

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
26. Dezember 2019 (26.12.2019)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2019/243293 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

C12N 9/80 (2006.01) C12P 13/02 (2006.01)
C12N 9/78 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2019/065947

(22) Internationales Anmeldedatum:
18. Juni 2019 (18.06.2019)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
18179032.0 21. Juni 2018 (21.06.2018) EP

(71) Anmelder: **COVESTRO DEUTSCHLAND AG**
[DE/DE]; Kaiser-Wilhelm-Allee 60, 51373 Leverkusen
(DE).

(72) Erfinder: **BITTNER, Natalie**; Kleiberweg 4, 50226 Fre-
chen (DE). **NEFZGER, Hartmut**; Zu den Fußfällen 24,
50259 Pulheim (DE). **BEHNKEN, Gesa**; Bernhard Letter-
haus Str. 19, 50670 Köln (DE). **JÄGER, Gernot**; Neusser
Str. 413, 50733 Köln (DE). **BEHNKEN, Swantje**; 115 Bre-
ckenwood Way, Sacramento, CA 95864 (US). **REISKY,**
Lukas; Herzogstr. 89a, 52382 Niederzier (DE).

(74) Anwalt: **ALTMANN STÖBEL DICK Patentanwälte**
PartG mbB et al.; DICK, Alexander, Dudenstraße 46,
68167 Mannheim (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN,
KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,
SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ,
RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT,
LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI,
SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu
beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii)

(54) Title: NOVEL URETHANASES FOR THE ENZYMATIC DEGRADATION OF POLYURETHANES

(54) Bezeichnung: NEUE URETHANASEN FÜR DEN ENZYMATISCHEN ABBAU VON POLYURETHANEN

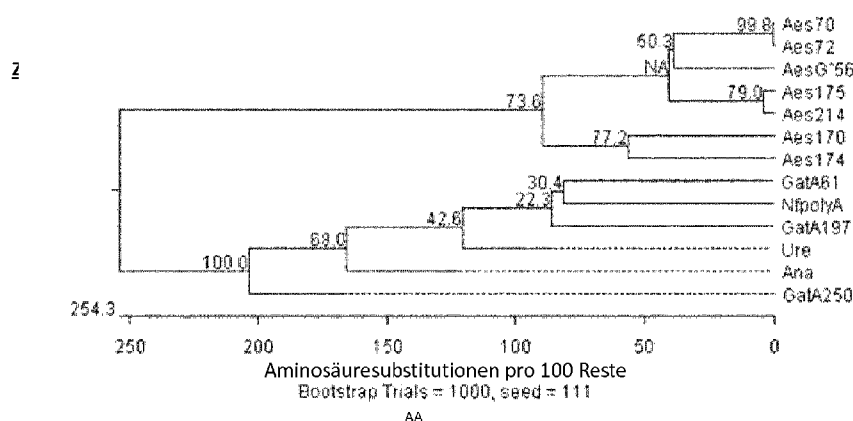


Abbildung 1

AA Amino acid substitution per 100 residues

(57) Abstract: The present invention relates to novel urethanases for the enzymatic degradation of polyurethanes and to an enzymatic process for the complete degradation of polyurethanes in defined monomers.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft neue Urethanasen für den enzymatischen Abbau von Polyurethanen sowie ein enzymatisches Verfahren für den vollständigen Abbau von Polyurethanen in definierte Monomere.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung (Regel 5 Absatz 2 Buchstabe a)
- mit Informationen über die Einbeziehung von fehlenden Teilen und/oder Bestandteilen durch Verweis (Regel 20 Absatz 6)

Neue Urethanasen für den enzymatischen Abbau von Polyurethanen

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Urethanasen für den enzymatischen Abbau von Polyurethanen sowie ein enzymatisches Verfahren für den vollständigen Abbau von Polyurethanen in definierte Monomere.

Polyurethane sind in vielen Bereichen des normalen Lebens etabliert. Sie finden sich zum Beispiel in Weichschäumen (Matratzen, Schwämme, Polstermöbel), Hartschäumen (Isolationsmaterialien, Baustoffe), Thermoplasten (Sportschuhe) oder Beschichtungen (Lacke, Farben, Klebstoffe). Aufgrund der stetig steigenden Nachfrage nach den Produkten werden zunehmend größere Mengen produziert. Parallel dazu wächst das Bedürfnis nach Methoden für möglichst nachhaltiges Recycling von nicht mehr benötigten Polyurethanprodukten, die eine Wiederverwertung von Bausteinen der Polymere erlaubt. Dafür müssen die Bindungen in den Polyurethanen gezielt gespalten werden, um definierte Abbauprodukte erhalten zu können und diese damit wiederverwertbar zu machen.

Neben den physiologischen Funktionen, welche Enzyme in lebenden Organismen erfüllen, können sie auf vielfältige Weise zur Katalyse chemischer Reaktionen außerhalb dieses Kontextes genutzt werden. Hierbei können im Vergleich zu konventionell chemischen Prozessen die Reaktionen bei mildereren Bedingungen wie niedrigerer Temperatur, neutralem pH-Wert und ohne die Verwendung aggressiver Chemikalien durchgeführt werden. Dadurch kann Energie gespart, die Bildung von Nebenprodukten minimiert und die Umwelt geschont werden, was zur Reduktion der Betriebskosten beiträgt. Durch den Einsatz von Enzymen wird es teilweise erst ermöglicht, dass labile Edukte umgesetzt werden können (Jaeger, K.-E. & Reetz, M. T. (1998) Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. Trends in biotechnology, 16, 396-403). Weiterhin sind Enzyme häufig regio-, stereo- und enantioselektiv, was die Aufreinigung der Produkte deutlich erleichtert und damit die effiziente Synthese schwer zugänglicher Produkte ermöglichen kann (Hasan, F., Shah, A. A. & Hameed, A. (2006) Industrial applications of microbial lipases. Enzyme and Microbial Technology, 39, 235-251).

Das Recycling von Polyurethanen wird hauptsächlich durch thermisches Recycling durchgeführt. Im Allgemeinen läuft dieser Prozess bei sehr hohen Temperaturen und mit sehr langen Reaktionszeiten im Batchprozess, sowie unter Einsatz von Katalysatoren ab. Dabei kann es passieren, dass ein thermischer Abbau der Polymerketten in Crackreaktionen zu unerwünschten und undefinierten Abbauprodukten oder auch die Bildung von Epoxidringen geschieht, welche zu einer hohen Geruchsbelastung und nachteiligen Vernetzungen der Ketten im recycelten Rohstoff führt und damit insbesondere eine personennahe Wiederverwendung, insbesondere bei der Schaumstoffproduktion für den Möbel- und Matratzenbau unmöglich machen kann. Alternativ wird auch eine vollständige Verbrennung und damit energetische Verwertung durchgeführt, dabei wird zwar Energie gewonnen aber eine effiziente Wiederverwendung der Polymerbausteine entfällt.

Es ist bekannt, dass Polyurethane in gewissem Maße von Bakterien und Pilzen abgebaut werden können. Dabei sind Polyesterpolyurethane deutlich anfälliger gegenüber mikrobiellem bzw. enzymatischem Abbau als Polyetherpolyurethane (Nakajima-Kambe, T., Shigeno-Akutsu, Y., Nomura, N., Onuma, F. & Nakahara, T. (1999) Microbial degradation of polyurethane, polyester polyurethanes and polyether polyurethanes. *Applied microbiology and biotechnology*, 51, 134-140).

