

Biotransformationen an Derivaten ungewöhnlicher, cyclischer Aminosäuren

Von der Fakultät Chemie der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von

Oliver Vielhauer

aus Stuttgart

Hauptberichter:

Prof. Dr. C. Syldatk

Mitberichter:

Prof. Dr. R. D. Schmid

Tag der mündlichen Prüfung:

25. November 2002

Institut für Bioverfahrenstechnik
Lehrstuhl Physiologische Mikrobiologie
Universität Stuttgart

2003

Danksagung

Ich möchte allen herzlich danken, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben,

Herrn Prof. Dr. Christoph Syldatk für die Bereitstellung des Themas, die Möglichkeit zu freiem und selbständigem Arbeiten und die Unterstützung neuer Ideen, sowie für die Durchsicht des Manuskriptes,

Herrn Prof. Dr. Rolf D. Schmid für die freundliche Bereitschaft und die Anfertigung des Co-Referates,

Herrn Prof. Dr. Markus Pietzsch für die Betreuung und Diskussionsbereitschaft, die Unterstützung bei der Erschließung von Geldquellen, für das Herstellen wissenschaftlicher Kontakte und für die gleichermaßen schnelle und gründliche Durchsicht des Manuskriptes,

Herrn Prof. Dr. Oliver Reiser für die freundliche Zusammenarbeit, die Bereitstellung von Substraten und für die teilweise Finanzierung der Arbeit aus Mitteln seines Lehrstuhls in Stuttgart,

Dirk Pamperin für seine stets geduldige Hilfe bei der Einarbeitung in die meisten Arbeitstechniken, die GC sowie die Bergsteigerei,

Harald Teves für die Unterstützung bei Rechenaufgaben, vor allem aber für die stets kompakt gehaltenen Mittagspausen am MPI und die aufmunternden und motivierenden Gespräche,

Tomi Waniek, der mir den Weg ins IBVT gewiesen hat, für die vielen lustigen Unternehmungen in und außerhalb des Labors,

Markus Werner für die hübschen gemeinsamen Projekte und Fahrten nach Roßhaupten

Kerstin Ragnitz für den schwäbisch-kulinarischen Debattierzirkel, die Cup-Dänemarks und die Oddentlisch-Lambrusco-Meetings,

Andreas Freund für die allzeit unbürokratische Hilfe bei unterschiedlichsten technischen Problemen und die gemeinsame Zeit am Seil ("stehst Du grad gut?"),

Sandra Baumann für die stets zuverlässige Versorgung mit allerlei Nahrungsmitteln bei Verpflegungs-Engpässen,

Petra Münch für die Einweisung in mikrobiologische Arbeitstechniken,

Ulli Peckmann für die zahlreichen HIWI-Verträge in harten Zeiten,

Renate Moser für die jederzeit anzutreffende freundliche Hilfsbereitschaft bei allem Papierkram,

und allen Kollegen des Instituts für eine schöne und erfahrungsreiche Zeit am IBVT.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung / Abstract	1
2	Einleitung	7
2.1	<i>Ungewöhnliche Aminosäuren.....</i>	7
2.1.1	β -Aminocyclopropan-carbonsäuren (β -ACCs)	8
2.1.2	Biotransformationen an Cyclopropan-carbonsäure-derivaten.....	10
2.1.3	Bedeutung von Piperidin-2-carbonsäure (Pipicolinsäure)	14
2.1.4	Biotransformationen an Pipicolinsäurederivaten	16
2.2	<i>Racemisierung</i>	18
2.3	<i>Aufgabenstellung und Zielsetzung</i>	19
3	Abkürzungsverzeichnis	22
3.1	<i>Strukturformeln.....</i>	22
3.2	<i>Sonstige Abkürzungen</i>	24
4	Material und Methoden	25
4.1	<i>Chemikalien.....</i>	25
4.1.1	Kaliumphosphat-Puffer	25
4.1.2	HPLC-Fließmittel	25
4.1.3	Substrate und Produkte.....	26
4.2	<i>Biokatalysatoren.....</i>	29
4.2.1	Freie Enzyme	29
4.2.2	Mikroorganismen	31
4.3	<i>Analytik.....</i>	33
4.3.1	Bestimmung der Biotrockenmasse.....	33
4.3.2	Enzym-Aktivitätstests	33
4.3.3	Dünnschichtchromatographie.....	37
4.3.4	Gaschromatographie	40
4.3.5	Analytische HPLC	47
4.3.6	Auflösung und Trennfaktor	52
4.3.7	Bestimmung des spezifischen optischen Drehwinkels $[\alpha]_D^{20}$	52

4.3.8	NMR-Spektroskopie	52
4.3.9	Elementaranalysen.....	53
4.4	<i>Derivatisierungen</i>	54
4.4.1	Derivatisierung von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd TsCHO	54
4.4.2	Derivatisierung von N- <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäure BC-S	54
4.5	<i>Versuche zur Abtrennung von Methanol aus Lösungsmittelgemischen</i>	55
4.6	<i>Chemische Eigenschaften von Substraten</i>	56
4.6.1	Stabilität von N- <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester BC-E in wässrigem Milieu.....	56
4.6.2	Stabilität von 2-Oxabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester OBC-E in wässrigem Milieu.....	56
4.6.3	Stabilität von 2-Oxabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester OBC-E in Zweiphasen-Systemen	56
4.6.4	Löslichkeit von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd TsCHO in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer.....	57
4.6.5	Stabilität von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd TsCHO in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer	57
4.6.6	Racemisierungsgeschwindigkeit von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd TsCHO	58
4.7	<i>Bestimmung der Enantioselektivität enzymkatalysierter Reaktionen</i>	60
4.8	<i>Biotransformationen mit N-tert-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester BC-E</i>	62
4.8.1	Enzymatische Esterhydrolyse	62
4.8.2	Enzymatische Umesterungen.....	65
4.9	<i>Biotransformationen mit 2-Oxabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester OBC-E</i>	67
4.9.1	Enzymatische Esterhydrolyse in wässrigem Puffer	67
4.9.2	Enzymatische Umesterungen.....	68
4.10	<i>Biotransformationen mit N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd TsCHO</i>	70
4.10.1	Umsetzungen mit Mikroorganismen	70
4.10.2	Umsetzungen mit freien Enzymen.....	72
4.11	<i>Präparative Umsetzungen</i>	79
4.11.1	Hydrolyse von N- <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester BC-E	79
4.11.2	Reduktion von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd TsCHO	80
5	Ergebnisse	81
5.1	<i>Hydrolyse von N-tert-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester BC-E</i>	81

5.1.1	Umsetzung unter Screening-Bedingungen.....	81
5.1.2	Optimierung der Reaktionsbedingungen.....	82
5.1.3	Hydrolysen von BC-E im präparativen Maßstab.....	89
5.2	<i>Umesterung von N-tert-Butyloxycarbonyl-2-Aza-bicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester BC-E</i>	93
5.2.1	Untersuchung der selektiven Entfernung von Methanol aus Lösungsmittelgemischen mittels Molsieb.....	93
5.2.2	Untersuchung enzymatischer Umesterungsreaktionen.....	95
5.3	<i>Hydrolyse von 2-Oxabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester OBC-E</i>	96
5.3.1	Stabilität von OBC-E in wasserhaltigen Systemen.....	96
5.3.2	Enzymatische Hydrolyse von OBC-E in wässrigem Puffer.....	96
5.4	<i>Enzymkatalysierte Umesterungen von 2-Oxabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester OBC-E</i>	97
5.4.1	Screening auf die enzymatische Alkohololyse von OBC-E	99
5.4.2	Einfluß von Molekularsieb auf die Alkohololyse von OBC-E	101
5.5	<i>Chemische Eigenschaften von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd TsCHO in wässrigen Systemen</i>	102
5.5.1	Analytik.....	102
5.5.2	Stabilität von TsCHO in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer.....	103
5.5.3	Racemisierung von TsCHO in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer.....	105
5.5.4	Löslichkeit von TsCHO in wässrigen Systemen.....	106
5.6	<i>Screening auf Oxidoreduktase-Aktivität für die Reduktion von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd TsCHO</i>	107
5.6.1	Bioreduktion von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd TsCHO mit Mikroorganismen.....	107
5.6.2	Bioreduktion von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd TsCHO mit freien Alkoholdehydrogenasen.....	112
5.7	<i>Optimierung der Reduktion von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd TsCHO mit der Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber</i>	116
5.7.1	Einfluß des pH-Wertes auf die Reduktion von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd TsCHO mit der Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber.....	116
5.7.2	Untersuchungen zur Inhibition der Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber.....	116
5.7.3	Bestimmung von $K_M(\text{NADH})$ und V_{\max} für die Reduktion von TsCHO in Gegenwart von Formiat.....	118
5.7.4	Charakterisierung der Oxidation von Formiat mittels der Formiatdehydrogenase aus <i>Candida boidinii</i> und NAD.....	119
5.8	<i>Kopplung der Bioreduktion von N-p-Toluolsulfonyl-pipecolinaldehyd TsCHO mit dem NADH-Recycling-System Formiat/Formiatdehydrogenase</i>	122

5.8.1	Berechnung der spezifischen Gesamtaktivität des gekoppelten Systems und des optimalen Verhältnisses der Enzyme HLADH und FDH.....	122
5.8.2	Bioreduktion von TsCHO mit gekoppeltem NADH-Recycling im analytischen Maßstab	126
5.8.3	Versuche zur Erhöhung der TTN.....	128
5.9	<i>Bioreduktion von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd TsCHO mit gekoppeltem NADH-Recycling in präparativem Maßstab</i>	130
5.10	<i>Untersuchungen zur enzymatischen Oxidation von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd TsCHO mit der Aldehyddehydrogenase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i></i>	133
6	Diskussion	134
6.1	<i>Hydrolyse von N-tert-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester BC-E.....</i>	134
6.1.1	Optimierung der Reaktionsbedingungen	134
6.1.2	Hydrolyse im präparativen Maßstab	142
6.1.3	Weitere mögliche Verbesserungen	142
6.2	<i>Umesterungen von N-tert-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester BC-E.....</i>	143
6.3	<i>Biotransformationen mit 2-Oxabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester OBC-E</i>	145
6.4	<i>Chemische Eigenschaften von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd TsCHO.....</i>	146
6.4.1	Gleichzeitige Zersetzung und Racemisierung von TsCHO in wäßrigem Phosphatpuffer	146
6.4.2	Messung der Racemisierung von TsCHO	148
6.4.3	Einfluß der chemischen Eigenschaften von TsCHO auf die theoretisch erreichbaren Ausbeuten bei Bioreduktionen	151
6.5	<i>Enantioselektive Bioreduktionen von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd TsCHO.....</i>	155
6.5.1	Screening auf die Bioreduktion von TsCHO	155
6.5.2	Optimierung der Bioreduktion von TsCHO mit der Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber.....	160
6.5.3	Kopplung von Bioreduktion und NADH-Recycling.....	161
6.5.4	Präparative Umsetzung.....	165
6.5.5	Identifizierte Limitierungen.....	166
7	Literatur.....	171

1 Zusammenfassung

Mit dem gestiegenen Bedarf an ungewöhnlichen Aminosäuren für die Herstellung pharmazeutisch wirksamer Verbindungen sind auch die Anstrengungen für ihre Herstellung gewachsen. Zunehmend werden hierfür auch biokatalytische Verfahren herangezogen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten präparativ anwendbare Biotransformationsverfahren für die Darstellung von enantiomerenreinen Derivaten zweier ungewöhnlicher, cyclischer Aminosäuren entwickelt werden: (i) β -Aminocyclopropancarbonsäure **2** (β -ACC) und (ii) Pipecolinsäure **10** (Piperidin-2-carbonsäure). Beide Verbindungen sind als Synthesebausteine für potentiell pharmazeutisch wirksame Verbindungen von Interesse.



Ausgehend von bisher nur racemisch zugänglichem *N-tert*-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester **5**, einem Intermediat aus dem Syntheseweg zu Derivaten von **2**, wurden Möglichkeiten zur stereoselektiven enzymatischen Esterspaltung bzw. Umesterung untersucht. Dazu wurden verschiedene chiralanalytische Methoden etabliert und ein Screening auf Hydrolasen durchgeführt. Hydrolytische Biotransformationen erwiesen sich beim untersuchten System gegenüber enzymatischen Transesterifikationen sowohl von der Geschwindigkeit als auch von der Selektivität her als vorteilhafter. Mit dem unter Screeningbedingungen gleichermaßen aktivsten und selektivsten Enzym, der Lipase B aus *Candida antarctica* (CAL B), wurde nach einer umfangreichen Optimierung der Reaktionsbedingungen ein Verfahren für die kinetische Racematspaltung von **5** entwickelt und angewandt. Am geeignetsten erwies sich ein Zweiphasensystem aus einer wäßrigen Puffer-Phase mit pH 5.0 und Cyclohexan als Cosolvens. In diesem konnte eine Enantioselektivität der Reaktion von $E = 34$ erreicht werden (vgl. Abbildung 1-1). Die dargestellten Produkte (-)-**5** und (+)-**5a** dienen als Edukte für die Synthese von enantiomerenreinen *cis*- und *trans*- β -ACC-Derivaten.

Da bisher beschriebene biokatalytische Verfahren zur Darstellung eines Derivates von **10** durchweg Ausbeuten unter 50 % lieferten, lag der Schwerpunkt auf der Entwicklung einer dynamischen kinetischen Racematspaltung (DKR), die prinzipiell Ausbeuten von 100 % enantiomerenreinem Produkt ermöglicht. Dazu wurde die spontane Racemisierungsfähigkeit eines *N*-geschützten Pipecolinaldehyds **14** ausgenutzt, die mit einer möglichst hochselektiven Biotransformation gekoppelt werden sollte. Bei einem Screening mit kommerziell erhältlichen Dehydrogenasen bzw. Mikroorganismen erwies sich die Biorreduktion von **14** mit der Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber (HLADH) als hochaktiv und enantio-spezifisch. Diese Reduktion wurde mit einer enzymatischen NADH-Regenerierung gekoppelt und das resultierende Batch-System reaktionskinetisch charakterisiert und optimiert (vgl. Abbildung 1-1). Dabei stellte sich die Geschwindigkeit der chemischen Racemisierung von **14** als bestimmend für die Reaktionsdauer und die maximal

erzielbare Ausbeute heraus, während die Löslichkeit von **14** die erreichbare totale Zyklenzahl (TTN) bezüglich des Cofaktors NAD(H) beschränkte.

In einer präparativen Umsetzung wurde N-p-Toluolsulfonyl-D-pipecolinalkohol **15** in 73 % Ausbeute (nach Isolierung) und in enantiomerenreiner Form (ee > 99.5 %) gewonnen. Das Produkt ist selbst ein wertvoller, konfigurationsstabiler Synthesebaustein oder kann leicht chemisch in D-Pipecolinsäure umgewandelt werden.

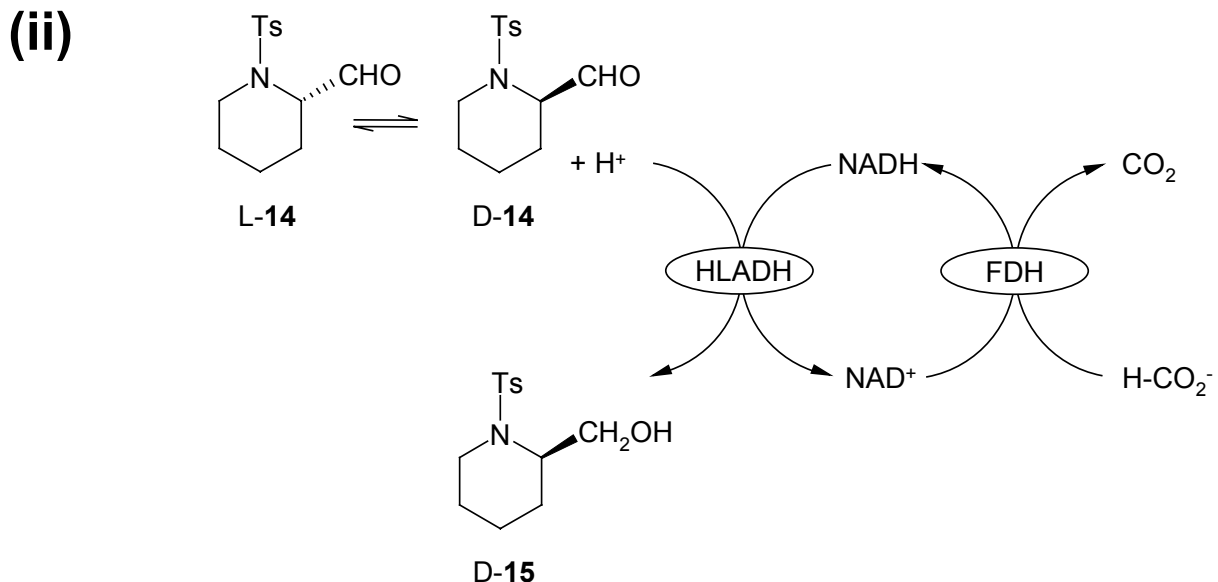
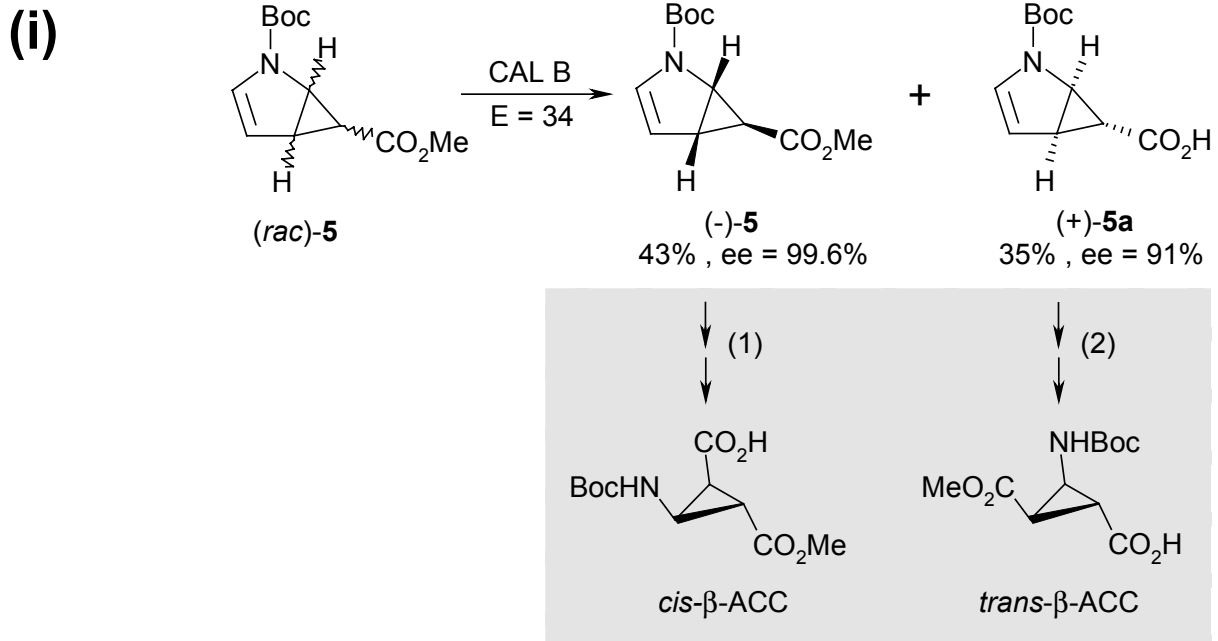


Abbildung 1-1: Übersicht der entwickelten enantioselektiven Biotransformationsverfahren zur Darstellung von (i) β-ACC-Derivaten und (ii) eines Pipecolinsäure-Derivates. Die Weiterverwendung von **5** und **5a** durch chemische Syntheseschritte (1) und (2) ist grau unterlegt. CAL B: Lipase B aus *Candida antarctica*. HLADH: Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber. FDH: Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii*. Boc: tert.-Butyloxycarbonyl. Ts: p-Toluolsulfonyl.

