

Abschlussbericht

Entwicklung und industrielle Umsetzung neuartiger und umweltfreundlicher chemoenzymatischer Synthesen zur Gewinnung pharma-relevanter Monosaccharide als Intermediate für die Herstellung von Impfstoffen, Diabetes- und antiviralen Medikamenten.



Projektleiter: Prof. Dr. Friedrich Giffhorn
Universität des Saarlandes

Das Projekt wurde im Rahmen des Forschungsnetzwerkes ChemBioTec, Schwerpunkt 2 „Neuartige Reaktionen und Reaktionskonzepte - Kopplung verschiedener Synthesestrategien“ durchgeführt.

Az 13195-32

Antragsteller

Univ.-Prof. Dr. Friedrich Giffhorn
Dr. Gert-Wieland Kohring
Lehrstuhl für Angewandte Mikrobiologie
Universität des Saarlandes, Gebäude A1.5
D-66123 Saarbrücken
Tel. +49 (0)681-3023426
E-Mail: giffhorn@mx.uni-saarland.de
<http://www.uni-saarland.de/fak8/giffhorn/>

toroma organics Ltd.
Science Park 2
D-66123 Saarbrücken, Germany
Tel. +49 (0) 681-9592852
E-Mail: info@toroma-organics.com
<http://www.toroma-organics.com>

Kooperationspartner

Univ.-Prof. Dr. Elmar Heinzle
Dipl.-Ing. (FH) Konstantin Schneider
Lehrstuhl für Technische Biochemie
Universität des Saarlandes, Gebäude A1.5
D-66123 Saarbrücken
Tel. +49 (0)681-3022905
E-Mail: e.heinzle@mx.uni-saarland.de
<http://www.uni-saarland.de/fak8/heinzle/>

Projektbeginn 01.05.2007
Projektende 31.12.2010

2. Zusammenfassung

In diesem Projekt wurden neue chemo-enzymatische Synthesen für D-Rhamnose und den Azazucker (Iminozucker) 2,5-Didesoxy-2,5-imino-D-glucitol entwickelt. Es handelt sich um hochpreisige Kohlenhydratderivate, die als Bausteine für die Herstellung von Glykokonjugat-Impfstoffen bzw. von Medikamenten gegen Diabetes, Krebs und Virusinfektionen in Frage kommen. Die Synthese des Azazuckers umfasste drei Stufen. Im ersten Schritt wurde ungeschützte L-Sorbose in wässriger Lösung mit dem Enzym Pyranose-2-Oxidase (P2Ox) regioselektiv zu 5-Keto-D-fructose (5KF) oxidiert. Um diesen Teilschritt effektiver zu machen, wurde die Syntheseleistung der P2Ox mit Methoden des *Proteinengineerings* verbessert und der Umsatz mit verfahrenstechnischen Methoden optimiert. Die Prozessierung der 5KF umfasste Ultrafiltration und Lyophilisierung zum Feststoff. Im chemischen Teilschritt wurde mittels zyklisierender, doppelt reduktiver Aminierung eine polyhydroxylierte Pyrrolidin-Zwischenstufe hergestellt, die durch hydrogenolytische Abspaltung der Benzhydryl-Schutzgruppe zum Zielprodukt führte. Die Qualität dieser und nachfolgender End- und Zwischenprodukte wurde mit ^1H - und ^{13}C -NMR sowie ggf. mit HPLC und DC validiert.

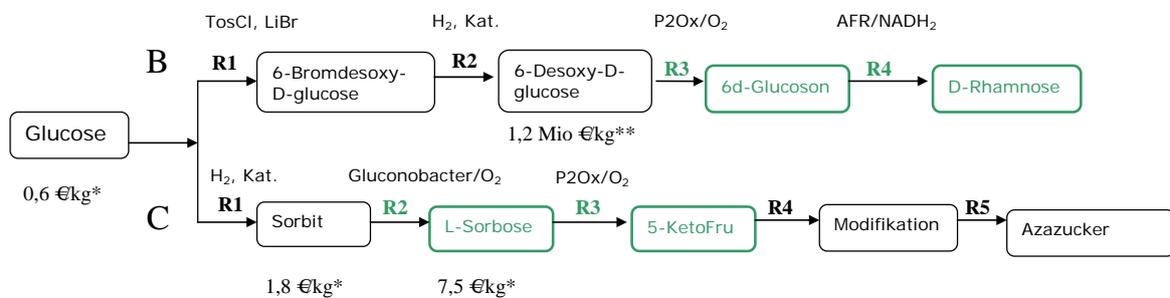
Die Synthese von D-Rhamnose umfasste zunächst eine mehrstufige chemische Synthese von 6-Desoxy-D-glucose (6dGlc), die in zwei aufeinanderfolgenden biokatalytischen Teilschritten zu D-Rhamnose umgesetzt wurde. Im ersten Schritt wurde 6dGlc in wässriger Lösung quantitativ mit P2Ox zu 2-Keto-6-desoxy-D-glucose (6-Desoxyglucoson) oxidiert. Die nachfolgende Reduktion von 6-Desoxyglucoson zu D-Rhamnose wurde mit dem Enzym Anhydrofructose-Reductase (AFR) und Cosubstrat-Regenerierung durchgeführt. Wegen der geringen Enantioselektivität der AFR gegenüber diesem Substrat ist eine wirtschaftliche Durchführung dieses Syntheseschrittes nur mit einer durch *Proteinengineering* verbesserten AFR durchführbar.

3. Anlass und Zielsetzung sowie Bewertung der Ökoeffizienz des Projektes

In Kooperation mit einem KMU sollten neue chemo-enzymatische Synthesen für D-Rhamnose und den Azazucker 2,5-Didesoxy-2,5-imino-D-glucitol entwickelt

werden. Die rein chemische Synthese derartiger Kohlenhydratderivate ist aufwändig und erfordert zahlreiche Reaktionsschritte, bei denen unerwünschte Nebenprodukte entstehen. Ziel war die Entwicklung wirtschaftlicher und Ressourcen schonender Synthesen, um eine konkurrenzfähige Vermarktung der Zielprodukte durch das KMU zu ermöglichen. Dazu sollten die Synthesen von Derivaten der D-Glucose, einem der preiswertesten Kohlenhydrate, ausgehen und biokatalytische und chemische Reaktionsschritte in den Synthesewegen optimal eingesetzt werden. Die Wirtschaftlichkeit der neu entwickelten Verfahren sollte mit bekannten Synthesen verglichen und eine Ökobilanz erstellt werden.

Schema 1. Synthesewege zu D-Rhamnose und Azazuckern.



* F.W. Lichtenthaler (2003) ACS Symposium Series 841:47
 ** Fluka 2007/08

Die biokatalytischen Reaktionsschritte (in Schema 1 grün gekennzeichnet) trugen im Wesentlichen zu einer Verbesserung der Ökobilanz bei, da sie in der Regel selektiver als chemische Reaktionen sind und in wässrigen Lösungen an ungeschützten Kohlenhydraten durchgeführt werden können. Bei den chemischen Syntheseschritten waren die verwendeten Lösemittel problematisch. Eine signifikante Verringerung des Lösemittelanteils sowie die Substitution der halogenierten Lösemittel durch weniger problematische ist nicht zufriedenstellend gelungen, sollte aber aus SHE-Sicht das Ziel für spätere Anwendungen sein. Das *Recycling* der Lösemittel durch Destillation würde zu einer Verbesserung der Bilanz der chemischen Reaktionsschritte beitragen.

4. Methoden

4.1 Chemische Synthesen

Methyl-6-desoxy-6-iod- α -D-glucopyranosid. 38.8 g (200 mmol, 1.00 Äquiv.) Methyl- α -D-glucopyranosid werden unter Argon in 1.3 l wasserfreiem Tetrahydrofuran gelöst, mit 78.7 g (300 mmol, 1.50 Äquiv.) Triphenylphosphin und 27.2 g (400 mmol, 2.00 Äquiv.) Imidazol versetzt und zum Rückfluss erhitzt. Zu dieser siedenden Suspension wird eine Lösung aus 76.1 g (300 mmol, 1.50 Äquiv.) Iod in 0.4 l wasserfreiem Tetrahydrofuran getropft. Nach beendeter Zugabe wird noch 45 min refluxiert, mit 1.80 ml Wasser (100 mmol, 0.50 Äquiv.) versetzt und abgekühlt. Nach Filtration und Abdestillieren des Lösemittels wird in Dichlormethan aufgenommen und dreimal mit Wasser extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen werden mit Dichlormethan gewaschen, mit Natriumchlorid gesättigt und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Ethylacetat-Extrakte werden über Magnesiumsulfat getrocknet und destillativ vom Lösemittel befreit. Das so erhaltene Rohprodukt wird aus Methanol umkristallisiert. Man erhält 26.3 g (86.5 mmol, 43% d. Th.) farblose Kristalle.

Methyl-6-desoxy-6-iod-2,3,4-tri-O-acetyl- α -D-glucopyranosid. 37.1 g (122 mmol, 1.00 Äquiv.) Methyl-6-desoxy-6-iod- α -D-glucopyranosid werden in 197 ml (2.44 mol, 20.0 Äquiv.) Pyridin gelöst, unter Eiskühlung mit 231 ml (2.44 mol, 20.0 Äquiv.) Acetanhydrid versetzt und über Nacht unter Erwärmung auf Raumtemperatur gerührt. Danach werden die flüchtigen Bestandteile destillativ entfernt. Der Rückstand wird in Dichlormethan aufgenommen, nacheinander mit 1 M Kaliumhydrogensulfat-Lösung, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und destillativ vom Lösemittel befreit. Das so erhaltene Rohprodukt wird aus Methanol umkristallisiert. Man erhält 47.9 g (111 mmol, 91% d. Th.) farblose Kristalle.

Methyl-6-desoxy-2,3,4-tri-O-acetyl- α -D-glucopyranosid. 13.0 g (30.2 mmol, 1.00 Äquiv.) Methyl-6-desoxy-6-iod-2,3,4-tri-O-acetyl- α -D-glucopyranosid werden in 500 ml Methanol und 250 ml Dichlormethan gelöst und nacheinander mit 15.6 ml (112 mmol, 3.73 Äquiv.) Triethylamin und einer Spatelspitze Palladium auf Kohle (5%) versetzt. Das Reaktionsgemisch wird bei Atmosphärendruck hydriert, bis 677 ml (30.2 mmol, 1.00 Äquiv.) Wasserstoff aufgenommen worden sind. Danach wird über Celite filtriert und destillativ vom Lösemittel befreit. Der Rückstand wird in

Ethylacetat aufgenommen, dreimal mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und destillativ vom Lösemittel befreit. Das so erhaltene Rohprodukt wird aus Petroleumbenzin (40–65 °C) umkristallisiert. Man erhält 7.50 g (24.6 mmol, 82% d. Th.) farblose Kristalle.

6-Desoxy-D-glucopyranose. 16.2 g (53.5 mmol, 1.00 Äquiv.) Methyl-6-desoxy-2,3,4-tri-O-acetyl- α -D-glucopyranosid werden in 180 ml Wasser gelöst, mit 16.2 g (100 Massen-%) Amberlite IR120 stark saurem Ionenaustauscher versetzt und eine Woche auf 85 °C erhitzt. Nach Abkühlen wird vom Ionenaustauscher abfiltriert und destillativ vom Lösemittel befreit. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch (Kieselgel, Eluent: Dichlormethan/Methanol = 75/25) und anschließend durch Kristallisation aus 2-Propanol. Man erhält so 7.03 g (42.8 mmol, 80% d. Th.) farblose Kristalle.

N-Benzhydryl-2,5-didesoxy-2,5-imino-D-glucit. 3.38 g (19.0 mmol, 1.00 Äquiv.) 5-Keto-D-fructose werden unter Argon in 100 ml wasserfreiem Methanol gelöst, nacheinander mit 5.01 g (22.8 mmol, 1.20 Äquiv.) Benzhydrylamin Hydrochlorid und 2.39 g (38.0 mmol, 2.00 Äquiv.) Natriumcyanoborhydrid versetzt und zum Rückfluss erhitzt. Nach 8 und 15 h erfolgt jeweils eine weitere Zugabe von 1.19 g (19.0 mmol, 1.00 Äquiv.) Natriumcyanoborhydrid. Dabei wird der pH-Wert durch Zugabe von Essigsäure möglichst konstant bei 5 gehalten. Nach weiteren 24 h Rückfluss wird das Lösemittel abdestilliert und das Rohprodukt chromatographisch gereinigt (Kieselgel, Eluent: Chloroform/Methanol/konz. Ammoniak = 88/11/1). Man erhält 1.91 g (5.80 mmol, 31 % d. Th.) eines farblosen Feststoffs.

2,5-Didesoxy-2,5-imino-D-glucit. 494 mg (1.50 mmol, 1.00 Äquiv.) N-Benzhydryl-2,5-didesoxy-2,5-imino-D-glucit werden in 200 ml Methanol gelöst, mit 100 mg Pearlman's Katalysator ($\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$) versetzt und bei Atmosphärendruck 18 h hydriert. Dann wird der Katalysator über Celite abfiltriert und das Lösemittel destillativ entfernt. Nach Trocknung im Hochvakuum erhält man 232 mg (1.42 mmol, 95 % d. Th.) eines farblosen Feststoffs.

N-Benzhydryl-2,5-didesoxy-2,5-imino-1,3-O-isopropyliden-D-glucit. 2.00 g (6.07 mmol, 1.00 Äquiv.) N-Benzhydryl-2,5-didesoxy-2,5-imino-D-glucit werden in 30 ml Dimethylformamid gelöst und nacheinander mit 1.27 g (6.68 mmol, 1.10 Äquiv.) *para*-Toluolsulfonsäure Monohydrat und 2.02 ml (16.4 mmol, 2.70 Äquiv.) 2,2-Dimethoxypropan versetzt. Nach 9 und 15 h erfolgt jeweils eine weitere Zugabe von 2.02 ml (16.4 mmol, 2.70 Äquiv.) 2,2-Dimethoxypropan, und es wird zusätzliche

24 h nachgerührt. Dann wird das Reaktionsgemisch durch Zugabe von gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung neutralisiert, mit Wasser verdünnt und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und destillativ vom Lösemittel befreit. Die Reinigung erfolgt säulenchromatographisch (Kieselgel, Eluent: Ethylacetat/Triethylamin = 98/2). Man erhält 1.82 g (4.93 mmol, 81% d. Th.) eines farblosen Feststoffs.