Der Abbau von Polyesterpolyurethanen lässt sich leicht über die Hydrolyse der Esterbindungen realisieren. Der relativ einfache Abbau von Polyestern ist nicht weiter verwunderlich, da Esterbindungen in hydrophoben Substraten in der Natur auch beim Abbau von Lipiden gespalten werden müssen und auch Polyester ohne Urethanbindungen relativ leicht durch Esterasen und Lipasen abgebaut werden können (Marten, E., Müller, R.-J. & Deckwer, W.-D. (2003) Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters I. Low molecular mass model esters and aliphatic polyesters. *Polymer degradation and stability*, 80, 485-501; Marten, E., Müller, R.-J. & Deckwer, W.-D. (2005) Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters. II. Aliphatic-aromatic copolyesters. *Polymer degradation and stability*, 88, 371-381.). In verschiedenen Literaturstellen wurden zum Abbau von Polyurethan verwendete Enzyme als Esterasen charakterisiert (Allen, A. B., Hilliard, N. P. & Howard, G. T. (1999) Purification and characterization of a soluble polyurethane degrading enzyme from *Comamonas acidovorans*. *International biodeterioration & biodegradation*, 43, 37-41; Blake, R., Norton, W. & Howard, G. (1998) Adherence and growth of a *Bacillus* species on an insoluble polyester polyurethane. *International biodeterioration & biodegradation*, 42, 63-73; Crabbe, J. R., Campbell, J. R., Thompson, L., Walz, S. L. & Schultz, W. W. (1994) Biodegradation of a colloidal ester-based polyurethane by soil fungi. *International biodeterioration & biodegradation*, 33, 103-113; Darby, R. T. & Kaplan, A. M. (1968) Fungal susceptibility of polyurethanes. *Applied microbiology*, 16, 900-905; Howard, G. T., Norton, W. N. & Burks, T. (2012) Growth of *Acinetobacter gernerii* P7 on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase enzyme. *Biodegradation*, 23, 561-573; Kaplan, A. M., Darby, R. T., Greenberger, M. & Rodgers, M. (1968) Microbial deterioration of polyurethane systems. *Dev Ind Microbiol*, 82, 362-371; Kay, M., Morton, L. & Prince, E. (1991) Bacterial degradation of polyester polyurethane. *International biodeterioration*, 27, 205-222; Vega, R. E., Main, T. & Howard, G. T. (1999) Cloning and expression in *Escherichia coli* of a polyurethane-degrading enzyme from *Pseudomonas fluorescens*. *International biodeterioration & biodegradation*, 43, 49-55). Dort gibt es keinen eindeutigen Nachweis auf die Spaltung der Urethanbindung, da die Enzymcharakterisierung in keinem Fall auf Grundlage der Spaltung eines Moleküls mit Urethangruppe durchgeführt wurde.

In vielen Publikationen und Patenten ist der Abbau von Poly(ester)urethanen mit Pilzen oder Bakterien beschrieben. Jedoch zielt der Abbau meist nur auf die relativ leicht zu spaltenden Esterbindungen und wird meist nur durch eine makroskopische Beobachtung des Polymerabbaus belegt. Es gibt hier keinen gesteuerten Abbau von Ester- und Urethanbindungen, wie in der vorliegenden Erfindung, und es ergeben sich häufig lange Abbauzeiten. Diese Veröffentlichungen

zeigen, dass Urethanasen weit verbreitete Enzyme sind, jedoch belegen sie nicht deren spezifischen Fähigkeiten, Einsatzmöglichkeiten und Gruppenzugehörigkeit, wie in der vorliegenden Erfindung genutzt. (JP09192633, Tang, Y. W., Labow, R. S., Santerre, J. P. (2003) Enzyme induced biodegradation of polycarbonate-polyurethanes: dose dependence effect of cholesterol esterase. Biomaterials 24 (12), 2003-2011, Vega, R. E., Main, T. & Howard, G. T. (1999) Cloning and expression in Escherichia coli of a polyurethane-degrading enzyme from Pseudomonas fluorescens. International biodeterioration & biodegradation, 43, 49-55)

Zum enzymatischen Abbau von Poly(ester)urethanen ist ein Abbauverfahren bekannt, bei dem im ersten Schritt aus einer Kultivierung von *Comamonas acidovorans* Stämmen eine Esterase gewonnen wird, indem als Kohlenstoffquelle nur Poly(ester)urethan zur Verfügung steht. In einem aufwendigen Aufarbeitungsschritt wird die Esterase abgetrennt und für den Abbau von Poly(ester)urethanen im Batch eingesetzt. Hierbei ergeben sich lange Abbauzeiten in einem mehrstufigen Verfahren und keine Belege für eine spezifische Spaltung der Urethanbindungen. (JP 09201192, JP 10271994)

In verschiedenen Patenten und Publikationen wird der Abbau von Poly(ester)urethanen mit Cutinasen, Esterasen und/oder Lipasen beschrieben. Jedoch zielt der Abbau hier nur auf die relativ einfache Spaltung der Esterbindungen, nicht aber spezifisch auf die Urethanbindungen. Außerdem wird keine gezielte Kombination von Ester- und Urethanbindungen spaltenden Enzymen zur gezielten Steuerung des Abbaus beschrieben. Es ist davon auszugehen, dass die beschriebenen Verfahren nur zu einer geringen oder keiner Spaltung der Urethanbindung führen. Damit können eingesetzte Diamine nicht effizient wiedergewonnen werden. (EP 0968300, US 6,180,381)

In WO 2013/134801 wird der Abbau von aromatischen Polyurethanen, basierend auf Polyetherpolyolen, unter Anwendung eines Enzymes der Klasse EC 3 beschrieben. Dabei sind keine spezifischen Enzymsequenzen angegeben, so dass die Spezifität des Verfahrens in dem Abbau bestimmter Urethanbindungen, sowie der kontrollierten Spaltung von Ester- und gesondert der Spaltung von Urethanbindungen, wie in der vorliegenden Erfindung gezeigt, in dem genannten Patent nicht belegt ist. Weiterhin gibt es keine Beschreibung einer Regelung des pH Wertes der Mischung während des Polymerabbaus, zur Erhaltung der Urethanaseaktivität. Weiterhin ist kein regioselektiver Abbau beschrieben, sowie kein Abbau von aliphatischen Poly(ester)urethanen.

In WO 2006/019095 wird eine Urethanase und durch Protein Engineering gewonnene Varianten dieses Enzyms beschrieben. Das Enzym kann auf TDA oder MDA beruhende Urethanoligomere spalten. Jedoch werden hier weder Bindungen regioselektiv gespalten noch gibt es eine Anwendung in Kombination mit Esterasen zum Abbau von Polymeren. Zudem sind keine weiteren Urethanasen aus der GatA- oder Aes-Familie, oder irgendeiner anderen Gruppe beschrieben.

Der vorliegenden Erfindung lag somit die Aufgabe zugrunde, weitere Enzyme bereitzustellen, die für die enzymatische Spaltung von Urethanbindungen und vorzugsweise für die Verwendung beim vollständigen enzymatischen Abbau von Polyurethanen einsetzbar sind. Weiterhin sollte ein enzymatisches Verfahren bereitgestellt werden, das den Abbau von Polyurethanen in definierte Monomere ermöglicht.

Diese Aufgabe wird durch die in den Patentansprüchen und in der untenstehenden Beschreibung offenbarten Ausführungsformen gelöst.

In einer ersten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 3, SEQ ID Nr. 2, SEQ ID Nr. 4, SEQ ID Nr. 5, SEQ ID Nr. 6, SEQ ID Nr. 8, SEQ ID Nr. 10 und Varianten dieser Polypeptide oder ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID Nr. 7 oder eine Variante davon, dadurch gekennzeichnet dass das Polypeptid Urethanaseaktivität aufweist.