Abstract

Along with the increasing demand for unusual amino acids, e.g. for the production of pharmaceutically active compounds, the efforts towards their synthesis have been intensified.

Within the scope of the present thesis, preparative scale biotransformation processes for the production of enantiomerically pure derivatives of two different unusual, cyclic amino acids should be developed: (i) β -aminocyclopropanecarboxylic acid **2** (β -ACC) and (ii) pipercolic acid **10** (piperidine-2-carboxylic acid). Both compounds are interesting building blocks for the synthesis of pharmaceutically active compounds.



Starting from racemic *N*-*tert*-butyloxycarbonyl-2-azabicyclo[3.1.0]hex-3-ene-6-carboxylic acid methyl ester **5**, an intermediate compound from the chemical synthesis of derivatives of **2**, the possibilities of enzymatic ester hydrolysis and transesterification were studied. For this purpose, several methods of chiral analysis have been established and a screening for hydrolase activity was performed. Hydrolytic biotransformations turned out to be superior in comparison to enzymatic transesterifications, concerning both activity and selectivity. The screening experiments revealed lipase B from *Candida antarctica* (CAL B) as the most active, and what is more, as the most selective enzyme. After extensive optimization of the reaction conditions using this enzyme, a process for the kinetic resolution of **5** in preparative scale could be developed and applied. Most suitable proved a biphasic system consisting of a buffer phase (pH 5.0) and cyclohexane as a cosolvent. Thus, an enantiomeric ratio of $E = 34$ could be reached (see figure 1-1). Thereby obtained compounds (-)-**5** and (+)-**5a** served as chiral starting materials for the synthesis of enantiopure *cis*- and *trans*- β -ACC derivatives.

Biocatalytical methods for the production of optically active derivatives of **10** reported so far all suffered in low yields (< 50 %) and some of them provide in addition products of only moderate enantiomeric purity. Therefore, the main focus in the present work was the development of a DKR process ("dynamic kinetic resolution"), which enables in principle a yield of 100 % of enantio-pure product. For this purpose, the *N*-protected pipercolic aldehyde **14** was chosen as a starting point, because it is known that the compound is able to racemize spontaneously. This very property

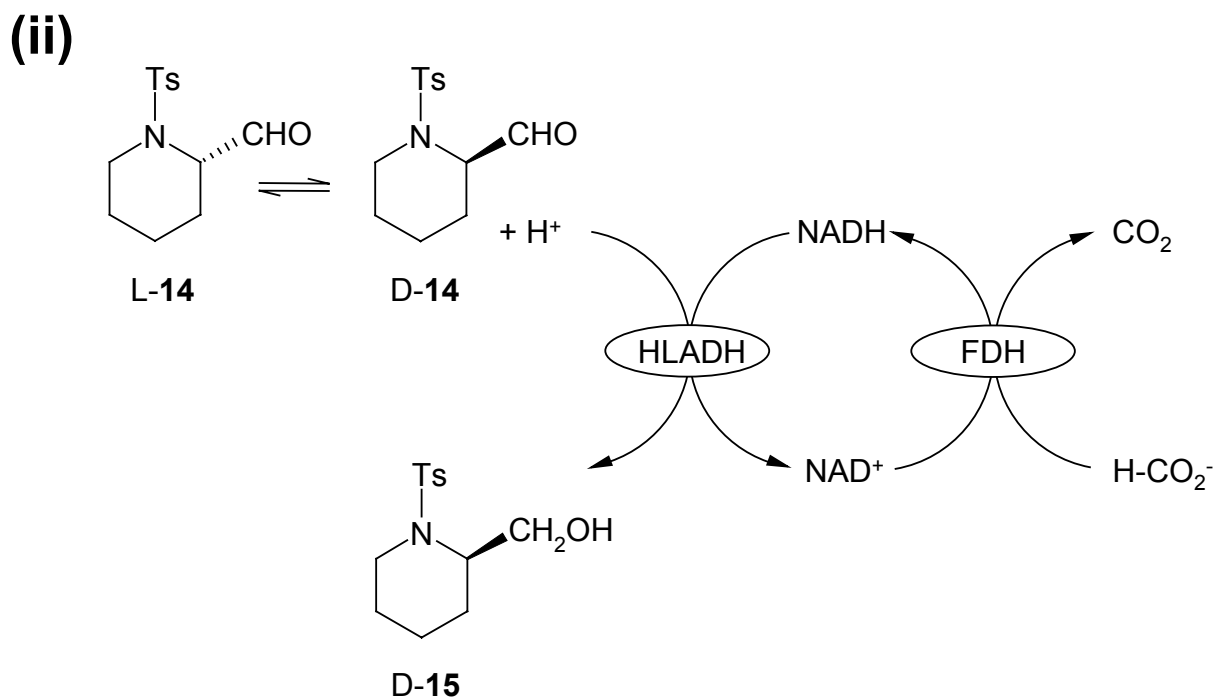
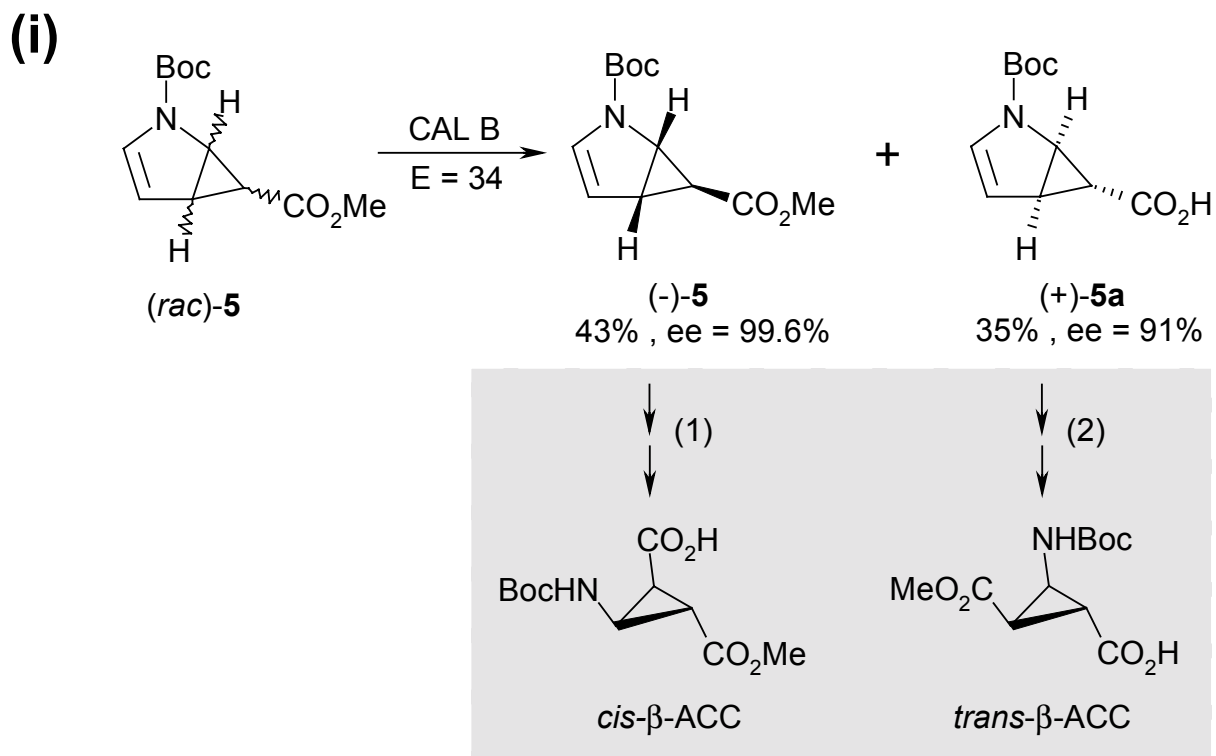


Figure 1-1: Summary of the developed enantioselective biotransformation processes for the production of (i) β -ACC derivatives and (ii) a pipercolic acid derivative. The further utilization of **5** and **5a** by means of chemical synthetic steps (1) and (2) is highlighted by grey marking. CAL B: Lipase B from *Candida antarctica*. HLADH: Alcohol dehydrogenase from horse liver. FDH: Formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. Boc: tert.-Butyloxycarbonyl. Ts: *p*-Toluenesulfonyl.

should be utilized by coupling it with a preferably enantiospecific biotransformation process. After a screening for oxidoreductase activity employing microorganisms and commercially available dehydrogenases, the bioreduction of **14** with the alcohol dehydrogenase from horse liver (HLADH) proved highly active and, what's more important, enantiospecific. The bioreduction was coupled with an enzymatic NADH regeneration method and the reaction kinetics of the resulting batch-system were analyzed. The investigations revealed that the racemization velocity of **14** is crucial for the total reaction time and furthermore limits the maximum yield of the desired product. On the other hand, the total turnover number (TTN) of the reaction system referring to the cofactor NAD(H) is mainly limited by the low solubility of **14** in aqueous buffer. After optimization of the reaction conditions, N-p-toluenesulfonyl-D-pipecolic alcohol **15** was synthesized by means of a preparative scale conversion in 73 % isolated yield and in optically pure form ($ee > 99.5\%$). The compound by itself is a valuable and configurationally stable synthetic building block, or it can easily be converted to D-pipecolic acid by chemical means.

2 Einleitung

2.1 Ungewöhnliche Aminosäuren

In der Natur kommen Aminosäuren überwiegend als Bausteine der Proteine vor. Diese sogenannten proteinogenen L-Aminosäuren finden in der Industrie in den verschiedensten Bereichen Anwendung: Als Nahrungs- und Futtermittelsupplement, Geschmacksverstärker, Süßungsmittel oder Bestandteil von Kosmetika und Arzneimitteln.

In den letzten Jahren ist aber auch das Interesse und der Bedarf an ungewöhnlichen Aminosäuren gestiegen. Dies können natürlich vorkommende, nicht-proteinogene Aminosäuren sein oder aber "unnatürliche", die derzeit in der Natur (noch) nicht bekannt und nur synthetisch zugänglich sind.

Ungewöhnliche, nicht-proteinogene Aminosäuren wie z.B. α -Aminosäuren mit ungewöhnlichen Seitenketten, α -D-Aminosäuren oder β -Aminosäuren kommen in allen Lebewesen als Bausteine unterschiedlichster Verbindungen vor (Bell, 1976; Fowden et al., 1979). Zahlreiche peptidische Naturstoffe z.B. enthalten nicht-proteinogene Aminosäuren. Solche Peptide werden durch nicht-ribosomale Peptidsynthetasen (NRPSs) gebildet und können antimikrobielle, antivirale und immunosuppressive Aktivitäten besitzen. Auch spezielle Funktionen als Chelatoren oder Biotenside kommen vor (Brunner, 1993; Hubbard et al., 2000). Des Weiteren finden sich D-Aminosäuren als essentieller Bestandteil des Peptidoglycangerüsts vieler Prokaryonten. Naturstoffe mit Antitumor-Aktivität können ebenso ungewöhnliche Aminosäuren enthalten, wie solche mit antibiotischer oder antimykotischer Aktivität (Ottenheim, 1985).

Ungewöhnliche Aminosäuren werden aber auch in zunehmendem Maße für die Entwicklung pharmazeutisch wirksamer synthetischer Verbindungen benötigt.

So lassen sich Naturstoffe in ihren pharmakologischen Eigenschaften oft verbessern, wenn Aminosäure-Bausteine durch andere, meist nicht-proteinogene oder unnatürliche Aminosäuren ersetzt werden. Einerseits kann eine erhöhte Stabilität gegenüber Abbaureaktionen im Verdauungstrakt und Blutstrom erreicht werden (Porter et al., 2000), andererseits können durch gezielten Aminosäureaustausch herbeigeführte Konformationsänderungen zu verbesserten Stoffeigenschaften führen (Dougherty, 2000; Ibbá und Hennecke, 1994; Ishida und Inoue, 1999). Beispiele hierfür sind Antibiotika und Chemotherapeutika (Ojima et al., 1999). Die Synthese pharmazeutisch wirksamer Peptidmimetika ist ein weiteres Einsatzfeld für ungewöhnliche Aminosäuren (s.u.).

Mit dem gestiegenen Interesse und Bedarf an ungewöhnlichen natürlichen und unnatürlichen Aminosäuren sind auch die Anstrengungen für ihre Herstellung gewachsen (Ohfuné, 1992). Zunehmend wurden hierfür auch biokatalytische Verfahren herangezogen (*Reviews*: Bommarius et al., 1998 und 2001. Altenbuchner et al., 2001; Ager et al., 2001).

Zwei Beispiele für ungewöhnliche Aminosäuren mit interessanten Eigenschaften sind die unnatürliche β -Aminocyclopropan-carbonsäure (β -ACC) und die natürlich vorkommende, nicht-proteinogene α -Aminosäure Piperidin-2-carbonsäure (Pipicolinsäure). Letztere, cyclische Verbindung ist homolog zur proteinogenen Aminosäure Prolin.

Auf diese beiden Beispiele für ungewöhnliche Aminosäuren wird im folgenden näher eingegangen.

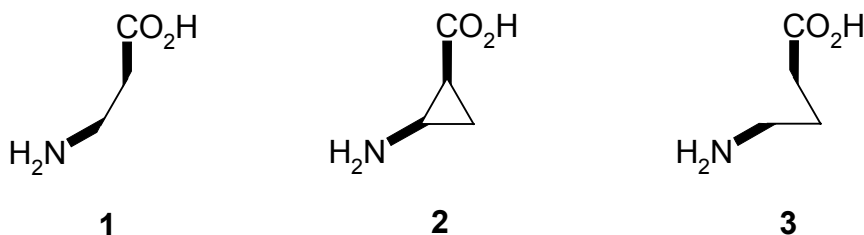
2.1.1 β -Aminocyclopropan-carbonsäuren (β -ACCs)

Von den biologischen Wirkungen der α -Aminocyclopropan-carbonsäuren (α -ACCs) weiß man seit den fünfziger Jahren (Burroughs, 1957. *Review*: Salaün und Baird, 1995). Deshalb und wegen ihrer Anwendung als strukturbeschränkende Bausteine für Peptide haben sie eine gewisse Bedeutung in der Synthese- und Peptidchemie erlangt (z.B.: Moye-Sherman et al., 1999; Gomez-Catalan et al., 2000). Die letzten Jahre brachten eine ganze Reihe eleganter Strategien für die Synthese von α -ACCs hervor (*Reviews*: Doyle et al., 1998; Burgess et al., 1994).

In neuerer Zeit wurden neben den α -Aminosäuren auch β -Aminosäuren und ihre Derivate als wichtige Bestandteile von Naturstoffen (z.B.: Juaristi und Lopez-Ruiz, 1999; Cardillo und Tomasini, 1996; Konopelski et al., 1991; Kato et al., 1988; Griffith, 1986; Drey, 1977 und 1985), von biologisch aktiven Verbindungen (z.B.: Ojima et al., 1999; Scarborough, 1999; Qureshi et al., 2000; Seebach et al., 1998; Porter et al., 2000) und als interessante Bausteine in Peptiden erkannt, am spektakulärsten wohl als Bestandteile der neu entdeckten Stoffklasse der β -Peptide (*Reviews*: Seebach und Matthews, 1997; Gellman, 1998; Iverson, 1997. *Beispiele*: Seebach et al., 1999; Apella et al., 1997).

Dementsprechend ist die Synthese von enantiomerenreinen β -Aminosäuren zur Zeit Gegenstand intensiver Forschung (*Übersicht über Synthesemethoden*: Juaristi und Lopez-Ruiz, 1999; Juaristi, 1997. *Übersicht über neuere Literatur*: Beumer et al., 2000. *Neuere Entwicklungen*: Palomo et al., 2000; Tang und Ellman, 1999; Miyabe et al., 1999; Marcotte et al., 1999; Nocioni et al., 1999; Davies und Ichihara, 1999).

Dagegen beschäftigen sich nur relativ wenige Arbeiten mit der Synthese von β -Aminocyclopropan-carbonsäuren (β -ACCs) **2** (Cannon und Garst, 1975; Paulini und Reissig, 1991; Bubert et al., 1994) und ihrer anschließenden Einführung in Peptide (North, 2000; Paulini und Reissig, 1994; Beck-Sickinger et al., 1994; Hibbs et al., 1997; Voigt et al., 1997; Bubert et al. 1997). Dies mag an der Tatsache liegen, daß β -ACCs als vicinal Donor-Akzeptor-substituierte Cyclopropane sehr zu Ringöffnungen neigen (Fülöp, 2001; Reissig, 1988). So war es bislang nicht möglich, Derivate von **2** mit ungeschützter Aminogruppe zu isolieren (Beumer et al., 2000). Dementsprechend müssen bei der Synthese von **2** und der nachfolgenden Verwendung als Peptidbausteine spezielle Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden.



Abgesehen von diesen besonderen "chemischen" Anforderungen haben β -ACCs als konformationsstarre Derivate von β -Alanin **1** oder γ -Aminobuttersäure (GABA) **3** aber äußerst interessante Eigenschaften, vor allem als Bausteine von Peptiden (North, 2000). So erwies sich β -Alanin **1** bei der Erzeugung von Haarnadelkurven (" β - und γ -

turns") in Peptiden als sehr effektiv (Lombardi et al., 1996; Pavone et al., 1992). Aus diesem Grund sind auch *cis*-konfigurierte 2-Aminocyclopropancarbonsäuren **2** besonders interessante Moleküle. Molekülmechanische Rechnungen deuteten darauf hin, daß die *cis*-Stellung von Amino- und Carboxylgruppe zur Erzeugung von Haarnadelkurven ideal geeignet sein sollte (Bubert et al., 1997). Überdies führt die Verbrückung von α - und β -C zur Chiralität von **2**, sodaß abhängig von der absoluten Konfiguration die Richtung des induzierten "Turns" bezüglich des restlichen (asymmetrischen) Peptids festgelegt ist.

