

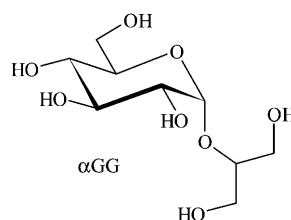
Ein effizienter biokatalytischer Herstellungsprozess für 2-O-(α -D-Glucopyranosyl)-sn-glycerin, einen natürlichen Osmolyt und feucht-haltenden Zusatzstoff**

Christiane Goedl, Thornthan Sawangwan, Mario Mueller, Alexandra Schwarz und Bernd Nidetzky*

Professor Herfried Griengl zum 70. Geburtstag gewidmet

Kompatible Solute stellen eine heterogene Substanzklasse von niedermolekularen organischen Verbindungen dar. Häufig haben sie eine Glycosidstruktur. In der Natur sind kompatible Solute weit verbreitet und erfüllen eine essenzielle Funktion im Schutz von Zellen gegen hohe Salzkonzentrationen, extreme Temperaturen und andere äußere Einflüsse. Ihre physiologische Wirkungsweise^[1] und technologische Effizienz^[2] beruhen auf der Fähigkeit, den Zellwasserhaushalt zu regulieren, vor Proteindenaturierung zu schützen und supramolekulare biologische Strukturen, wie jene der Lipidmembranen, zu stabilisieren.

Glycosylglycerine sind wirkungsvolle Osmolyte, die von Pflanzen, Algen und Bakterien zur Anpassung an Salzstress und Trockenheit produziert werden.^[3] Unter ihnen hat speziell 2-O-(α -D-Glucopyranosyl)-sn-glycerin (α GG), das



wichtigste kompatible Solut in photosynthetisierenden Bakterien,^[4] Aufmerksamkeit hervorgerufen. α GG gilt als viel-versprechender Feuchtigkeitsspender in Kosmetika,^[5] aber auch als nichtkariogener Süßstoff mit geringem Kaloriengehalt.^[6] Mögliche therapeutische Anwendungen, die auf der Fähigkeit von α GG beruhen, Proteine und Zellen zu stabilisieren, werden zurzeit evaluiert.^[7]

[*] C. Goedl, T. Sawangwan, M. Mueller, Dr. A. Schwarz,

Prof. Dr. B. Nidetzky

Institut für Biotechnologie und Bioprozesstechnik

Technische Universität Graz

Petersgasse 12/1, 8010 Graz (Österreich)

Fax: (+43) 316-873-8434

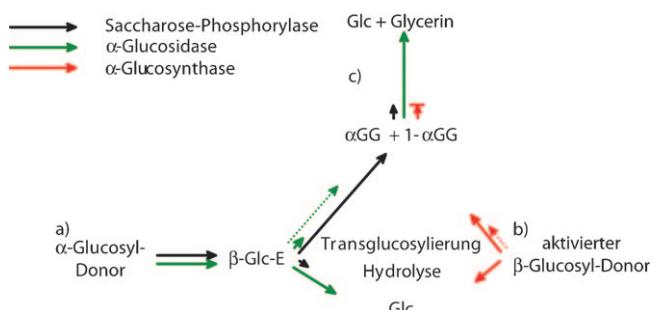
E-Mail: bernd.nidetzky@tugraz.at

Homepage: <http://www.biote.tugraz.at>

[**] Finanzielle Unterstützung wurde vom Österreichischen Wissenschaftsfonds FWF (DK Molekulare Enzymologie W901-B05) und vom Österreichischen Akademischen Austauschdienst OEAD erhalten. Wir danken Prof. Dr. Lothar Brecker, Universität Wien, für die NMR-spektroskopischen Analysen.

Die industrielle Anwendung von α GG ist jedoch durch dessen eingeschränkte Verfügbarkeit stark begrenzt. Dokumentierte Syntheseverfahren sind aufgrund unzureichender Ausbeuten, Selektivitäten und/oder Produktivitäten nicht technologisch ausgereift.^[6,8] Wir beschreiben hier einen neuen biokatalytischen Prozess, der die chemischen und technologischen Anforderungen für die Produktion von stereochemisch reinem α GG erfüllt und folglich dessen weitere Verwendung als Industriechemikalie ermöglicht.

