

Kontinuierliche katalytische Herstellung von *N*-Acetylactosamin**

Von Guido F. Herrmann, Udo Kragl und Christian Wandrey*

Oligosaccharide rücken aufgrund ihrer Bedeutung als determinante Strukturen von Glycopeptiden und Lipopolysacchariden in den Blickpunkt des Interesses der immunologischen und der pharmakologischen Forschung^[1]. Neben den chemischen Methoden zur Synthese von O-Glycosiden etablieren sich seit einer Dekade auch enzymatische Verfahren^[2]. Mit beiden Ansätzen sind bisher größere Mengen der Zielsubstanzen nur schwer zugänglich^[3]. Der Einsatz von Enzymen als homogene Katalysatoren bei Reaktionen in einem Enzym-Membran-Reaktor hat sich als wertvolles Werkzeug in der organischen Synthese erwiesen^[4]. Bei der enzymkatalysierten Synthese von *N*-Acetylneuraminsäure in einem Enzym-Membran-Reaktor konnte gezeigt werden, daß auf diese Weise eine größere Menge dieser Substanz herstellbar ist^[5].

Wir berichten hier über die enzymkatalysierte kontinuierliche Synthese von *N*-Acetylactosamin 3 (LacNAc) in einem Enzym-Membran-Reaktor. Ebenso wie *N*-Acetylneuraminsäure ist 3 Strukturbestandteil vieler biologisch aktiver Oligosaccharide^[1]. Neben chemischen Synthesen von 3^[6] und Herstellungsmethoden, bei denen 3 Bestandteil höherer Oligosaccharide^[7] ist, beschäftigen sich mehrere Autoren mit dem Einsatz einer Galactosyltransferase (E.C. 2.4.1.38)^[8] zur Synthese von 3. Die bislang geringe Verfügbarkeit dieses Biokatalysators, sein hoher Preis^[9] und die geringe Stabilität des Enzyms erschweren seinen Einsatz in der Synthese. Ein alternativer Biokatalysator ist eine β -Galactosidase (E.C. 3.2.1.23)^[10], insbesondere die β -Galactosidase aus *Bacillus circulans*, die den Zugang zu 3 in hoher Regioisomerenreinheit ermöglicht^[10a].

Abbildung 1 zeigt das Reaktionsschema der hier vorgestellten kontinuierlichen Synthese. Ausgehend von Lactose 1 wird in einer Transgalactosylierung der Galactoseteil von 1 auf den Acceptor *N*-Acetylglucosamin 2 übertragen, und so 3 erhalten (Abb. 1a). In einer Parallelreaktion wird der Galactosyldonor 1 zu Galactose und Glucose 4 hydrolysiert (Abb. 1b). Das Zielprodukt 3 ist auch Substrat der β -Galactosidase und wird in einer Folgereaktion vom Enzym wieder hydrolysiert (Sekundärhydrolyse, Abb. 1c).

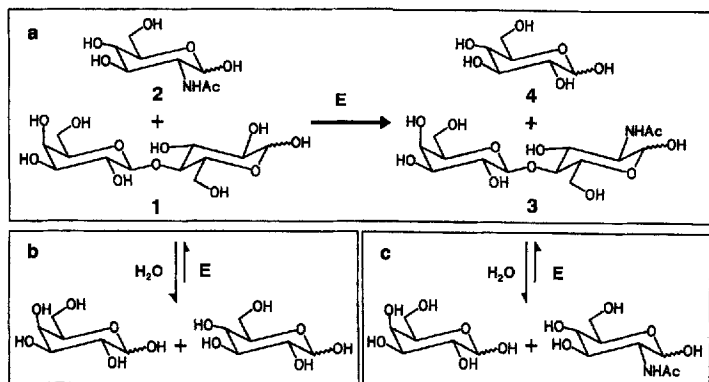


Abb. 1. β -Galactosidase(E)-katalysierte Synthese von *N*-Acetylactosamin 3: a) Transgalactosylierung, b) Hydrolyse des Donors (Parallelreaktion), c) Hydrolyse des Produkts (Sekundärhydrolyse).