Referenz für die erwähnten Polypeptide

SEQ ID Nr.	Interne Bezeichnung	Bezeichnung in Studie
1	Enz01	GatA61
2	Enz02	Aes70
3	Enz03	Aes72
4	Enz04	Aes170
5	Enz05	Aes174
6	Enz06	Aes175
7	Enz07	GatA197
8	Enz08	Aes214
9	Enz09	GatA250
10	Enz10	AesGö56
11	Ref01	SB12
12	Ref02	SB23

Polypeptid

Der Begriff „Polypeptid“ ist dem Fachmann gut bekannt. Er bezeichnet eine Kette von wenigstens 50, vorzugsweise wenigstens 70 Aminosäuren, die durch Peptidbindungen miteinander verknüpft sind. Ein Polypeptid kann sowohl natürlich vorkommende als auch synthetische Aminosäuren enthalten. Vorzugsweise enthält es die bekannten proteinogenen Aminosäuren.

Für SEQ ID Nr. 1 bis 5, 9 und 10 wird eine Variante durch Hinzufügung, Deletion oder Austausch von bis zu 10 %, bevorzugt bis zu 5 %, der im jeweiligen Polypeptid enthaltenen Aminosäuren erhalten. Eine bevorzugte Variante von SEQ ID Nr. 7 wird durch Hinzufügung, Deletion oder Austausch von bis zu 5 %, der in SEQ ID Nr. 7 definierten Aminosäuren erhalten. Besonders bevorzugte Varianten der vorgenannten Polypeptide werden durch Hinzufügung, Deletion oder Austausch von bis zu 20, bevorzugt bis zu 10 und noch stärker bevorzugt bis zu 5 Aminosäuren der offenbarten Sequenzen erhalten. Bevorzugte Varianten von SEQ ID Nr. 6 und SEQ ID Nr. 8 werden durch Hinzufügung, Deletion oder Austausch von bis zu 3, stärker bevorzugt bis zu 2 Aminosäuren erhalten. Grundsätzlich können die vorgenannten Modifikationen an jeder beliebigen Stelle des Polypeptids kontinuierlich oder diskontinuierlich erfolgen. Bevorzugt erfolgen sie aber nur am N-Terminus und/oder am C-Terminus des Polypeptids. Jede erfindungsgemäße durch Hinzufügung, Austausch oder Deletion von Aminosäuren erhaltene Variante ist aber durch Urethanaseaktivität wie weiter unten in dieser Anmeldung definiert gekennzeichnet.

Die Polypeptide, wie sie durch SEQ ID Nr. 3, SEQ ID Nr. 2, SEQ ID Nr. 4, SEQ ID Nr. 5, SEQ ID Nr. 6, SEQ ID Nr. 8 und SEQ ID Nr. 10 definiert sind, bilden eine von dem bisher einzigen bekannten Enzym mit Urethanaseaktivität, Ure, phylogenetisch unterschiedene Gruppe (siehe Abbildung 1). Aus dieser Gruppe waren bisher noch keine Enzyme mit entsprechender Aktivität bekannt. Im Folgenden wird diese Gruppe von Polypeptiden auch als „Aes-ähnlich“ bezeichnet.

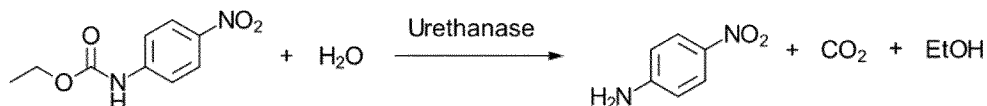
Urethanaseaktivität

Der Begriff „Urethanaseaktivität“ bezieht sich auf die Fähigkeit eines Polypeptids, die Spaltung einer Urethangruppe enzymatisch zu katalysieren. Pro Mol Urethangruppe entsteht hierbei ein Mol Amin, ein Mol Alkohol und ein Mol CO₂.

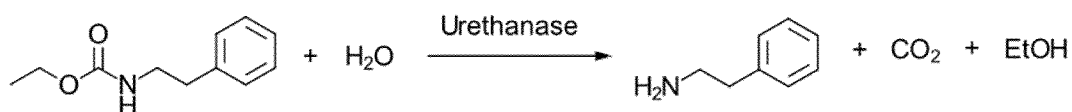
Bei der Urethangruppe kann es sich um eine aromatisch oder eine aliphatisch gebundene Urethangruppe handeln. Bei einer aromatisch gebundenen Urethangruppe ist das Stickstoffatom direkt an einen aromatischen Ring gebunden. Bei einer aliphatisch gebundenen Urethangruppe ist das Stickstoffatom an einen Alkylrest gebunden. Vorzugsweise handelt es sich um einen unverzweigten Alkylrest mit wenigstens einem, stärker bevorzugt wenigstens zwei und am stärksten bevorzugt wenigstens drei Kohlenstoffatomen. In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das Polypeptid mit Urethanaseaktivität in der Lage eine aromatisch gebundene Urethangruppe enzymatisch zu spalten.

Ob ein Polypeptid eine Urethanaseaktivität besitzt, kann durch die Spaltung geeigneter Modellsubstrate überprüft werden.

Für die Fähigkeit zur Spaltung aromatisch gebundener Urethangruppen dient vorzugsweise Ethyl-4-Nitrophenylcarbammat (ENPC) als Modells substrat. Die Spaltung wird durch die Bestimmung des Konzentrationsanstiegs von 4-Nitroanilin nachgewiesen. Dies erfolgt vorzugsweise photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm. Die Enzymaktivität wird vorzugsweise in einem Reaktionspuffer mit 100 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , pH 7 mit 6,25 Vol.-% Ethanol in Anwesenheit von 0,2 mg/L ENPC als Substrat bestimmt. Die Inkubation des Enzyms im Reaktionspuffer mit ENPC erfolgt vorzugsweise bei Raumtemperatur und vorzugsweise für 24 Stunden.



Für die Fähigkeit zur Spaltung aliphatisch gebundener Urethangruppen dient vorzugsweise Ethylphenethylcarbammat (EPEC) als Modells substrat. Die Spaltung wird durch die Bestimmung des Konzentrationsanstiegs von Phenethylamin nachgewiesen. Dies erfolgt vorzugsweise durch HPLC. Der verwendete Reaktionspuffer und die Reaktionsbedingungen entsprechen vorzugsweise den oben für ENPC beschriebenen Parametern.



Enzymatische Spaltung

Der Begriff „enzymatische Spaltung einer Urethangruppe“ kennzeichnet, dass die oben beschriebene Spaltung einer Urethangruppe in Anwesenheit eines Polypeptids mit Urethanaseaktivität schneller abläuft als bei Inkubation mit dem Reaktionspuffer ohne Enzym unter denselben Reaktionsbedingungen oder bei Inkubation mit dem Reaktionspuffer unter denselben Bedingungen in Anwesenheit eines inaktiven Polypeptids. Als Modell für ein inaktives Polypeptid ist bovines Serumalbumin bevorzugt. Wenn in Anwesenheit eines zu testenden Polypeptids die Spaltung der Urethangruppe schneller abläuft als in einer ansonsten identischen Kontrolle mit BSA, besitzt besagtes Polypeptid Urethanaseaktivität wie in dieser Anmeldung verstanden.