N-Benzhydryl-4,6-di-O-benzyl-2,5-didesoxy-2,5-imino-1,3-O-isopropyliden-D-glucit. 1.80 g (4.87 mmol, 1.00 Äquiv.) N-Benzhydryl-2,5-didesoxy-2,5-imino-1,3-O-isopropyliden-D-glucit werden unter Argon in 20 ml wasserfreiem Dimethylformamid gelöst und mit 214 mg (5.36 mmol, 1.10 Äquiv.) Natriumhydrid (60% Dispersion in Mineralöl) versetzt. Nach Beendigung der Gasentwicklung werden 0.64 ml (5.36 mmol, 1.10 Äquiv.) Benzylbromid zugegeben und 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Hiernach werden erneut 214 mg (5.36 mmol, 1.10 Äquiv.) Natriumhydrid und nach Beendigung der Gasentwicklung 0.64 ml (5.36 mmol, 1.10 Äquiv.) Benzylbromid zugegeben und weitere 24 h gerührt. Dann wird das Reaktionsgemisch mit Wasser verdünnt und dreimal mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden dreimal mit Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und destillativ vom Lösemittel befreit. Das so erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel, Eluent: n-Hexan/Ethylacetat = 6/4). Man erhält 1.81 g (3.29 mmol, 68% d. Th.) eines farblosen Feststoffs.

4.2 Biochemische, analytische und molekularbiologische Methoden

Aminosäureaustausche in Proteinen. Die Aminosäureaustausche wurden einzeln mit dem QuikChange[®]-Mutagenese-Kit (Stratagene) durchgeführt. Als Template diente die in pET24a(+) klonierte P2OxB2H DNA-Sequenz (Bastian et al. 2005). Für die Vereinigung der Austausch wurde als *Template* das Produkt von Primerpaar 1 (Dorscheid 2009) verwendet. Die DNA-Sequenzierungen wurden von kommerziellen Anbietern durchgeführt. *In silicio* Mutationen wurden anhand der Strukturdaten der P2Ox aus *Peniophora* sp. (Bannwarth et al. 2004) mit dem Swiss-PdbViewer Version 3.7 (Guex und Peitsch 1997) und der Modelling-Software YASARA Version 7.9.3 erstellt (Krieger et al. 2002).

Mit Hilfe des Programms B-Fitter (Reetz und Carballeira 2007) wurden die Aminosäuren der AFR identifiziert, die eine hohe Flexibilität der Enzymstruktur bewirken und dadurch die Thermostabilität des Enzyms beeinflussen. Mit iterativer Sättigungsmutagenese (ISM) (Reetz und Carballeira 2007) wurden die in Frage kommenden Aminosäuren gegen alle anderen 19 Aminosäuren mit dem QuikChange[®]-Mutagenese-Kit (Stratagene) ausgetauscht. Als Template diente die in das *E. coli* Plasmid pET24a(+) klonierte AFR-A13G DNA-Sequenz (Kühn et al. 2006). Die DNA-Sequenzierungen wurden extern von GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) durchgeführt. Die neu eingeführten Mutationen wurden anhand der Strukturdaten der AFR aus *S. morelense* S-30.7.5. (Dambe et al. 2006) mit der Modelling-Software YASARA Version 7.9.3 ausgewertet (s.o).

Produktion und Isolierung rekombinanter Enzyme. Rekombinante Pyranose-2-Oxidase (P2Ox) Varianten wurden mit und ohne Chaperone in *E. coli* BL21(D3) bei 22°C im 2 L-Bioreaktor (Braun-Biostat B) produziert (Bastian et al. 2005). Die Chaperone wurden abhängig vom Regulatorgen mit L-Arabinose (0,5 mg/mL) oder mit Tetracyclin (5 mg/mL) induziert (Takara Bio Inc). Bei der *fed-batch* Fermentation im 2 L- Bioreaktor erfolgte die Induktion bei einer OD₆₀₀ von 20 (Riesenberg et al. 2001). Das *feeding* wurde mit dem Ansteigen des pH in der Kultur mit einer 1 M Glucoselösung begonnen (Lee 1996). Da die P2Ox-Varianten thermostabil waren und einen His-Tag hatten, konnten die Enzyme in einem Schritt über HiTrap-Affinitätschromatographie aus einem hitzebehandelten Zellextrakt isoliert werden (Bastian et al. 2005). Die Protein-Konzentration wurde mit dem BCA Protein Assay Kit bestimmt (Hartree 1972).

Rekombinante Anhydrofructose-Reductase (AFR) wurde bei 22 °C in *E. coli* BL21(D3) im 2 L-Bioreaktor produziert (Kühn et al., 2006). Screening-positive AFR-Varianten wurden jeweils in 30 mL Pepton/Trypton-Medium bei 37°C in *E. coli* BL21(DE3)pLysS produziert. Das Screening nach thermostabilen Varianten wurde im Thermoblock durchgeführt.

Screening nach thermostabilen AFR-Varianten in Mikrotiterplatten. Zur Expression der in pET24a(+) klonierten AFR-A13G-Varianten wurde *E. coli* BL21(DE3)pLysS verwendet. Dazu wurden die Kolonien in 200 µl Pepton/Trypton-Medium vier Stunden bei 37°C und 220 rpm in Mikrotiterplatten angezogen. Dann wurde die AFR-Expression mit IPTG (0,1 mM) induziert und die Platten bei 20°C über Nacht inkubiert. Nach Zellyse durch Zugabe von 100 µl 100 mM KH₂PO₄-Puffer

(pH 7,0) mit DNase I und 0,06 % Triton-X 100 (Reeves et al. 1999) wurden die Zellextrakte 10 min bei 85°C inkubiert, anschließend denaturiertes Protein 10 min bei 2000 rpm und 4°C abzentrifugiert, und dann die Enzymaktivität mit einem Reader im Standardtest (s. Enzymtest) gemessen.

Enzymtests und Elektrophorese. Die Aktivität der P2Ox wurde spektral-photometrisch in einem chromogenen Assay gemessen (Danneel et al. 1993). Die Aktivität der AFR wurde spektralphotometrisch im UV-Test gemessen (Kühn et al., 2006) und entsprechend im Microplate Reader 680 XR (Biorad) mit der zugehörigen Software Microplate Manager (Biorad).

Die Proteinfractionen wurden mit SDS-PAGE (Laemmli 1970) analysiert. Proteinbanden wurden mit Coomassie-Blue angefärbt und densitometrisch analysiert (ScanJet 6200C, Hewlett Packard). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der 1 D-Analyse-Software Quantity One (The Discovery Series™, Biorad).

Analytik. Kohlenhydratsubstrate und -produkte wurden mit HPLC und exemplarisch mit DC analysiert. Für HPLC wurde eine Rezex ROA-Organic Acid H⁺-Säule bzw. eine Rezex RCM Monosaccharide Ca²⁺-Säule (300 x 7,8 mm) von Phenomenex verwendet. Laufmittel: war 5 mM H₂SO₄ (0.5 ml/min) bei 60°C. Für die Detektion wurde ein Brechungsindex-Detektor verwendet. Alternativ diente als Laufmittel war H₂O_{dd} bei 80°C (Bastian et al., 2005; Kühn et al., 2006).

DC wurde auf mit Kieselgel beschichteten Aluminiumfolien im Fließmittel: Phenol:Wasser (4:1) durchgeführt. Als Sprühreagenz wurde 2,4-Dinitrophenylhydrazin bzw. *p*-Anisaldehyd verwendet (Kühn et al., 2006).

NMR-Spektren wurden nach Lösung der Feststoffe in D₂O mit einem Avance 500 Spektrometer (Bruker) bei 500 MHz und 300 K aufgenommen. Die Aufnahme und Auswertung der Spektren erfolgte mit der vom Hersteller gelieferten Software (Kühn et al., 2006).

Biokonversionen mit Cosubstratregenerierung Zur Regenerierung von NADPH wurden D-Glucose und Glucose-Dehydrogenase (EC 1.1.1.47, GDH) aus *Pseudomonas sp.* verwendet (Sigma Aldrich). Der Reaktionsansatz enthielt in einem Volumen von 20 ml (30°C) folgende Komponenten: 20 mM BisTris (pH 6,5), 0.06 mM NADPH, 1,2 mM NADP, 200 mM D-Glucoson, 500 mM D-Glucose, 800 U AFR-A13G, 100 U GDH. Nach Vorversuchen zur Optimierung des Systems wurde 2-Keto-D-glucoson verwendet.

Downstream Processing. Nach dem Umsatz wurden die Enzyme mit einer 10 kDa-Membran aus dem Reaktionsansatz abfiltriert. Zur Abtrennung geladener Verbindungen wie NADP(H), D-Gluconat und BisTris wurde das Filtrat im *Batch* mit 8 g gemischtem Ionenaustauscher (Serdolit MB-2, Serva) versetzt und bei 180 rpm und 28°C 1,2 h inkubiert. Dann wurde der Ionenaustauscher abfiltriert und das Filtrat auf Ionen mittels Leitfähigkeitsmessungen, HPLC (D-Dlucose, D-Gluconat) und ggf. Extinktionsmessungen bei 260 nm (NADP/H) analysiert. Um die für die Cosubstrat-Regenerierung im Überschuss eingesetzte D-Glucose zu entfernen, wurde die nach dem Umsatz verbleibende D-Glucose mit Glucose-Oxidase quantitativ zu D-Gluconat oxidiert durch Ionenaustauscher entfernt.

Ökoeffizienzanalyse

Ziele der frühen Bewertung von Prozessen sind im Allgemeinen das umfassende Erkennen potentiell kritischer Aspekte und das Aufzeigen und die Bewertung von Optimierungspotenzialen (Heinzle und Hungerbühler, 1997). Kritische Aspekte ergeben sich dabei in erster Linie durch den Einsatz von kritischen Stoffen. Für einige der in diesem Projekt bearbeiteten Synthesen mit den in Schema 1 dargestellten Reaktionen sind erste Stoffbilanzen verfügbar, die einen ersten Einblick in die damit verbundenen Risikopotentiale in den Bereichen Gesundheit, Sicherheit, und Umweltschutz (SHE) erlauben. Es handelt sich durchgehend um Laborverfahren einzelner Synthesestufen. Entsprechend besteht ein Potential zur Optimierung dieser Synthesestufen hinsichtlich Produktqualität, Produktivität aber auch SHE-Aspekten. In dieser frühen Phase der Entwicklung wird zur SHE-Bewertung die Methode von Heinzle et al. (2006) eingesetzt, die eine Bewertung auf der Basis von Stoffbilanzen und gut verfügbaren SHE-Merkmalen der eingesetzten und soweit bekannt auch der gebildeten Stoffe erlaubt. Für die Stoffe wurde zunächst eine ABC-Einstufung durchgeführt (Siehe Tabelle Ö1 (Anhang). Wie in Heinzle et al. (2006) und in früheren Arbeiten (Heinzle et al., 1998; Biber und Heinzle, 2004) ausführlich dargestellt, handelt es dabei um Risikopotentiale und nicht um die mit einem späteren Prozess tatsächlich verbundenen Risiken. Diese können einerseits durch technische Verbesserungen wie Änderung der Einsatzstoffe oder der Lösungsmittel, andererseits durch Änderung der Prozessführung oder durch den Einsatz von Schutzmaßnahmen eventuell wesentlich vermindert werden. Tabelle Ö1 enthält die ermittelten ABC-Klassifizierungen der eingesetzten Stoffe. Die Einstufung erfolgt dabei durchgängig mit den Daten der reinen Stoffe. Für die Hauptsubstrate sowie für

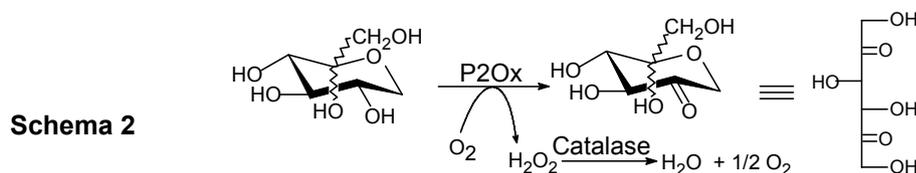
Benzhydrylamin konnten noch keine Einstufungen vorgenommen werden. Für alle diese Stoffe wurden die Wichtungsfaktoren auf je 50 gesetzt. Für die eingesetzten Enzyme wurden die Input-Wichtungsfaktoren auf ebenfalls 50 gesetzt, was den relativ hohen Aufwand an Material und Energie für ihre Herstellung ausreichend gewichtet. In Tabelle Ö2 (Anhang) sind die aus den Daten von Tabelle Ö1 errechneten ökologischen Wichtungsfaktoren für Input und Output aufgelistet. Durch Multiplikation der Stoffströme mit diesen Wichtungsfaktoren erhält man eine erste Quantifizierung der SHE-Risiken wie in Abbildung Ö1 (Anhang) für einige Synthesen zeigt.

5. Ergebnisse

5.1 Synthese 2,5-Didesoxy-2,5-imino-D-glucitol

5.1.1 Biokatalytische Synthese von 5-Keto-D-fructose

Der Syntheseweg zu Azazuckern enthält als biokatalytischen Teilschritt (Schema 1C R3) die Oxidation der L-Sorbose zu 5-Keto-D-fructose (5KF) mit dem Enzym Pyranose-2-Oxidase (P2Ox) (Schema 3). Das gebildete H₂O₂ wird mit Katalase in H₂O und ½ O₂ gespalten und somit aus der Reaktionslösung entfernt.



Für die Reaktion wurde zunächst die P2Ox-Variante P2OxB2H verwendet, deren katalytische Effizienz (k_{cat}/K_m) gegenüber L-Sorbose mit *Proteinengineering* verbessert worden war (Bastian et al. 2005). Da die Produktion des rekombinanten Enzyms in *E. coli* mit ca. 400 U pro Liter Kultur unbefriedigend war, bestand auch hier Entwicklungsbedarf (s.u.).

Vorversuche ergaben, dass P2OxB2H grundsätzlich für Biokonversionen im präparativen Maßstab geeignet war. In begasten und gerührten Enzymreaktoren mit jeweils 25 mL Arbeitsvolumen wurden bis zu 1 M Lösungen L-Sorbose quantitativ zu 5KF umgesetzt. Darüber hinaus zeigte sich, dass der Enzymeinsatz signifikant verringert werden konnte, wenn anstelle von Luft mit Sauerstoff begast wurde. Die

Abbildung 1 zeigt exemplarisch den Umsatz einer 1 M L-Sorbose Lösung im Enzymreaktor mit 25 mL Arbeitsvolumen und Sauerstoffbegasung. Dabei zeigte sich, dass unmittelbar nach dem Start der Reaktion die Sauerstoffkonzentration sehr rasch bis auf einen Wert von 60% Sättigung absank und nach einem Übergang, der bis zum Umsatz von ca. 50% der L-Sorbose anhielt, langsam wieder bis zum Ende des Umsatzes anstieg und Sättigung erreichte. Ebenfalls wurde beobachtet, dass der pH trotz Pufferung der Reaktionslösung um eine Einheit absank.