Schema 1 fasst die charakteristischen Merkmale der enzymatischen Synthese von α GG durch Transglucosylierung von Saccharose auf Glycerin zusammen. Unter natürlichen Bedingungen katalysiert Saccharose-Phosphorylase (EC 2.4.1.7) die reversible Umsetzung von Saccharose und Phosphat in α -D-Glucose-1-phosphat (α G1P) und D-Fructose.^[9] Unter Ausschluss von Phosphat wird das β -Glucosyl-Enzym-Intermediat der Reaktion mit Saccharose von Glycerin abgefangen und so die Bildung von α GG gefördert. Anzumerken ist, dass in Abwesenheit von Phosphat das glucosyierte Enzym in einer Nebenreaktion auch hydrolysiert werden kann.^[10] Während im Großen und Ganzen die Strategie der Transglycosidase-katalysierten Synthese von Glycosiden in der Kohlenhydratchemie gut etabliert ist,^[11] gibt es einige Besonderheiten, die diesen biokatalytischen Prozess unseres



Schema 1. Vergleich der enzymatischen Herstellung von α GG über Transglucosylierung (a) sowie durch eine hypothetische „ α -Glucosynthase“-katalysierte Reaktion (b). Die relative Produktverteilung in den einzelnen Schritten wird durch die Pfeillänge dargestellt und beruht auf kinetischen Daten aus dieser Arbeit und Lit. [6]. Verfügbare kinetische Daten einer β -Glucosynthase-katalysierten Reaktion wurden zur Darstellung des Synthesewegs b verwendet.^[25] Die Problematik hinsichtlich Regioselektivität (punktierter Linien) und sekundärer Produkthydrolyse (c) wird aufgezeigt. 1- α GG, 1-O-(α -D-Glucopyranosyl)-sn-glycerin.

Wissens einzigartig machen. Erstens verfügt das aktive Zentrum der Saccharose-Phosphorylase über einen ausgezeichneten Kontrollmechanismus für den regioselektiven Glucosyltransfer, der mit anderen Transglycosidasen oft nur unzureichend erzielt werden kann (siehe Lit. [12] für den allgemeinen Fall der Transglycosylierung und Lit. [13] für die Synthese von α GG). Zweitens gelingt es dem Enzym, die Konkurrenzreaktion mit Wasser kinetisch so weit zu unterdrücken, dass in Anwesenheit einer entsprechenden Menge an Glycerin als Akzeptor die Substrat hydrolyse zur Gänze verhindert werden kann. Drittens erzeugt die Verwendung von Saccharose als energiereichem Glucosyldonor in Kombination mit der substanzialen kinetischen Hemmung des Abbaus von α GG durch Saccharose-Phosphorylase eine große Triebkraft in Richtung der Produktbildung, sodass nahezu quantitative Produktausbeuten (bezogen auf umgesetztes Substrat) erreicht werden können. Der biokatalytische Herstellungsprozess für α GG verbindet somit die wichtigsten Vorteile von Transglycosidasen hinsichtlich des relativ einfachen Reaktionssystems und des Gebrauchs billiger Substrate, von Glycosyltransferasen hinsichtlich der Produkteinheitlichkeit durch die hohe Regioselektivität des Glucosyltransfers, und von Glycosynthetasen hinsichtlich der kinetischen Stabilität des glycosidischen Produkts.^[14,15]