Verwendung

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung eines Polypeptids mit einer Aminosäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 3, SEQ ID Nr. 2, SEQ ID Nr. 4, SEQ ID Nr. 5, SEQ ID Nr. 6, SEQ ID Nr. 8, SEQ ID Nr. 10 und Varianten dieser Polypeptide oder eines GatA-ähnlichen Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID Nr. 7

oder einer Variante davon, dadurch gekennzeichnet dass das Polypeptid Urethanaseaktivität aufweist, zur enzymatischen Spaltung von Urethanbindungen.

Alle oben gegebenen Definitionen gelten – soweit nicht explizit anders definiert – auch für diese Ausführungsform.

Abbau von Urethanen in niedermolekulare Abbauprodukte

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Abbau von Polyester-Polyurethanen in niedermolekulare Abbauprodukte enthaltend die Schritte

- a) Spaltung der im Polyester-Polyurethan enthaltenen Estergruppen; und
- b) Spaltung der im Polyester-Polyurethan enthaltenen Urethangruppen mit einem Polypeptid, welches Urethanaseaktivität aufweist;

mit der Maßgabe, dass die Verfahrensschritte a) und b) in beliebiger Reihenfolge oder auch gleichzeitig durchgeführt werden können.

Als Peptide mit Urethanaseaktivität sind die in dieser Anmeldung beschriebenen Peptide mit Aminosäuresequenzen wie in der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 und 10 definiert sowie Aminosäuresequenzen mit wenigstens 90 % Sequenzidentität zu den vorgenannten Sequenzen besonders gut geeignet. Ganz besonders bevorzugt werden Peptide mit Aminosäuresequenzen wie in SEQ ID NO: 3 oder 7 definiert und Aminosäuresequenzen mit wenigstens 90 % Sequenzidentität zu den vorgenannten Sequenzen eingesetzt.

Deswegen betrifft die vorliegende Erfindung in einer besonders bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren zum Abbau von Polyester-Polyurethanen in niedermolekulare Abbauprodukte enthaltend die Schritte

- a) Spaltung der im Polyester-Polyurethan enthaltenen Estergruppen; und
- b) Behandlung des Polyurethans mit einem Polypeptid, welches Urethanaseaktivität aufweist und eine Aminosäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 10 und Aminosäuresequenzen mit wenigstens 90 % Sequenzidentität zu den vorgenannten Sequenzen hat;

mit der Maßgabe, dass die Verfahrensschritte a) und b) in beliebiger Reihenfolge oder auch gleichzeitig durchgeführt werden können.

Vorzugsweise wird der Verfahrensschritt a) vor dem Verfahrensschritt b) durchgeführt.

Verfahrensschritt a) wird vorzugsweise mit einer Lipase durchgeführt. Diese Lipase ist bevorzugt wasserlöslich und liegt nicht in immobilisierter Form vor. „Immobilisiert“ bezeichnet hier die in der Biotechnologie allgemein bekannte Bindung von Peptiden, insbesondere Antikörper oder Enzymen an die Oberfläche von Gefäßen oder an wasserunlösliche Partikel.

Stärker bevorzugt wird eine Lipase verwendet, die in der Lage ist, Tributyrin zu spalten. Noch stärker bevorzugt wird ein Polypeptid verwendet, das eine Aminosäuresequenz wie in SEQ ID Nr. 11 oder SEQ ID Nr. 12 definiert aufweist oder dessen Aminosäuresequenz wenigstens 90 %, bevorzugt wenigstens 95 %, Sequenzidentität mit einer der beiden vorgenannten Sequenzen aufweist und das in der Lage ist Tributyrin zu spalten. Verfahrensschritt a) wird vorzugsweise unter Reaktionsbedingungen durchgeführt, bei denen die verwendete Lipase Aktivität zeigt. Solche Bedingungen können durch Routineexperimente mit gängigen biochemischen Methoden bestimmt werden.

Da die erfindungsgemäßen Polypeptide mit Urethanaseaktivität ihre maximale Aktivität im neutralen Bereich haben, wird der Verfahrensschritt b) vorzugsweise bei einem pH-Wert zwischen 6,0 und 10,0, bevorzugt zwischen 6,0 und 8,0 durchgeführt. Die Einstellung des pH-Wertes kann durch alle dem Fachmann bekannten und geeigneten Basen erfolgen.

Der Begriff „Polyester-Polyurethan“ bezeichnet ein Polyurethan, das aus einem oder mehreren Polyesterpolyolen und einem oder mehreren Isocyanaten aufgebaut ist. Das Polyurethan kann geschäumt oder nicht geschäumt vorliegen. Bevorzugt liegt es geschäumt vor. Um die spezifische Oberfläche zu vergrößern, ist es bevorzugt, das Polyurethan vor Durchführung der Verfahrensschritte a) und b) zu zerkleinern. Dies ist insbesondere bevorzugt, wenn Polyurethan in nicht geschäumter Form eingesetzt werden soll. Das Zerkleinern kann auf alle dem Fachmann geläufigen Arten geschehen, vorzugsweise durch Mahlen, Hobeln, Reißen oder Schneiden.

Das Polyurethan enthält als Isocyanatkomponente wenigstens ein aromatisches, aliphatisches oder cycloaliphatisches Isocyanat. Bevorzugt enthält das Polyurethan nur aromatische Isocyanate. Bevorzugte aromatische Isocyanate sind Methyldiphenylisocyanat (MDI), Varianten des MDI mit drei und mehr Kernen Naphthylendiisocyanat und Toluylendiisocyanat. Besonders bevorzugte aromatische Isocyanate sind Methyldiphenylisocyanat (MDI), Varianten des MDI mit drei und mehr Kernen und Toluylendiisocyanat. Varianten des MDI mit drei und mehr Kernen sind Nebenprodukte der Synthese und können auch in Polyurethanen enthalten sein. Besonders

bevorzugt enthält das abzubauen Polyurethan 2,4-Toluylendiisocyanat und 2,6-Toluylendiisocyanat.

Der Begriff „Polyesterpolyol“ ist dem Fachmann bekannt, es handelt sich um Polyester, die im Durchschnitt pro Molekül wenigstens 1,5, bevorzugt wenigstens 1,8 und stärker bevorzugt wenigstens 2,0 Hydroxylgruppen enthalten. Besonders bevorzugt weisen die in dem abzubauen Polyurethan enthaltenen Polyesterpolyole Funktionalität zwischen 1,5 und 6,0 auf. Sie enthalten als Aufbaukomponenten aromatische und/oder aliphatische Polyole sowie aromatische und/oder aliphatischen Polycarbonsäuren in beliebiger Kombination.

Die niedermolekularen Abbauprodukte der polyesterbasierten Polyurethanschäume weisen vorzugsweise ein Molekulargewicht von höchstens 1.000 g/mol auf. Es handelt sich vorzugsweise um

- (i) Amine, die von den bei der Herstellung des betreffenden Polyurethans eingesetzten Isocyanaten abgeleitet sind, Beispielsweise im Falle von 2,4-Toluylendiisocyanat um das 2,4-Toluyldiamin; und
- (ii) Alkohole und Carbonsäuren, die zum Aufbau der für die Synthese des betreffenden Polyurethans eingesetzten Polyesterpolyole eingesetzt wurden.

Unter einem „Polyol“ wird in dieser Anmeldung jede Verbindung mit wenigstens zwei Hydroxylgruppen verstanden. Besagtes Polyol hat vorzugsweise ein Molekulargewicht von höchstens 300 g/mol. Bevorzugte Polyole, die niedermolekulare Abbauprodukte der polyesterbasierten Polyurethanschäume sind, sind ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ethylenglycol, Diethylenglykol, 1,4-Butandiol, Triethylenglycol, Propylenglycol, 1,2-Di-Propylenglycol, Neopentylglykol, Glycerin, 1,1,1-Trimethylolpropan, Saccharose, Sorbitol und Pentaerythrit.

