

Forschungsverbund der Deutschen Bundesstiftung Umwelt

"ChemBioTech"

Gesamtkoordination: Prof. Dr. Andreas Schmid, Universität Dortmund

Abschlussbericht für das Verbundvorhaben:

„Förderschwerpunkt Biotechnologie: ChemBioTec: Entwicklung eines innovativen und umweltfreundlichen Verfahrens zur regio- und stereoselektiven Oxidation von Alkoholen am Beispiel der Produktion von Dihydroxyaceton, D-Glyceraldehyd und L-Glyceraldehyd“

Az. 13194

(Oxidation von Hydroxyverbindungen mit Oxidoreduktasen)

Projektpartner und –bearbeiter

evocatal GmbH

Merowingerplatz 1a

40225 Düsseldorf

PD Dr. Thorsten Eggert

Dipl.-Biol. Nina Richter

Dr. Christian Leggewie

Dr. Simon Eßer

Dr. Sascha Hausmann

Technische Universität Hamburg Harburg

Institute of Biotechnology II

Denickestr. 15

21073 Hamburg

Prof. Dr. Andreas Liese

Dr. Markus Neumann

Dr. Boris Galunsky

Uta Naefken

Heinrich Heine Universität Düsseldorf

Institut für Molekulare Enzymtechnologie

Forschungszentrum Jülich

52425 Jülich

Prof. Dr. Werner Hummel

Anita Ogolong

Kai Luther

Sigma Aldrich Chemie GmbH

Industriestrasse 25

9470 Buchs, Schweiz

Dr. Roland Wohlgemuth

Zusammenfassung

Ziel des beantragten Projekts ist es, umweltschonende enzymkatalysierte Oxidations-Reaktionen zur Entwicklung neuer Synthesewege für enantiomerenreine Verbindungen im technischen Maßstab auszuarbeiten. Für die industriell höchst interessante Herstellung enantiomerenreinen Glycerinaldehyds sind bislang weder enzymatische Verfahren noch geeignete, gut charakterisierte Enzyme bekannt, so dass vor der eigentlichen verfahrenstechnischen Bearbeitung der Oxidation, neue Enzyme isoliert werden mussten. Insgesamt wurden sechs neue Glycerol-Dehydrogenasen sowie zwei neue Glycerinaldehyd-Dehydrogenasen aus verschiedenen Wirtsorganismen rekombinant verfügbar gemacht. Darüber hinaus wurde neben bereits verfügbaren Regenerierungsenzymen eine NAD(P)H-Oxidase aus *Thermus thermophilus* rekombinant in *E. coli* für die Projektpartner zugänglich gemacht. Weiter konnten mit Hilfe eines Anreicherungs Screenings sechs interessante Umwelisolat für die Anwendung in der selektiven Oxidation von GLY identifiziert werden.

Die deutliche Produktinhibierung der Glycerol-Dehydrogenasen macht eine Entwicklung eines technischen Prozesses nicht möglich. Alternativ sollten aufgrund dieser Tatsache Oxidasen für die selektive Oxidation von Glycerol eingesetzt werden. Es gelang, sechs Umweltisolat zu indentifizierten, die Oxidaseaktivität in der selektiven Oxidation von Glycerol zeigten. Dabei konnte für ein Umweltisolat eine deutliche L-Selektivität nachgewiesen werden. Die Identifizierung der entsprechenden Enzyme steht noch aus.

Parallel zur Identifikation der entsprechenden Oxidasen konnte ein Prozess zur Produktion von L-Glycerinaldehyd entwickelt werden. Dabei wurde die hohe Selektivität und Aktivität der Glycerol-Dehydrogenase GOX 3 in der Reduktion von *rac*-Glycerinaldehyd ausgenutzt. Bei der entwickelten kinetischen Racematspaltung wurde Glucose-Dehydrogenase zur Cofaktor-Regenrierung eingesetzt. Im zellfreien System konnten Umsätze von 50% bei einem ee Wert von >99% erzielt werden. In einem weiten Schritt gelang es, die kinetische Racematspaltung auf ein ökonomisch und ökologisch effizienteres Ganzzellsystem zu übertragen.

Zusätzlich gelang im Rahmen des Projektes die Entwicklung und Etablierung einer Methode zur Produktaufarbeitung. Unter Verwendung von Kationenaustausch-Chromatographie gelang es, enantiomerenreines L-Glycerinaldehyd von den anderen Komponenten des Reaktionsgemisches zu trennen. Schließlich konnte sowohl der Maßstab der Racematspaltung als auch der Produktaufarbeitung vergrößert werden.

Bei einer Ausgangsmenge von 10 g *rac*-Glyceraldehyd konnten nach der Biotransformation und Produktaufarbeitung 4,24 g L-GA mit einem ee von >94 % produziert werden, das entspricht einer Isolierausbeute von 85%.

Im Rahmen des DBU-Projektes gelang es, eine Methode zur Produktion von enantiomerenreinem L-Glyceraldehyd zu entwickeln und auf dieser Basis einen technisch effizienten Prozess auszuarbeiten.

1. Anlass und Zielsetzung des Projektes

Ziel des beantragten Projekts ist es, neue Synthesewege für enantiomerenreine Verbindungen durch enzymkatalysierte Oxidations-Reaktionen im technischen Maßstab zu entwickeln. Eine interessante, kostengünstige Ausgangsverbindung ist dabei das Glycerol (GLY), da diese Verbindung beispielsweise ein Abfallprodukt bei der Herstellung von Biodiesel ist. Ein geeignetes enzymatisches Verfahren zur Oxidation von GLY sollte aber auch grundsätzliche Bedeutung für die selektive Oxidation homologer Polyole besitzen, die durch regioselektive Einführung von Keto- oder Aldehyd-Funktionen zu Ketose- oder Aldosezucker oder auch zu Zuckersäuren umgesetzt werden können. Durch die regioselektive enzymatische Oxidation von Polyolen kann man hier auf die Anwendung aufwendiger Schutzgruppen-Chemie verzichten. Am Beispiel der C3-Verbindung Glycerol GLY bzw. Glyceraldehyd GA sind die durch verschiedene Oxidationsreaktionen zugänglichen Produkte in Abb. 1 zusammengestellt (Abb. 1).

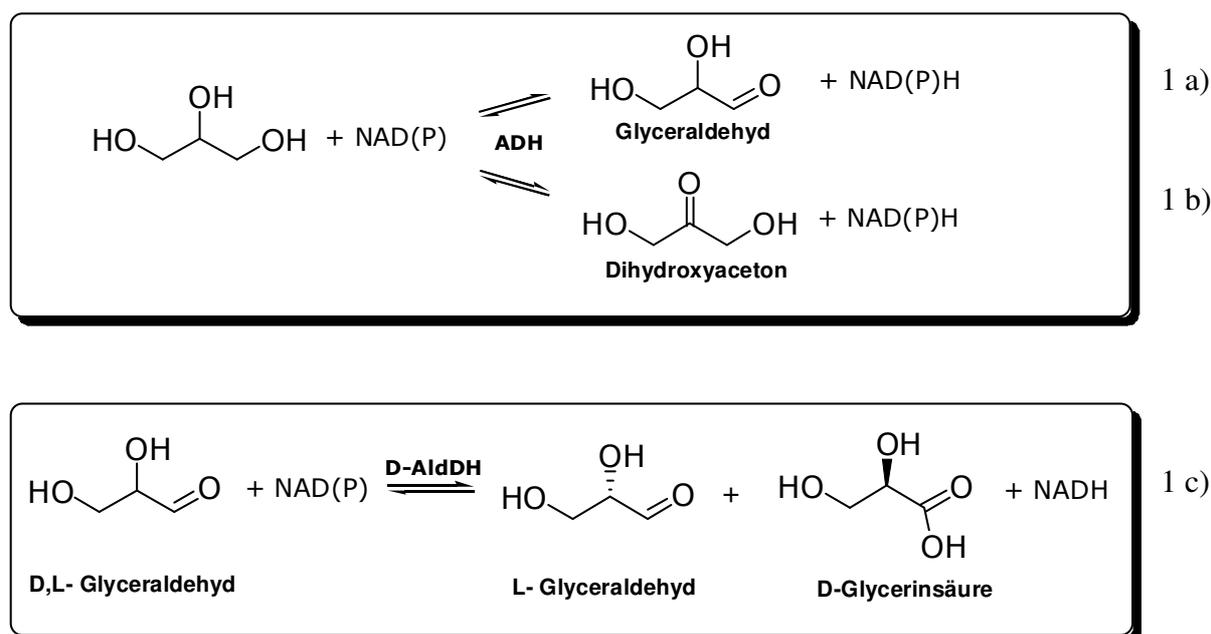


Abb. 1: Aus GLY bzw. racemischem Glyceraldehyd durch enzymatische Oxidation zugängliche Produkte. Von GLY ausgehend gelangt man durch regioselektive Oxidation mit NAD(P)-abhängigen Dehydrogenasen entweder zu chiralem GA (1a) oder achiralem DHA (1b). Eine weitere Möglichkeit der enzymatischen Oxidation geht von racemischem GA aus, durch stereoselektive Oxidation beispielsweise mit einer D-spezifischen Aldehyd-Dehydrogenase gewinnt man L-GA, Oxidationsprodukt ist in diesem Fall D-Glycerinsäure (1c), das ebenfalls einen Wertstoff darstellt.

Eine Reihe solcher Produkte wird z.Zt. noch durch unvollständige Oxidation mit Gluconobacter-Stämmen gewonnen, beispielsweise 5-Keto-D-Gluconsäure (Wein-

säure-Vorstufe), 6-(2-Hydroxyethyl)amino-6-desoxy-L-sorbofuranose, einer Vorstufe von Miglitol (Diabetes-Mittel), L-Sorbose (Ascorbinsäure-Vorstufe), L-Ribulose oder (S)-2-Methylbuttersäure bzw. -ester davon als Aromastoffe. Diese Umsetzungen werden allerdings mit Wildstämmen durchgeführt, rekombinante Gluconobacter-Produktionssysteme sind nicht bekannt. Weitere in der Literatur beschriebene Anwendungen für Produkte, die durch Oxidation zugänglich sind, betreffen die Synthese von (S)-1-Phenyl-1,2-ethandiol, (R)-1,3-Butandiol, (R)-3-Pentyn-2-ol, GA oder D-2-Hydroxypropansäure. Teilweise handelt es sich hierbei um Racematspaltungs-Verfahren, wobei durch Oxidation die unerwünschte Komponente entfernt wird.

