

Eine Enzymkaskade zur Synthese von ϵ -Caprolacton und dessen Oligomeren**

Sandy Schmidt, Christian Scherkus, Jan Muschiol, Ulf Menyes, Till Winkler, Werner Hummel, Harald Gröger, Andreas Liese, Hans-Georg Herz und Uwe T. Bornscheuer*

Abstract: In industriellem Maßstab wird Poly- ϵ -caprolacton (PCL) gegenwärtig nur chemisch produziert, wobei mit Peressigsäure ein gefährliches Reagens als Oxidationsmittel genutzt wird. Baeyer-Villiger-Monoxygenasen (BVMOs) ermöglichen im Prinzip die enzymatische Synthese von ϵ -Caprolacton (ϵ -CL) direkt ausgehend von Cyclohexanon mit molekularem Sauerstoff, doch gegenwärtige Systeme leiden unter niedrigerer Produktivität sowie Substrat- und Produktinhibierung. Wir überwinden wesentliche Limitationen eines solchen biokatalytischen Wegs durch die Kombination einer Alkoholdehydrogenase mit einer BVMO für die effiziente Oxidation von Cyclohexanol zu ϵ -CL. Entscheidend war die direkte Ringöffnungs-Oligomerisierung des *in situ* gebildeten ϵ -CL in wässriger Phase unter Nutzung der Lipase A aus *Candida antarctica*. So wurde das Problem der Produktinhibition gelöst, und Oligo- ϵ -CL wurde mit >20 g L⁻¹ ausgehend von 200 mM Cyclohexanol erhalten. Dieses Oligomer konnte chemisch leicht zu PCL polymerisiert werden.

Biokatalytische Prozesse unter Nutzung von natürlichen oder veränderten Enzymen sind heutzutage für die Synthese von hochwertigen Feinchemikalien, vor allem aber für chirale pharmazeutische Intermediate, sehr gut etabliert.^[1] Dagegen sind Beispiele für die enzymatische Synthese von Bulkchemikalien mit einigen Ausnahmen sehr selten.^[2]

Eine sehr wichtige industrielle Chemikalie ist ϵ -Caprolacton (ϵ -CL, **3**), das derzeit in einem Maßstab von mehreren 10000 Tonnen pro Jahr durch den UCC-Prozess hergestellt und als Vorstufe für die Polymersynthese eingesetzt wird.^[3] Dabei wird Cyclohexanon unter Nutzung von stöchiometrischen Mengen Peressigsäure oxidiert. Abgesehen von der nur sehr moderaten Selektivität (85–90 %) ergeben sich weitere Nachteile aus der Perspektive der Toxizität, Ökologie und Sicherheit. Eine offensichtliche enzymatische Alternative zur Produktion von ϵ -CL ist der Einsatz von Baeyer-Villiger-Monoxygenasen (BVMOs).^[4] Diese Flavin-abhängigen Enzyme benötigen nur molekularen Sauerstoff als vorteilhaftes Oxidationsmittel sowie den Kofaktor NADPH. Innerhalb dieser Enzymklasse ist die Cyclohexanon-Monoxygenase (CHMO) aus *Acinetobacter calcoaceticus* der bevorzugte Kandidat, da sie bereits vor 40 Jahren beschrieben wurde.^[5] Außerdem kann dieses Enzym rekombinant sowohl in Hefe^[6] als auch in *E. coli*^[7] hergestellt werden. Trotzdem wurde bis heute eine biokatalytische Produktion von ϵ -CL in großem Maßstab aus mehreren Gründen nicht erzielt. Diese schließen sowohl die Stabilität des Enzyms ein, als auch die Regeneration des Kofaktors sowie die Notwendigkeit eines Kosubstrates in stöchiometrischen Mengen. Die größte Herausforderung ist die Überwindung der Substrat- und Produktinhibition der CHMO. Um einen ökonomischen Prozess zu ermöglichen, ist eine preiswerte und effiziente Regenerierung des Kofaktors NADPH ohne die Notwendigkeit eines externen Kosubstrates nötig. Kürzlich haben wir ein solches System beschrieben, bei dem eine autarke Kofaktor-Regenerierung ausgehend von der leicht zugänglichen Bulkchemikalie Cyclohexanol durch die Kombination von CHMO mit einer Alkoholdehydrogenase (ADH aus *Lactobacillus kefir* oder eine entworfene Polyol-Dehydrogenase aus *Rhodobacter spaeroides*; Schema 1, links) erreicht werden konnte.^[10] In diesen Studien wurde gezeigt, dass schon Substratkonzentrationen von >60 mM eine starke Produktinhibition auslösen, im Unterschied zu einer nur schwachen Inhibition durch Cyclohexanol (**1**) und Cyclohexanon (**2**).^[8]