Die konkurrierenden Reaktionen des Glucosyl-Enzym-Intermediats der Saccharose-Phosphorylase mit Glycerin und Wasser wurden durch kinetische Untersuchungen im Fließgleichgewicht studiert. Die Freisetzung von Fructose (V_{Fru} ; Saccharose) oder Phosphat (V_{Pi} ; α G1P) wurde gemeinsam mit der Glucosebildung (V_{Glc}) in Abhängigkeit vom verwendeten Glucosyldonor-Substrat gemessen. Die Verhältnisse $V_{\text{Fru}}/V_{\text{Glc}}$ und $V_{\text{Pi}}/V_{\text{Glc}}$ wurden bei variierten Glycerin-Konzentrationen bestimmt (Abbildung 1a). Wie erwartet, wenn Glycerin mit Wasser um die Reaktion am glucosyliertem Enzym konkurriert, nahmen die Verhältnisse bei jedem Donorsubstrat mit steigender Glycerinmenge zu (Schema 1). Bei Verwendung von Saccharose und α G1P ergab die lineare Regressionsanalyse der Daten Steigungen von 7.9 M^{-1} bzw. 2.8 M^{-1} als Maß für den kinetischen Verteilungskoeffizienten des glucosylierten Enzyms unter den jeweiligen Bedingungen. Diese Resultate implizieren, dass Glycerin in der enzymatischen Reaktion – anders als in Literaturberichten dargestellt^[16] – eindeutig als Akzeptor des vom Enzym transferierten Glucosylrestes fungiert.

Überdies beeinflusst die Abgangsgruppe des Donorsubstrats die Gesamteffizienz des Glucosyltransfers auf Glycerin, was aus Schema 1 nicht ersichtlich wird. Dieser Effekt ist nicht eindeutig erklärbar und wird hypothetisch auf die flexible Konformation der Akzeptorbindungsstelle der Saccharose-Phosphorylase zurückgeführt, wie aus hochauflösten Röntgenstrukturanalysen des Enzyms (aus *Bifidobacterium adolescentis*) ersichtlich wird.^[17]

Die unmittelbaren Auswirkungen der kinetischen Befunde auf die Synthese von α GG werden in Abbildung 1b gezeigt, worin die zeitlichen Verläufe der Produktbildung bei enzymatischen Umsetzungen von Saccharose und α G1P verglichen werden. Die Ausbeute an Transferprodukt bezogen auf den Umsatz des Donorsubstrats wurde mit HPLC bestimmt und war im Fall von Saccharose wesentlich höher

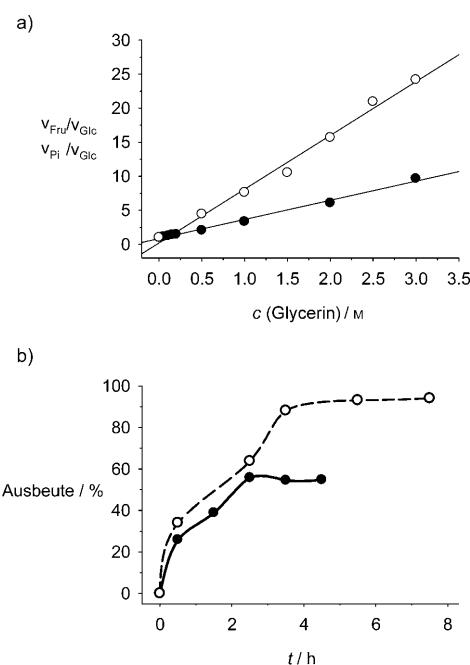


Abbildung 1. Vergleich von Saccharose und α G1P als Glucosyldonor für die Herstellung von α GG. a) Bestimmung des kinetischen Verteilungskoeffizienten unter Verwendung von 0.8 M Saccharose (○) und 0.1 M α G1P (●) in Gegenwart von 20 U mL^{-1} (○) und 3 U mL^{-1} Enzym (●). b) Zeitlicher Verlauf der Bildung von α GG während der Umsetzung von 0.3 M Saccharose (○) oder 0.1 M α G1P (●) in Gegenwart von 2.0 M Glycerin und 20 U mL^{-1} Enzym bei 30°C und pH 7.0.

als mit α G1P. Die Bildung von freier Glucose ist ein Maß für die Hydrolyse des Donorsubstrats und entspricht dem Anteil nicht auf Glycerin transferierter Glucosylreste. Die Daten in Abbildung 1b zeigen, dass unter Verwendung von α G1P Hydrolyse und Glucosyltransfer stärker miteinander konkurrieren, als dies mit Saccharose als Donorsubstrat der Fall ist. Nach vollständiger Umsetzung von Saccharose wurde das Produktgemisch NMR-spektroskopisch analysiert. Innerhalb der Nachweisgrenzen der verwendeten Methode (0.02 %) wurde ausschließlich das gewünschte Regiosomer von α -Glucosylglycerin gefunden.