Zur Entwicklung von Verfahren entsprechend Abbildung 1 müssen eine Reihe von Voraussetzungen erarbeitet werden, wie beispielsweise:

- Neue regio- und stereoselektive Oxidoreduktasen zur Oxidation der Edukte
- Enzymatische Verfahren zur Regenerierung der Coenzyme NAD bzw. NADP
- Quantifizierbare Nachweisverfahren für die Produkte (GC, HPLC)
- Verfahrenstechnik der gekoppelten Anwendung von oxidierenden und regenerierenden Enzymen
- Verfahrenstechnik der Oxidation (O_2 -Versorgung, gfl. Vermeidung der H_2O_2 -Akkumulation)
- Aufarbeitung der Produkte aus wässrigen Lösungen
- Öko-Bilanzierung der enzymatischen Verfahren, Vergleich mit konventionellen (chemischen) Verfahren

Entsprechend dieser verschiedenen Anforderungen ist das Projektteam zusammengesetzt aus Chemikern, Biochemikern, Mikrobiologen, Verfahrenstechnikern und Wissenschaftlern einer KMU und einer Großindustrie, um durch aufeinander abgestimmte parallele Bearbeitung eine rasche Realisierung der Projektziele zu erreichen.

2. Material und Methoden

Bestimmung von Enzymaktivitäten

Photometrische Messung des NAD(P)H-Verbrauchs bei 340 nm. Standardansatz: 970 μ l 10 mM Substrat-Lösung, 20 μ l Cofaktor-Lösung 12,5 mM, 10 μ l Enzym-Lösung, Temperatur 30 °C, alle Lösungen in 100 mM TEA-Puffer (pH 7,0).

Umsatz- und Enantiomerenanalytik

Zu Beginn des Projektes wurde die Analytik für die betrachteten Reaktionskomponenten Glycerol (GLY), Dihydroxyaceton (DHA) und GA, sowie eine chirale Analytik für die Produkte D- und L-GA entwickelt.

Analytik von Glycerol (GLY), Dihydroxyaceton (DHA) und Glyceraldehyd (GA)

In der Literatur war zur Zeit des Projektstarts keine Methode zur gleichzeitigen Analyse aller Komponenten beschrieben. Besondere Herausforderungen bei der Suche eines geeigneten Verfahrens für die gleichzeitige Analyse stellen die hohe Polarität, die strukturelle Ähnlichkeit, der hohe Siedepunkt, sowie bei GLY die Abwesenheit chromophorer Gruppen.

Die Versuche zur Auftrennung der drei Komponenten wurden mit einer Reihe von HPLC-Säulen durchgeführt (Umkehrphasen: Merck LiChrospher RP-8 und RP-18, Amino: Merck LiChrospher NH₂, Diol: Merck LiChrospher DIOL, Hydrophil: CS MultoHigh 100-Si-5 μ -HILIC, Ionenaustausch: CS Organic-Acid-Resin). Als Detektoren wurden dabei UV-Detektion (für DHA und GA), Brechungsindexdetektion (RID) bzw. Lichtstreuungdetektion (ELSD) getestet.

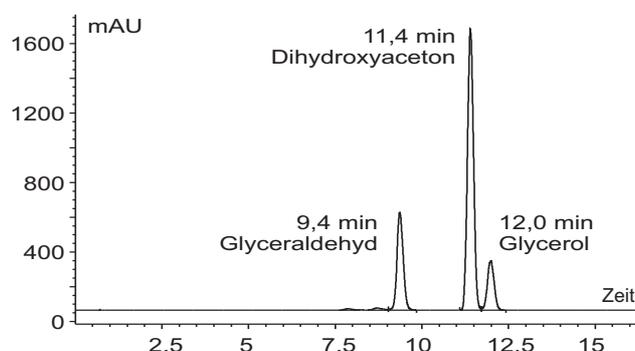


Abb. 2: HPLC-Spektrum von GLY, DHA und GA (5 mM TFA, 0,7 ml/min, 5 °C, ELSD).

Von den getesteten Säulen war nur die CS Organic-Acid-Resin für die gleichzeitige Bestimmung aller drei Komponenten geeignet (Abb. 2). Die verwendeten Bedingungen sind 5 mM Trifluoressigsäure, 5 °C, 0.7 ml/min, Detektion über RID oder ELSD. Die drei Signale sind voneinander Basisliniengetrennt.

Chirale Analytik von D- und L-Glycerinaldehyd

Zur Bestimmung des enantiomeren Überschusses von D- bzw. L-GA werden in der Literatur nur Beispiele mit Enzymassays oder Polarimetrie beschrieben. Für eine Prozessanalytik wäre davon prinzipiell die Polarimetrie geeignet, allerdings ist die spezifische Drehung so gering (0,097 °, α -D-Glucose: 112°), dass diese Methode nur für sehr hohe Konzentrationen an GA anwendbar ist. Daher wurde eine geeignete Analysemethode auf der Basis chromatographischer Methoden wie HPLC oder GC entwickelt.

Versuche zur Auftrennung von *rac*-GA mit einer chiralen HPLC-Säule (Chiracel OD-RH) führten unter den gewählten Bedingungen (Wasser/Methanol/Acetonitril Mischungen, 5-50 °C) nicht zu der erforderlichen Trennleistung.

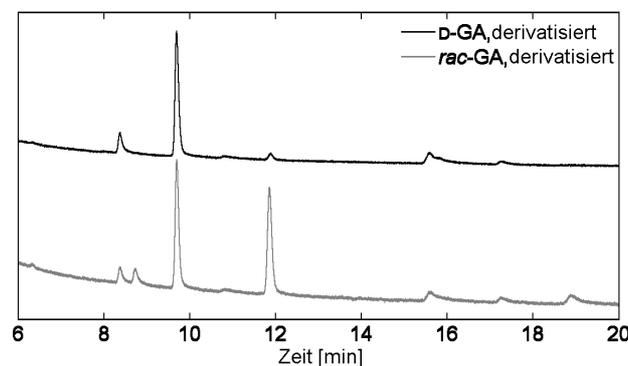


Abb. 3: Auftrennung von D- und L-GA (9,8 / 11,9 min) mit GC/Derivatisierung (108 °C isotherm).

Für die Analyse von GA wurden GC-Säulen mit chiralen Säulenmaterialien getestet. Dazu wurde eine für Alkohole typische Derivatisierung ausgehend von 100 μ l Probenvolumen mit 150 μ l Acetanhydrid und 150 μ l Pyridin durchgeführt. Zu einer wässrigen Probe wird dazu zunächst Ethylacetat (300 μ l) und dann die entsprechenden Verbindungen hinzugefügt. Die entstehenden Acetate können auf einer Varian Chirasil (25 m) GC-Säule aufgetrennt werden (Abb. 3). So konnte eine neue, nicht in der Literatur beschriebene Analysemethode für D- und L-GA auch für geringe Konzentrationen etabliert werden. Die Limitierung durch die geringe spezifische Drehung (Polarimeter) konnte überwunden werden.

Inzwischen konnte die GC-Methode bei den Projektpartnern (HHU, evocatal, SIAL) erfolgreich reproduziert werden und wird als Routineanalytik angewendet.

Enzymatische Umsetzung von Glyceraldehyd (Racemattrennung Reduktion)

Chirale gaschromatographische Messung der Glyceraldehydkonzentration: 20 - 100 mM GA, 10 - 100 μ l Rohextrakt, 100 mM β -D-Glukose, 2 U/ml GDH, 0,5 mM NAD(P)H, Temperatur 20 $^{\circ}$ C, alle Losungen in 100 mM TEA-Puffer (pH 7,0).

Enzymatische Umsetzung von Glyceraldehyd (Racemattrennung Oxidation)

Chirale gaschromatographische Messung der Glyceraldehydkonzentration: 100 mM GA, 10 - 100 μ l Rohextrakt, 20 mM NAD, Temperatur 20 $^{\circ}$ C, alle Losungen in 100 mM TEA-Puffer (pH 7,0).

3. Ergebnisse

3.1. Oxidation von Glycerol

GLY kann prinzipiell am C-1 oder C-2 oxidiert werden unter Bildung von GA (Abb. 1a) oder DHA (1b). Im Rahmen dieses Projekts werden für diese Reaktionen primär NAD- bzw. NADP-abhängige Dehydrogenasen in Betracht gezogen, denkbar ist aber auch die Verwendung von FAD-abhängigen Oxidasen.

3.1.1 Oxidation an C-2 (Dihydroxyaceton als Produkt)

Die erste betrachtete Reaktion ist die Oxidation von GLY zu DHA. Dieses wird industriell derzeit in einer klassischen Batch-Fermentation mit *Gluconobacter oxydans* Wildtyp produziert. Der Nachteil dieses Prozesses ist das Vorliegen einer starken Produktinhibierung und der Einsatz hoher Zellmassen.

Auswahl literaturbekannter NAD(P)-abhängigen Dehydrogenasen

Das erste Ziel des Projektes war es, Enzyme, die GLY zu DHA oxidieren, zu identifizieren und rekombinant verfügbar zu machen. Eine Reihe solcher Dehydrogenasen sind bereits literaturbekannt, deshalb wurde eine Auswahl dieser Enzyme für eine heterologe Produktion zusammengestellt (Tab. 1). Hauptkriterium für die Auswahl war eine aufgeklärte Gensequenz der jeweiligen Enzyme; diese sollten als Grundlage für eine schnelle Klonierung und Expression der entsprechenden Dehydrogenasen dienen.

Tab. 1: Übersicht literaturbekannter Eigenschaften der ausgewählten Enzyme

Organismus	Gensequenz	Heterologe Expression	Substrat Spektrum
<i>Clostridium butyricum</i> (C1) [1]	bekannt	nein	bekannt
<i>Pichia angusta</i> (P1) [2, 3]	bekannt	pSE-PAD1- <i>E. coli</i> HB101	bekannt
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (S1) [4, 5]	bekannt	nein	bekannt

Zwei der ausgewählten Dehydrogenasen konnten erfolgreich heterolog in *E. coli* exprimiert werden (Tab. 2). Diese können für die Produktion von DHA genutzt werden. Auf Anraten der Gutachter wurde die Produktion von DHA nicht weiter bearbei-

tet, da es sich bei GA um das deutlich interessantere und hochwertigere Produkt handelt.

Tab. 2: Übersicht über die Expressionsbedingungen und erreichten Aktivitäten der rekombinanten GlyDHs aus *P. angusta* und *C. butyricum*. Für die GlyDH aus *P. angusta* sind zusätzlich Literaturwerte aufgeführt.