[*] Prof. Dr. C. Wandrey, G. F. Herrmann, Dr. U. Kragl
Forschungszentrum Jülich, Institut für Biotechnologie
D-52425 Jülich
Telefax: Int. + 2461/61-3870

[**] Wir danken der Firma Daiwa Kasei K. K., Osaka, Japan, für die Bereitstellung des verwendeten Katalysators.

Untersuchungen zur Enzymstabilität zeigen, daß β -Galactosidase ein sehr stabiles Enzym ist^[11], das auch aufgrund seines geringen Preises und seiner Verfügbarkeit ein nützlicher Katalysator für die Synthese ist^[12]. Durch Variation der Konzentrationsverhältnisse von 1 und 2 konnte das Verhältnis von Transgalactosylierung zu Hydrolyse des Donors, d. h. die Selektivität^[13] der enzymatischen Reaktion, für den kontinuierlichen Prozeß optimiert werden.

Durch die Wahl einer geeigneten Verweilzeit τ der Reaktionslösung im Reaktor konnte die Sekundärhydrolyse des Produkts 3 minimiert werden. Abbildung 2 zeigt den Konzentrations-Zeit-Verlauf der kontinuierlichen β -Galactosidase-katalysierten Synthese von 3 in einem Enzym-Membran-Reaktor über 100 Stunden. Über den Reaktionszeit-

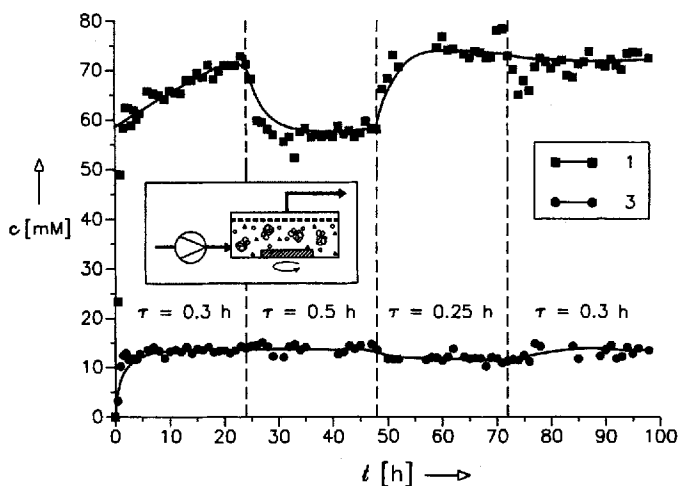


Abb. 2. Konzentrations-Zeit-Verlauf der kontinuierlichen Synthese von *N*-Acetylactosamin 3 in einem Enzym-Membran-Reaktor; Ausgangskonzentration: 120 mM Lactose 1, 300 mM *N*-Acetylglucosamin 2, 100 mM KH_2PO_4 , 2 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5 mM Dithiothreitol; pH 6.8; 25 °C; 3 mg mL^{-1} β -Galactosidase; Verweilzeit: $\tau = 0.25$ h bis $\tau = 0.5$ h.

raum arbeitet das Enzym ohne merkliche Desaktivierung. Die Verweilzeit wurde von $\tau = 0.25$ h bis $\tau = 0.5$ h variiert. Mit zunehmender Verweilzeit steigt die Konzentration von 3 und damit die Ausbeute leicht an^[14]. Der Umsatz von 1 nimmt von 0.37 auf 0.51 zu. Die Selektivität sinkt mit steigendem Umsatz von 0.26 ($\tau = 0.25$ h) auf 0.22 ($\tau = 0.5$ h). Die Raum-Zeit-Ausbeute erreicht bei einer Verweilzeit von $\tau = 0.25$ h einen Wert von $442 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ und sinkt bei einer Verweilzeit von $\tau = 0.5$ h auf einen Wert von $261 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. In 100 h konnten 11.3 g 3 hergestellt werden. Die Raum-Zeit-Ausbeute konnte im Vergleich zu der Galactosyltransferasekatalysierten Synthese von 3 nach Wong et al.^[8a] um den Faktor 130 gesteigert werden. Da die Maßstabsvergrößerung eines Enzym-Membran-Reaktors linear möglich ist^[4,15], wurde somit ein ökonomischer und einfacher Zugang zu größeren Mengen von 3 eröffnet^[16]. Die hier vorgestellte Synthese ist die erste kontinuierliche Synthese eines Disaccharides in homogener Katalyse. Aufgrund des breiten Substratspektrums der β -Galactosidase aus *B. circulans*^[17] ist auch die Synthese von Derivaten von 3 mit dieser vorteilhaften Technik möglich.

