

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Zuwendungsempfänger

Technische Universität München
Arcisstr. 21
80333 München

Titel der Förderung

Bioökonomie International 2017: BioTrim – Marine Sulfatasen und Oxidasen zum
Trimmen von biogenen und biobasierten Produkten

Verantwortliche Autoren

Alexander Fuchs, M.Sc.
Dr. Enrico Hupfeld
Prof. Dr. Volker Sieber

Förderkennzeichen

031B0859

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des
Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen
031B0859 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt
bei den Autoren.



Zuwendungsempfänger Prof. Dr. Volker Sieber Technische Universität München Lehrstuhl für Chemie biogener Rohstoffe Schulgasse 16 94315 Straubing	Förderkennzeichen 031B0859
Vorhabensbezeichnung Bioökonomie International 2017: BioTrim – Marine Sulfatasen und Oxidasen zum Trimmen von biogenen und biobasierten Produkten	
Laufzeit des Vorhabens Februar 2020 – Januar 2024	

Kurzbericht – Teil 1

1. Aufgabenstellung

Um die Entwicklung einer biobasierten Industrie voranzutreiben, werden neue biotechnologische Prozesse für die Produktion neuer biobasierter Produkte oder Materialien benötigt. Jedoch ist ein großer Nachteil der Nutzung pflanzlicher Biomasse oft deren strukturelle Heterogenität, was wiederum zu schlecht definierten Produkten führen kann. Dies ist beispielsweise bei dem Biopolymer Carrageen der Fall, welches in verschiedenen Sulfatierungs-Mustern vorliegt, oder auch bei Nitrocellulose, das oft Sulfat-Verunreinigungen in der Polymerkette beinhaltet. Im Projekt BioTrim sollten daher marine Mikroorganismen als Quelle für spezifische Enzyme zur Produktion von gezielt getrimmten Materialien in nachhaltigen Prozessen untersucht werden. Diese Enzyme sollen eingehend charakterisiert und für die Modifikation der genannten Materialien eingesetzt werden.

2. Wissenschaftlicher und technischer Stand

Carrageene sind Biopolymere, die aus verschiedenen Gattungen von Rotalgen gewonnen werden, und dienen kommerziell als Zusatz zu Nahrungsmitteln und Kosmetika, um gezielt deren Textur und Fließeigenschaften zu beeinflussen. Der Begriff Carrageen bezeichnet eine Klasse von unterschiedlich stark sulfatierten Polysacchariden, wobei der Grad der Sulfatierung einen entscheidenden Einfluss auf deren Eigenschaften und der daraus resultierenden Anwendung hat. Nitrocellulose wird hingegen in einer Vielzahl von Beschichtungs- und Lackanwendungen genutzt. Während des Produktionsprozesses kommt es jedoch zu einer ungewollten Sulfatierung der Polymerkette, was einige Anwendungen behindern kann. Für beide Polymere kann die Nutzung von Sulfatasen zur Entfernung von Sulfatgruppen in nachhaltigen Prozessen dazu beitragen, die Produktqualität zu erhöhen und sogar neue Anwendungsfelder zu erschließen. Zu Beginn des Vorhabens waren erst wenige Sulfatasen charakterisiert, die an größeren Substraten (d.h. Polymeren) aktiv sind. Dementsprechend war auch das Anwendungspotential dieser Enzymklasse zur Modifikation von Biopolymeren bisher unzureichend untersucht. Zudem war ebenfalls nicht bekannt, wie sich die Materialeigenschaften der Polymere mit spezifisch modifizierter Sulfatierung ändern, und für welche neuen Anwendungen diese Produkte in Frage kommen.

3. Ablauf des Vorhabens

3.1. Arbeitspaket 1 - Projektmanagement

3.2. Arbeitspaket 2 – Transfer von genomischem Material zwischen den Projektpartnern

In AP2 fand der Austausch von genomischem Material zwischen UNESP und TUM statt. Ein Expressionssystem für *Pichia pastoris* wurde dabei an UNESP übergeben. Von der UNESP übersandte Stammsammlungen von marinen Mikroorganismen wurden von der TUM auf Sulfatase-Aktivität untersucht. Insgesamt wurden während des Arbeitspakets 71 Hefen und 46 Pilzstämme übersandt und analysiert.

3.3. Arbeitspaket 3 – Screening, Identifizierung und Charakterisierung neuer Sulfatasen

In Arbeitspaket 3 wurden sowohl die vom Projektpartner zur Verfügung gestellten Stämme, als auch weitere marine bakterielle Kandidaten auf Sulfatase-Aktivität untersucht. Die dabei identifizierten Sulfatasen wurden anschließend im Labormaßstab produziert und ausführlich biochemisch charakterisiert.

3.4. Arbeitspaket 4 – Produktion und Charakterisierung mariner Oxidasen

Im AP4 wurden Laccasen die zuvor von Seiten des brasilianischen Projektpartners isoliert worden waren, in *P. pastoris* exprimiert und charakterisiert. Dazu verbrachte ein Mitarbeiter des Partners einige Zeit an der TUM.

3.5. Arbeitspaket 5 - Anwendung mariner Enzyme für das Trimmen von biogenen Polymeren und biobasierten Produkten

Die identifizierten und charakterisierten Enzyme aus Arbeitspaket 3 wurden auf deren Potential zur Modifikation verschiedener Biopolymere getestet. Die daraus entstandenen Produkte wurden ausführlich charakterisiert und das Potential der Sulfatasen sowie der modifizierten Polymere für technische Anwendungen evaluiert.

3.6. Arbeitspaket 6

Arbeitspaket 6 umfasste die Publikation der wichtigsten Projektergebnisse in relevanten Fachzeitschriften.

4. Wesentliche Ergebnisse

Im Zuge von Arbeitspaket 2 wurde das Expressionssystem für *Pichia pastoris* an die UNESP übergeben und erfolgreich für Expression einer Oxidase genutzt. Zudem wurden marine eukaryotische Mikroorganismen aus der Stammsammlung der UNESP an die TUM gesendet. Seitens der TUM konnten diese biologisch intakt gehalten und für ein funktionales Screening



nach Sulfatase-Aktivität in Arbeitspaket 3 genutzt werden. Im Rahmen des Screenings konnte ein Stamm identifiziert werden, der eine signifikant erhöhte Freisetzung von Sulfat nach Inkubation mit verschiedenen Carrageenen aufwies. Der Stamm wurde anschließend sequenziert, um über Sequenzinformationen die zugrundeliegende Enzymaktivität zu identifizieren. Da annotierte Sulfatase-Sequenzen nicht für die gesuchte Aktivität verantwortlich waren, könnte die Desulfatierung von einer neuen Sulfatase-Klasse durchgeführt werden. Diese Aktivität konnte bisher noch nicht identifiziert werden. Zusätzlich dazu wurden die Genome verschiedener mariner Bakterien nach potentiellen Carrageen-Sulfatasen untersucht. Hier konnten eine Vielzahl von neuen Carrageen-Sulfatasen identifiziert, in aktiver Form produziert und anschließend ausführlich biochemisch charakterisiert werden. Unter Anderem zeigten dabei zwei dieser Sulfatasen promiskuitive Aktivität auf polymeres ι - und κ -Carrageen, wodurch diese Enzyme in Arbeitspaket 5 gezielt zum Trimmen von einer Vielzahl von Carrageenen genutzt werden konnten. Durch den Einsatz dieser Sulfatasen konnten die rheologische Materialeigenschaften dieser kommerziell relevanten Carrageene signifikant verändert werden, wodurch sich neue Anwendungsfelder für diese Biopolymere ergeben. Insbesondere lassen sich durch die Desulfatierung Carrageen-Varianten erhalten, die eine deutlich höhere Gelstärke bei geringer Salzkonzentration aufweisen, wodurch man in der Anwendung weniger Carrageen einsetzen muss. Zudem ermöglichen sie eine Enzym-induzierte Gelbildung, was für in situ Anwendungen von Vorteil ist. Im Projektverlauf konnten keine Sulfatase für Nitrocellulose identifiziert werden. Die wichtigsten Ergebnisse des Vorhabens konnten bereits publiziert werden.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Während des Vorhabens kam es nicht zur Zusammenarbeit mit anderen Stellen.