Ein neuer Syntheseweg zu racemischen β - und γ -Aminosäurederivaten verläuft über die Ozonolyse von cyclischen Enaminen und wurde auch zur Darstellung von N-geschützten Aminocyclopropancarbonsäureestern angewandt (Bubert et al., 1994).

Ein Beispiel hierfür ist die Synthese des N-geschützten Aminocyclopropandicarbonsäureesters (*rac*)-**7** über die Ozonolyse des cyclischen Enamins (*rac*)-**5** (siehe Abbildung 2.1-1; Bubert et al., 1997). Die Cyclopropanierung des Pyrrolderivats **4** verläuft vollständig diastereoselektiv mit Orientierung der Estergruppe zur *exo*-Seite der bicyclischen Struktur in (*rac*)-**5**. Es gelang allerdings bislang nicht, einen chiralen Katalysator zu finden, welcher eine Cyclopropanierung zu optisch aktivem **5** mit präparativ brauchbaren Enantioselektivitäten ermöglichte (Beumer et al., 2000).

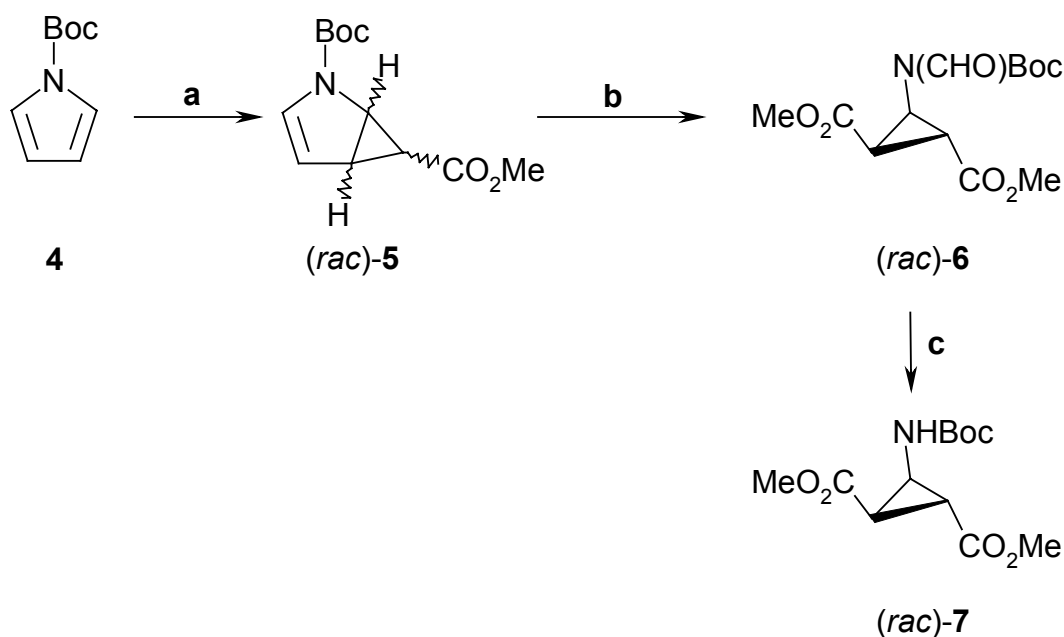


Abbildung 2.1-1: Synthese eines N-geschützten Aminocyclopropandicarbonsäureesters (nach Bubert et al., 1997). Reagenzien: (a) $N_2CHCOOMe$, $Cu(OSO_2CF_3)_2$, $PhNHNH_2$. (b) O_3 , CH_2Cl_2 , $MeOH$, $-78^\circ C$, anschließend Ac_2O , NEt_3 , Raumtemperatur. (c) $KHCO_3$, $MeOH$, H_2O .

Um **7** als strukturbestimmenden Baustein in Peptiden sinnvoll einsetzen zu können, ist die Zugänglichkeit zu **5**, **6** oder **7** in enantiomerenreiner Form notwendig. Da sich eine enantioselektive Cyclopropanierung aber als sehr schwierig erwies, kommen hierfür vor allem Racematspaltungen von (*rac*)-**5**, (*rac*)-**6** oder (*rac*)-**7** mit chemischen oder enzymatischen Methoden in Frage. Dabei ist es sinnvoll, eine Racematspaltung möglichst früh im Verlauf einer Synthese einzusetzen, um die Folgechemie und

Aufarbeitungsschritte nicht unnötig durch das ungewünschte Enantiomer zu belasten.

2.1.2 Biotransformationen an Cyclopropan-carbonsäure-derivaten

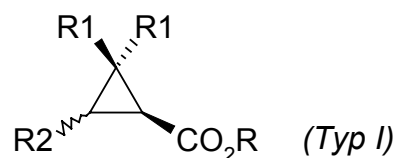
Die seit den achtziger Jahren an Cyclopropan-carbonsäurederivaten durchgeführten Biotransformationen sind recht zahlreich. Dabei handelt es sich ausschließlich um enantioselektive enzymatische Esterhydrolysen mittels Esterasen oder Lipasen. Die eingesetzten Cyclopropan-carbonsäurederivate lassen sich in 3 Grundtypen unterteilen:

- Typ I: Chirale Cyclopropanmonocarbonsäureester
- Typ II: Chirale Cyclopropan-1,1-dicarbonsäureester
- Typ III: Cyclopropan-1,2-dicarbonsäureester (prochiral oder chiral)

Eine Übersicht über enzymatische Racemattrennungen von Verbindungen vom Typ I gibt Tabelle 2.1-1. Reaktionen mit *cis/trans*-Gemischen als Substrat (Einträge 1, 5-7) verliefen allesamt *trans*-spezifisch, d.h. es wurde ausschließlich das Isomer mit zu R2 *trans*-ständiger Esterfunktion hydrolysiert. Eine Besonderheit bildet die Umsetzung eines *cis*-Esters durch die PPL (Lipase aus Schweinepankreas, Eintrag 8, Tabelle 2.1-1). Mit der PLE (Esterase aus Schweineleber) wurden niedrige bis mittlere, mit den übrigen Enzymen mittlere bis sehr gute Enantioselektivitäten erzielt.

In Tabelle 2.1-2 sind vier Verbindungen vom Typ II aufgeführt, die mit Esterasen hydrolysiert wurden. Auch hier wurde jeweils nur die zu R1 *trans*-ständige der beiden nichtäquivalenten Estergruppen angegriffen, d.h. die Enzyme katalysierten die Reaktion regiospezifisch. Zu den Enantioselektivitäten wurden in drei der vier Fälle keine eindeutigen Angaben gemacht.

Tabelle 2.1-1: Enzymatische enantioselektive Esterhydrolysen von racemischen Cyclopropan-carbonsäurederivaten mit der Struktur

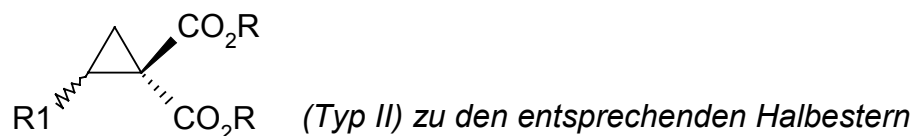


	R1	R2	R	Enzym ¹⁾	Literatur	Selektivität ²⁾
1	H		Et	PLE	Schotten et al., 1985	98.5 % <i>trans</i> , ee _P = 0 %
2	H		Me	PLE	Basak et al., 1997	k.A.
3	H		Et	"P-30 Lipase"	Toy et al., 1997	k.A.
4	Me		Me	CCL	Rao et al., 1994	E = 56
5	Me		Me Et	PLE AGE	Schneider et al., 1984a Nishizawa et al., 1993	100 % <i>trans</i> , E = 4 100 % <i>trans</i> , E > 100
6	Me		Me	PLE	Cottens und Schlosser, 1988	100 % <i>trans</i> , E = 1.6
7	Me		Me	PLE	Schneider et al., 1984a	100 % <i>trans</i> , E = 22
8	Me		Me	PPL	Yadav et al., 1997	E = 30

¹⁾ **AGE**: Esterase aus *Arthrobacter globiformis*; **CCL**: Lipase aus *Candida cylindracea*; **PLE**: Esterase aus Schweineleber; **PPL**: Lipase aus Schweinepankreas

²⁾ Die **Stereoselektivität** bei racemischen *cis/trans*-Substratgemischen wurde in der prozentualen Zusammensetzung des Reaktionsproduktes ausgedrückt. Dabei bezieht sich *trans* auf die Stellung der Carboxylgruppe zu R2. Die **Enantioselektivität** wurde soweit möglich in Form des E-Wertes der Reaktion ("enantiomeric ratio"; Chen et al., 1982; Vgl. auch Abschnitt 4.7) angegeben. Ließ sich dieser nicht aus den jeweils publizierten Daten ermitteln, dann bedeutet ee_P den beobachteten Enantiomerenüberschuß des Produktes, k.A. bedeutet keine Angabe.

Tabelle 2.1-2: Enzymatische enantioselektive Esterhydrolysen von racemischen Cyclopropan-1,1-dicarbonsäurederivaten mit der Struktur



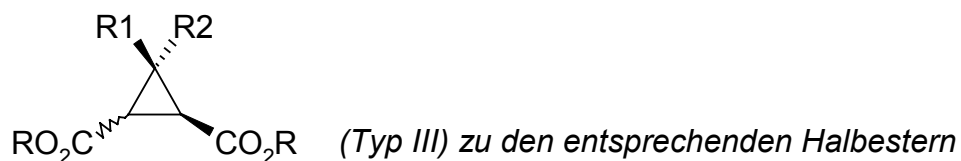
	R1	R	Enzym	Literatur	Selektivität ¹⁾
1		Me	"Esterase 30.000"	Fliche et al., 1991	100 % <i>trans</i> , $ee_p = 97$ %
2	Me	Me	"Esterase 30.000"	Rusconi et al., 1992	100 % <i>trans</i> , E k.A.
3		Me	"Esterase 30.000"	Ariente-Fliche et al., 1992	100 % <i>trans</i> , E = 8
4	NC ^W	Me	"Carboxyl Esterase NP"	Bousquet et al., 1995	100 % <i>trans</i> , E k.A.

¹⁾ Die **Regioselektivität** wurde in der prozentualen Zusammensetzung des gebildeten Halbesters ausgedrückt. Dabei bezieht sich *trans* auf die Stellung der hydrolysierten Carboxylgruppe zu R1. Die **Enantioselektivität** wurde soweit möglich in Form des E-Wertes der Reaktion ("enantiomeric ratio"; Chen et al., 1982) angegeben. Ließ sich dieser nicht aus den jeweils publizierten Daten errechnen, dann bedeutet ee_p den beobachteten Enantiomerenüberschuß des Produktes, k.A. bedeutet keine Angabe.

Vom Typ III (siehe Tabelle 2.1-3) wurden weitaus am meisten Verbindungen enzymatisch umgesetzt. Dabei wurde ausschließlich die Esterase aus Schweineleber (pig liver esterase oder porcine liver esterase, "PLE") verwendet. Eigene Arbeiten deuteten darauf hin, daß Cyclopropan-1,2-dicarbonsäureester keine geeigneten Substrate für Lipasen sind (Vielhauer, 1997). Das geeignetste Substrat für die PLE hingegen ist eindeutig der prochirale, unsubstituierte Cyclopropan-*cis*-1,2-dicarbonsäuredimethylester (Eintrag 1). Diese Reaktion könnte man als eine "klassische" Anwendung der PLE bezeichnen. Mit steigendem sterischen Anspruch von R1 und R2 sinken Aktivität und Enantioselektivität des Enzyms.

Chirale *trans*-Diester wurden nur mit geringen Enantioselektivitäten umgesetzt. Bei einem N-geschützten β -Aminocyclopropan-*trans*-1,2-dicarbonsäuredimethylester mit zwei nicht-äquivalenten Esterfunktionen war auch die Regioselektivität unzureichend (Eintrag 11, Tabelle 2.1-3). Letzteres Beispiel stammt aus eigenen Arbeiten und ist die einzige bislang berichtete Biotransformation an einem β -ACC-Derivat.

Tabelle 2.1-3: Mit der Esterase aus Schweineleber (PLE) katalysierte, enantioselektive Esterhydrolysen von racemischen Cyclopropan-1,2-dicarbonsäurederivaten mit der Struktur



	R1	R2	R	Symmetrie ¹⁾	Literatur	Selektivität ²⁾
1	H	H	Me	<i>cis</i>	Mohr et al., 1983 Schneider et al., 1984 b Sabbioni und Jones, 1987 Walser et al., 1991 Csuk und von Scholz, 1994 Ito et al., 1996	E > 100 E = 32 E = 66 E > 100 E > 100 E > 100
2	H	Me	Me	<i>cis</i>	Walser et al., 1991	E = 21
3	H	Ph	Me	<i>cis</i>	Walser et al., 1991	E = 16
4	Me	Me	Me	<i>cis</i>	Mohr et al., 1983 Schneider et al., 1984 b Walser et al., 1991	E = 2.5 E = 9 E = 7
5	Ph	Ph	Me	<i>cis</i>	Walser et al., 1991	Keine Reaktion
6	H	H	Me	<i>trans</i>	Csuk und von Scholz, 1994	ee _P = 0 %
7	H	H	Et	<i>trans</i>	Csuk und von Scholz, 1994	ee _P = 0 %
8	Me	Me	Me	<i>trans</i>	Schneider et al., 1984 a	E = 7
9	Ph	Ph	Me	<i>trans</i>	Walser et al., 1991	Keine Reaktion
10	H	Ph	Me	<i>trans</i>	Walser et al., 1991	100 % <i>trans</i> , ee _P = 6 %
11	H	NHBoc ³⁾	Me	<i>trans</i>	Vielhauer, 1997	<i>cis/trans</i> = 40:60 ee _P = 0 %

¹⁾ "Symmetrie" bezieht sich auf die Stellung der beiden Esterfunktionen zueinander. Bei *cis*-Stellung liegen prochirale Substrate vor (Einträge 1-5). Bei *trans*-Stellung der Esterfunktionen sind diese zwar chemisch äquivalent wenn R1 = R2 ist, es liegen aber chirale Substrate vor (Einträge 6-9). Unterscheiden sich dagegen R1 und R2, so sind die Esterfunktionen nicht äquivalent und es liegen chirale Substrate vor (Einträge 10 und 11).

²⁾ Die **Regioselektivität** bei nicht äquivalenten Esterfunktionen (Einträge 10 und 11) wurde in der prozentualen Zusammensetzung der entstandenen Halbestern ausgedrückt. Dabei bezieht sich *cis* bzw. *trans* auf die Stellung der hydrolysierten Carboxylgruppe zu R2. Die **Enantioselektivität** wurde soweit möglich in Form des E-Wertes der Reaktion ("enantiomeric ratio"; Chen et al., 1982) angegeben. Ließ sich dieser nicht aus den jeweils publizierten Daten errechnen, dann bedeutet ee_P den beobachteten Enantiomerenüberschuß des Produktes.

³⁾ Boc = *tert*-Butyloxycarbonyl, Me₃C-O-CO-

Schließlich wurden noch drei bicyclische Cyclopropan-carbonsäurederivate enzymatisch hydrolysiert, die in Tabelle 2.1-4 zusammengefaßt sind.

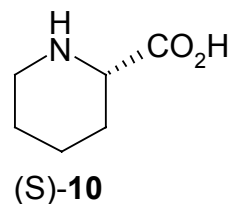
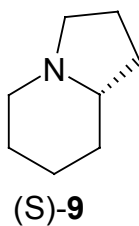
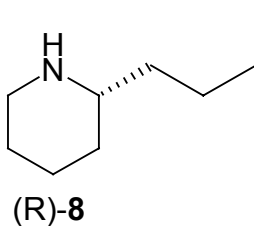
Tabelle 2.1-4: Enzymatische enantioselektive Esterhydrolysen von bicyclischen Cyclopropan-carbonsäurederivaten

	Substrat	Enzym ¹⁾	Literatur	Enantioselektivität ²⁾
1		HLE	Guibe-Jampel et al., 1989	E = 33 ³⁾
2		"PS Lipase"	Tsuji et al., 1999	E = 62 ⁴⁾
3		CAL B	Vielhauer, 1997	E = 24 ⁵⁾

¹⁾ **HLE**: "Horse liver esterase", Esterase aus Pferdeleber; **CAL B**: Lipase aus *Candida antarctica*, "Fraktion B"
²⁾ Die Enantioselektivität wurde in Form des E-Wertes der Reaktion ("enantiomeric ratio"; Chen et al., 1982) angegeben.
³⁾ Hydrolyse des Lactons
⁴⁾ Spezifische Hydrolyse der Ethylesterfunktion
⁵⁾ Wert unsicher

2.1.3 Bedeutung von Piperidin-2-carbonsäure (Pipicolinsäure)

Der Piperidinring ist eine ubiquitäre Struktureinheit in zahlreichen Sekundärmetaboliten und biologisch aktiven Verbindungen. Beispiele für solche Naturstoffe sind Alkaloide mit 2-Alkyl-Piperidin-Struktur wie z.B. (*R*)-Coniin **8** (Plunkett, 1994; Schneider, 1996; O'Hagan, 1997; Bailey et al., 1998), Indolizidin-Alkaloide wie z.B. (*S*)- δ -Conicein **9** (Takahata und Momose, 1993; Michael, 2001) und nicht-proteinogene Aminosäuren wie z.B. (*S*)-Pipicolinsäure **10** (Fowden et al., 1979).



Diese letztgenannte Verbindung tritt in freier Form in Pflanzen (Wickwire et al., 1990 und dort zitierte Literatur) sowie im zentralen Nervensystem im Lysin-Stoffwechsel

auf und wirkt vermutlich als Neuromodulator des GABA (γ -Aminobuttesäure) Rezeptors (Zabriskie et al., 1997; Ho und Zabriskie, 1998). Weiterhin ist sie ein Bestandteil vieler natürlicher Peptide (Sánchez-Sancho und Herradón, 1998 und dort zitierte Literatur). Es wurde festgestellt, daß Pipecolinsäure in Peptiden das Auftreten sogenannter "reversed turns" induziert, die ein wichtiges Strukturelement bei nativ gefalteten Proteinen darstellen. Solche reversed turns werden häufig als Erkennungsregion für intermolekulare Wechselwirkungen beschrieben (Takeuchi et al., 1998).

Außerdem stellen Pipecolinsäure und deren Derivate Vorstufen für die Synthese zahlreicher synthetischer Pharmazeutika dar (Sánchez-Sancho und Herradón, 1998 und dort zitierte Literatur). Beispiele für die zahlreichen bioaktiven Substanzen, die sich von der Pipecolinsäure ableiten, sind

- Analgetika (Vecchietti et al., 1991)
- Anästhetika (Adger et al., 1996; Af Ekenstam und Bovin, 1987)
- Proteinkinase C Inhibitoren (Perumattam et al., 1991)
- Immunsuppressiva FK506 (Rupprecht et al., 1998) und Rapamycin (Khaw et al., 1998)
- Antipsychotika (Patrick and Singletary, 1991)
- Mittel gegen Hyperaktivität bei Kindern (Thai et al., 1998)
- Efraeptine (Peptid-Insektizide, Gupta et al., 1991)
- HIV-Protease-Inhibitoren (Copeland et al., 1990; Fleet et al., 1990)
- Mittel gegen Frühgeburten (Perlow et al., 1992)

Um die biologische Wirksamkeit zu optimieren und Nebeneffekte zu minimieren ist es sinnvoll, Wirkstoffe in enantiomerenreiner Form einzusetzen (Ariëns et al., 1983; Tombo und Bellus, 1991; Crossley, 1992). Dazu sind wiederum optisch reine Pipecolinsäurederivate als Synthesebausteine notwendig. Folglich gibt es intensive Bestrebungen, enantiomerenreine Pipecolinsäure zu synthetisieren, die bis in die jüngste Zeit anhalten.