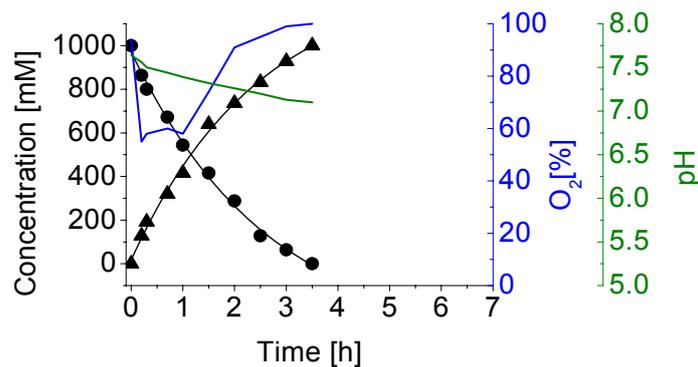


Abbildung 1. Umsetzung von L-Sorbose (●) zu 5-Ketofructose (▲) mit P2OxB2H Enzymreaktor bei 22 °C. Der Reaktionsansatz hatte ein Volumen von 25 mL und enthielt in 0,1 M KH₂PO₄-Puffer 4,5 g L-Sorbose, 125 U P2OxB2H (5 U/mmol L-Sorbose) und 20 kU Rinderleber Katalase (Sigma). Begast wurde mit 0,5 vvm Sauerstoff.

Um erste präparative Mengen 5KF für chemischen Umsetzungen herzustellen, wurde ein entsprechender Umsatz im 250 mL-Maßstab durchgeführt und das Produkt gereinigt und chemisch analysiert. Ein weiteres *Upscaling* derartiger Biokonversionen war zu diesem Zeitpunkt wegen der begrenzten Verfügbarkeit des Biokatalysators nicht möglich.

5.1.2 *Downstream Processing* der 5-Ketofructose

Da die Umsätze in Puffer durchgeführt wurden, musste 5KF aus der Reaktionslösung aufgereinigt und in Feststoff überführt werden. Die Schritte umfassten Ultrafiltration der Reaktionslösung, Entfernung der Puffersalze aus dem Filtrat mit einem gemischten Ionenaustauscher im *Batch*, gegebenenfalls Volumenreduktion im Rotationsverdampfer und anschließender Gefriertrocknung zum Feststoff mit 60-65% Ausbeute. Die Präparate waren hygroskopisch aber schüttbar, wenn sie luftdicht verschlossen waren, und besaßen üblicherweise eine weiße bis leicht gelbliche

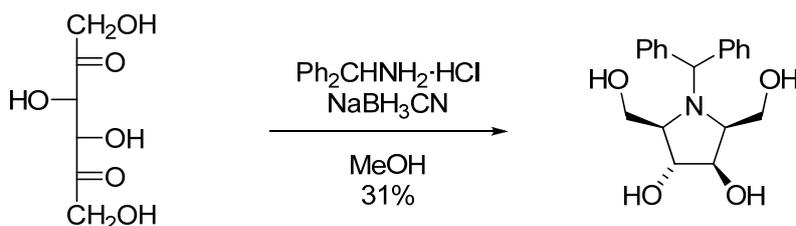
Färbung (Abbildung 2). Ausbeute mildernd war der Ionenaustauscher, aus dem 5KF nach abnutschen mit Wasser nur mit *Tailing* eluiert werden konnte. Um die nicht unerheblichen Verluste durch Vermeidung dieses Schrittes zu verringern, wurden Biokonversionen in rein wässriger Lösung durchgeführt und der pH mit $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -Lösung titriert, um Salzurückstände bei der Gefriertrocknung zu vermeiden. Aus derartigen Umsätzen konnte 5KF nach Ultrafiltration und Gefriertrocknung mit Ausbeuten >95% als Feststoff erhalten werden. Allerdings trat während der Umsätze bereits eine gelbliche Färbung auf, die sich beim Feststoff zu einer leicht bräunlichen Färbung verdichten konnte.



Abbildung 2. Verschiedene 5-Ketofructose-Präparate nach Gefriertrocknung.

Demgegenüber waren die 5KF-Feststoffe wiederum weiß bis gelblich gefärbt, wenn mit verdünnter NaOH titriert wurde. Nebenprodukte als mögliche Ursache für die Bräunung konnten mit DC-, HPLC- sowie NMR-spektroskopischer Analytik nicht erfasst werden. Farbänderungen, wie sie bei der Bildung von Zuckercouleur oder Maillardreaktion auftreten, wurden wegen der niedrigen Reaktionstemperatur ausgeschlossen. Allerdings sind Farbänderungen von Stoffen durch Spuren von Nebenprodukten ein in der Analytik bekanntes Phänomen, so dass wir bei dem bräunlichen 5KF-Präparat von einem weitestgehend homogenen Produkt ausgehen können.

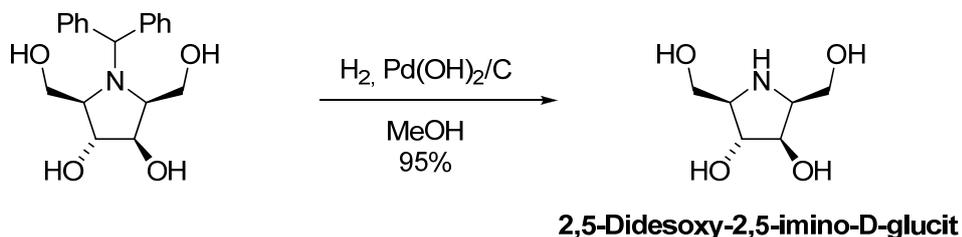
5.1.3 Chemische Synthese von 2,5-Didesoxy-2,5-imino-D-glucitol Durch cyclisierende, doppelte reduktive Aminierung von 5KF wurde zunächst eine polyhydroxylierte Pyrrolidin-Zwischenstufe synthetisiert (Schema 4) (Baxter und Reitz, 1994).



5-Keto-D-fructose

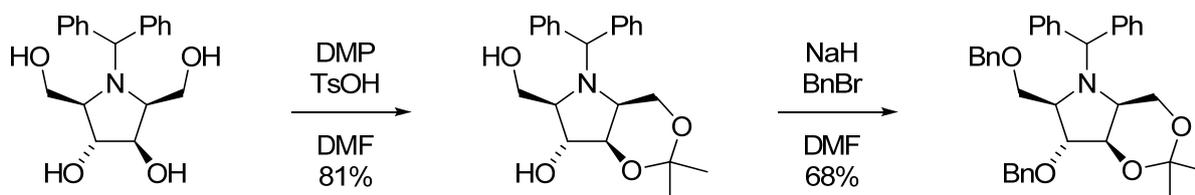
Schema 3

Insbesondere die moderate Ausbeute und die Erfordernis großer Mengen des giftigen Natriumcyanoborhydrids drängen auf weitere Optimierung des Verfahrens. Dennoch wurde auf diese Weise in einem einzigen Schritt eine gemeinsame Vorstufe einer ganzen Reihe von Iminozuckern hergestellt. So lieferte beispielsweise die hydrogenolytische Abspaltung der Benzhydryl-Schutzgruppe an Palladium auf Kohle in sehr guter Ausbeute das 2,5-Didesoxy-2,5-imino-D-glucit (Schema 5), einen potenten Inhibitor der α - und β -Glucosidase sowie der β -Fructosidase.



Schema 4

Einen weiteren Vertreter dieser Stoffklasse stellt das 1-Desoxymannojirimycin dar, das ebenfalls als potenter Glucosidase-Inhibitor beschrieben ist. Hier wurden bereits die ersten Stufen zur Synthese ausgehend von der gemeinsamen Pyrrolidin-Zwischenstufe erarbeitet:

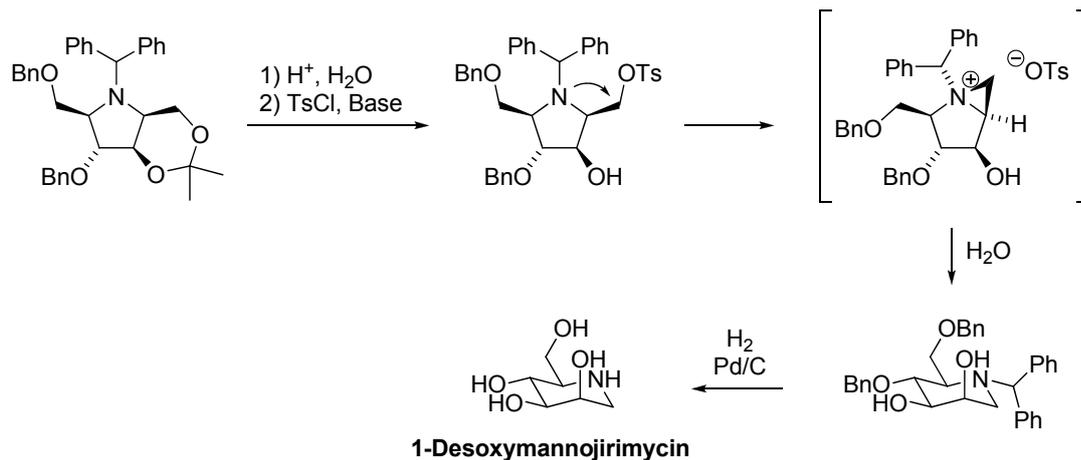


Schema 5

Die Umsetzung mit 2,2-Dimethoxypropan lieferte ausschließlich das Dioxinan der *syn*-ständigen Substituenten an den Positionen 2 und 3 des Heterocyclus. Die

anschließende doppelte Benzylierung führte in akzeptabler Gesamtausbeute zum vollständig geschützten Derivat (Schema 6).

Das nach saurer Entschützung des Acetonids und anschließender Tosylierung der reaktiveren primären Hydroxygruppe unter S_N2 -Bedingungen erhaltene Aziridiniumion sollte in der gezeigten Weise mit Wasser als Nucleophil zum *manno*-konfigurierten Piperidin-Derivat abreagieren, welches nach hydrogenolytischer



Schema 6

Abspaltung der Schutzgruppen zum 1-Desoxymannojirimycin führt (Schema 7). Allerdings waren die Ausbeuten derart unbefriedigend, dass dieser Weg zu Piperidin-Iminozuckern aufgegeben wurde.

5.2 Produktion und *Proteinengineering* der P2OxB2H

5.2.1 Verbesserung der Produktion von P2OxB2H mit Chaperonen.

Bei der Expression rekombinanter P2OxB2H in *E. coli* wurden neben löslicher, enzymatisch aktiver P2Ox erhebliche Mengen inaktiver *Inclusion Bodies* (IB) gebildet, die bis zu 50% der insgesamt exprimierten P2Ox ausmachten (Bastian et al., 2005). Die Ausbeute aktiver P2OxB2H lag bei ca. 400 U pro Liter Kultursuspension und nach Aufreinigung bei ca. 280 U (~70%). Im Hinblick auf das *Upscaling* und die bisher eingesetzten Enzymmengen (2-10 U/mmol L-Sorbose) würden selbst bei sparsamem Einsatz für einen Umsatz von 2 mol L-Sorbose (360 g) 4000 U P2OxB2H aus ca. 14 L *E. coli* Suspension benötigt. Ein solcher Ansatz wäre weder Ressourcen schonend noch wirtschaftlich. Deshalb wurden Untersuchungen zur besseren Expression der P2OxB2H in *E. coli* durchgeführt, zumal die Expression

in zu *E. coli* alternativen Wirten bisher wenig ergiebig war (Bastian et al., 2005). Da kulturphysiologische Ansätze durch Variierung der Temperatur, des pH-Wertes sowie der Medienzusammensetzung und Belüftung nicht zur Steigerung der Enzymausbeute führten, wurde ein molekularbiologischer Ansatz verfolgt, um durch Coexpression der P2OxB2H mit Chaperonen die Ausbeute nativ gefalteter und somit funktioneller P2OxB2H zu erhöhen (Mogk et al., 2001; Schlieker et al., 2002). Untersucht wurden Effekte der bakteriellen Chaperonine GroEL und GroES sowie Vertreter der Hsp70-Familie (DnaK, DnaJ, GrpE) und des Triggerfaktors.

Von den getesteten Chaperonen war der Triggerfaktor am wirksamsten, was sich in einer Steigerung der P2OxB2H-Volumenaktivität um den Faktor 1,8 auf ~750 U/L widerspiegelte bei gleichzeitiger Abnahme der *IBs* um 16%. Gleichzeitig verdoppelte sich die spezifische Aktivität des reinen Enzyms auf 38 U/mg Protein im Vergleich zu der aus einer Standardproduktion isolierten P2OxB2H. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde eine *fed-batch* Fermentation mit *Glucose-feeding* durchgeführt, die nach 29 h eine OD₆₀₀ von 160 (~40 g TG/L) erreicht hatte und mit 5750 U/L eine 14-fach höhere P2OxB2H Volumenausbeute hatte als die Standardproduktion. Die Abbildung 3 zeigt eine SDS-PAGE der Fraktionen einer P2OxB2H Isolierung aus dem Extrakt einer entsprechenden Zellsuspension.

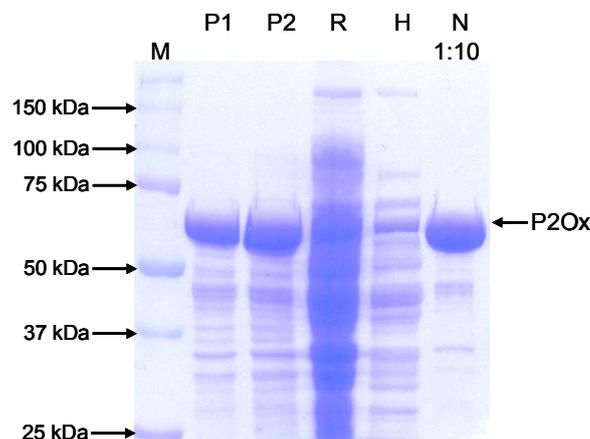


Abbildung 3: SDS-PAGE der Anreicherungsfraktionen der P2OxB2H nach Hochzelldichtefermentation von *E. coli* BL21(DE3) bei 28°C und Coexpression des Triggerfaktors. (M) Protein-Marker, (P1 und P2) Pellet, (R) Rohextrakt (99 µg), (H) Hitzefällung (30 µg), (N) Ni-Sepharose (2 µg).