Tabelle 1 fasst die Ergebnisse jener Experimente zusammen, die zur Optimierung der enzymatischen Umsetzung von Saccharose und Glycerin hinsichtlich der Produkt- und Raum-Zeit-Ausbeuten (RZA) durchgeführt wurden. Ange-sichts des breiten pH-Optimums (5.0–8.0) für die enzymatische Freisetzung von α G1P aus Saccharose,^[18] war der pH-Arbeitsbereich für die Synthese von α GG überraschend schmal. Der optimale pH-Wert liegt bei 7.0. Durch systematische Variation der Anfangskonzentrationen von Saccharose und Glycerin konnten Bedingungen gefunden werden (0.8 M Saccharose, 2.0 M Glycerin), unter denen die spezifische RZA, bezogen auf die eingesetzte Enzymmenge pro Volumeneinheit, am höchsten war und gleichzeitig die Produktausbeute ca. 90 % betrug. Eine weitere Erhöhung der Saccharose- und Glycerinkonzentration verbesserte weder die RZA noch die Produktausbeute signifikant. Um den erforderlichen Reinheitsgrad des löslichen Biokatalysators zu bestimmen, haben wir die Effizienz des Rohextrakts der *Escherichia coli*-Zellen, aus denen die rekombinante Sac-

Tabelle 1: Optimierung der Herstellung von α GG hinsichtlich Produkt- und spezifischer Raum-Zeit-Ausbeute (RZA).^[a]

c (Saccharose) [M]	c (Glycerin) [M]	Ausb. [%]	spezifische RZA $[M\ h^{-1}\ 1000\ kU]$
0.3	2.0	93	0.54
0.5	2.0	93	0.97
0.8	2.0	85	1.41
1.0	2.0	80	1.11
1.5	2.0	55	1.15
2.0	2.0	47	1.31
0.8	0.5	47	0.59
0.8	1.0	60	0.75
0.8	1.5	73	0.91
0.8	2.0	88 ^[b] /63 ^[c]	1.11
0.8	2.5	79	0.98
0.8	3.0	87	1.09
0.8	2.0	85	1.41
0.8	2.0	86 ^[d]	1.43
0.8	2.0	33 ^[e]	–
0.3	2.0	30 ^[f]	0.19
0.3	2.0	68 ^[g]	0.43
0.3	2.0	95 ^[h]	0.59
0.3	2.0	63 ^[i]	0.39
0.3	2.0	39 ^[j]	0.25
0.1 ^[k]	3.0	55	0.68

[a] Sofern nicht anders angegeben, wurde gereinigtes Enzym in 50 mM MES-Puffer pH 7.0 verwendet. [b] Analytische Transferausbeute. [c] Gesamtausbeute an isoliertem Produkt. [d] Rohextrakt. [e] 3.25 g intakte *E. coli*-Zellen. [f] pH 5.5. [g] pH 6.5. [h] pH 7.0. [i] pH 7.5. [j] pH 8.5. [k] α G1P.

charose-Phosphorylase gewonnen wird, mit der des isolierten Enzyms verglichen. Es konnte kein Unterschied zwischen den beiden Enzympräparationen (Tabelle 1) festgestellt werden. Allerdings führte die Verwendung von intakten, Saccharose-Phosphorylase exprimierenden Bakterienzellen zu einer substanzialen Abnahme der Produktausbeute verglichen mit der entsprechenden Reaktion unter Gebrauch des freien Enzyms.

Abbildung 2 zeigt den vollständigen zeitlichen Verlauf der Synthese von α GG unter optimalen Reaktionsbedingungen. Wesentlich ist, dass die Hydrolyse von Saccharose durchweg nur in sehr geringem Ausmaß stattfand. Das Transferprodukt (0.7 M) wurde mit einer berechneten Reinheit von $\geq 98\%$ (HPLC) und einer Gesamtausbeute von ca. 63% nach einer einstufigen säulenchromatographischen Aufarbeitung isoliert (siehe *Experimentelles*). Die chemische Struktur des gereinigten Produkts wurde mithilfe von NMR-Spektroskopie bestätigt.^[*]