Experimentelles

Der Enzym-Membran-Reaktor (Volumen 10 mL (Bioengineering, Wald, Schweiz) mit eingelegter Ultrafiltrationsmembran (YM-3, Amicon, Witten))

und ein vorgeschaltetes Sterilfilter (0.2 µm, Sartorius, Göttingen) werden im Autoklaven 0.3 h bei 120 °C sterilisiert (der Versuchsaufbau entspricht dem in [4] und [5] beschriebenen). Anschließend werden mit der Pufferlösung (100 mM KH₂PO₄, 2 mM MgCl₂ · 6 H₂O, 5 mM Dithiothreitol, pH 6.8) 10 mg Rinderseumaalbumin und 30 mg β-Galactosidase (150 Units) aus *Bacillus circulans* (Daiwa Kasei K. K., Osaka, Japan) in den Reaktor eingespült. 2.6 L sterile Substratlösung (120 mM Lactose 1, 300 mM N-Acetylglucosamin 2 in Pufferlösung) werden nachfolgend mit Verweilzeiten zwischen τ = 0.25 h und τ = 0.5 h durch den Reaktor gepumpt. Dies entspricht Volumenströmen von 40 mL h⁻¹ bis 20 mL h⁻¹. Am Reaktorauslauf werden regelmäßig Proben entnommen und chromatographisch analysiert (HPLC, Säule: ET 250/8/4 Nucleosil 5 NH₂ (Macherey-Nagel, Düren), 250 mm × 4 mm, Laufmittel: 75/25 (v/v) Acetonitril/Wasser, Fließgeschwindigkeit: 1 mL min⁻¹, RI-Detektion, Kapazitätsfaktoren k': N-Acetylglucosamin 0.84, Galactose 1.26, 3 2.09, Lactose 3.09). Zur Produktisolierung wurde die Lösung (Gehalt an 3: 11.3 g) auf 0.68 L eingeeengt. Zur Charakterisierung des Produkts wurde ein kleiner Teil dieser Lösung (0.02 L) an 2/1 (w/w) Aktivkohle (Darco, 20–40 mesh)/Celite AFA (38 cm × 3.5 cm, Eluent: H₂O mit 0%–10% (v/v) Ethanol, 0.5 bar) chromatographiert. Die Fraktionen von 3 wurden gesammelt und lyophilisiert. 0.19 g 3 wurden isoliert. Die gaschromatographische Analyse (Säule: OV1 (Macherey-Nagel, Düren), 25 m × 0.25 mm, He, Temperatur: 275 °C, Silylierung analog [18]) zeigt als Nebenprodukt 4.7% N-Acetylallo-lactosamin (Galβ(1,6)GlcNAc) (Kapazitätsfaktoren k': 3 5.00/5.35, Allo-3 3.65/4.24). Korrekte Elementaranalyse. [α]_D²⁰,_c = 25.38 (c = 0.1 in H₂O). Das ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, D₂O, [D₄]DSS [3-(Trimethylsilyl)-1-propansulfonsäure], δ = 2.04 (3H, s, NHAc, GlcNAc), 4.47 (1H, d, J_{1,2} = 7.5 Hz, H1, Gal), 5.2 (1H, s, H1, GlcNAc)) und das 50 MHz-¹³C-NMR-Spektrum für 3 stimmen mit den Literaturdaten [8a, 10d] überein.