Zuwendungsempfänger Prof. Dr. Volker Sieber Technische Universität München Lehrstuhl für Chemie biogener Rohstoffe Schulgasse 16 94315 Straubing	Förderkennzeichen 031B0859
Vorhabensbezeichnung Bioökonomie International 2017: BioTrim – Marine Sulfatasen und Oxidasen zum Trimmen von biogenen und biobasierten Produkten	
Laufzeit des Vorhabens Februar 2020 – Januar 2024	

Eingehende Darstellung – Teil 2

1. Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

1.1. Arbeitspaket 1: Projektmanagement

1.2. Arbeitspaket 2: Transfer von Material und Methoden zwischen den Projektpartnern

In Arbeitspaket 2 wurde das *Pichia Pastoris* Expressionssystem an den Projektpartner übergeben und dieser mit dessen Umgang vertraut gemacht. Da das Screening nach Arylsulfatasen aufgrund seiner Komplexität ausschließlich an der TUM stattfand, fand kein Transfer des Screeningprotokolls für Sulfatasen zwischen den Projektpartnern statt. Seitens der TUM wurden ausschließlich Stämme untersucht, deren Genom zuvor nicht sequenziert wurde. Im Zuge von Arbeitspaket 2 wurden zudem insgesamt 71 Hefen und 46 Pilzstämme innerhalb mehrerer Chargen an die TUM übersendet. Der Großteil des biologischen Materials konnte dabei seitens der TUM biologisch intakt gehalten werden und für ein darauf folgendes Screening nach Sulfatase-Aktivität genutzt werden.

1.3. Arbeitspaket 3: Screening, Identifikation und Charakterisierung neuer Sulfatasen

Die von UNESP übersandten Stämme wurden funktional nach Sulfatase-Aktivität auf verschiedene kommerziell relevante Carrageene und auf selbst hergestellte Nitrocellulose untersucht. Innerhalb der marinen Umweltproben konnte dabei ein Stamm als Sulfatase-Produzent identifiziert, welcher laut UNESP als *Holtermanniella wattica* gelistet ist. Diese Aktivität konnte ebenfalls in weiteren *Holtermanniella wattica* Isolaten nachgewiesen werden, wodurch es nahelegt, dass die identischen oder zumindest sehr eng verwandte Enzyme in den Stämmen für die Aktivität verantwortlich sind (siehe Abbildung 1).

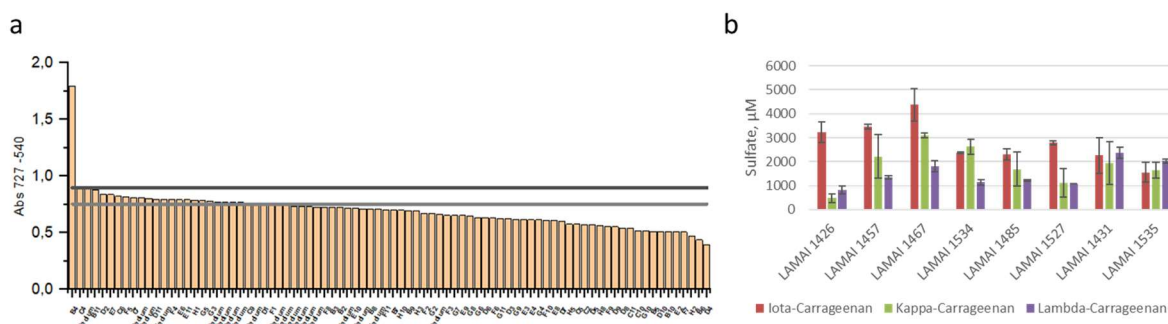


Abbildung 1: Screening nach Sulfatasen in marinen Hefen. (a) Sulfatase-Aktivität verschieden mariner Hefen, hier exemplarisch gezeigt für I-Carrageen. Der Stamm in Well B4 wurde als *Holtermanniella wattica* LAMAI 1535 identifiziert. (b) Sulfatase-Aktivität in verschiedenen *Holtermanniella wattica* Isolaten nach Inkubation mit verschiedenen Carrageenen.

Der ursprünglich identifizierte *Holtermaniella wattica* Stamm LAMAI 1535 wurde anschließend sequenziert und das Genom funktionell annotiert. Innerhalb dieser Annotation wurde jedoch nur eine Sequenz eindeutig als Sulfatase gekennzeichnet. Es wurde anschließend versucht, die Sulfatase heterolog zu exprimieren, wobei jedoch kein funktionales Protein erhalten werden konnte. Zudem ist das Enzym als S1_4 Sulfatase annotiert, eine Sulfatase-Klasse, für die bisher in der Literatur keine Kohlenhydrat-Aktivität nachgewiesen wurde. Dies legt nahe, dass das Enzym vermutlich anderweitig im Stoffwechsel der Hefe involviert ist, jedoch nicht am Carrageen-Metabolismus. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die gesuchte Carrageen-Sulfatase Aktivität entweder nicht von einer S1-Sulfatase ausgeht, oder eine neue, möglicherweise eukaryotische Sulfatase-Klasse für die Aktivität verantwortlich ist. Daher wurde es als aussichtsreicher angesehen, die Aktivität der gesuchten Sulfatase(n) über ein funktionales Screening des Proteoms zu identifizieren. Dies ist derzeit noch Gegenstand der Forschung und wird auch nach Abschluss der Projektförderung auf eigene Kosten am Lehrstuhl weiterverfolgt.

Parallel zum Screening nach neuen Sulfatasen in den vom Projektpartner übersandten Umweltproben wurden zusätzlich bereits sequenzierte marine Bakterien genauer untersucht. Dabei wurden Sequenzen ausgewählt, die als Sulfatasen in verschiedenen (mutmaßlichen) carrageenolytischen *Polysaccharid-Utilization-Loci* (PULs) in marinen heterotrophen Bakterien annotiert sind. Diese Auswahl basierte auf ihrer Ähnlichkeit zum kürzlich untersuchten Carrageenan-PUL von *Zobellia galactanivorans* DsijT sowie ihrer genetischen Codierung in Nähe von GH127/GH129-Enzymen, die Schlüsselenzyme für den Abbau von Carrageenen darstellen [1]. Insgesamt wurden 24 als Sulfatasen annotierte Gene in den potentiellen carrageenolytischen Clustern von *Cellulophaga algicola* DSM 14327, *Cellulophaga baltica* DSM 24729, *Cellulophaga lytica* DSM 7489, *Echinicola pacifica* DSM 19836 und *Saccharicrinis fermentans* DSM 9555, sowie in den bereits veröffentlichten Carrageen-PULs von *Pseudoalteromonas atlantica* T6c und *Pseudoalteromonas carrageenovora* ATCC 43555 untersucht. Die Architektur der PULs ist schematisch in Abbildung 2 gezeigt.