[*] Zuweisung der chemischen Verschiebungen in α GG: $^1\text{H-NMR}$: Glucose: H-1, 5.21; H-2, 3.66; H-3, 3.84; H-4, 3.52; H-5, 3.93; H-6a, 3.95; H-6b, 3.83 ppm; Glycerin: H-1'a, 3.80; H-1'b, 3.75; H-2', 3.91 ppm. $^{13}\text{C-NMR}$: Glucose: C-1, 98.2; C-2, 71.9; C-3, 73.3; C-4, 69.9; C-5, 72.4; C-6, 61.0 ppm; Glycerin: C-1', 63.8; C-2', 79.2 ppm.^[8a] Referenziert auf externes Aceton: $\delta(^1\text{H}) = 2.22$ ppm und $\delta(^{13}\text{C}) = 31.5$ ppm.

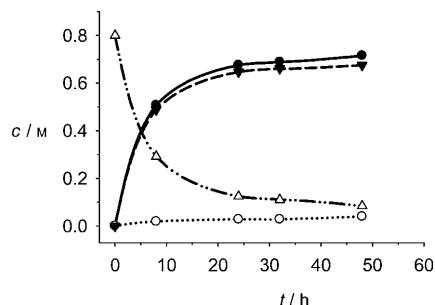


Abbildung 2: Herstellung von α GG unter optimierten Reaktionsbedingungen: 0.8 M Saccharose, 2.0 M Glycerin, 20 U mL⁻¹ Enzym, pH 7.0. d-Fructose (●), d-Glucose (○), α GG (▼), Saccharose (△).

Die sekundäre Produkthydrolyse stellt häufig eine große Einschränkung für die von Transglycosidasen katalysierte Synthese von Glycosiden dar. Es bedarf aus diesem Grund einer streng kinetisch kontrollierten Reaktionsführung bei der enzymatischen Umsetzung, und selbst unter optimierten Bedingungen liegen die Produktausbeuten vielfach nur bei 10–20%.^[19] Der hydrolytische Produktabbau hat die Entwicklung des Glycosynthase-Konzepts vorangetrieben. Glycosynthasen sind genetisch manipulierte Glycosidasen, die die Sekundärhydrolyse aufgrund von Strukturänderungen in ihren aktiven Zentren nicht unterstützen können.^[20] Die erfolgreiche Entkopplung von Produktsynthese und -hydrolyse hat aber zur Folge, dass hoch aktivierte Glycosyldonor-Substrate verwendet werden müssen, die meist chemisch instabil sind.^[14] Angesichts des Standes der Technik war es überraschend, dass die Bildung von α GG scheinbar gleichgewichtskontrolliert abläuft (siehe Abbildung 1 b und 2), was wiederum auf eine ungewöhnliche kinetische Stabilität des Produkts unter den verwendeten Transglucosylierungsbedingungen schließen lässt. Aus diesem Grund haben wir die Aktivität von Saccharose-Phosphorylase mit gereinigtem α GG als Donorsubstrat und Phosphat, Wasser oder Fructose als Akzeptor untersucht. Die Umsatzgeschwindigkeiten dieser Reaktionen waren extrem niedrig ($k_{\text{cat}} \leq 5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), und können mit jenen k_{cat} -Werten für die Umsetzung von Saccharose in α G1P und d-Glucose von ca. 100 s⁻¹ bzw. 2 s⁻¹ verglichen werden. Somit erhöht der Austausch der Abgangsgruppe von d-Fructose auf Glycerin die Stabilität des α -Glucosids gegen Hydrolyse durch Saccharose-Phosphorylase um etwa vier Größenordnungen.

Wir stellen zusammenfassend fest, dass ein sehr effizienter und selektiver Transglycosidase-Prozess entwickelt wurde, welcher die Grundlage zur Produktion von α GG als Industriechemikalie liefern kann.^[21] Wir erwarten uns, dass dadurch auch die Entwicklung der potenziellen Anwendungen dieser Verbindung, im Speziellen als Inhaltsstoff von kosmetischen Rezepturen, vorangetrieben wird.

