≥99 [(+)- 3a]
8	1 × 10 mM ^{c,d}	–	1472 ± 16	1 [(+)- 3a]
9	1 × 10 mM ^{c,e}	C41 _{AtPrR2}	822 ± 44	97 [(+)- 3a]
10	1 × 10 mM ^{c,f}	C41 _{AtPrR2}	876 ± 21	98 [(+)- 3a]
11	1 × 10 mM ^{c,g}	C41 _{FIPLR}	610 ± 19	97 [(–)- 3b]
12	1 × 10 mM ^{c,e}	C41 _{FIPLR}	456 ± 19	95 [(–)- 3b]
13	1 × 10 mM ^{c,h}	C41 _{FIPLR}	434 ± 40	92 [(–)- 3b]

All reaction conditions tested yielded 100 % conversion of eugenol **1**

^a Reaction conditions: reaction buffer (50 mM KPi-buffer, pH 7.5, 100 μM IPTG), 2 % (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO), concentrations of eugenol **1** as indicated. Reactions were carried out for 24 h at 25 °C, 140 rpm

^b Recombinant *E. coli* C41(DE3) harbouring PsVAO, CgL1, and AtPrR2 resuspended in 10 ml reaction buffer with an adjusted cell wet weight (cww) of 70 g l⁻¹

^c Recombinant *E. coli* C41(DE3) harbouring PsVAO and CgL1 resuspended in 10 ml reaction buffer with 20 g l⁻¹ D-glucose (cww adjusted to 70 g l⁻¹)

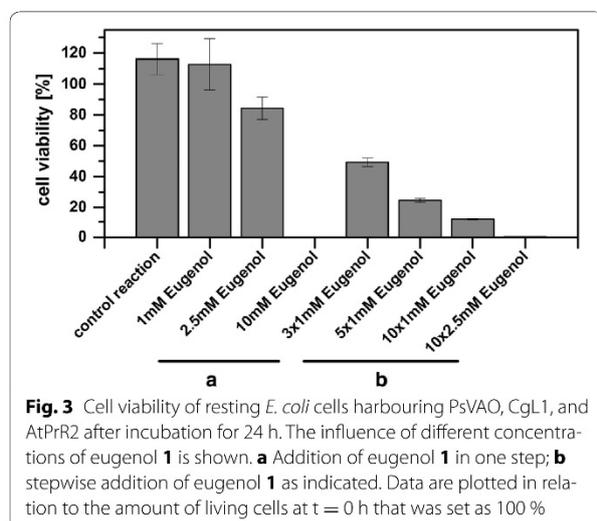
^d Without addition of recombinant *E. coli* cells harbouring AtPrR2 or FIPLR

^e Addition of recombinant *E. coli* cells harbouring AtPrR2 or FIPLR resuspended in 10 ml reaction buffer with 20 g l⁻¹ D-glucose (cww adjusted to 70 g l⁻¹) after 24 h; further incubation for 4 h

^f As reaction e, but further incubation for 8 h

^g As reaction e, but further incubation for 2 h

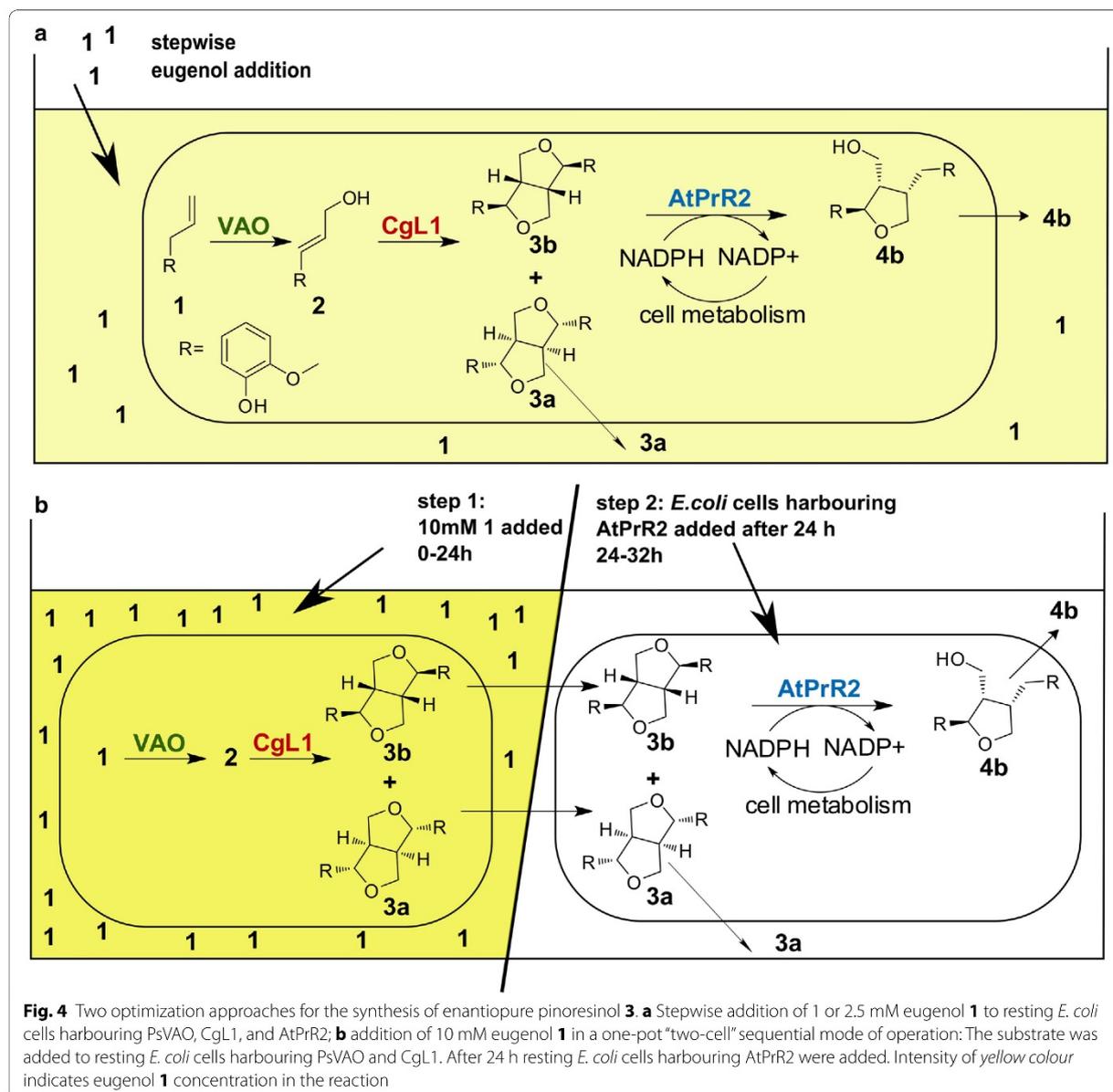
^h As reaction e, but further incubation for 6 h



We observed that during the course of the reaction, formation of a side product occurred that we identified as coniferyl aldehyde **6**. This side reaction could not be attributed to any of the enzymes of the cascade. To understand the origin of coniferyl aldehyde **6**, control reactions were

performed with resting *E. coli* cells that did not express heterologous enzymes but were supplemented with eugenol **1**, coniferyl alcohol **2**, or pinosresinol **3**. While no conversion of eugenol **1** and pinosresinol **3** was seen, coniferyl alcohol **2** was oxidized by the *E. coli* cells to coniferyl aldehyde **6**. Presumably, coniferyl alcohol **2** is used to regenerate NADPH due to a shifted NADPH/NADP⁺ equilibrium towards NADP⁺ within the cell. To prove this hypothesis, either 25 g l⁻¹ glycerol or 20 g l⁻¹ D-glucose were added to *E. coli* cells harbouring PsVAO and CgL1 as an energy source to ensure higher NADPH concentrations. As expected, conversion of 2.5 mM eugenol **1** with addition of glycerol or D-glucose resulted in higher concentrations of (±)-pinosresinol **3** (351 and 375 μM, compared to 153 μM; Table 2) and reduced coniferyl aldehyde **6** formation (see Additional file 4).

When the same reaction set-up was assigned to *E. coli* cells harbouring PsVAO, CgL1, and AtPrR2, similar amounts of (±)-pinosresinol **3** were detected (308 and 402 μM), but unexpectedly no conversion of (–)-pinosresinol **3b** to (–)-lariciresinol **4b** was obtained (ee % = 2 and 0; Table 2). We speculate that due to reduced formation of coniferyl aldehyde **6** under these conditions the accumulation of higher concentrations of coniferyl alcohol **2** could either be toxic for the cells and/or negatively



affect the activity of AtPrR2 (as was observed for eugenol **1**), but this was not investigated in detail.

In vivo one-pot “two-cell” sequential cascade reaction for the synthesis of enantiopure (+)-pinoresinol

Because of the correlation between cell viability and AtPrR2 activity, and the observation that higher concentrations of (±)-pinoresinol **3** were achieved in the presence of D-glucose, we decided to separate the kinetic resolution step of (±)-pinoresinol **3** from its production step. The one-pot approach was set up in a sequential mode of operation

(Fig. 4b) as follows: High concentrations of eugenol **1** were added to a first set of resting *E. coli* cells harbouring PsVAO and CgL1, but not AtPrR2. The first two biocatalytic steps of this cascade are independent of cofactors, and PsVAO and CgL1 are stable in the presence of high concentrations of eugenol **1**; therefore cell lysis due to substrate toxicity does not affect the production of (±)-pinoresinol **3**. After 24 h freshly prepared resting *E. coli* cells harbouring AtPrR2 were added to the reaction and continued for additional 4–8 h. Under these conditions, at 10 mM of eugenol **1**, up to 876 μM (+)-pinoresinol **3a** with an ee value of 98 %

Table 2 Achieved concentration of pinoresinol **3** and ee values for (+)-**3a** in the one-pot “one-cell” set-up depending on the energy source added

<i>E. coli</i> cell	Energy source	Concentration of 3 (μM)	ee value of $\pm 3\text{a}$ (%)
C41(DE3) harbouring PsVAO and CgL1	None added	153 \pm 40.7	4
	25 g l ⁻¹ glycerol	351 \pm 27	8
	20 g l ⁻¹ D-glucose	375 \pm 17	5
C41(DE3) harbouring PsVAO and CgL1 and AtPrR2	None added	42 \pm 3	≥ 99
	25 g l ⁻¹ glycerol	308 \pm 29	2
	20 g l ⁻¹ D-glucose	402 \pm 28	0

All reactions yielded 100 % conversion of eugenol **1**

Reaction conditions: recombinant *E. coli* cells resuspended in 10 ml 50 mM KPi-buffer, pH 7.5, 100 μM IPTG ($c_{\text{ww}} = 70 \text{ g l}^{-1}$); 2 % (v/v) DMSO; 2.5 mM of eugenol **1**. Reactions were carried out for 24 h at 25 °C, 140 rpm

were gained (Table 1, entries 9, 10). The maximal theoretical molar yield of enantiopure pinoresinol **3** starting from eugenol **1** is 25 %. In comparison, we achieved 8.8 % which corresponds to one third of the maximal yield. This difference can be explained through side product formation due to the radical reaction mechanism of laccases, as described previously [17, 23]. As a consequence, 1472 μM (\pm)-pinoresinol **3** were achieved starting from 10 mM eugenol **1** at almost complete conversion of substrate **1** and intermediate **2**.

Encouraged by these results an upscaling experiment was performed: 160 mg eugenol **1** (10 mM, 0.98 mmol) were added to 100 ml resting *E. coli* cells harbouring PsVAO and CgL1 (resuspended in reaction buffer; see “Methods” section). After 24 h 100 ml resting *E. coli* cells harbouring AtPrR2 were added and the reaction was continued for additional 4 h. Enantiopure (+)-pinoresinol **3a** (see Additional file 5A) and (–)-lariciresinol **4b** (which is not commercially available) were purified from the reaction, and isolated yields of 12 % (19 mg) and 11 % (18 mg) were achieved, respectively.

In vivo one-pot “two-cell” sequential cascade reaction for the synthesis of enantiopure (–)-pinoresinol

Besides the production of (+)-pinoresinol **3a**, we investigated the potential of the one-pot “two-cell” system for the production of enantiopure (–)-pinoresinol **3b**. This compound is not commercially available and its effective production is particularly attractive. *E. coli* cells harbouring FiPLR from *F. intermedia* with an opposite enantioselectivity to AtPrR2 were applied for the kinetic resolution step. Utilizing this set-up under the established reaction conditions, the concentrations of (–)-pinoresinol **3b** achieved 610 μM with an ee value of 97 % (Table 1, entries 11–13), which is in a similar range compared to the system producing (+)-pinoresinol **3a**. Moreover, the high-value compound (–)-secoisolariciresinol **5a** was

formed with an ee value of ≥ 99 % through the further oxidation of (+)-lariciresinol **4a** by FiPLR (see Additional file 5B).

Conclusions

Within this study, we demonstrated that the three-step cascade including a kinetic resolution step is a powerful approach for the synthesis of enantiopure pinoresinol **3** starting from the inexpensive substrate eugenol **1**. A sequentially operating one-pot “two-cell” process is preferable to a simultaneous one-pot “one-cell” mode of operation. It was demonstrated that the process could easily be switched from production of enantiopure (+)-pinoresinol **3a** to enantiopure (–)-pinoresinol **3b** by choosing a plant reductase with opposite enantioselectivity.

In addition, the high-value compound (–)-lariciresinol **4b** was isolated in enantiopure form, and the formation of enantiopure (–)-secoisolariciresinol **5a** was demonstrated. This enables the development of biocatalytic systems for the production of lariciresinol **4** and secoisolariciresinol **5** that can serve as building blocks for the production of other lignans.

Methods

Enzymes and chemicals

Pinoresinol **3** (≥ 95 %, SML0073; mixture composed of 61 % **3a** and 39 % **3b**), (+)-lariciresinol **4a** (≥ 95 %, 06892), and secoisolariciresinol **5** (≥ 95 %, 60,372) were obtained in HPLC grade from Sigma-Aldrich. All other chemicals were purchased in an analytical or higher grade from Sigma-Aldrich, Alfa Aesar, or Merck. LC/MS grade solvents were from Sigma-Aldrich (water) and Fisher Scientific (formic acid and methanol). HPLC grade solvents were obtained from Carl Roth (*n*-heptane), Th. Geyer (*n*-hexane), and Sigma-Aldrich (ethanol). Enzymes for molecular biology (DNA-polymerase, restriction endonucleases, T4-DNA-ligase) were acquired from Thermo Scientific. “Anti-His₆-Peroxidase (2)” and the “BM Blue POD Substrate (precipitating)” from Roche were used for Western-Blot analysis.

Synthetic genes and molecular biology

Synthetic genes

Synthetic genes *syatprrr2* and *syfiplr* (see Additional file 1) were ordered codon optimized for *E. coli* from Eurofins MWG Operon. A C-terminal hexa-histidine tag (His₆-tag) was added to the sequence of *syfiplr*.

Cloning of reductase genes

The genes *syatprrr2* and *syfiplr* were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the synthetic genes as template and the oligonucleotide sequences (Eurofins

Table 3 Oligonucleotides used for polymerase chain reaction

Gene	Oligonucleotide	
	Name	Sequence
<i>syatpr2</i> (with His ₆ -tag)	<i>syatpr2_tag_fw</i>	5'-GGGTTT <u>CATAT</u> GAAAGAGACTAACTTCGGCG-3'
	<i>syatpr2_tag_rev</i>	5'-CCGCTC <u>GAGTCA</u> GTGGTGATGATGGTGATG ACCGCCGACGAAAATTTTCAG-3'
<i>syfiplr</i> (with His ₆ -tag)	<i>syfiplr_tag_fw</i>	5'-GGGTTT <u>CATAT</u> GGGCAAATCCAAAGTTCTG-3'
	<i>syfiplr_tag_rev</i>	5'-CCGCTC <u>GAGTCA</u> GAGTGGTGATGATGG-3'
<i>syfiplr</i> (no tag)	<i>syfiplr_fw</i>	5'-GGGTTT <u>CATAT</u> GGGCAAATCCAAAGTTCTG-3'
	<i>syfiplr_rev</i>	5'-CCGCTC <u>GAGTCA</u> AAACATAGCGTTTAAGGTATTCTTCAAC-3'

MWG Operon) listed in Table 3. The restriction sites of the endonucleases *NdeI* and *XhoI* are underlined, and the His₆-tag sequence is marked in bold.

The amplified DNA fragments and the plasmid pCDF-Duet were cut with *NdeI* and *XhoI* and ligated by T4-DNA-ligase resulting in the expression plasmids pCDF-Duet_ *syatpr2_his₆*, pCDF-Duet_ *syfiplr_his₆*, and pCDF-Duet_ *syfiplr*. Correct insertion was verified by Sanger DNA sequencing (GATC Biotech).

Cloning of *psvao* and co-expression plasmids

For whole-cell biotransformations different plasmids for the co-expression of certain genes were produced (see Additional file 1): (1) pACYC_{tac}-*psvao*, (2) pCDF-Duet-*psvao_syatpr2_his₆*, (3) pCDF-Duet-*psvao_syfiplr*.

First, the gene *psvao* was inserted into the plasmid pACYC_{tac} (kindly provided by Dr. Natalie Trachtmann, Institute of Microbiology, University of Stuttgart). Amplification by PCR took place using pET28b-*psvao* [17] as template and the oligonucleotides 5'-AACGAGCTCGATGTCCAAGACACAGG-3' and 5'-CCCAAGCTTGGTTTACAGTTTCC-3'. Restriction of the amplified DNA fragments and pACYC_{tac} was done with the restriction endonucleases *SacI* and *HindIII*.

Next, *psvao* was also cloned upstream of reductase genes into the first multiple cloning site (MCS) of the pCDF-Duet-based expression plasmids generated before. *Psvao* was cut out of pACYC_{tac}-*psvao* with *SacI* and *HindIII* and ligated into the plasmids pCDF-Duet_ *syatpr2_his₆* or pCDF-Duet_ *syfiplr*. After ligation the resulting plasmids were confirmed by Sanger DNA sequencing (GATC Biotech).

Heterologous expression in *E. coli*

For heterologous expression of genes (*syatpr2*, *syfiplr*, *psvao*) different *E. coli* strains were tested: BL21(DE3), OverExpress C41(DE3), OverExpress C43(DE3), and Shuffle T7 Express. 5 ml LB medium supplemented with 50 µg ml⁻¹ streptomycin (*syatpr2*, *syfiplr*), or 34 µg ml⁻¹

chloramphenicol (*psvao*), were inoculated with a single colony and incubated over night at 37 °C, 180 rpm. Expression was performed in 50 ml TB-medium with the corresponding antibiotic inoculated with 500 µl of the pre-culture and incubated at 37 °C, 180 rpm to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.6. 0.5 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to the culture and thereafter incubated at 30 °C, 140 rpm for 21 h. The culture was harvested by centrifugation at 3200×g and resuspended in 5 ml 50 mM KPi-buffer, pH 7.5 with 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). Cell lysis was performed by sonication on ice, and cell debris was removed by centrifugation at 11,325×g for 20 min.

Expressions of the laccase gene *cgl1* from *Corynebacterium glutamicum* [36] and the glucose dehydrogenase (GDH) gene *gdhIV* from *Bacillus megaterium* [37] were performed as described previously.