Substratinhibition kann sehr leicht durch eine geeignete Zufütterung von Cyclohexanol umgangen werden. Wenn beide Enzyme, ADH und CHMO, in ausreichender Menge exprimiert werden, verbleibt die Konzentration von Cyclohexanon als *in situ* gebildetes Intermediat sehr niedrig. Dagegen sind sowohl Produktinhibition als auch Enzymdesaktivierung durch das Produkt ϵ -CL vor allem bei höheren Konzentrationen sehr große Hindernisse. Mehrere Wege, um dieses vollständig mit Wasser mischbare Lacton unter Verwendung von organischen Lösungsmitteln *in situ* zu extrahieren oder mittels Adsorbern zu entfernen, resultieren in

[*] Dipl.-Biochem. S. Schmidt, Dipl.-Biochem. J. Muschiol,
Prof. Dr. U. T. Bornscheuer
Institut für Biochemie, Abt. Biotechnologie & Enzymkatalyse
Universität Greifswald
Felix-Hausdorff-Straße 4, 17487 Greifswald (Deutschland)
E-Mail: uwe.bornscheuer@uni-greifswald.de

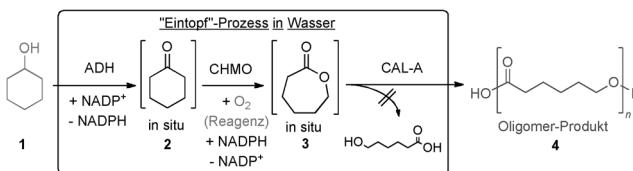
Dr. U. Menyes
Enzymicals AG
Walther-Rathenau-Straße 49a, 17489 Greifswald (Deutschland)
M.Sc. T. Winkler, Prof. Dr. W. Hummel, Prof. Dr. H. Gröger
Organische Chemie I, Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld
Postfach 100131, 33501 Bielefeld (Deutschland)

Dipl.-Biochem. C. Scherkus, Prof. Dr. A. Liese
Institut für Technische Biokatalyse
Technische Universität Hamburg-Harburg (TUHH)
Denickestraße 15, 21073 Hamburg (Deutschland)

Dr. H.-G. Herz
Polymaterials AG
Innovapark 20, 87600 Kaufbeuren (Deutschland)

[**] Wir danken der „Deutschen Bundesstiftung Umwelt“ für die finanzielle Unterstützung (AZ 13268-32).

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201410633> zu finden.



Schema 1. Synthese von Oligo- ϵ -caprolacton (Oligo- ϵ -CL, 4) durch eine Enzymkaskade. Zuerst wird Cyclohexanol (1) durch die Alkoholdehydrogenase (ADH) zu Cyclohexanon (2) oxidiert, gefolgt von der Baeyer-Villiger-Oxidation durch eine Cyclohexanon-Monoxygenase (CHMO), um ϵ -CL (3) zu erzeugen und gleichzeitig den Kofaktor NADPH zu regenerieren. Die starke Produktinhibierung wird komplett verhindert und eine signifikant höhere Produktivität wird durch den Einsatz von Lipase CAL-A dank ihrer Acyltransferase-Aktivität in einem wässrigen System erreicht. Dies führt ausschließlich zur Bildung von Oligo- ϵ -CL, aber nicht zur Bildung der 6-Hydroxycapronsäure.

geringen Produktivitäten, zusätzlichen Kosten und ökologischen Nachteilen.