Die Biosynthese von S-Pipecolinsäure wurde bei dem parasitären Pilz *Rhizoctonia leguminicola* besonders detailliert untersucht (Wickwire et al., 1990). Der Syntheseweg geht von L-Lysin aus und folgt dessen Abbauweg über L-Saccharopin bis zum L-2-Aminoadipinsäuresemialdehyd. Dieser cyclisiert spontan zur Δ^1 -Piperidein-6-carbonsäure, welche schließlich zu Pipecolat reduziert wird. Der Pilz verwendet Pipecolat zur Synthese der toxischen Indolizidin-Alkaloide Slaframin und Swainsonin. Auch andere Organismen wie z.B. Pflanzen synthetisieren Pipecolinsäure von Lysin ausgehend (Meyer und Grobbelaar, 1986).

Die Isolierung des S-Enantiomers der Pipecolinsäure **aus natürlichen Quellen** ist allerdings sehr ineffektiv. So sind aus getrockneten Kleeblättern nur 0.1 % der Verbindung gewinnbar (Rodwell, 1971).

Die nach wie vor verbreitetste Methode zur Gewinnung enantiomerenreiner Pipecolinsäure geht von der leicht zugänglichen racemischen Verbindung aus und besteht in der fraktionierenden **Kristallisation diastereomerer Salze** (Aebischer et al., 1989; Shiraiwa et al., 1991; Hockless et al., 1995). Hierbei müssen aber äquimolare Mengen enantiomerenreiner Hilfssubstanzen eingesetzt werden und die Ausbeuten liegen i. A. mit 25 % nur niedrig.

Selbstverständlich sind zahlreiche **asymmetrische chemische Synthesen** zur Darstellung von optisch aktiver Pipecolinsäure und ihrer Derivate entwickelt worden. Dabei wurde von enantiomerenreinen Vorstufen wie S-Lysin ausgegangen (Kisfaludy und Korenczki, 1982) oder es wurden stereoselektive chemische Schlüsselschritte wie z.B. asymmetrische Aminoacylierung (Koh et al., 1993), diastereoselektive Alkylierung (Myers et al., 1997) und sogar eine asymmetrische Diels-Alder-Cycloaddition (Barluenga et al., 1998) angewandt. Eine gute Übersicht bzgl. der Literatur über neuere Entwicklungen geben auch Sánchez-Sancho und Herradón (1998).

Eine weitere Strategie zur Herstellung von enantiomerenreiner Pipecolinsäure besteht in der selektiven Metabolisierung des S-Enantiomers durch Mikroorganismen und anschließender Gewinnung des R-Enantiomers (Mochizuki et al., 1988; Petersen et al., 2000). Hierbei liegen die maximal erzielbaren Ausbeuten naturgemäß bei 50 %, in der Praxis durch partielle Metabolisierung des R-Enantiomers aber teils noch erheblich niedriger.

2.1.4 Biotransformationen an Pipecolinsäurederivaten

Eine schematische Übersicht über bislang berichtete enantioselektive Biotransformationen an Pipecolinsäurederivaten gibt Abbildung 2.1-2.

Weitaus am häufigsten kamen erwartungsgemäß Hydrolasen zum Einsatz. Dabei wurden N-geschützte und ungeschützte Pipecolinsäureester hydrolysiert (Reaktionen **[1]** und **[4]** in Abbildung 2.1-2; Literatur siehe dort), sowie N-geschützter oder ungeschützter Pipecolinalkohol **11** verestert (Reaktionen **[7]** und **[3]**) oder dessen Acetat hydrolysiert (Reaktion **[2]**). Außerdem wurde über die mit Amidasen in ganzen Zellen katalysierte enantioselektive Hydrolyse von Pipecolinsäureamid **12** berichtet (Reaktion **[5]**).

Alle diese Hydrolase-katalysierten Reaktionen zeigen bestimmte Nachteile wie mangelnde Enantioselektivität oder Aktivität der verwendeten Biokatalysatoren und durchweg niedrige Ausbeuten (siehe Abbildung 2.1-2).

Bekannte Aminoacylasen akzeptieren keine cyclischen Aminosäuren und sind daher nicht wie für acyclische Aminosäuren zur einfachen Racematspaltung von N-Acetyl-(R,S)-Pipecolinsäure einsetzbar (Ng-Youn-Chen et al., 1994).

Ein prinzipiell sehr elegantes "Eintopf"-Verfahren beruht auf der Behandlung von racemischer Pipecolinsäure (R,S)-**10** mit einer D-Aminosäure-Oxidase (Reaktion **[6]** in Abbildung 2.1-2). Bei der selektiven Oxidation der (R)-Pipecolinsäure entsteht das nicht chirale Reaktionsprodukt **13**, welches durch eine unselektive chemische Reduktion wieder ins racemische Substrat überführt wird. Dadurch reichert sich das nicht oxidierte S-Enantiomer des Substrates an und es kann prinzipiell aus racemischer Pipecolinsäure 100 % (R)-Pipecolinsäure gewonnen werden. Allerdings lag der Maßstab der Versuche mit 6.4 mg weit von einer präparativen Nutzbarkeit entfernt. Außerdem schädigt das bei der Oxidase-Reaktion frei werdende Wasserstoffperoxid das Enzym und den zuzusetzenden Cofaktor FAD, was zu kurzen Standzeiten des Prozesses führt.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß bislang noch kein Biotransformationsverfahren zur Herstellung von enantiomerenreinen

Pipecolinsäurederivaten entwickelt werden konnte, welches in präparativem Maßstab hohe Ausbeuten liefert.

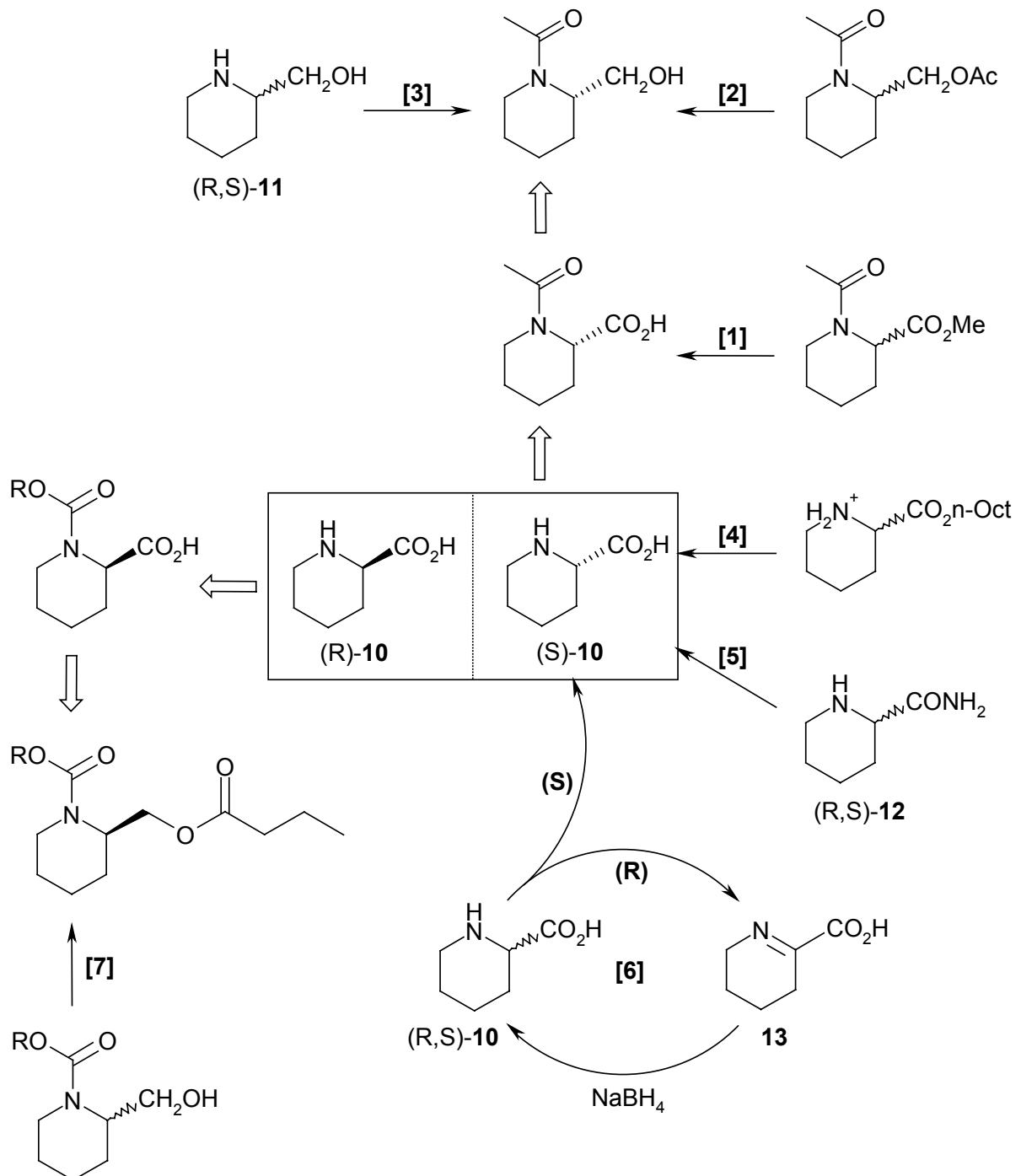


Abbildung 2.1-2: Enantioselektive Biotransformationen an Pipecolinsäurederivaten. Detailangaben zu den einzelnen Reaktionen [1] – [7] finden sich in Tabelle 2.1-5.

Tabelle 2.1-5: Daten zu den literaturbekannten Biotransformationen an Pipecolinsäurederivaten aus Abbildung 2.1-2.

Rkt. # ¹⁾	Biokatalysator	Reaktionsbedingungen	Enantioselectivität	Literatur
[1]	Esterase aus Schweineleber (PLE)	RT ²⁾ , pH 7	E ³⁾ = 3.4	Toone und Jones, 1987
[2]	Esterase aus Schweineleber (PLE)	RT, pH 7	E = 4.1	Toone und Jones, 1987
[3]	Lipase aus Schweinepankreas (PPL)	RT, Ethylacetat	E = 7	Asensio et al., 1991
[4]	Partiell aufgereinigte Lipase aus <i>Aspergillus niger</i> (ANL)	RT, pH 5	E = 60 (19 % Ausbeute)	Ng-Youn-Chen et al., 1994
[5]	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	30 °C, pH 7	ee _p ⁴⁾ = 97.3% (20 % Ausbeute)	Eichhorn et al., 1997
[6]	D-Aminosäureoxidase aus Schweinenieren	FAD, Rinder-Serumalbumin, O ₂ , NaBH ₄ , 37 °C, pH 8	ee _s ⁴⁾ > 99 % (99 % Ausbeute)	Huh et al., 1992
[7]	Acylase I aus <i>Aspergillus spec.</i> (AA-I)	RT, feuchtes Toluol	E = 33 (R = Benzyl) E = 25 (R = <i>tert</i> -Butyl)	Sánchez-Sancho und Herradón, 1998

¹⁾ Schematische Darstellung der Reaktionen siehe Abbildung 2.1-2.
²⁾ RT = Raumtemperatur.
³⁾ E-Wert für die Enantioselectivität nach Chen et al. (1982).
⁴⁾ ee_p, ee_s: Enantiomerenüberschuß des Produktes bzw. des Substrates.

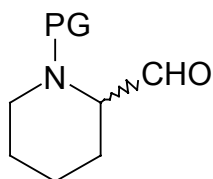
2.2 Racemisierung

Die Entwicklung von Prozessen, bei denen eine *in-situ* Racemisierung in Kombination mit Racemattrennungsprozessen eingesetzt wird, stellt ein interessantes Aufgabengebiet für die asymmetrische Synthese dar, weil sich hierdurch Ausbeuten an optisch reinem Produkt von bis zu 100 % bezogen auf das racemische Ausgangsmaterial erzielen lassen (Noyori et al., 1995; Ward, 1995; Caddick und Jenkins, 1996; Ebbers et al., 1997).

Auch in Biotransformationsprozessen wurden solche sog. "dynamische kinetische Racematspaltungen" (dynamic kinetic resolutions) in jüngerer Zeit zunehmend entwickelt und angewandt (*Reviews*: Huerta et al., 2001; Faber, 2001; El Gihani und Williams, 1999; Strauss et al., 1999; Stecher und Faber, 1997). Grundlage für derartige Verfahren ist die Möglichkeit, das Substrat einer möglichst hoch enantioselectiven (enzymatischen) Reaktion unter Reaktionsbedingungen racemisieren zu können. Dies kann spontan und mit chemischen oder biologischen Racemisierungskatalysatoren geschehen.

Die im vorigen Abschnitt beschriebenen Biotransformationen an Pipecolinsäurederivaten wiesen diese Möglichkeit nicht auf, da die verwendeten Substrate konfigurationsstabil sind und kein Racemisierungs-(Bio-)katalysator zur Verfügung stand. Eine Ausnahme bildet Reaktion **[6]** (Abbildung 2.1-2), die durch chemisches Recycling des racemischen Reaktionsproduktes eine vollständige Deracemisierung des Substrates erreicht.

Bekanntermaßen konfigurations-labile Pipecolinsäurederivate sind N-geschützte Pipecolinaldehyd **14**. Wie alle α -Aminoaldehyde zeigen sie eine Tendenz, spontan zu racemisieren und ihre Synthese, Handhabung und Aufbewahrung macht eine besondere Sorgfalt nötig (Review: Jurczak und Golebiowski, 1989. Lubell und Rapoport, 1987; Braun und Opdenbusch, 1997).



14, PG = Schutzgruppe

Diese Tendenz zu spontaner Racemisierung könnte vorteilhaft ausgenutzt werden, wenn es gelänge eine enantioselektive Reaktion (z.B. eine Reduktion des Aldehyds durch Alkoholdehydrogenasen) gleichzeitig durchzuführen. Der entstehende enantiomerenreine Alkohol wäre ein wertvoller, stabiler und lagerfähiger Synthesebaustein für eine ganze Reihe von biologisch aktiven Verbindungen und Naturstoffen (vgl. Abschnitt 2.1.3).

2.3 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand in der Entwicklung von enantioselektiven Biotransformationsverfahren zur präparativen Darstellung von enantiomerenreinen Derivaten der einleitend erwähnten ungewöhnlichen Aminosäuren β -Aminocyclopropan-carbonsäure **2** und Pipecolinsäure **10**.

Im ersten Fall kamen zwei Intermediate einer Synthesefolge für β -Aminocyclopropan-carbonsäuren für eine enzymatische Racematspaltung in Frage (vgl. Abbildung 2.1-1): Der bicyclische Cyclopropan-carbonsäureester (*rac*)-**5** und der β -Aminocyclopropan-dicarbonsäureester (*rac*)-**7**. In einer vorangegangenen Arbeit wurde für beide Substanzen bereits ein Enzym-Screening und die Charakterisierung der aussichtsreichsten Enzyme durchgeführt (Vielhauer, 1997). Dabei konnte für (*rac*)-**7** kein aussichtsreicher Ansatzpunkt für eine enzymatische Racematspaltung gefunden werden (vgl. Tabelle 2.1-3, Eintrag 11). Für die enantioselektive Hydrolyse von (*rac*)-**5** wurde mit der Lipase aus *Candida antarctica* ein möglicher Ausgangspunkt gefunden (vgl. Tabelle 2.1-4, Eintrag 3), die zur Charakterisierung des Enzyms in analytischem Maßstab durchgeführten Reaktionen waren von einer präparativen Anwendbarkeit jedoch noch weit entfernt. Hauptaufgabe bestand somit darin, die Reaktionsbedingungen für die Hydrolyse von (*rac*)-**5** soweit zu optimieren,

daß die Verbindung in präparativen Mengen enantiomerenrein zugänglich würde. Dies war mit chemischen Methoden bislang nicht gelungen (vgl. Abschnitt 2.1.1).

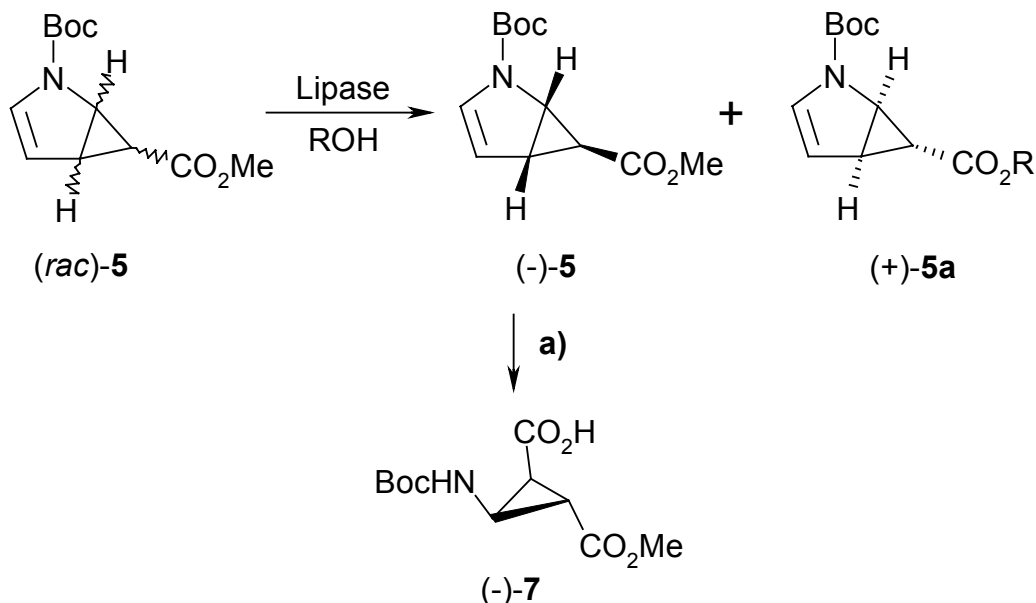


Abbildung 2.3-1: Zu untersuchende Reaktionen des Substrates N-tert-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester (rac)-5. R = H: Hydrolyse; R = Alkyl: Umesterung. a): Chemische Folgeschritte (Bubert et al., 1997).