Determination of enzymatic activities

Activity assay for reductases

The activities of the soluble protein fractions of reductase expressions were analysed towards pinoresinol **3** in a reaction volume of 500 µl. 50 µl soluble protein fraction was added to 200 µM pinoresinol **3** and 200 µM NADPH in 50 mM KPi-buffer, pH 7.5 and incubated at 25 °C for 16 h. Optionally, a cofactor regeneration system consisting of 20 mM D-glucose and 3 U ml⁻¹ GDH was added.

For LC/MS analysis 100 µM ferulic acid methyl ester [FSME; 5 mM stock solution in dimethyl sulfoxide (DMSO)] was added as internal standard and the reaction was extracted with 600 µl ethyl acetate. The organic phase was evaporated and the residue was resuspended in 100 µl methanol. Non-chiral LC/MS analysis was performed as described below.

The influence of eugenol **1** and *t*BME on the reductase activity was tested as follows: eugenol **1** (1, 2.5, or 10 mM) or 20 % (v/v) *t*BME were added to the established activity assay, and the reactions were performed and analysed by non-chiral LC/MS as described.

Activity assays for PsVAO and CgI1

The activities of PsVAO and CgI1 were determined as described previously [17].

In vitro one-pot three-step cascade reaction for the synthesis of enantiopure pinosresinol

The reaction for the synthesis of enantiopure (+)-pinosresinol **3a** was set up by addition of the reductase AtPrR2 to the previously established in vitro cascade reaction [17]. 1 mM eugenol **1** in 50 mM KPi-buffer, pH 7.5 was supplemented with 20 % (v/v) *t*BME, 10 mU ml⁻¹ PsVAO, 50 mU ml⁻¹ CgI1, 0.03 mU ml⁻¹ AtPrR2, 200 μM NADPH, 20 mM D-glucose, and 3 U ml⁻¹ GDH. Samples were incubated at 25 °C for 7.5 h in an overhead shaker (20 rpm).

For GC/MS analysis 100 μM FSME was added, and extraction was performed twice with 300 μl ethyl acetate. All samples were analysed by GC/MS and non-chiral LC/MS as described below.

Laccase screening

For whole-cell biotransformations of eugenol **1** combinations of PsVAO and different bacterial laccases (CotA, Ssl1, or CgI1) were analysed. *E. coli* OverExpress C41(DE3) was chosen due to high expression levels of the recombinant enzymes.

Competent C41(DE3) cells were co-transformed with the following plasmids: (1) pACYC_{tac}_psvao and pETK316 N/D500G, (2) pACYC_{tac}_psvao and pET22ssl1, or (3) pACYC_{tac}_psvao and pET16b_cgl1 (see Additional file 1). Expressions were carried out in 200 ml TB-medium supplemented with 100 μg ml⁻¹ ampicillin and 34 μg ml⁻¹ chloramphenicol at 37 °C, 180 rpm. At an OD₆₀₀ of 0.6–0.5 mM IPTG and CuSO₄ (2 mM in case of CotA and Ssl1, 3 mM in case of CgI1) were added. Thereafter, cultures were incubated at 30 °C, 140 rpm for 21 h.

Cells were harvested by centrifugation and resuspended in reaction buffer (50 mM KPi, pH 7.5; 100 μM IPTG) thereby adjusting a cell wet weight of 70 g l⁻¹ (corresponding to 18.1 g l⁻¹ cell dry weight). 10 ml of resuspended cells were exposed to 10 mM eugenol **1** and 2 % (v/v) DMSO and incubated at 25 °C, 140 rpm in an orbital shaker for 24 h. Samples (0.5 ml) were taken after certain time points, 2 mM FSME (100 mM stock solution in DMSO) was added and extracted with 1 ml ethyl acetate. All samples were analysed by GC/MS as described below.

In vivo one-pot “one-cell” cascade reaction for synthesis of enantiopure pinosresinol

E. coli OverExpress C41(DE3) cells co-expressing the plasmids pCDF-Duet_psvao_systpr2_his₆ and pET16b_cgl1 were employed. Protein expression and adjustment

of cell wet weight was conducted as described above for the co-expression of PsVAO and a bacterial laccase.

The one-pot “one-cell” cascade was analysed regarding (1) different eugenol **1** concentrations (1–10 mM), (2) addition of different energy sources (20 g l⁻¹ D-glucose or 25 g l⁻¹ glycerol), and (3) the stepwise addition of eugenol **1** (1 mM or 2.5 mM added as indicated in Table 1).

Control reactions were performed in the same manner but with *E. coli* cells not expressing heterologous genes; 1 mM eugenol **1**, 1 mM coniferyl alcohol **2**, or 0.75 mM pinosresinol **3** were added to the cells.

Extraction was performed with 6 ml ethyl acetate after addition of 100 μM FSME (for concentrations of eugenol **1** of up to 3 mM) or 2 mM FMSE (in all other cases). All samples were analysed by GC/MS, non-chiral LC/MS, and chiral HPLC as described below.

In vivo one-pot “two-cell” sequential cascade reactions for synthesis of enantiopure pinosresinol

The one-pot “two-cell” sequential reaction was realized by employing two types of cells: Conversion of eugenol **1** to (±)-pinosresinol **3** was achieved by *E. coli* OverExpress C41(DE3) cells carrying plasmids pACYC_{tac}_psvao and pET16b_cgl1, whereas kinetic resolution of (±)-pinosresinol **3** was done by *E. coli* OverExpress C41(DE3) cells carrying either pCDF-Duet_syatpr2_his₆ (for synthesis of (+)-pinosresinol **3a**), or pCDF-Duet_syfiplr (for synthesis of (–)-pinosresinol **3b**). Protein expression was conducted as described above for the co-expression of PsVAO and a bacterial laccase.

The first step of the reaction was performed with resting *E. coli* cells with heterologously expressed PsVAO and CgI1 (resuspended in 10 ml reaction buffer supplemented with 25 g l⁻¹ D-glucose; cell wet weight adjusted to 70 g l⁻¹), 2 % (v/v) DMSO, 10 mM eugenol **1**. After 24 h resting *E. coli* cells with heterologously expressed AtPrR2 or FiPLR were added (resuspended in 10 ml reaction buffer supplemented with 25 g l⁻¹ D-glucose; cell wet weight adjusted to 70 g l⁻¹). Extraction was performed with 6 ml ethyl acetate after addition of 2 mM FMSE. All samples were analysed by GC/MS, non-chiral LC/MS, and chiral HPLC as described below.

For scale-up experiments, the reaction was multiplied by the factor of 10 resulting in a substrate amount of 160 mg (10 mM in 100 ml), 100 ml *E. coli* cells harbouring PsVAO and CgI1, and 100 ml *E. coli* cells harbouring AtPrR2.

Pinosresinol **3** and lariciresinol **4** were purified from the reaction mixture by preparative HPLC. For product verification high-resolution mass spectrometry (HR/MS), ¹H NMR, ¹³C NMR, HMBC, COSY, and HSQC were performed (for additional information and results see Additional file 6).

Cell toxicity tests

Cell growth assay

The effect of different eugenol **1** concentrations on cell growth of *E. coli* OverExpress C41(DE3) cells carrying pACYC_{tac-psvao} and pET16b_{cgl1} was monitored. 400 ml TB-medium were inoculated with 4 ml of an overnight culture and incubated at 37 °C, 180 rpm to an OD₆₀₀ of 0.6. Cells were harvested by centrifugation, resuspended in TB-medium adjusting an OD₆₀₀ = 0.6, and split. Different concentrations of eugenol **1** (0, 1, 2.5, 5, or 10 mM) and 2 % (v/v) DMSO were added. Cells were incubated at 37 °C, 180 rpm and cell growth was analysed for additional 18 h by measuring the OD₆₀₀.

Cell viability assay

Viability of resting *E. coli* cells during biotransformations was assayed as follows: 40 µl of the cell suspension was withdrawn immediately after eugenol **1** addition, as well as after 24 h reaction time. The samples were diluted and plated on LB-agar-plates containing 100 µg ml⁻¹ ampicillin and 50 µg ml⁻¹ streptomycin. After incubation at 37 °C over night colony forming units (CFU) were counted.

Reaction analysis by GC/MS, LC/MS, and HPLC

GC/MS analysis was performed as described previously [17].

Non-chiral LC/MS measurements were performed on a LC/MS-2020 (Shimadzu, Duisburg, Germany) equipped with a Chromolith® Performance RP-18e column (100 × 4.6 mm, Merck, Darmstadt, Germany). A solvent gradient of methanol and 0.1 % formic acid at a flow rate of 0.5 ml min⁻¹ was applied as follows: starting from 20 to 35 % methanol in 5 min, hold for 5 min, increase to 70 % methanol within 15 min, then to 90 % methanol within 1 s, hold for 1 min, re-equilibration with 20 % methanol. UV/Vis spectra were monitored in the range between 190–800 nm. The interface temperature was 350 °C, the desolvation line temperature was 275 °C, and the heat block temperature was 400 °C. The nebulizing gas flow and the drying gas flow were set to 1.5 and 15 l min⁻¹, respectively.

For determination of the enantiomeric composition of pinoresinol **3**, lariciresinol **4**, and secoisolariciresinol **5** reaction mixtures were analysed by chiral HPLC (Shimadzu, Duisburg, Germany) equipped with a CHIRALPAK®IB column (250 × 4.6 mm, Chiral Technologies Europe, Illkirch Cedex, France). The solvents *n*-hexane/ethanol were used under isocratic conditions (pinoresinol **3**: 50/50; lariciresinol **4**: 80/20, secoisolariciresinol **5**: 75/25) at a flow rate of 0.7 ml min⁻¹.

Product isolation and identification

Pinoresinol **3** and lariciresinol **4** were purified by preparative HPLC equipped with a MultoHigh 100 Si-10 µ column (250 × 10 mm, pore size 100 Å, 10 µm particle size, CS-Chromatographie Service, Langerwehe, Germany). A solvent gradient of *n*-heptane and ethanol at a flow rate of 7.5 ml min⁻¹ was applied as follows: starting from 10 to 39 % ethanol in 12.5 min, increase to 90 % ethanol within 1 s, hold for 1 min, re-equilibration with 10 % ethanol.

Product identification was performed by NMR and HR/MS as described in the Additional file 6.

Additional files

Additional file 1. DNA-sequences of the synthetic genes (*syatpr2* and *syfip1r*), plasmids and strains used within this study.

Additional file 2. Formation of lariciresinol **4** or secoisolariciresinol **5** from pinoresinol **3** in the reactions with cleared cell lysates of different *E. coli* strains expressing the reductase AtPrR2 (**a**) or the reductase FiPLR (**b**). Reaction conditions: 50 mM KPI-buffer, pH 7.5, 0.2 mM pinoresinol **3**, 50 µl cleared cell lysate containing AtPrR2 or FiPLR, 0.2 mM NADPH. Optionally, 3 U ml⁻¹ GDH and 20 mM D-glucose were added for cofactor regeneration (cr). The reactions were incubated at 25 °C for 16 h. Besides formation of lariciresinol **4** or secoisolariciresinol **5**, no other reaction products were observed.

Additional file 3. Cell growth of *E. coli* C41(DE3) cells co-transformed with pACYC_{tac-psvao} and pET16b_{cgl1} in the presence of different concentrations of eugenol **1**. Cell cultures were grown at 37 °C, 180 rpm to an OD₆₀₀ of 0.6 and harvested (indicated by an arrow). Cell pellet was resuspended in TB medium, eugenol **1** was added and the cultures were incubated at 37 °C, 180 rpm. Cell growth was monitored at 600 nm. Black square: 0 mM eugenol **1**, blue circle: 1 mM, green triangle: 2.5 mM, purple square: 5 mM, orange circle: 10 mM.

Additional file 4. Influence of an energy source on conversion of coniferyl alcohol **2** by *E. coli* cells. 10 ml *E. coli* C41(DE3) pCDF-Duet resuspended in reaction buffer (70 g l⁻¹ cww) were supplemented with 1 mM coniferyl alcohol **2**. Optionally, 25 g l⁻¹ glycerol or 20 g l⁻¹ D-glucose was added. The reaction was carried out for 24 h at 25 °C, 140 rpm. [2] = coniferyl alcohol **2**, [6] = coniferyl aldehyde **6**, [IS] = internal standard FSME, * = unspecific peak; chromatograms are shifted vertically.

Additional file 5. HPLC chromatograms of enantiomeric separations of reaction products. **a** Application of AtPrR2; **b** application of FiPLR. [3a] = (+)-pinoresinol **3a**, [3b] = (-)-pinoresinol **3b**, [4a] = (+)-lariciresinol **4a**, [4b] = (-)-lariciresinol **4b**, [5a] = (-)-secoisolariciresinol **5a**.

Additional file 6. Product identification by NMR and HR/MS.

Authors' contributions

All authors participated in the development of the initial concept of the study. ER carried out all experiments and drafted the manuscript. MG and VBU participated in writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

Financial support of the Ministry of Innovation, Science and Research within the framework of the NRW Strategieprojekt BioSC (No. 313/323-400-00213, BioSC project EnZip) is gratefully acknowledged.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 5 February 2016 Accepted: 24 April 2016
Published online: 09 May 2016

References

- Sepporta MV, Mazza T, Morozzi G, Fabiani R. Pinoresinol inhibits proliferation and induces differentiation on human HL60 leukemia cells. *Nutr Cancer*. 2013;65:1208–18.
- Menendez JA, Vazquez-Martin A, Garcia-Villalba R, Carrasco-Pancorbo A, Oliveras-Ferreras C, Fernandez-Gutierrez A, Segura-Carretero A. tabAnti-HER2 (*erbB-2*) oncogene effects of phenolic compounds directly isolated from commercial Extra-Virgin Olive Oil (EVOO). *BMC Cancer*. 2008;8:377.
- Mitsuhashi S, Kishimoto T, Uraki Y, Okamoto T, Ubukata M. Low molecular weight lignin suppresses activation of NF-kappaB and HIV-1 promoter. *Bioorg Med Chem*. 2008;16:2645–50.
- Wikul A, Damsud T, Kataoka K, Phuwapraisrisan P. (+)-Pinoresinol is a putative hypoglycemic agent in defatted sesame (*Sesamum indicum*) seeds through inhibiting α -glucosidase. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012;22:5215–7.
- Kim KH, Moon E, Kim SY, Lee KR. Lignans from the tuber-barks of *Colocasia antiquorum* var. *esculenta* and their antimelanogenic activity. *J Agric Food Chem*. 2010;58:4779–85.
- Lapi D, Di Maro M, Mastantuono T, Battiloro L, Sabatino L, Muscariello E, Colantuoni A. Effects of oleuropein and pinoresinol on microvascular damage induced by hypoperfusion and reperfusion in rat pial circulation. *Microcirculation*. 2015;22:79–90.
- Hwang B, Lee J, Liu Q, Woo E, Lee DG. Antifungal effect of (+)-pinoresinol isolated from *Sambucus williamsii*. *Molecules*. 2010;15:3507–16.
- Landete JM. Plant and mammalian lignans: a review of source, intake, metabolism, intestinal bacteria and health. *Food Res Int*. 2012;46:410–24.
- Feng J, Shi Z, Ye Z. Effects of metabolites of the lignans enterolactone and enterodiol on osteoblastic differentiation of MG-63 cells. *Biol Pharm Bull*. 2008;31:1067–70.
- McCann MJ, Rowland IR, Roy NC. The anti-proliferative effects of enterolactone in prostate cancer cells: evidence for the role of DNA licencing genes, mi-R106b cluster expression, and PTEN dosage. *Nutrients*. 2014;6:4839–55.
- Kulik T, Buško M, Pszczołkowska A, Perkowski J, Okorski A. Plant lignans inhibit growth and trichothecene biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Lett Appl Microbiol*. 2014;59:99–107.
- Grougnat R, Magiatis P, Mitaku S, Terzis A, Tillequin F, Skaltsounis A. New lignans from the perisperm of *Sesamum indicum*. *J Agric Food Chem*. 2006;54:7570–4.
- Kitagawa S, Hisada S, Nishibe S. Phenolic compounds from *Forsythia* leaves. *Phytochemistry*. 1984;23:1635–6.
- Okunishi T, Umezawa T, Shimada M. Isolation and enzymatic formation of lignans of *Daphne genkwa* and *Daphne odora*. *J Wood Sci*. 2001;47:383–8.
- Maruyama J, Kobayashi M, Miyashita M, Kouno I, Irie H. A synthesis of (\pm)-pinoresinol and its related compound using potassium persulfate (K₂S₂O₈) oxidation of benzoylacetates. *Heterocycles*. 1994;37:839–45.
- Vermes B, Seligmann O, Wagner H. Synthesis of biologically active tetrahydro-furofuranlignan-(syringin, pinoresinol)- mono- and bis-glucosides. *Phytochemistry*. 1991;30:3087–9.
- Ricklefs E, Girhard M, Koschorreck K, Smit M, Urlacher VB. Two-step one-pot production of pinoresinol from eugenol via enzymatic cascade. *ChemCatChem*. 2015;7:1857–64.
- Davin LB, Wang HB, Crowell AL, Bedgar DL, Martin DM, Sarkanen S, Lewis NG. Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an active center. *Science*. 1997;275:362–6.
- Kim K, Moinuddin SGA, Atwell KM, Costa MA, Davin LB, Lewis NG. Opposite stereoselectivities of dirigent proteins in *Arabidopsis* and *Schizandra* species. *J Biol Chem*. 2012;287:33957–72.
- Pickel B, Schaller A. Dirigent proteins: molecular characteristics and potential biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97:8427–38.
- Kazenwadel C, Klebensberger J, Richter S, Pfanstiel J, Gerken U, Pickel B, et al. Optimized expression of the dirigent protein AtDIR6 in *Pichia pastoris* and impact of glycosylation on protein structure and function. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97:7215–27.
- Kim MK, Jeon J, Fujita M, Davin LB, Lewis NG. The western red cedar (*Thuja plicata*) 8-8' DIRIGENT family displays diverse expression patterns and conserved monolignol coupling specificity. *Plant Mol Biol*. 2002;49:199–214.
- Pickel B, Constantin M, Pfanstiel J, Conrad J, Beifuss U, Schaller A. An enantiocomplementary dirigent protein for the enantioselective laccase-catalyzed oxidative coupling of phenols. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2010;49:202–4.
- Halls SC, Lewis NG. Secondary and quaternary structures of the (+)-pinoresinol-forming dirigent protein. *Biochemistry*. 2002;41:9455–61.
- Liu J, Stipanovic RD, Bell AA, Puckhaber LS, Magill CW. Stereoselective coupling of hemigossypol to form (+)-gossypol in moco cotton is mediated by a dirigent protein. *Phytochemistry*. 2008;69:3038–42.
- Halls SC, Davin LB, Kramer DM, Lewis NG. Kinetic study of coniferyl alcohol radical binding to the (+)-pinoresinol forming dirigent protein. *Biochemistry*. 2004;43:2587–95.
- Dinkova-Kostova AT, Gang DR, Davin LB, Bedgar DL, Chu A, Lewis NG. (+)-Pinoresinol/(+)-lariciresinol reductase from *Forsythia intermedia*. Protein purification, cDNA cloning, heterologous expression and comparison to isoflavone reductase. *J Biol Chem*. 1996;271:29473–82.
- Nakatsubo T, Mizutani M, Suzuki S, Hattori T, Umezawa T. Characterization of *Arabidopsis thaliana* pinoresinol reductase, a new type of enzyme involved in lignan biosynthesis. *J Biol Chem*. 2008;283:15550–7.
- Fujita M, Gang DR, Davin LB, Lewis NG. Recombinant pinoresinol-lariciresinol reductases from western red cedar (*Thuja plicata*) catalyze opposite enantiospecific conversions. *J Biol Chem*. 1999;274:618–27.
- Hemmati S, Schmidt TJ, Fuss E. (+)-Pinoresinol/(+)-lariciresinol reductase from *Linum perenne* Himmelszelt involved in the biosynthesis of justicidin B. *FEBS Lett*. 2007;581:603–10.
- Wankhede DP, Biswas DK, Rajkumar S, Sinha AK. Expressed sequence tags and molecular cloning and characterization of gene encoding pinoresinol/lariciresinol reductase from *Podophyllum hexandrum*. *Protoplasma*. 2013;250:1239–49.
- Hano C, Martin I, Fliniaux O, Legrand B, Gutierrez L, Arroo RRR, et al. Pinoresinol-lariciresinol reductase gene expression and secoisolariciresinol diglucoside accumulation in developing flax (*Linum usitatissimum*) seeds. *Planta*. 2006;224:1291–301.
- Fukuhara Y, Kamimura N, Nakajima M, Hishiyama S, Hara H, Kasai D, et al. Discovery of pinoresinol reductase genes in sphingomonads. *Enzyme Microb Technol*. 2013;52:38–43.
- Overhage J, Steinbüchel A, Priefert H. Highly efficient biotransformation of eugenol to ferulic acid and further conversion to vanillin in recombinant strains of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69:6569–76.
- Friedman M, Henika PR, Mandrell RE. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J Food Prot*. 2002;65:1545–60.
- Ricklefs E, Winkler N, Koschorreck K, Urlacher VB. Expanding the laccase-toolbox: a laccase from *Corynebacterium glutamicum* with phenol coupling and cuprous oxidase activity. *J Biotechnol*. 2014;191:46–53.
- Khatri Y, Hannemann F, Girhard M, Kappl R, Hutter M, Urlacher VB, Bernhardt R. A natural heme-signature variant of CYP267A1 from *Sorangium cellulosum* So ce56 executes diverse ω -hydroxylation. *FEBS J*. 2015;282:74–88.