Eingegangen am 14. April 1993 [Z 5946]

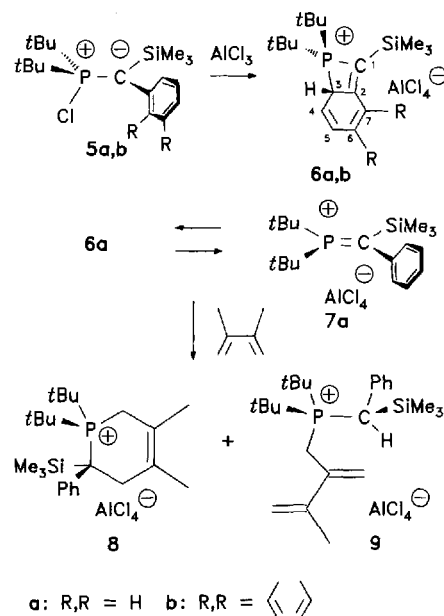
Benzokondensierte Phosphor-Kohlenstoff-Vierringe**

Von Udo Heim, Hans Pritzkow, Ulrich Fleischer und Hansjörg Grützmacher*

Professor Hans Bock zum 65. Geburtstag gewidmet

Der polarisierende Effekt von Silylsubstituenten^[1] auf Mehrfachbindungssysteme ist stark ausgeprägt und experimentell gut belegt^[2]. Wir haben den Einfluß einer Trimethylsilylgruppe auf die Doppelbindung von Methylenphosphonium-Salzen^[3] untersucht. Populationsanalysen der berechneten Moleküle H₂P=CH₂⁺ 1 [q(P): +0.7, q(C): -0.2], H₂P=C(SiH₃)₂⁺ 2 [q(P): +0.7, q(C): -0.7]^[4], Me₂P=CH₂⁺ 3 [q(P): +1.0, q(C): -0.2] und Me₂P=CH(SiH₃)₂⁺ 4 [q(P): +1.0, q(C): -0.5]^[5] ergeben eine Zunahme der Ladungsdifferenz zwischen dem Phosphor- und dem Kohlenstoffatom der Doppelbindung von etwa 0.2–0.3 e pro Silylgruppe, die als π-Acceptor wirkt^[6]. Diese Differenz wird durch den Austausch der Wasserstoffatome am Phosphoratom gegen Methylgruppen noch verstärkt. Die polarisierende Wirkung der Silylgruppe kann für eine einfache und ergiebige Synthese von neuartigen, vierringigen Phosphor-Kohlenstoff-Heterocyclen genutzt werden^[7].

Die halogenierten Ylide 5 reagieren mit AlCl₃ nahezu quantitativ zu den bisher unbekannten Dihydrophosphetium-Salzen (Schema 1)^[8]. Ihr Entstehen läßt sich aus intermediär gebildeten Methylenphosphonium-Ionen 7 (7a: Aryl = Phenyl, 7b: Aryl = Naphthyl) durch einen intramolekularen elektrocyclischen Ringschluß erklären. Der energetisch günstige Wechsel der Koordinationsgeometrie von trigonal-planar am elektrophilen Phosphoratom in 7 zu tetraedrisch in 6 gleicht den Verlust der Konjugationsenergie



Schema 1.

* Prof. Dr. H. Grützmacher
Institut für Anorganische und Analytische Chemie der Universität
Albertstraße 21, D-79104 Freiburg
Telefax: Int. +761/203-2815
Dipl.-Chem. U. Heim, Dr. H. Pritzkow
Anorganisch-chemisches Institut der Universität Heidelberg
Dr. U. Fleischer
Fakultät für Chemie, Lehrstuhl für Theoretische Chemie an der
Universität Bochum

** Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 247) und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert. Den Gutachtern danken wir für Anregungen.