GlyDH	T [°C]	IPTG [mM]	Expression	Protein löslich	Oxidation [U/mg Gesamtprotein]	Reduktion [U/mg Gesamtprotein]
GlyDH aus <i>C. butyricum</i>						
C1	RT	0,1	deutliche Expression	~20%-60%	0,103	0,18
GlyDH aus <i>P. angusta</i>						
P1	30°C	0,1	deutliche Expression	~10%	1,27	8,73
<i>P. angusta</i> [2]					0,228	0,979

Zwei Enzyme für die oxidative Produktion von DHA sind rekombinant verfügbar.

3.1.2 Oxidation an C-1 (Glyceraldehyd als Produkt)

Literaturdaten

Die weitaus interessantere Reaktion ist die in Abbildung 1a dargestellte Bildung von GA aus GLY. Die Produktion von D-GA wird industriell bei Sigma-Aldrich (SIAL) über eine dreistufige, chemische Synthese ausgehend von D-Mannitol durchgeführt. L-GA ist auf diese Weise nicht zugänglich, da das entsprechende Mannitol-Isomer nicht im "chiral-pool" vorhanden ist. Eine direkte, biokatalytische Produktion wäre so der aktuell etablierten Methode deutlich überlegen.

In der Literatur sind nur wenige Enzyme zu bekannt, die diese Reaktion katalysieren. Für die NADPH-abhängige Dehydrogenase aus *Hypocrea jecorina* (HJ) [7] ist beschrieben, dass dieses Enzym GA zur GLY reduziert, allerdings wird auf die für präparative Anwendungen eher interessante „Rück“-Reaktion weniger eingegangen. Ebenso ist unklar, ob diese Reduktion überhaupt stereospezifisch verläuft. Diese Publikation ist aber für die weitere Bearbeitung sehr wertvoll, da zum einen dieses Enzym selbst bezüglich des präparativen Potentials hin detailliert untersucht werden kann, zum anderen die Sequenz dieses Enzyms als Grundlage für ein *in silico*-Screening verwendet werden kann.

In silico-Screening nach Glyceraldehyd-bildenden Enzymen

Basierend auf der Sequenz von HJ wurde ein *in silico*-Screening durchgeführt dabei wurden sieben mögliche Kandidaten identifiziert (Tab. 3).

Tab. 3: Übersicht über putative neue Oxidoreduktasen aus *Gluconobacter oxydans*

Name	Größe	putative Funktion
GOX1	840 bp	Putative 2, 5- Diketo-D-gluconsäure Reduktase
GOX2	846 bp	Putative Oxidoreduktase
GOX3	999 bp	Putative Oxidoreduktase
PA1	990 bp	Putative Oxidoreduktase
GOX5 [8]	1371 bp	Putative NAD-abhängige Aldehyd Dehydrogenase
GOX6	1443 bp	Aldehyd Dehydrogenase
GOX7	867 bp	Putative Aldehyd Dehydrogenase

Neue Oxidoreduktasen zur Oxidation von Glycerol zu Glyceraldehyd

Bei dieser Enzymklasse handelt es sich um Enzyme, die als Hauptreaktion die Reduktion von GA zu GLY katalysieren, die aber auch in der Lage sind, GLY zu GA zu oxidieren (Abb. 4). Als Cofaktor wird NAD(P)H verwendet.

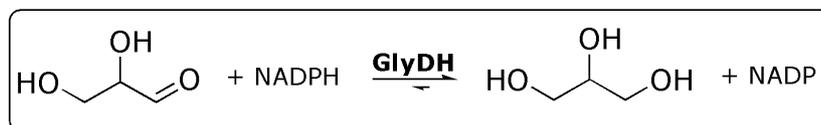


Abb. 4: Reaktion der GlyDHs am Beispiel GA

Mit Ausnahme der Gene *gox2* und *gox7* konnten drei GlyDHs und zwei AldDHs erfolgreich kloniert und heterolog in *E. coli* exprimiert werden. In der Reduktion von GA und Oxidation von GLY konnten den drei neuen GlyDHs und der GlyDH aus *H. jecorina* die in Tabelle 4 aufgeführten Aktivitäten nachgewiesen werden.

Tab. 4: Reduktions- und Oxidationsaktivität der verschiedenen GlyDHs. Die Reduktion wurde mit GA, die Oxidation mit GLY getestet.

Enzym	Reduktion [U/mg Gesamtprotein]	Oxidation [U/mg Gesamtprotein]
GOX1	0,4	0
GOX3	19,82	0,12
HJ1	16,1	0,03
PA1	9,36	0,09

Der Vergleich der spezifischen Aktivitäten zeigte, dass es sich bei GOX3 und PA1 um die Enzyme mit dem größten Potential handelte, daher wurden diese beiden GlyDHs genauer bezüglich ihrer Charakteristika untersucht.

Vier interessante Enzyme für die Produktion von GA konnten identifiziert, kloniert und exprimiert werden.

Biochemische Charakterisierung der GlyDHs GOX3 und PA1

In biochemischen Charakterisierungen der Enzyme wurden typische Parameter wie Temperaturoptimum, Temperatur- und pH-Stabilität sowie pH-Optima ermittelt (Daten nicht abgebildet). Die Daten deuten auf eine Nutzbarkeit beider Enzyme in technischen Prozessen hin. Ferner wurden für GOX3 und PA1 Substratspektren aufgenommen, die im Einzelnen im Anhang angeführt sind.

Oxidation von Glycerol mit GOX3

Bei GOX3 liegt bei der Oxidation von GLY eine starke Produktinhibierung vor. Der Quotient zwischen K_M und K_I liegt bei 0,008, so dass eine effektive GA-Produktion nicht möglich ist. Aus diesem Grund wird von weiteren Arbeiten mit dem Wildtyp-Enzym in oxidativer Richtung abgesehen.

Tab. 5: Kinetische Daten der Oxidation von GLY mit GOX3.

Parameter	v_{max}	$K_{M, GLY}$	$K_{I, GA}$	$K_{I, GA} / K_{M, GLY}$
Wert	$0,20 \pm 0,02$ U/ml	162 ± 53 mM	$1,3 \pm 0,8$ mM	0,008

Eine genauere Charakterisierung von zwei ausgewählten GlyDHs (GOX3 und PA1) zeigt, dass bei diesen Enzymen das Gleichgewicht auf Seiten der Reduktion liegt. Aufgrund des Substratspektrums handelt es um präparativ interessante Enzyme mit einem breiten Substratspektrum.

Alternative Enzymsysteme zur Herstellung von Glyceraldehyd

Begründet in der starken Produktinhibierung der identifizierten GlyDHs wurden parallel alternative Wege zur Oxidation von GLY gesucht. Dabei wurden zwei interessan-

ten Beispiele in der Literatur gefunden und auf ihre Eignung für einen Produktionsprozess bewertet und getestet. Im Detail wurden folgende Enzyme bearbeitet:

- Galactose-Oxidase aus *Dactylium dendroides* (1.1.3.9) [9, 10]
- Methanol-Dehydrogenase aus *Methylobacterium organophilum* (EC 1.1.99.8) [11]

Aufgrund ihrer katalytischen Eigenschaften wurden Oxidasen als eine weitere interessante Enzymklasse zur Oxidation von GLY identifiziert, und parallel mit einem umfangreichen *In silico*- und Anreicherungs-Screening begonnen, in dem neue Alkohol-Oxidasen (AOX) zur selektiven Oxidation von GYL zu GA identifiziert werden sollten.

Galactose Oxidase aus *Dactylium dendroides*

Die Oxidase aus *Dactylium dendroides* setzt GLY mit molekularem Sauerstoff zu L-GA um. Entstehendes Wasserstoffperoxid kann durch Zusatz einer Katalase entfernt werden. In der Literatur werden Umsätze bis 6 % in 14 Tagen erreicht. Eine reaktionstechnische Analyse der Arbeitsvorschriften lässt auf eine Massentransportlimitierung bzgl. des benötigten Sauerstoffes schließen. Da die Versorgung mit Sauerstoff in beiden Literaturstellen limitiert ist, kann durch den Einsatz eines Druckreaktors die Konzentration an O₂ im Reaktionsmedium nach *Henry* deutlich erhöht werden. Durch die kommerzielle Verfügbarkeit des Enzyms (SIAL) konnten entsprechende Tests durchgeführt werden.

Zunächst wurde die Aktivität des Enzyms gegenüber GLY im Vergleich zum natürlichen Substrat Galactose bestimmt. Dafür wurde auf einen auf ABTS/HRP (2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) / Horseradish Peroxidase) basierenden Aktivitätsassay zurückgegriffen. Die Aktivität von GLY liegt bei 0.9 % (0,5 U/mg).

Für die Umsetzungen wurde ein *Büchi tinyclave* Kleinstreaktor mit austauschbaren Druckgefäßen (bis 10 bar) aus Glas verwendet. Unter Einsatz von 5 bar O₂ konnte ausgehend von 50 mM GLY ein Umsatz von 16 % innerhalb von 20 Stunden erreicht werden. Die Analyse per GC/Derivatisierung ergab einen ee von 55 %. Es ergibt sich also im Vergleich zur Literatur eine Umsatzsteigerung um über 250 % in nur 7 % der Zeit. Aufgrund der unzureichenden Stereospezifität wird allerdings auf weitere Untersuchungen verzichtet.

Methanol Dehydrogenase aus *Methylobacterium organophilum*

Die in der Literatur beschriebene Methanol Dehydrogenase aus *Methylobacterium organophilum* ist in der Lage, GLY präparativ (5g / 50 ml) zu GA umzusetzen. In isolierter Form ist das Enzym von künstlichen Cofaktoren wie Phenazinmethosulfat (PMS) abhängig. Der Wildstamm wurde über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ 760) bezogen. Das erhaltene Zellpellet wurde auf Agarplatten ausgestrichen und die bei 30 °C gebildeten, roten Kulturen in Komplexmedium im Schüttelkolben fermentiert. Als Kohlenstoffquelle für die Platten und die Fermentation dient Methanol. Der Rohextrakt aus 2,2 g Zellen (2,7 mg Protein/g Zellen) wurde in der Oxidation von GLY eingesetzt. Der Cofaktor PMS wird dabei durch den eingebrachten Sauerstoff autoxidiert und somit regeneriert. Des Weiteren wurde die Reaktion unter Lichtausschluss durchgeführt, da der Cofaktor lichtempfindlich ist. Nach einer Zeit von 24 Stunden konnte die Bildung von 1 % L-GA (92 % ee) detektiert werden. Die Methanol Dehydrogenase ist also prinzipiell ein geeignetes Enzym zur Produktion von L-GA, allerdings liegt es nur in geringen Mengen im Wildstamm vor. Da bereits andere Enzyme rekombinant vorlagen, wurde auf eine weitere Bearbeitung diese Katalysators verzichtet.