2.4.2. Additional files

Additional file 1: DNA-sequences of the synthetic genes (*syatpr2* and *syfiplr*), plasmids and strains used within this study

syatpr2 (NCBI Reference Sequence NP_193102.1):

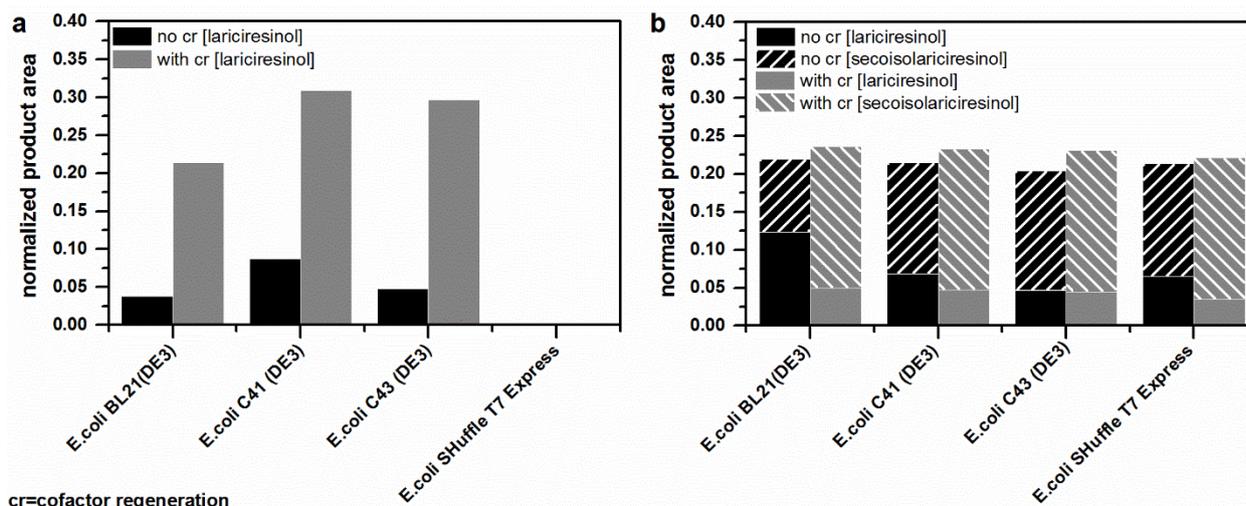
```
ATGAGTGGAGTCCATTTTCGCACGCACAATATTCCGGTCCAACCTAAGTTAGTCGCAGCC
ATCAAAGAAGCCGGCAACGTGAAACGCTTCCTGCCAGTGAGTTTGGCATGGATCCTAGC
CGCATGGGCCATGCAATGCCGCCAGGTAGCGAAACGTTTCGATCAGAAAATGGAGATCCGT
AATGCCATCAAAGCAGCGGGCATCTCCCATACCTATTTAGTCGGCGCTTGCTTTGCGGCC
TATTTCCGGTGGCAATCTGTCTCAGATGGGAACCCTCTTTCCGCCGAAGAACAAAGTGGAC
ATTTATGGCGATGGGAACGTGAAGGTAGTATTTGTGCGACGAAGATGACATGGCGAAATAC
ACCGCGAAAACGCTGAATGACCCACGTACCCTGAACAAAACAGTCTATGTACGTCCTACG
GATAACATCTTGACCCAGATGGAACCTTGTGCAGATTTGGGAGAACTGACCGAGAAAGAA
CTGGAAAAGACGTATGTGAGCGGTAATGACTTTCTGGCCGATATCGAAGATAAAGAGATT
TCGCATCAAGCTGGCTTAGGTCACCTTACCACATTTACTACGAAGGCTGCCTGACCGAT
CACGAAGTTGGTGACGATGAAGAAGCTACTAAACTGTATCCGGATGTGAAATACAAGCGC
ATGGACGAATATCTGAAAATTTTCGTCTGA
```

syfiplr (GenBank AAC49608.1):

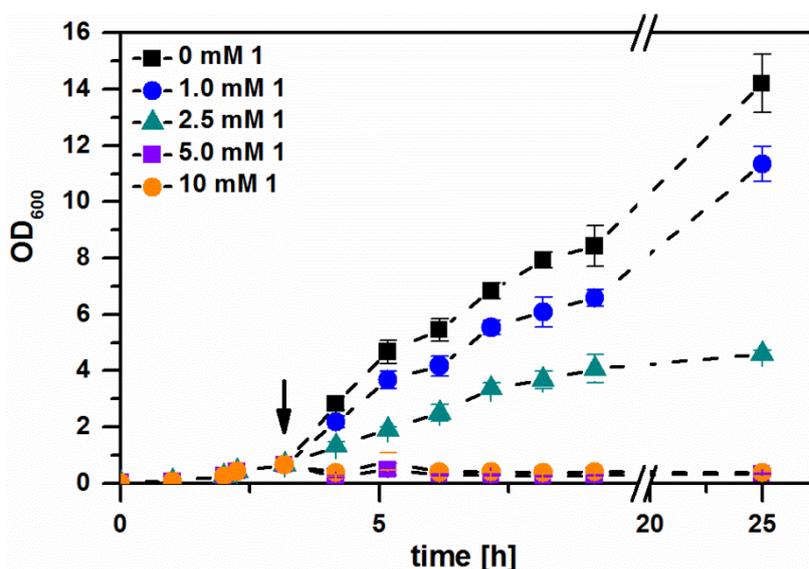
```
ATGCTGATTAGCTTCAAATGCAAGGTGCGCATCTGGTGAGTGGCTCCTTTAAAGACTTC
AATAGCCTCGTTGAAGCGGTAAAACCTGGTAGATGTGGTTATTTCCGCAATCAGTGGCGTG
CATATCCGCAGCCATCAGATTCTGTTACAGCTGAAACTTGTGGAAGCGATCAAAGAAGCT
GGTAACGTTAAGCGCTTCTTACCGTCTGAATTCGGGATGGATCCTGCTAAATTCATGGAT
ACCGCTATGGAACCCGGGAAAGTCACGTTAGACGAAAAGATGGTGGTACGCAAAGCCATT
GAGAAAGCAGGAATCCCGTTTACCTATGTGTCAGCCAATTGCTTTGCCGGCTATTTTCTG
GGAGGTCTGTGTCAGTTTGGGAAGATCCTCCCATCACGGGATTTTCGTCATCATTTCATGGC
GATGGGAACAAGAAAGCGATTTACAATAACGAGGATGACATTGCAACTTACGCGATCAAA
ACGATCAATGATCCGCGTACTTTGAACAAAACCATCTACATTAGCCCACCTAAGAACATC
CTTAGCCAACGCGAAGTTGTGCAGACATGGGAGAACTGATTGGCAAAGAATTGCAGAAA
ATTACGTTGTGCAAGGAGGACTTTCTGGCATCGGTGAAGGAACTGGAGTATGCGCAGCAA
GTGGGTCTGAGTCACTATCATGATGTCAACTACCAGGGATGCTTAACCTCCTTTGAAATT
GGCGATGAAGAGGAAGCCTCTAAACTGTATCCGGAAGTGAATAACACCTCTGTTGAAGAA
TACCTTAAACGCTATGTTGGCGGTCATCACCATCATCACCCTGA
```

Strains and plasmids used within this study

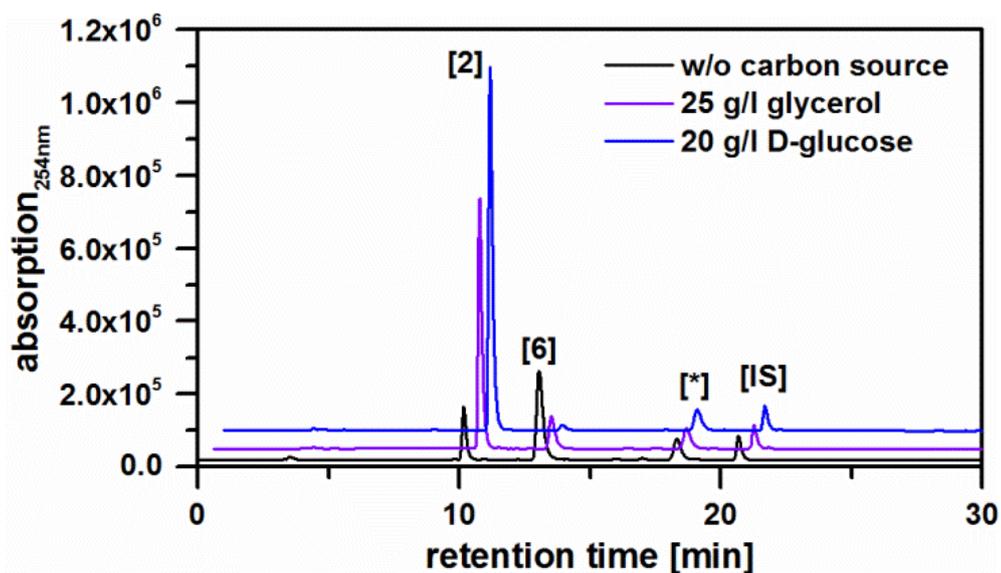
Strain or plasmid	Characteristics	Source or reference
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> λ ⁻	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Novagen
<i>E. coli</i> OverExpress C41(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Lucigen
<i>E. coli</i> OverExpress C43(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Lucigen
<i>E. coli</i> SHuffle® T7 Express	<i>fhuA2 lacZ::T7 gene1</i> [lon] <i>ompT ahpC gal</i> λ att::pNEB3-r1- <i>cDsbC</i> (Spec ^R , <i>lacI</i> ^q) Δ <i>trxB sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2 [dcm] <i>R(zgb-210::Tn10 --Tet^S) endA1 Δgor Δ(mcrC-mrr)114::IS10</i></i>	NEB
pET16b_cgl1	Plasmid containing <i>cgl1</i>	E. Ricklefs <i>et al.</i> , <i>J Biotechnol</i> 2014 , 191, 46–53.
pET22ssl1	Plasmid containing <i>ssl1</i> with a N-terminal His ₆ -tag	M. Gunne, V. B. Urlacher, <i>PLoS ONE</i> 2012 , 7, e52360
pETK316N/D500G	Plasmid containing <i>cotA</i> mutant	K. Koschorreck <i>et al.</i> , <i>BMC Biotechnol.</i> 2009 , 9, 12.
pET28b_psvao	Plasmid containing <i>psvao</i> with N-terminal His ₆ -tag	Newlandè von Rooyen, PhD thesis, University of the Free State, Bloemfontein, 2012
pACYC _{tac} _psvao	Plasmid containing <i>psvao</i>	This study
pCDF-Duet_syatpr2_his ₆	Plasmid containing <i>syatpr2</i> with C-terminal His ₆ -tag	This study
pCDF-Duet_syfiplr	Plasmid containing <i>syfiplr</i>	This study
pCDF-Duet_syfiplr_his ₆	Plasmid containing <i>syfiplr</i> with C-terminal His ₆ -tag	This study
pCDF-Duet_psvao_syatpr2_his ₆	Plasmid containing <i>psvao</i> and <i>syatpr2</i>	This study
pCDF-Duet_psvao_syfiplr	Plasmid containing <i>psvao</i> and <i>syfiplr</i>	This study



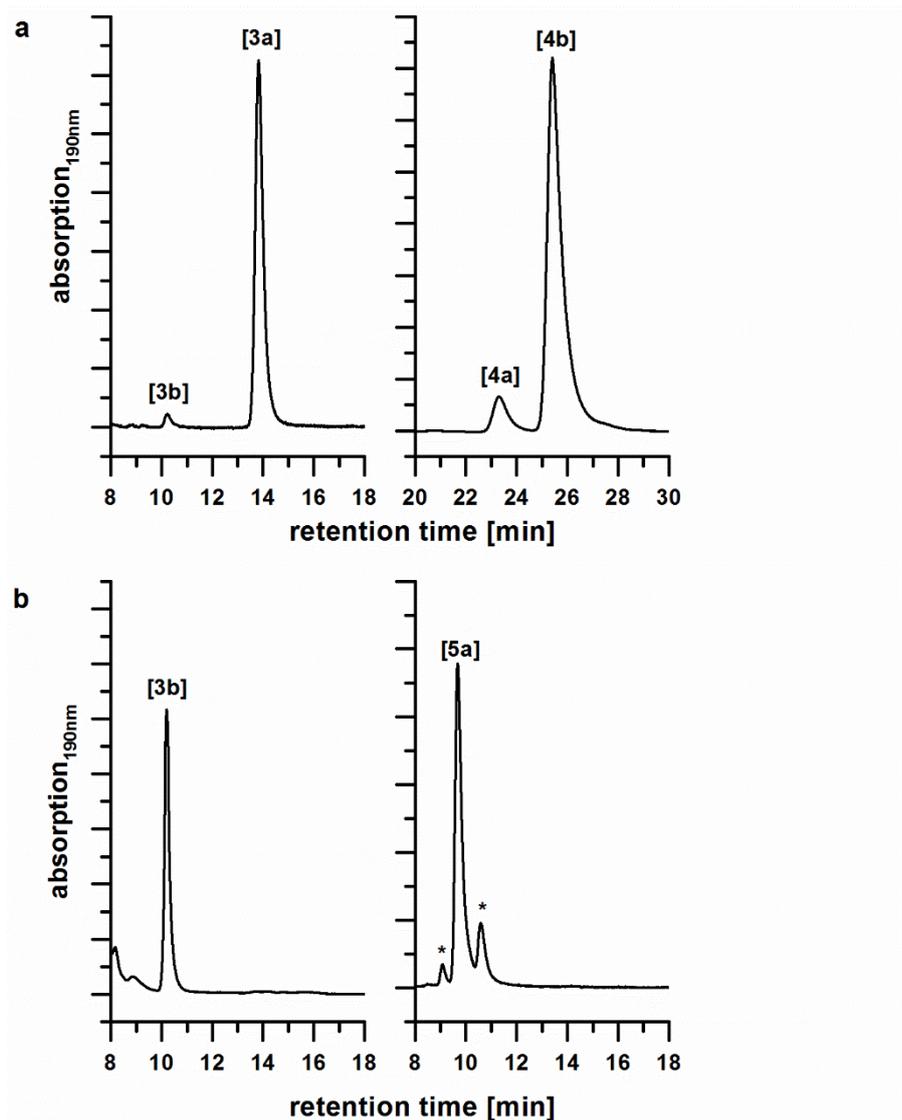
Additional file 2: Formation of lariciresinol **4** or secoisolariciresinol **5** from pinoresinol **3** in the reactions with cleared cell lysates of different *E. coli* strains expressing the reductase AtPrR2 (**a**) or the reductase FiPLR (**b**). Reaction conditions: 50 mM KPi-buffer, pH 7.5, 0.2 mM pinoresinol **3**, 50 μ l cleared cell lysate containing AtPrR2 or FiPLR, 0.2 mM NADPH. Optionally, 3 U ml⁻¹ GDH and 20 mM D-glucose were added for cofactor regeneration (cr). The reactions were incubated at 25°C for 16 h. Besides formation of lariciresinol **4** or secoisolariciresinol **5**, no other reaction products were observed.



Additional file 3: Cell growth of *E. coli* C41(DE3) cells co-transformed with pACYC_{tac}_psvao and pET16b_cgl1 in the presence of different concentrations of eugenol **1**. Cell cultures were grown at 37°C, 180 rpm to an OD₆₀₀ of 0.6 and harvested (indicated by an arrow). The cell pellet was resuspended in TB medium, eugenol **1** was added and the cultures were incubated at 37°C, 180 rpm. Cell growth was monitored at 600 nm. Black square: 0 mM eugenol **1**, blue circle: 1 mM, green triangle: 2.5 mM, purple square: 5 mM, orange circle: 10 mM.



Additional file 4: Influence of an energy source on conversion of coniferyl alcohol **2** by *E. coli* whole-cells. 10 ml *E. coli* C41(DE3) transformed with pCDF-Duet resuspended in reaction buffer (70 g l^{-1} cww) were supplemented with 1 mM coniferyl alcohol **2**. Optionally, 25 g l^{-1} glycerol or 20 g l^{-1} D-glucose was added. The reaction was carried out for 24 h at 25°C , 140 rpm. [2] = coniferyl alcohol **2**, [6] = coniferyl aldehyde **6**, [IS] = internal standard FSME, * = unspecific peak; chromatograms are shifted vertically.



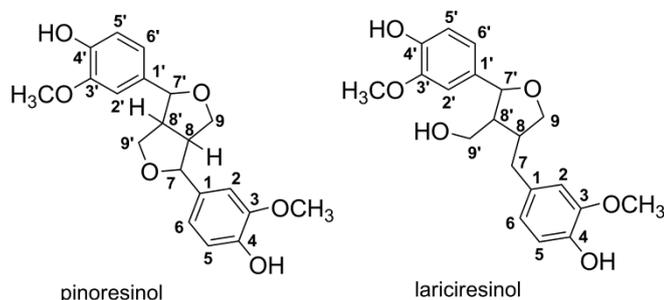
Additional file 5: HPLC chromatograms of enantiomeric separations of reaction products. **a** Application of AtPrR2; **b** application of FiPLR. [3a] = (+)-pinoresinol **3a**, [3b] = (-)-pinoresinol **3b**, [4a] = (+)-lariciresinol **4a**, [4b] = (-)-lariciresinol **4b**, [5a] = (-)-secoisolariciresinol **5a**.