Wir beschreiben hier eine elegante Lösung, in der das durch die enzymatische Eintopf-Zweischritt-Methode produzierte ϵ -CL direkt einer In-situ-Ringöffnungspolymerisierung unter Nutzung der Lipase CAL-A aus *Candida antarctica*^[9] unterworfen wird (Schema 1). Solch ein Prozess löst das Problem der Enzyminhibierung und Desaktivierung durch ϵ -CL (3) bei höheren Konzentrationen. Vorteilhafterweise ist das gebildete Oligo- ϵ -CL hydrophob und kann durch Extraktion oder Fällung isoliert werden. Während die enzymatische Synthese von Polymeren, vor allem aber die enzymatische Ringöffnungspolymerisation in der Literatur sehr gut dokumentiert sind,^[10] benötigt die Bildung von Polyester immer organische Lösungsmittel in großer Menge und insbesondere die Abwesenheit von Wasser, um eine unerwünschte Hydrolyse zu vermeiden.^[11] Lipase CAL-A verfügt über eine einzigartige Acyltransferase-Aktivität in Wasser, welche die effiziente Bildung des Esters auch in Gegenwart großer Wassermengen ermöglicht.^[12] Tatsächlich konnten wir keine Hydrolyse von 3 feststellen, als die hydrolytische Aktivität der CAL-A gegenüber einer 1M wässrigen Lösung dieses Esters bestimmt wurde. Nach einigen Stunden der Inkubation wurde die Bildung eines weißen Niederschlags in der wässrigen 1M Lösung beobachtet (Abbildungen S1, S2 in den Hintergrundinformationen). Nach Isolierung und Untersuchung mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) zeigte sich, dass die CAL-A-Katalyse zu einem Oligomer von Verbindung 3 mit einem maximalen Molekulargewicht von 1200 g mol⁻¹ führt (Tabelle 1, Retentionsvolumen 16.4 mL; Abbildung 1). Beide Endgruppen können durch den angenommenen Reaktionsmechanismus spezifiziert werden, der identisch zu der Ringöffnungspolymerisation in organischem Lösungsmittel ist.^[10b] Demzufolge handelt es sich um eine Carboxyl- sowie eine Alkoholgruppe.

Dieses Oligomer (Oligo- ϵ -CL_{CAL-A}, Tabelle 1) kann chemisch sehr leicht in ein Polymer mit hohem Molekulargewicht (Oligo- ϵ -CL_{Cond.}) umgewandelt werden, das identische Eigenschaften zu chemisch synthetisiertem Poly- ϵ -caprolacton (PCL_{chem}) aufweist. Eine ¹H-NMR-spektroskopische Untersuchung bestätigte ebenfalls die Identität beider Polymere (Abbildungen S3–S5).

Tabelle 1: Charakterisierung von auf verschiedenen Wegen erhaltenem Oligo- und Poly- ϵ -caprolacton durch GPC-Analyse.

Produkt ^[a]	Peak-Retentionsvolumen [mL]	M _n [Da]	M _w [Da]	M _w /M _n
PCL _{chem}	12.0	35 426	48 248	1.4
Oligo- ϵ -CL _{Kaskade}	18.4	160	375	2.3
Oligo- ϵ -CL _{CAL-A}	16.4	615	1154	1.8
Oligo- ϵ -CL _{Cond.}	12.2	21 662	37 773	1.7

[a] PCL_{chem}: chemisch synthetisiert; Oligo- ϵ -CL_{Kaskade}: erhalten unter Nutzung von allen drei Enzymen ausgehend von 1; Oligo- ϵ -CL_{CAL-A}: erhalten unter Nutzung von Lipase A ausgehend von 1 m 3; Oligo- ϵ -CL_{Cond.}: chemisch polymerisiertes Oligo- ϵ -CL_{CAL-A}.

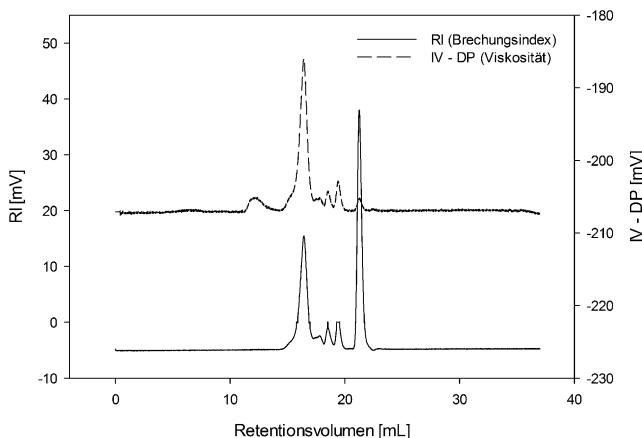


Abbildung 1. GP-Chromatogramm von Oligo- ϵ -CL (4), synthetisiert direkt durch CAL-A (nach Extraktion aus der Biokatalyse-Reaktion). Der einzelne schmale Peak repräsentiert den internen Standard Toluol; die Peaks zwischen den Retentionsvolumen 14.80 und 20.30 mL entsprechen dem Oligomer 4.