Unter einer „Polycarbonsäure“ wird in dieser Anmeldung jede Verbindung verstanden, die wenigstens zwei Carboxylgruppen enthält. Besagte Polycarbonsäure hat vorzugsweise ein Molekulargewicht von höchstens 300 g/mol. Bevorzugte Polycarbonsäuren, die niedermolekulare Abbauprodukte der polyesterbasierten Polyurethanschäume sind, sind ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bernsteinsäure, Glutarsäure, Adipinsäure, Phthalsäure, Terephthalsäure, Benzoltricarbonsäure, Ölsäure und Ricinolsäure. Besonders bevorzugte Polycarbonsäuren, die niedermolekulare Abbauprodukte der polyesterbasierten Polyurethanschäume sind, sind ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bernsteinsäure, Glutarsäure, Adipinsäure, Phthalsäure, Terephthalsäure und Benzoltricarbonsäure.

Unter einem „Polyamin“ wird in dieser Anmeldung jede Verbindung verstanden, die wenigstens zwei Aminogruppen enthält. Besagtes Polyamin hat vorzugsweise ein Molekulargewicht von höchstens

300 g/mol. Bevorzugte Polyamine, die niedermolekulare Abbauprodukte der polyesterbasierten Polyurethanschäume sind, sind ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 4,4'-Methyldiamin, 2,4'-Methyldiamin, 2,2'-Methyldiamin, 2,4-Toluyldiamin, 2,6-Toluyldiamin, Hexamethyldiamin, Isophorondiamin, Xylyldiamin, Pentamethyldiamin, para-Phenyldiamin, Butyldiamin und H12-Methyldiamin. Stärker bevorzugt sind die Polyamine ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 4,4'-Methyldiamin, 2,4'-Methyldiamin, 2,2'-Methyldiamin, 1,4-Naphthylendiamin, 1,5-Naphthylendiamin, 1,6-Naphthylendiamin, 2,4-Toluyldiamin und 2,6-Toluyldiamin. Besonders bevorzugt sind die Polyamine ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 4,4'-Methyldiamin, 2,4'-Methyldiamin, 2,2'-Methyldiamin, 2,4-Toluyldiamin und 2,6-Toluyldiamin.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht ein effektives Recycling von Polyurethanen in zweierlei Hinsicht: (i) Das Verfahren selbst benötigt aufgrund der milden Reaktionsbedingungen keinen hohen Energieeinsatz und ermöglicht (ii) die stoffliche Verwertung des Polyurethans, da definierte Abbauprodukte entstehen, die ihrerseits wertvolle chemische Grundstoffe sind.

Im Vergleich dazu erfolgt die thermische Glykolyse, die zurzeit die gängigste Chemolyse zum Recycling von Polyurethan darstellt und bereits industriell umgesetzt ist, bei sehr hohen Temperaturen. Dabei liegt der Fokus auf der Gewinnung der Polyole, während die Amine als Störfaktor abgetrennt und nicht zurückgewonnen werden. Bei der nicht-enzymatischen Hydrolyse werden sowohl Polyole als auch Amine als Produkte gewonnen. Dieses Verfahren erfolgt jedoch bei hohen Temperaturen und hohen Umgebungsdrücken.

Übersicht über die Abbildungen:

Abbildung 1: Ergebnis der phylogenetischen Analyse der in der vorliegenden Anmeldung offenbarten Aminosäuresequenzen

Die folgenden Ausführungsbeispiele dienen nur dazu, die Erfindung zu erläutern. Sie sollen den Schutzzumfang der Patentansprüche in keiner Weise beschränken.

Beispiele

Test der Enzymaktivität mit ENPC

0,2 mg/ml ENPC wurden in 100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ bei pH 7,0 mit 6,25 Vol.-% Ethanol bei Raumtemperatur und 900 rpm auf dem Plattenschüttler „MTS 2/4“ (IKA, Staufen) für 24 Stunden inkubiert.

Nach dem Filtrieren der Proben wurden jeweils 100 μL in transparente 96-well-Platten mit flachem Boden „UV-Star“ (Greiner Bio-One, Frickenhausen) übertragen und die Extinktion bei 405 und 480 nm bestimmt. Der Wert bei 480 nm wurde gemessen, da 4-Nitroanilin hier nicht mehr signifikant absorbiert und es somit bei hohen Werten für beide Wellenlängen sehr wahrscheinlich war, dass nicht 4-Nitroanilin sondern ein anderer Stoff für die Extinktion bei 405 nm verantwortlich war.

Bei der Hydrolyse durch Urethanasen wird das fast farblose ENPC zu 4-Nitroanilin, CO_2 und Ethanol gespalten, wobei 4-Nitroanilin bei 405 nm im Mikrotiterplatten-Photometer „Infinite M1000PRO“ (Tecan, Männedorf, Schweiz) detektiert werden konnte. Zur Steuerung des Photometers wurde die Software „i-control“ (Tecan, Männedorf, Schweiz) in der Version 3.4.2.0 verwendet. Zudem wurde 4-Nitroanilin mit der Methode „Dabsylamin“ per HPLC detektiert.

Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)

Die Hochdruckflüssigchromatographie wurde an einem Gerät der 1100er Serie von Agilent Technologies (Santa Clara, USA) mit *Autosampler* und DAD (*diode array detector*) für UV und den sichtbaren Bereich des Lichtes durchgeführt. Für alle Messungen wurde die Säule „Zorbax XDB-C18“ mit einer Partikelgröße von 3,5 μm und den Abmessungen 4,6 x 75 mm (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) verwendet. Bei allen Methoden wurden 5 μL Probe injiziert und die Säule auf 40 °C temperiert. Der Fluss lag generell bei 1,5 mL/min. Wegen der Verwendung einer Umkehrphasensäule wurde bei allen Methoden mit steigenden Konzentrationen an organischem Lösemittel eluiert.

Zur Detektion und Quantifizierung von dabsylierten aliphatischen Aminen und Urethanen wurde die Methode „Dabsylamin“ verwendet. Aromatische Amine und Urethane konnten wegen der hohen Eigenabsorption ohne Derivatisierung mit dieser Methode quantifiziert werden. Als Laufmittel wurde neben AcN 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 verwendet, dem zum Schutz vor mikrobiellem Wachstum 0,005% (w/v) Natriumazid zugegeben wurde. Um Druckproblemen durch verunreinigte Pumpenventile vorzubeugen wurde dem AcN später 5% (v/v) ddH₂O zugegeben und die Methode angepasst („Dabsylamin95“). Zur Bestimmung der MDEC-Menge aus den enzymkatalysierten Reaktionen von 4,4'-MDA mit EC wurde die Methode „Dabsylamin-12-MeOH“ verwendet, wobei die wässrige Komponente angesäuert ist und die dadurch protonierten aromatischen Amine sehr früh

eluieren. Zur Untersuchung der Reaktionen von 4,4'-MDA mit DMC, 2,4-TDA mit DMC und 2,4-TDA mit EC wurde die Methode „Dabsylamin95-H₂O“ genutzt, welche sich von „Dabsylamin95“ lediglich durch die Verwendung von reinem ddH₂O anstatt Puffer unterscheidet. Die Analyse der Daten erfolgte mit der Software „OpenLAB CDS ChemStationLC“ in der Version A.02.09[017] (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

Dabsylamin: Laufmittel: AcN und 10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7,0

t [min]	AcN
0	5
6,5	85
8,0	5
10,0	5

Dabsylamin95: Laufmittel: AcN mit 5% (v/v) ddH₂O und 10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7,0

t [min]	% AcN (+5% (v/v) ddH ₂ O)
0	5
6,5	90
8,0	5
10,0	5

Dabsylamin-12-MeOH-lang: Laufmittel: Methanol und ddH₂O mit 0,1% (v/v) Methansäure

t [min]	% Methanol
0	5
2,5	35
8,0	70
8,5	85
10,0	5
12,0	5

SEQ ID Nr.	Bezeichnung in Studie	Hydrolyse von ENPC
1	GatA61	+
2	Aes70	+
3	Aes72	+
4	Aes170	+
5	Aes174	+
6	Aes175	+
7	GatA197	+
8	Aes214	+

9	GatA250	+
10	AesGö56	+
11	SB12	+
12	SB23	+

Test der Enzymaktivität mit EPEC

Der Versuch wurde wie für ENPC beschrieben durchgeführt. Das entstehende Phenethylamin wurde durch HPLC nachgewiesen wie oben beschrieben.

