

Diss. ETH NO. 17115

# ENZYMATIC CARBON-CARBON BOND FORMATION INTEGRATED WITH SMB SEPARATION

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

STEFAN KLAUS MAKART  
Dipl. Bot. University of Zurich

born 30.12.1973

citizen of Gempen (SO)

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Sven Panke, examiner  
Prof. Dr. Marco Mazzotti, co-examiner  
Prof. Dr. John M. Woodley, co-examiner

2007

## Abstract

Aldolases constitute a class of biotechnologically promising enzymes that can catalyze the stereoselective formation of carbon-carbon bonds. However, their wider application on a process scale has been hampered as they mostly suffer from an unfavorable position of the reaction equilibrium.

Continuous chromatography, realized as simulated moving bed (SMB), has matured into a reliable and frequently used process option in biotechnology and the pharmaceutical industry over the last years. The high resolution power of continuous chromatography should make it well suited for the purification of products from complex reaction mixtures.

The integrated operation of a SMB unit and an enzyme reactor is proposed in this thesis, as this should theoretically enable to obtain 100 % yield from a thermodynamically limited reaction. The product can be continuously removed while the remaining substrates can be recycled.

The formation of *L-allo*-threonine from glycine and acetaldehyde, catalyzed by the serine hydroxymethyltransferase GlyA from *Escherichia coli*, is used as a model reaction to explore this concept of an integrated process. The enzyme can be functionally categorized as a glycine-dependent aldolase, which introduces two new chiral centers in the product. GlyA was produced in fed-batch fermentations of *E. coli* JM101(pESM3), achieving a yield of 120 mg recombinant protein per gram cell dry weight. This high expression level allowed the direct use of cell free extract in an enzyme membrane reactor (EMR) for the continuous production of *L-allo*-threonine. The stability and activity of the enzyme, with regard to the content of organic co-solvent in the reaction medium, was investigated. A kinetic model was proposed and the according kinetic parameters were estimated for purely aqueous and 20 % methanol-containing reaction medium. The experimental data agreed well with the model, which allowed the development of a suitable model for the EMR.

For the chromatographic separation, a suitable stationary phase was identified that is capable of separating the main components of the reaction mixture, the amino acids glycine and threonine. The separation takes place under enzyme-compatible conditions, i.e. in aqueous buffer at neutral pH, with minor content of organic co-solvent. Experimental SMB runs were performed using the selected stationary phase. High purities were achieved, both in the extract and raffinate outlet stream, indicating the overall feasibility for the integrated process concept.

## Zusammenfassung

Aldolasen bilden eine Klasse biotechnologisch vielversprechender Enzyme, welche die stereoselektive Bildung von Kohlenstoff-Kohlenstoff Bindungen katalysieren können. Deren weitverbreitete industrielle Anwendung wird jedoch behindert durch eine ungünstige Position des Reaktionsgleichgewichtes.

Kontinuierliche Gegenstromchromatographie, basierend auf Simulated Moving Bed (SMB) Technologie, hat sich in den letzten Jahren zu einem zuverlässigen und häufig genutzten Prozess in der Biotechnologie und der pharmazeutischen Industrie entwickelt. Die hervorragende Trennleistung der kontinuierlichen Gegenstromchromatographie prädestiniert sie für die Trennung komplexer Reaktionsgemische.

In dieser Arbeit wird der integrierte Betrieb einer SMB-Anlage und eines Enzymreaktors vorgeschlagen, da dies theoretisch eine hundertprozentige Ausbeute in einer thermodynamisch limitierten Reaktion erlaubt. Das Produkt kann kontinuierlich abgezogen und die verbleibenden Substrate zurückgeführt werden.

Die Bildung von *L-allo*-Threonin aus Glycin und Acetaldehyd, katalysiert durch GlyA, einer Serin-Hydroxymethyltransferase aus *Escherichia coli*, wurde als Modellreaktion ausgewählt zur Untersuchung dieses Konzepts des integrierten Prozesses. Funktionell kann das Enzym als eine Glycin-abhängige Aldolase bezeichnet werden, welche im Produkt zwei neue chirale Zentren einführt. GlyA wurde in gefütterten Satzkulturen von *E. coli* JM101(pESM3) produziert, wobei eine Ausbeute von 120 mg rekombinantem Protein pro Gramm Zelltrockenmasse erreicht wurde. Dieses hohe Niveau der Überexprimierung erlaubte den direkten Gebrauch des zellfreien Extrakts in einem Enzym-Membranreaktor (EMR) zur kontinuierlichen Produktion von *L-allo*-Threonin. Die Stabilität und Aktivität des Enzyms wurde untersucht in Bezug auf den Gehalt an organischem Lösungsmittel im Reaktionsmedium. Ein Modell für die Kinetik wurde aufgestellt und die entsprechenden Parameter dazu wurden bestimmt, sowohl für rein wässriges als auch 20 % Methanol enthaltendes Reaktionsmedium. Die gute Übereinstimmung der experimentellen Daten mit den Modelldaten ermöglichte die Erstellung eines Modells für den EMR.

Eine stationäre Phase konnte gefunden werden, welche für die Trennung der Hauptkomponenten des Reaktionsgemischs, den Aminosäuren Glycin und Threonin, geeignet ist. Die Trennung erfolgt unter enzymkompatiblen Bedingungen, d.h. in gepufferter Lösung bei neutralem pH mit einem geringen Anteil organischen Lösungsmittels. Mit der ausgesuchten stationären Phase wurden experimentelle SMB-Versuche durchgeführt. Die

### III

hohen Reinheiten, welche sowohl im Extrakt als auch im Raffinat erreicht werden konnten, deuten auf die Durchführbarkeit des integrierten Prozesses hin.