Daraufhin wurden ADH und CHMO als ein Gemisch zweier *E.-coli*-Zellsuspensionen, welche diese rekombinanten Enzyme enthielten, zur Untersuchung des Effektes von CAL-A in einer biokatalytischen Eintopfreaktion mit verschiedenen Cyclohexanol-Konzentrationen eingesetzt. Dabei fiel die Konzentration von 3 im Vergleich zur Biotransformation ohne Zugabe von CAL-A stark ab (Abbildung 2). Die niedrigere Konzentration von ϵ -CL resultiert offensichtlich aus der Bildung von Oligo- ϵ -CL katalysiert durch Lipase CAL-A. Unter Einsatz von 1 g L⁻¹ (pro Ansatz) lyophilisierter CAL-A während der Biotransformation konnten wesentlich geringere Konzentrationen von ϵ -CL im Vergleich zu den Reaktionen ohne CAL-A, bei denen nur ϵ -CL gebildet wurde, beobachtet werden. Dies deutete stark auf die Bildung von Oligo- ϵ -CL hin, was daraufhin durch eine Analyse mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestätigt wurde (Abbildung S5). Außerdem war es mit diesem Experiment möglich, zu zeigen, dass Ganzzellbiotransformationen mit allen drei Enzymen (ADH, CHMO und CAL-A) in einer Eintopf-Reaktionskaskade durchgeführt werden können.

Zusätzlich zur Inhibition der CHMO durch 3 ist seine Instabilität ein weiterer Grund dafür, dass eine Produktion von 3 in großem Maßstab bisher nicht erzielt werden konnte. Zur Überwindung dieses Problems wurde eine Zweifachmu-

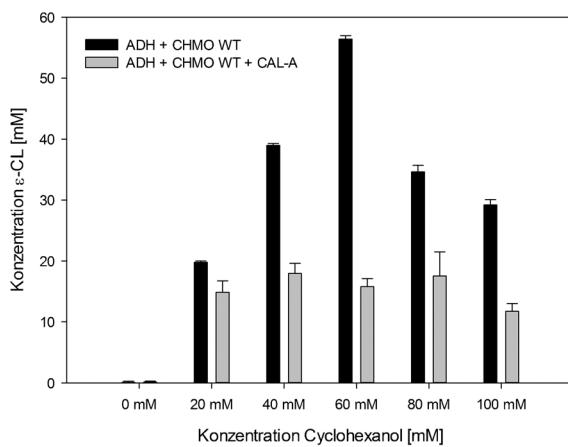


Abbildung 2. Vergleich der ϵ -CL-Konzentrationen in Biokatalysen katalysiert durch ADH und CHMO-Wildtyp mit (graue Balken) und ohne (schwarze Balken) Zugabe von CAL-A. Demnach führt die Zugabe von CAL-A zu einer wesentlich geringeren Menge an ϵ -CL infolge der Umsetzung zu Oligo- ϵ -CL.

tante der CHMO (C376L/M400I) eingesetzt. Diese wurde bereits beschrieben^[13] und führt sowohl zu einer höheren Oxidationsbeständigkeit als auch zu einer verbesserten Langzeitstabilität der CHMO. Im Vorfeld angefertigte Studien zeigten, dass die Nutzung von ADH und CHMO in separaten *E. coli*-Zellen bevorzugt ist gegenüber ihrer Nutzung in einem einzelnen Ganzzellsystem. Verschiedene Verhältnisse ganzer Zellen, die rekombinant exprimierte ADH oder die BVMO-Variante C376L/M400I enthielten, wurden gemeinsam für die Biotransformation ausgehend von Cyclohexanol zu ϵ -CL eingesetzt (Abbildung S7). Das optimale Verhältnis von ADH und CHMO ist ein sehr wichtiger Faktor aufgrund der unterschiedlichen Expressionsniveaus, der spezifischen Aktivitäten sowie der Stabilität beider Enzyme. Mit 60 mM **1** wurde der höchste Umsatz bei einem ADH/CHMO-Verhältnis von 1:10 erzielt.