Additional file 6: Product identification by NMR and HR/MS

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a Bruker Avance III (600 MHz) on CD_3COCD_3 or Cl_3CD solutions using residual solvent as internal standard. For CD_3COCD_3 the chemical shifts were $\delta = 2.05$ ppm and 2.84 ppm in ^1H -NMR spectra, $\delta = 29.84$ ppm, and 206.26 in ^{13}C -NMR spectra, for Cl_3CD $\delta = 7.26$ ppm in ^1H -NMR spectra, $\delta = 77.16$ ppm in ^{13}C -NMR spectra. Chemical shifts (δ) are reported in parts per million (ppm) relative to the signal of the residual protic solvents.

Coupling constants J [Hz] were directly taken from the spectra and are not averaged. Splitting patterns are designated as s (singlet), d (doublet), dd (doublet of doublets), ddd (doublet of doublets of doublets) and m (multiplet). Peak assignment was based on correlation experiments.

High-resolution mass spectrometry (HR/MS) was recorded on maXis in the positive mode with a scan from 50-1500 m/z and the following settings: Source Type ESI, Set Capillary 4000 V, Set End Plate Offset -500 V, Nebulizer 0.3 Bar, Dry Heater 180 °C, Dry gas 4.0 l min⁻¹.



(+)-Pinoresinol (+)-**3a**: ¹H NMR (600 MHz, Acetone-*d*₆): δ = 6.99 (d, ³*J*(H_{2,2'},H_{6,6'}) = 1.9 Hz, 2H; 2,2'-H), 6.83 (ddd, ⁴*J*(H_{5,5'},H_{6,6'}) = 8.1, ³*J*(H_{2,2'},H_{6,6'}) = 1.9, ⁴*J*(H_{6,6'},H_{7,7'}) = 0.7 Hz, 2H; 6,6'-H), 6.79 (d, ⁴*J*(H_{5,5'},H_{6,6'}) = 8.1 Hz, 2H; 5,5'-H), 4.67 (d, ³*J*(H_{7,7'},H_{8,8'}) = 4.4 Hz, 2H; 7,7'-H), 4.22 – 4.18 (m, 2H; 9,9'-H), 3.84 (s, 6H; 3,3'-OCH₃), 3.80 (dd, ²*J* = 9.1, ³*J*(H_{8,8'},H_{9,9'}) = 3.8 Hz, 2H; 9,9'-H), 3.11 – 3.06 (m, 2H); ¹³C NMR (151 MHz, Acetone-*d*₆): δ = 148.27 (C-3,3'), 146.77 (C-4,4'), 134.16 (C-1,1'), 119.61 (C-6,6'), 115.46 (C-5,5'), 110.61 (C-2,2'), 86.63 (C-7,7'), 72.21 (C-9,9'), 56.24 (3,3'-OCH₃), 55.24 (C-8,8'); HRMS (ESI, pos.) calculated for C₂₀H₂₂NaO₆ [M+Na]⁺ m/z: 381.1309, found: 381.1304; ee-value: 96%

(-)-Lariciresinol (-)-**4b**: ¹H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*): δ = 6.90 – 6.66 (m, 6H; ArH), 4.78 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H; 7'-H), 4.05 (dd, *J* = 8.6, 6.6 Hz, 1H; 9-H), 3.90 (dd, *J* = 10.8, 7.1 Hz, 1H; 9'-H), 3.87 (s, 3H; 3'-OCH₃), 3.86 (s, 3H; 3-OCH₃), 3.78 – 3.69 (m, 2H; 9'-H, 9-H), 2.91 (dd, *J* = 13.6, 5.2 Hz, 1H; 7-H), 2.77 – 2.69 (m, 1H, 8-H), 2.54 (dd, *J* = 13.6, 10.7 Hz, 1H; 7-H), 2.43 – 2.37 (m, 1H; 8'-H); ¹³C NMR (151 MHz, Chloroform-*d*): δ = 146.77 (C-3'), 146.66 (C-3), 145.15 (C-4'), 144.11 (C-4'), 134.89 (C-1'), 132.40 (C-1), 121.31 (C-6), 118.87 (C-6'), 114.56 (C-5), 114.33 (C-5'), 111.35 (C-2), 108.46 (C-2'), 82.94 (C-7'), 73.01 (C-9), 60.99 (C9'), 56.05 (2xOCH₃), 52.72 (C-8'), 42.53 (C-8), 33.42(C-7); HRMS (ESI, pos.) calculated for C₂₀H₂₄NaO₆ [M+Na]⁺ m/z: 383.1465, found: 383.1464; ee: 85%

HR/MS results: HR/MS acquisition parameters: (ESI, pos.) m/z calculated for [M+Na]⁺.

Product No.	Measured m/z	Ion Formula	Calculated m/z	err [ppm]
3	381.1304	C ₂₀ H ₂₂ NaO ₆	381.1309	1.2
4	383.1464	C ₂₀ H ₂₄ NaO ₆	383.1465	0.4
5	385.1624	C ₂₀ H ₂₆ NaO ₆	385.1622	-0.5

3. Diskussion

Laccasen sind für industrielle Anwendungen aufgrund verschiedener Aspekte von besonderem Interesse: Zum einen handelt es sich bei Laccasen um „grüne“ Biokatalysatoren, die Sauerstoff als Cosubstrat benötigen und Wasser als einziges Nebenprodukt produzieren. Zum anderen sind Laccasen stabile Enzyme, die unter milden Reaktionsbedingungen die Oxidation verschiedener Phenole, aromatischer und aliphatischer Amine katalysieren.^[22,98] Aufgrund ihrer hohen Stabilität können sie aber auch in technischen Prozessen, die oftmals harsche Bedingungen (wie z.B. hohe Temperaturen, Drücke und Salzkonzentrationen sowie extreme pH-Bereiche) erfordern, eingesetzt werden.^[46]

In der Vergangenheit wurden hauptsächlich pilzliche und pflanzliche Laccasen biochemisch charakterisiert und hinsichtlich potentieller biotechnologischer Anwendungen analysiert.^[118] Bis heute werden ausschließlich pilzliche Laccasen für industrielle Anwendungen kommerziell hergestellt.^[120] Anfang der 90er Jahre wurden Prokaryoten als neue Quelle für Laccasen entdeckt und erste bakterielle Laccasen beschrieben.^[38,39] Die wachsende Zahl an sequenzierten Genomen innerhalb der letzten 25 Jahre in Kombination mit *in-silico*-Methoden (wie *Genome Mining*) ermöglichten die Identifizierung von mehr als 1200 potentiellen Laccasen in Prokaryoten.^[40,234,235] Bisher charakterisierte bakterielle Laccasen unterscheiden sich in ihren Eigenschaften von pilzlichen Laccasen: Sie sind bei höheren Temperaturen und im neutralen bis basischen pH-Bereich stabil und katalytisch aktiv und sind gegenüber organischen Lösungsmitteln, Inhibitoren und erhöhten Salzkonzentrationen stabil. Die Produktion bakterieller Laccasen kann im etablierten Expressionssystem *E. coli* erfolgen. Die Expression von funktionell aktiven pilzlichen Laccasen in *E. coli* ist aufgrund notwendiger posttranslationaler Modifikationen fast nicht möglich und wurde bisher nur für zwei pilzliche Laccasen beschrieben.^[236] Die Expression in rekombinanten Hefen ist mit geringen Proteinmengen, die Expression in Pilzen mit langen Kultivierungszeiten verbunden.^[237] Trotz dieser Vorteile gibt es bis heute keine industrielle Anwendung mit bakteriellen Laccasen. Gründe hierfür könnten die relativ geringe Anzahl charakterisierter bakterieller Laccasen, das niedrige Redoxpotential sowie die fehlende Möglichkeit, bakterielle Laccasen kommerziell zu erwerben, sein.

Speziell interessierte uns die Frage der Anwendung von bakteriellen Laccasen in Kaskadenreaktionen für die Herstellung von Feinchemikalien. In Kaskadenreaktionen werden verschiedene Schritte in einem Topf ohne Aufarbeitung der Zwischenprodukte durchgeführt. Im Allgemeinen können sowohl verschiedene enzymkatalysierte Reaktionen (multi-enzymatisch), als auch chemisch katalysierte Reaktionen mit enzymkatalysierten Reaktionen (chemo-enzymatisch) kombiniert werden.^[191,193] Prozesse können mittels Kaskadenreaktionen hinsichtlich ihrer Effizienz und Nachhaltigkeit aufgrund der reduzierten Anzahl an Arbeitsschritten und somit reduzierten Kosten und Abfallprodukten verbessert werden. Daher

sind sie für technische Anwendungen im großen Maßstab attraktiv. Obwohl in den letzten Jahren Kaskadenreaktionen intensiv erforscht wurden, werden Laccasen bis heute kaum in multi-enzymatischen Kaskaden verwendet. Die mangelnde Kompatibilität von pilzlichen Laccasen mit anderen Enzymen (z.B. enzymatische Aktivität in verschiedenen pH-Bereichen) könnte ein Grund hierfür sein.

Um das Potential bakterieller Laccasen für die Biokatalyse zu erweitern, beschäftigt sich diese Arbeit mit der Charakterisierung einer neuen bakteriellen Laccase und dem Einsatz bakterieller Laccasen in multi-enzymatischen Kaskaden am Beispiel der Synthese des Lignans Pinoresinol.

3.1. Eine neue bakterielle Laccase für die Biokatalyse

Laccasen werden nach der *Laccase Engineering Database* (LccED; <http://www.lcced.uni-stuttgart.de/>; 10.07.2015) in 11 verschiedene Superfamilien eingeteilt, die mit den Buchstaben A – K benannt sind.^[235] Diese Klassifizierung erfolgt anhand von Sequenzähnlichkeiten und phylogenetischen Analysen. Um die Diversität an charakterisierten Laccasen aus verschiedenen Superfamilien und phylogenetischen Gruppen zu erhöhen, wurden in unserer Gruppe verschiedene bakterielle Laccasen ausgewählt, die charakterisiert und hinsichtlich ihrer potentiellen biokatalytischen Anwendungsmöglichkeiten analysiert werden sollten.^[238] Die in dieser Arbeit charakterisierte bakterielle Laccase aus *C. glutamicum* (CgL1) gehört zur Superfamilie B (*Ascomycete like*) und ist in der NCBI-Datenbank als hypothetische Multikupferoxidase annotiert (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; NC_003450 region 3169415..3170896, NCBI Reference Sequence: NP_602158.1, GenBank: BAC00361.1; 29.07.2015). Sequenzanalysen zeigten, dass es sich um ein extrazelluläres Protein handelt mit geringen Sequenzidentitäten zu gut untersuchten bakteriellen Laccasen aus *Bacillus* oder *Streptomyces*.^[239]

Die bakterielle Laccase CgL1 wurde kloniert, in *E. coli* exprimiert und mittels Anionenaustausch- und Größenausschlusschromatographie aufgereinigt. Es wurden Proteinmengen von 35 mg L⁻¹ Kulturmedium erzielt.^[239] CgL1 konnte aufgrund der Oxidation der typischen Laccasesubstrate ABTS, Syringaldazin und 2,6-Dimethoxyphenol sowie der Nicht-Oxidation von Tyrosin als Laccase identifiziert werden. Zusätzlich katalysiert CgL1 die Oxidation von Cu(I) zu Cu(II).^[239] Dies deutet auf eine physiologische Funktion in der Kupferhomöostase von *C. glutamicum* hin. Die aufgrund des TAT-Signals wahrscheinliche Sekretion von CgL1 in den extrazellulären Raum von *C. glutamicum* stützt diese These, denn dort kann CgL1 die Oxidation von Cu(I) zum für die Zelle weniger toxischen Cu(II) katalysieren. Transkriptionsanalysen von *C. glutamicum* bei Inkubation der Zelle mit erhöhten Kupferkonzentrationen zeigten die Hochregulierung der Transkription von *cg/1*. Zusätzlich wurde die Transkription 19 weiterer Gene (u.a. *copR*, *copS*, *copB*) hochreguliert.^[51] *CopR* und

copS codieren für ein Zweikomponentensystem zur Signaltransduktion bei der Detektion von Kupfer und *copB* für eine ATPase, die als potentieller Kationentransporter annotiert ist und Kupferionen aus der Zelle transportieren könnte. Aus der Zelle exportiertes Cu(I) würde anschließend von CgL1 zu Cu(II) oxidiert werden. Bei hohen Kupferkonzentrationen autophosphoryliert sich die transmembrängängige Sensorkinase CopS intrazellulär, der Phosphatrest wird anschließend auf den Antwortregulator CopR übertragen, der die Transkription zweier Operone aktiviert. Das eine Operon enthält das Gen *cgl1* und weitere, nicht genauer beschriebene Gene, das andere Operon *copR*, *copS*, *copB* und drei weitere, nicht genauer beschriebene Gene.^[51] Die Beteiligung von bakteriellen Laccasen an der Kupferhomöostase wurde unter anderem für CueO in *E. coli* oder McoA in *Aquifex aeolicus* gezeigt.^[52,240]

Die Laccase CgL1 war bei moderaten Reaktionsbedingungen (25 – 30°C, pH 7,5) am stabilsten.^[239] Wie bei allen bisher literaturbeschriebenen bakteriellen Laccasen war CgL1 im neutralen bis basischen pH-Bereich deutlich stabiler als im sauren. Das pH-Optimum für die Oxidation verschiedener Substrate war im Vergleich zu pilzlichen Laccasen zu höheren pH-Werten hin verschoben (ABTS bei pH 4,0, 2,6-Dimethoxyphenol bei pH 7,0, Syringaldazin bei pH 9,0). Das Temperaturoptimum für die Umsetzung von ABTS lag bei 60°C mit einer Halbwertszeit von 2 h.^[239] Des Weiteren war CgL1 in allen getesteten Lösungsmitteln über 24 h stabil.^[239] Diese Eigenschaften von CgL1 erweitern das Einsatzgebiet von Laccasen in potentiellen industriellen Anwendungen. In technischen Prozessen werden häufig Bedingungen benötigt, die für Enzyme problematisch sind, wie z.B. hohe Temperaturen, extreme pH-Werte oder hohe Salzgehalte.^[46] Unter diesen Bedingungen sind Enzyme oftmals instabil, weshalb die Stabilität vor einer möglichen Anwendung bspw. mittels evolutiver Optimierung (z.B. epPCR, SeSaM) verbessert werden muss. Dies ist für bakterielle Laccasen wie CgL1 nicht erforderlich. Sie können direkt in Prozessen mit höheren Temperaturen und/oder basischen pH-Werten eingesetzt werden. Bisher war lediglich der Einsatz von pilzlichen Laccasen in Prozessen mit sauren Reaktionsbedingungen möglich.

In multi-enzymatischen Eintopfsynthesen ermöglichen die unterschiedlichen Reaktionsoptima und -stabilitäten von pilzlichen und bakteriellen Laccasen bezüglich des pH-Wertes prinzipiell eine Vielzahl an Enzymkombinationen. So können bakterielle Laccasen mit Enzymen kombiniert werden, die im neutralen bis basischen Bereich aktiv sind,^[241] und pilzliche Laccasen mit Enzymen, die im sauren pH-Bereich aktiv sind.^[189] Die Stabilität von CgL1 gegenüber erhöhten Temperaturen und organischen Lösungsmitteln ermöglicht außerdem die Anwendung in chemo-enzymatischen Eintopfsynthesen. Ein Beispiel für eine solche Synthese wurde für die Laccase aus *Agaricus bisporus* beschrieben: Die Kombination von chemischer Hydrierung mit anschließender enzymkatalysierter Michael-Addition zur

Herstellung von 3-alkyliertem 3,4-Dihydrocumarinen aus Cumarinen und Catechol-Derivaten.^[154]

Eine erhöhte Stabilität von Enzymen in organischen Lösungsmitteln ist für industrielle und biokatalytische Anwendungen ebenfalls ein interessanter Aspekt: Durch die Zugabe wasserlöslicher organischer Lösungsmittel zu Synthesen erhöht sich die Löslichkeit von hydrophoben Substraten und somit ihre Zugänglichkeit für das Enzym. Dies ist vor allem für Laccasen mit ihren typischen, schwerlöslichen Substraten wichtig.^[22] Die Zugabe nicht-wassermischbarer organischer Lösungsmittel für die *in-situ*-Extraktion von Reaktionsprodukten aus der wässrigen Phase wird angewendet, um deren Abbau, wie z.B. durch Metabolisierung bei Verwendung von Ganzzellsystemen oder weitere enzymatische Nebenreaktionen, zu unterbinden. Im Falle von laccasekatalysierten Reaktionen wurde gezeigt, dass organische Lösungsmittel als Additive auch die Produktverteilung beeinflussen können.^[24,25]

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass CgL1 verschiedene phenolische Substrate oxidiert, die anschließend durch homomolekular C-C- oder C-O-Kupplung oligomerisiert wurden.^[239] In Abhängigkeit vom Substrat und der Reaktionszeit wurden Dimere, Trimere oder höher polymerisierte Produkte detektiert.^[239] Verschiedene phenolische Substrate könnten mittels CgL1 homomolekular oder heteromolekular miteinander verknüpft werden und somit verschiedenste Dimere, Trimere bis hin zu Polymeren synthetisiert werden. Anwendungsbeispiele hierfür sind die Synthese von biologisch aktiven Derivaten, wie Dimere von Phenolsäuren^[242] oder Flavonoiden,^[243] oder die Synthese von artifiziellem Urushi.^[162] Substanzen, wie z.B. Antibiotika, könnten mittels CgL1 mit phenolischen Substraten derivatisiert werden zur Synthese neuer Antibiotika.^[145] Auch die Anwendung von CgL1 in Biosensoren zur Detektion von Phenolen in Getränken (wie Wein oder Bier)^[244] oder Umweltproben wäre möglich.^[245]

Das Redoxpotential von CgL1 ist mit 260 mV im Vergleich zu pilzlichen (450 – 800 mV)^[35] und anderen bakteriellen Laccasen (Ssl1 aus *S. sviceps*: 375 mV,^[47] CotA aus *B. subtilis*: 455 mV^[42] bzw. 525 mV,^[43] CueO aus *E. coli*: 360 mV^[48]) niedrig. Dies könnte den industriellen Einsatz erschweren, da niedrige Redoxpotentiale mit einem eingeschränkten Substratspektrum verbunden sind. Diese Problematik könnte durch den Einsatz eines Laccase/Mediatorsystems^[21,22,136] oder durch gezielte Mutagenese auf Basis von Strukturmodellen oder nach Lösen der Kristallstruktur zur Erhöhung des Redoxpotentials umgangen werden.^[47] Allerdings kann ein niedriges Redoxpotential in Synthesen auch von Vorteil sein, wie z.B. bei der hier beschriebenen Synthese von (±)-Pinoresinol. Das gebildete Produkt kann durch die Laccase nur in geringem Maße umgesetzt werden und wird somit angereichert (siehe Kapitel 2.3. und 3.2.).