Alkohol Oxidasen

Bei den Alkohol Oxidasen handelt es sich um Flavin-abhängige Enzyme, die irreversibel die Oxidation verschiedener Alkohole zu den entsprechenden Aldehyden bzw. Ketonen katalysieren. Dabei benötigen sie molekularen Sauerstoff als Reduktionsäquivalent und produzieren Wasserstoffperoxid (Abb. 5).

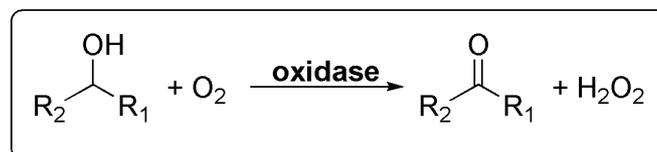


Abb. 5: Allgemeine Reaktion der Oxidasen

In silico-Screening nach neuen Alkohol Oxidasen

Basierend auf literaturbekannten Sequenzen der Alkohol Oxidasen (AOX) aus *Candida boidinii* und *Aspergillus niger* wurden mit Hilfe von Datenbankrecherchen verschiedenen putative *aox Gene* identifiziert (Tab. 6).

Tab. 6: Übersicht über das Ergebnis des *in silico*-Screenings.

Bezeichnung	Ursprung	Ähnlichkeit	putative Funktion
<i>Candida boidinii</i> AOX			
AOX 4	<i>A. niger</i>	79 %	hypothetical protein
AOX 5	<i>A. oryzae</i>	73%	unnamed protein product
AOX 6	<i>N. crassa</i>	75 %	hypothetical protein
<i>A.niger</i> AOX			
AOX 7	<i>A. niger</i>	100 %	AOX
AOX 8	<i>A. oryzae</i>	73 %	hypothetical protein

Klonierung und Expression der AOX Gene

Der eukaryotische Ursprung der identifizierten Gene machte eine Isolierung der RNA und deren Übersetzung in cDNA nötig. Die cDNA wurde dann als Grundlage für die Klonierung der putativen *aox* Gene verwendet. Mit Hilfe dieser Strategie gelang es lediglich, AOX 7 rekombinant verfügbar zu machen.

AOX 7

Nähere Untersuchungen bezüglich der Eignung für einen Produktionsprozess von AOX 7 zeigten, dass durch massive Expressionsprobleme und eine geringe Aktivität eine Oxidation von GLY durch AOX 7 nicht realisiert werden kann.

Anreicherung und Screening nach neuen Alkohol Oxidasen

Da das durchgeführte *In silico*-Screening nicht den erwünschte Erfolg hatte, wurden im nächsten Schritt Kulturen unterschiedlicher Habitats angereichert. Hierbei wurde ein Minimalmedium, das GLY als einzige C-Quelle enthält, verwendet. Als Ergebnis konnten einige interessante Kulturen identifiziert werden. In ersten Untersuchungen konnte in einer Reihe verschiedener Umweltisolate Aktivität für die Oxidation von GLY als Substrat nachgewiesen werden (Tab. 7). Die Stämme mit nachweisbarer Aktivität wurden für weitere Arbeiten verwendet.

Tab. 7: Übersicht über die Aktivität verschiedener Umweltisolate. Die Aktivität wurde photometrisch mit Glycerol als Substrat gemessen (Assay: Peroxidase / ABTS-Assay)

Bezeichnung	Klasse/Herkunft	Aktivität
eOX 2	Umweltisolat	++
eOX 3	Umweltisolat	++
eOX 7	Umweltisolat	+
eOX 10	Umweltisolat	+
eOX 11	Umweltisolat	+
eOX 12	Umweltisolat	+

Konstruktion einer cDNA Bank

Da die rekombinante Verfügbarkeit der entsprechenden Oxidase für einen Prozess zur Produktion von GA von entscheidender Bedeutung ist, wurde mit der Konstruktion einer cDNA Bank begonnen. Dafür wurde die RNA verschiedener putativer Kandidaten isoliert, und auf Grundlage dieser RNA mit Hilfe des „CreatorTMSMARTTM cDNA Library Construction Kits“ eine cDNA Bank konstruiert. Die konstruierte Bank umfasst etwa 5000 Gene, die zurzeit auf ihre Aktivität in der Oxidation von GLY untersucht werden. Es ist absehbar, dass die Arbeiten auf diesem Gebiet nicht innerhalb der Projektlaufzeit beendet werden können, sie sollen aber auch nach Abschluss des DBU-Projektes fortgesetzt werden.

3.2. Stereoselektive Oxidation von Glycerol

Die beste Methode, enantiomerenreines GA zu produzieren, stellt die selektive Oxidation von GLY dar (Abb. 1a). Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene im Rahmen dieses Projektes identifizierte neue Dehydrogenase durch eine starke Produktinhibierung nicht für die selektive Oxidation verwendet werden konnten. Als Alternative zu Dehydrogenasen können aber auch Oxidasen für eine solche Reaktion eingesetzt werden, konkret handelt es sich dabei um Alkohol Oxidasen (AOX).

Alkohol Oxidasen

Die im Rahmen des Anreicherungs-Screenings identifizierten Umweltisolate wurden in weiteren Versuchen genauer untersucht. Bereits in den Vor-Screenings zeigte

eOX 2 eine besonders hohe Aktivität in der Oxidation von GLY (Tab. 7). Deshalb wurde der wildtypische Zellextrakt für weitere Umsetzungen verwendet. Es zeigte sich, dass durch eOX 2 die selektive Oxidation zu L-GA katalysiert wird (*ee* 80%) (Abb. 6).

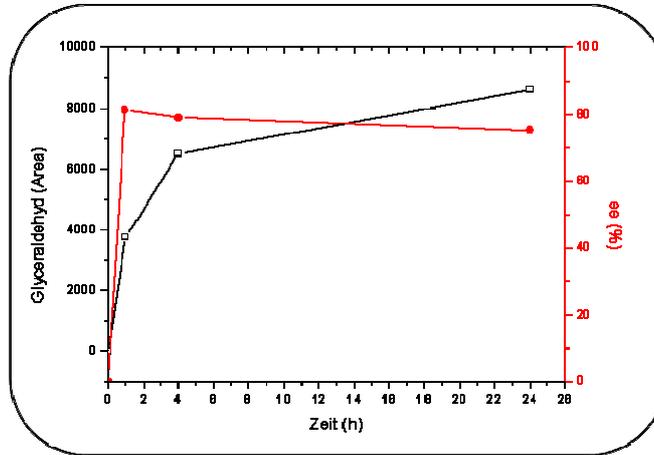


Abb. 6: Oxidation von GLY zu GA katalysiert durch eOX 2. Dargestellt ist die Produktion von GA (□) durch den Rohextrakt. Parallel wurde die Entwicklung des *ee* Wertes (●) beobachtet.

Folglich gelang es, mit Hilfe des Anreicherungs-Screenings, mehrere interessante Stämme zu identifizieren und zu isolieren. Eine weitere Prozessentwicklung bzw. -optimierung macht eine Identifizierung der entsprechenden Gene notwendig.

Mit Hilfe eine Anreicherungs-Screenings konnten sechs Umweltisolate identifiziert werden, die in der Lage sind, Glycerol zu oxidieren. Arbeiten zur Identifikation der verantwortlichen Oxidasen werden noch über das Projektende hinaus fortgeführt.

3.3. Selektive Oxidation von GA

Eine weitere oxidative Methode zur Bildung von GA ist die in Abbildung 1c dargestellte selektive Oxidation von *rac*-GA. Dabei entstehen zwei chirale Produkte, zum einen GA und zum anderen Glycerinsäure. Katalysiert wird diese Reaktion durch NAD(P)-abhängige Dehydrogenasen, den sogenannten AldDHs.

Aldehyd-Dehydrogenasen (AldDHs)

Bei Aldehyd-Dehydrogenasen handelt es sich um NAD(P)-abhängige Oxidoreduktasen. Vertreter dieser Enzymklasse katalysieren die in Abbildung 7 dargestellte Oxidation von Aldehyden zur korrespondierenden Säure.

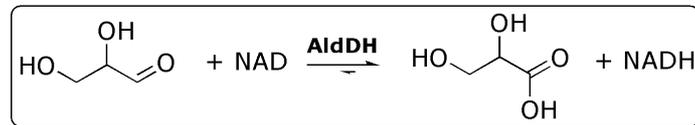


Abb. 7: Reaktion der AldDHs am Beispiel GA

Zwei AldDHs aus *Gluconobacter oxydans* (GOX5 und GOX6) konnten erfolgreich kloniert und exprimiert werden. Beide Enzyme zeigen hohe Aktivitäten in der Oxidation (19 – 33,5 U/mg). GOX5 und GOX6 oxidieren beide GA und können daher für weitere Prozessentwicklungen zur Synthese von enantiomerenreinem GA oder enantiomerenreiner Glycerinsäure verwendet werden. In weiteren Schritten gelang es, ein für die Anwendung erforderliches Coenzym-Regenerierungssystem zu entwickeln und zu etablieren.

Dabei wurde auf die enzymgekoppelte Methode zurückgegriffen und eine Kopplung mit der NAD(P)H-Oxidase versucht. Da durch die Oxidase bei der Reaktion H_2O_2 entsteht, ist ein weiteres Enzym zur Zersetzung des Peroxids (Katalase) notwendig (Abb. 8).

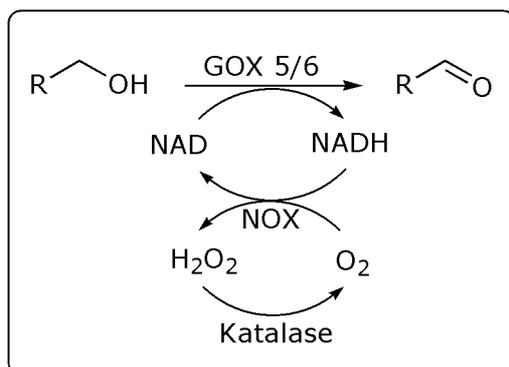


Abb. 8: Cofaktorregenerierungssystem durch die NAD(P) Oxidase. NADP wird durch die gekoppelte Oxidation durch Sauerstoff regeneriert.

Aus Zeitgründen wurde dieser Weg zur Darstellung von enantiomerenreinem Glycerinaldehyd mittels Aldehyd-Dehydrogenasen bislang nicht weiter verfolgt. Geplant ist, dieses Konzept noch über die Projektlaufzeit hinaus weiter zu bearbeiten.