SEQ ID Nr.	Bezeichnung in Studie	Hydrolyse von EPEC
1	GatA61	+
2	Aes70	-
3	Aes72	+
4	Aes170	-
5	Aes174	+
6	Aes175	-
7	GatA197	+
8	Aes214	+
9	GatA250	+
10	AesGö56	-
11	SB12	+
12	SB23	+

Phylogenetische Analyse der Enzyme

Zur Erstellung von Stammbäumen zur Verwandtschaft der Urethanasen wurde das Programm „MegAlign“ (DNASTAR, Madison, USA) in der Version 10.1.0 verwendet. Stammbäume wurden mit den Standardeinstellungen unter Nutzung von „ClustalW“ erstellt.

Für die Erstellung von *Alignments* verschiedener Proteine wurde das Programm „Clustal Omega“ verwendet (Sievers *et al.*, 2011).

Die Datenbanksuche nach Proteinsequenzen wurde mit BLASTP durchgeführt (Altschul *et al.*, 1990).

Open Reading Frames (ORFs) in sequenzierten Metagenomsequenzen wurden mit dem Onlineprogramm „ORF-Finder“ von NCBI (Wheeler *et al.*, 2007) ausfindig gemacht.

Identische Hydrolasegene wurden auf einen Vertreter reduziert und alle Sequenzen mit ORFs untersucht, um die kompletten Sequenzen der Gene zu erhalten. Bei der Suche wurden auch alternative Startcodons zugelassen. Hierbei fiel auf, dass für das Gen aus pLip214 ein *N*-terminaler Bereich mit Ähnlichkeit zu *aes* vorhanden war, wobei kein Startcodon gefunden werden konnte. Dieser Genabschnitt lag nicht am Rand des Inserts des Metagenomvektors, was ein verkürztes Gen erklären könnte. Für weitere Analysen wurde als Sequenz für dieses Gen der Bereich mit Ähnlichkeit zu *aes* ohne Startcodon genutzt. Die identifizierten putativen Urethanasegene wurden *in silico* translatiert und über BLASTP mit der NCBI-Datenbank abgeglichen. Die putativen Urethanasen wurden gemäß ihrer Nummer in der Lipasebank und der Ähnlichkeit zu GatA oder Aes benannt.

Um die einzelnen Mitglieder der beiden identifizierten Urethanasegruppen (GatA und Aes) untereinander zu vergleichen wurde jeweils ein *Alignment* mit dem Programm „Clustal Omega“ gebildet und zusätzlich ein Stammbaum mit der Programm „MegAlign“ erstellt, wobei für den Stammbaum ein geneimsames *Alignment* beider Gruppen erstellt wurde. Es wurden auch die Sequenzen für die Enzyme aus der Literatur (Ure, Ana und NfpolyA), die alle Ähnlichkeit mit GatA aufweisen, mit in den Sequenzvergleich einbezogen.

Der Stammbaum ist in Abbildung 1 dargestellt. Es zeigt sich, dass beide Gruppen in unterschiedlichen Ästen lokalisiert sind, wobei die Ähnlichkeitsverhältnisse innerhalb der beiden Gruppen teilweise nicht so deutlich waren, was an geringeren *Bootstrapping*-Werten an den Knotenpunkten zu erkennen ist. Innerhalb der GatA-Gruppe scheinen größere Unterschiede zu existieren als innerhalb der Aes-Gruppe, was an den größeren Astlängen in dieser Gruppe zu erkennen ist. Vor allem Aes70 und Aes72 sowie Aes175 und Aes214 weisen eine sehr hohe Ähnlichkeit auf, was sowohl durch die relativ kurzen Äste im Stammbaum als auch durch das Auffinden des gleichen Proteins mit der größten Ähnlichkeit bei der BLASTP-Suche äußerte.

Herstellung des Polyurethanschaums für die Abbauprobversuche

In für die Herstellung von Polyurethanschaumstoffen üblicher Verarbeitungsweise nach dem Einstufenverfahren wurden die unten aufgeführten Einsatzstoffe miteinander zur Reaktion gebracht. Die Rohdichte betrug 38 kg/m³ (DIN EN ISO 845 in der Fassung vom Oktober 2009), die Stauchhärte bei 40% Stauchung 3,5 kPa (DIN EN ISO 3386-1 in der Fassung vom Oktober 2015)

Rezeptur:

100 Teile	Desmophen 2200B
3 Teile	Wasser
19 Teile	Desmodur T80
19 Teile	Desmodur T65

0,7 Teile N,N'-Dimethylpiperazin
1 Teil Tegostab 8325

Rohstoffe:

Desmophen®2200B, Fa. Covestro Deutschland AG; verzweigtes Polyesterpolyol auf Basis Adipinsäure, Diethylenglykol und 1,1,1-Trimethylolpropan mit einer Hydroxylzahl von ca. 60 mg KOH/g.

Desmodur®T80, Fa. Covestro Deutschland AG; Isomerengemisch aus 2,4- und 2,6-Toluylendiisocyanat mit einem Mischungsverhältnis von ca. 80:20.

Desmodur®T65, Fa. Covestro Deutschland AG; Isomerengemisch aus 2,4- und 2,6-Toluylendiisocyanat mit einem Mischungsverhältnis von ca. 67: 33.

N,N'-Dimethylpiperazin, Katalysator der Fa. abcr GmbH

Tegostab®B 8325, Schaumstabilisator der Fa. Evonik

Wasser; entionisiertes Wasser

Die Rezeptur kann mit Kennzahlen von 90 bis 115 ausgeführt werden. Mit Kennzahl wird das mit 100 multiplizierte molare Verhältnis von Isocyanatgruppen zu isocyanatreaktiven Gruppen bezeichnet.

Abbau von Polyurethanschaum

Als Substrat wurde ein mit Toluylendiisocyanat hergestelltes Polyesterpolyurethan verwendet. Der Abbau erfolgte in zwei Reaktionsschritten. Zunächst wurde der Schaum mit einer Lipase inkubiert. Die hierbei entstehenden Oligomere wurden nach Neutralisation mit einer Urethanase in Monomere aufgespalten.