Das Redoxpotential aller bisher charakterisierten Laccasen aus Pilzen liegt zwischen 450 und 800 mV. Für oxidative Phenolkupplungen zur Synthese von Dimeren ist z.T. ein hohes Redoxpotential aufgrund einer schnellen Polymerisierung von Nachteil. Ein interessanter Aspekt wäre daher die gezielte Mutation von pilzlichen Laccasen auf Basis eines Strukturmodells oder einer Kristallstruktur von CgL1 zur Erniedrigung des Redoxpotentials. Dies würde den Einsatz von Laccasen mit niedrigem Redoxpotential im sauren pH-Bereich ermöglichen, in dem bisher hauptsächlich pilzliche Laccasen mit hohem Redoxpotential eingesetzt werden.

3.2. Synthese von (\pm)-Pinoresinol

Innerhalb dieser Studie wurde die Synthese des Lignans Pinoresinol in einer multi-enzymatischen Kaskade (als Eintopfsynthese) ausgehend von einem preiswerten Substrat analysiert. Pinoresinol ist ein pflanzliches Sekundärmetabolit; es ist für die medizinische Anwendung von besonderem Interesse hinsichtlich verschiedener gesundheitsfördernder Eigenschaften^[182–187,246] sowie als Vorstufe der humanen Enterolignane Enterodiol und Enterolacton.^[174–176,178,179,181,247] In der Natur wird Pinoresinol über die oxidative Kupplung zweier Moleküle Coniferylalkohol synthetisiert. Die Synthese von (\pm)-Pinoresinol aus Coniferylalkohol wurde in vorherigen Studien für die pflanzlichen Laccasen aus *R. vernicifera* und *Pinus taeda*,^[143,248] verschiedene pilzliche Laccasen (aus *Pycnoporus coccineus*, *Melanocarpus albomyces* und *Trametes versicolor*)^[143,189,249] sowie für die Meerrettich-Peroxidase^[182] gezeigt. Um Pinoresinol möglichst günstig zu synthetisieren, sollte in dieser Arbeit Eugenol als Substrat verwendet werden, welches in einem ersten Schritt mittels der Vanillylalkoholoxidase aus *P. simplicissimum* (PsVAO)^[209] zu Coniferylalkohol oxidiert wird. Dieser Schritt erfolgt sehr selektiv; als einziges Produkt wird Coniferylalkohol gebildet. Aufgrund des pH-Optimums von PsVAO, das bei pH 9,0 – 10,5 liegt, musste zuerst eine Laccase gefunden werden, welche die oxidative Kupplung von Coniferylalkohol im neutralen bis basischen Bereich katalysiert. Hierfür sind bakterielle Laccasen potentiell interessante Biokatalysatoren, da ihr pH-Optimum in diesem pH-Bereich liegt.

So zeigt das bei verschiedenen pH-Werten durchgeführte Enzymscreening, dass bakterielle Laccasen für die Kupplung von Coniferylalkohol zu (\pm)-Pinoresinol im neutralen bis basischen pH-Bereich besser geeignet sind, als der kommerziell erhältliche pilzliche Laccasemix (Lcc) aus *T. versicolor*.^[241] Auch die kommerziell erhältliche Meerrettich-Peroxidase kann für Reaktionen im basischen Bereich verwendet werden. Während Lcc Coniferylalkohol lediglich bei pH 5,0 umsetzte, ließen sich für die getesteten bakteriellen Laccasen Umsetzungen vor allem bei pH 7,5 und 9,0 detektieren. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Shiba *et al.*^[143] Sie beobachteten, dass die pilzliche Laccase aus *Pycnoporus coccineus* Coniferylalkohol besser im sauren pH-Bereich umsetzt (pH 3,5 – 4,5), die

pflanzliche Laccase aus *Rhus vernicifera* jedoch besser im basischen Bereich (pH 8.5 – 9,0). Dies kann durch Unterschiede beim pH-Optimum zwischen pilzlichen,^[33] bakteriellen^[46,239,250] und pflanzlichen Laccasen^[63,64,251,252] erklärt werden.

Neben bakteriellen Laccasen könnten demnach auch pflanzliche Laccasen für die Kupplung von Coniferylalkohol im neutralen bis basischen pH-Bereich eingesetzt werden. Der Vorteil von bakteriellen gegenüber pflanzlichen Laccasen ist die mögliche Expression im etablierten Expressionsorganismus *E. coli*. Dabei handelt es sich oftmals um den Expressionsorganismus der Wahl, da er einfach zu handhaben und manipulieren ist. Die Kultivierung ist aufgrund geringer Anforderungen an das Nährmedium preiswert und hohe Wachstums- und Expressionsraten können erzielt werden. Pflanzliche Laccasen werden hingegen aufgrund ihrer für die Aktivität notwendigen posttranslationalen Modifikationen aus Pflanzen isoliert^[57,59,122,251,253] oder heterolog in der Tabakzelllinie BY-2 exprimiert.^[65,248] Bei Arbeiten mit transgenen Pflanzen sollte beachtet werden, dass die molekularbiologischen Arbeiten aufwendig sind, geringe Raum-Zeit-Ausbeuten erzielt werden und in Deutschland mit gesellschaftlichem und politischem Widerstand gerechnet werden muss.

Alle in dieser Arbeit untersuchten Enzyme zeigten bei der Umsetzung von Coniferylalkohol zu (±)-Pinoresinol das gleiche Produktspektrum. Dies lässt sich anhand des Katalysemechanismus von Laccasen und Peroxidasen erklären. Sie katalysieren die Oxidation des Substrates unter Bildung eines Radikals. Die Radikale reagieren nachfolgend unselektiv miteinander, daher ist dieser Schritt der Eintopfsynthese weder stereo- noch regioselektiv. Neben (±)-Pinoresinol (C8-C8'-Kupplung) wurden auch (±)-Dehydrodiconiferylalkohol (C8-C5'-Kupplung) und (±)-*erythro/threo*-Guaiacylglycerin-8-O-4'-coniferylether (C8-O4'-Kupplung) detektiert. Die gleichen Produkte wurden in der Literatur bei der Umsetzung von Coniferylalkohol mit Laccasen aus *T. versicolor*, *M. albomyces* und *R. vernicifera*^[143,189,249] sowie der Meerrettich-Peroxidase^[254] nachgewiesen.

Die Zugabe eines dirigierenden Proteins zur etablierten Eintopfsynthese könnte die Stereo- und Regioselektivität beeinflussen. Dirigierende Proteine sind katalytisch nicht-aktive Proteine, für die jedoch gezeigt wurde, dass sie die enantio- und stereoselektive Bildung eines Produktes aus radikalischen Reaktionen begünstigen.^[69,189] Die Arbeitsgruppe von Prof. Lewis zeigte, dass dirigierende Proteine die Stereoselektivität bei der Kupplung von Coniferylalkohol beeinflussen, indem sie die bei der Substratoxidation gebildeten Radikale auf spezifische Weise binden und ihnen so definierte Orientierungen für die Kupplung geben.^[69] In der Natur wird in Abhängigkeit vom Organismus bevorzugt (+)- oder (-)-Pinoresinol gebildet.

Bei einer potentiellen Anwendung von dirigierenden Proteinen in der etablierten *in-vitro*-Eintopfsynthese müsste das pH-Optimum der verschiedenen Enzyme beachtet werden. Für das dirigierende Protein aus *Forsythia intermedia* (FiDIR) wurde gezeigt, dass dieses im sauren pH-Bereich „aktiv“ ist,^[255] was hinsichtlich einer Anwendung in dem etablierten System

von Nachteil ist. Hier wäre ein sequentieller Versuchsaufbau sinnvoll; der erste Schritt der Kaskade (Umsetzung von Eugenol zu Coniferylalkohol mittels PsVAO) wird bei pH 9,0 – 10,5 durchgeführt, der Ansatz wird anschließend angesäuert und die übrigen Proteine hinzugegeben (z.B. die bakterielle Laccase CotA und das dirigierende Protein FiDIR). Eine Alternative wäre ein laserinduzierter pH-Wechsel während der Reaktion, wie er von Kohse *et al.* beschrieben wurde.^[256] Bei dieser Methode erfolgt eine laserinduzierte Umlagerung von 2-Nitrobenzaldehyd unter Freilassung von Protonen, wodurch der pH-Wert der Reaktionslösung sinkt. Voraussetzung für die Anwendung dieser Methode ist, dass alle eingesetzten Enzyme bei dem anfänglichen pH-Wert stabil sind, und dass die verwendete Laccase 2-Nitrobenzaldehyd nicht umsetzt.

Die durchgeführte Studie zeigte, dass sich die Reaktionsgeschwindigkeiten für die Umsetzung von Coniferylalkohol bei den verschiedenen Laccasen und der Peroxidase unterscheiden.^[241] Die schnellste Umsetzung wurde mit Lcc gemessen, die langsamste mit CgL1. Die Menge an gebildetem (\pm)-Pinoresinol nahm über die Zeit wieder ab, wobei dieser Prozess ebenfalls am schnellsten mit Lcc und am langsamsten mit CgL1 erfolgte. Zudem wurden mit Lcc niedrigere (\pm)-Pinoresinolkonzentrationen erzielt als mit CgL1. Ein Grund hierfür könnte das unterschiedliche Redoxpotential des Typ-1-Kupferions der untersuchten Laccasen sein. Das Redoxpotential ist eine wichtige Enzymeigenschaft von Laccasen und Peroxidasen, das vor allem die katalytische Effizienz und das Substratspektrum beeinflusst.^[257] Für den Umsatz von Coniferylalkohol wurde in dieser Arbeit beobachtet, dass schnelle Substratumsetzungen mit höheren Redoxpotentialen der Laccasen korrespondieren.^[241] Die Ergebnisse von Shiba *et al.*^[143] stützen diese Hypothese: Coniferylalkohol wurde von der Laccase aus *P. coccineus* (Redoxpotential: 720 mV)^[258] schneller umgesetzt als von der Laccase aus *R. vernicifera* (Redoxpotential: 434 mV).^[259] Folglich geht der Vorteil einer schnelleren Umsetzung von Coniferylalkohol bei Verwendung einer Laccase mit hohem Redoxpotential mit dem Nachteil einher, dass eine geringere Konzentration von (\pm)-Pinoresinol erzielt wird, da dieses Produkt aufgrund des höheren Redoxpotentials schneller weiteroxidiert wird und nachfolgend Oligo- und Polymere gebildet werden.

Zum Schutz des gebildeten (\pm)-Pinoresinols vor einer weiteren Oligo- bzw. Polymerisierung wurden Zweiphasenreaktionssysteme mit nicht-wassermischbaren organischen Lösungsmitteln eingesetzt und hinsichtlich der Produktion von (\pm)-Pinoresinol und des Verteilungskoeffizienten ($\log P$ -Wert) analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Zweiphasenreaktionssysteme mit einem hohen $\log P$ -Wert für Pinoresinol zu einer *in-situ*-Extraktion dieses Produktes aus dem Reaktionsansatz führten, wodurch höhere Pinoresinolkonzentrationen im Vergleich zum wässrigen Reaktionssystem erzielt wurden. Konkret konnten für Zweiphasenreaktionssysteme mit Isooctan und *tert*-Butylmethylether

(tBME) im Vergleich zum wässrigen System um den Faktor 1,8 bzw. 3,0 verbesserte Pinoresinolkonzentrationen erzielt werden. Dieses Prinzip des Schutzes von Dimeren vor weiteren Oxidationen wurde auch für die Catecholoxidation durch die Laccase aus *R. vernicifera* im Zweiphasenreaktionssystem mit Dichlormethan gezeigt.^[260]

Unter optimierten Bedingungen konnte ausgehend von dem Substrat Eugenol mit Hilfe der *in-vitro*-Kaskade bestehend aus PsVAO und Cg1 eine (±)-Pinoresinolkonzentration von 4,4 mM (entspricht 1,6 g L⁻¹) erzielt werden. Ein volumetrisches *Up-Scaling* erzielte bei einem Substratumsatz von 50 % eine Produktausbeute von 13 %. Im Vergleich zu bisher beschriebenen biokatalytischen oder chemischen Synthesen sowie der Isolation von Pinoresinol aus natürlichen Quellen wurden in diesem neuen Ansatz der Arbeitsaufwand und die Kosten für das Substrat reduziert (Eugenol: 100 g kosten 24 €).

Die bisher beschriebenen biokatalytischen Synthesen verwendeten Coniferylalkohol als Substrat (100 mg kosten 92 €) und erzielten geringere Produktausbeuten (Pickel *et al.*: 10 %, ^[189] Mitsuhashi *et al.*: 4 % ^[182]). Auch chemische Synthesen verwendeten z.T. Coniferylalkohol als Substrat. Vermes *et al.* etablierten die einstufige Synthese von (±)-Pinoresinol aus Coniferylalkohol.^[112] Die Reaktion wurde von CuSO₄, Luft und Licht katalysiert und erzielte eine Produktausbeute von 12 %. Verschiedenen Arbeitsgruppen gelang die Synthese ausgehend von einem preiswerten Substrat, allerdings zu Ungunsten des Arbeitsaufwandes. Maruyama *et al.* synthetisierten (±)-Pinoresinol in einer sechsstufigen Synthese ausgehend von Methylacetoacetat (100 g kosten 12,40 €) mit einer Produktausbeute von 13 %, ^[261] Pelter *et al.* in einer dreistufigen Synthese ausgehend von Ferulasäure (100 g kosten 116,50 €) mit einer Produktausbeute von 3 %, ^[262] Roy *et al.* etablierten eine sechsstufige Synthese ausgehend von 4-Benzyloxy-3-methoxybenzaldehyd (100 g kosten 118€). Für dieses Beispiel ist die Berechnung der isolierten Ausbeute nicht möglich, da nicht von allen Syntheseschritten die Ausbeute angegeben wurde.^[263]

Die Isolation von Pinoresinol aus Pflanzen ist mit einem hohen Arbeitsaufwand und geringen Ausbeuten verbunden. Es sind sowohl mehrfache Extraktionsschritte mit verschiedenen Lösungsmitteln (z.T. auch mit Laugen bei 60°C) notwendig, als auch mehrfache Aufreinigungen. Der Pinoresinolgehalt in *Sesamum indicum* L. beträgt 0,01 mg pro 100 g Frischgewicht;^[264] im Samen von *S. indicum* L. und in *Daphne genkwa* ist der Gehalt mit 30 mg pro 100 g Frischgewicht deutlich höher.^[224,265] Ein Vergleich zur Extraktion von Pinoresinol aus *Linum flavum* ist schwierig, da gefriergetrocknetes Pflanzenmaterial verwendet wurde (5,5 mg aus 6,3 g Material).^[266] Der Vorteil bei der Extraktion aus bestimmten Pflanzen besteht darin, dass Pinoresinol im Enantiomerenüberschuss oder sogar in enantiomerenreiner Form isoliert werden kann (z.B. (+)-Pinoresinol aus *Linum compactum* (ee-Wert 70 %); (-)-Pinoresinol aus *D. genkwa* (ee-Wert 95 %)).^[224,266] Dies kann bis heute durch chemische Synthesen nicht erreicht werden. Auch die biokatalytische Synthese von

enantiomerenreinem Pinoresinol mit Hilfe von Laccase oder Peroxidase allein ist nicht möglich, da die oxidative Kupplung über einen unselektiven Radikalmechanismus verläuft.

3.3. Synthese von enantiomerenreinem (+)- und (-)-Pinoresinol

Eine in der Biokatalyse weit verbreitete Methode zur Gewinnung enantiomerenreiner Substanzen ist die kinetische Racematspaltung. Hierbei macht man sich die Eigenschaft von Enzymen zunutze, dass sie oftmals selektiv die Umsetzung nur eines Enantiomers katalysieren, wodurch das andere Enantiomer angereichert wird. Während die Ausbeute einer klassischen kinetischen Racematspaltung theoretisch bei max. 50 % liegt, kann durch Anwendung der sogenannten dynamischen kinetischen Racematspaltung, bei der das nicht-umgesetzte Enantiomer wieder in ein Racemat überführt wird (durch einen chemischen oder zusätzlichen enzymatischen Schritt), die theoretische Ausbeute bis auf 100 % gesteigert werden.^[267]

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich die Methode der kinetischen Racematspaltung auch für die Synthese von enantiomerenreinem (+)- oder (-)-Pinoresinol anwenden lässt. Dabei erfolgt eine enantiospezifische Reduktion eines Enantiomers von Pinoresinol zu Lariciresinol bzw. Secoisolariciresinol mittels einer enantioselektiven Pinoresinolreduktase. Hierfür wurde die bereits etablierte Kaskade bestehend aus PsVAO und Laccase um die Pinoresinolreduktase 2 aus *A. intermedia* (AtPrR2) bzw. die Pinoresinol/Lariciresinolreduktase aus *F. intermedia* (FiPLR) erweitert.

Die Synthese von enantiomerenangereichertem (+)-Pinoresinol konnte in einem *Proof-of-concept*-Experiment nachgewiesen werden. In einem *in-vitro*-Experiment mit AtPrR2 wurden ee-Werte von 34 % für (+)-Pinoresinol erzielt, allerdings konnte dieser Wert aufgrund mangelnder Stabilität von AtPrR2 gegenüber *t*BME und Eugenol nicht weiter gesteigert werden.^[268]

Um diese Problematik zu lösen, wurde die Nutzung eines Ganzzellsystems erprobt. Dies bietet neben der Erhöhung der Enzymstabilität den Vorteil, dass die Cofaktorregenerierung für AtPrR2 durch den Zellmetabolismus erfolgt. Die Anwendung dieses Systems ermöglichte unter optimierten Bedingungen die Synthese von (+)-Pinoresinol mit ee-Werten von ≥ 96 % und einer Produktausbeute von 12 %. Als „Nebenprodukt“ der Racematspaltung entstand dabei (-)-Lariciresinol (ee-Wert = 85 %; Produktausbeute 11 %). Durch Austausch von AtPrR2 durch FiPLR konnte (-)-Pinoresinol mit einem ee-Wert von 97 % synthetisiert werden. Hierbei entstand als „Nebenprodukt“ (-)-Secoisolariciresinol (ee-Wert ≥ 99 %).^[268]

Bei Anwendung des designten Ganzzellbiokatalysators wurde festgestellt, dass nicht alle bakteriellen Laccasen für die Synthese von Pinoresinol ausgehend von Eugenol geeignet sind.

Die Synthese von (\pm)-Pinoresinol wurde in Eugenolumsetzungen mit *E. coli* OverExpress C41(DE3)-Zellen nachgewiesen, die PsVAO und die bakterielle Laccase Ssl1 oder CgL1 überexprimierten. Die besten Ergebnisse wurden bei Verwendung von CgL1 erzielt (1,2 mM nach 8 h Reaktionszeit). Im Vergleich zur *in-vitro*-Eintopfsynthese konnte die Reaktionszeit um den Faktor 12 reduziert werden. Bei Ganzzellumsetzungen mit Zellen, die PsVAO und CotA coexprimierten, wurde zwar die Abnahme des Substrates Eugenol, aber weder die Bildung des Intermediates Coniferylalkohol noch des Produktes Pinoresinol detektiert. CotA oxidierte vermutlich direkt das Substrat Eugenol. Mögliche Gründe könnten die unterschiedlichen Expressionslevel (CgL1: 35 mg L⁻¹ Kulturmedium, Ssl1: 40 – 50 mg L⁻¹ Kulturmedium, CotA: 100 mg L⁻¹ Kulturmedium)^[239,250,269] sowie die unterschiedlichen Redoxpotentiale der Laccasen sein (siehe 3.2.).