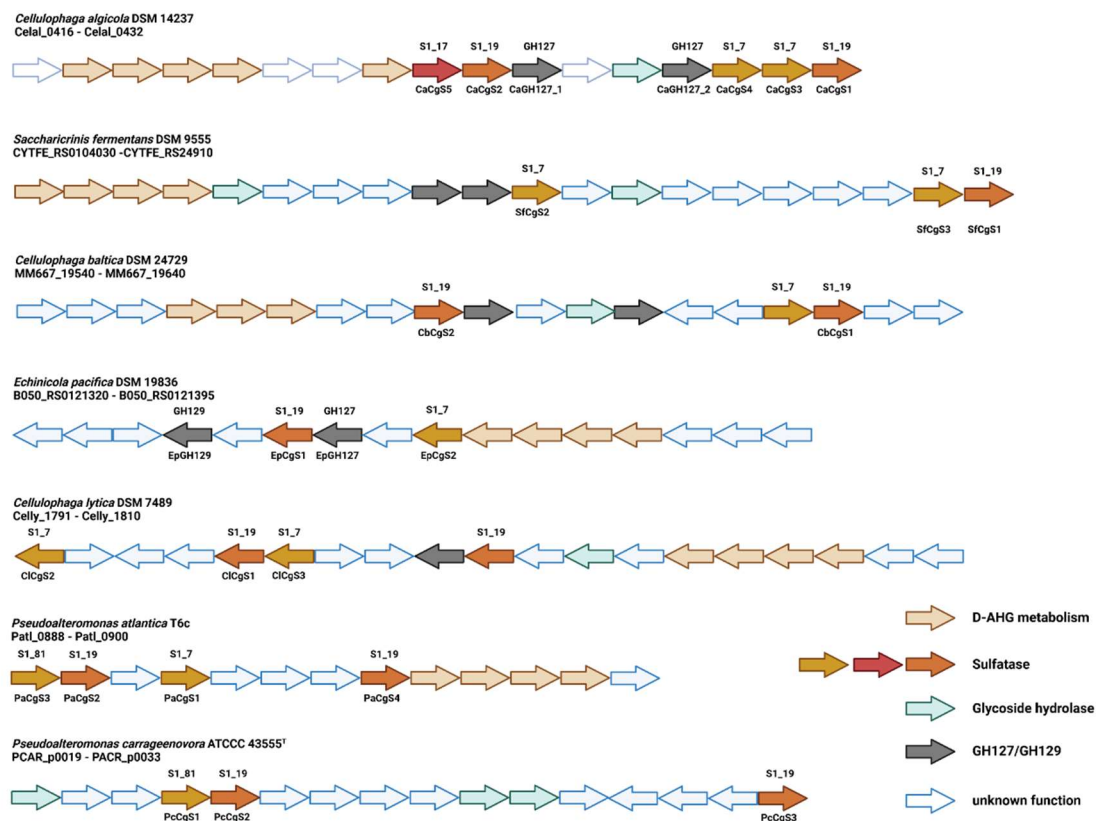


Abbildung 2: Genetische Architektur der in dieser Arbeit untersuchten carrageenolytischen Cluster. Die Bezeichnungen über den Pfeilen geben die zugrundeliegende Sulfatase bzw. Hydrolase-Klasse an. Die Annotation unter den Pfeilen bezeichnet den Namen der Enzyme. Die Farbe der Pfeile repräsentiert die links dargestellten Funktionen der jeweiligen Enzyme.

Die Gene wurden ohne ihre N-terminalen Signalpeptide in den pET28a(+) Expressionsvektor kloniert und zusammen mit dem Formylglycin-generierenden Enzym (FGE) aus *Mycobacterium tuberculosis* in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert, um die Bildung des katalytischen Formylglycins zu fördern, da alle untersuchten Typl-Sulfatasen das charakteristische FGE-Motiv C/S-X-P-S/X-R-XXX-L/X-G/X-R/X trugen [2]. Mithilfe des kürzlich von uns entwickelten Sulfat-Assays konnten von den untersuchten Kandidaten elf als Carrageen-Sulfatasen bestätigt werden [3]. Diese Sulfatasen wurden anschließend ausführlich biochemisch charakterisiert. Dabei konnte u. A. erstmals Promiskuität bei Carrageen-Sulfatasen nachgewiesen werden. Zudem wurden verschiedene Stereospezifitäten, sowie neue exo- und endo-Aktivitäten der Sulfatasen beobachtet (siehe Abbildung 3). Hervorzuheben ist besonders die Aktivität der Sulfatasen CaCgS1 und CbCgS1 aus *Cellulophaga algicola* DSM 14237 und *Cellulophaga baltica* DSM 24729, welche Sulfat von polymeren ι- und κ-Carrageen entfernen konnten.

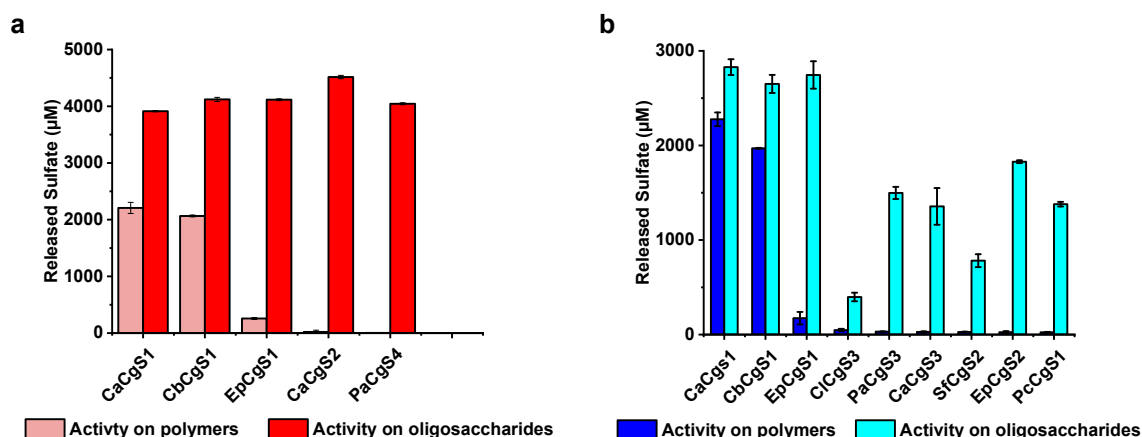


Abbildung 3: Sulfatfreisetzung der identifizierten Carrageen-Sulfatases aus den beschriebenen PULs ausgehend von K- (a) oder I-Carrageen (b) in polymerem oder oligomerem Zustand. Die Freisetzung von Sulfat wurde mithilfe eines kürzlich entwickelten Sulfat-Assay analysiert [3].

Die spektroskopische Analyse der Reaktionsprodukte ergab, dass es sich bei beiden Enzymen um promiskuitive endo-G4S-Sulfatases handelt, die Sulfat jeweils vom C4 der Galaktose in α - und κ -Carrabiosen abspaltet, und dabei α - bzw. β -Carrageen produziert. Es war zudem möglich, mithilfe der Enzyme verschiedene natürliche Hybrid-Carrageene, wie beispielsweise K2-Carrageen oder Furcellaran zu modifizieren. Die zugrundeliegenden Reaktionen sind in Abbildung 4 dargestellt.

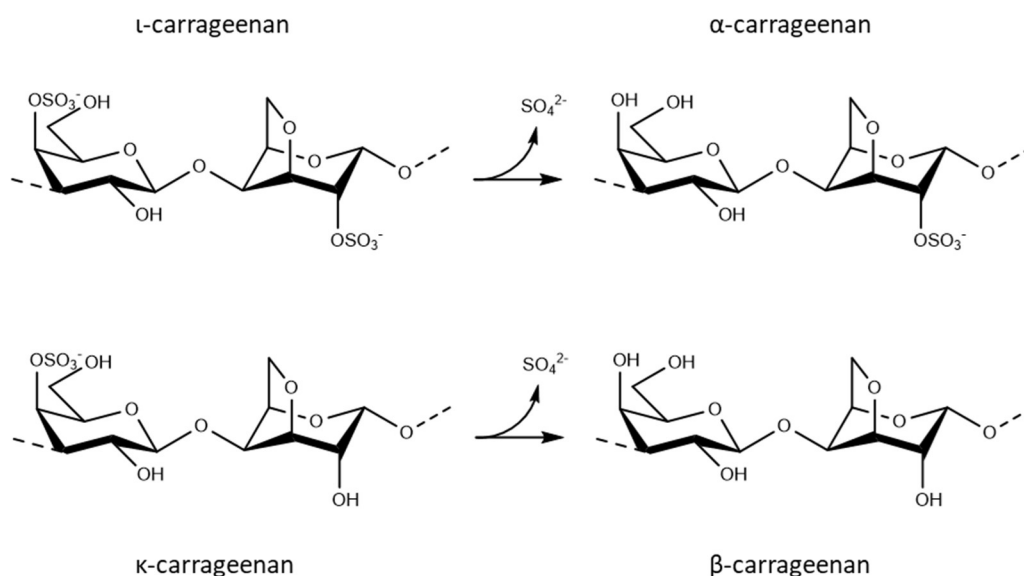


Abbildung 4: Chemische Strukturen der Substrate und Reaktionsprodukte der identifizierten endo-G4S-Sulfatases CaCgS1 und CbCgS1.