Klonierung und Expression der NAD(P)H-Oxidase aus *Thermus thermophilus* (TT-NOX)

Zur Verwendung einer NAD(P)H-Oxidase in der Coenzymregenerierung und der geplanten Entwicklung von Ganzzell-Katalysatoren wurde dieses Enzym rekombinant verfügbar gemacht. Ausgewählt wurde die TT-NOX, ein Enzym von dem bekannt ist, dass es sowohl NADH als auch NADPH akzeptiert. Ein zweiter entscheidender Faktor war die bereits publizierte rekombinante Herstellung des Enzyms [12]. In Anlehnung an die publizierten Daten gelang es, die TT-NOX zu klonieren und mit guter Aktivität zu exprimieren.

Vier Systeme zur Coenzymregenerierung von NAD bzw. NADP sind bislang bearbeitet worden. Zwei Systeme kommen prinzipiell in Frage und werden zurzeit weitergehend untersucht:

3.4. Selektive Reduktion von GA

Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung von GA stellt die selektive Reduktion von GA und eine daraus resultierende Racematspaltung dar (Abb. 9).

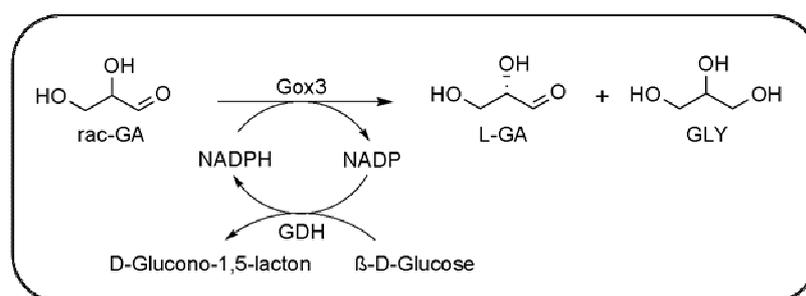


Abb. 9: Schema der kinetische Racematspaltung von GA am Beispiel der GlyDH Gox 3.

Racematspaltung von Glyceraldehyd durch GOX1, GOX3, HJ1 und PA1

Da sich, wie bereits beschrieben, die gefundenen GlyDHs durch sehr geringe Oxidationsaktivitäten auszeichneten und eine Produktinhibierung bei der Oxidation von GLY beobachtet wurde, wurde als alternatives Verfahren eine Racematspaltung

durch stereoselektive Reduktion von racemischem GA untersucht, Zur Coenzym-Regenerierung wurde dabei Glucose-Dehydrogenase (GDH) eingesetzt.

Die sinnvolle Anwendung einer Racematspaltung zur Gewinnung enantiomerenreiner Produkte setzt voraus, dass hoch enantioselektive Enzyme zur Anwendung kommen. Dazu wurde in ersten Versuchen getestet, ob dies für die Enzyme GOX1, GOX3, HJ1 und PA1 für die reduktive Umsetzung von Glyceraldehyd gegeben ist (Tab. 8).

Tab. 8: Stereoselektivität und ee-Werte für die NADPH-abhängigen Enzyme GOX1 und GOX3 aus *Gluconobacter oxydans*, HJ1 aus *Hypocrea jecorina* und PA1 aus *Pseudomonas aeruginosa*. Eingesetzt wurde racemischer Glyceraldehyd, das Produkt wurde mittels GC analysiert.

Enzym	Temperatur [°C]	Konzentration Glyceraldehyd [mM]	Selektivität	ee- Wert [%]
GOX1	20	20	(S)- selektiv	> 95
GOX3	20	50	(R)- selektiv	>95
HJ1	20	100	nicht selektiv	/
PA1	20	50	(R)- selektiv	90

Die in Tabelle 8 dargestellten Daten zeigen, dass sich unter den vier GlyDHs zwei (R)-selektive, ein (S)-selektives und ein nicht selektives Enzym befinden. Somit ist eine Anwendung in der Racematspaltung zur Darstellung von sowohl D- als auch L-GA möglich.

Für den technischen Einsatz der GlyDH GOX3 in einer möglichen Racematspaltung von GA wurde Glucose-Dehydrogenase (GDH) als Enzym zur Coenzym-Regenerierung eingesetzt. Von beiden Enzymen wurden die kinetischen Parameter bestimmt (Tab. 9). Dabei wurde auf eine mögliche Einflussnahme der jeweiligen Cosubstrate/Coprodukte, sowie auf Kreuzaktivitäten geachtet. In das kinetische Modell gehen die Verbindungen ein, die die Reaktionsgeschwindigkeit beeinflussen. Eine Produktinhibierung durch GLY liegt hier nicht vor, dafür wurde eine Substratüberschussinhibierung gefunden. Auch Kreuzinhibierungen zwischen den beiden enzymatischen Reaktionen treten nicht auf. Dieses stellt eine erfolgreiche präparative Anwendung dieses Enzyms für die Gewinnung von L-GA in Aussicht.

Tab. 9: Kinetische Daten der Reduktion von GA mit GOX3 und der GDH.

GOX3		GDH	
V_{max}	$80,3 \pm 17,0$ U/ml	V_{max}	$111 \pm 5,8$ U/mL
$K_{M,GA}$	$0,82 \pm 0,30$ mM	$K_{M,Glucose}$	$8,83 \pm 3,0$ mM
$K_{M,NADPH}$	$0,10 \pm 0,05$ mM	$K_{M,NADP^+}$	$0,006 \pm 0,002$ mM
$K_{I,GA}$	$145 \pm 43,7$ mM		
$K_{I,NADP^+}$	$0,19 \pm 0,13$ mM		

Aufgrund der positiven Ergebnisse wurde racemisches GA in einem ersten präparativen Batch-Experiment umgesetzt. Abbildung 10 zeigt das Ergebnis der präparativen Racematspaltung. Dargestellt sind GLY und L-GA Konzentrationen und zusätzlich die Entwicklung des *ee* Wertes über 26 h.

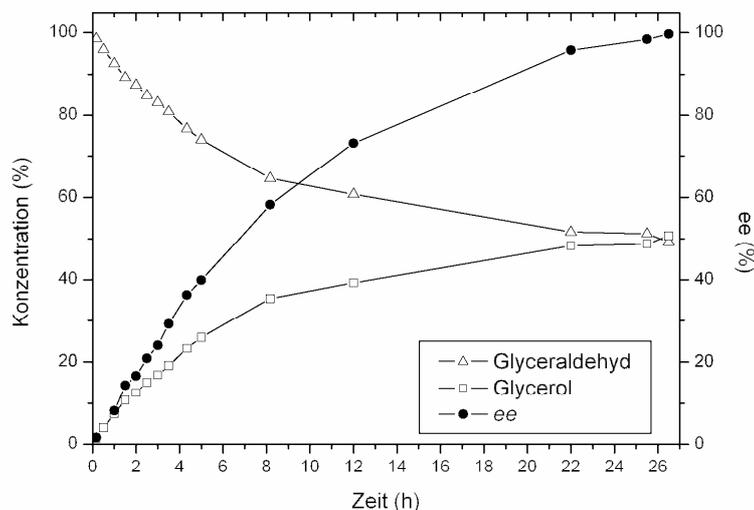


Abb. 10: Ergebnis der kinetischen Racematspaltung von GA katalysiert durch GOX3 mit gekoppelter Cofaktorregenerierung durch die GDH. Dargestellt sind die *rac*-GA (Δ) und die GLY (\square) Konzentration über eine Reaktionszeit von 26 h. Zusätzlich wurde über die gesamte Reaktionszeit der *ee* Wert (\bullet) beobachtet.

Bei einem Umsatz von 50% konnte ein *ee* von >99% in der Racematspaltung von GA erreicht werden. Dadurch gelang es bereits in Vorversuchen, 2 g enantiomerenreines L-GA (Rohprodukt in Lösung) zu produzieren. Die eingesetzte Menge kann beliebig erweitert werden, so dass eine Produktion von enantiomerenreinem L-GA im Multi-gramm-Bereich möglich ist.

Eine kinetische Racematspaltung mit GOX 3 und GDH für die Coenzym-Regenerierung konnte etabliert werden. Mit Hilfe dieser Methode gelang es, 2 g enantiomerenreines L-GA zu produzieren.

Kinetische Racematspaltung von GA mit ganzen rekombinanten Zellen

Um einen effizienteren Prozess zu ermöglichen, wurden ein *E. coli* Stamm konstruiert der GlyDH und GDH coexprimiert.

Konstruktion des Ganzzellkatalysators

Beide für die Racematspaltung benötigten Gene konnten erfolgreich in einen Expressionsvektor kloniert werden. Die parallele Expression beider Gene konnte realisiert werden, wobei die GDH mit einer Aktivität von 6,5 U/mg Gesamtprotein und die GlyDH mit 15,8 U/mg Gesamtprotein exprimiert werden konnte.

Eine umfangreiche Charakterisierung des Ganzzellkatalysators zeigte, dass die Racematspaltung von GA mit ähnlichen Umsätzen und Selektivitäten möglich ist. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der Ganzzellkatalysator deutlich stabiler ist als ein zellfreies System. Ein weiterer beträchtlicher Vorteil liegt darin, dass der Ganzzellkatalysator ohne Aktivitätsverlust wiederverwendet werden kann. Eine Zugabe von externem Cofaktor beschleunigt zwar die Reaktion, ist jedoch nicht zwingend notwendig (siehe Manuskript, Anhang).

Die kinetische Racematspaltung von Glyceraldehyd, die mit isolierten Enzymen entwickelt wurde, lässt sich auf ein ökologisch und ökonomisch attraktives Ganzzellsystem übertragen.

Dynamisch kinetische Racematspaltung

Ein weitere interessante Möglichkeit zur Darstellung enantiomerenreinen Glyceraldehyds stellt die Kombination einer Oxidase mit der bereits etablierten kinetischen Racematspaltung dar. Hierbei wird GLY als günstiges Ausgangsprodukt eingesetzt. Dieses könnte in einem ersten Schritt durch eine Oxidase zu enantiomerenangereichertem L-GA oxidiert werden, durch eine Kopplung mit der kinetischen

Racematspaltung würde das System dann dynamisiert werden. Aus Zeitgründen konnte dieses Verfahren nicht mehr im Rahmen des Projektes durchgeführt werden. Es sind aber von den Partnern Sigma-Aldrich und evocatal weiterführende Arbeiten zu diesem Thema im Projektanschluss geplant.

3.5 Entwicklung der Produktaufarbeitung

Die enzymatische Synthese von DHA oder GA in wässrigen Puffersystemen erfordert eine auf diese Bedingungen abgestimmte Produktaufarbeitung. Die ungünstigen Eigenschaften, wie sehr hohe Siedepunkte, Polarität und strukturelle Ähnlichkeit erschwert die Aufarbeitung. In der Literatur wurden keine entsprechenden Vorschriften gefunden.