Experimentelles

Synthese von α GG: Saccharose (0.3–2.0 M) oder α G1P (0.1 M) wurde in Gegenwart von Glycerin (0.5–3.0 M) und rekombinanter Saccharose-Phosphorylase aus *Leuconostoc mesenteroides*^[22] (3–80 U mL⁻¹) in 50 mM MES-Puffer, pH 5.5–8.5, bei 30 °C und 550 rpm umgesetzt.

Die Reaktionszeit betrug bis zu 72 h und war abhängig von der eingesetzten Enzymmenge. Repräsentative Proben wurden zu adäquaten Zeiten gezogen, und das Enzym wurde nach Hitzeinaktivierung durch Zentrifugation abgetrennt. Gereinigtes Enzym wurde gemäß dem Protokoll in Lit. [10] hergestellt.

Die Konzentration an D-Fructose wurde mit einem enzymatischen Test unter Verwendung von rekombinanter Mannitol-Dehydrogenase aus *Pseudomonas fluorescens*^[23] bestimmt. Ein kolorimetrischer Glucose-Oxidase/Peroxidase-Test wurde zur Bestimmung der D-Glucose-Konzentration herangezogen. Glucose-Oxidase aus *Aspergillus niger*, Meerrettich-Peroxidase und o-Dianisidin wurden von Sigma bezogen. Anorganisches Phosphat wurde kolorimetrisch bei 850 nm gemessen.^[24] HPLC-Analysen wurden mit einer Aminex-HPX-87C-Säule (Bio-Rad) bei 85 °C durchgeführt. Elution erfolgte mit deionisiertem Wasser bei einem konstanten Fluss von 0.6 mL min⁻¹. Die Konzentration an αGG wurde direkt mit HPLC oder indirekt über die Konzentrationsdifferenz von D-Fructose (oder Phosphat) und D-Glucose bestimmt.

Das Produktgemisch (16.2 g αGG in 90 mL) wurde auf eine XK-50/60-Säule aufgetragen. Das Säulenmaterial (1 L) bestand aus einem 1:1-Gemisch aus Aktivkohle Norit (Typ Norit SX Ultra, Sigma) und kalziniertem Celite 501 (Sigma). Ein vierstufiger Gradient, der sich aus 4 L deionisiertem Wasser gefolgt von 4 L 2%igem Ethanol, 2 L 15%igem Ethanol und 1 L 25%igem Ethanol zusammensetzte, diente zur Elution der Produkte bei einem konstanten Fluss von 20 mL min⁻¹. Unter diesen Bedingungen eluierten 10.2 g αGG (40 mmol) in der 2%igen Ethanolfraktion, welche unter Vakuum aufkonzentriert, lyophilisiert und bei -21 °C gelagert wurde.

Eingegangen am 22. Juli 2008
Online veröffentlicht am 21. November 2008

Stichwörter: Enzymatische Synthesen · Glycoside · Reaktionskinetik · Regioselektivität · Transglucosylierungen