Im ersten Schritt wurden 1 g des Schaumes mit 20 mL Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 und ca. 30 mg CalB-Lyophilisat „Chirazyme L2“ (Roche, Basel, Schweiz) (hier als SEQ ID Nr. 12 bezeichnet) in ein 50-ml Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 37 °C und 200 rpm für 5 Tage inkubiert. Stücke der Schaumreste wurden im Vergleich zu einer Negativkontrolle ohne Enzym mit dem Mikroskop „MH2“ (Olympus, Hamburg) fotografiert. Anschließend wurde die trübe Lösung bei 25 °C und 4000 rpm in einer Großraumzentrifuge für 10 Minuten zentrifugiert. Der klare Überstand wurde mit 1 M NaOH auf pH 7,0 eingestellt. Nach ca. 6 Stunden bei Raumtemperatur wurde der leicht gefallene pH-Wert erneut auf 7,0 titriert und die Lösung sterilfiltriert. Die löslichen Oligomere wurden bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Zur weiteren Verwendung wurden die löslichen Oligomere in 1,5-mL-Reaktionsgefäße gegeben, mit 20 µL DMF und 150 µL des für die jeweilige Urethanasen optimalen Puffers (100 mM Natriumphosphatpuffer, eingestellt auf das jeweilige Optimum der Urethanasen im Bereich pH 6,0 bis pH 8,0) versetzt. Anschließend wurden jeweils 30 µL der unverdünnten, aufgereinigten Urethanasen zugegeben und die Ansätze bei 30 °C und 1000 rpm auf dem Thermoblock geschüttelt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit Enzymlagerpuffer. Nach drei Tagen wurden die Ansätze über Filterplatten mit PVDF-Membran und 0,2 µm Porengröße (Corning, Kaiserslautern) gefiltert und das Filtrat per HPLC mit der Methode „Dabsylamin95“ auf entstandenes 2,4- und 2,6-Toluyldiamin hin untersucht.

Bereits nach der Reaktion im Ansatz mit dem CalB-Lyophilisat war makroskopisch im Vergleich zu einer Negativkontrolle ohne Enzym zu erkennen, dass der Schaum jegliche Struktur verloren hatte und als trübe Suspension mit kleinen Schaumpartikeln vorlag. Der zu Anfang des Experimentes fast vollständig vom Schaum aufgenommene Puffer beinhaltete später die gesamte Schaummasse als zersetzte Partikel. Bei der HPLC-Analyse zeigten sich deutliche Peaks, die den gebildeten Oligomeren zugeschrieben wurden, aber keine Peaks, die auf die Bildung von Toluyldiamin (TDA) hindeuten würden (Daten nicht gezeigt).

Die Oligomerlösung wurde mit allen exprimierten Urethanasen und SEQ ID Nr. 12 versetzt und anschließend per HPLC auf die Bildung von TDA untersucht. Dieses konnte für die Ansätze mit SEQ ID Nr. 7 und SEQ ID Nr. 3 nachgewiesen werden, wobei die gemessene Menge von 2,6-TDA in beiden Ansätzen etwa gleich war und die Bildung von 2,4-TDA im Ansatz mit Enz03 deutlich stärker ausfiel. Mit SEQ ID Nr. 3 wurden 0,057 g/L 2,4-TDA und 0,025 g/L 2,6-TDA gebildet, während SEQ ID Nr. 7 zur Bildung von 0,0075 g/L 2,4-TDA und 0,024 g/L 2,6-TDA führte. Weiterhin zeigte sich mit diesen beiden Enzymen im Gegensatz zu den anderen Ansätzen eine Veränderung und generelle Verkleinerung der Oligomerpeaks. Im Falle von SEQ ID Nr. 7 konnte bereits TDA ohne vorherige Vorbehandlung aus dem Polyester-PU-Schaum abgespalten werden, während dies im Falle von SEQ ID Nr. 3 erst durch die Bereitstellung neutralisierten von Oligomeren nach vorheriger Esterspaltung möglich war. Die Tatsache, dass die als Oligomerpeaks identifizierten Produktpeaks aus der Hydrolyse mit SEQ ID Nr. 12 nach weiterer Behandlung mit Urethanasen drastisch verkleinert wurden, wobei eine deutliche TDA-Bildung auftrat, bestätigte, dass es sich bei diesen Peaks um Oligomere handelte.

Es konnte also gezeigt werden, dass unlöslicher auf TDI-basierender aus Polyester-Polyurethan Schaum durch eine Kombination von zwei Reaktionsschritten in seine Monomere aufgespalten werden kann. In einem ersten Schritt wurde unter Einsatz der Lipase CalB über die Hydrolyse der Esterbindungen der PU Schaum vorverdaut. Nach Neutralisation wurden die frei gewordenen

Oligomere als Substrat für die überexprimierten Urethanasen eingesetzt. Dabei wurden die Urethanbindungen hydrolysiert und TDA konnte als Monomer nachgewiesen werden.

Es zeigt sich also abschließend, dass eine Kombination aus hydrolytischer Spaltung der Esterbindungen mittels Lipasen, Neutralisation der Oligomerlösung sowie anschließende hydrolytische Spaltung der Urethanbindungen einen vollständigen Abbau von Polyurethanen in definierte Monomere erlauben.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Abbau von Polyester-Polyurethanen in niedermolekulare Abbauprodukte enthaltend die Schritte
 - a) Spaltung der im Polyester-Polyurethan enthaltenen Estergruppen; und
 - b) Spaltung der im Polyester-Polyurethan enthaltenen Urethangruppen mit einem Polypeptid, welches Urethanaseaktivität aufweist;mit der Maßgabe, dass die Verfahrensschritte a) und b) in beliebiger Reihenfolge oder auch gleichzeitig durchgeführt werden können.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Polypeptid, welches Urethanaseaktivität aufweist, eine Aminosäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 1 bis SEQ ID Nr. 10 und Aminosäuresequenzen mit wenigstens 90 % Sequenzidentität zu den vorgenannten Sequenzen hat.
3. Das Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Verfahrensschritt a) vor dem Verfahrensschritt b) durchgeführt wird.
4. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei als Verfahrensprodukte Polyole, Polycarbonsäuren und Polyamine entstehen.
5. Das Verfahren nach Anspruch 4, wobei wenigstens ein Polyamin ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 4,4'-Methyldiamin, 2,4'-Methyldiamin, 2,2'-Methyldiamin, 1,4-Naphthylendiamin, 1,5-Naphthylendiamin, 1,6-Naphthylendiamin, 2,4-Toluyldiamin und 2,6-Toluyldiamin entsteht.
6. Das Verfahren nach Anspruch 4, wobei wenigstens ein Polyol ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Ethylenglycol, Diethylenglykol, 1,4-Butandiol, Triethylenglycol, Propylenglycol, 1,2-Di-Propylenglycol, Neopentylglykol, Glycerin, 1,1,1-Trimethylolpropan, Saccharose, Sorbitol und Pentaerythrit entsteht.
7. Das Verfahren nach Anspruch 4, wobei wenigstens eine Polycarbonsäure ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bernsteinsäure, Glutarsäure, Adipinsäure, Phthalsäure, Terephthalsäure, Benzoltricarbonsäure, Ölsäure und Ricinolsäure entsteht.

8. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei der Verfahrensschritt a) mit einer Lipase durchgeführt wird.
9. Das Verfahren nach Anspruch 8, wobei die Lipase eine Aminosäuresequenz wie in SEQ ID Nr. 11, SEQ ID Nr. 12 oder einer Variante der vorgenannten Sequenzen mit wenigstens 90 % Sequenzidentität zu SEQ ID Nr. 11 oder SEQ ID Nr. 12 hat.
10. Verwendung eines Polypeptids mit einer Aminosäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 3, SEQ ID Nr. 2, SEQ ID Nr. 4, SEQ ID Nr. 5, SEQ ID Nr. 6, SEQ ID Nr. 8, SEQ ID Nr. 10 und Varianten dieser Polypeptide oder eines GatA-ähnlichen Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID Nr. 7 oder einer Variante davon, dadurch gekennzeichnet dass das Polypeptid Urethanaseaktivität aufweist, zur enzymatischen Spaltung von Urethanbindungen.
11. Verwendung gemäß Anspruch 10, wobei die Urethangruppe aromatisch gebunden ist.