Daher wurde an vier verschiedenen Ansätzen gearbeitet:

- Extraktion mit organischen Lösungsmitteln
- Adsorption an feste Partikel
- Destillative Trennung
- Chromatographische Auftrennung

Extraktion mit organischen Lösungsmitteln

Die Extraktion von DHA oder GA erfordert ein polares, nicht mit Wasser mischbares Lösungsmittel. Weiterhin sollte ein kostengünstiges Lösungsmittel verwendet werden, um die Kosten der Aufarbeitung niedrig zu halten. Eine Reihe von typischen Lösungsmitteln wurde mit wässrigen Lösungen jeder Verbindung geschüttelt und die wässrige Phase per HPLC untersucht. Die verwendeten Lösungsmittel bei diesem Versuch waren: Ethylacetat (EA), Methyl ethylketon, Tetrahydrofuran, *tert*-Butylmethylester (MTBE), Dichlormethan, Diethylether, Toluol und Isohexan. In allen Fällen lag die Konzentrationsänderung im Rahmen der Messgenauigkeit. Des Weiteren führen geringe Lösungsmittelmengen in der wässrigen Phase zu Störungen der Analytik.

In Hinblick auf mögliche kontinuierliche Extraktionsverfahren wurde der Versuch mit EA und MTBE wiederholt und jede Probe 10-mal mit dem entsprechenden Lösungsmittel ausgeschüttelt. Die wässrigen Phasen weisen im Laufe der Extraktionen keine Änderungen auf. Die Extraktion als Aufarbeitungsmethode ist also nicht möglich.

Adsorption an feste Partikel

Eine weitere Methode zur Produktaufarbeitung ist die Adsorption der Verbindungen an feste Partikel. Eine Anwendung kann nach einer Reaktion oder *in-situ* während der Reaktion geschehen. Auch eine unselektive Adsorption ist anwendbar, da auf diese Weise die effektiven Konzentrationen in der Lösung verringert und damit Substrat- und/oder Produktinhibierungen vermieden werden. Ein solches Verfahren wird industriell bei der enzymatischen Reduktion von Ketonen verwendet. Die Adsorption wurde mit folgenden Partikelsorten getestet:

- Amberlite XAD-4 / XAD-7 (Polyacrylester)
- Süd-Chemie Tonträger (Bezeichnung: EX M 1607, 1753, 1833)

Die Verbindungen GLY, DHA und GA wurden in Lösung mit verschiedenen Mengen an Partikel versetzt. Ein Volumen von 1 ml wurde mit 50, 100, 200 bzw. 400 mg behandelt. Die Konzentrations-Änderungen in der Lösung wurden mit der HPLC bestimmt. Alle Partikeltypen haben eine annähernd gleiche Adsorptionseffizienz. Bei Einsatz von 200 mg Träger mit 120 mM der jeweiligen Verbindung wird eine Adsorptionsleistung von bis zu 14 % erreicht. Dies entspricht einer Adsorption von etwa 3 µg der Verbindung pro mg Partikel. Die getesteten Partikel sind daher für einen präparativen Ansatz nicht geeignet.

Destillative Trennung

Eine im großtechnischen Maßstab etablierte Methode ist die Destillation oder Rektifikation. In der Literatur (Merck Index) werden für GA Siedepunkte von 145 °C (1 mbar) bzw. 127 °C (14 mbar) berichtet. In einer versuchten Destillation wird ein Produktgemisch bei 10 mbar aufgetrennt. Die Temperatur wird stufenweise erhöht und verschiedene Fraktionen aufgefangen. In keiner der Fraktionen und im Destillationsrückstand kann aufgereinigtes GA detektiert werden. Es ist davon auszugehen, dass GA unter diesen Bedingungen nicht ausreichend stabil ist.

Chromatographische Auftrennung

Eine Methode zur Auftrennung organischer Verbindungen ist die klassische Säulenchromatographie an Kieselgel. Die Bestimmung eines geeigneten Laufmittels für die Auftrennung wird per Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Dazu ist zunächst eine deutliche Detektion der Verbindungen auf der Kieselgel-Platte nötig. Es wurden

verschiedene Methoden untersucht: UV-Licht, Ninhydrin in Ethanol/Schwefelsäure, Cer(IV)sulfat sowie Vanillin in Ethanol/Schwefelsäure.

Für den Test wurden Stammlösungen von GLY und GA auf eine Kieselgel-Platte gegeben und eine Detektion geprüft. Im UV-Licht ist nur GA schwach zu sehen. Die Färbereagenzien führen alle zu einer leichten Färbung der Verbindungen; am besten sichtbar ist die tiefblaue Einfärbung durch Cer(IV)sulfat. Ein selektives Laufmittel in Gegenwart von GA, GLY, Glucose und Gluconolacton mit ausreichender Löslichkeit für das Rohprodukt konnte allerdings nicht identifiziert werden.

Eine weitverbreitete Methode zur chromatographischen Auftrennung von Zuckergemischen ist die Verwendung von Kationenaustauschern als feste Phase. Außerdem wird diese Art der Phase in der HPLC-Trennung der Reaktionsmischung erfolgreich eingesetzt. Getestet wurden folgende Materialien:

- *Pharmacia* CM Sephadex C-50
- *Dow* Dowex 50WX8

Das erste Material zeigt ein starkes Anschwellen und in einem Trennversuch keinerlei Selektivität. Der Kationenaustauscher von *Dow* hingegen zeigte eine deutliche Trennung. In einem Versuch mit 100 µL Produktgemisch (aus 0,5 M rac-GA) konnte GA von Glycerin, Glucose und Gluconsäure abgetrennt werden.

Es konnte eine chromatographische Methode zur Trennung der Reaktionsmischung etabliert werden.

3.6 Maßstabsvergrößerung

Die technische Umsetzbarkeit der entwickelten Racematspaltung und der Produktaufarbeitung wird im Rahmen einer Maßstabsvergrößerung getestet. Das Ziel ist dabei L-GA in reiner Form im Gramm-Maßstab zu erhalten.

Eine Menge von 10 g rac-GA wurde zusammen mit dem Cosubstrat Glucose und dem Cofaktor NADP⁺ in TEA-Puffer gelöst. GOX3 Rohextrakt und GDH werden als Katalysatoren hinzugefügt. Während der Umsetzung wurde der pH-Wert mit 2 M KOH auf einen Wert von 7 gehalten. Im Laufe von 10 Stunden Reaktionszeit wurde ein Umsatz von 57 % (96 % ee) erreicht. Die Lösung wurde mit Trifluoressigsäure gequench und ausgefallene Bestandteile wurden über Zentrifugation entfernt. Be-

zogen auf das Endvolumen und die Reaktionszeit lag die Produktivität bei 1,01 g/(L d).

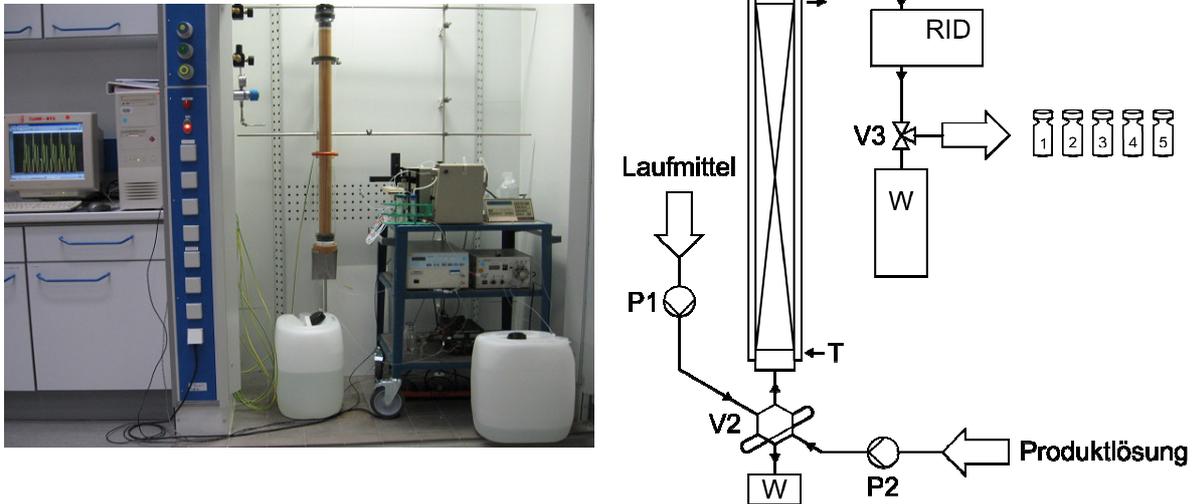


Abb. 11: Foto (links) und Fließschema (rechts) der Chromatographieanlage.

Für die chromatographische Trennung wurde eine Chromatographiesäule (1000 x 50 mm), gefüllt mit Dowex 50WX8 (1,5 kg) eingesetzt. Für eine vereinfachte Handhabung und Automatisierung wurde die Säule mit einer Pumpe, einem Injektionsventil und einem Fraktionssammler versehen. Auf diese Weise konnte die Produktlösung portionsweise aufgearbeitet werden. Über einen Brechungsindexdetektor werden die einzelnen Komponenten beim Verlassen der Säule detektiert (Abb. 11).

Die Produktlösung wurde in 5 mL-Portionen (entspricht 190 mg L-GA) automatisch aufgetragen und getrennt. Das Laufmittel war dabei 5 mM Trifluoressigsäure. Der L-GA-Peak wurde mittels Fraktionssammler aufgefangen und gesammelt. Die Dauer zwischen zwei Injektionen betrug 35 min. Die Aufzeichnung der RI-Signals zeigt die hohe Stabilität des Chromatographie-Systems (Abb. 12). Der jeweils dritte Peak (z.B. bei 51 min) entspricht dem gewünschten Produkt.