Weiterhin sollte das bisher nicht untersuchte Potential von lipasekatalysierten enantioselektiven Umesterungsreaktionen ($R \neq H$ in Abbildung 2.3-1) für die Darstellung von enantiomerenreinem **5** untersucht werden. Am Ende der Arbeit sollte ein praktikables chemo-enzymatisches Verfahren zur Darstellung von optisch reinem **7** stehen und es sollten präparative Mengen an enantiomerenreinem **5** durch eine Biotransformation in entsprechendem Maßstab bereitgestellt werden.

Im Fall der Pipecolinsäure sollte ausgehend von einem N-geschützten Pipecolinaldehyd **14** ein Biotransformationsverfahren für eine dynamische kinetische Racematspaltung mit *in-situ* Racemisierung des Substrates zur Darstellung eines enantiomerenreinen Pipecolinsäurederivats (**15** oder **16**) mit möglichst 100 % Ausbeute entwickelt werden (vgl. Abschnitt 2.2).

Dazu sollten zuerst die Stabilität und die spontane Racemisierung der Ausgangsverbindung **14** in wäßrigen Medien quantitativ untersucht werden, da entsprechende Angaben in der Literatur fehlen.

Anschließend mußte ein Screening auf einen Biokatalysator für eine geeignete Reduktions- oder Oxidationsreaktion erfolgen. Hierzu sollten sowohl ganze Zellen als auch isolierte Enzyme in Betracht kommen. Bei Auffinden eines geeigneten Biokatalystors wären die Reaktionsbedingungen im Hinblick auf eine Umsetzung im präparativen Maßstab zu optimieren und evtl. (im Fall von isolierten Enzymen) die Ankopplung eines Cofaktor-Recycling-Systems zu etablieren.

Das entwickelte Verfahren sollte zur Darstellung eines optisch reinen Pipecolinsäurederivats in präparativer Menge angewandt und Limitierungen identifiziert werden.

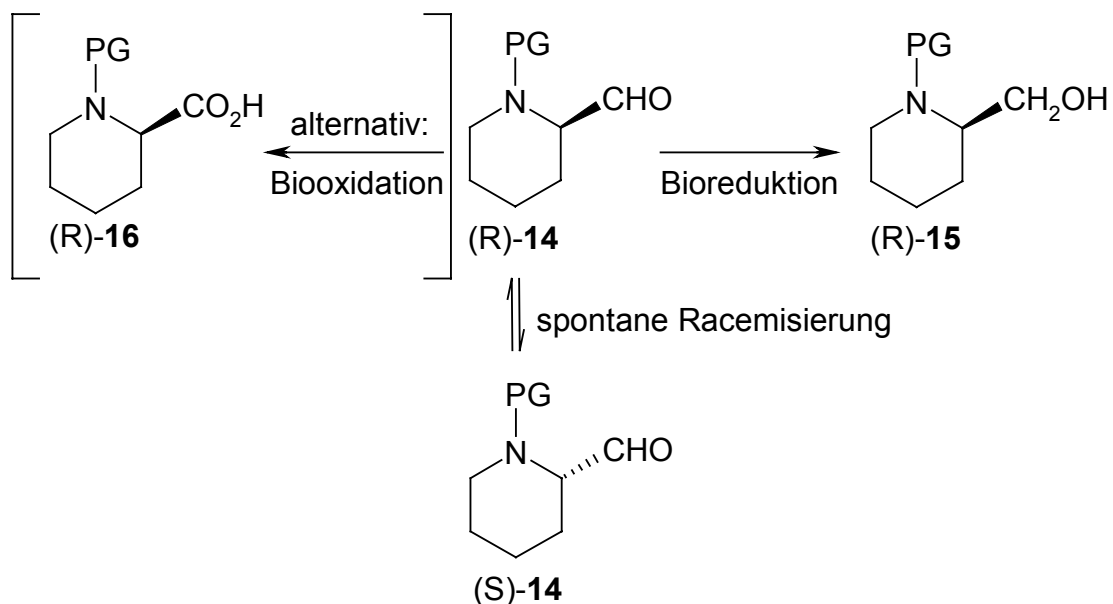
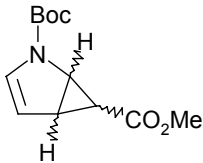
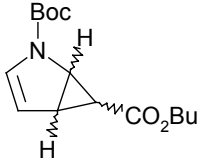
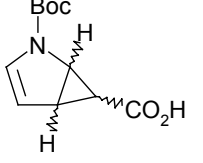
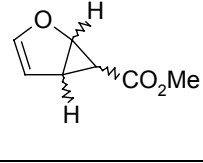
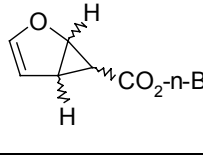
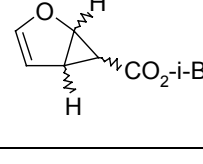
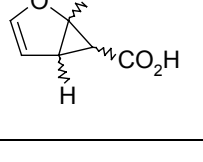


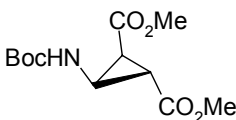
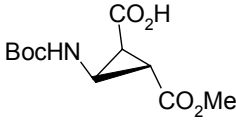
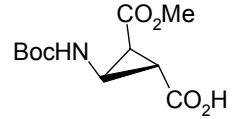
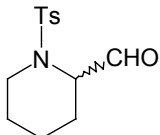
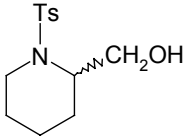
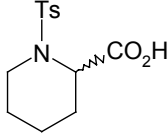
Abbildung 2.3-2: Angestrebtes Verfahrensprinzip für die dynamische kinetische Racematspaltung eines N-geschützten Pipecolinaldehyds **14** zur Darstellung eines enantiomerenreinen Pipecolinsäurederivats (**15** oder **16**) am Beispiel einer R-selektiven Biotransformation. PG: Acyl-Schutzgruppe.

3 Abkürzungsverzeichnis

3.1 Strukturformeln

Tabelle 3.1-1: Strukturformeln der untersuchten Substrate und Produkte. Dargestellt sind die jeweiligen Racemate

Strukturformel	Name	Abkürzung
	N- <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester	BC-E
	N- <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäurebutylester	BC-Bu
	N- <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäure	BC-S
	2-Oxabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester	OBC-E
	2-Oxabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäure- <i>n</i> -butylester	OBC-Bu
	2-Oxabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäureisobutylester	OBC-iBu
	2-Oxabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäure	OBC-S

	<i>N-tert</i> -Butyloxycarbonyl-3-amino-cyclopropan-1,2-dicarbonsäure-dimethylester	CP-EE
	<i>cis-N-tert</i> -Butyloxycarbonyl-3-amino-cyclopropan-1,2-dicarbonsäure-2-monomethylester	<i>cis</i>-CP-SE
	<i>trans-N-tert</i> -Butyloxycarbonyl-3-amino-cyclopropan-1,2-dicarbonsäure-2-monomethylester	<i>trans</i>-CP-SE
	N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd	TsCHO
	N-p-Toluolsulfonylpipecolinalkohol	TsOH
	N-p-Toluolsulfonylpipecolinsäure	TsCOOH

3.2 Sonstige Abkürzungen

Tabelle 3.2-1: Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen.

Å	10^{-10} m, 1 Angström
ADH	Alkoholdehydrogenase
AldDH	Aldehyddehydrogenase
β-ACC	β-Aminocyclopropancarbonsäure(-Derivat)
BFM	Biofeuchtmasse
Boc-	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-
BTM	Biotrockenmasse
CAL B	Lipase aus <i>Candida antarctica</i> , Fraktion B
CCL	Lipase aus <i>Candida Cylindracea</i>
CD	Cyclodextrin
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	E-Wert ("enantiomeric ratio") nach Chen et al., 1982
EA	Spezifische Enzymaktivität [U/mg]
ee _P (ee _S)	Enantiomerenüberschuß von Produkt (Substrat)
EMR	Enzym-Membranreaktor
Et ₂ O	Diethylether
EtOAc	Ethylacetat
FDH	Formiatdehydrogenase
GC	Gaschromatographie
Gl.	Gleichung
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
HV	Hochvakuum (< 10 ⁻² mbar)
KR	Kunststoffreaktionsgefäß mit Schnappdeckel, i. d. R. 1.5 ml
Lit.	Literatur
lyo.	lyophilisiert
MeOH	Methanol
MM	Michaelis-Menten
PLE	Esterase aus Schweineleber
PPL	Lipase aus Schweinepankreas ("pig pancreas lipase")
RP	Umkehrphase ("reversed phase")
RT	Raumtemperatur, hier: 22 – 23 °C
Smp.	Schmelzpunkt
Ts-	Tosyl- = p-Toluolsulfonyl-
TTN	Zyklenzahl ("total turnover number"), definiert als Quotient aus gebildeter Produktmenge und verbrauchter Cofaktormenge
UPM	Umdrehungen pro Minute

4 Material und Methoden

4.1 Chemikalien

Kommerziell erhältliche Substanzen, Lösungsmittel, Trockenmittel etc. wurden in den handelsüblichen Reinheitsgraden von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland), Fluka AG (Buchs, Schweiz), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Riedel-de-Haën GmbH (Seelze, Deutschland) oder Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Zur Herstellung wässriger Lösungen wurde vollentsalztes Wasser (Hausanlage) verwendet, zur Herstellung von RP-HPLC-Fließmitteln Reinstwasser aus einer NANOpure II-Anlage (Fa. Barnstead, Newton, MA, USA).

Die Herkunft bzw. Synthese kommerziell nicht erhältlicher Substanzen wird an entsprechender Stelle genannt.

4.1.1 Kaliumphosphat-Puffer

Im Rahmen der Arbeit wurde ausschließlich Kaliumphosphat-Puffer verwendet, wenn nicht anders erwähnt in einer Konzentration von 0.1 mol/l. Zur Herstellung wurden 1M-Lösungen von Kaliumdihydrogenphosphat und Dikaliumhydrogenphosphat im entsprechenden Verhältnis (Sambrook et al., 1989) gemischt und verdünnt. Der pH-Wert wurde jeweils bei RT kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert.

4.1.2 HPLC-Fließmittel

4.1.2.1 RP-18-Analytik

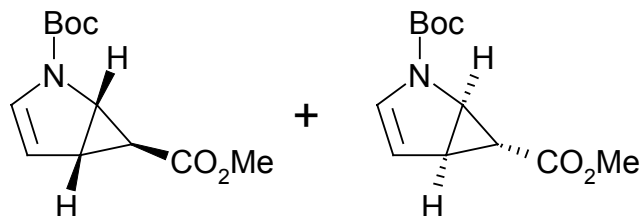
Zu 2 l Reinstwasser wurden 500 ml Methanol und 7 ml Phosphorsäure (85 %) gegeben. Die Lösung wurde über 0.45 µm Membranfilter (Nylon, Gelman Science, Deutschland) filtriert und ca. 15 min. unter Rühren mit Helium entgast.

4.1.2.2 Chiralanalytik

Für die Chiralanalytik mit verschiedenen Cyclodextrin-Trennsäulen wurde zu RP-18-HPLC-Fließmittel (s.o.) je nach Trennproblem gegebenenfalls Methanol zugesetzt, mit konzentrierter Natronlauge auf pH 3.2 – 3.7 eingestellt und erneut filtriert und entgast (s.o.). Der Methanolgehalt verschiedener Fließmittel betrug zwischen 20 und 40 % (v/v) und ist neben dem genauen pH-Wert an entsprechender Stelle genannt.

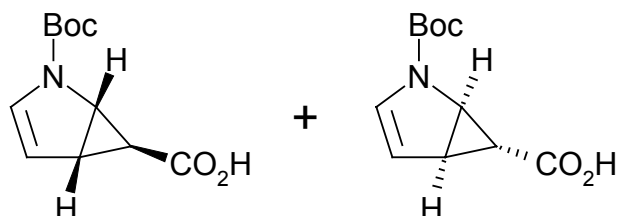
4.1.3 Substrate und Produkte

4.1.3.1 *rac*-N-*tert*-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester



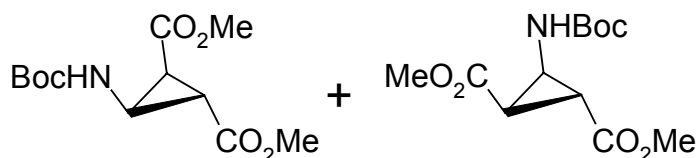
Die als Substrat für Biotransformationen verwendete racemische Substanz lag in Form einer fast farblosen, wachsartigen Masse vor.

4.1.3.2 *rac*-N-*tert*-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäure



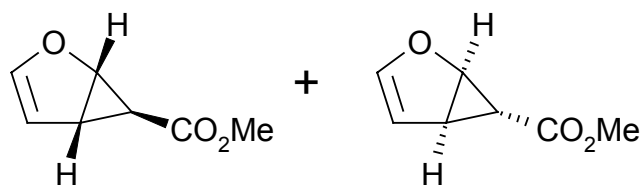
Die als Standard für Biotransformationsprodukte verwendete racemische Substanz lag als schwach braunes, feines Pulver vor.

4.1.3.3 *rac*-N-*tert*-Butyloxycarbonyl-3-amino-cyclopropan-1,2-dicarbonsäure-dimethylester



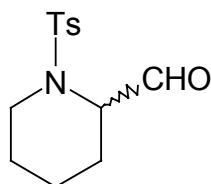
Dieser als Substrat verwendete racemische Cyclopropandicarbonsäureester lag als feines, farbloses Pulver vor.

4.1.3.4 2-Oxabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester



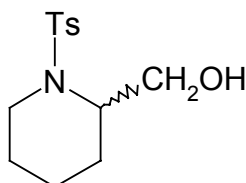
Die als Substrat für Biotransformationen verwendete Substanz lag racemisch in Form eines farblosen Öls vor.

4.1.3.5 N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd



Dieser racemische N-geschützte α -Aminoaldehyd wurde als Substrat verwendet und lag als gelbliche, spröde Brocken vor.

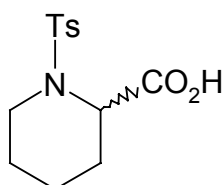
4.1.3.6 N-p-Toluolsulfonylpipecolinalkohol



Die als Standard für Biotransformationsprodukte verwendete racemische Substanz lag in Form farbloser spröder Brocken vor.

Alle bisher aufgelisteten Substanzen wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. O. Reiser, Institut für Organische Chemie der Universität Regensburg (vormals ansässig am Institut für Organische Chemie und Isotopenforschung der Universität Stuttgart) zur Verfügung gestellt.

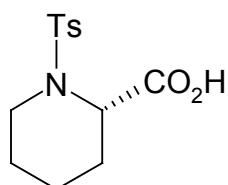
4.1.3.7 D,L-N-p-Toluolsulfonylpipecolinsäure



Diese N-geschützte Pipecolinsäure wurde als Standardsubstanz für die Analytik synthetisiert. Dazu wurden analog einer Literaturvorschrift (Moss et al., 1992) 1.29g (10 mmol) D,L-Pipecolinsäure in 10 ml (20 mmol) 2M-NaOH gelöst. Nach Zusatz von 1.91g (10 mmol) p-Toluolsulfonylchlorid in 10 ml Diethylether wurde bei RT über Nacht mit maximaler Rührerdrehzahl magnetisch gerührt. Danach wurde die Etherphase abgetrennt und die wäßrige mit 1N-HCl auf pH 3 angesäuert, wobei sich das Produkt als farbloses Öl abschied. Die Mischung wurde 3 mal mit Diethylether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Dabei kristallisierte das zurückbleibende farblose Öl. Das Rohprodukt (2.00g, 71 %, Lit.: 76 %) wurde aus c-Hexan / Ethylacetat umkristallisiert. Es blieben 1.84g (65 %) farblose Kristalle, Smp. 111.5 °C (Lit.: 100-101 °C), DC- und HPLC-rein. Elementaranalyse: C, 55.01; H, 6.04; N, 4.91 (Berechnet für C₁₃H₁₇NO₄S: C, 55.10; H, 6.05; N, 4.94).

$^1\text{H-NMR}$ (250.1 MHz, CDCl_3): δ = 1.28-1.47 (m, 2H, CH_2), 1.61-1.80 (m, 3H, CH_2), 2.15 (b dd, J = 14.0, 1.9 Hz, 1H, CH_2), 2.42 (s, 3H, Ts- CH_3), 3.20 (dt, J = 12.5, 3.0 Hz, 1H, 6'-H), 3.74 (b d, J = 13.2 Hz, 1H, 6'-H), 4.77 (d, J = 3.9 Hz, 1H, 2-H), 7.27 (d, J = 8.0 Hz, 2H, Ts- H_A), 7.69 (d, J = 8.3 Hz, 2H, Ts- H_B), 10.95 (b s, 1H, CO_2H). Die $^1\text{H-NMR}$ -Daten stimmen mit denen in der Literatur überein (Moss et al., 1992).

4.1.3.8 L(-)-N-p-Toluolsulfonylpipecolinsäure



Die als Standard für die Chiralanalytik benötigte Substanz wurde analog der racemischen Verbindung (s.o.) aus 50.0 mg (0.39 mmol) L-Pipecolinsäure in 390 μl (0.78 μmol) 2M-NaOH und 1.91g (0.39 mmol) p-Toluolsulfonylchlorid hergestellt. Das nach Trocknung im Hochvakuum als Rohprodukt anfallende farblose, klare Öl (79 mg, 72 %) kristallisierte nicht: $[\alpha]_D^{25} = -32.0$ (c 0.197, CHCl_3). Es wurde per Chiral-HPLC (u.a. in Mischung mit der chemisch reinen racemischen Verbindung) als enantiomerenreine L(-)-N-p-Toluolsulfonylpipecolinsäure identifiziert und nicht weiter aufgereinigt oder charakterisiert.

4.2 Biokatalysatoren

4.2.1 Freie Enzyme

Alle verwendeten Enzyme waren kommerziell erhältlich und wurden, teilweise freundlicherweise als Schenkungen, von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland), Fluka AG (Buchs, Schweiz), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland), Amano Pharmaceutical Co., Ltd. (Nagoya, Japan) und Meito Sangyo Co., Ltd. (Tokyo, Japan) bezogen. Sie lagen als Suspension in Ammoniumsulfat (PLE1, PLE2, YADH) bzw. Kaliumphosphat (HLADH1) oder als lyophilisierte Pulver (alle anderen Enzyme, s.u.) vor.

4.2.1.1 Hydrolasen

4.2.1.1.1 Lipasen

Die Herkunft der jeweiligen Lipasen ist in Tabelle 4.2-1 wiedergegeben.

Tabelle 4.2-1: Herkunft der verwendeten Lipasen.