5.2.2 Proteinengineering der Pyranose-2-Oxidase (P2OxB2H).

Neuere Untersuchungen mit P2Ox aus *Trametes pubescens* hatten gezeigt, dass eine stark exponierte, hydrophobe Kopfdomäne der P2Ox wesentlich zur Bildung von IBs beiträgt. Der Austausch dieser Domäne durch eine hydrophilere Peptidsequenz aus *T. ochracea* mittels *DNA-Suffling* führte zu einer besseren Löslichkeit des chimären Enzyms (Maresova et al. 2007). Da die Kopfdomäne ein konserviertes Strukturelement bei P2Ox ist, wurden abweichend von der beschriebenen Vorgehensweise bei P2OxB2H gezielt hydrophobe Aminosäuren der Kopfdomäne durch hydrophilere ersetzt. Die Abbildung 4. zeigt das Bändermodell der P2Ox aus *Peniophora gigantea* mit der exponierten Kopfdomäne, die sich über eine Sequenz von Aminosäure 368-430 erstreckt (Bannwarth et al. 2004, 2006).

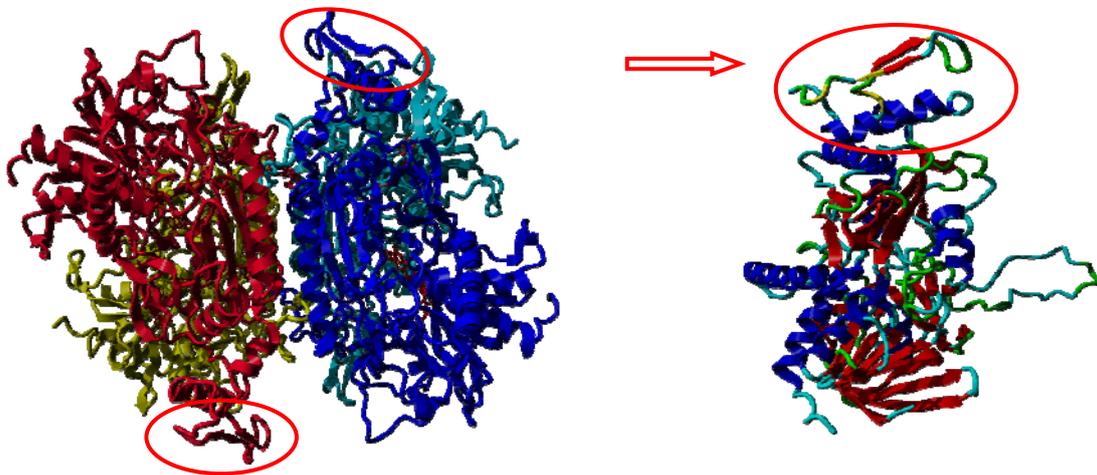


Abbildung 4. Bändermodell der P2Ox aus *Peniophora sp.* Links: Tetramer mit dem Betrachter zugewandten Kopfdomänen von zwei Untereinheiten. Rechts: Monomer mit Kopfdomäne.

Auf der Basis von Hydrophobizitätsindices (Kyte and Doolittle, 1982) wurden vier Aminosäuren in dieser Region identifiziert und durch das jeweils hydrophilere Analogon nach Vorgabe der P2Ox aus *T. pubescens* ausgetauscht (T378K, A379S, T395S und S398P). Die so erhaltene neue Enzymvariante erhielt die Bezeichnung P2OxB2H1.

Während der Austausch einzelner Aminosäuren keinen signifikanten Effekt auf die Expression und Eigenschaften der Enzymvarianten hatte, bildete P2OxB2H1 insbesondere bei 28 °C deutlich mehr Enzym in der löslichen Fraktion im Vergleich zu P2OxB2H. Dieser Effekt konnte durch Coexpression der P2OxB2H1 mit dem Triggerfaktor noch weiter verbessert werden (Dorscheid 2009).

Darüber hinaus zeigten kinetische Analysen auch signifikante Verbesserungen der Effizienz (k_{cat}/K_m) der P2OxB2H1 für L-Sorbose im Vergleich zu P2OxB2H (Tabelle 1). Von besonderer Bedeutung ist die hohe Effizienzsteigerung für 6-Desoxy-D-glucose (60-fach bzw. 2,4-fach im Vergleich zu Wildtyp-P2Ox bzw. P2OxB2H), die Substrat der P2OxB2H1 im Syntheseweg zu D-Rhamnose ist.

Tabelle 1. Vergleich der kinetischen Parameter verschiedener P2Ox-Varianten in bezug auf die Hauptsubstrate und 6-Desoxy-D-glucose.

Substrat	K_m [mM]			V_{max} [U/mg]			k_{cat}/K_m [M ⁻¹ s ⁻¹]*10 ⁻⁴		
	BH	B2H	B2H1	BH	B2H	B2H1	BH	B2H	B2H1
D-Glucose	0,8	0,4	0,34	5,20	22,5	30,1	2,9	26,9	39,7
L-Sorbose	47	2,9	2,5	4,0	33,7	27,0	0,04	3,7	5,4
D-Xylose	25	2,4	6,7	2,2	22,0	23,0	0,04	4,5	1,6
6d-D-Glucose	11,3	0,96	0,62	5,02	26,8	40,3	0,5	12,5	29,2

BH, Wildtyp P2Ox mit HisTag; B2H, P2Ox-K312E-E540K; B2H1, P2Ox-E312K-K520 plus 4 Mutationen in der Kopfdomäne (s.o.). Daten für BH und B2H aus Bastian et al. (2005) (nicht 6d-D-Glucose).

Biokonversionen mit der neu konstruierten Enzymvariante P2OxB2H1 zeigten bei gleichen Enzymmengen ähnliche Umsatzkinetiken wie P2OxB2H. Damit stand der weiteren Verwendung der neuen Enzymvariante nichts mehr im Wege.

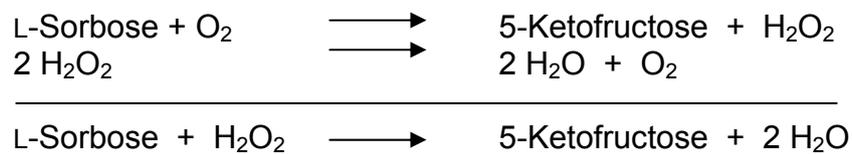
5.3 Bioverfahrensentwicklung

Die geringe Löslichkeit von O₂ in wässrigen Medien (Truesdale 1955) sowie die relativ geringe Affinität der P2Ox zu O₂ machten das Upscaling für das Upscaling keine guten Voraussetzungen und erforderten verfahrenstechnische Lösungsansätze, die in Kooperation mit der Arbeitsgruppe E. Heinzle realisiert werden sollten. Zwar gibt es technische Lösungen wie die Erhöhung der Begasungsrate und der Drehzahl sowie die Auslegung von Rührblättern und Reaktor, um die Sauerstoffübergangsraten zu verbessern. Allerdings waren derartige Maßnahmen bisher nicht Ziel führend, da insbesondere die Erhöhung der Begasungsrate zu Schaumbildung und damit zur Enzyminaktivierung führte. Als

weitere Möglichkeit zum Sauerstoffeintrag in die Reaktionslösung verfolgten wir deshalb das Konzept der *in situ* Sauerstoffgenerierung.

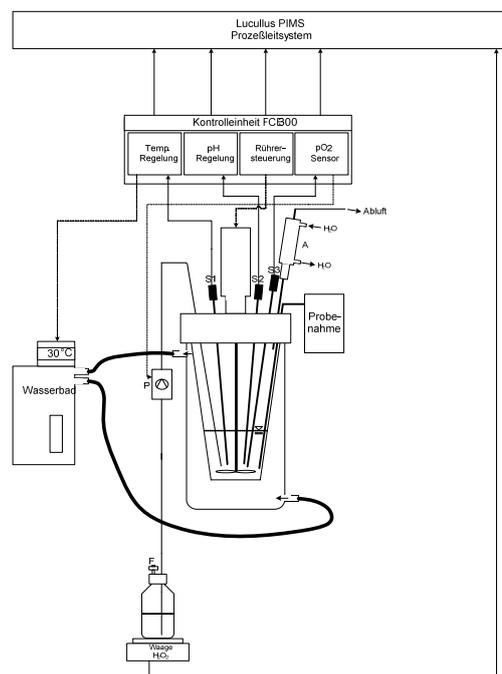
Bei der P2Ox-katalysierten Substratoxidation wird durch Spaltung des H₂O₂ mit Katalase ein halbes mol gelöster Sauerstoff in den Prozess zurückgeführt (s. Schema 7). Es lag daher nahe, an Stelle von O₂ gleich H₂O₂ als Sauerstoffquelle zu nutzen. Entsprechend Schema 8 wird für die Oxidation von einem mol L-Sorbose ein mol H₂O₂ benötigt. Für die Oxidation von 10 mol (1,8 kg) L-Sorbose ergibt sich demnach ein rechnerischer Bedarf von 1 kg einer 34% H₂O₂-Lösung (10 mol). Allerdings wird sich in der Praxis ein stöchiometrischer Umsatz nur schwer realisieren lassen, da es selbst bei der Zudosierung verdünnter H₂O₂-Lösungen zu O₂-Übersättigung des Reaktionsmediums mit spontaner Ausgasung kommen kann.

Schema 7



Die nachfolgend beschriebenen Biokonversionen wurden in Kooperation mit Herrn Schneider aus dem Arbeitskreis E. Heinzle durchgeführt. Verwendet wurden Enzymreaktoren mit pH-, Sauerstoff- und Temperaturregulierung. Der H₂O₂-Verbrauch wurde gravimetrisch über eine externe Waage bestimmt und die Zudosierung über die Sauerstoffelektrode reguliert (Schema 8).

Schema 8.



Die Abbildung 5 zeigt den vollständigen Umsatz von 18 g (0,1 mol) L-Sorbose zu 5KF innerhalb von 3 h. Durch Zudosierung einer 3,5% H_2O_2 -Lösung verdoppelte sich das Ausgangsvolumen im Reaktor auf 200 mL (A). Bei diesem Umsatz korrelierte der H_2O_2 -Verbrauch (B) sehr schön mit der L-Sorbose Oxidation, da es während der Umsetzung zwar zur Übersättigung der Reaktionslösung mit Sauerstoff (C), nicht aber zu Ausgasungen kam. Da bei diesem Umsatz die Enzymmenge signifikant auf 0,5 U/mmol L-Sorbose reduziert werden konnte, wurde die Weiterentwicklung dieses Verfahrens mit hoher Priorität verfolgt.

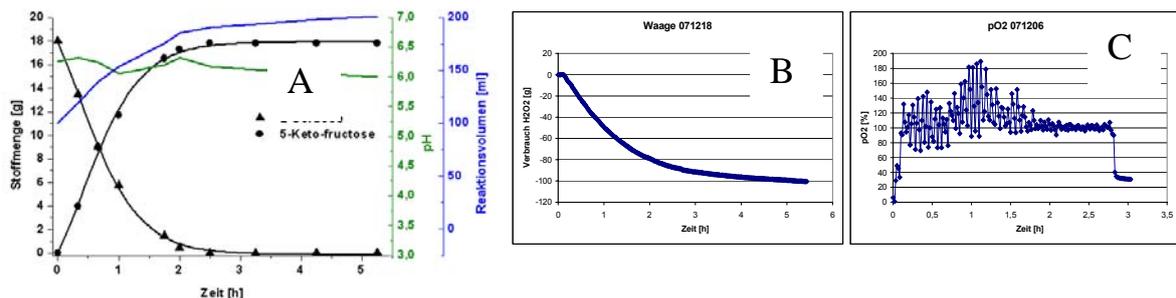


Abbildung 5. (A) Umsetzung von L-Sorbose (▲) zu 5-Ketofruktose (●) mit P2OxB2H1 durch *in situ* Sauerstoffgenerierung mit H_2O_2 bei 22 °C. Das Ausgangsvolumen war 100 mL Wasser mit 0,1 mol (18 g) L-Sorbose, 20 kU Rinderleber Katalase (Sigma) und 0,5 U P2OxB2H1/mmol L-Sorbose. Der Verlauf des Umsatzes wurde mit HPLC analysiert. (B) Registrierung der Gewichtsänderung einer 3,5 % (w/v) H_2O_2 -Lösung, (C) Registrierung der Sauerstoffkonzentration während der Umsetzung.

Um die Volumenvergrößerung durch Zugabe der H_2O_2 -Lösung gering zu halten, wurde exemplarisch ein entsprechender Umsatz mit 33% H_2O_2 -Lösung durchgeführt. Durch Verwendung einer sehr feinen Kanüle und Positionierung des Auslaufs im Bereich der Rührblätter konnte auch dieser Prozess trotz der hochkonzentrierten H_2O_2 -Lösung sehr zufriedenstellend realisiert werden (Abbildung 6). Bei diesem Umsatz kam es erwartungsgemäß zu spontanen Ausgasungen von Sauerstoff, was den überproportionalen Verbrauch von 27 mL (ca. 0,26 mol) H_2O_2 erklärt. Im Hinblick auf die problematische Handhabung konzentrierter H_2O_2 -Lösungen und wegen der durch die schwierige Dosierung bedingte Ausgasung, wird im letztendlich zu realisierenden Prozess mit H_2O_2 -Lösungen <<33% gearbeitet.