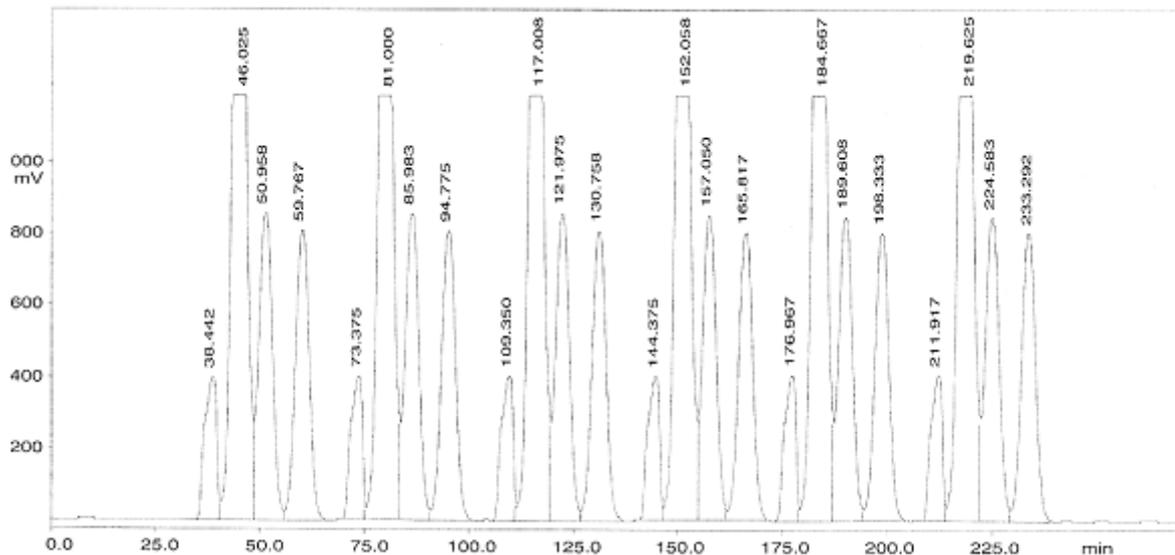


Abb. 12: Chromatogramm der automatischen, sequenziellen Aufreinigung von L-GA.

Die vereinigten L-GA Phasen wurden auf vier Portionen aufgeteilt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Insgesamt wurden so 4,24 g (85 % isolierte Ausbeute, ee > 94 %) L-GA erhalten. Die Hauptverunreinigung stellt Dihydroxyaceton dar, welches wahrscheinlich durch Tautomerisierung während des Eindampfens entstanden ist.



Abb. 13: Biokatalytisch hergestelltes L-GA der Fa. evocatal.

Durch weitere Optimierung könnte dies vermieden werden, so dass mit dem entwickelten Verfahren L-GA im Multi-gramm Maßstab mit guter Ausbeute und guter Stereoselektivität erhalten werden kann. L-GA wird im Laufe des nächsten Jahres (2010) als neues Produkt in den Sigma-Katalog aufgenommen. Notwendige Verfahrensoptimierungen werden in einem anschließenden bilateralen Entwicklungsprojekt zwischen der evocatal GmbH und Sigma-Aldrich erarbeitet.

Die chromatographische Methode zur Trennung der Reaktionsmischung konnte in den technischen Maßstab überführt werden, um L-GA in größeren Mengen aus dem Reaktionsansatz zu isolieren.

4. Diskussion

Ziel des beantragten Projekts ist es, umweltschonende enzymkatalysierte Oxidations-Reaktionen zur Entwicklung neuer Synthesewege für enantiomerenreine Verbindungen im technischen Maßstab am Beispiel der Oxidation von GLY auszuarbeiten.

Von GLY ausgehend sind zwei Oxidationsprodukte möglich: Die Oxidation am C-2 führt zu DHA, bei Oxidation einer endständigen OH-Funktion wird GA gebildet. Die Entwicklung einer enzymatischen Methode zur Bildung von DHA ist aus industrieller Sicht weniger attraktiv, es handelt sich hierbei um ein achirales, niedrigpreisiges Produkt, für das bereits Syntheseverfahren im Tonnen-Maßstab bestehen. Da es aber auch ein Ziel dieses Projekts ist, eine Plattformtechnologie für enzymatische Oxidationen aufzubauen, hat diese Reaktion im Rahmen dieses Projekts Bedeutung als Modellreaktion, da es – zumindest für die Reaktion DHA zu GLY - bereits gut beschriebene Enzyme gibt. Diese Bewertung, dass die Bildung von GA im Rahmen dieses Projekts mit deutlich höherer Priorität bearbeitet werden soll als die DHA-Bildung, entspricht im Übrigen auch dem Gutachtervotum des Kickoff-Meetings.

Für die industriell attraktivere Umsetzung von GLY zu GA sind bislang weder enzymatischen Verfahren noch geeignete, gut charakterisierte Enzyme bekannt, so dass vor der eigentlichen verfahrenstechnischen Bearbeitung der Oxidation neue Enzyme isoliert werden mussten. Als hilfreich für dieses Screening hat sich ein Literaturhinweis erwiesen, in dem ein Enzym aus *Hypocrea jecorina* beschrieben wurde, das GA zu GLY reduziert. Durch Datenbank-Recherchen konnte die zugrunde liegende Sequenz identifiziert werden und diese dann als Grundlage für ein *in silico*-Screening genutzt werden. Mit dieser Methode konnten in kurzer Zeit mehrere neue GA-umsetzende Enzyme gefunden, kloniert und überexprimiert werden. Neben dem *Hypocrea*-Enzym stehen damit mittlerweile zwei Enzyme aus *Gluconobacter oxidans* und eins aus *Pseudomonas aeruginosa* zur Verfügung. Eine erste Charakterisierung hat gezeigt, dass diese Enzyme durchweg mit deutlich höherer Aktivität GA reduzieren als umgekehrt durch Oxidation GA bilden. Diese sehr ungünstige Gleichgewichtslage ist in einer Produktinhibierung der GlyDHs durch den gebildeten GA begründet. Da dieser Effekt bei allen identifizierten GlyDHs zu erkennen ist, wurden in einem zweiten Versuch Oxidasen als putative Kandidaten zur selektiven Oxidation von GLY genauer untersucht.

Dabei konnten durch ein umfangreiches Anreicherungs-Screening sechs interessante Umweltisolate identifiziert werden. Bei einem ausgewählten besonders aktiven Kandidaten konnte sogar eine Präferenz zur Bildung des L-Enantiomeres nachgewiesen werden.

Die entsprechenden Enzyme sollten mit Hilfe einer cDNA Bank identifiziert werden, bislang gelang es jedoch noch nicht, die Oxidasen zu identifizieren. Die Arbeiten hierzu werden noch nach Beendigung des DBU-Projektes fortgesetzt.

Aufgrund der Tatsache das die Oxidasen noch nicht für die Entwicklung eines technischen Prozesses zur Verfügung stehen, und die GlyDH eine starke Produktinhibition in der Oxidation von GLY aufweisen musste nach Alternativen zur Produktion von enantiomerenreinem GA gesucht werden. Am vielversprechendsten ist, bedingt durch die hohe Aktivität und Selektivität der GlyDHs, eine kinetische Racematspaltung von *rac*-GA. Dabei konnte die GDH zur Cofaktorregenerierung verwendet werden. Die Racematspaltung konnte durch die Konstruktion eines effektiven Ganzzellkatalysators zu einem technisch anwendbaren Prozess entwickelt werden, der enantiomerenreines L-GA als Produkt liefert.

Damit steht zum Abschluss des DBU-Projektes eine Methode zur enzymatischen Produktion von L-GA zu Verfügung, die gegenüber der chemischen Synthese ökonomisch und ökologisch von Vorteil ist. Am Beispiel dieser Methode konnte parallel eine Methode zur Produktisolation von L-GA entwickelt werden. Dabei wird L-GA durch eine Kationenaustausch-Chromatographie von den restlichen Komponenten des Reaktionsgemisches getrennt. Durch die Verwendung von Wasser mit geringen Mengen (5mM) an Trifluoressigsäure als Lösungsmittel ist dieses Verfahren deutlich umweltfreundlicher als die sonst in der Chemie verwendeten Verfahren zur Produktisolation.

Mit Hilfe beider entwickelten Prozesse gelang es im Rahmen diese DBU-Projektes enantiomerenreines L-GA im Grammmaßstab zu produzieren.

5. Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen

Die Bereitstellung von chiralen C3-Verbindungen ist von hoher Bedeutung für die Synthese von Spezial-/Feinchemikalien. Die im Rahmen dieses Projektes im Fokus stehende Verbindung GA, ist eine dieser chiralen Bausteine, die zurzeit nur durch chemische Synthesen unter Verwendung aufwendiger Schutzgruppen-Chemie dargestellt werden kann. Aus diesem Grund wird L-GA derzeit vom Großindustriepartner Sigma-Aldrich nicht in der eigenen Produktpalette angeboten. Aus ökonomischer und in erheblichem Maße auch aus ökologischer Sicht stellen biokatalytische Verfahren unter Zuhilfenahme von Dehydrogenasen oder Oxidasen eine umweltfreundliche Alternative dar.

Die in der ersten Hälfte der Projektarbeiten (bis zum Zwischenbericht) identifizierten und charakterisierten Biokatalysatoren erwiesen sich aufgrund ihrer zum Teil höchst effizienten Produktion im Wirt *E.coli* und der sehr guten Selektivitäten als aussichtsreiche Kandidaten für den Einsatz in technischen Prozessen. Die Katalysatoren sind geeignet für die oxidative Racematspaltung von D-/L-GA mit dem Ziel der Herstellung hochreinen L-GA. Darüber hinaus sind sämtliche Biokatalysatoren aufgrund ihrer Substratspektren auch für die Oxidation weiterer Polyole mit dem Ziel weitere chirale Bausteine darzustellen interessant.

In der zweiten Projekthälfte wurde dann der Schwerpunkt auf die Entwicklung eines technischen Prozesses zur oxidativen Racematspaltung von rac-GA gesetzt. Aufgrund der Etablierung eines effizienten Ganzzellkatalysators sowie der Ausarbeitung einer chromatographischen Methode zur Aufreinigung von L-GA aus dem Reaktionsgemisch wurde ein technisch machbares und wirtschaftlich interessantes Verfahren zur biokatalytischen Herstellung von L-GA entwickelt. Die Firma evocatal hat ein Stoffpatent auf das identifizierte Enzym angemeldet und damit auch die Verwendung des Enzyms für den beschriebenen Prozess geschützt. Mit Projektabschluss wird Sigma-Aldrich biokatalytisch hergestelltes L-GA in den Katalog aufnehmen.

Die abschließende Bewertung der Wirtschaftlichkeit der neuen Biokatalysatoren und ihrer Verfahren wird zurzeit noch in einer Ökoeffizienzanalyse in Zusammenarbeit mit der IFU-Hamburg GmbH erarbeitet. Die Analyse wird der DBU Anfang 2010 nachgereicht.