Abbildung 5 zeigt die ^1H -NMR-Spektren der Reaktionsprodukte der Biotransformation verschiedener Carrageene mit CaCgS1. Obwohl es mithilfe dieser Enzyme möglich war, sämtliche I-carrabiosen entlang der Polymerkette in α -Carrabiosen umzuwandeln, und somit reines

α -Carrageen zu produzieren, konnten lediglich κ/β -Carrageen Hybride als Endprodukt hergestellt werden.

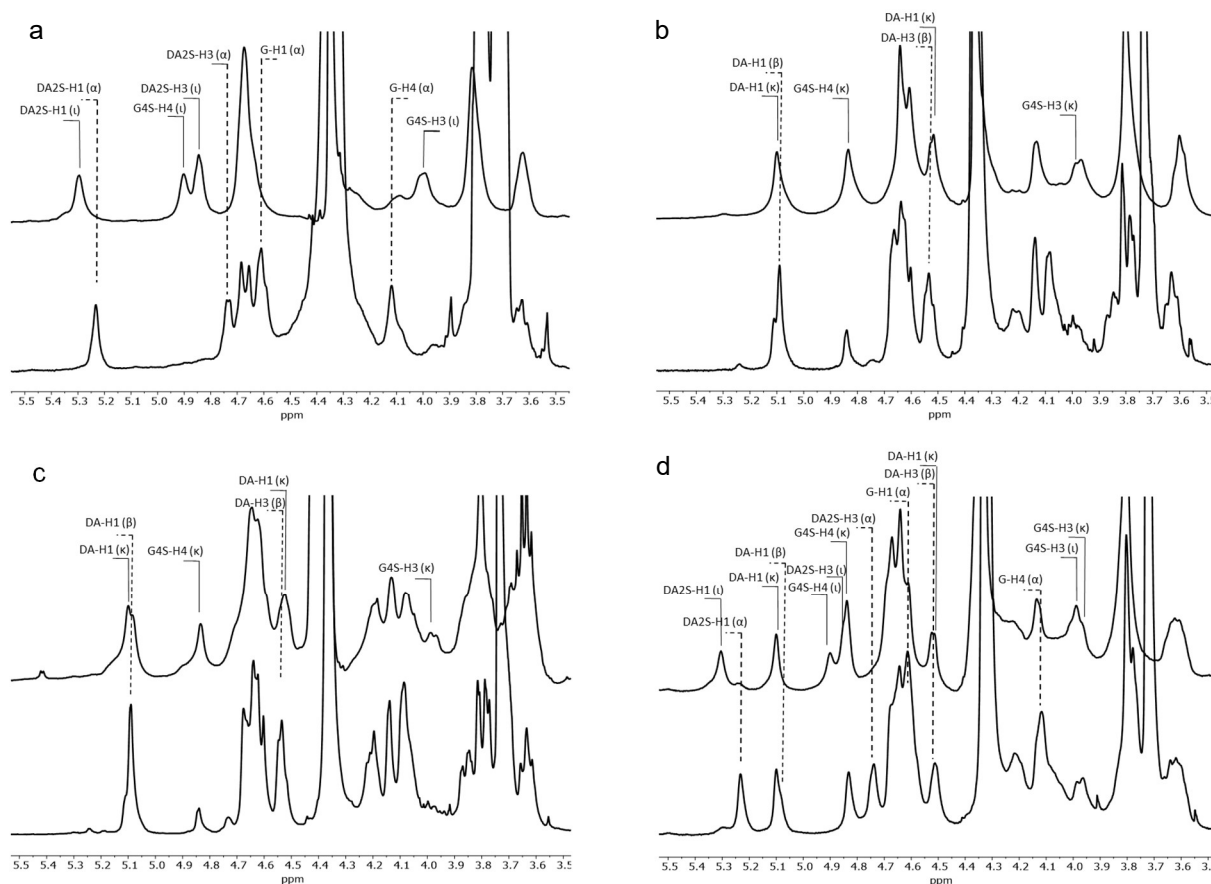


Abbildung 5: ^1H -NMR der Reaktionsprodukte (unterer Teil des Spektrums) der promiskuitiven G4S-Sulfatase CaCgS1 nach Inkubation mit sulfatierten Galactanen (oberer Teil des Spektrums): ι -Carrageen (a), κ -Carrageen (b), Furcellaran (c) und Kappa2-Carrageen (extrahiert aus *Chondrus crispus*) (d). Die griechischen Buchstaben in Klammern bezeichnen die jeweiligen Carrabiose-Einheiten.

Weiterhin konnten eine Vielzahl an verschiedene neuartigen Sulfatasen identifiziert werden, die teils promiskuitive exo-Aktivität auf verschiedene Carrageen-Oligosaccharide zeigten. Besonders hervorzuheben ist, dass auch erstmals eine DA2S-Aktivität auf ι -Neocarrabiosen nachgewiesen werden konnte, welche ein Indiz für einen zusätzlichen, bisher unerforschten Weg im Carrageen-Katabolismus sein könnte. Außerdem konnten wir zeigen, dass diese Aktivität einen essentiellen Schritt für die zellfreie Biokonversion von Carrageenen zu Fein- und Plattformchemikalien darstellt, wodurch das Nutzungsspektrum von Carrageenen erweitert werden kann [4].

1.4. Arbeitspaket 4: Expression und Charakterisierung von Laccasen

Das Arbeitspaket wurde vom ausschließlich von einem Mitarbeiter vom Partner UNESP durchgeführt, der dazu mehrere Monate im Labor der TUM verbrachte. Im Wesentlichen wurde eine vom Partner aus Umweltproben isolierte Laccase in *P. pastoris* hergestellt und diese charakterisiert und auf ihre Eignung beim Abbau von toxischen Stoffen aus Industrieabwässern analysiert. *P. pastoris* wurde für die Herstellung ausgewählt, da diese Hefe Enzyme sehr gut sekretieren kann und Laccasen typischerweise sekretierte Enzyme sind. Zunächst konnten nur sehr geringe Enzymaktivitäten nachgewiesen werden, nach Verifikation und Anpassung der Gensequenz gelang die funktionelle Expression jedoch noch gut, wobei sich hier die Nutzung eines konstitutiven Promoters als geeignetsten erwies.

1.5. Arbeitspaket 5: Anwendung von marinen Enzymen zum Trimmen von biogenen und biobasierten Produkten

In Arbeitspaket 5 wurden die erfolgreich identifizierten, neuen marinen Sulfatasen aus Arbeitspaket 3 zur Modifikation von biogenen Polymeren verwendet. Da die charakterisierten Sulfatasen bakteriellen Ursprungs waren, war eine Produktion der Biokatalysatoren mithilfe des Laborstammes *E. coli* BL21(DE3) in funktionaler Form und ausreichender Menge für anschließende Biotransformationen in größerem Maßstab möglich. Die Spezifitäten der jeweiligen Sulfatasen wurden unter Arbeitspaket 3 dargestellt. Für die Experimente zur Modifikation von Carrageen im präparativen Maßstab wurde die in Arbeitspaket 3 identifizierte und ausführlich charakterisierte endo-G4S-Sulfatase von *Cellulophaga algicola* DSM14237 verwendet.

Zunächst wurde hier der Einfluss von biotechnologisch modifizierten Sulfatarchitekturen auf die Rheologie kommerziell erhältlicher Carrageene getestet, um dadurch Struktur-Funktionsbeziehungen abzuleiten. Dazu wurden Biotransformationen von ι - und κ -Carrageen durchgeführt, und die Reaktionsprodukte anschließend ausführlich rheologisch an einem Anton

Paar MCR302 Rheometer untersucht. Zusammenfassend sind in Abbildung 6 die viskoelastischen Moduli der jeweiligen Reaktionsprodukte bei verschiedenen Carrabiose-Verhältnissen gezeigt.