Die Enzyme PsVAO, CgL1 und AtPrR2 wurden in *E. coli* OverExpress C41 (DE3) coexprimiert und die Umsetzungen von Eugenol hinsichtlich der erzielten Pinoresinolkonzentration, ee-Wert und Zellvitalität analysiert.^[268] Es zeigte sich, dass bei steigender Substratkonzentration die Menge an gebildetem Pinoresinol zunahm, der ee-Wert und die Zellvitalität allerdings abnahmen. Mit diesem System konnten bei einer stufenweisen Zugabe von Eugenol mit einer Endkonzentration von 3 mM ee-Werte von ≥ 99 % erreicht werden, allerdings lediglich eine Pinoresinolkonzentration von 63 μ M. Die Abnahme der Zellvitalität beruht auf der antibakteriellen Wirkung von Eugenol und wurde bereits für verschiedene Mikroorganismen gezeigt.^[221,268,270] In Angiospermen wird Eugenol zur Verteidigung gegen Herbivore, Mikroorganismen und Pilze synthetisiert.^[271] Die Abnahme der Zellvitalität deutet auf die Zellyse des Ganzzellbiokatalysators hin. Dies hat vermutlich zur Folge, dass zum einen AtPrR2 mit Eugenol in direkten Kontakt kommt und dass zum anderen das Cofaktorregenerierungssystem zusammenbricht, wodurch die kinetische Racematspaltung zum Erliegen kommt.

Um den negativen Einfluss von Eugenol auf die Reaktion von AtPrR2 zu reduzieren, wurde eine Abkopplung der kinetischen Racematspaltung von (\pm)-Pinoresinol und seiner Synthese vorgenommen. Es wurde ein sequentieller Ansatz mit zwei *E. coli* Ganzzellbiokatalysatoren durchgeführt: Die Typ 1-*E. coli*-Zellen coexprimieren PsVAO und CgL1 und die Typ 2-*E. coli*-Zellen exprimieren entweder AtPrR2 oder FiPLR. Dies ermöglichte in Abhängigkeit von der verwendeten Reduktase die Synthese von 0,9 mM bzw. 0,6 mM enantiomerenreinem (+)- oder (-)-Pinoresinol. Dies entspricht einer um den Faktor 11 verbesserten Produktkonzentration im Vergleich zum Ansatz der stufenweisen Eugenolzugabe.

Alternative Ansätze wären die Erhöhung der Biokompatibilität von *E. coli* oder die Verwendung eines anderen Ganzzellbiokatalysators. Die Überexpression der Exporter OmpA und FadL in *E. coli* könnte die Zellvitalität erhöhen, da diese möglicherweise Phenylpropanoide

aus der Zelle exportieren und an der Reparatur von Zellwandschäden beteiligt sein könnten.^[272] *Corynebacterium* und *Pseudomonas* sind mögliche alternative Wirtsorganismen zu *E. coli*, da sie Eugenol als C-Quelle nutzen können und somit eine gewisse Resistenz gegen seine antibakterielle Wirkung besitzen sollten.^[273] So wurden z.B. bei der Kultivierung von *Pseudomonas* sp. Stamm HR199 6,5 mM Eugenol eingesetzt, bei *P. fluorescens* sogar 16 mM. Allerdings müsste vor Verwendung dieser Mikroorganismen zur Synthese von Pinoresinol möglicherweise ein Knockout der für die Metabolisierung von Eugenol zuständigen Enzyme vorgenommen werden, um den Abbau von Eugenol zu verhindern. Eine weitere Option wäre die Biotransformation von Eugenol in *S. cerevisiae*. Lambert *et al.* produzierten mit einem genetisch veränderten *S. cerevisiae* Stamm Ferulasäure ausgehend von ca. 18 mM Eugenol.^[274]

Ein Nachteil bei der Verwendung des Ganzzellsystems zur Synthese von Pinoresinol war die Bildung von Coniferylaldehyd, welches aus dem Intermediat Coniferylalkohol gebildet wurde. Vermutlich wurde Coniferylalkohol durch eine *E. coli*-eigene Alkoholdehydrogenase (ADH) oxidiert. Durch Zugabe einer Kohlenstoffquelle konnte diese Oxidation deutlich vermindert werden, in geringen Mengen wurde allerdings noch Coniferylaldehyd gebildet. Dies könnte durch Verwendung eines ADH-defizienten *E. coli* Stamms möglicherweise vollständig verhindert werden. Die Generierung eines solchen Stammes wurde bereits von Kunjapur *et al.* beschrieben.^[275]

3.4. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurden folgende Ziele verfolgt: (I) Erweiterung des Spektrums verfügbarer bakterieller Laccasen, (II) Entwicklung einer multi-enzymatischen Kaskade zur Synthese des Lignans (±)-Pinoresinol mittels bakterieller Laccasen und (III) Anwendung der kinetischen Racematspaltung zur Synthese von enantiomerenreinem Pinoresinol (und weiteren Lignanen).

CgL1 ist ein aus biotechnologischer Sicht interessanter Biokatalysator, da er einfach in *E. coli* exprimierbar ist und bei erhöhten Temperaturen und pH-Werten sowie gegenüber organischen Lösungsmitteln stabil ist. Die Anwendung von CgL1 als Biokatalysator wurde sowohl *in vitro* anhand der Oxidation einer Vielzahl von phenolischen Substraten gezeigt, als auch *in vivo* für die Synthese von Pinoresinol. Zusätzlich konnte die Oxidation von Cu(I) nachgewiesen werden. Das Redoxpotential von CgL1 ist relativ niedrig; dies ist für bestimmte Synthesen von Vorteil, da die Zielprodukte nicht überoxidiert werden.

Die Eintopfsynthese von Pinoresinol mittels der Vanillylalkoholoxidase aus *P. simplicissimum* und CgL1 ist die erste literaturbeschriebene Kaskade zur Herstellung von Feinchemikalien mittels bakterieller Laccasen. Im Vergleich zu bisherigen chemischen und biokatalytischen Ansätzen zur Synthese von (±)-Pinoresinol konnte die Effizienz hinsichtlich

der Anzahl der Arbeitsschritte und der Kosten verbessert werden. Die Methode der kinetischen Racematspaltung mittels Pinoresinolreduktasen konnte für die Synthese von enantiomerenreinem (+)- und (-)-Pinoresinol angewendet werden. Auch die Synthese von enantiomerenreinem (-)-Lariciresinol und (-)-Secoisolariciresinol aus Eugenol wurde mit diesem System gezeigt. Die etablierte Kaskade kann daher als Grundlage für die Synthese weiterer Lignane, z.B. Lariciresinol, Secoisolariciresinol oder Matairesinol (als Vorstufe des Krebsmedikamentes Podophyllotoxins), dienen.

Zusammenfassend betrachtet wurde das Spektrum an verfügbaren bakteriellen Laccasen um eine Laccase aus *C. glutamicum* erweitert. Das Potential bakterieller Laccasen für biokatalytische Anwendungen und für multi-enzymatische Kaskaden (als Eintopfsynthesen) wurde anhand der bakteriellen Laccase CgL1 aufgezeigt. Die etablierte Synthese von enantiomerenreinem Pinoresinol eröffnet den Zugang zu biokatalytischen Synthesen weiterer Lignane.

4. Literaturverzeichnis

- [1] R. Wohlgemuth, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 713–724.
- [2] A. Schmid, J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, *Nature* **2001**, *409*, 258–268.
- [3] P. Anastas, N. Eghbali, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 301–312.
- [4] R. Wohlgemuth, *N. Biotechnol.* **2009**, *25*, 204–213.
- [5] P. Grunwald, *Biocatalysis. Biochemical fundamentals and applications*, Imperial College Press, London, **2009**.
- [6] B. M. Nestl, B. A. Nebel, B. Hauer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 187–193.
- [7] R. A. Gross, A. Kumar, B. Kalra, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2097–2124.
- [8] F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, K. Buehler, A. Schallmey, B. Bühler, *Green Chem.* **2011**, *13*, 226–265.
- [9] M. T. Reetz, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12480–12496.
- [10] U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, *485*, 185–194.
- [11] H. Kries, R. Blomberg, D. Hilvert, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 221–228.
- [12] M. Dörr, D. Böttcher, A. Hummel, M. Höhne, U. T. Bornscheuer, *Biospektrum* **2015**, *21*, 230–231.
- [13] J. Lima-Ramos, W. Neto, J. M. Woodley, *Top. Catal.* **2014**, *57*, 301–320.
- [14] K. Drauz, H. Gröger, O. May, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2012**.
- [15] a) P. A. Santacoloma, G. Sin, K. V. Gernaey, J. M. Woodley, *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 203–212; b) K. B. Otte, B. Hauer, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2015**, *35*, 16–22.
- [16] N. J. Turner, E. O'Reilly, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 285–288.
- [17] K. Nakamura, N. Go, *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 2050–2066.
- [18] H. Yoshida, *J. Chem. Soc., Trans.* **1883**, *43*, 472–486.
- [19] C. F. Thurston, *Microbiology* **1994**, *140*, 19–26.
- [20] B. G. Malmstrom, R. Mosbach, T. Vanngard, *Nature* **1959**, *183*, 321–322.
- [21] O. V. Morozova, G. P. Shumakovich, S. V. Shleev, A. I. Iaropolov, *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* **2007**, *43*, 583–597.
- [22] S. Riva, *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 219–226.
- [23] A. Mikolasch, K. Manda, R. Schlüter, M. Lalk, S. Witt, S. Seefeldt, E. Hammer, F. Schauer, W.-D. Jülich, U. Lindequist, *Biotechnol. Appl. Bioc.* **2012**, *59*, 295–306.
- [24] A. Intra, S. Nicotra, S. Riva, B. Danieli, *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 973–977.
- [25] S. Ncanana, L. Baratto, L. Roncaglia, S. Riva, S. G. Burton, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1507–1513.

- [26] S. Nicotra, A. Intra, G. Ottolina, S. Riva, B. Danieli, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2927–2931.
- [27] a) H. Uchida, T. Fukuda, H. Miyamoto, T. Kawabata, M. Suzuki, T. Uwajima, *Biochem. Biophys. Res. Co.* **2001**, *287*, 355–358; b) K. Koschorreck, S. M. Richter, A. Swierczek, U. Beifuss, R. D. Schmid, V. B. Urlacher, *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, *474*, 213–219.
- [28] K. Koschorreck, S. M. Richter, A. B. Ene, E. Roduner, R. D. Schmid, V. B. Urlacher, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *79*, 217–224.
- [29] S. Kawai, T. Umezawa, T. Higuchi, *Arch. Biochem. Biophys.* **1988**, *262*, 99–110.
- [30] F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, *Polymers* **2012**, *4*, 759–793.
- [31] S. Kawai, T. Umezawa, M. Shimada, T. Higuchi, *FEBS Lett.* **1988**, *236*, 309–311.
- [32] J. M. Harkin, M. J. Larsen, J. R. Obst, *Mycologia* **1974**, *66*, 469–476.
- [33] P. Baldrian, *FEMS Microbiol. Rev.* **2006**, *30*, 215–242.
- [34] A. Mayer, *Phytochemistry* **2002**, *60*, 551–565.
- [35] O. V. Morozova, G. P. Shumakovich, M. A. Gorbacheva, S. V. Shleev, A. I. Yaropolov, *Biochemistry Mosc.* **2007**, *72*, 1136–1150.
- [36] M. J. Butler, A. W. Day, *Can. J. Microbiol.* **1998**, *44*, 1115–1136.
- [37] L. Munk, A. K. Sitarz, D. C. Kalyani, J. D. Mikkelsen, A. S. Meyer, *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 13–24.
- [38] A. Givaudan, A. Effosse, D. Faure, P. Potier, M.-L. Bouillant, R. Bally, *FEMS Microbiol. Rev.* **1993**, *108*, 205–210.
- [39] A. Sanchez-Amat, F. Solano, *Biochem. Biophys. Res. Co.* **1997**, *240*, 787–792.
- [40] G. Alexandre, I. B. Zhulin, *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 41–42.
- [41] a) T. Xie, Z. Liu, Q. Liu, G. Wang, *J. Struct. Biol.* **2015**, *190*, 155–161; b) P. Durão, Z. Chen, A. T. Fernandes, P. Hildebrandt, D. H. Murgida, S. Todorovic, M. M. Pereira, E. P. Melo, L. O. Martins, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 183–193; c) T. Beneyton, A. El Harrak, A. D. Griffiths, P. Hellwig, V. Taly, *Electrochem. Commun.* **2011**, *13*, 24–27.
- [42] E. P. Melo, A. T. Fernandes, P. Durão, L. O. Martins, *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35*, 1579–1582.
- [43] P. Durão, Z. Chen, C. S. Silva, C. M. Soares, M. M. Pereira, S. Todorovic, P. Hildebrandt, I. Bento, P. F. Lindley, L. O. Martins, *Biochem. J.* **2008**, *412*, 339–346.
- [44] L. O. Martins, C. M. Soares, M. M. Pereira, M. Teixeira, T. Costa, G. H. Jones, A. O. Henriques, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 18849–18859.
- [45] M.-F. Hullo, I. Moszer, A. Danchin, I. Martin-Verstraete, *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 5426–5430.
- [46] N. Santhanam, J. M. Vivanco, S. R. Decker, K. F. Reardon, *Trends Biotechnol.* **2011**, *29*, 480–489.
- [47] M. Gunne, A. Höppner, P.-L. Hagedoorn, V. B. Urlacher, *FEBS J.* **2014**, *281*, 4307–4318.

- [48] K. Kataoka, H. Kogi, S. Tsujimura, T. Sakurai, *Biochem. Bioph. Res. Co.* **2013**, *431*, 393–397.
- [49] K. Endo, K. Hosono, T. Beppu, K. Ueda, *Microbiology* **2002**, *148*, 1767–1776.
- [50] a) S. Castro-Sowinski, G. Martinez-Drets, Y. Okon, *FEMS Microbiol. Lett.* **2002**, *209*, 119–125; b) D. Faure, M. L. Bouillant, R. Bally, *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 3413–3415.
- [51] S. Schelder, D. Zaade, B. Litsanov, M. Bott, M. Brocker, *PLoS ONE* **2011**, *6*, e22143.
- [52] G. Grass, C. Rensing, *Biochem. Bioph. Res. Co.* **2001**, *286*, 902–908.
- [53] a) J. S. Cha, D. A. Cooksey, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, *88*, 8915–8919; b) Y. A. Lee, M. Hendson, N. J. Panopoulos, M. N. Schroth, *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 173–188.
- [54] G. J. Brouwers, J. P. de Vrind, P. L. Corstjens, P. Cornelis, C. Baysse, E. W. de Vrind-de Jong, *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 1762–1768.
- [55] a) B. R. M. Reinhammar, *BBA-Bioenergetcis* **1970**, *205*, 35–47; b) W. Nakamura, *J. Biochem.* **1967**, *62*, 54–61.
- [56] L. Liu, J. F. D. Dean, W. E. Friedman, K.-E. L. Eriksson, *Plant J.* **1994**, *6*, 213–224.
- [57] R. Sterjiades, J. F. D. Dean, G. Gamble, D. S. Himmelsbach, K.-E. Eriksson, *Planta* **1993**, *190*, 75–87.
- [58] M. C. Kiefer-Meyer, V. Gomord, A. O'Connell, C. Halpin, L. Faye, *Gene* **1996**, *178*, 205–207.
- [59] P. Ranocha, G. McDougall, S. Hawkins, R. Sterjiades, G. Borderies, D. Stewart, M. Cabanes-Macheteau, A. M. Boudet, D. Goffner, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *259*, 485–495.
- [60] a) B. C. McCaig, R. B. Meagher, J. F. D. Dean, *Planta* **2005**, *221*, 619–636; b) D. Caparrós-Ruiz, S. Fornalé, L. Civardi, P. Puigdomènech, J. Rigau, *Plant Sci.* **2006**, *171*, 217–225.
- [61] B. Gavnholt, K. Larsen, S. K. Rasmussen, *Plant Sci.* **2002**, *162*, 873–885.
- [62] L. Tomková, L. Kučera, K. Vaculová, J. Milotová, *Plant Sci.* **2012**, *183*, 77–85.
- [63] G. N. Kumar, K. Srikumar, *Biomed. Chromatogr.* **2011**, *25*, 707–711.
- [64] G. N. Kumar, S. Kotteazeth, *Chem. Nat. Compd.* **2012**, *48*, 451–456.
- [65] P. R. LaFayette, K.-E. L. Eriksson, J. F. D. Dean, *Plant Mol. Biol.* **1999**, *40*, 23–35.
- [66] a) P. V. Turlapati, K.-W. Kim, L. B. Davin, N. G. Lewis, *Planta* **2011**, *233*, 439–470; b) Y. Sato, B. Wuli, R. Sederoff, R. Whetten, *J. Plant. Res.* **2001**, *114*, 147–155.
- [67] a) M. Schuetz, A. Benske, R. A. Smith, Y. Watanabe, Y. Tobimatsu, J. Ralph, T. Demura, B. Ellis, A. L. Samuels, *Plant Physiol.* **2014**, *166*, 798–807; b) W. Bao, D. M. O'Malley, R. Whetten, R. R. Sederoff, *Science* **1993**, *260*, 672–674.
- [68] M. Liang, E. Davis, D. Gardner, X. Cai, Y. Wu, *Planta* **2006**, *224*, 1185–1196.
- [69] L. B. Davin, H. B. Wang, A. L. Crowell, D. L. Bedgar, D. M. Martin, S. Sarkanen, N. G. Lewis, *Science* **1997**, *275*, 362–366.
- [70] J. T. Hoopes, J. F. D. Dean, *Plant Physiol. Biochem.* **2004**, *42*, 27–33.
- [71] G.-D. Wang, Q.-J. Li, B. Luo, X.-Y. Chen, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 893–897.