- [1] a) L. A. Lasky, *Science* **1992**, 258, 964–969; b) A. Kobata, *Eur. J. Biochem.* **1992**, 209, 483–501; c) T. Feizi, *Nature* **1985**, 314, 53–57.
- [2] a) Y. Ichikawa, G. C. Look, C.-H. Wong, *Anal. Biochem.* **1992**, 202, 215–238, zit. Lit.; b) H. Waldmann, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **1992**, 40, 828–834, zit. Lit.
- [3] S. Bormann, *Chem. Eng. News* **1992**, 70 (49), 25–28.
- [4] a) U. Kragl, D. Vasic-Racki, C. Wandrey, *Chem. Ing. Tech.* **1992**, 64 (6), 499–509, zit. Lit.; b) G. Herrmann, A. Schwarz, C. Wandrey, M.-R. Kula, G. Knaup, K. H. Drauz, H. Berndt, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1991**, 13, 346–353.
- [5] U. Kragl, D. Gygax, O. Ghisalba, C. Wandrey, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 854–855; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 827–828.
- [6] a) R. Kuhn, W. Kirschenloher, *Liebigs Ann. Chem.* **1956**, 600, 135–143; b) E. Lattová, L. Petrus, *Carbohydr. Res.* **1992**, 235, 289–293.
- [7] a) A. Kameyama, H. Ishida, M. Kiso, A. Hasegawa, *Carbohydr. Res.* **1991**, 209, c1–c4; b) K. C. Nicolaou, C. W. Hummel, Y. Iwabuchi, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 3126–3128; c) A. Toeffer, R. R. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 5161–5164, d) Y. Matsuzaki, Y. Ito, Y. Nakahara, T. Oga-wa, *ibid.* **1993**, 34, 1061–1064.
- [8] a) C.-H. Wong, S. L. Haynie, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 5416–5418; b) H. Yuasa, O. Hindsgaul, M. M. Palcic, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 5891–5892; c) J. Thiem, T. Wiemann, *Angew. Chem.* **1990**, 102, 78–80; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 827–828.
- [9] 25 Units der Galactosyltransferase aus Kuhmilch werden zum Preis von 637 \$ angeboten (Sigma Chemie).
- [10] a) K. Sakai, R. Katsumi, H. Ohi, T. Usui, Y. Ishido, *J. Carbohydr. Chem.* **1992**, 11, 553–565; b) L. Hedbys, E. Johansson, K. Mosbach, P.-O. Larsson, A. Gunnarsson, S. Svensson, H. Lönn, *Glycoconjugate J.* **1989**, 6, 161–168; c) F. Zilliken, P. N. Smith, C. S. Rose, P. György, *J. Biol. Chem.* **1955**, 217, 79–82; d) K. Aisaka, H. Fujimoto, H. Nishida, *Carbohydr. Res.* **1988**, 180, 35–42; e) K. G. I. Nilsson, *Trends Biotechnol.* **1988**, 6, 256–264, zit. Lit.
- [11] Halbwertszeit der Enzymaktivität: $t_{1/2}$ = 262 h bei pH 7 und 22 °C (McIl-vaine-Puffer, 5 mM Dithiothreitol, 2 mM MgCl₂ · 6 H₂O).
- [12] Die β-Galactosidase aus *B. circulans* wird zu einem Preis von 350 \$ für 1 kg (dies entspricht 5 × 10⁶ Units) angeboten (Daiwa Kasei, Osaka, Japan).
- [13] Die Selektivität ist definiert als der Quotient aus Produktkonzentration (LacNAc 3) und Konzentration des umgesetzten Substrats (Lactose 1).
- [14] Bei τ = 0.5 h beträgt die Konzentration von 3 5.4 g L⁻¹ (13.85 mmol L⁻¹). Dies entspricht einer Ausbeute von 11.5%. Die Allo-LacNAc-Konzentration beträgt 0.25 g L⁻¹.
- [15] In einem 0.2 L-Enzym-Membran-Reaktor konnten 3.5 kg N-Acetylneu-raminsäure hergestellt werden (unveröffentlichte Ergebnisse).
- [16] Unter Einsatz von 1 g der β-Galactosidase aus *B. circulans* sind mit der hier vorgestellten Technik 376 g 3 zugänglich.
- [17] G. F. Herrmann, Y. Ichikawa, C. Wandrey, F. C. A. Gaeta, J. C. Paulson, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 3091–3094.
- [18] C. C. Sweeley, R. Bentley, W. W. Wels, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2497–2507.