6. Kooperation

Die erfolgreiche Bearbeitung dieses Projektes war nur aufgrund des intensiven Dialogs der Projektpartner möglich. Insgesamt wurden in 2007 drei, in 2008 vier sowie in 2009 ebenfalls vier Projekttreffen durchgeführt. Aufgrund der räumlichen Entfernungen wurden einige Treffen mit Hilfe der sog. WEB-Ex Technologie durchgeführt, die durch den Partner Sigma-Aldrich zur Verfügung gestellt wurde. Ferner wurden Mitarbeiter zwischen den Labors der beteiligten Partner ausgetauscht, so dass Arbeitstechniken reibungslos zwischen den Partnern ausgetauscht werden konnten.

7. Präsentationen, Patentanmeldungen, Publikationen, Diplomarbeiten und Dissertationen

Präsentationen

Eggert, T., Richter, N., Hummel, W., Liese, A., Neumann, M., Wohlgemuth, R (2008) Enantioselective biosynthesis of hydroxyketones catalyzed by novel glycerol dehydrogenases BioPerspectives 2008, Hannover.

Puls, M. (2009) Enantioselective biosynthesis of hydroxyketones catalyzed by novel glycerol dehydrogenases. Biotrans 2009, Bern.

Poster

Neumann, M., Richter, N., Hummel, W., Eggert, T., Wohlgemuth, R., Liese, L. *Production of Dihydroxyacetone and Glyceraldehyde in Enzymatic Redoxreactions*. International Congress on Biocatalysis (biocat) **2008**, Hamburg.

Richter, N., Neumann, M., Liese, A., Wohlgemuth, R., Eggert, T., Hummel, W. (2009). Production of L-Glyceraldehyde by a new NADP-dependent Glycerol Dehydrogenase from *Gluconobacter oxydans*. Biotrans 2009, Bern.

Patentanmeldungen

Alkoholdehydrogenase aus *Gluconobacter oxydans* und deren Verwendung

DE 10 2009 007 272 Anmelder: Fa. evocatal GmbH (2009)

Publikationen

Richter, N., Neumann, M., Liese, A., Wohlgemuth, R., Eggert, T., Hummel, W. (2009)
Characterisation of a recombinant NADP-dependent glycerol dehydrogenase from *Gluconobacter oxydans* and its application in the production of L-glyceraldehyde.
ChemBioChem 10, 1888-1896

Richter, N., Neumann, M., Liese, A., Wohlgemuth, R., Eggert, T., Hummel, W. (2009)
Characterization of a whole-cell catalyst co-expressing NADP⁺-dependent glucose dehydrogenase and NADP⁺-dependent glycerol dehydrogenase and its application in the synthesis of L glyceraldehyde.

Biotechnol. Bioeng. (zur Veröffentlichung eingerichtet)

Diplomarbeiten

Anita Blanche Ogolong Mouessoune (2008) Screening, Aufreinigung und biochemische Charakterisierung neuer Glyceroldehydrogenasen. FH Aachen

Dissertationen

Richter, Nina (2010) Neue Enzyme zur Synthese chiraler Bausteine (Arbeitstitel), Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

8. Zitierte Literatur

- 1 **Malaoui, H. and Marczak, R.**, *J. Appl. Microbiol.* 2001. **90**: 1006-1014.
- 2 **Yamada-Onodera, K., Yamamoto, H., Kawahara, N. and Tani, Y.**, *Acta Biotechnologica* 2002. **22**: 355-362.
- 3 **Yamada-Onodera, K., Yamamoto, H., Emoto, E., Kawahara, N. and Tani, Y.**, *Acta Biotechnologica* 2002. **22**: 337-353.
- 4 **Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream et al.** *Nature* 2002. **415**: 871-880.
- 5 **Marshall, J. H., May, J. W. and Sloan, J.**, *J. Gen. Microbiol.* 1985. **131**: 1581-1588.
- 6 **Lee, L. G. and Whitesides, G. M.**, *JACS* 1985. **24**: 6999-7008.
- 7 **Liepins, J., Kuorelahti, S., Penttila, M. and Richard, P.**, *FEBS J.* 2006. **273**: 4229-4235
- 8 **Schweiger, P., Volland, S. and Deppenmeier, U.**, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2007. **13**: 147-155.
- 9 **Klibanov, A. M., Alberti, B. N. and Marletta, M. A.**, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1982. **108**: 804-808.
- 10 **Franke, D., Machajewski, T., Hsu, C.-C., Wong, C.-H.**, *J. Org. Chem.* 2003. **68**: 6828-6831.
- 11 **Wolf, H. J.**, *US Patent* 4,353,987 1981.
- 12 **Park, H. J., Erdmann, H. and Sprinzl, M.**, *Protoplasma* 1995. **184**: 104-110.

Anhang

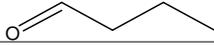
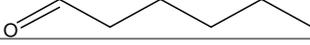
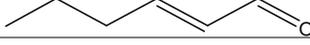
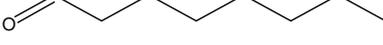
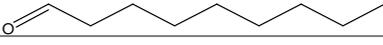
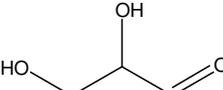
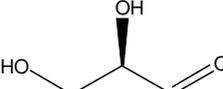
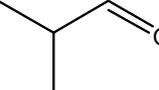
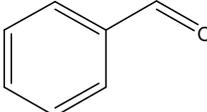
1. Verwendete Abkürzungen

GLY	Glycerol
DHA	Dihydroxyaceton
GA	Glyceraldehyd
GlyDH	Glycerol Dehydrogenase
AldDH	Aldehyd Dehydrogenase
AOX	Alkohol Oxidase

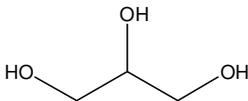
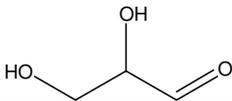
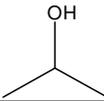
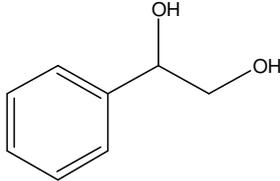
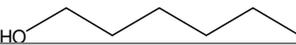
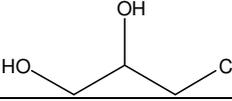
2. Substratspektren von GOX3, PA1, GOX5 und GOX 6

Die Tabellen 1 bis 5 zeigen die Ergebnisse der Substratspektren von GOX3, PA1, GOX5 und GOX6.

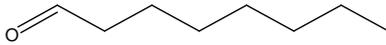
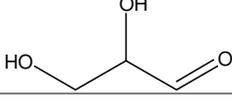
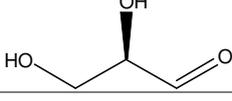
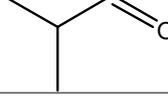
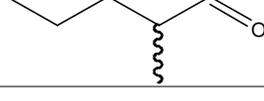
Tab. 1: Substratspektrum für die Reduktion der NADPH-abhängigen GlyDH GOX3. Die Reduktion von Glyceraldehyd (19,8 U/mg) wurde als Referenz (100 %-Wert) gesetzt. Weitere getestete Substrate, die allerdings praktisch nicht umgesetzt wurden (Aktivität < 0,05 U/mg) waren: Acetaldehyd, o-Phthalaldehyd, 3- Octanon, Acetophenon, Propiophenon und 6-Methyl-5-hepten-2-one.

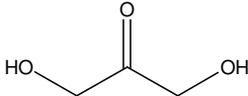
Substrat	Struktur	Relative Aktivität [%]
Propanal (Propionaldehyd)		7,5
Butanal (Butylraldehyd)		77,9
Hexanal		83,9
Trans-Hexenal		12,9
Octanal		92,8
Nonanal (Pelargonaldehyd)		67,4
Glyceraldehyd		100
D- Glyceraldehyd		118,6
Isobutyraldehyde		22,9
Benzaldehyde		43,9

Tab. 2: Substratspektrum für die Oxidation der NADPH-abhängigen GlyDH GOX3. Die Oxidation von Glycerol (0,12 U/mg) wurde als Referenz auf 100 % gesetzt.

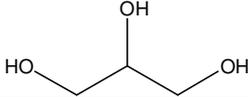
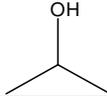
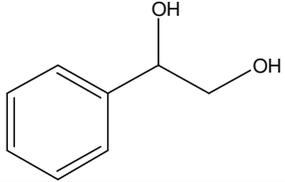
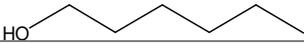
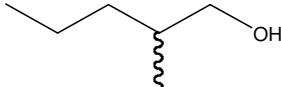
Substrat	Struktur	Relative Aktivität [%]
Glycerol		100
Glyceraldehyd		66,7
Isopropanol		3,3
Phenylethandiol		275
Hexanol		408
3-Chloro-1,2-propandiol		75

Tab. 3: Substratspektrum der NADPH-abhängigen GlyDH PA1. Die Aktivität von 9,36 U/mg gegenüber Glyceraldehyd wurde als Referenz auf 100% gesetzt. Weitere getestete Substrate, die allerdings praktisch nicht umgesetzt wurden (Aktivität < 0,05 U/mg) waren: Acetaldehyd, Butanal, Benzaldehyd, 2- Octanon, Acetophenon und 6-Methyl-5-hepten-2-one.

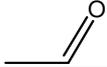
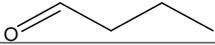
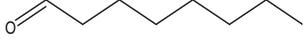
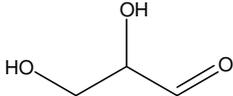
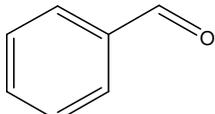
Name	Struktur	Relative Aktivität [%]
<i>Aldehyde</i>		
Octanal		68,9
Nonanal (Pelargonaldehyd)		23,3
Glyceraldehyd		100
D- Glyceraldehyd		130,4
Isobutyraldehyd		27,4
2- Methylpentanal		0,01

Ketone		
Dihydroxyacetone		2,7

Tab. 4: Substratspektrum in der Oxidation der NADPH- abhängigen GlyDH PA1. Die spezifische Aktivität von 0,09 U/mg in der Oxidation von Glycerin wurde auf 100% gesetzt

Name	Struktur	Relative Aktivität [%]
Glycerin		100
Isopropanol		11,1
Phenylethandiol		100
Hexanol		255,6
2- Methylpentanol		155,6

Tab. 5: Substratspektrum der NAD-abhängigen AldDHs GOX5 & 6. Die spezifische Aktivität von 19 U/mg (GOX5) und 33,5 U/mg (GOX6) wurde auf 100% gesetzt.

Name	Struktur	GOX5 relative Aktivität [%]	GOX6 Relative Aktivität [%]
Acetaldehyde		< 0,05 U/mg	54,1
Butanal (Butylaldehyd)		< 0,05 U/mg	96,1
Octanal		< 0,05 U/mg	19,7
Glyceraldehyd		100	100
Benzaldehyde		Kein Umsatz	19,4