Herstellerbezeichnung	Quelle	Aktivität ¹⁾	Anbieter ²⁾	Lot-Nr.
L-1, Lyo.	<i>Burkholderia sp.</i>	309 (a)	RD	83769541-03
L-2, Lyo.	<i>Candida antarctica</i> B	173 (a)	RD	83833434-01
L-3, Lyo.	<i>Candida Rugosa</i>	5 (a)	RD	83934622-04
L-5, Lyo.	<i>Candida antarctica</i> A	48 (a)	RD	83833529-01
L-6, Lyo.	<i>Pseudomonas sp.</i>	400 (a)	RD	14144334-01
L-7, Lyo.	Schweinepankreas	20 (a)	RD	83934723-04
L-8, Lyo.	<i>Humicola sp.</i>	1130 (a)	RD	83770726-01
L-9, Lyo.	<i>Mucor miehei</i>	407 (a)	RD	83863631-03
Lipase F	<i>Rhizopus javanicus</i>	0.4 (b)	A	NSO 4529
PS Lipase	<i>Pseudomonas cepacia</i>	17.2 (b)	A	LPSAS 01525
Lipase M	<i>Mucor javanicus</i>	3.1 (b)	A	LMR 09525
Lipase R	<i>Penicillium roquefortii</i>	0.7 (b)	A	LRFS 10520
Lipase D	<i>Rhizopus delemar</i>	9.2 (b)	A	40111 TM
Lipase A	<i>Aspergillus niger</i>	0.1 (b)	A	LS 06507
Lipase G	<i>Penicillium cambertii</i>	0.1 (b)	A	LGDS 001507
Lipase-MY	<i>Candida Rugosa</i>	30 (c)	MS	MD7109
Lipase-OF	<i>Candida cylindracea</i>	360 (c)	MS	FA7408
Lipase-PL	<i>Alcaligenes</i>	90 (c)	MS	B3102
Lipase-QL	<i>Alcaligenes</i>	30 (c)	MS	QH7605
Lipase-AL	<i>Achromobacter</i>	20 (c)	MS	8501
Lipase-SL	<i>Pseudomonas cepacia</i>	45 (c)	MS	SL-25
Lipase-TL	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	50 (c)	MS	PL-836
Lipase-UL	<i>Rhizopus</i>	25 (c)	MS	Q119
PPL	Schweinepankreas	30 (b)	F	303001/1

¹⁾ Spezifische Enzymaktivität [U/mg]. Hydrolyse von: (a) Tributyrin, Herstellerangabe; (b) Tributyrin, eigene Messung, vgl. Abschnitt 4.3.2.2.1; (c) Olivenöl, Herstellerangabe.
²⁾ RD: Roche Diagnostics; A: Amano; MS: Meito Sangyo; F: Fluka.

4.2.1.1.2 Esterasen

Die Herkunft der jeweiligen Esterasen ist in Tabelle 4.2-2 wiedergegeben.

Tabelle 4.2-2: Herkunft der verwendeten Esterasen.

Herstellerbezeichnung	Abkürzung	Quelle	Aktivität ¹⁾	Anbieter ²⁾	Lot-Nr.
Esterase from Porcine Liver	PLE 1	Schweineleber	185	S	32H8010
Esterase from Porcine Liver	PLE 2	Schweineleber	300	S	115H7095
E-1	E-1	Schweineleber	50	RD	84092720-01
E-2	E-2	Schweineleber	26	RD	84085523-01

¹⁾ Spezifische Enzymaktivität [U/mg] (Hydrolyse von Ethylbutyrat, Herstellerangaben).
²⁾ S: Sigma; RD: Roche Diagnostics.

4.2.1.2 Dehydrogenasen

4.2.1.2.1 Alkoholdehydrogenasen

Die Herkunft der jeweiligen Alkoholdehydrogenasen ist in Tabelle 4.2-3 wiedergegeben.

Tabelle 4.2-3: Herkunft der verwendeten Alkoholdehydrogenasen.

Herstellerbezeichnung	Abkürzung	Quelle	Aktivität ¹⁾	Anbieter ²⁾	Lot-Nr.
ADH from Yeast	YADH	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	300 (a)	RD	84080729-46
ADH from Horse Liver	HLADH 1	Pferdeleber	2.7 (a)	RD	83877920-63
ADH from Equine Liver	HLADH 2	Pferdeleber	0.30 (a)	S	58H7012
ADH, NADP ⁺ -dependent from <i>Thermoanaerobium brockii</i>	TbADH	<i>Thermoanaerobium brockii</i>	4.7 (b)	S	81H40692
ADH from <i>Lactobacillus kefir</i>	LkADH	<i>Lactobacillus kefir</i>	0.47 (c)	F	52445/1 1195

¹⁾ Spezifische Enzymaktivität [U/mg] für die Oxidation von: (a) Ethanol; (b) 2-Propanol; (c) Acetophenon (Herstellerangaben).
²⁾ RD: Roche Diagnostics; S: Sigma; F: Fluka.

4.2.1.2.2 Sonstige Dehydrogenasen

Außer ADHs wurden noch zwei weitere Dehydrogenasen eingesetzt:

Tabelle 4.2-4: Herkunft der sonst verwendeten Dehydrogenasen.

Herstellerbezeichnung	Abkürzung	Quelle	Aktivität ¹⁾	Anbieter ²⁾	Lot-Nr.
Aldehyde Dehydrogenase from Bakers Yeast	AldDH	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.0 (a)	S	20K1642
Formate Dehydrogenase from <i>Candida boidinii</i>	FDH	<i>Candida boidinii</i>	0.4 (b)	RD	85553532-35

¹⁾ Spezifische Enzymaktivität [U/mg] für die Oxidation von: (a) Acetaldehyd; (b) Natrium-Formiat (Herstellerangaben).
²⁾ RD: Roche Diagnostics; S: Sigma; F: Fluka.

4.2.2 Mikroorganismen

Alle eingesetzten Mikroorganismen waren in der Stammsammlung des Instituts für Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart vorhanden und stammen aus allgemein zugänglichen Stammsammlungen: Deutsche Sammlung Mikroorganismen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland), American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA) und Institute for Fermentation Osaka (IFO, Osaka, Japan). Der Stamm *Saccharomyces cerevisiae* DSM 11285 wurde aus einer kommerziell erhältlichen Bäckerhefe (Eridania, Eridania Lievieto S.p.A., Genua, Italien) isoliert und bei der DSM bestimmt und hinterlegt (Pamperin, 1998). Weiterhin wurde eine kommerziell erhältliche Trockenhefe der Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland) verwendet: "Yeast, *Saccharomyces cerevisiae* (Bakers yeast), Typel "; Lot-Nr. 24H7105.

4.2.2.1 Nährmedien

Alle Mikroorganismen wurden auf Komplexmedien kultiviert, die folgendermaßen zusammengesetzt waren:

Agarmedium

3 g/l Hefeextrakt
 3 g/l Malzextrakt
 5 g/l Pepton
 10 g/l Glucose
 20 g/l Agar

Flüssigkultur

3 g/l Hefeextrakt
 3 g/l Malzextrakt
 5 g/l Pepton
 10 g/l Glucose

Die Medien wurden bei 121 °C und 1 bar Überdruck 20 min autoklaviert. Die Glucose wurde als 40 %ige (m/v) Lösung getrennt von den anderen Mediumsbestandteilen unter den gleichen Bedingungen sterilisiert und anschließend unter sterilen Bedingungen zu den übrigen Mediumsbestandteilen gegeben.

Der pH-Wert der Medien wurde gemäß der ATCC-Vorschrift vor der Sterilisation nicht eingestellt.

4.2.2.2 Agarplatten-Kulturen

Zur Überprüfung der Kulturen auf Kontaminationen unter dem Mikroskop und zwecks einfacherer Zugänglichkeit der Mikroorganismen wurden Agarplatten-Kulturen der verwendeten Stämme ausgehend von den Kulturen in Schrägagarröhrchen aus der Stammsammlung angelegt. Dazu wurden unter sterilen Bedingungen Verdünnungsausstriche in Petrischalen mit Agarmedium hergestellt, 3 Tage bei 30 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert. Diese Kulturen wurden zur Herstellung der Vor- und Hauptkulturen verwendet.

4.2.2.3 Vorkulturen

20 ml Komplexmedium in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen wurden mit je einer Impföse unter sterilen Bedingungen aus Agarplatten-Kulturen (s.o.) angeimpft. Der Erlenmeyerkolben wurde mit einem Cellulosestopfen verschlossen und die Kulturen bei 30 °C und 100 UPM auf einer Schüttelmaschine 28h inkubiert.

4.2.2.4 Hauptkulturen

Auf die Hauptkulturen (200 ml Komplexmedium in einem 1000 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen) wurden unter sterilen Bedingungen 2 ml der jeweiligen Vorkultur überimpft. Danach erfolgte 2-tägige Inkubation bei 30 °C und 100 UPM.

4.2.2.5 Ernte

Die Hauptkulturen wurden nach erfolgter Inkubation jeweils bei 4 °C in 500 ml Zentrifugenbechern für 45 min bei 5000 UPM zentrifugiert und danach der Überstand verworfen. Zur Entfernung von noch anhaftendem Medium wurde in physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) resuspendiert und erneut jeweils bei 4 °C für 45 min bei 5000 UPM zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen. Schließlich wurde für 10 min bei 4 °C und 5000 UPM zentrifugiert und Überstandsreste soweit als möglich entfernt. Die resultierenden Biofeuchtmassen wurden in PE-Folie eingeschweißt und bei -20 °C gelagert.

4.3 Analytik

4.3.1 Bestimmung der Biotrockenmasse

In zuvor konstant gewogenen TS-Röhrchen wurden 5.0 ml der jeweiligen Hauptkulturen bei 5000 UPM 45 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5 ml physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand wieder verworfen und danach die Biofeuchtmasse durch Auswiegen bestimmt. Diese wurde anschließend im Trockenschrank bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, im Exsiccator abgekühlt, ausgewogen und die Biotrockenmasse errechnet.

Im Falle der Trockenhefe "Yeast, Type I" von Sigma wurden zwischen 0.2 und 0.5g der Masse (wie geliefert) in zuvor konstant gewogenen TS-Röhrchen eingewogen und bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Röhrchen wurden im Exsiccator abgekühlt, ausgewogen und die Biotrockenmasse errechnet.

In allen Fällen wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

4.3.2 Enzym-Aktivitätstests

4.3.2.1 Dehydrogenasen

4.3.2.1.1 Meßprinzip

Als Grundlage wurde ein für ADHs etablierter photometrischer Assay (Pamperin 1998) verwendet, welcher teilweise etwas modifiziert wurde. Dabei wird der stark unterschiedliche Extinktionskoeffizient der oxidierten Form (NAD bzw. NADP) und der reduzierten Form (NADH bzw. NADPH) der verwendeten Coenzyme ausgenutzt. Letztere besitzen im Gegensatz zu ersteren bei einer Wellenlänge von 340 nm ein charakteristisches Extinktionsmaximum. Verbrauch bzw. Bildung von NADH oder NADPH können aus dem zeitlichen Verlauf der in einem Zweistrahl-Photometer (Modell Uvikon 930, Fa. Kontron Instruments) gemessenen Extinktion ermittelt werden. Die Daten wurden mittels System-integrierter Software digital aufgezeichnet und wie im folgenden beschrieben ausgewertet.

4.3.2.1.2 Berechnung der Dehydrogenase-Aktivität

Die spezifische Enzymaktivität ergibt sich aus ihrer Definition

$$EA = \frac{\Delta n}{\Delta t m_{\text{Prot.}}} \quad EA : \text{spez. Aktivität [U/mg]}, \Delta n : \text{umgesetzte Stoffmenge [\mu\text{mol}]}$$

$$\Delta t : \text{Reaktionszeit [min]}, m_{\text{Prot.}} : \text{Proteinmasse [mg]}$$

und dem Lambert-Beerschen Gesetz

$$E = \varepsilon c d \quad E : \text{Extinktion}, \varepsilon : \text{molarer Extinktionskoeffizient [l/mol*cm]}$$

$$c : \text{Konzentration [mol/l]}, d : \text{Schichtdicke in der Küvette [cm]}$$

unter Berücksichtigung der Einheiten zu

$$EA = \frac{\Delta E}{\Delta t} \cdot \frac{V}{\epsilon d m_{\text{Prot.}}}$$

V : Reaktionsvolumen [ml]
 ϵ : molarer Extinktionskoeffizient [$\text{cm}^2/\mu\text{mol}$]

Aus dem zeitlichen Verlauf der gemessenen Extinktion kann durch Bestimmung der Anfangssteigung $(\Delta E/\Delta T)_{t=0}$ so die spezifische Enzymaktivität berechnet werden. Für den molaren Extinktionskoeffizienten von NADH bzw. NADPH wurde ein Literaturwert von $\epsilon = 6.22 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol} = 6.22 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ (Budavari, 1987) eingesetzt.

4.3.2.1.3 Standardaktivitätstests

Alkoholdehydrogenasen

In Anlehnung an einen etablierten Test (Pamperin 1998) wurde der Standardtest bei einem pH-Wert von 6.5 durchgeführt. Stammlösungen der Enzyme wurden in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.5 in einer Konzentration von 10 mg/ml bereitete. Diese wurden zur Verwendung in den Tests zum Erhalt sinnvoller Reaktionsraten entsprechend verdünnt (1:10000 bis unverdünnt).

Alle Enzymlösungen wurden bis zum Gebrauch auf Eis gelagert.

Die Standardaktivität der ADHs wurde durch die Reduktion von Acetaldehyd zu Ethanol ermittelt. In einem KR wurden dazu 855 μl 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.5, 25 μl 20 mM Acetaldehyd (88.1 mg Acetaldehyd in 100 ml 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.5) und 100 μl 1 mM NADH (17.7 mg NADH-Dinatriumsalz in 25 ml 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.5) zusammenpipettiert und einige Minuten auf 25 °C vortemperiert. Im Fall der ADHs aus *Thermoanaerobium brockii* bzw. *Lactobacillus kefir* wurde anstatt der NADH-Lösung eine 1 mM NADPH-Lösung (8.3 mg NADPH-Tetranatriumsalz in 10 ml 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.5) verwendet.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μl der jeweiligen Enzymlösung und anschließendes kurzes Vortexen gestartet. Die Reaktionslösung wurde sofort in eine Halbmikro-UV-Kunststoffküvette überführt und die Photometer-Messung gestartet.

Aldehyddehydrogenase aus Saccharomyces cerevisiae

Die Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität der AldDH erfolgte durch die Oxidation von Acetaldehyd zu Acetat. Der für ADHs etablierte Test wurde hierfür folgendermaßen abgewandelt: In einem KR wurden 830 μl 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 8.0, 50 μl 20 mM Acetaldehyd (88.1 mg Acetaldehyd in 100 ml 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 8.0) und 100 μl 10 mM NAD (66.3 mg NAD in 10 ml 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 8.0) zusammenpipettiert und einige Minuten auf 25 °C vortemperiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μl Enzymlösung (1 mg/ml) und anschließendes kurzes Vortexen gestartet. Die Reaktionslösung wurde sofort in eine Halbmikro-UV-Kunststoffküvette überführt und die Photometer-Messung gestartet.

Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii*

Geeignete Bedingungen für die Oxidation von Formiat zu CO₂ wurden aus der Produktbeschreibung des Enzyms (Roche Diagnostics, 1999) und durch Variation der Substrat- und Cofaktorkonzentrationen ermittelt. Daraus wurde folgender Standard-Assay abgeleitet:

In einem KR wurden 730 µl 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 8.0, 100 µl 1 M Natriumformiat (17.00 g Natriumformiat in 250 ml 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 8.0) und 100 µl 10 mM NAD (66.3 mg NAD in 10 ml 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 8.0) zusammenpipettiert und einige Minuten auf 25 °C vortemperierte. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 µl Enzymlösung (1 mg/ml) und anschließendes kurzes Vortexen gestartet. Die Reaktionslösung wurde sofort in eine Halbmikro-UV-Kunststoffküvette überführt und die Photometer-Messung gestartet.

4.3.2.1.4 Aktivitätstests unter Umsetzungsbedingungen

Bei späteren Biotransformationen war auf Grund der schlechten Löslichkeit des Substrates **TsCHO** die Gegenwart von 1 Vol-% Methanol in den Reaktionsansätzen geplant. Daher war das Verhalten der Dehydrogenasen gegenüber Methanol von Interesse. Hierfür wurden die oben beschriebenen Standardaktivitätstests dahingehend abgewandelt, daß 10 µl des jeweils verwendeten Puffers im Reaktionsansatz durch das gleiche Volumen Methanol ersetzt wurden. Alle verwendeten Dehydrogenasen wurden in Gegenwart von Methanol getestet.

Für Inhibitionstests (Formiat bei der HLADH, **TsCHO** bzw. **TsOH** bei der FDH) wurde eine entsprechende Menge Puffer durch das gleiche Volumen einer Lösung des möglichen Inhibitors ersetzt. Die genauen Inhibitor-Konzentrationen sind an entsprechender Stelle genannt.

Alle Aktivitätstests wurden jeweils als Doppelbestimmungen ausgeführt. Der spontane (chemische) Zerfall von NADH bzw. NADPH und die daraus resultierende Abnahme der Extinktion wurden dadurch berücksichtigt, daß in der Referenzküvette im Zweistrahl-Photometer ein dem Test-Ansatz entsprechender Ansatz mit Puffer anstatt Enzym verwendet wurde.

4.3.2.2 Hydrolasen

Bei den Aktivitätstests wurde die Umsetzung von Modellsubstraten (Ethylbutyrat bei Esterasen bzw. Tributyrin bei Lipasen) durch titrimetrische Bestimmung der freiwerdenden Säure mit 0.1-N-Natronlauge (aus Titrisol-Ampulle, Merck) mittels eines Titrationsautomaten (Titrino 719 S, Fa. Metrohm) mit angeschlossenem x,t-Schreiber (Fa. Kipp & Zonen, Modell BD 40) verfolgt.

Aus dem linearen Teil der vom x,t-Schreiber aufgenommenen Titrationskurve wurde die spezifische Aktivität folgendermaßen berechnet:

$$EA = \frac{V_{NaOH} \cdot 100}{t \cdot m_{Protein}}$$

EA	spezifische Aktivität [U/mg _{Protein}]
V_{NaOH}	zugewetztes Volumen 0.1 N Natronlauge [ml]
t	Reaktionszeit [min]
$m_{Protein}$	eingesetzte Enzymmenge [mg]

Die eingesetzten Enzymmengen wurden so gewählt, daß sinnvolle Geradensteigungen erhalten wurden. Die Reaktion darf einerseits nicht zu langsam

sein, da sonst das (in der Praxis immer beobachtbare !) Driften der pH-Elektrode ins Gewicht fällt. Andererseits darf die Reaktion aber auch nicht zu schnell sein, da die bei der enzymatischen Esterverseifung pro Zeiteinheit freiwerdende Säuremenge kleiner sein muß, als die Laugenmenge, die vom Titrimaten maximal pro Zeiteinheit im Regelbereich zudosiert werden kann.