Obwohl das System im Prinzip unabhängig im Hinblick auf die Kofaktor-Regenerierung ist (Abbildung S6), erwies sich die Zugabe von Aceton und Glukose als sehr vorteilhaft, um eine schnellere Regenerierung des NADPH, vor allem bei hohen Substratkonzentrationen (Abbildung S8), zu ermöglichen, da beide Enzyme in separaten *E. coli*-Zellen exprimiert werden (Abbildung S6). Eine Zugabe von Aceton in stöchiometrischen Mengen führte zu einem Umsatz von 95 %.

Als nächstes wurden Biokatalysen in präparativem Maßstab mit einer Zufütterung von Substrat (um eine Inhibition durch **1** zu verhindern) unter Verwendung des kombinierten Systems (ADH, CHMO-Zweifachmutante C376L/M400I und CAL-A) durchgeführt. Nach 48 Stunden konnte eine vollständige Umsetzung von 200 mM **1** erreicht werden (Tabelle 2). Bei einer Substratkonzentration von 300 mM oder 500 mM unter Verwendung einer gleichbleibenden Enzymmenge konnten Umsätze von 74 % bzw. 43 % erzielt werden. Die Analyse des Produktes aus der Reaktion mit 200 mM durch GC und ^1H -NMR-Spektroskopie bestätigte, dass 75 % Oligomer gebildet wurden und 25 % ϵ -CL als weiteres Produkt präsent waren, das offensichtlich sehr leicht gemeinsam

Tabelle 2: Umsetzung von Cyclohexanol (**1**) durch die Enzymkaskadenreaktion (Schema 1).

1 (mM)	ADH [mU mg _{Zellen} ⁻¹]	CHMO [mU mg _{Zellen} ⁻¹]	CAL-A [kU] ^[a]	Umsatz [%] ^[b]
200	1.78 ± 0.20	3.32 ± 0.18	30	99.0 ± 0.7
300	1.89 ± 0.17	3.56 ± 0.10	30	74.0 ± 1.3
500	1.93 ± 0.23	3.45 ± 0.20	30	43.0 ± 2.1

[a] Bestimmt gegen das Standardsubstrat Tributyrin. [b] Basierend auf dem Verbrauch von **1** bestimmt über GC-Analyse.

mit dem Oligomer extrahiert werden kann (für weitere experimentelle Details, siehe die Hintergrundinformationen).

Zusammenfassend haben wir ein biokatalytisches Konzept für die Produktion von ϵ -Caprolacton gefolgt von einer direkten In-situ-Transformation zu Oligo- ϵ -caprolacton vorgestellt, das bei einer Substratkonzentration > 200 mM zu hohen Produktausbeuten führt. Diese elegante Methode ermöglicht nun die Kombination von Monomerbildung mit einer direkten In-situ-Oligomersynthese bei Substratkonzentrationen, die frühere Arbeiten mindestens 6-fach übertreffen. Zukünftige Arbeiten werden sich einer weiteren Verbesserung der gesamten Produktivität unter Verwendung von Bioprozess-Technologien widmen. Unabhängig von unserer Arbeit wurde vor kurzem ein Beitrag von der Kroutil-Gruppe veröffentlicht, die einen ähnlichen Kaskadenprozess mit ϵ -CL als Intermediat für das Produkt 6-Aminohexansäure thematisiert.^[14] Dies betont zusätzlich die Stärke von BVMOs für den Einsatz in der organischen Synthese sowie besonders die Bedeutung von Enzymkaskaden für die Synthese von ϵ -CL als Startpunkt, um verschiedene Anwendungsfelder zu adressieren.

Eingegangen am 31. Oktober 2014,
veränderte Fassung am 3. Dezember 2014
Online veröffentlicht am 30. Januar 2015

Stichwörter: Baeyer-Villiger-Monoxygenase · Enzymkatalyse · Polymersynthese · Reaktionskaskaden · ϵ -Caprolacton