- [72] P. Galuszka, J. Frébortová, L. Luhová, K. D. Bilyeu, J. T. English, I. Frébort, *Plant Cell Physiol.* **2005**, *46*, 716–728.
- [73] a) H. I. Yamazaki, *J. Insect Physiol.* **1969**, *15*, 2203–2211; b) H. I. Yamazaki, *Insect Biochem.* **1972**, *2*, 431–444.
- [74] N. M. Parkinson, C. M. Conyers, J. N. Keen, A. D. MacNicoll, I. Smith, R. J. Weaver, *Comp. Biochem. Phys. C* **2003**, *134*, 513–520.
- [75] N. T. Dittmer, R. J. Suderman, H. Jiang, Y.-C. Zhu, M. J. Gorman, K. J. Kramer, M. R. Kanost, *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *34*, 29–41.
- [76] Y. Arakane, S. Muthukrishnan, R. W. Beeman, M. R. Kanost, K. J. Kramer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 11337–11342.
- [77] B.-L. Niu, W.-F. Shen, Y. Liu, H.-B. Weng, L.-H. He, J.-J. Mu, Z.-L. Wu, P. Jiang, Y.-Z. Tao, Z.-Q. Meng, *Insect Mol. Biol.* **2008**, *17*, 303–312.
- [78] X. Wu, X. Zhan, M. Gan, D. Zhang, M. Zhang, X. Zheng, Y. Wu, Z. Li, A. He, *Parasitol. Res.* **2013**, *112*, 1929–1934.
- [79] a) M. Hattori, K. Tsuchihara, H. Noda, H. Konishi, Y. Tamura, T. Shinoda, M. Nakamura, T. Hasegawa, *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2010**, *40*, 331–338; b) A. P. Alves, M. D. Lorenzen, R. W. Beeman, J. E. Foster, B. D. Siegfried, *J. Insect Sci.* **2010**, *10*, 162.
- [80] M. Elias-Neto, M. P. M. Soares, Z. L. P. Simões, K. Hartfelder, M. M. G. Bitondi, *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2010**, *40*, 241–251.
- [81] R. Futahashi, K. Tanaka, Y. Matsuura, M. Tanahashi, Y. Kikuchi, T. Fukatsu, *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2011**, *41*, 191–196.
- [82] N. T. Dittmer, M. R. Kanost, *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2010**, *40*, 179–188.
- [83] Y. Masuoka, S. Miyazaki, R. Saiki, T. Tsuchida, K. Maekawa, *Arthropod. Struct. Dev.* **2013**, *42*, 469–475.
- [84] K. K. Sharma, R. C. Kuhad, *Indian J. Microbiol.* **2009**, *49*, 142–150.
- [85] S. Uthandi, B. Saad, M. A. Humbard, J. A. Maupin-Furlow, *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 733–743.
- [86] A. T. Fernandes, J. M. Damas, S. Todorovic, R. Huber, M. C. Baratto, R. Pogni, C. M. Soares, L. O. Martins, *FEBS J.* **2010**, *277*, 3176–3189.
- [87] S. Uthandi, L. Prunetti, I. M. S. De Vera, G. E. Fanucci, A. Angerhofer, J. A. Maupin-Furlow, *J. Ind. Microbiol. Biot.* **2012**, *39*, 1523–1532.
- [88] N. Hakulinen, J. Rouvinen, *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, *72*, 857–868.
- [89] a) V. Ducros, G. J. Davies, D. M. Lawson, K. S. Wilson, S. H. Brown, P. Østergaard, A. H. Pedersen, P. Schneider, D. S. Yaver, A. M. Brzozowski, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **1997**, *53*, 605–607; b) V. Ducros, A. M. Brzozowski, K. S. Wilson, S. H. Brown, P. Østergaard, P. Schneider, D. S. Yaver, A. H. Pedersen, G. J. Davies, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1998**, *5*, 310–316.

- [90] F. J. Enguita, L. O. Martins, A. O. Henriques, M. A. Carrondo, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 19416–19425.
- [91] T. Skálová, J. Dohnálek, L. H. Østergaard, P. R. Østergaard, P. Kolenko, J. Dušková, A. Štěpánková, J. Hašek, *J. Mol. Biol.* **2009**, *385*, 1165–1178.
- [92] E. I. Solomon, *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 8012–8025.
- [93] H. Claus, *Arch. Microbiol.* **2003**, *179*, 145–150.
- [94] E. I. Solomon, M. D. Lowery, *Science* **1993**, *259*, 1575–1581.
- [95] S. Wherland, O. Farver, I. Pecht, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2014**, *19*, 541–554.
- [96] E. I. Solomon, A. J. Augustine, J. Yoon, *Dalton Trans.* **2008**, *30*, 3921–3932.
- [97] H. Komori, K. Miyazaki, Y. Higuchi, *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 1189–1195.
- [98] P. Giardina, V. Faraco, C. Pezzella, A. Piscitelli, S. Vanhulle, G. Sannia, *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, *67*, 369–385.
- [99] S. M. Jones, E. I. Solomon, *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, *72*, 869–883.
- [100] A. J. Augustine, M. E. Kragh, R. Sarangi, S. Fujii, B. D. Liboiron, C. S. Stoj, D. J. Kosman, K. O. Hodgson, B. Hedman, E. I. Solomon, *Biochemistry* **2008**, *47*, 2036–2045.
- [101] A. J. Augustine, C. Kjaergaard, M. Qayyum, L. Ziegler, D. J. Kosman, K. O. Hodgson, B. Hedman, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6057–6067.
- [102] H. Komori, R. Sugiyama, K. Kataoka, K. Miyazaki, Y. Higuchi, T. Sakurai, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2014**, *70*, 772–779.
- [103] C. S. Silva, J. M. Damas, Z. Chen, V. Brissos, L. O. Martins, C. M. Soares, P. F. Lindley, I. Bento, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2012**, *68*, 186–193.
- [104] K. Kataoka, R. Kitagawa, M. Inoue, D. Naruse, T. Sakurai, H.-w. Huang, *Biochemistry* **2005**, *44*, 7004–7012.
- [105] T. E. Machonkin, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12547–12560.
- [106] D. E. Heppner, C. H. Kjaergaard, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 17788–17801.
- [107] L. Quintanar, C. S. Stoj, T.-P. Wang, D. J. Kosman, E. I. Solomon, *Biochemistry* **2005**, *44*, 6081–6091.
- [108] J. Yoon, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13127–13136.
- [109] A. J. Augustine, L. Quintanar, C. S. Stoj, D. J. Kosman, E. I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13118–13126.
- [110] S. Yamamura, S. Nishiyama, *Synlett* **2002**, *4*, 533–543.
- [111] G. E. Magoulas, D. Papaioannou, *Molecules* **2014**, *19*, 19769–19835.
- [112] B. Vermes, O. Seligmann, H. Wagner, *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3087–3089.
- [113] S. Witayakran, A. J. Ragauskas, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2009**, *351*, 1187–1209.

- [114] L. Setti, S. Scali, I. D. Angeli, P. G. Pifferi, *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *22*, 656–661.
- [115] F. Ernst, C. Zwenger, *Ann. Chem. Pharm.* **1871**, *159*, 27–36.
- [116] S. Quideau, D. Deffieux, L. Pouységu in *Comprehensive Organic Synthesis II* (Eds.: P. Knochel, G. A. Molander), Elsevier, Amsterdam, **2014**, 656–740.
- [117] A. C. Sousa, M. C. Oliveira, L. O. Martins, M. P. Robalo, *Green Chem.* **2014**, *16*, 4127–4136.
- [118] S. Rodríguez Couto, J. L. Toca Herrera, *Biotechnol. Adv.* **2006**, *24*, 500–513.
- [119] a) T. Kudanga, M. Le Roes-Hill, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 6525–6542; b) A. Le Goff, M. Holzinger, S. Cosnier, *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, *72*, 941–952.
- [120] J. F. Osma, J. L. Toca-Herrera, S. Rodríguez-Couto, *Enzyme Res.* **2010**, *2010*, 1–8.
- [121] A. A. Telke, A. N. Kagalkar, U. B. Jagtap, N. S. Desai, V. A. Bapat, S. P. Govindwar, *Planta* **2011**, *234*, 1137–1149.
- [122] G. N. Kumar, K. Srikumar, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2012**, *167*, 662–676.
- [123] H. P. Call, I. Mücke, *J. Biotechnol.* **1997**, *53*, 163–202.
- [124] S. Camarero, O. García, T. Vidal, J. Colom, J. C. del Río, A. Gutiérrez, J. M. Gras, R. Monje, M. J. Martínez, Á. T. Martínez, *Enzyme Microb. Technol.* **2004**, *35*, 113–120.
- [125] R. Campos, A. Kandelbauer, K. H. Robra, A. Cavaco-Paulo, G. M. Guebitz, *J. Biotechnol.* **2001**, *89*, 131–139.
- [126] a) H. I. Oh, J. E. Hoff, G. S. Armstrong, L. A. Haff, *J. Agric. Food Chem.* **1980**, *28*, 394–398; b) J. P. van Buren, R. O. Way, *J. Food. Science* **1978**, *43*, 1235–1237; c) M. Schroeder, B. Pöllinger-Zierler, N. Aichernig, B. Siegmund, G. M. Guebitz, *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 2485–2489.
- [127] K. Brijwani, A. Rigdon, P. V. Vadlani, *Enzyme Res.* **2010**, *2010*, 149748.
- [128] T. Ozdal, E. Capanoglu, F. Altay, *Food Res. Int.* **2013**, *51*, 954–970.
- [129] a) R. C. Minussi, M. Rossi, L. Bologna, D. Rotilio, G. M. Pastore, N. Durán, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2007**, *45*, 102–107; b) M. Neifar, R. Ellouze-Ghorbel, A. Kamoun, S. Baklouti, A. Mokni, A. Jaouani, S. Ellouze-Chaabouni, *J. Food Process Eng.* **2011**, *34*, 1199–1219; c) T. M. D. S. Bezerra, J. C. Bassan, V. T. D. O. Santos, A. Ferraz, R. Monti, *Process Biochem.* **2015**, *50*, 417–423; d) T. E. Mathiasen, WO 95/21240, **1995**.
- [130] L. S. Conrad, W. R. Sponholz, O. Berker, US6152966, **2000**.
- [131] a) J. Q. Si, US6296883, **2001**; b) S. Renzetti, C. M. Courtin, J. A. Delcour, E. K. Arendt, *Food Chem.* **2010**, *119*, 1465–1473.
- [132] T. Kudanga, G. S. Nyanhongo, G. M. Guebitz, S. G. Burton, *Enzyme Microb. Technol.* **2011**, *48*, 195–208.
- [133] R. Huang, P. A. Christenson, I. M. Labuda, US6200786, **2001**.
- [134] U. Krings, V. Esparan, R. G. Berger, *Flavour Fragr. J.* **2015**, *30*, 362–365.

- [135] M. Mogharabi, M. A. Faramarzi, *Adv. Synth. Catal.* **2014**, *356*, 897–927.
- [136] A. Kunamneni, S. Camarero, C. García-Burgos, F. J. Plou, A. Ballesteros, M. Alcalde, *Microb. Cell Fact.* **2008**, *7*, 32.
- [137] a) C. Pezzella, L. Guarino, A. Piscitelli, *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, *72*, 923–940; b) K. W. Wellington in *Green chemistry* (Ed.: R. Luque), Nova Science Publishers, Hauppauge NY, **2012**, 167–212.
- [138] a) U. Thiyam, H. Stöckmann, T. Zum Felde, K. Schwarz, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2006**, *108*, 239–248; b) M.-E. Cuvelier, H. Richard, C. Berset, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1992**, *56*, 324–325; c) O. Firuzi, L. Giansanti, R. Vento, C. Seibert, R. Petrucci, G. Marrosu, R. Agostino, L. Saso, *J. Pharm. Pharmacol.* **2003**, *55*, 1021–1027.
- [139] a) K. E. Heim, A. R. Tagliaferro, D. J. Bobilya, *J. Nutr. Biochem.* **2002**, *13*, 572–584; b) P. G. Pietta, *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1035–1042.
- [140] a) O. E. Adelakun, T. Kudanga, A. Parker, I. R. Green, M. Le Roes-Hill, S. G. Burton, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, *74*, 29–35; b) F. F. Bruno, S. Nagarajan, R. Nagarajan, J. Kumar, L. A. Samuelson, *J. Marcomol. Sci. A* **2005**, *42*, 1547–1554.
- [141] M. Hosny, J. P. N. Rosazza, *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 5539–5545.
- [142] S. Ciecholewski, E. Hammer, K. Manda, G. Bose, T. H. van Nguyen, P. Langer, F. Schauer, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 4615–4619.
- [143] T. Shiba, L. Xiao, T. Miyakoshi, C.-L. Chen, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, *10*, 605–615.
- [144] R. Pezet, *FEMS Microbiol. Lett.* **1998**, *167*, 203–208.
- [145] A. Mikolasch, T. H. J. Niedermeyer, M. Lalk, S. Witt, S. Seefeldt, E. Hammer, F. Schauer, M. Gesell, S. Hessel, W.-D. Jülich, U. Lindequist, *Chem. Pharm. Bull.* **2006**, *54*, 632–638.
- [146] a) A. Mikolasch, T. H. J. Niedermeyer, M. Lalk, S. Witt, S. Seefeldt, E. Hammer, F. Schauer, M. Gesell Salazar, S. Hessel, W.-D. Jülich, U. Lindequist, *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 412–416; b) A. Mikolasch, M. Wurster, M. Lalk, S. Witt, S. Seefeldt, E. Hammer, F. Schauer, W.-D. Jülich, U. Lindequist, *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, *56*, 902–907.
- [147] a) V. Hahn, A. Mikolasch, K. Manda, D. Gördes, K. Thurow, F. Schauer, *Amino acids* **2009**, *37*, 315–321; b) K. Manda, E. Hammer, A. Mikolasch, D. Gördes, K. Thurow, F. Schauer, *Amino acids* **2006**, *31*, 409–419.
- [148] S. Herter, D. Michalik, A. Mikolasch, M. Schmidt, R. Wohlgemuth, U. T. Bornscheuer, F. Schauer, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, *90*, 91–97.
- [149] K. W. Wellington, P. Steenkamp, D. Brady, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 1406–1414.
- [150] a) J. Osiadacz, A. J. H. Al-Adhami, D. Bajraszewska, P. Fischer, W. Peczyńska-Czoch, *J. Biotechnol.* **1999**, *72*, 141–149; b) C. Eggert, U. Temp, J. F. D. Dean, K.-E. L. Eriksson,

- FEBS Lett.* **1995**, *376*, 202–206; c) F. Bruyneel, E. Enaud, L. Billottet, S. Vanhulle, J. Marchand-Brynaert, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 72–79.
- [151] V. Hahn, T. Davids, M. Lalk, F. Schauer, A. Mikolasch, *Green Chem.* **2010**, *12*, 879–887.
- [152] H. Leutbecher, M.-A. Constantin, S. Mika, J. Conrad, U. Beifuss, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 605–608.
- [153] a) H. T. Abdel-Mohsen, J. Conrad, U. Beifuss, *Green Chem.* **2014**, *16*, 90–95; b) M. D. Cannatelli, A. J. Ragauskas, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2015**, *119*, 85–89.
- [154] S. Suljić, J. Pietruszka, *Adv. Synth. Catal.* **2014**, *356*, 1007–1020.
- [155] a) M. D. Cannatelli, A. J. Ragauskas, *Chem. Eng. Res. Des.* **2015**, *97*, 128–134; b) K. W. Wellington, T. Qwebani-Ogunleye, N. I. Kolesnikova, D. Brady, C. B. de Koning, *Arch. Pharm.* **2013**, *346*, 266–277; c) J. Pietruszka, C. Wang, *Green Chem.* **2012**, *14*, 2402–2409; d) H. Leutbecher, J. Conrad, I. Klaiber, U. Beifuss, *Synlett* **2005**, 3126–3130; e) S. Hajdok, J. Conrad, U. Beifuss, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 445–459.
- [156] S. Witayakran, A. J. Ragauskas, *Green Chem.* **2007**, *9*, 475–480.
- [157] S. Kobayashi, A. Makino, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5288–5353.
- [158] R. Ikeda, J. Sugihara, H. Uyama, S. Kobayashi, *Polym. Int.* **1998**, *47*, 295–301.
- [159] N. Aktas, A. Tanyolac, *Bioresour. Technol.* **2003**, *87*, 209–214.
- [160] A. V. Karamyshev, S. V. Shleev, O. V. Koroleva, A. I. Yaropolov, I. Y. Sakharov, *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, *33*, 556–564.
- [161] M. Calafell, C. Díaz, H. Hadzhiyska, J. M. Gibert, J. M. Dagà, T. Tzanov, *Biocatal. Biotransformation* **2007**, *25*, 336–340.
- [162] S. Kobayashi, H. Uyama, R. Ikeda, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 4754–4760.
- [163] a) A. N. Semenov, I. V. Lomonsova, V. I. Berezin, M. I. Titov, *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, *42*, 1137–1141; b) J. M. M. Verkade, L. J. van Hemert, P. J. L. M. Quaedflieg, H. E. Schoemaker, M. Schürmann, F. L. van Delft, F. P. Rutjes, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1332–1336.
- [164] L. Martínez-Montero, A. Díaz-Rodríguez, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, I. Lavandera, *Green Chem.* **2015**, *17*, 2794–2798.
- [165] S. Hemmati, T. J. Schmidt, E. Fuss, *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 603–610.
- [166] T. Nakatsubo, M. Mizutani, S. Suzuki, T. Hattori, T. Umezawa, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 15550–15557.
- [167] M. A. Castro, M. Gordaliza, J. M. Miguel Del Corral, A. San Feliciano, *Phytochemistry* **1996**, *41*, 995–1011.
- [168] A. T. Dinkova-Kostova, D. R. Gang, L. B. Davin, D. L. Bedgar, A. Chu, N. G. Lewis, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 29473–29482.
- [169] I. V. Ogungbe, R. A. Crouch, T. Demeritte, *J. Chem. Inf. Model.* **2014**, *54*, 3051–3055.

- [170] H.-J. Kuo, Z.-Y. Wei, P.-C. Lu, P.-L. Huang, K.-T. Lee, *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 2687–2692.
- [171] a) P. Cos, L. Maes, A. Vlietinck, L. Pieters, *Planta Med.* **2008**, *74*, 1323–1337; b) J. L. Charlton, *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1447–1451; c) W. D. MacRae, J. B. Hudson, G. H. Towers, *Planta Med.* **1989**, *55*, 531–535; d) M. Saleem, H. J. Kim, M. S. Ali, Y. S. Lee, *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22*, 696–716; e) J. Harmatha, J. Nawrot, *Biochem. Syst. Ecol.* **1984**, *12*, 95–98; f) J. Harmatha, J. Nawrot, *Entomol. Exp. Appl.* **2002**, *104*, 51–60; g) J. Harmatha, L. Dinan, *Phytochem. Rev.* **2003**, *2*, 321–330.
- [172] M. Fujita, D. R. Gang, L. B. Davin, N. G. Lewis, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 618–627.
- [173] a) J. L. Adolphe, S. J. Whiting, B. H. J. Juurlink, L. U. Thorpe, J. Alcorn, *Br. J. Nutr.* **2010**, *103*, 929–938; b) A. Ayella, S. Lim, Y. Jiang, T. Iwamoto, D. Lin, J. Tomich, W. Wang, *Nutr. Res.* **2010**, *30*, 762–769; c) K. Buck, A. K. Zaineddin, A. Vrieling, J. Linseisen, J. Chang-Claude, *Am. J. Clin. Nutr.* **2010**, *92*, 141–153; d) J. Luo, Y. Hu, W. Kong, M. Yang, *PLoS ONE* **2014**, *9*, e93516; e) J. Peterson, J. Dwyer, H. Adlercreutz, A. Scalbert, P. Jacques, M. L. McCullough, *Nutr. Rev.* **2010**, *68*, 571–603.
- [174] M. Azrad, R. T. Vollmer, J. Madden, M. Dewhirst, T. J. Polascik, D. C. Snyder, M. T. Ruffin, J. W. Moul, D. E. Brenner, W. Demark-Wahnefried, *J. Med. Food* **2013**, *16*, 357–360.
- [175] M. J. McCann, I. R. Rowland, N. C. Roy, *Nutrients* **2014**, *6*, 4839–4855.
- [176] J. Feng, Z. Shi, Z. Ye, *Biol. Pharm. Bull.* **2008**, *31*, 1067–1070.
- [177] a) E. Tripoli, M. Giammanco, G. Tabacchi, D. Di Majo, S. Giammanco, M. La Guardia, *Nutr. Res. Rev.* **2005**, *18*, 98–112; b) K. B. Harikumar, B. Sung, S. T. Tharakan, M. K. Pandey, B. Joy, S. Guha, S. Krishnan, B. B. Aggarwal, *Mol. Cancer Res.* **2010**, *8*, 751–761.
- [178] T. Cornwell, W. Cohick, I. Raskin, *Phytochemistry* **2004**, *65*, 995–1016.
- [179] H. Adlercreutz, *Crit. Rev. Cl. Lab. Sci.* **2007**, *44*, 483–525.
- [180] M. Axelson, J. Sjövall, B. E. Gustafsson, K. D. R. Setchell, *Nature* **1982**, *298*, 659–660.
- [181] J. M. Landete, *Food Res. Int.* **2012**, *46*, 410–424.
- [182] S. Mitsuhashi, T. Kishimoto, Y. Uraki, T. Okamoto, M. Ubukata, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 2645–2650.
- [183] M. V. Sepporta, T. Mazza, G. Morozzi, R. Fabiani, *Nutr. Cancer.* **2013**, *65*, 1208–1218.
- [184] A. Wikul, T. Damsud, K. Kataoka, P. Phuwapraisirisan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 5215–5217.
- [185] B. Hwang, J. Lee, Q.-H. Liu, E.-R. Woo, D. G. Lee, *Molecules* **2010**, *15*, 3507–3516.
- [186] K. H. Kim, E. Moon, S. Y. Kim, K. R. Lee, *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 4779–4785.
- [187] D. Lapi, M. Di Maro, T. Mastantuono, L. Battiloro, L. Sabatino, E. Muscariello, A. Colantuoni, *Microcirculation* **2015**, *22*, 79–90.