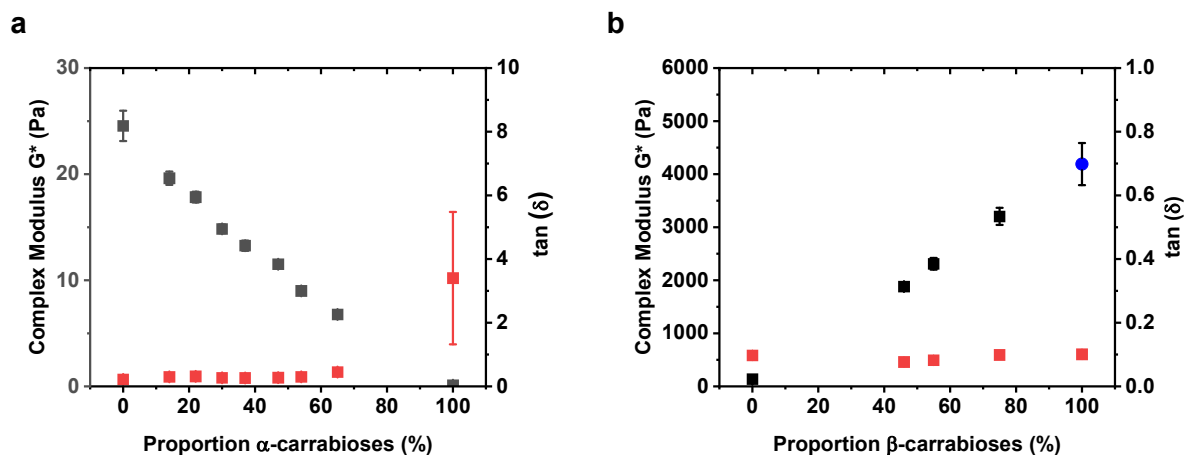


Abbildung 6: Viskoelastische Eigenschaften von (a) I/α- und (b) κ/β-Hybrid-Carrageenen bei unterschiedlichen Verhältnissen der jeweiligen Carrabiosen. Die komplexen Moduli G^* (schwarze Quadrate) und die jeweiligen Verlustfaktoren (rote Quadrate) wurden im linearen viskoelastischen Bereich (LVR) bei 20 °C unter Anwendung einer Frequenz von 1 Hz und einer Polymerkonzentration von 1 % bestimmt.

Dabei wird ersichtlich, dass die Modifikation von I-Carrageen zu α-Carrageen zu einem deutlichen Rückgang der viskoelastischen Moduli führt, was sich generell mit einer Abschwächung des Gelcharakters des Polymers bei zunehmender α-Carrabiose in der Polymerkette beschreiben lässt. Im Gegensatz dazu konnte bei der Biotransformation von κ- zu β-Carrageen eine signifikante Zunahme der Gelstärke beobachtet werden. Dies ist insofern interessant, als dass der strukturelle Unterschied zwischen α- und β-Carrageen lediglich eine Sulfatgruppe beträgt. Es ist zu erwähnen, dass diese Versuche ohne externe Zugabe von Kationen durchgeführt wurden.

Weitergehend wurde der Einfluss der Polymermodifikation auf das thermische Verhalten der Polymere untersucht. Parallel zum zunehmenden Verlust der Gelierfähigkeit von α-Carrageen wurde ebenfalls eine geringere thermische Stabilität beobachtet. Im Kontrast dazu konnte bei der Biotransformation von κ- zu β-Carrageen eine deutliche Zunahme der Schmelz- und Geltemperaturen mit zunehmender Desulfatierung beobachtet werden, sprich die thermische Stabilität der Polymere wurde erhöht. Zudem wurde der Einfluss von Kationen auf Carrageene mit neuen Sulfatierungen untersucht. Die Zugabe von 0,2 % CaCl_2 oder KCl erhöhte die Gelstärke von I-Carrageen deutlich und führte zu elastischeren Gelen, wobei Calcium einen stärkeren Einfluss hatte. Mit steigendem Anteil von α-Carrageen beeinflussten die Kationen die viskoelastischen Moduli von I/α-Hybrid-Carrageen weniger, was nur zu einem geringen Anstieg von G' führte. Reines α-Carrageen bildete unter den getesteten Bedingungen keine Gelnetzwerke.

und zeigte ein flüssigkeitsähnliches Verhalten. Wie bereits beschrieben korreliert der Gehalt von β -Carrabiose innerhalb der Polymerkette mit höheren Gelier- und Schmelztemperaturen. Die Zugabe von Calcium hatte jedoch einen geringeren Einfluss auf die Gelier- und Schmelztemperaturen von β -Carrageen, was zu einer insgesamt geringeren Hysterese führte.

α -Carrageen bildete bei der Zugabe von 0,2 % der getesteten Kationen keine Gelstrukturen, und daher konnten keine Schmelz- und Gelier-Temperaturen bestimmt werden. Untersuchungen des Fließverhaltens von ι - und α -Carrageen zeigten für alle Varianten ein scherverdünnendes Verhalten. Die Zugabe von Calcium und Kalium hatte eine verdickende Wirkung auf ι -Carrageen, welche bei ι/α -Hybrid-Carrageen deutlich geringer ausfiel. Die vollständige Desulfatierung zu α -Carrageen führte zu einem signifikanten Rückgang der Viskosität, und auch die Zugabe von Kationen beeinflusste das Fließverhalten nicht wesentlich.

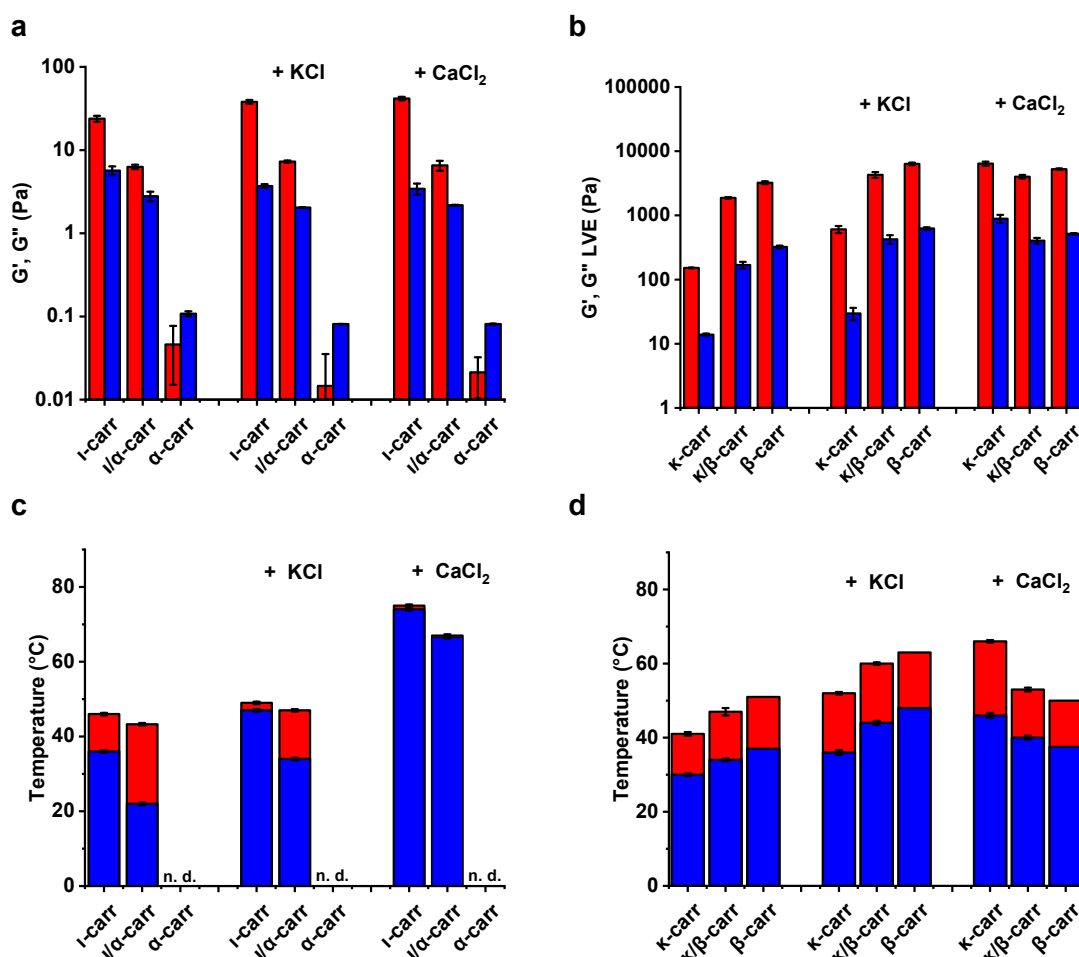


Abbildung 7: Rheologische Charakterisierung von 1%igen-Lösungen von ι - und κ -Carrageen (carr) bei unterschiedlichen Sulfatierungsleveln der Galactose mit und ohne Kationen. (a) Viskoelastische Moduli G' (rote Balken) und G'' (blaue Balken) von ι -Carrageen, ι/α -Carrageen und α -Carrageen ohne Zugabe von Salzen und mit 0,2 % KCl und CaCl_2 im LVR bei 20 $^{\circ}\text{C}$. (b) Viskoelastische Moduli G' (rote Balken) und G'' (blaue Balken) von κ -Carrageen, κ/β -Carrageen und β -Carrageen ohne Zugabe von Salzen und in Anwesenheit von 0,1 % KCl und CaCl_2 im LVR