2

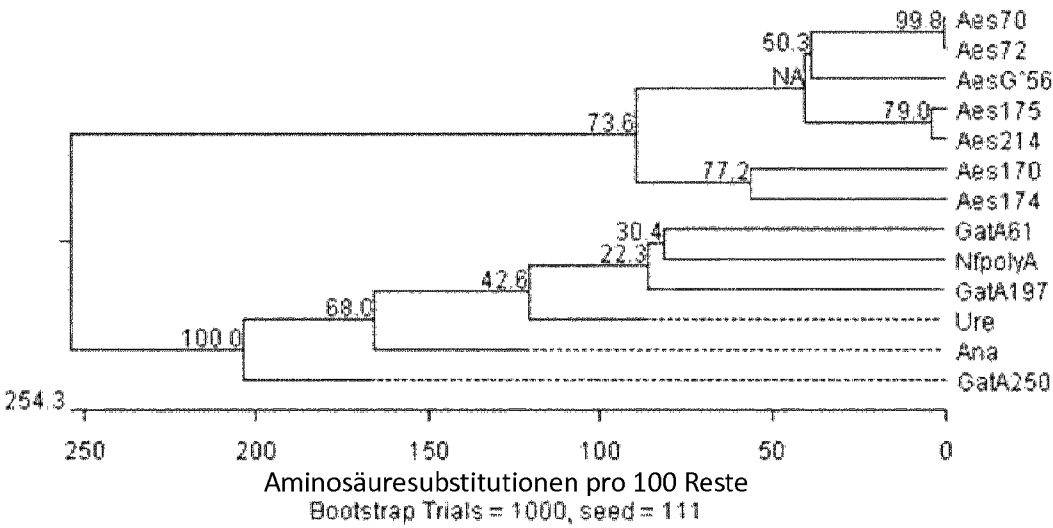


Abbildung 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2019/065947

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N9/80 C12N9/78 C12P13/02 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N C12P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BOUBENDIR, A.: "Purification And Biochemical Evaluation Of Polyurethane Degrading Enzymes Of Fungal Origin (fungal Enzymes, Ethyl Carbamate, Salicylanilide, Microfungi)", ProQuest Dissertations & Theses Global: The Sciences and Engineering Collection. 31 December 1992 (1992-12-31), XP002795784, Retrieved from the Internet: URL:https://search.proquest.com/docview/304029298?accountid=29404 [retrieved on 2019-11-20]	1
A	abstract ----- -/--	2-11
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
20 November 2019		13/12/2019
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Niebuhr-Ebel, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2019/065947

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE UniProt [Online] 16 November 2011 (2011-11-16), "Abhydrolase_3 domain-containing protein", XP002795785, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:G3CRG3 Database accession no. G3CRG3 sequence -----	1-11
A	DATABASE UniProt [Online] 15 March 2017 (2017-03-15), "Amidase domain-containing protein from Bacillaceae", XP002795786, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:A0A1L8I4K0 Database accession no. A0A1L8I4K0 sequence -----	1-11
A	DATABASE UniProt [Online] 22 November 2017 (2017-11-22), "Acetyl esterase/lipase aus Planifilum fulgidum", XP002786401, retrieved from EBI accession no. UNIPROT:A0A1I2L9V0 Database accession no. A0A1I2L9V0 abstract -----	1-11
A	YUKIE AKUTSU-SHIGENO ET AL: "Isolation of a bacterium that degrades urethane compounds and characterization of its urethane hydrolase", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 70, no. 4, 1 April 2006 (2006-04-01), pages 422-429, XP019332126, ISSN: 1432-0614, DOI: 10.1007/S00253-005-0071-1 page 423, left-hand column, paragraph 3; sequence page 426, right-hand column, paragraph 2 - page 427, right-hand column, paragraph 1 -----	1-11
A	WO 2006/019095 A1 (JAPAN SCIENCE & TECH AGENCY [JP]; KAMBE TOSHIAKI [JP]; SHIGENO YUKIE []) 23 February 2006 (2006-02-23) cited in the application paragraph [0003] figure 9 ----- -/--	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2019/065947

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NAKAJIMA-KAMBE T ET AL: "Microbial degradation of polyurethane, polyester polyurethanes and polyether polyurethanes", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, DE, vol. 51, no. 2, 1 February 1999 (1999-02-01), pages 134-140, XP002379237, ISSN: 0175-7598, DOI: 10.1007/S002530051373 cited in the application the whole document -----	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2019/065947

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006019095 A1	23-02-2006	JP 2006055005 A WO 2006019095 A1	02-03-2006 23-02-2006

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. C12N9/80 C12N9/78 C12P13/02 ADD.		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) C12N C12P		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data, BIOSIS		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BOUBENDIR, A.: "Purification And Biochemical Evaluation Of Polyurethane Degrading Enzymes Of Fungal Origin (fungal Enzymes, Ethyl Carbamate, Salicylanilide, Microfungi)", ProQuest Dissertations & Theses Global: The Sciences and Engineering Collection. 31. Dezember 1992 (1992-12-31), XP002795784, Gefunden im Internet: URL: https://search.proquest.com/docview/304029298?accountid=29404 [gefunden am 2019-11-20]	1
A	Zusammenfassung ----- -/-	2-11
☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
20. November 2019		13/12/2019
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Niebuhr-Ebel, K

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DATABASE UniProt [Online] 16. November 2011 (2011-11-16), "Abhydrolase_3 domain-containing protein", XP002795785, gefunden im EBI accession no. UNIPROT:G3CRG3 Database accession no. G3CRG3 Sequenz -----	1-11
A	DATABASE UniProt [Online] 15. März 2017 (2017-03-15), "Amidase domain-containing protein from Bacillaceae", XP002795786, gefunden im EBI accession no. UNIPROT:A0A1L8I4K0 Database accession no. A0A1L8I4K0 Sequenz -----	1-11
A	DATABASE UniProt [Online] 22. November 2017 (2017-11-22), "Acetyl esterase/lipase aus Planifilum fulgidum", XP002786401, gefunden im EBI accession no. UNIPROT:A0A1I2L9V0 Database accession no. A0A1I2L9V0 Zusammenfassung -----	1-11
A	YUKIE AKUTSU-SHIGENO ET AL: "Isolation of a bacterium that degrades urethane compounds and characterization of its urethane hydrolase", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, Bd. 70, Nr. 4, 1. April 2006 (2006-04-01), Seiten 422-429, XP019332126, ISSN: 1432-0614, DOI: 10.1007/S00253-005-0071-1 Seite 423, linke Spalte, Absatz 3; Sequenz Seite 426, rechte Spalte, Absatz 2 - Seite 427, rechte Spalte, Absatz 1 -----	1-11
A	WO 2006/019095 A1 (JAPAN SCIENCE & TECH AGENCY [JP]; KAMBE TOSHIAKI [JP]; SHIGENO YUKIE []) 23. Februar 2006 (2006-02-23) in der Anmeldung erwähnt Absatz [0003] Abbildung 9 ----- -/--	1-11

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	NAKAJIMA-KAMBE T ET AL: "Microbial degradation of polyurethane, polyester polyurethanes and polyether polyurethanes", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, DE, Bd. 51, Nr. 2, 1. Februar 1999 (1999-02-01), Seiten 134-140, XP002379237, ISSN: 0175-7598, DOI: 10.1007/S002530051373 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-11

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

PCT/EP2019/065947

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie) (April 2005)