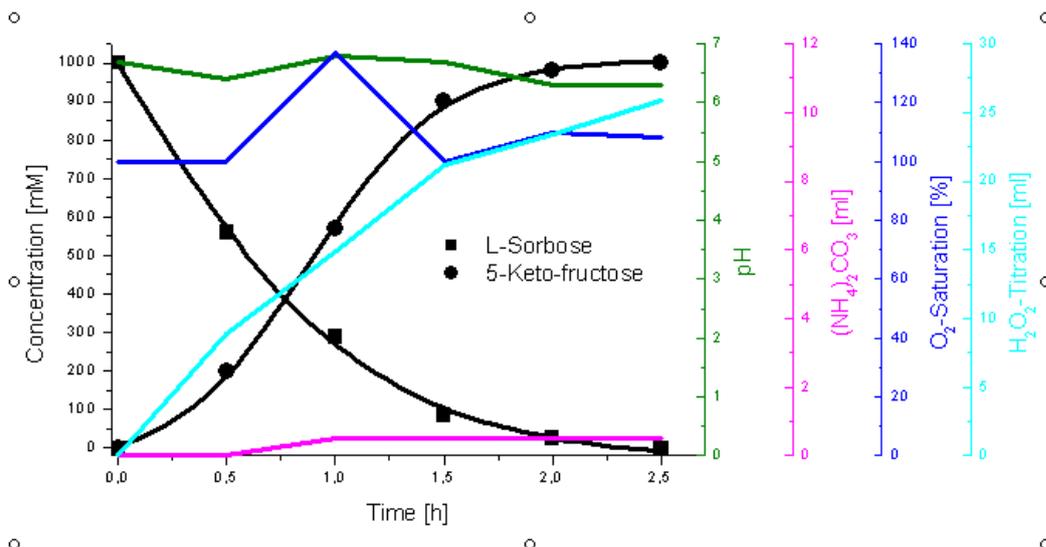
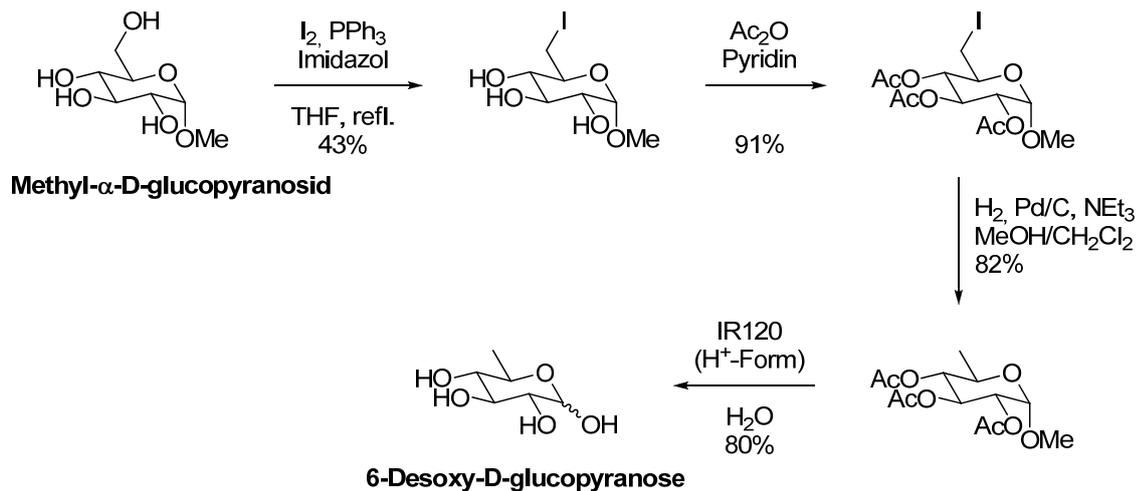


Abbildung 6. Umsetzung von L-Sorbose (■) zu 5-Ketofruktose (●) mit P2OxB2H1 durch *in situ* Sauerstoffgenerierung mit H₂O₂ bei 30 °C. Das Ausgangsvolumen war 100 mL Wasser mit 0,1 mol (18 g) L-Sorbose, 20 kU Rinderleber Katalase (Sigma) und 1 U P2OxB2H1/mmol L-Sorbose. Titriert wurde mit 33% H₂O₂.

5.4 Synthese von D-Rhamnose

5.4.1 Chemische Synthese von 6-Desoxy-D-glucopyranose

Die chemische Synthese von 6-Desoxy-D-glucopyranose ging von Methyl- α -D-glucopyranosid aus. Zunächst galt es, die Hydroxygruppe an C-6 in eine hydrogenolytisch spaltbare Funktionalität umzuwandeln. Dazu wurde eine Iodierung mit elementarem Iod in Anwesenheit von Triphenylphosphin und Imidazol durchgeführt. Es soll nicht unerwähnt bleiben, dass die Hauptproblematik dieser Stufe darin besteht, dass pro Kilogramm Produkt über acht Kilogramm Nebenprodukte entstehen, die jedoch durch eine Kombination aus Filtrations-, Extraktions- und Kristallisationsschritten problemlos abgetrennt werden konnten. Da der Versuch einer direkten Hydrierung auf dieser Stufe scheiterte, wurden als nächstes die drei freien Hydroxylgruppen durch Acetylierung blockiert. Während dieser beiden Schritte (Iodierung und Acetylierung) bei der Ausarbeitung der Synthese im fünf-Gramm-Maßstab noch zusammengefasst werden konnten, erforderte die Synthese im größeren Maßstab die Aufreinigung beider Stufen durch Umkristallisation.



Schema 9

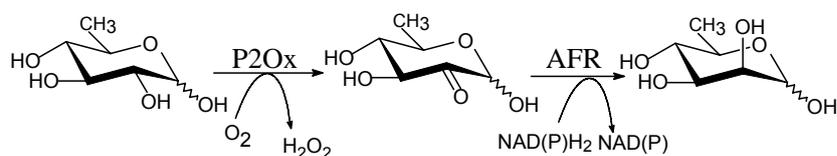
Die hydrogenolytische Spaltung des Iodids wurde an Palladium auf Kohle als Katalysator durchgeführt und erforderte die Verwendung von Triethylamin als Hilfsbase. Aus Löslichkeitsgründen musste in einem Methanol/Dichlormethan-Gemisch als Solvens gearbeitet werden. Wieder gelang die Reinigung durch einfache Umkristallisation. Die anschließende vollständige Entschützung wurde mit Hilfe eines stark sauren Ionenaustauschers (Amberlite IR120, H⁺-Form) in Wasser durchgeführt. Hier konnte bislang auf eine chromatographische Vorreinigung auf Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol als Eluent nicht verzichtet werden. Die abschließende Endreinigung erfolgte erneut durch Umkristallisation.

Somit wurde eine Synthese von 6-Desoxy-D-glucopyranose entwickelt, die problemlos im größeren Maßstab durchgeführt werden kann und die Zielverbindung in akzeptabler Gesamtausbeute liefert. Die kritische Auseinandersetzung mit Stoffbilanzen und Umweltverträglichkeit zeigt jedoch noch einige Schwachpunkte der Synthese auf und liefert Ansatzpunkte für weiteren Optimierungsbedarf.

5.4.2 Biokatalytische Synthese von 2-Keto-6-desoxy-D-glucose

Ausgehend von 6-Desoxy-D-glucose (6d-Glucose) wurde in zwei aufeinanderfolgenden biokatalytischen Schritten D-Rhamnose synthetisiert (Schema 10).

Schema 10



Im ersten Schritt katalysiert P2Ox die regioselektive Oxidation von 6d-Glucose zu 2-Keto-6-desoxy-D-glucose (6-Desoxyglucoson). Dieser Dicarbonylzucker konnte bisher wegen der geringen katalytische Effizienz der Wildtyp-P2Ox nur in Kleinstmengen hergestellt (Körper und Freimund 2003; Freimund et al. 1998). Vorteilhaft für die in diesem Projekt geplanten Umsetzungen war der Befund, dass P2OxB2H 6d-Glucose mit 25-fach höherer Effizienz umsetzte als P2Ox und dass die neu konstruierte P2OxB2H1 eine weitere Steigerung um den Faktor 2,4 brachte (s. Tabelle 1).

Aufbauend auf den Ergebnissen der Biokonversionen mit L-Sorbose und des *Downstream Processings*, wurde ein Umsatz von 6d-Glucose in wässriger Reaktionslösung durchgeführt und der pH-Wert mit einer $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -Lösung titriert. Da P2OxB2H1 gegenüber 6d-Glucose eine ca. 6-fach höhere katalytische Effizienz (k_{cat}/K_m) als gegenüber L-Sorbose besitzt, war das Problem der Enzymmenge für derartige Umsetzungen (Abbildung 7) nicht relevant. In der dargestellten Biokonversion wurden 4,1 g (25 mmol) 6d-Glucose mit einem Enzymeinsatz von 0,2 U/mmol 6d-Glucose innerhalb von 31/2 h vollständig umgesetzt. Somit ergäbe sich für den Umsatz von 1 mol 6d-Glucose (164 g) ein Bedarf von nur 200 U P2OxB2H1.

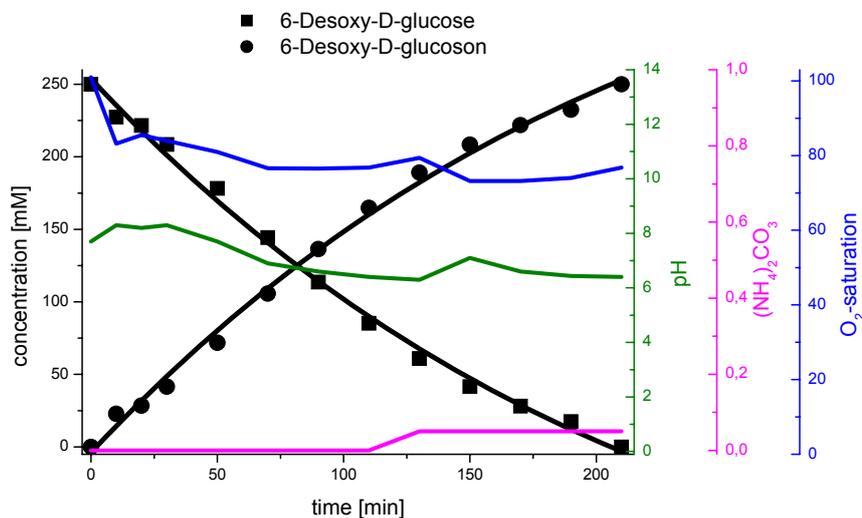


Abbildung 7. Umsetzung von 6-Desoxy-D-glucose (■) zu 2-Keto-6-desoxy-D-glucose (●) mit P2OxB2H1 Enzymreaktor bei 22 °C. Der Umsatz wurde in 100 mL Wasser als Reaktionsmedium durchgeführt, das 4,1 g 6d-Glucose, 5 U P2OxB2H1 und 20 kU Rinderleber Katalase (Sigma) enthielt. Begast wurde mit 0,5 vvm Sauerstoff.

Die Analytik des Reaktionsverlaufs zeigte, dass 6d-Glucose quantitativ zu 6d-Glucoson umgesetzt wurde, was durch NMR-spektroskopische Analyse (Freimund et

al. 1998) bestätigt wurde. Die Aufreinigung des 6d-Glucosons erfolgte wie für 5KF über Ultrafiltration und Gefriertrocknung zum Feststoff mit einer Ausbeute von 88%. Der Feststoff ist weiß gefärbt und hygroskopisch (Abbildung 8).



Abbildung 8. 6-Desoxy-D-glucoson nach Gefriertrocknung.

5.4.3 Biokatalytische Synthese von D-Mannose (Vorversuche)

Zur Optimierung der Biokonversionen wurden Voruntersuchungen mit AFR-A13G und dem Substrat D-Glucoson an Stelle von 6-Desoxy-D-glucoson (6d-Glucoson) durchgeführt. D-Glucoson wird von AFR streoselektiv und quantitativ zu D-Mannose reduziert (Kühn et al., 2006; Dambe et al., 2006). Als Cofaktor für die Reduktion von D-Glucoson zu D-Mannose diente NADPH, das mit Hilfe von Glucose-Dehydrogenase durch Dehydrierung von D-Glucose zu D-Gluconolacton regeneriert werden kann (Abbildung 9).

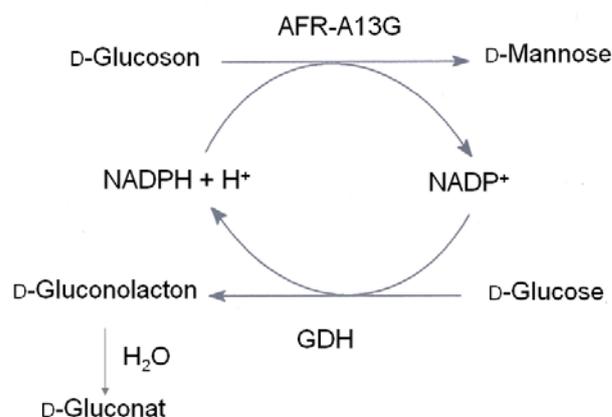


Abbildung 9. Prinzip der Synthese von D-Mannose (D-Rhamnose) durch Cosubstrat-Regenerierung.

Da die kinetischen Konstanten der AFR-A13G für D-Glucoson und 6d-D-Glucoson sehr ähnlich waren (Tabelle 2), konnte die Prozessentwicklung gut mit D-Glucoson simuliert werden.

Tabelle 2. Kinetische Parameter der AFR-A13G für D-Glucoson und 6-Desoxy-D-Glucoson

Kinetische Parameter	D-Glucoson	6-Desoxy-D-glucoson
V_{max} [$\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$]	135	161,3
K_m [mM]	$11 \pm 0,1$	$17,02 \pm 0,8$
k_{cat}/K_m [$\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]	7 159	5 528

Die Abbildung 10 zeigt exemplarisch eine Biokonversion von D-Glucoson zu D-Mannose mit Cosubstrat-Regenerierung im Enzymreaktor. Um sicherzustellen, dass D-Glucoson quantitativ umgesetzt wird, wurde D-Glucose im Überschuss zugesetzt.

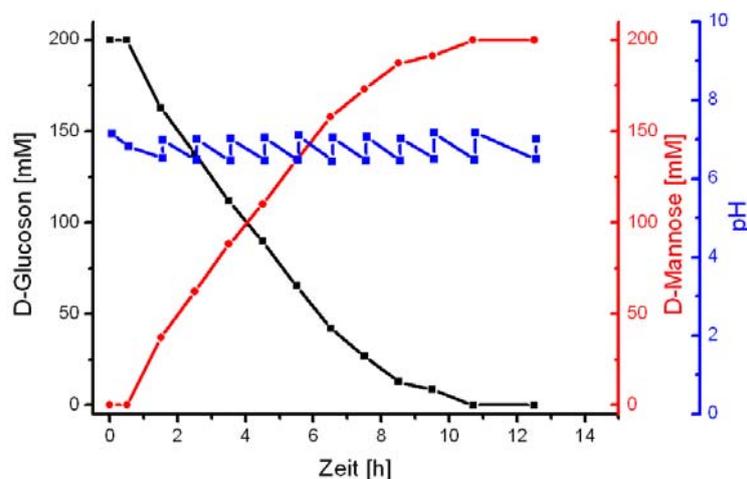


Abbildung 10. Umsetzung von D-glucoson (■) zu D-Mannose (■) mit AFR-A13G Enzymreaktor bei 30 °C. Der Umsatz wurde in 20 mL 20 mM BisTris (pH 6,5) als Reaktionsmedium durchgeführt, das folgende Komponenten enthielt: NADPH, 0,0012 mmol; NADP⁺, 0,024 mmol; D-Glucoson, 4 mmol; D-Glucose, >4 mmol; AFR-A13G, 200 U; GDH, 100 U. Der pH wurde mit NaOH-Lösung titriert.