4.3.2.2.1 Lipasen

Von einigen verwendeten Lipasen lagen keine Angaben bezüglich der Aktivität vor. Bei diesen wurde die spezifische Standardaktivität mit folgendem Test bestimmt (Boehringer, 1996):

24 ml 10-mM-Phosphatpuffer, pH 6.9 wurden in einer temperierbaren Meßzelle des Titrimaten vorgelegt, unter Rühren 735µl Tributyrin zugesetzt und bei 25 °C auf pH 7.00 vortitriert. Nach Äquilibrierung des Systems (ca. 5 min.) wurde die Reaktion durch Zugabe von Enzymlösung bzw. -suspension (50 mg Enzym + 500 µl Phosphatpuffer) gestartet. Das zugesetzte Volumen wurde je nach Enzym zwischen 5µl und 200µl variiert, um sinnvolle Geradensteigungen zu erhalten. Suspensionen wurden unmittelbar vor Entnahme des einzusetzenden Volumens durch Vortexen homogenisiert.

4.3.2.2.2 Esterasen

331µl Ethylbutyrat und 10ml 1 M Phosphatpuffer pH 7.4 wurden im Meßkolben auf 100ml aufgefüllt (Substratkonzentration: 25 mmol/l). Bei Messungen in Gegenwart von Hilfssubstanzen wie Aceton oder Triton X100 wurden diese in entsprechenden Mengen vor dem Auffüllen bis zur Marke zugesetzt, um die Konzentration von Substrat und Phosphat nicht zu verändern.

25 ml Substratlösung wurden in einer temperierbaren Meßzelle des Titrimaten vorgelegt und bei 25 °C auf pH 7.50 vortitriert. Nach Äquilibrierung des Systems (ca. 5 min.) wurde die Reaktion durch Zugabe einer geeigneten Menge Enzym (2 – 100 µl in Puffer gelöstes Lyophilisat bzw. Originalsuspension) gestartet (Horgan et al., 1969).

4.3.3 Dünnschichtchromatographie

Die DC wurde hauptsächlich zur qualitativen Schnellkontrolle chemischer und enzymatischer Reaktionen verwendet. Vor der erfolgreichen Entwicklung einer Chiral-HPLC-Analytik für das Biotransformationsprodukt **BC-S** wurde die DC auch quantitativ für die Bestimmung von **BC-E** und **BC-S** nebeneinander angewandt.

4.3.3.1 Qualitative Dünnschichtchromatographie

Für den Nachweis der Substanzen **BC-E**, **BC-S**, **CP-EE** und **CP-SE** wurde schon früher eine DC-Analytik entwickelt (Vielhauer, 1997). Es zeigte sich, daß die hierfür verwendete Methode ebenfalls gut zur Identifizierung der Verbindungen **TsCHO**, **TsOH** und **TsCOOH** geeignet war.

Tabelle 4.3-1: Verwendete Materialien für die DC

DC-Fertigfolien:	a) SIL G/UV ₂₅₄ , 4 x 8 cm, Kieselgel 60 (0.25 mm) mit Fluoreszenzindikator (Fa. Macherey-Nagel, Düren) b) DC-Alufolien Kieselgel 60 F ₂₅₄ , Schicht 0.2 mm, 20cm x 20cm (Fa. Merck, Darmstadt)
Laufmittel:	Petrolether (Kp 40 - 60 °C) 50 Ethylacetat 50 Essigsäure 0.5 (Volumenteile)
Detektion:	a) UV-Licht (254 nm) b) Ehrlichs Reagens ¹⁾ (Merck, 1970) c) Iod-Schwefelsäure ²⁾ (Merck, 1970)
¹⁾ 2.0 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd wurden pulverisiert und in einer Mischung von 60 ml Salzsäure (32 %) und 140 ml Methanol gelöst. Es wurde bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach Besprühen wurde 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit Heißluft (ca. 120 °C) erhitzt. ²⁾ 0.6345 g (2.5 mmol) Iod und 0.9684 g (5.83 mmol) KI wurden in Wasser zu 50 ml gelöst. Diese Lösung wurde mit dem gleichen Volumen 10-%iger Schwefelsäure gemischt. Nach Besprühen wurde 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert.	

Außer **CP-EE** und **CP-SE** sind alle Substanzen UV-aktiv und wurden unter UV-Licht (254 nm) markiert. Um eventuell auftretende Neben- oder Zersetzungsprodukte nachweisen zu können, wurden zusätzlich die beschriebenen Anfärbemethoden angewandt.

Die R_f-Werte der mit Hilfe der qualitativen DC identifizierten Substrate und Produkte sind in Tabelle 4.3-2 zusammengefaßt.

Tabelle 4.3-2: R_f -Werte der Substrate und ihrer Hydrolyseprodukte

Substanz	Abkürzung	R_f -Wert	Detektion
N- <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester	BC-E	0.64	UV-Licht (254 nm), Ehrlichs Ragenz (violette Flecke)
N- <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäure	BC-S	0.43	UV-Licht (254 nm), Ehrlichs Ragenz (violette Flecke)
N- <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-3-amino-cyclopropan-1,2-dicarbonsäure-dimethylester	CP-EE	0.52	Ehrlichs Ragenz (gelbe Flecke, rasch verblassend)
N- <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-3-amino-cyclopropan-1,2-dicarbonsäure-2-monomethylester	CP-SE	0.35	Ehrlichs Ragenz (gelbe Flecke, rasch verblassend)
N- <i>p</i> -Toluolsulfonyl-pipecolinaldehyd	TsCHO	0.51	UV-Licht (254 nm), Iod-Schwefelsäure (braune Flecke)
N- <i>p</i> -Toluolsulfonyl-pipecolinsäure	TsCOOH	0.35	UV-Licht (254 nm), Iod-Schwefelsäure (braune Flecke)
N- <i>p</i> -Toluolsulfonyl-pipecolinalkohol	TsOH	0.28	UV-Licht (254 nm), Iod-Schwefelsäure (braune Flecke)

4.3.3.2 Quantitative Dünnschichtchromatographie

Dieses Verfahren wurde zur Bestimmung von Reaktionsumsätzen bei enzymatischen Esterhydrolysen des Substrates **BC-E** angewandt.

Eine schon früher entwickelte Methode erlaubte zwar die Quantifizierung dieses Substrates, doch bei der Bestimmung von Reaktionsumsätzen nur aus der Abnahme von **BC-E** traten Unstimmigkeiten auf, deren Ursache in einer mangelnden Wiederfindung der eingesetzten Substanz vermutet wurde (Vielhauer, 1997). Aus diesem Grund wurde die Methode weiterentwickelt, um das Substrat (**BC-E**) und das Produkt (**BC-S**) nebeneinander bestimmen zu können. Die dadurch ermöglichte Bilanzierung sollte Aufschluß über die tatsächlichen Gründe für die inkonsistenten Meßdaten liefern.

Bei der quantitativen Dünnschichtchromatographie werden Lösungen mit einem Auftragegerät in definierten Mengen reproduzierbar auf DC-Platten aufgetragen. Nach Entwicklung werden die Flecken auf dem DC (evtl. nach Anfärbung durch Tauch- oder Sprühreagenzien) densitometrisch mittels eines DC-Scanners vermessen.

Die eingesetzten Geräte und Materialien sind im folgenden aufgeführt.

DC-Fertigfolien: DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄, Schicht 0.2 mm, 20cm x 20cm (Fa. Merck). Die Folien wurden vorentwickelt, um sie sauer zu konditionieren und evtl. vorhandene Verunreinigungen zu entfernen.

Auftragegerät: Modell AS 30, Fa. Desaga

DC-Scanner: TLC Scanner 3, Fa. Camag

Software: TLC Auswertprogramm CATS V4.04, Fa. Camag

Die Vermessung der Substanzflecke erfolgt durch Absorptions-Reflexions-Messungen mit UV-Licht einer Deuterium-Lampe. Die Absorption wird mit einer voreingestellten Meßwertauflösung entlang der Laufstrecke jeden Flecks vom Start bis zur Laufmittelfront gemessen. Wird danach die Absorption als Funktion der Laufstrecke dargestellt, so erscheinen Substanzflecke in Form eines Peaks. Ein Beispiel für solch eine Messung ist in Abbildung 4.3-1 dargestellt.

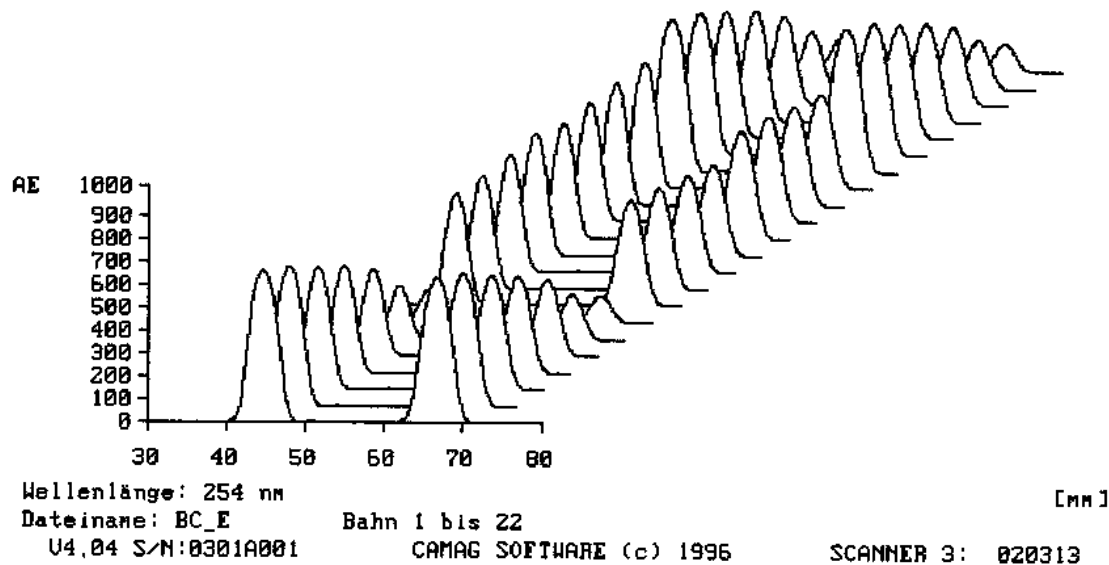


Abbildung 4.3-1: Exemplarisches Scanner-vermessenes DC nach Basislinienkorrektur mit 22 Bahnen. Gezeigt ist die Trennung von **BC-S** und **BC-E** (rechts) bei der biokatalytischen Esterhydrolyse von **BC-E** mit der Lipase L-2.

Die Bestimmung der aufgetragenen Substanzmengen unbekannter Analyse-Proben bzw. deren Konzentrationen erfolgte anschließend über eine Folien-interne Kalibrierung. Zusammen mit den Analyse-Proben wurden auf jede DC-Folie Eichlösungen bekannter Konzentration aufgetragen (Bahn 1 bis 7 und 16 bis 22). Aus den Höhen bzw. Flächen der Peaks dieser Eichkonzentrationen (Doppelbestimmungen) wurden Eichkurven erstellt, daraus schließlich wurden dann die Werte für die unbekannt Proben ermittelt.

Die empirisch ermittelten, optimierten Parameter für eine erfolgreiche Quantifizierung von **BC-E** und **BC-S** nebeneinander sind im folgenden zusammengestellt.

Tabelle 4.3-3: Parameter zur Quantifizierung von **BC-E** und **BC-S** nebeneinander mittels quantitativer Dünnschichtchromatographie

Auftragebedingungen		
aufgetragenes Volumen	10 x 1 μ l	
Lösungsmittel	Toluol	
Auftragedauer pro μ l	5 s	
Auftragebreite (= Bahnbreite)	5 mm	
Bahnabstand	8 mm	
Entwicklung		
Laufmittel:	Petrolether (Kp 40 - 60 °C)	50
	Ethylacetat	50
	Essigsäure	0.5 (Volumenteile)
Rf-Wert	BC-E:	0.65
	BC-S:	0.42
Geräteparameter (Scanner)		
Lampe	Deuterium	
Monochromator-Bandbreite	20 nm	
Wellenlänge	254 nm	
Spalt	4.0 x 0.30 mm	
Meßwertauflösung	100 μ m	
Meßmodus	Absorption / Reflexion	
Meßgeschwindigkeit	5 mm/s	
Auswertung		
relevante Meßgröße	Peakfläche	
Kalibrierung	polynome Regression	

Als sinnvoller Arbeitsbereich für die Quantifizierung von **BC-E** und **BC-S** wurde eine aufzutragende Substanzmenge von je ca. 200 bis 3500 ng ermittelt.

4.3.4 Gaschromatographie

Zur Bestimmung von Enantiomerenüberschüssen (*ee*-Werten) ist die Trennung der Enantiomeren mittels geeigneter Methoden notwendig. Dies geschah unter anderem mit Hilfe der Kapillar-Gaschromatographie. Das Verfahren bietet auch die Möglichkeit, gegebenenfalls gleichzeitig, schnell und exakt Reaktionsumsätze zu bestimmen.

Für das Substrat **BC-E** wurde bereits eine GC-Enantiomerenanalytik auf einer β -Cyclodextrinphase am Institut für Organische Chemie und Isotopenforschung der Universität Stuttgart entwickelt (Vielhauer, 1997). Aus Praktikabilitätsgründen wurde jedoch eine eigene, verbesserte Analytik für diese Verbindung entwickelt. Davon ausgehend gelang auch die Entwicklung einer GC-Methode für die Trennung der Enantiomere von **OBC-E**.

Hinsichtlich der Ts-Pipecolinderivate **TsCHO** und **TsOH** lagen keine eigenen Erfahrungen bezüglich einer GC-Enantiomerenanalytik vor. Es wurde daher im Rahmen dieser Arbeit eine derartige Analytik entwickelt.

Alle Analysen wurden mit einem Gaschromatographen der Firma Hewlett Packard (Waldbronn, Deutschland) durchgeführt. Die einzelnen Komponenten des Systems sind in Tabelle 4.3-4 aufgeführt.

Tabelle 4.3-4: Komponenten des verwendeten Kapillar-GC-Systems für verschiedene Enantiomerentrennungen

Komponente	Modell
Gaschromatograph	Modell 5890 Series II
Probengeber	Modell 7673 B
Integrator	Modell 3396 Series II
Auswertesoftware	Peak 96, Version A.02.01 (1990)

Obwohl im Rahmen der vorliegenden Arbeit 6 verschiedene Cyclodextrin-Phasen getestet wurden, erwiesen sich jedoch nur zwei sehr ähnliche β -Cyclodextrin-Kapillarsäulen für alle relevanten Verbindungen als die geeignetsten:

- A) Heptakis-(6-*O-tert.*-thexyldimethylsilyl-2,3-di-*O*-methyl)- β -Cyclodextrin (19 m x 0.25 mm)
- B) Heptakis-(6-*O-tert.*-butyldimethylsilyl-2,3-di-*O*-methyl)- β -Cyclodextrin (15 m x 0.25 mm)

Als stationäre Phasen für Enantiomerentrennungen wurden daher diese Cyclodextrin-Phasen verwendet. Die entsprechenden Kapillarsäulen wurden von Prof. W.A. König, Hamburg (Institut für organische Chemie, TU Hamburg) bezogen.

Außer den erwähnten Enantiomerentrennungen wurde noch eine etablierte Trennung für Lösungsmittelgemische angewandt. Hierfür wurde folgende Säule benutzt:

- C) Permabond CW20M-0.5 μ m (Macherey & Nagel, Düren, Deutschland) (25 m x 0.32 mm)

Die Detektion erfolgte mit einem Flammen-Ionisationsdetektor (FID). Die Temperatur am Injektor und Detektor betragen jeweils 250 °C, die Gasflüsse am Detektor wurden entsprechend einer maximalen Empfindlichkeit des FID eingestellt (31.4 ml/min H₂, 400 ml/min Druckluft, 42 ml/min He-AUX-Gas).

Als Trägergas wurde für sämtliche Trennungen Helium verwendet.

4.3.4.1 Trennungen mit der Säule A

4.3.4.1.1 **N-tert-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester BC-E und -n-butylester BC-Bu**

Die Trennbedingungen für die Enantiomere von **BC-E** und **BC-Bu** sind in Tabelle 4.3-5 zusammengefaßt.

Tabelle 4.3-5: Trennbedingungen für die Enantiomere von **BC-E** und **BC-Bu**

Temperaturprogramm	100 °C, 3 min isotherm mit 3 °C/min auf 128 °C, 15 min isotherm mit 10 °C/min auf 180 °C, 10 min isotherm mit 10 °C/min auf 100 °C
Säulenvordruck	40 kPa
Säulendurchfluß (100 °C)	0.91 ml/min
Splitverhältnis	1:80

Unter diesen Bedingungen konnten die Enantiomere beider Verbindungen getrennt werden. Die Kenngrößen der Trennung sind in Tabelle 4.3-6 zusammengefaßt.

Tabelle 4.3-6: Kenngrößen der Trennung der Enantiomere von **BC-E** und **BC-Bu**

Substanz	Retentionszeiten [min]		Trennfaktor α ¹⁾	Auflösung R_s ¹⁾
	(1R, 5R, 6R)-	(1S, 5S, 6S)-		
N-tert-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester BC-E	22.26	23.47	1.06	1.71
N-tert-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäure-n-butylester BC-Bu	34.78	35.01	1.01	1.32
Naphthalin (interner Standard)	5.83		-	-

¹⁾ Die Definitionen für den Trennfaktor α und die Auflösung R_s finden sich in Abschnitt 4.3.6.

4.3.4.1.2 2-Oxabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester OBC-E, -n-butylester OBC-Bu und -isobutylester OBC-iBu

Die Trennbedingungen für die Enantiomere von **OBC-E**, **OBC-Bu** und **OBC-iBu** sind in Tabelle 4.3-7 zusammengefaßt.

Tabelle 4.3-7: Trennbedingungen für die Enantiomere von **OBC-E**, **OBC-Bu** und **OBC-iBu**

Temperaturprogramm	90 °C, 8 min isotherm mit 3 °C/min auf 119 °C, 3 min isotherm mit 10 °C/min auf 180 °C, 10 min isotherm mit 10 °C/min auf 90 °C
Säulenvordruck	30 kPa
Säulendurchfluß (100 °C)	0.72 ml/min
Splitverhältnis	1:90

Unter diesen Bedingungen konnten die Enantiomere aller drei Verbindungen getrennt werden. Die Kenngrößen der Trennung sind in Tabelle 4.3-8 zusammengefaßt.

Tabelle 4.3-8: Kenngrößen der Trennung der Enantiomere von **OBC-E**, **OBC-Bu** und **OBC-iBu**

Substanz	Retentionszeiten [min]	Trennfaktor α	Auflösung R_S
2-Oxabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester OBC-E	6.05; 6.86	1.13	1.84
2-Oxabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäure-n-butylester OBC-Bu	18.56; 19.19	1.03	1.17
2-Oxabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäureisobutylester OBC-iBu	15.99; 16.50	1.03	0.81
Naphthalin (interner Standard)	10.37	-	-

Die Retentionszeiten der Enantiomere sind nicht den jeweiligen absoluten Konfigurationen zugeordnet.

4.3.4.2 Trennungen mit der Säule B

4.3.4.2.1 **N-tert-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester BC-E**

Die Trennbedingungen für die Enantiomere von **BC-E** sind in Tabelle 4.3-9 zusammengefaßt.