- [1] a) H. Santos, P. Lamosa, T. Q. Faria, N. Borges, C. Neves in *Physiology and Biochemistry of Extremophiles* (Hrsg.: C. Gerday, N. Glansdorff), ASM Press, Washington, DC, **2007**, S. 86–103; b) N. Empadinhas, M. S. da Costa, *Int. Microbiol.* **2006**, 9, 199–206; c) M. S. da Costa, H. Santos, E. A. Galinski, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **1998**, 61, 117–153.
- [2] a) G. Lentzen, T. Schwarz, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, 72, 623–634; b) „Orally used compatible solute containing agents“: T. Schwarz, G. Lentzen, J. Krutmann, Germany, WO 2006097263, **2006**.
- [3] D. K. Hincha, M. Hagemann, *Biochem. J.* **2004**, 383, 277–283.
- [4] S. Fulda, J. Huckauf, A. Schoor, M. Hagemann, *J. Plant Physiol.* **1999**, 154, 240–249.
- [5] a) „α-D-Glucopyranosyl glycerol derivatives as antiallergic agents, health foods, and cosmetics“: K. Yoshida, A. Takenaka, T. Nitta, M. Iki, JP 2007137862, **2007**; b) „Cosmetic preparations containing glucosyl glycerides and one or more acrylamidomethyl propylsulphonic acid polymers“: U. Breitenbach, V. Kall-
- mayer, T. Raschke, C. Scherner, W. Siecken, S. Viala, Germany, WO 2006122669, **2006**; c) „Cosmetic preparations with an effective amount of glycosylglycerides as skin moisturizers“: J. Thiem, O. Scheel, G. Schneider, Germany, EP 770378, **1997**.
- [6] F. Takenaka, H. Uchiyama, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2000**, 64, 1821–1826.
- [7] a) „Antitumor agents containing α-D-glucopyranosylglycerols and food and cosmetics containing them“: T. Nitta, A. Takenaka, M. Iki, E. Matsumura, M. Sakaguchi, JP 2007262023, **2007**; b) D. Colombo, F. Compostella, F. Ronchetti, A. Scala, L. Toma, H. Tokuda, H. Nishino, *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, 35, 1109–1113.
- [8] a) R. Suhr, O. Scheel, J. Thiem, *J. Carbohydr. Chem.* **1998**, 17, 937–968; b) N. Ohta, K. Achiwa, *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, 39, 1337–1339; c) A. Roder, E. Hoffmann, M. Hagemann, G. Berg, *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**, 243, 219–226.
- [9] a) C. Goedl, A. Schwarz, M. Mueller, L. Brecker, B. Nidetzky, *Carbohydr. Res.* **2008**, 343, 2032–2040; b) J. J. Mieyal, R. H. Abeles in *The Enzymes*, Vol. 7, 3. Aufl., Academic Press, New York, **1972**, S. 515–532.
- [10] A. Schwarz, B. Nidetzky, *FEBS Lett.* **2006**, 580, 3905–3910.
- [11] D. H. Crout, G. Vic, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, 2, 98–111.
- [12] M. Scigelova, S. Singh, D. H. G. Crout, *J. Mol. Catal. B* **1999**, 6, 483–494.
- [13] H. Nakano, T. Kiso, K. Okamoto, T. Tomita, M. B. Manan, S. Kitahata, *J. Biosci. Bioeng.* **2003**, 95, 583–588.
- [14] F. A. Shaikh, S. G. Withers, *Biochem. Cell Biol.* **2008**, 86, 169–177.
- [15] a) M. Fajes, A. Planas, *Carbohydr. Res.* **2007**, 342, 1581–1594; b) G. Perugino, A. Trincone, M. Rossi, M. Moracci, *Trends Biotechnol.* **2004**, 22, 31–37; c) G. J. Davies, S. J. Charnock, B. Henrissat, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2001**, 13, 105–120.
- [16] S. Kitao, H. Sekine, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1992**, 56, 2011–2014.
- [17] O. Mirza, L. K. Skov, D. Sprogøe, L. A. van den Broek, G. Beldman, J. S. Kastrup, M. Gajhede, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 35576–35584.
- [18] a) E. J. Vandamme, J. van Loo, L. Machelinckx, A. de Laporte in *Adv. Appl. Microbiol.*, Vol. 32, Academic Press, New York, **1987**, S. 163–201; b) A. Schwarz, L. Brecker, B. Nidetzky, *Biochem. J.* **2007**, 403, 441–449.
- [19] S. J. Williams, S. G. Withers, *Carbohydr. Res.* **2000**, 327, 27–46.
- [20] S. M. Hancock, M. D. Vaughan, S. G. Withers, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, 10, 509–519.
- [21] „Preparation of 2-O-glyceryl-α-D-glucopyranoside from a glucosyl donor and a glucosyl acceptor“: C. Goedl, T. Sawangwan, B. Nidetzky, M. Mueller, Austria, WO 2008034158, **2008**.
- [22] C. Goedl, A. Schwarz, A. Minani, B. Nidetzky, *J. Biotechnol.* **2007**, 129, 77–86.
- [23] M. Slatner, B. Nidetzky, K. D. Kulbe, *Biochemistry* **1999**, 38, 10489–10498.
- [24] S. Saheki, A. Takeda, T. Shimazu, *Anal. Biochem.* **1985**, 148, 277–281.
- [25] Y. W. Kim, H. Chen, S. G. Withers, *Carbohydr. Res.* **2005**, 340, 2735–2741.