Nach dem Umsatz wurde die in der Reaktionslösung verbliebene D-Glucose mit Glucose-Oxidase zu Gluconsäure oxidiert. Danach wurde D-Mannose mittels Ultrafiltration und Ionenaustauschchromatographie des Filtrats aufgereinigt.

5.4.3 Biokatalytische Synthese von D-Rhamnose

Aufbauend auf den in den Voruntersuchungen erzielten Ergebnissen wurden Umsetzungen mit 6d-Glucoson durchgeführt. Die Abbildung 11 zeigt beispielhaft einen derartigen Umsatz. Die Verringerung der Reaktionszeit wurde mit relativ hohen Enzymkonzentrationen erkauf. Da AFR gegenüber 6d-Glucoson eine geringere Stereoselektivität als gegenüber D-Glucoson besitzt (Kühn et al., 2006) konnte davon ausgegangen werden, dass im Verlauf des Umsatzes beide Enantiomere, 6d-Glucose und 6d-Mannose (D-Rhamnose), als Reaktionsprodukte entstehen (Abbildung 11). Der dargestellte Umsatz von 4 mmol (0,65 g) 6-Desoxy-D-glucoson war quantitativ und ergab 1,8 mmol (0,36 g) 6d-glucose und 1,2 mmol (0,29 g) 6d-mannose (D-Rhamnose).

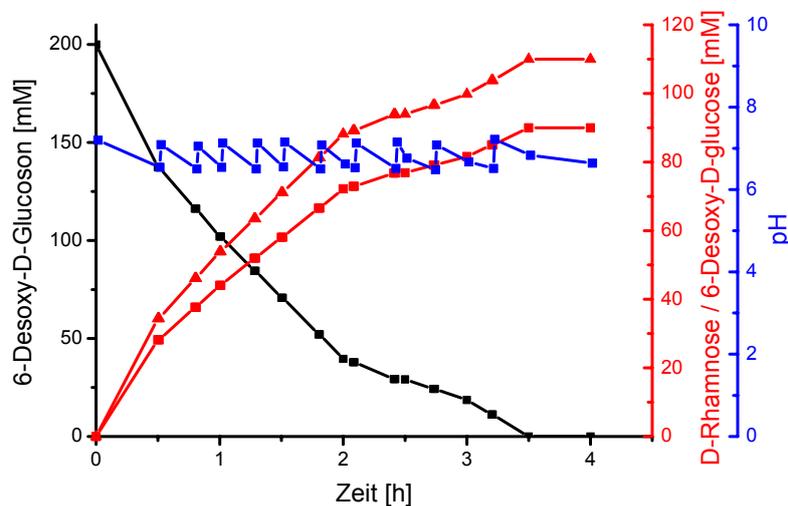


Abbildung 11. Umsetzung von 6-Desoxy-D-glucoson (■) zu D-Rhamnose (■) und 6d-Glucose (▲) mit AFR-A13G Enzymreaktor bei 30 °C. Der Umsatz wurde in 20 mL 20 mM BisTris (pH 6,5) als Reaktionsmedium durchgeführt, das folgende Komponenten enthielt: NADPH, 0,0012 mmol; NADP⁺, 0,024 mmol; 6d-Glucoson, 4 mmol; D-Glucose, >4 mmol; AFR-A13G, 800 U; GDH, 250 U. Der pH wurde mit NaOH-Lösung titriert.

Das für D-Mannose ausgearbeitete *Downstream Processing* konnte auch für D-Rhamnose angewandt werden, da 6d-Glucose mit Glucose-Oxidase zu 6d-Gluconsäure oxidiert werden konnte (Pazur et al., 1964). Bezogen auf den Anteil in der Reaktionslösung wurde D-Rhamnose als gelbliche harzige Flüssigkeit mit einer Ausbeute von 80% erhalten.

5.4.4 Proteinengineering der Anhydrofructose-Reductase (AFR-A13G).

5.4.4.1 Konstruktion von thermostabilen AFR-Varianten

AFR besitzt eine geringe Thermostabilität, mit der die operative Stabilität korreliert. Unter Bedingungen der Biokonversion bei 30°C und pH 7,0 hat AFR eine Halbwertszeit von ~ 2h (Kühn et al., 2006). Da Biokonversionen in Regel über längere Zeitspannen laufen, ist ein vollständiger Umsatz nur durch Zugabe unwirtschaftlich großer Enzymmengen möglich. Verschiedene Ansätze durch *directed evolution* thermostabilere AFR-Varianten zu erfassen, waren bisher nicht erfolgreich. Deshalb wurde ein neuer Ansatz verfolgt dem die Methodik der Iterativen Sättigungsmutagenese (ISM) zugrunde liegt (Reetz und Carballeira 2007). Mit Hilfe des Programms B-Fitter wurden 9 Aminosäuren der AFR mit hohem B-Faktor identifiziert, die eine hohe Flexibilität der Enzymstruktur bewirken und dadurch die Thermostabilität des Enzyms ungünstig beeinflussen (Reetz und Carballeira 2007). Bei AFR waren entsprechende Aminosäuren in peripheren *loop*-Strukturen lokalisiert (Abbildung 12, links).

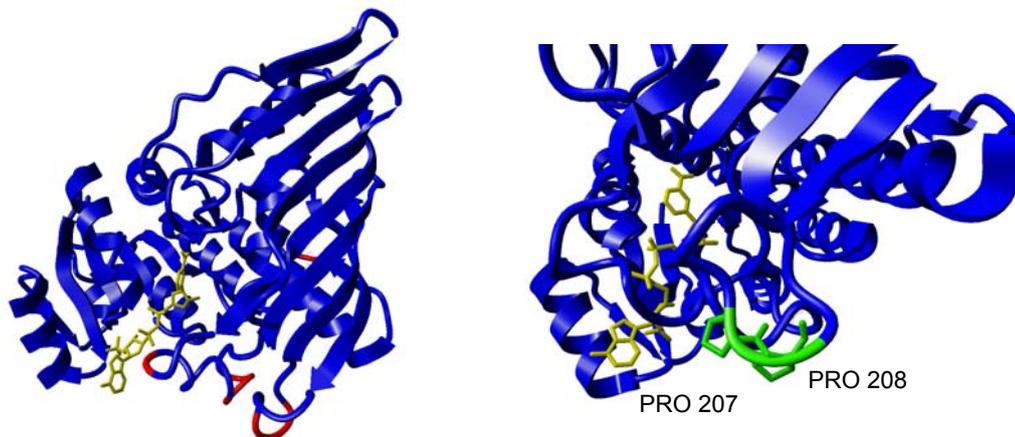


Abbildung 12. AFR-Monomer aus *S. morelense* S-30.7.5. Aminosäuren mit den höchsten B-Faktoren rot gekennzeichnet. NADPH gelb dargestellt (links). Ausschnitt aus dem Bändermodell der Variante A13G-K207P-E208P (rechts). Das Modell wurde anhand der Strukturdaten (Dambe et al 2006) mit YASARA Model erstellt.

Der Austausch dieser Aminosäuren in AFR-A13G mittels ISM führte im Screening zu drei Varianten mit verbesserter Thermostabilität (Tabelle 3). Bei der Variante mit der größten Stabilität (AFR-A13G-K207P-E208P) die in einem *loop* liegenden Aminosäuren Lys 207 und Glu 208 jeweils durch Prolin ersetzt (Abbildung 12, rechts).

Tabelle 3. Vergleich der Rest-Aktivitäten verschiedener AFR-Varianten nach 10 min Inkubation bei 45°C

AFR-Variante	Rest-Aktivität [%] (10 min bei 45°C)
A13G	3,6
A13G-K207P-E208P	30,4
A13G-E165N-R166K	19,6
A13G-G209Q	13,4

Proline verleihen Proteinen eine höhere Rigidität, da sie die Zahl der einnehmbaren Konformationen des Peptid-Rückgrates verringern und die *long-range*-Interaktionen stabilisieren (Klein-Seetharaman et al., 2002; Prajapati et al., 2007). Bei der Variante A13G-E165N-R166K waren wiederum zwei benachbarte Aminosäuren ausgetauscht, die ebenfalls innerhalb einer *loop*-Struktur an der Enzymoberfläche der AFR lagen (nicht dargestellt). Die Seitenketten von Glu165 und Arg166 ragen aus dieser *loop*-Struktur heraus und können dadurch keine stabilisierenden Wasserstoffbrücken mit benachbarten Aminosäureresten bilden.

Die neu eingeführten Aminosäuren Asp165 und Lys166 sind weniger exponiert und ermöglichen so eine dichtere Packung und dadurch eine Stärkung der *long-range*-Interaktionen (Klein-Seetharaman et al., 2002). Außerdem bildet die Aminogruppe von Asp165 eine Wasserstoffbrücke mit der Carbonylgruppe des Peptidrückgrates von Gly161 und die Aminogruppe von Lys166 eine Wasserstoffbrücke mit der Carboxygruppe des Glu168 aus (nicht dargestellt), so dass sich auch bei dieser AFR-Variante eine höhere Stabilität ergab. Bei der Variante A13G-G209Q war die Substitution ebenfalls in einem loop (nicht dargestellt) und führte wahrscheinlich deshalb zu einer besseren Proteinstabilität, da an der Enzymoberfläche eine unpolare durch eine polare Aminosäure ersetzt wurde (Hendrix und Welker 1985, Warren und Petsko 1995).

Tabelle 4. Kinetische Charakterisierung der AFR-Varianten

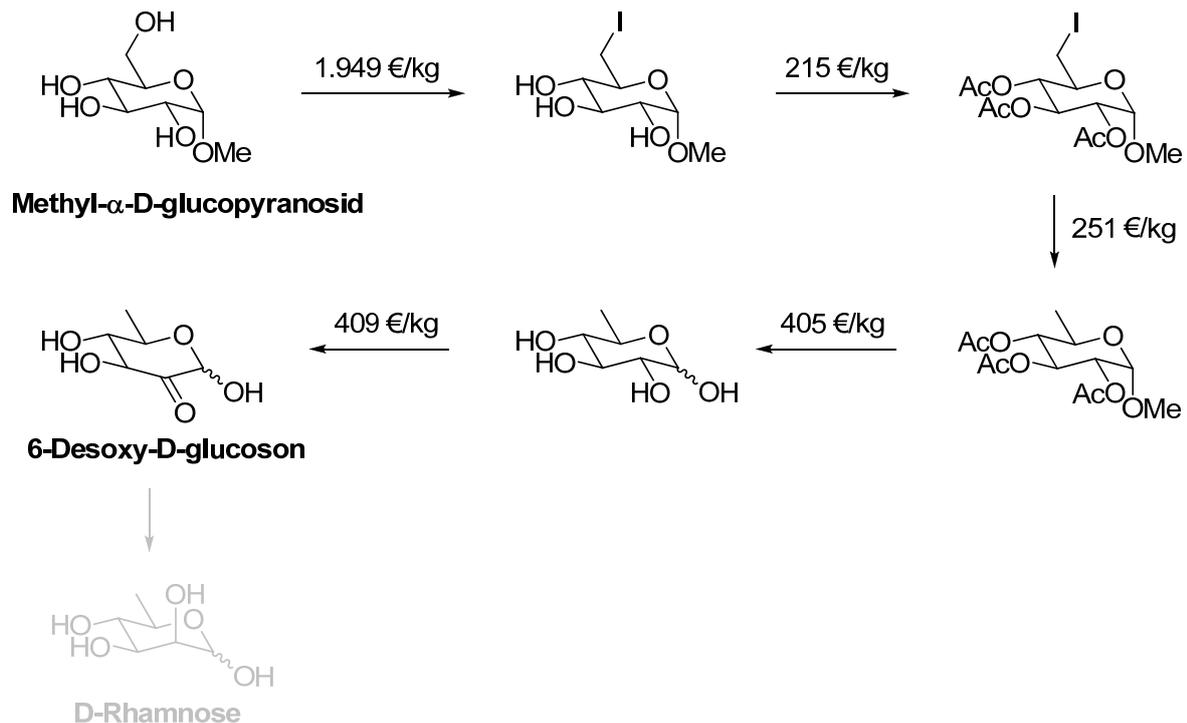
AFR-Variante	K_m [mM]	v_{max} [U/mg]	k_{cat} [sec ⁻¹]	k_{cat}/K_m [M ⁻¹ ·s ⁻¹]
A13G	8,3 ± 0,15	803,6	470	56600
A13G-K207P-E208P	6,6 ± 0,21	766,4	448	68000
A13G-E165N-R166K	2,1 ± 0,17	140,4	82	39000
A13G-G209Q	2,9 ± 0,12	701,5	410	141600

Die kinetische Charakterisierung der AFR-Varianten (Tabelle 4) ergab, dass sich bei allen Varianten gegenüber dem Ausgangsstamm die K_m -Werte verbessert hatten. Da sich mit Ausnahme von A13G-E165N-R166K die k_{cat} -Werte nicht signifikant verändert hatten, ergaben sich daraus bessere katalytische Effizienzen für zwei thermostabilere AFR-Varianten. Im Prinzip stand mit AFR-A13G-K207P-E208P ein hochaktives und im Vergleich zu AFR-A13G bereits deutlich stabileres Enzym für Biokonversionen zur Verfügung.