- [188] S. Jafari, S. Saeidnia, M. Abdollahi, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2014**, *15*, 409–421.
- [189] B. Pickel, M.-A. Constantin, J. Pfannstiel, J. Conrad, U. Beifuss, A. Schaller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 202–204.
- [190] C. M. Fraser, C. Chapple, *The Arabidopsis book* **2011**, *9*, e0152.
- [191] E. Ricca, B. Brucher, J. H. Schrittwieser, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2239–2262.
- [192] A. Bruggink, R. Schoevaart, T. Kieboom, *Org. Process Res. Dev.* **2003**, *7*, 622–640.
- [193] H. Gröger, W. Hummel, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 171–179.
- [194] R. H. H. van den Heuvel, M. W. Fraaije, C. Laane, W. J. H. van Berkel, *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2954–2958.
- [195] a) N. Oberleitner, C. Peters, J. Muschiol, M. Kadow, S. Saß, T. Bayer, P. Schaaf, N. Iqbal, F. Rudroff, M. D. Mihovilovic, U. T. Bornscheuer, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 3524–3528; b) V. B. Urlacher, S. Schulz in *Cascade Biocatalysis* (Eds.: S. Riva, W.-D. Fessner), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, **2014**, 87–132.
- [196] S. Suljić, J. Pietruszka, D. Worgull, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 1822–1830.
- [197] K. Akagawa, R. Umezawa, K. Kudo, *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 1333–1337.
- [198] B. Bechi, S. Herter, S. McKenna, C. Riley, S. Leimkühler, N. J. Turner, A. J. Carnell, *Green Chem.* **2014**, *16*, 4524–4529.
- [199] S. Witayakran, A. J. Ragauskas, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *3*, 358–363.
- [200] a) S. Tajchakavit, J. I. Boye, D. Bélanger, R. Couture, *Food Res. Int.* **2001**, *34*, 431–440; b) H.-S. Bae, S.-G. Lee, S.-P. Hong, M.-S. Kwak, N. Esaki, K. Soda, M.-H. Sung, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1999**, *6*, 241–247.
- [201] S. Witayakran, L. Gelbaum, A. J. Ragauskas, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 10958–10962.
- [202] S. Aksu, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 1211–1216.
- [203] K. Kędziora, A. Díaz-Rodríguez, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Green Chem.* **2014**, *16*, 2448–2453.
- [204] A. Díaz-Rodríguez, N. Ríos-Lombardía, J. H. Sattler, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, W. Kroutil, V. Gotor, *Catal. Sci. Technol.* **2015**, *5*, 1443–1446.
- [205] a) E. E. Ferrandi, D. Monti, I. Patel, R. Kittl, D. Haltrich, S. Riva, R. Ludwig, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 2821–2828; b) P. Könst, S. Kara, S. Kochius, D. Holtmann, I. W. C. E. Arends, R. Ludwig, F. Hollmann, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 3027–3032; c) L. Tetianec, A. Chaleckaja, R. Vidziunaite, J. Kulys, I. Bachmatova, L. Marcinkeviciene, R. Meskys, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2014**, *101*, 28–34.
- [206] M. Mifsud, A. Szekrényi, J. Joglar, P. Clapés, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, *84*, 102–107.
- [207] M. J. H. Moonen, M. W. Fraaije, I. M. C. Rietjens, C. Laane, W. J. H. van Berkel, *Adv. Synth. Catal.* **2002**, *344*, 1023–1035.
- [208] M. W. Fraaije, W. J. H. van Berkel, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 18111–18116.

- [209] E. de Jong, W. J. H. van Berkel, R. P. van der Zwan, J. A. de Bont, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *208*, 651–657.
- [210] A. Mattevi, M. W. Fraaije, A. Coda, W. J. H. van Berkel, *Proteins* **1997**, *27*, 601–603.
- [211] A. Mattevi, M. W. Fraaije, A. Mozzarelli, L. Olivi, A. Coda, W. J. H. van Berkel, *Structure* **1997**, *5*, 907–920.
- [212] R. H. H. van den Heuvel, M. W. Fraaije, A. Mattevi, C. Laane, W. J. H. van Berkel, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *11*, 185–188.
- [213] M. W. Fraaije, R. H. H. van den Heuvel, W. J. H. van Berkel, A. Mattevi, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 35514–35520.
- [214] N. Tahallah, R. H. H. van den Heuvel, W. A. M. van den Berg, C. S. Maier, W. J. H. van Berkel, A. J. R. Heck, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 36425–36432.
- [215] M. W. Fraaije, C. Veeger, W. J. H. van Berkel, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *234*, 271–277.
- [216] R. H. H. van den Heuvel, M. W. Fraaije, A. Mattevi, W. J. H. van Berkel, *Int. Congr. Ser.* **2002**, *1233*, 13–24.
- [217] M. W. Fraaije, M. Pikkemaat, W. J. H. van Berkel, *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 435–439.
- [218] M. W. Fraaije, R. H. H. van den Heuvel, J. C. A. A. Roelofs, W. J. H. van Berkel, *Eur. J. Biochem.* **1998**, *253*, 712–719.
- [219] R. H. H. van den Heuvel, M. W. Fraaije, A. Mattevi, W. J. H. van Berkel, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 14799–14808.
- [220] R. H. H. van den Heuvel, M. W. Fraaije, M. Ferrer, A. Mattevi, W. J. H. van Berkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 9455–9460.
- [221] J. Overhage, A. Steinbüchel, H. Priefert, *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 6569–6576.
- [222] R. H. H. van den Heuvel, W. A. M. van den Berg, S. Rovido, W. J. H. van Berkel, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 33492–33500.
- [223] D. P. Wankhede, D. K. Biswas, S. Rajkumar, A. K. Sinha, *Protoplasma* **2013**, *250*, 1239–1249.
- [224] T. Okunishi, T. Umezawa, M. Shimada, *J. Wood Sci.* **2001**, *47*, 383–388.
- [225] S. Suzuki, N. Sakakibara, T. Umezawa, M. Shimada, *J. Wood Sci.* **2002**, *48*, 536–541.
- [226] C. Hano, I. Martin, O. Fliniaux, B. Legrand, L. Gutierrez, R. R. J. Arroo, F. Mesnard, F. Lamblin, E. Lainé, *Planta* **2006**, *224*, 1291–1301.
- [227] Y. Fukuhara, N. Kamimura, M. Nakajima, S. Hishiyama, H. Hara, D. Kasai, Y. Tsuji, S. Narita-Yamada, S. Nakamura, Y. Katano, N. Fujita, Y. Katayama, M. Fukuda, S. Kajita, E. Masai, *Enzyme Microb. Technol.* **2013**, *52*, 38–43.

- [228] M. Tamura, Y. Tsuji, T. Kusunose, A. Okazawa, N. Kamimura, T. Mori, R. Nakabayashi, S. Hishiyama, Y. Fukuhara, H. Hara, K. Sato-Izawa, T. Muranaka, K. Saito, Y. Katayama, M. Fukuda, E. Masai, S. Kajita, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 8165–8177.
- [229] T. Katayama, L. B. Davin, N. G. Lewis, *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3875–3881.
- [230] A. Chu, A. Dinkova, L. B. Davin, D. L. Bedgar, N. G. Lewis, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 27026–27033.
- [231] S. Hemmati, C. B. I. von Heimendahl, M. Klaes, A. Wilhelm Alfermann, T. J. Schmidt, E. Fuss, *Planta Med.* **2010**, *76*, 928–934.
- [232] S. Suzuki, T. Umezawa, M. Shimada, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2002**, *66*, 1262–1269.
- [233] T. Min, H. Kasahara, D. L. Bedgar, B. Youn, P. K. Lawrence, D. R. Gang, S. C. Halls, H. Park, J. L. Hilsenbeck, L. B. Davin, N. G. Lewis, C. Kang, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 50714–50723.
- [234] L. Ausec, M. Zakrzewski, A. Goesmann, A. Schlüter, I. Mandic-Mulec, *PLoS ONE* **2011**, *6*, e25724.
- [235] D. Sirim, F. Wagner, L. Wang, R. D. Schmid, J. Pleiss, *Database* **2011**, *2011*, bar006.
- [236] a) C. Nicolini, D. Bruzzese, M. T. Cambria, N. L. Bragazzi, E. Pechkova, *J. Cell. Biochem.* **2013**, *114*, 599–605; b) Salony, N. Garg, R. Baranwal, M. Chhabra, S. Mishra, T. K. Chaudhuri, V. S. Bisaria, *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1784*, 259–268.
- [237] J. Ihssen, R. Reiss, R. Luchsinger, L. Thöny-Meyer, M. Richter, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 10465.
- [238] M. Gunne, Dissertationsschrift, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf (Germany), **2014**.
- [239] E. Ricklefs, N. Winkler, K. Koschorreck, V. B. Urlacher, *J. Biotechnol.* **2014**, *191*, 46–53.
- [240] S. K. Singh, G. Grass, C. Rensing, W. R. Montfort, *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 7815–7817.
- [241] E. Ricklefs, M. Girhard, K. Koschorreck, M. S. Smit, V. B. Urlacher, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 1857–1864.
- [242] a) H.-L. Liu, X. Wan, X.-F. Huang, L.-Y. Kong, *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 1003–1008; b) R.-W. Jiang, K.-M. Lau, P.-M. Hon, T. Mak, K.-S. Woo, K.-P. Fung, *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 237–246.
- [243] a) J. Anthoni, C. Humeau, E. R. Maia, L. Chebil, J.-M. Engasser, M. Ghoul, *Eur. Food Res. Technol.* **2010**, *231*, 571–579; b) E. Uzan, B. Portet, C. Lubrano, S. Milesi, A. Favel, L. Lesage-Meessen, A. Lomascolo, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *90*, 97–105.
- [244] a) J. J. García-Guzmán, M. P. Hernández-Artiga, L. Palacios-Ponce de León, D. Bellido-Milla, *Food Chem.* **2015**, *182*, 47–54; b) E. Martinez-Periñan, M. P. Hernández-

- Artiga, J. M. Palacios-Santander, M. ElKaoutit, I. Naranjo-Rodriguez, D. Bellido-Milla, *Food Chem.* **2011**, *127*, 234–239.
- [245] F. Karim, A. N. M. Fakhrudin, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **2012**, *11*, 261–274.
- [246] a) K. Koch, C. Büchter, S. Havermann, W. Wätjen, *Phytother. Res.* **2015**, *29*, 894–901; b) J. A. Menendez, A. Vazquez-Martin, R. Garcia-Villalba, A. Carrasco-Pancorbo, C. Oliveras-Ferraro, A. Fernandez-Gutierrez, A. Segura-Carretero, *BMC Cancer* **2008**, *8*, 377.
- [247] R. A. Dixon, *Annu. Rev. Plant. Biol.* **2004**, *55*, 225–261.
- [248] Y. Sato, R. W. Whetten, *J. Plant Res.* **2006**, *119*, 581–588.
- [249] M. Lahtinen, L. Viikari, P. Karhunen, J. Asikkala, K. Kruus, I. Kilpeläinen, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, *85-86*, 169–177.
- [250] M. Gunne, V. B. Urlacher, *PLoS ONE* **2012**, *7*, e52360.
- [251] N. Jaiswal, V. P. Pandey, U. N. Dwivedi, *Process Biochem.* **2014**, *49*, 1196–1204.
- [252] G. Benfield, S. M. Bocks, K. Bromley, B. R. Brown, *Phytochemistry* **1964**, *3*, 79–88.
- [253] T. Nakamura, *Biochim. Biophys. Acta* **1958**, *30*, 44–52.
- [254] F. Chioccare, S. Poli, B. Rindone, T. Pilati, G. Brunow, P. Pietikäinen, H. Setälä, M. Trætteberg, A. Nasiri, T. Tsuda, *Acta Chem. Scand.* **1993**, *47*, 610–616.
- [255] S. C. Halls, L. B. Davin, D. M. Kramer, N. G. Lewis, *Biochemistry* **2004**, *43*, 2587–2595.
- [256] S. Kohse, A. Neubauer, A. Pazidis, S. Lochbrunner, U. Kragl, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9407–9411.
- [257] a) M. A. Tadesse, A. D'Annibale, C. Galli, P. Gentili, F. Sergi, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 868–878; b) F. Xu, W. Shin, S. H. Brown, J. A. Wahleithner, U. M. Sundaram, E. I. Solomon, *BBA-Protein Struct. M.* **1996**, *1292*, 303–311; c) F. Xu, *Biochemistry* **1996**, *35*, 7608–7614; d) M. Lahtinen, K. Kruus, H. Boer, M. Kemell, M. Andberg, L. Viikari, J. Sipilä, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *57*, 204–210.
- [258] E. Uzan, P. Nousiainen, V. Balland, J. Sipilä, F. Piumi, D. Navarro, M. Asther, E. Record, A. Lomascolo, *J. Appl. Microbiol.* **2010**, *108*, 2199–2213.
- [259] B. R. M. Reinhammar, *BBA-Bioenergetics* **1972**, *275*, 245–259.
- [260] H.-L. Ma, S. Kermasha, J.-M. Gao, R. M. Borges, X.-z. Yu, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *57*, 89–95.
- [261] J. Maruyama, M. Kobayashi, M. Miyashita, I. Kouno, H. Irie, *Heterocycles* **1994**, *37*, 839–845.
- [262] A. Pelter, R. S. Ward, D. J. Watson, P. Collins, I. T. Kay, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1982**, 175–181.
- [263] S. C. Roy, K. K. Rana, C. Guin, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3242–3248.
- [264] R. Grougnet, P. Magiatis, S. Mitaku, A. Terzis, F. Tillequin, A.-L. Skaltsounis, *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7570–7574.

- [265] I. E. J. Milder, I. C. W. Arts, B. van de Putte, D. P. Venema, P. C. H. Hollman, *Br. J. Nutr.* **2005**, *93*, 393–402.
- [266] K. Mikame, N. Sakakibara, T. Umezawa, M. Shimada, *J. Wood Sci.* **2002**, *48*, 440–445.
- [267] H. Stecher, K. Faber, *Synthesis* **1997**, 1–16.
- [268] E. Ricklefs, M. Girhard, V. B. Urlacher, *Microb. Cell Fact.* **2016**, *15*, 78.
- [269] K. Koschorreck, R. D. Schmid, V. B. Urlacher, *BMC Biotechnol.* **2009**, *9*, 12.
- [270] a) R. Di Pasqua, G. Betts, N. Hoskins, M. Edwards, D. Ercolini, G. Mauriello, *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4863–4870; b) D. Thapa, R. Losa, B. Zweifel, R. J. Wallace, *Microbiology* **2012**, *158*, 2870–2877; c) S. Hemaiswarya, M. Doble, *Phytomedicine* **2009**, *16*, 997–1005; d) M. Friedman, P. R. Henika, R. E. Mandrell, *J. Food Prot.* **2002**, *65*, 1545–1560; e) D. Fabian, F. Dusan, M. Sabol, S. Marián, K. Domaracká, D. Katarína, D. Bujnáková, B. Dobroslava, *Toxicol. In Vitro* **2006**, *20*, 1435–1445.
- [271] T. S. Kaufman, *J. Brazil. Chem. Soc.* **2015**, *26*, 1055–1085.
- [272] J. Zhou, K. Wang, S. Xu, J. Wu, P. Liu, G. Du, J. Li, J. Chen, *J. Proteomics* **2015**, *113*, 15–28.
- [273] a) K. Tadasa, *Agric. Biol. Chem.* **1977**, *41*, 925–929; b) K. Tadasa, H. Kayahara, *Agric. Biol. Chem.* **1983**, *47*, 2639–2640.
- [274] F. Lambert, J. Zucca, F. Ness, M. Aigle, *Flavour Fragr. J.* **2014**, *29*, 14–21.
- [275] A. M. Kunjapur, Y. Tarasova, K. L. J. Prather, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 11644–11654.

5. Anhang

Anhang 1: Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Å	Ångström
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ADH	Alkoholdehydrogenase
<i>A. lappa</i>	<i>Arctium lappa</i>
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>B. licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
ca.	Circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
<i>C. glutamicum</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E.C.	Enzymklasse
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPR	Elektronenspinresonanz
EXAFS	<i>Extended X-Ray absorption fine structure</i>
FAD	Flavinadenindinucleotid
<i>F. intermedia</i>	<i>Forsythia intermedia</i>
kDa	Kilodalton
LccED	<i>Laccase Engineering Database</i>
<i>L. perenne</i>	<i>Linum perenne</i>
M	Molar
m	Milli
MCO	Multikupferoxidase
Mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mV	Millivolt
NaCl	Natriumchlorid
NI	natives Intermediat
μ	Micro
NAD(P)H	β-Nicotinamidadenindinucleotid(phosphate)

N-Terminus	Amino-Terminus
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDB	Proteindatenbank
PLR	Pinoresinol/Lariciresinolreduktase
PrR	Pinoresinolreduktase
<i>P. simplicissimum</i>	<i>Penicillium simplicissimum</i>
<i>R. vernicifera</i>	<i>Rhus vernicifera</i>
RvL	Laccase aus <i>R. vernicifera</i>
RO	ruhender, oxidierter Zustand
PI	Peroxidintermediat
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SLAC	<i>Small laccase</i>
<i>S. sviceps</i>	<i>Streptomyces sviceps</i>
T1	Typ-1-Kupferion
T2	Typ-2-Kupferion
T3	Typ-3-Kupferion
TEMPO	(2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-yl)-oxyl
TNC	trinucleares Cluster
U	Unit
u.a.	unter anderem
U ml ⁻¹	<i>Volumenaktivität</i>
UV/Vis-Spektroskopie	Spektroskopie, die elektromagnetische Wellen des ultravioletten und sichtbaren Lichts nutzt
VAO	Vanillylalkoholoxidase
VR	vollständig reduzierter Zustand
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
X-Ray Kristallographie	Röntgenkristallographie

Anhang 2: Aminosäureabkürzungen

Tabelle 5-1: Abkürzungen der Aminosäure als Dreibuchstaben- und Einbuchstabencode

Aminosäure	3Bstn-Code	1Bstn-Code	Aminosäure	3Bstn-Code	1Bstn-Code
Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutaminsäure	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V