bei 20 °C. (c) Schmelz- (rote Balken) und Geliertemperaturen (blaue Balken) von ι -Carrageen, ι/α -Carrageen und α -Carrageen ohne Zugabe von Salzen und mit 0,2 % KCl und CaCl_2 . (d) Schmelz- (rote Balken) und Geliertemperaturen (blaue Balken) von κ -Carrageen, κ/β -Carrageen und β -Carrageen ohne Zugabe von Salzen und mit 0,1 % KCl und CaCl_2 .

Wir konnten zudem zeigen, dass die enzymatische Desulfatierung von κ -Carrageen die Möglichkeit zur zeitabhängigen *in-situ* Produktion von Carrageen-basierten Gelen bietet (siehe Abbildung 8.) Die spezifischen Geleigenschaften dieser können spezifisch durch verschiedene Parameter wie Reaktionszeit, Polymerkonzentration, oder Enzymmenge moduliert werden, wodurch die Produktion von maßgeschneiderten Gelen ausgehend von nicht gelierenden κ -Carrageen-Lösungen möglich ist.

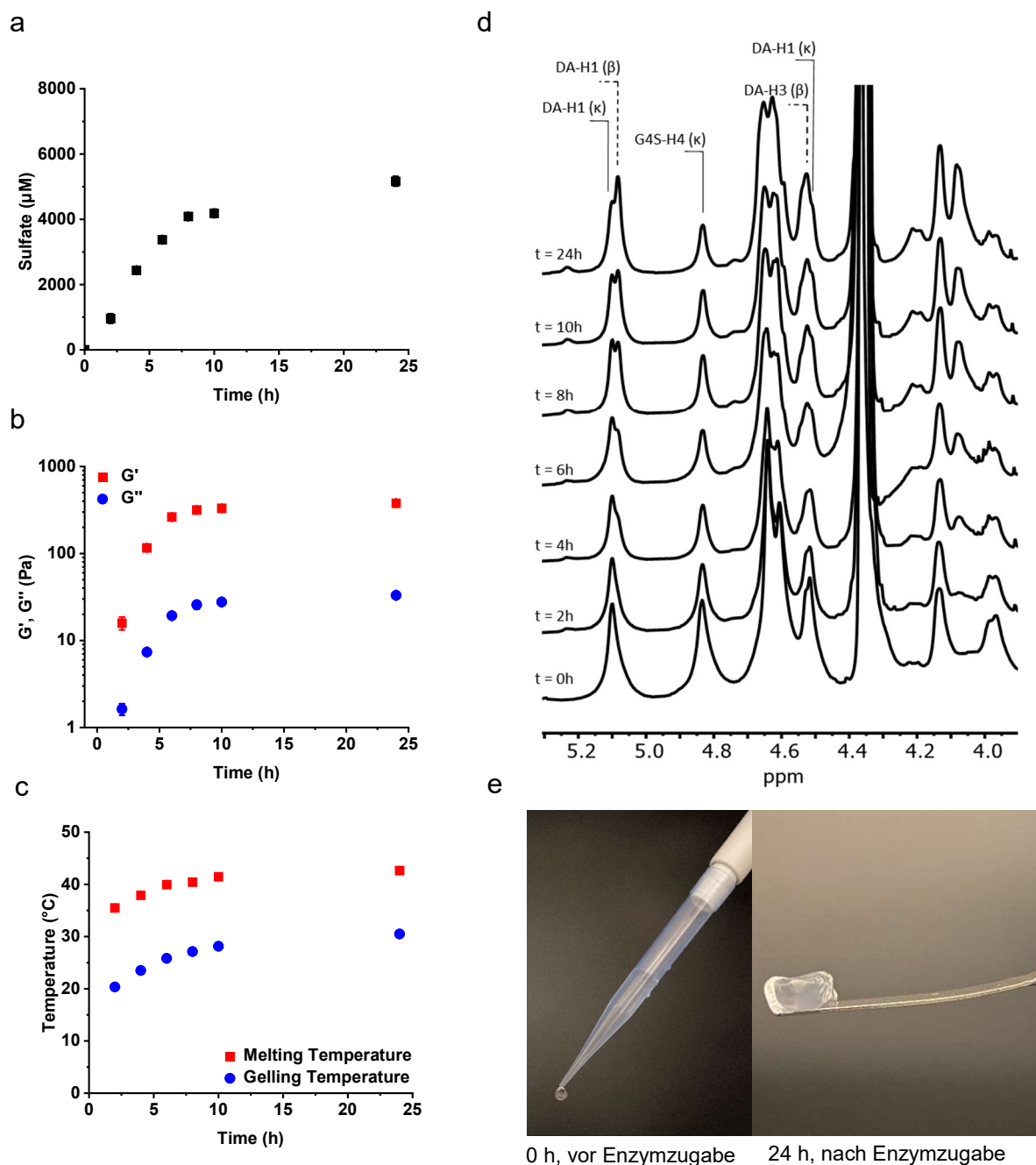


Abbildung 8: *In-situ* Modulation von Carrageen-Eigenschaften. (a) Freigesetztes Sulfat bestimmt durch Sulfat-Assay. (b) Viskoelastische Eigenschaften und (c) thermisches Verhalten der Reaktionsprodukte. (d) ^1H -NMR der Reaktionsprodukte zu verschiedenen Zeitpunkten. (e) Optisches Erscheinungsbild der Reaktion nach 0 h und 24 h.

Es konnte gezeigt werden, dass die Rheologie von Carrageenen enzymatisch durch gezielte Entfernung von Sulfatgruppen angepasst werden kann. Die in unseren Experimenten verwendeten kommerziellen Carrageene sind jedoch typischerweise von hoher Reinheit, wodurch sie nur teilweise mit Produkten aus industriellen Extraktionsprozessen vergleichbar sind (Webber

et al., 2012). Um das Potenzial der enzymkatalysierten Desulfatierung für nicht-kommerzielle Carrageene zu bewerten, wurde die Anwendbarkeit von CaCgs1 für die direkte Modifikation von Carrageenen mit unterschiedlichen Sulfatierungsmustern aus verschiedenen industriell relevanten Rotalgen getestet, die als Quelle für diverse Carrageene dienen.

Für kommerzielle Anwendungen werden hauptsächlich Carrageene aus *Kappaphycus alvarezii*, *Kappahycus striatus*, *Chondrus crispus* und *Eucheuma spinosum* verwendet. Diese repräsentieren die primären Quellen von κ -, Kappa2- und ι -Carrageen und wurden daher als repräsentative Substrate für unsere Experimente ausgewählt [5]. Da die Enzymeigenschaften von CaCgS1 die Verwendung der Sulfatase während der herkömmlichen Extraktion in einer stark alkalischen Umgebung unter hohen Temperaturen nicht erlaubten, wurde die Eignung von CaCgS1 für die direkte Integration in einen wässrigen Extraktionsprozess als Machbarkeitsstudie getestet. Die für diese Studie verwendeten Galaktane konnten bereits unter milden Bedingungen bei 37 °C schonend ohne Zusatz von Lauge extrahiert werden. Daher war eine kombinierter Prozess von und enzymatische Modifikation möglich. Die Analyse der Kationen-zusammensetzung und des Molekulargewichts der extrahierten Carrageene ist in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1: Kationen- und Molekulargewichtsanalyse der kommerziellen und extrahierten Carrageene.