6. Wirtschaftlichkeitsbetrachtung

6.1 Synthese von D-Rhamnose

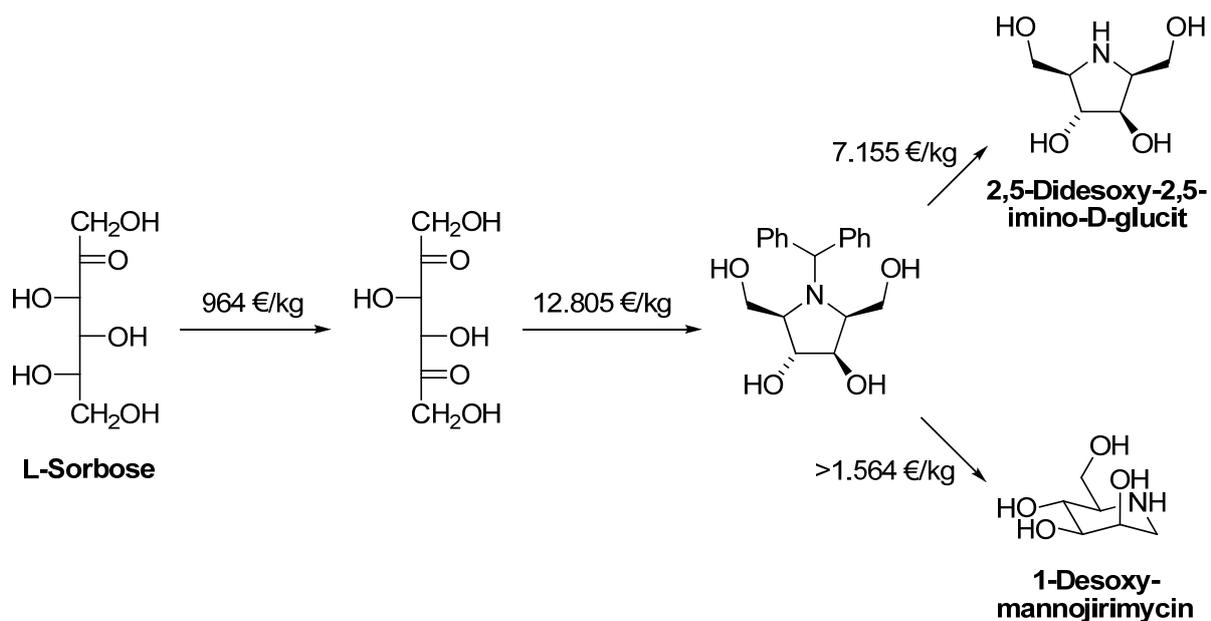
D-Rhamnose ist eine Komponente O-spezifischer Antigene in zahlreichen pathogenen Gram-negativen Bakterien und besitzt somit Potenzial für die Entwicklung von Oligosaccharid-Impfstoffen (Fauré et al. 2007). Des Weiteren enthalten Oligosaccharide aus der Artischocke (*Cynara scolymus*) D-Rhamnose; daraus resultiert eine potentielle Anwendung als Antiallergikum und als Bestandteil in sogenanntem „Health Food“. Ester der D-Rhamnose werden als entzündungshemmende Agenzien und Sonnenschutzfaktoren in Kosmetika und pharmazeutischen Präparaten eingesetzt. Trotz der Anwendungsbreite dieser Substanz gibt es bis heute nur einen kommerziellen Anbieter (Carbosynth Ltd, UK), der D-Rhamnose in Kleinstmengen führt. Die Entwicklung einer effektiven Synthese war demzufolge in hohem Maße erstrebenswert, um das Produkt am Markt platzieren zu können. Es gibt ein chemisches Verfahren, das direkt von D-Mannose ausgeht (Nishio et al., *Carbohydr. Res.* **1996**, 280, 357–363), jedoch ist diese um den Faktor 1.000 teurer als D-Glucose. Eine weitere Publikation behandelt die chemische Konfigurationsumkehr an C-2 der 6-Desoxy-D-glucose (Yano, Yoshikawa et al., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1986**, 1001–1003), jedoch wird dazu ein teurer Schwermetallkatalysator benötigt, dessen Verwendung heute nicht mehr den Prinzipien der *Grünen Chemie* entspricht (Anastas und Warner, 1998).



Prinzipiell verläuft die im Projektantrag skizzierte Synthese von D-Rhamnose über eine chemische Synthese des *gluco*-konfigurierten Derivats mit anschließender biotechnologischer Konfigurationsumkehr an C-2 zur *manno*-konfigurierten D-Rhamnose. Dieser Syntheseweg ist den bisher bekannten sowohl in Bezug auf Wirtschaftlichkeit als auch Umweltverträglichkeit überlegen, wenn die beiden biokatalytischen Teilschritte sehr gute Ausbeuten liefern. Das traf zwar für die Synthese des 6-Desoxy-D-glucosons nicht aber auf die nachfolgende Reduktion zu D-Rhamnose zu. Derzeit ist eine wirtschaftlich sinnvolle Synthese der D-Rhamnose nicht möglich, so dass wir diesbezüglich keine Ökobilanz erstellt haben.

6.2 Synthese von pharmarelevanten Iminozuckern

Aus der Klasse der Iminozucker gibt es eine Reihe hochpotenter Glucosidase-Inhibitoren, beispielsweise das 2,5-Didesoxy-2,5-imino-D-glucit oder das 1-Desoxymannojirimycin (Asano 2009). Das daraus resultierende pharmakologische Potenzial macht diese Verbindungen zu Vertretern von hohem kommerziellem Interesse, die bislang nur in Milligrammmengen zu Preisen von ca. 10 €/mg vertrieben werden. Der Projektantrag sah für diese Iminozucker eine Synthese über ein biotechnologisch/chemisches Verfahren ausgehend von L-Sorbose vor, das für alle Vertreter über dieselbe polyhydroxylierte Pyrrolidin-Zwischenstufe verläuft.



Aus dem Schema wird deutlich, dass das entwickelte Verfahren auf dem Papier wirtschaftlich noch nicht mit den etablierten Verfahren konkurrieren kann, da der Schritt der chemischen Synthese des Pyrrolidin-Derivats weiterhin optimiert werden muss. Da es eine gemeinsame Zwischenstufe in den Synthesen verschiedenster Azazucker ist, und sich dadurch ein Marktpotenzial ergibt, wurde und wird dieses Synthesekonzept weiterentwickelt und die Ökoeffizienz der Synthese entsprechend bilanziert. 2,5-Dideoxy-2,5-imino-D-glucitol wurde als erstes Produkt in das Portfolio von *toroma organics* aufgenommen.

8. Diskussion

Kohlenhydrate gelten als grüne Rohstoffe mit einem enormen Potenzial für die Chemische Industrie (Lichtenthaler und Peters, 2004). Die chemische Umwandlung von Kohlenhydraten zu höherwertigen Produkten basiert bis heute auf einer aufwändigen Schutzgruppen- und Aktivierungs-Chemie, die den Einsatz großer Mengen Lösemittel impliziert. Seit dem Konzept der „Grünen Chemie“, das in 1990er Jahren entwickelt und dessen Prinzipien von Anastas und Warner (1998) formuliert wurden, werden bevorzugt selektive Katalysatoren in die Synthesen einbezogen. Wegen der zahlreichen Hydroxylfunktionen gleicher bzw. ähnlicher Reaktivität in Kohlenhydraten eignen sich insbesondere Biokatalysatoren für gezielte (regioselektive) Oxidationsschritte. Die so erzeugte Carbonylfunktion unterscheidet sich von den Hydroxylfunktionen und kann deshalb für Derivatisierungsreaktionen

genutzt werden. Es ist uns gelungen, mit P2OxH2H1 einen sehr effektiven und Prozess-robusten Biokatalysator zu entwickeln, mit dem die Dicarboxylzucker 5-Keto-D-fructose und 6-Desoxyglucoson, Zwischenprodukt für die Synthese von Pyrrolidin-Iminozuckern und D-Rhamnose, im Kilogramm-Maßstab hergestellt werden können. Die Ergebnisse der verfahrenstechnischen Entwicklungen sprechen für die homogene Katalyse und *in situ* Sauerstoffgenerierung aus H₂O₂. Zwar wurde in früheren Arbeiten mit immobilisierter P2Ox eine akzeptable operative Stabilität erzielt, die aber wegen der geringen Beladungsdichte des Trägers mit unbefriedigenden Umsatzkinetiken korrelierten (Huwig et al. 1994). Demgegenüber zeigen neuere Untersuchungen mit P2Ox aus *Trametes multicolor* zeigen, dass sich mit Agarose- und Acryl-basierten Trägern prozesstaugliche Beladungsdichten erzielen lassen (Sukyai et al. 2008). Da aber Oxidasen einer inhärenten, durch reaktive Sauerstoffspezies bewirkten Reaktionsinaktivierung unterliegen (Kleppe 1966, Nidetzky 2007; Pollegioni et al. 2008; Wong et al. 2008), stellt sich die Frage, ob eine vorherige Immobilisierung des Enzyms an teure Träger wirtschaftlich sinnvoll ist, oder ob der Biokatalysator nach dem Prozess verworfen werden soll. Im Falle guter Verfügbarkeit des Biokatalysators, erscheint letztere - auch bei industriellen Prozessen - die bevorzugte Option zu sein.

Was die chemischen Teilschritte der Synthesen betrifft, so besteht weiterhin Entwicklungsbedarf bei der doppelt reduktiven Aminierung der Keto-D-fructose zum Pyrrolidinderivat. Es handelt sich dabei um eine sehr komplexe Reaktion, bei deren Erstbeschreibung (Baxter und Reitz, 1994) eher das Prinzip als Ausbeuten und Ökoeffizienz im Vordergrund standen. Grundsätzlich andere Wege zu gehen erscheint bei Synthesen derartiger Verbindungen bisher keine Option zu sein (Blanco et al. 2008 und 2009; Sletten und Liotta, 2006).

Bei der Synthese der D-Rhamnose besteht weiterhin Optimierungsbedarf bei den chemischen Teilschritten zu 6-Desoxy-D-glucose. Dennoch ist bereits heute den literaturbekannten Synthesen in allen Belangen überlegen und auch in den größeren Maßstab übertragbar. Da sich 6-desoxy-D-Glucose biokatalytisch vollständig zu 6-Desoxy-D-glucoson umsetzen lässt ist die Bilanz bis dahin positiv. Wegen der geringen Ausbeute an D-Rhamnose im anschließenden biokatalytischen Reaktionsschritt wird das Gesamtverfahren unwirtschaftlich. Eine Verbesserung der Enantioselektivität der AFR gegenüber 6d-Glucoson mit Methoden des *Proteinengineerings* war im Rahmen des Projektes nicht mehr möglich. Da D-

Glucoson stereoselektiv zu D-Mannose umgesetzt wird (Kühn et al. 2006; Dambe et al., 2006), scheint die Methylgruppe in 6d-Glucoson die Enantioselektivität der Reduktionsreaktion zu beeinflussen (Yeung et al. 2003). Da sich auch die Chemie mit der Problematik der selektiven Reduktion von 2-Ketoaldosen befasst (Lichtenthaler et al. 2003), wäre die Weiterentwicklung der AFR zu einem 6d-Glucoson stereoselektiv reduzierenden Biokatalysator erstrebenswert. Damit könnte D-Rhamnose, für den toroma sehr gute Marktchancen sieht wirtschaftlich und mit einer verbesserten Ökobilanz produziert werden.

9. Kooperation

Unmittelbar nach Beginn des Projektes wurde entsprechend dem Arbeitsprogramm mit der Kooperation begonnen. Glycotec entwickelte ein vorläufiges Biokonversionsverfahren, um toroma mit ausreichenden Mengen 5-Ketofructose zu versorgen. Toroma startet ihrerseits mit der Erarbeitung einer Synthese für 6d-Glucose. Nach Grundlegenden Untersuchungen zur besseren Verfügbarkeit der P2Ox wurde die Verfahrenstechnik (AK Heinzle) in die Prozessentwicklung einbezogen, die auch hinsichtlich der Bewertung der Ökoeffizienz beteiligt war.

10. Literatur

- Anastas P, Warner J (1998) Green Chemistry: Theory and Practice, Oxford University Press.
- Asano M (2009) Review. Sugar-mimicking glycosidase inhibitors: bioactivity and application. Cell Mol Life Sci 66:1479-92
- Bannwarth M, Bastian S, Heckmann-Pohl DM, Giffhorn F, Schulz GE (2004) Crystal structure of pyranose 2-oxidase from the white-fungus *Peniophora* sp. Biochemistry 43:11683-11690
- Bannwarth M, Heckmann-Pohl DM, Bastian S, Giffhorn F, Schulz GE (2006) Reaction geometry and thermostable variant of pyranose 2-oxidase from the white-rot fungus *Peniophora* sp. Biochemistry 45:6587-6595
- Basséguy R, Délécouls K, Bergel A (2004) Glucose oxidase catalysed oxidation of glucose in a dialysis membrane electrochemical reactor (D-MER). Bioprocess Biosyst Eng 26:165-168
- Bastian S, Rekowski MJ, Witte K, Heckmann-Pohl DM, Giffhorn F (2005) Engineering of pyranose 2-oxidase from *Peniophora gigantea* towards improved thermostability and catalytic efficiency. Appl Microbiol Biotechnol 67:654-663
- Baxter EW, Reitz AB (1994) Expeditious synthesis of azasugars by the double reductive amination of dicarbonyl sugars. J Org Chem 59:3175-85
- Biwir A, Heinzle E (2004) Environmental Assessment in Early Process Development. J Chem Technol Biotechnol, 79:597-609
- Blanco O, Pato C, Ruiz M, Ojea V (2008) Access to pyrrolidine imino sugars via tin(II)-mediated aldol reactions of bisbislactim ethers: synthesis of 2,5-dideoxy-2,5-imino-D-glucitol. Org Biomol Chem 6: 3967-69
- Blanco O, Pato C, Ruiz M, Ojea V (2009) Synthesis of pyrrolidine homoazasugars 3,4-dihydroxy-5-hydroxymethylprolines using aldol additions of metalated bisbislactim ethers to 2,4-O-ethylidene-D-erythroses. Org Biomol Chem 7: 2310-21