- [1] a) B. M. Nestl, S. C. Hammer, B. A. Nebel, B. Hauer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3070–3095; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 3132–3158; b) U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, *485*, 185–194; c) M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Kebeler, R. Stürmer, T. Zelinski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 788–824; *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 806–843; d) H. E. Schoemaker, D. Mink, M. G. Wubbolts, *Science* **2003**, *299*, 1694–1697; e) A. Schmid, J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, *Nature* **2001**, *409*, 258–268.
- [2] a) M. Kobayashi, T. Nagasawa, H. Yamada, *Trends Biotechnol.* **1992**, *10*, 402–408; b) C. E. Nakamura, G. M. Whited, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 454–459; c) H. Yim, R. Haselbeck, W. Niu, C. Pujol-Baxley, A. Burgard, J. Boldt, J. Khundurina, J. D. Trawick, R. E. Osterhout, R. Stephen, J. Estadilla, S. Teisan, H. B. Schreyer, S. Andrae, T. H. Yang, S. Y. Lee, M. J. Burk, S. Van Dien, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 445–452.
- [3] K. Weissermel, H. J. Arpe, *Industrial Organic Chemistry*, 4. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, **2003**.

- [4] a) K. Balke, M. Kadow, H. Mallin, S. Sass, U. T. Bornscheuer, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 6249–6265; b) H. Leisch, K. Morley, P. C. K. Lau, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4165–4222.
- [5] N. A. Donoghue, D. B. Norris, P. W. Trudgill, *Eur. J. Biochem.* **1976**, *63*, 175–192.
- [6] J. D. Stewart, K. W. Reed, M. M. Kayser, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1996**, 755–757.
- [7] W.-H. Lee, Y.-C. Park, D.-H. Lee, K. Park, J.-H. Seo, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2005**, *123*, 827–836.
- [8] S. Staudt, U. T. Bornscheuer, U. Menyes, W. Hummel, H. Gröger, *Enzyme Microb. Technol.* **2013**, *53*, 288–292; H. Wulf, H. Mallin, U. T. Bornscheuer, *Enzyme Microb. Technol.* **2013**, *53*, 283–287.
- [9] U. T. Bornscheuer, U. Menyes, S. Schmidt, R. Wardenga, S. Borchert, European Patent Application, EP14152848.9, **2014**.
- [10] a) S. Kobayashi, K. Takeya, S. Suda, H. Uyama, *Macromol. Chem. Phys.* **1998**, *199*, 1729–1736; b) M. Labet, W. Thielemans, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 3484–3504; c) S. Kobayashi, *J. Polym. Sci. Part A* **1999**, *37*, 3041–3056; d) S. Kobayashi, H. Uyama, M. Ohmae, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2001**, *74*, 613–635; e) R. T. MacDonald, S. K. Pulapura, Y. Y. Svirkin, R. A. Gross, D. L. Kaplan, J. Akkara, G. Swift, S. Wolk, *Macromolecules* **1995**, *28*, 73–78 ; f) G. A. R. Nobes, R. J. Kazlauskas, R. H. Marchessault, *Macromolecules* **1996**, *29*, 4829–4833; g) G. M. Sivalingam, G. Madras, *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 603–609; h) H. Dong, S. G. Cao, Z. Q. Li, S. P. Han, D. L. You, J. C. Shen, *J. Polym. Sci. Part A* **1999**, *37*, 1265–1275; i) H. Uyama, S. Kobayashi, *Chem. Lett.* **1993**, *22*, 1149–1150.
- [11] a) S. Hari Krishna, *Biotechnol. Adv.* **2002**, *20*, 239–267; b) I. K. Varma, A.-C. Albertsson, R. Rajkhowa, R. K. Srivastava, *Prog. Polym. Sci.* **2005**, *30*, 949–981; c) S. Namekawa, H. Uyama, S. Kobayashi, *Polym. J.* **1998**, *30*, 269–271.
- [12] a) J. Müller, B. Fredrich, C. Kohlmann, L. Maksym, U. T. Bornscheuer, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2014**, *116*, 232–236; b) R. Brenneis, B. Baeck, *Biotechnol. Lett.* **2012**, *34*, 1459–1463; c) D. Briand, E. Dubreucq, P. Galzy, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1995**, *72*, 1367–1373; d) D. Briand, E. Dubreucq, P. Galzy, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *228*, 169–175.
- [13] D. J. Opperman, M. T. Reetz, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2589–2596.
- [14] J. H. Sattler, M. Fuchs, F. G. Mutti, B. Grischek, P. Engel, J. Pfeffer, J. M. Woodley, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, DOI: 10.1002/anie.201409227; *Angew. Chem.* **2014**, DOI: 10.1002/ange.201409227.