Carrageen	Extraktions- methode	K	Na	Ca	MW
κ -carrageenan	Commercial	9.62 ± 0.27	0.50 ± 0.001	0.16 ± 0.03	3.2
ι -carrageenan	Commercial	3.90 ± 0.766	2.0 ± 0.005	4.60 ± 2.6	2.2
<i>Kappahycus alvarezii</i>	KOH	7.50 ± 0.08	n.d.	0.11 ± 0.006	1.9
	H ₂ O	3.63 ± 0.105	1.18 ± 0.01	0.20 ± 0.007	2.3
<i>Kappahycus striatus</i>	KOH	7.24 ± 0.12	0.082 ± 0.0007	0.13 ± 0.006	3.5
	H ₂ O	3.804 ± 0.095	0.86 ± 0.002	0.28 ± 0.004	2.79

<i>Chondrus Crispus</i>	KOH	7.99 ± 0.21	0.058 ± 0.0006	0.15 ± 0.02	4.8
	H ₂ O	3.15 ± 0.11	1.60 ± 0.012	0.45 ± 0.008	n.d.
<i>Eucheuma spinosum</i>	KOH	11.65 ± 0.17	0.275 ± 0.0008	0.131 ± 0.014	6.0
	H ₂ O	6.40 ± 0.20	1.92 ± 0.008	0.32 ± 0.007	5.37

n.d.: Nicht bestimmt

Nach Biotransformationen im präparativen Maßstab konnte spektroskopisch eine erfolgreiche Biotransformation und damit die katalytische Aktivität von CaCgS1 in der komplexen Extraktionsmatrix bestätigt werden. Die anschließende rheologische Analyse der Reaktionsprodukte bestätigte die erwartete Zunahme der Viskoelastizität sowie erhöhte Schmelz- und Gelierpunkte, wenn κ -Carrageen zu β -Carrageen-Einheiten desulfatiert wurde. Umgekehrt ging die Gelierfähigkeit verloren, wenn überwiegend α -Carrageen als Reaktionsprodukt im Polymer vorhanden war, was unsere bereits beschriebenen Beobachtungen für die kommerziellen Substrate bestätigte (siehe Abbildung 9).

Modifizierte Polymere, die aus *K. striatus* und *K. alvarezii* Biomasse extrahiert wurden, ergaben dabei die höchsten Gelstärken, da hier hybride κ/β -Carrageene ohne nachweisbare Anteile an α -Carrabiose produziert wurden. Die Modifikation von hybridem κ/ι -Carrageen aus *C. crispus* führte zu moderat niedrigeren Gelstärken des Polymers aufgrund höherer Mengen an α -Carrageen im Reaktionsprodukt (infolge der Desulfatierung von ι -Carrageen). Analog dazu zeigte das Biotransformationsprodukt von ι -Carrageen aus *E. spinosum* einen starken Rückgang von G' und G'' und einen Verlust des gelartigen Verhaltens, da das Reaktionsprodukt fast reines α -Carrageen war. Dies unterstützt unsere bisherigen Erkenntnisse und die daraus abgeleitete Struktur-Funktions-Beziehung.

Trotz erfolgreicher Desulfatierung von Carrageenen während ihrer Extraktion fanden wir heraus, dass die enzymatische Modifikation von zuvor alkalisch extrahierten und gereinigten Polymeren zu bis zu mehr als zehnfach höheren viskoelastischen Moduli sowie erhöhten Gelier- und Schmelztemperaturen führte (siehe Abbildung 9 f). Wir vermuten, dass dies auf das Fehlen der alkalischen Umwandlung von restlichen, nicht-gelierenden (nicht-cyclisierten) μ - und ν -Carrabiose-Einheiten in gelbildende κ - und ι -Carrageene zurückzuführen ist, die nach dem wässrigen Extraktionsprozess in der Polymerstruktur vorhanden waren. Das Vorhandensein dieser Strukturen konnte spektroskopisch bestätigt werden. Die Unregelmäßigkeiten in der



Struktur, die durch signifikante Mengen an μ - und ν -Carrageen-Einheiten verursacht werden, behindern die Helixbildung der Polymerstränge und unterdrücken die Gelierung (Vilén et al., 2010). Dies ist nicht der Fall, wenn die Algen nach alkalischer Vorbehandlung extrahiert wurden. Es ist daher in Zukunft sinnvoll, einen alternativen und nachhaltigeren Weg verglichen mit der alkalischen Extraktion durch die Integration von D-Galactose-Sulfurylasen anzustreben, um 3,6-Anhydro-D-Galactose-Reste enzymatisch zu produzieren und damit die Carrageen-Qualität zu erhöhen. Obwohl solche Transferasen bereits identifiziert und aus einigen Rotalgenarten isoliert wurden (Genicot-Joncour et al., 2009; Wang et al., 2014), wurde bisher keine heterologe Produktion erfolgreich durchgeführt.