- Dambe TR, Kühn AM, Giffhorn F, Scheidig AJ (2006) Crystal structure of NADP(H) dependent 1,5-anhydro-fructose reductase from *Sinorhizobium morelense* at 2.2 Å resolution: construction of a NADH-accepting mutant and its application in rare sugar synthesis. *Biochemistry* 45:10030-10042
- Danneel HJ, Rössner E, Zeeck A, Giffhorn F (1993) Purification and characterization of a pyranose oxidase from the basidiomycete *Peniophora gigantea* and chemical analysis of its reaction products. *Eur J Biochem* 214:795-802
- Dorscheid S (2009) Molekulare Evolution der Pyranose-2-Oxidase aus *Peniophora gigantea* zur effizienten Anwendung in der Biokatalyse. *Dissertationsarbeit, Universität des Saarlandes*
- Fauré R, Shiao TC, Lagnoux D, Giguère D, Roy R (2007) *En route* to a carbohydrate-base vaccine against *Burkholderia cepacia*. *Org Biomol Chem* 5: 2704-08
- Freimund S, Giffhorn F, Huwig A, Köpper S (1998) Rare keto-aldehydes from enzymatic oxidation: substrates and oxidation products of pyranose oxidase. *Chem Eur J* 4:2442-2455
- Freimund S, Köpper S (2004) The composition of 2-keto aldehydes in organic solvents as determined by NMR spectroscopy. *Carbohydr Res* 339:217-220
- Guex N, Peitsch MC (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18:2714-2723
- Hartree EF (1972) Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* 48:422-427
- Heinzle E, Biwer A, Eissen M, Abdul Kholiq M (2006) Bewertung biotechnologischer Prozesse in frühen Phasen der Entwicklung hinsichtlich Risiken bezüglich Ökologie, Sicherheit und Gesundheit. *Chemie Ing Tech* 78:301-305
- Heinzle E, Hungerbühler, K (1997) Integrated process development: The key to future production of chemicals. *Chimia* 51:176-183
- Heinzle, E., Weirich, D., Brogli, F., Hoffmann, V., Koller, G., Verduyn, M.A., Hungerbühler, K. (1998) Ecological and Economic Objective Functions for Screening in Integrated Development of Fine Chemical Processes. I. Flexible and Expandable Framework Using Indices. *Ind. Eng. Chem. Res.* 37:3395-3407
- Hendrix JD, Welker NE (1985) Isolation of a *Bacillus stearothermophilus* mutant exhibiting increased thermostability in its restriction endonuclease. *J. Bacteriol.* 162(2): 682-692
- Huwig A, Danneel HJ, Giffhorn F (1994) Laboratory procedures for producing 2-keto-D-glucose, 2-keto-D-xylose and 5-keto-D-fructose from D-glucose, D-xylose, and L-sorbose with immobilized pyranose oxidase of *Peniophora gigantea*. *J Biotechnol* 32:309-315
- Klein-Seetharaman J, Oikawa M, Grimshaw SB, Wirmer J, Duchardt E, Ueda T, Imoto T, Smith LJ, Dobson CM, Schwalbe H (2002) Long-range interactions within a nonnative protein. *Science* 295:1719-22
- Kleppe K (1966) The effect of hydrogen peroxide on glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochemistry* 5:139-143
- Köpper S, Freimund S (2003) The composition of keto aldehydes in aqueous solution as determined by NMR spectroscopy. *Helv Chim Acta* 86:827-843
- Krieger E, Koraimann G, Vriend G (2002) Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA—a self-parameterizing force field. *Proteins* 47:393-402
- Kühn A, Yu S, Giffhorn F (2006) Catabolism of 1,5-anhydro-D-fructose in *Sinorhizobium morelense*: The discovery, characterization and overexpression of a new 1,5-anhydro-D-fructose reductase and its application in the sugar analysis and rare sugar synthesis. *Appl Environ Microbiol* 72:1248-1257
- Kyte J Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157:105-132
- Laemmli U (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lee S (1996) High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* 14: 98-105
- Lichtenthaler FW, Peters S (2004) Carbohydrates as green raw materials for the chemical industry. *CR Chimie* 7: 65-90
- Lichtenthaler FW, Lergenmüller M, Peters S, Varga Z (2003) *manno-* versus *gluco-*Selectivity in reduction of 2-keto-β-D-*arabino*-hexopyranosides. *Tetrahedron: Asymmetry* 14: 727-736
- Maresova H, Palyzova A, Kyslik P (2007) The C-terminal region controls correct folding of genus *Trametes* pyranose 2-oxidases. *J Biotechnol* 130:229-235
- Mogk A, Mayer MP, Deuerling E (2001) Molekulare Chaperone und ihr biotechnologisches Potential. *Biologie in unserer Zeit.* 31: 182-192

- Nidetzky B (2007) Stability and stabilization of D-amino acid oxidase from the yeast *Trigonopsis variabilis*. *Biochem Soc Transact* 35: 1588-1592
- Pazur JH, Kleppe K (1964) The oxidation of glucose and related compounds by glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Biochem* 4: 578-583
- Peters J (1998) Dehydrogenases – Characteristics, design of reactions, conditions and applications. *Biotech. Bioformat.* 1/8a (2): 392-474. Wiley-VCH, Weinheim.
- Pollegioni L, Molla G, Sacchi S, Rosini E, Verga R, Pilone MS (2008) Properties and applications of microbial D-amino acid oxidases: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 78: 1-16
- Prajapati RS et al. (2007) Thermodynamic effects of proline introduction on protein stability. *Protein: Structure, Function, and Bioinformatics* 66: 480-491
- Reetz MT, Carballeira JD (2007) Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes. *Nature* 2(4): 891-903
- Reeves R, Nissen MS. 1999. *Methods in enzymology*. Academic Press Inc, London.
- Riesenberg D, Menzel K, Schulz V, Schumann K, Veith G (1990) High cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli* expressing human interferon alpha 1. *Appl Microbiol Biotechnol* 34: 77-82
- Schlieker C, Bukau B, Mogk A (2002) Prevention and reversion of protein aggregation by molecular chaperones in the *E. coli* cytosol: implications for their applicability in biotechnology. *J Biotechnol* 96: 13-21
- Sletten EM, Liotta LJ (2006) A flexible stereospecific synthesis of polyhydroxylated pyrrolizidines from commercially available pyranosides. *J Org Chem* 71: 1335-43
- Sogabe A, Minami M, Sogabe Y, Emi S. 1994. Glucose dehydrogenase from *Pseudomonas*. US Pat. Appl. 5298411
- Sukayi, P., Rezac, T., Lorenz, C., Mueangtoom, K., Lorenz, W., Haltrich, D., Ludwig, R. (2008) Comparing soluble and co-immobilized catalysts for 2-ketoaldose production by pyranose 2-oxidase and auxiliary enzymes. *J Biotechnol* 135: 281-290
- Truesdale GA, Downing AL, Lowden GF (1955) The solubility of oxygen in pure water and sea water. *J Appl Chem* 5:53-62
- Warren GL, Petsko GA (1995) Composition analysis of α -helices in thermophilic organisms. *Protein Eng.* 8(9): 905-913
- Yeung GFC, Setiadi DH, Chass GA, Csizmadia IG (2003) An exploratory conformational analysis of D and L- β -D-6-deoxyglucose: an *ab initio* and DFT approach. *J Mol Structure (theochem)* 666-667: 393-396

ANHANG

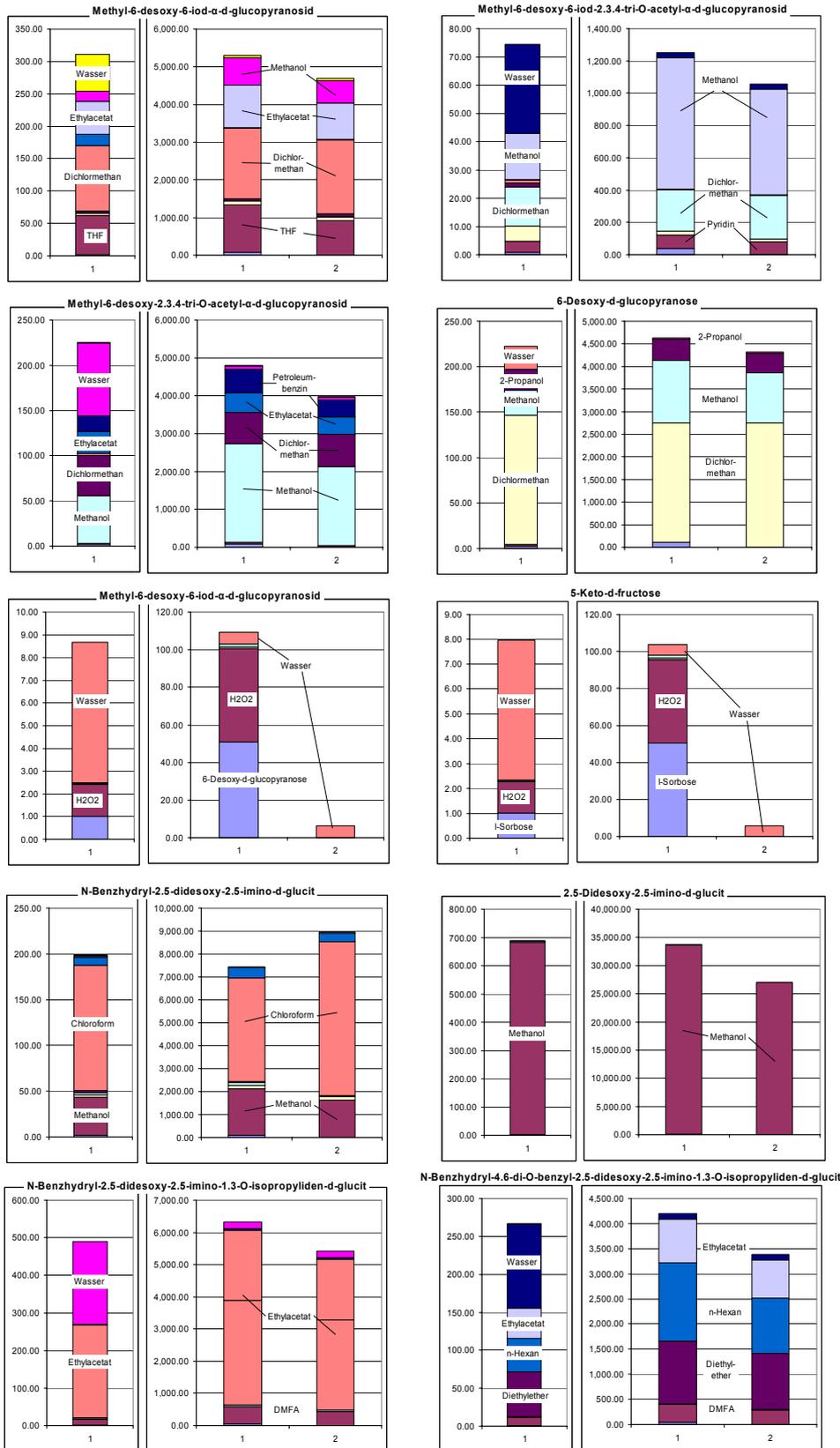


Abbildung Ö1: Massenindices (jeweils linker Balken) und Umweltindices (jeweils rechte Abbildung, Index-Input – linker Balken; Index-Output – rechter Balken) für einzelne Synthesestufen. (Berechnungsmethode Heinzle et al., 2006).

Tabelle Ö1: Stoffe und ihre ABC-Einstufung bezüglich SHE-Risiken gemäß Heinzle et al. (2006)

Name	CAS-#	Compl	Land	Reich	TRisk	Akutox	ChronTox	BioRisk	EcoTox	GWP	ODP	AP	POCP	Geruch	NutrPot	#A
2,2-Dimethoxypropan	77-76-9	B	C	C	A	B	B	C	B	C	C	C	C	C	C	1
Acetanhydrid	108-24-7	B	C	C	B	B	C	C	C	C	C	C	C	B	C	0
Ammoniak	7664-41-7	B	C	C	B	A	A	C	A	C	C	A	C	B	C	4
Argon (Ar)	7440-37-1	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	0
Benzylbromid	100-39-0	B	C	B	C	B	B	C	B	C	C	C	C	C	C	0
Dichlormethan	75-09-2	C	C	C	C	B	A	C	B	B	C	C	A	C	C	2
Diethylether (Ether)	60-29-7	C	C	B	A	B	B	C	C	C	C	C	A	B	C	2
Essigsäure	64-19-7	B	C	C	B	A	C	C	C	C	C	C	C	A	C	2
Ethylacetat	141-78-6	B	C	B	A	B	B	C	C	C	C	C	A	B	C	2
Hexan	110-54-3	C	C	B	A	B	A	C	C	C	C	C	C	C	C	2
Imidazol	288-32-4	B	C	C	C	B	B	C	C	C	C	C	C	C	C	0
Iod	7553-56-2	C	C	C	C	A	B	C	A	C	C	C	C	A	C	2
Isopropanol	67-63-0	C	C	B	A	B	B	C	C	C	C	C	A	B	C	2
Kaliumhydrogensulfat	7646-93-7	C	C	C	C	B	C	C	C	C	C	C	C	C	C	0
Magnesiumsulfat (Heptahydrat)	10034-99-8	B	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	0
Methanol	67-56-1	C	C	C	A	A	A	C	C	C	C	C	A	C	C	3
Natriumchlorid	7647-14-5	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	0
Natriumcyanoborhydrid	25895-60-7	C	C	C	A	A	A	C	A	C	C	C	C	C	C	4
Natriumhydrid	7646-69-7	B	C	C	A	B	C	C	C	C	C	C	C	C	C	1
Natriumhydrogencarbonat	144-55-8	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	0
Natriumsulfat	7757-82-6	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	0
p-Toluolsulfonsäure Hydrat	6192-52-5	B	C	B	C	B	B	C	C	C	C	C	C	C	B	0
Palladium (Pd)	2023568	C	C	C	C	A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	1
Sauerstoff	7782-44-7	C	C	C	C	B	A	C	C	C	C	C	C	C	C	1
Tetrahydrofuran	109-99-9	B	C	C	A	B	B	C	C	C	C	C	C	B	C	1
Trichlormethan	67-66-3	C	C	C	C	A	A	C	A	A	C	C	A	B	C	5
Wasser	7732-18-5	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	0
Wasserstoffperoxid	7722-84-1	B	C	C	A	A	B	C	C	C	C	C	C	C	C	2
Triphenylphosphin	603-35-0	C	C	C	C	A	A	C	A	C	C	C	C	C	C	3
Pyridin	110-86-1	C	C	C	A	B	B	C	B	C	C	C	C	A	C	1
Triethylamin	121-44-8	C	B	C	A	A	C	C	C	C	C	C	C	A	C	3
Kieselguhr	RR-1-7	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	0
N,N-Dimethylformamid	68-12-2	B	C	C	C	A	A	C	C	C	C	C	C	A	C	3

Tabelle Ö3: Input und Output Wichtungsfaktoren für Sicherheit, Gesundheit und Ökologie (SHE) (Heinzle et al., 2006)

Stoff	Input-SHE	Output-SHE
2,2-Dimethoxypropan	20.8	15.6
Acetanhydrid	4.7	3.5
Ammoniak	35.4	42.6
Argon (Ar)	1.0	1.0
Benzylbromid	5.8	4.0
Dichlormethan	18.6	19.4
Diethylether (Ether)	21.1	18.9
Essigsäure	19.3	17.5
Ethylacetat	21.9	18.9
Hexan	35.8	25.3
Imidazol	4.7	3.1
Iod	18.6	26.8
Isopropanol	21.1	18.9
Kaliumhydrogensulfat	2.5	2.1
Magnesiumsulfat (Heptahydrat)	1.7	1.0
Methanol	49.3	39.6
Natriumchlorid	1.0	1.0
Natriumcyanoborhydrid	49.3	45.1
Natriumhydrid	19.3	13.7
Natriumhydrogencarbonat	1.0	1.0
Natriumsulfat	1.0	1.0
p-Toluolsulfonsäure Hydrat	5.8	3.9
Palladium (Pd)	17.1	12.6
Sauerstoff	18.6	13.7
Tetrahydrofuran	20.8	15.1
Trichlormethan	33.2	49.3
Wasser	1.0	1.0
Wasserstoffperoxid	35.4	25.3
Triphenylphosphin	33.2	33.5
Pyridin	20.0	19.4
Triethylamin	34.5	28.0
Kieselguhr	1.0	1.0
N,N-Dimethylformamid	33.9	28.0