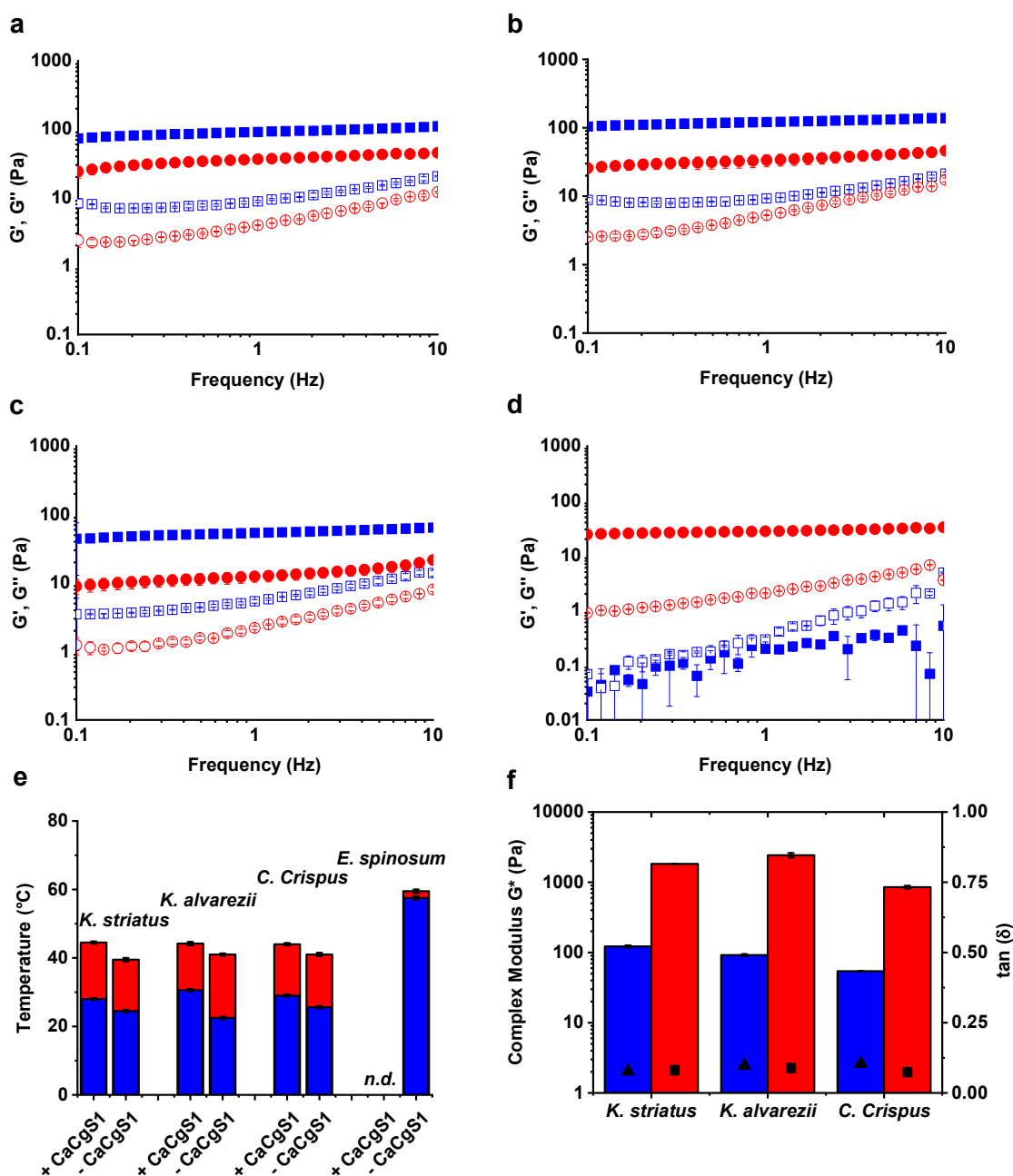


Abbildung 9: Rheologische Eigenschaften modifizierter Carrageene nach kombinierter Extraktion und Biotransformation von Algenbiomasse. Frequency-Sweeps von 1 %-Lösungen gereinigter Carrageene aus *Kappahycus striatus* (a), *Kappahycus alvarezii* (b), *Chondrus Crispus* (c) und *Eucheuma spinosum* (d). Blaue Symbole repräsentieren modifizierte Polymere nach Desulfatierung durch CaCgS1; rote Symbole repräsentieren Kontrollproben ohne Zugabe von CaCgS1. Offene Symbole repräsentieren Speichermoduli G' , geschlossene Symbole repräsentieren Verlustmoduli G'' . (e) Schmelz- (rote Balken) und Geliertemperaturen (blaue Balken) modifizierter Carrageen im Vergleich zu Kontrollproben ohne Zugabe von CaCgS1. Die Carrageen-Quellen sind über den jeweiligen Balken angegeben. Carrageene aus *E. spinosum* wurden mit 10 mM CaCl_2 ergänzt, um die Gelbildung zu fördern; alle anderen Polymere wurden mit 10 mM KCl ergänzt. (f) Vergleich der komplexen Moduli G^* und des Verlustfaktors $\tan(\delta)$ bei 1 Hz von CaCgS1-modifizierten Carrageene nach wässriger Extraktion (blaue Balken) oder vorheriger alkalischer Extraktion (rote Balken). n. d.: nicht bestimmt, da die Messung nicht möglich war.

1.6. Arbeitspaket 6

Arbeitspaket 6 umfasste die Verbreitung der relevantesten Ergebnisse als Publikationen. Seitens der TUM konnten hierbei bereits zwei Veröffentlichungen publiziert werden [6, 7]. Eine weitere Publikation in Zusammenarbeit mit UNESP ist noch geplant. Zudem sollen die Ergebnisse zur *in-situ* Produktion von Carrageen-Gelen noch veröffentlicht werden.

2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Der Finanz- und Zeitplan musste aufgrund der Covid-19-Pandemie deutlich geändert werden. Es gab Einschränkungen im Laborbetrieb und es waren keine Dienstreisen möglich. Unter Berücksichtigung der kostenneutralen Verlängerung um 12 Monate konnte der Zeitplan eingehalten werden. Auch der Finanzplan wurde unter Berücksichtigung der Umwidmung von Mitteln größtenteils eingehalten.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die im Laufe des Projektes erfolgten Forschungsarbeiten waren notwendig für das Erreichen der Projektmeilensteine und das Ziel des Vorhabens, neue Sulfatasen für die Modifikation von Biopolymeren bereitzustellen, um deren Anwendungsspektrum zu erweitern. Wesentliche Projektziele wurden mit den unternommenen Maßnahmen erreicht. Insbesondere die Identifikation von Sulfatasen aus den Stammsammlungen des Projektpartners und Sulfatasen für Nitrocellulose erwies sich jedoch schwieriger als gedacht. Dass dadurch weiterer Forschungsbedarf und Aufwand entstand, erklärt wieso einige Meilensteine im Projekt (insbesondere zu Nitrocellulose) nicht vollständig erreicht werden konnten. Die Arbeiten zu den Carrageen-Sulfatasen erwiesen sich hingegen als sehr erfolgreich, und bietet die Grundlage für weiter Folgearbeiten und für die Entwicklung kommerzieller Anwendungen.

4. Voraussichtlicher Nutzen und konkrete Planung für die Zukunft

Aus den erzielten Ergebnissen ergibt sich die Möglichkeit weitere Forschung im Bereich der Nutzung der neuen Carrageene zu verfolgen. Da insbesondere β -Carrageen in der Lage ist, bereits in geringen Konzentrationen und während der Biotransformation sehr starke Gele auszubilden, liegt hier aus unserer Sicht das größte kommerzielle Potential. Als sehr niedrigviskoses Biopolymer ist es zudem aussichtsreich, sich mit potentiellen Anwendungen von α -Carrageen zu beschäftigen.

5. Bekannt gewordener Fortschritt bei anderen Stellen

Während der Projektdauer sind Arbeiten bekanntgeworden, die sich mit der Rheologie von α -Carrageen beschäftigen [8]. Der Fokus lag dabei jedoch nicht auf der Identifizierung neuer Sulfatasen und deren Nutzung in nachhaltigen Prozessen zur Modifikation von Carrageenen, sondern auf der molekularen und strukturellen Grundlage des Fließverhaltens von Carrageenen, und steht daher nicht in Konkurrenz zum vorliegenden Vorhaben. Vielmehr wurden unsere Ergebnisse hier unabhängig in einem anderen Kontext bestätigt. Zudem wurden während

des Projektes verschiedene weitere Carrageen-Sulfatasen in anderen Arbeiten entdeckt [9, 10]. Diese Arbeiten entstanden jedoch im Kontext der Aufklärung des Carrageen Katabolismus verschiedener heterotropher Bakterie, und waren ebenfalls nicht für die Modifikation von Biopolymeren in unserem Vorhaben relevant.

6. Erfolgte und geplante Veröffentlichungen

Im Rahmen des Projektes sind bisher zwei wissenschaftliche Veröffentlichungen erfolgt [4, 7]. Eine weitere Veröffentlichung soll noch erfolgen. Zudem wurde ein Artikel über die Anwendung von Sulfatasen für die Biotechnologie, der auf den Ergebnissen des Projektes BioTrim beruht und der dieses Thema der Allgemeinheit vermitteln soll, im Magazin *BIOspektrum* veröffentlicht.

7. Literatur

1. Ficko-Blean E, Préchoux A, Thomas F, et al. (2017) Carrageenan catabolism is encoded by a complex regulon in marine heterotrophic bacteria. *Nature Communications* 8:1685
2. Dierks T, Lecca MR, Schlotterhose P, et al. (1999) Sequence determinants directing conversion of cysteine to formylglycine in eukaryotic sulfatasen. *The EMBO Journal* 18:2084-2091
3. Ortiz-Tena JG, Rühmann B, Sieber V (2018) Colorimetric Determination of Sulfate via an Enzyme Cascade for High-Throughput Detection of Sulfatase Activity. *Analytical Chemistry* 90:2526-2533
4. Fuchs A, Romeis D, Hupfeld E, et al. (2024) Biocatalytic Conversion of Carrageenans for the Production of 3,6-Anhydro-D-galactose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*
5. Porse H, Rudolph B (2017) The seaweed hydrocolloid industry: 2016 updates, requirements, and outlook. *Journal of Applied Phycology* 29:2187-2200
6. Fuchs A, Romeis D, Hupfeld E, et al. (2024) Biocatalytic Conversion of Carrageenans for the Production of 3,6-Anhydro-D-galactose. *J Agric Food Chem*
7. Fuchs A, Hupfeld E, Sieber V (2024) To gel or not to gel – Tuning the sulfation pattern of carrageenans to expand their field of application. *Carbohydrate Polymers*:121930
8. Elmarhoum S, Mathieu S, Ako K, et al. (2023) Sulfate groups position determines the ionic selectivity and syneresis properties of carrageenan systems. *Carbohydrate Polymers* 299:120166
9. Poulet L, Mathieu S, Drouillard S, et al. (2023) α -Carrageenan: An alternative route for the heterogenous phase degradation of hybrid ι - κ -carrageenan. *Algal Research* 71:103049
10. Jiang C, Zhang T, Li Q, et al. (2022) A Novel Carrageenan Metabolic Pathway in *Flavobacterium algicola*. *Applied and Environmental Microbiology* 88:e01100-01122