Tabelle 4.3-9: Trennbedingungen für die Enantiomere von **BC-E**

Temperaturprogramm	100 °C, 3 min isotherm mit 3 °C/min auf 128 °C, 18 min isotherm mit 10 °C/min auf 180 °C, 10 min isotherm mit 10 °C/min auf 100 °C
Säulenvordruck	40 kPa
Säulendurchfluß (100 °C)	0.78 ml/min
Splitverhältnis	1:100

Unter diesen Bedingungen konnten die Enantiomere der Verbindung getrennt werden. Die Kenngrößen der Trennung sind in Tabelle 4.3-10 zusammengefaßt.

Tabelle 4.3-10: Kenngrößen der Trennung der Enantiomere von **BC-E**

Substanz	Retentionszeiten [min]		Trennfaktor α	Auflösung R_s
	(1R, 5R, 6R)-	(1S, 5S, 6S)-		
N-tert-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester BC-E	28.55	29.81	1.04	3.20

4.3.4.2.2 **2-Oxabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester OBC-E**

Die Trennbedingungen für die Enantiomere von **OBC-E** sind in Tabelle 4.3-11 zusammengefaßt.

Tabelle 4.3-11: Trennbedingungen für die Enantiomere von **OBC-E**

Temperaturprogramm	85 °C, 3 min isotherm mit 3 °C/min auf 90 °C, 4 min isotherm mit 10 °C/min auf 180 °C, 10 min isotherm mit 10 °C/min auf 85 °C
Säulenvordruck	30 kPa
Säulendurchfluß (100 °C)	0.61 ml/min
Splitverhältnis	1:100

Unter diesen Bedingungen konnten die Enantiomere der Verbindung getrennt werden. Die Kenngrößen der Trennung sind in Tabelle 4.3-12 zusammengefaßt.

Tabelle 4.3-12: Kenngrößen der Trennung der Enantiomere von **OBC-E**

Substanz	Retentionszeiten [min]	Trennfaktor α	Auflösung R_S
2-Oxabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester OBC-E	7.84; 8.65	1.10	4.42

Die Retentionszeiten der Enantiomere sind nicht den jeweiligen absoluten Konfigurationen zugeordnet.

4.3.4.2.3 N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO** und N-p-Toluolsulfonylpipecolinalkohol **TsOH**

Die Trennbedingungen für die Enantiomere von **TsCHO** und **TsOH** sind in Tabelle 4.3-13 zusammengefaßt.

Tabelle 4.3-13: Trennbedingungen für die Enantiomere von **TsCHO** und **TsOH**

Temperaturprogramm	165 °C, 41 min isotherm mit 3 °C/min auf 180 °C, 30 min isotherm mit 10 °C/min auf 165 °C
Säulenvordruck	75 kPa
Säulendurchfluß (100 °C)	1.31 ml/min
Splitverhältnis	1:100

Unter diesen Bedingungen konnten nur die Enantiomere von **TsCHO** mit relativ geringer Auflösung getrennt werden (vgl. Abschnitt 4.4.1), die von **TsOH** ließen sich auf keiner verfügbaren GC-Säule trennen. Die Kenngrößen der Trennung sind in Tabelle 4.3-14 zusammengefaßt.

Tabelle 4.3-14: Kenngrößen der Trennung der Enantiomere von **TsCHO** und **TsOH**

Substanz	Retentionszeiten [min]		Trennfaktor α	Auflösung R_S
	L- (S-)	D- (R-)		
N-p-Toluolsulfonyl- pipecolinaldehyd TsCHO	38.02	39.18	1.03	1.50
N-p-Toluolsulfonyl- pipecolinalkohol TsOH	63.44 (keine Trennung)		-	-

4.3.4.3 Trennung verschiedener Lösungsmittel mit der Säule C

Die Trennbedingungen für Lösungsmittelgemische sind in Tabelle 4.3-15 zusammengefaßt.

Tabelle 4.3-15: Trennbedingungen für Lösungsmittelgemische

Temperaturprogramm	60 °C, mit 5 °C/min auf 90 °C, mit 10 °C/min auf 120 °C, 4 min isotherm mit 30 °C/min auf 60 °C
Säulenvordruck	90 kPa
Säulendurchfluß (100 °C)	0.59 ml/min
Splitverhältnis	1:100

Unter diesen Bedingungen konnten alle relevanten Lösungsmittel voneinander getrennt werden. Die Retentionszeiten sind in Tabelle 4.3-16 zusammengefaßt.

Tabelle 4.3-16: Retentionszeiten verschiedener Lösungsmittel

Substanz	Retentionszeit [min]
Methanol	1.81
Ethanol	2.03
Toluol	3.17
Isobutanol	3.64
<i>n</i> -Butanol	4.49

4.3.5 Analytische HPLC

Für einige der in dieser Arbeit verwendeten Substanzen war eine Trennung der Enantiomere mittels Gaschromatographie nicht möglich. Vor allem Carbonsäuren sind oft ungeeignet, da sie sich nicht unzersetzt verdampfen lassen. Außerdem war für den Pipecolinalkohol **TsOH** eine Trennung per GC nicht gelungen.

Es lagen keinerlei Erfahrungen bezüglich einer HPLC-Chiralanalytik für die nachfolgend aufgeführten Substanzen vor. Es wurde daher im Rahmen dieser Arbeit eine derartige Analytik entwickelt.

Alle Analysen wurden mit einer Anlage der Spectra Series von der Firma Thermo Separation Products (San Jose, CA, USA) durchgeführt. Die einzelnen Komponenten des Systems sind in Tabelle 4.3-17 aufgeführt.

Tabelle 4.3-17: Komponenten der verwendeten HPLC-Analage für verschiedene Enantiomerentrennungen

Komponente	Modell
Pumpe	P2000
Autosampler	AS3000
Detektor	UV1000
Probenschleife	10 μ l
Controller	SN 4000
Auswertesoftware	TSP PC1000, Version 3.0.3 (1997)

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erwiesen sich 2 verschiedene, an Kieselgel kovalent gebundene Cyclodextrin-Phasen als geeignet. Die folgenden Chiral-HPLC-Säulen wurden eingesetzt:

- D) ET 200/4 Nucleodex β -PM, 200 x 4 mm, Säulen-Nr. 7095697
- E) ET 200/4 Nucleodex β -OH, 200 x 4 mm, Säulen-Nr. 8125092

Beide Säulen wurden von der Firma Macherey&Nagel (Düren, Deutschland) bezogen. Da die Trennsäulen laut Hersteller üblicherweise unter Reversed-Phase-Bedingungen betrieben werden, wurden nur wässrige Fließmittel getestet. In allen Fällen erwiesen sich Mischungen aus Methanol und wässrigem Natriumphosphat als am geeignetsten. Die Herstellung der Fließmittel ist unter 4.1.2 beschrieben.

Die Detektion der Analyte erfolgte ausnahmslos durch Messung der UV-Absorption bei geeigneten Wellenlängen.

4.3.5.1 Trennungen mit der Säule D

4.3.5.1.1 **N-tert-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäure BC-S und dem entsprechenden Methylester BC-E**

Die Trennbedingungen für die Enantiomere von **BC-S** und **BC-E** sind in Tabelle 4.3-18 zusammengefaßt.

Tabelle 4.3-18: Trennbedingungen für die Enantiomere von **BC-S** und **BC-E**

Fließmittel	60 % 40 mM Natriumphosphat, pH 3.7 40 % Methanol
Flußrate	0.2 ml/min
Säulentemperatur	Raumtemperatur
Detektionswellenlänge	249 nm

Unter diesen Bedingungen konnten die Enantiomere von **BC-S** und **BC-E** getrennt werden. Die Trennleistung nahm bei abnehmenden Flußraten zu. Um für **BC-S** eine ausreichend gute Trennung zu erreichen, wurden daher lange Retentionszeiten in Kauf genommen. Die Kenngrößen der Trennung sind in Tabelle 4.3-19 zusammengefaßt.

Tabelle 4.3-19: Kenngrößen der Trennung der Enantiomere von **BC-S** und **BC-E**

Substanz	Retentionszeiten [min]		Trennfaktor α	Auflösung R_s
	(1R, 5R, 6R)-	(1S, 5S, 6S)-		
N-tert-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäure BC-S	72.9	78.9	1.08	1.77
N-tert-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester BC-E	100.2	117.1	1.17	3.26

4.3.5.1.2 N-tert-Butyloxycarbonyl-3-amino-cyclopropan-1,2-dicarbonsäure-dimethylester CP-EE und die entsprechenden Halbester CP-SE

Die Trennbedingungen für die Enantiomere von **CP-EE** und **CP-SE** sind in Tabelle 4.3-20 zusammengefaßt.

Tabelle 4.3-20: Trennbedingungen für die Enantiomere von **CP-EE** und **CP-SE**

Fließmittel	60 % 40 mM Natriumphosphat, pH 3.7 40 % Methanol
Flußrate	0.2 ml/min
Säulentemperatur	Raumtemperatur
Detektionswellenlänge	210 nm

Unter diesen Bedingungen konnten nur die Enantiomere von **CP-EE** getrennt werden, die von **cis-CP-SE** sowie von **trans-CP-SE** nicht. Die Kenngrößen der Trennung sind in Tabelle 4.3-21 zusammengefaßt.

Tabelle 4.3-21: Kenngrößen der Trennung der Enantiomere von **CP-EE** und **CP-SE**

Substanz	Retentionszeiten [min]	Trennfaktor α	Auflösung R_s
N-tert-Butyloxycarbonyl-3-amino-cyclopropan-1,2-dicarbonsäure-dimethylester CP-EE	38.7; 46.6	1.20	3.54
cis-N-tert-Butyloxycarbonyl-3-amino-cyclopropan-1,2-dicarbonsäure-2-monomethylester cis-CP-SE	25.4 (keine Trennung)	-	-
trans-N-tert-Butyloxycarbonyl-3-amino-cyclopropan-1,2-dicarbonsäure-2-monomethylester trans-CP-SE	23.1 (keine Trennung)	-	-

Die Retentionszeiten der Enantiomere von **CP-EE** sind nicht den jeweiligen absoluten Konfigurationen zugeordnet. Die Zuordnung der Retentionszeiten von **CP-SE** zu *cis*- und *trans*-Form der Halbester erfolgte anhand der Analyse von NMR-Daten (Vielhauer, 1997).

4.3.5.1.3 2-Oxabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäure **OBC-S** und den entsprechenden Methylester **OBC-E**

Die Trennbedingungen für die Enantiomere von **OBC-S** und **OBC-E** sind in Tabelle 4.3-22 zusammengefaßt.

Tabelle 4.3-22: Trennbedingungen für die Enantiomere von **OBC-S** und **OBC-E**

Fließmittel	80 % 40 mM Natriumphosphat, pH 3.7 20 % Methanol
Flußrate	0.5 ml/min
Säulentemperatur	Raumtemperatur
Detektionswellenlänge	210 nm

Unter diesen Bedingungen konnten die Enantiomere von **OBC-S** und **OBC-E** getrennt werden. Die Kenngrößen der Trennung sind in Tabelle 4.3-23 zusammengefaßt.

Tabelle 4.3-23: Kenngrößen der Trennung der Enantiomere von **OBC-S** und **OBC-E**

Substanz	Retentionszeiten [min]	Trennfaktor α	Auflösung R_s
2-Oxabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäure OBC-S	22.1; 24.5	1.11	1.94
2-Oxabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester OBC-E	34.0; 37.9	1.11	2.01

Die Retentionszeiten der Enantiomere sind nicht den jeweiligen absoluten Konfigurationen zugeordnet.

4.3.5.2 Trennungen mit der Säule E

4.3.5.2.1 N-p-Toluolsulfonylpipecolinsäure **TsCOOH** und N-p-Toluolsulfonylpipecolinalkohol **TsOH**

Die Trennbedingungen für die Enantiomere von **TsCOOH** und **TsOH** sind in Tabelle 4.3-24 zusammengefaßt.

Tabelle 4.3-24: Trennbedingungen für die Enantiomere von **TsCOOH** und **TsOH**

Fließmittel	60 % 40 mM Natriumphosphat, pH 3.2 40 % Methanol
Flußrate	0.4 ml/min
Säulentemperatur	Raumtemperatur
Detektionswellenlänge	234 nm

Unter diesen Bedingungen konnten die Enantiomere von **TsCOOH** und **TsOH** getrennt werden. Die Trennleistung nahm bei abnehmenden Flußraten zu. Um für **TsOH** eine ausreichend gute Trennung zu erreichen, wurden daher sehr lange Retentionszeiten in Kauf genommen. Die Kenngrößen der Trennung sind in Tabelle 4.3-25 zusammengefaßt.

Tabelle 4.3-25: Kenngrößen der Trennung der Enantiomere von **TsCOOH** und **TsOH**

Substanz	Retentionszeiten [min]		Trennfaktor α	Auflösung R_s
	L- (S-)	D- (R-)		
N-p-Toluolsulfonyl- pipecolinaldehyd TsOOH	227.5	268.7	1.18	2.45
N-p-Toluolsulfonyl- pipecolinalkohol TsOH	155.2	167.7	1.08	1.40

4.3.6 Auflösung und Trennfaktor

Die Auflösung zweier Peaks in GC- oder HPLC-Chromatogrammen wurde nach folgender Formel berechnet (Naumer und Heller, 1986).

$$R_S = 1.177 \cdot \frac{t_S - t_R}{b_S^{1/2} + b_R^{1/2}} \quad \begin{array}{ll} R_S: & \text{Auflösung} \\ t_S, t_R: & \text{Retentionszeiten der Enantiomere S und R} \\ (t_S > t_R) & b_S^{1/2}, b_R^{1/2}: \text{ Halbwertsbreiten der Peaks von S und R} \end{array}$$

Der Trennfaktor berechnet sich folgendermaßen:

$$\alpha = \frac{t_S}{t_R} \quad \begin{array}{ll} \alpha: & \text{Trennfaktor} \\ (t_S > t_R) & t_S, t_R: \text{ Retentionszeiten der Enantiomere S und R} \end{array}$$

4.3.7 Bestimmung des spezifischen optischen Drehwinkels $[\alpha]_D^\vartheta$

Die Messung der Drehwerte erfolgte mit einem thermostatisierten Polarimeter (Modell 341 der Firma Perkin-Elmer, Überlingen, Deutschland) mittels der Linie einer Na-Dampfampe bei 589 nm und der Linien einer Hg-Dampfampe bei 546 und 578 nm und anschließender Extrapolation mit Hilfe der Drude-Gleichung [Flügge, 1970] gemäß:

$$[\alpha]_\lambda^\vartheta = \frac{\alpha_\lambda^\vartheta}{c \cdot d} \quad \begin{array}{l} \alpha_\lambda^\vartheta: \text{ bei der Wellenlänge } \lambda \text{ (in nm) und der} \\ \text{Temperatur } \vartheta \text{ (in } ^\circ\text{C) gemessener} \\ \text{Drehwert} \\ c: \text{ Konzentration in g/cm}^3 \\ d: \text{ Schichtdicke in dm} \\ [\alpha]_\lambda^\vartheta: \text{ spezifischer Drehwert bei der} \\ \text{Wellenlänge } \lambda \text{ und der Temperatur } \vartheta \\ D: \text{ Wellenlänge der Na-Linie bei 589 nm} \end{array}$$

$$[\alpha]_D^\vartheta = \frac{[\alpha]_{578}^\vartheta \cdot 3,199}{4,199 - \frac{[\alpha]_{578}^\vartheta}{[\alpha]_{546}^\vartheta}}$$

Die Schichtdicke in der Küvette betrug jeweils 10 cm, die Meßtemperaturen und verwendeten Lösungsmittel sind an entsprechender Stelle genannt.

4.3.8 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren wurden am Institut für Organische Chemie und Isotopenforschung der Universität Stuttgart an einem Gerät Bruker AC 250 bei 250.1 MHz ($^1\text{H-NMR}$) / 62.9 MHz ($^{13}\text{C-NMR}$) bzw. Bruker ARX 500 bei 500.1 MHz ($^1\text{H-NMR}$) / 125.8 MHz ($^{13}\text{C-NMR}$) gemessen.

Die Messung erfolgte in Deuteriochloroform (CDCl_3) als Lösungsmittel mit Tetramethylsilan als internem Standard ($\delta_{\text{TMS}} = 0.00$ ppm).

Bei der $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektroskopie wurden die relativen Lagen der Signale mit Hilfe der ^1H -Breitbandentkopplung ermittelt.

Die chemischen Verschiebungen sind in Bezug auf die δ -Skala, Kopplungskonstanten (J) in Hertz (Hz) angegeben.

Die Signalmuster werden wie folgt beschrieben: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), dd (Dublett von Dubletts) etc.; m (Multiplet), b (breites Signal).

Die Bestimmung von Diastereomerenverhältnissen aus ^1H -NMR-Spektren erfolgte durch Mittelwertbildung über die Intensitätsverhältnisse getrennter Signalpaare entsprechender H-Atome unter Voraussetzung ähnlicher Relaxationszeiten.

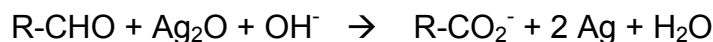
4.3.9 Elementaranalysen

Die Elementaranalysen wurden am Institut für Organische Chemie und Isotopenforschung der Universität Stuttgart durchgeführt.

4.4 Derivatisierungen

4.4.1 Derivatisierung von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO**

Eine analytische Enantiomerentrennung des Pipecolinaldehyds **TsCHO** gelang mittels Chiral-HPLC überhaupt nicht und mittels GC nur mit unbefriedigender Auflösung. Außerdem war zu vermuten, daß die racemisierungsanfällige Verbindung bei den relativ hohen notwendigen Tempertauren (165 °C) in der GC-Analytik auf der Säule teilweise racemisiert. Da für die entsprechende (konfigurationsstabile!) Carbonsäure **TsCOOH** eine qualitativ hochwertige Enantiomerentrennung per Chiral-HPLC zur Verfügung stand (siehe 4.3.5.2.1), bestand Interesse an einer oxidativen Derivatisierung von **TsCHO** zu **TsCOOH**. Eine praktikable Methode sollte einfach, schnell und selektiv für Aldehyde sein, quantitative Umsätze liefern und weiterhin möglichst racemisierungsfrei ablaufen. Besonders interessant schien hierfür eine literaturbekannte Oxidation von Aldehyden mit Silberoxid (Norman und Coxon, 1993):



Für R = 3-Thienyl wurde bei 0 °C nach 5 min quantitativer Umsatz beobachtet. Davon ausgehend wurde folgende Methode entwickelt und optimiert:

In 100 µl Methanol gelöster **TsCHO** (≤ 10 mM, kann **TsOH** im Überschuß enthalten) wurde mit 360 µl dest. Wasser und 15 µl 100 mM AgNO₃ in H₂O versetzt. Nach Mischen wurden 25 µl 100 mM NaOH zugesetzt und sofort sehr kurz (< 1 Sekunde) gevortext. Dabei bildete sich gelb-braunes Ag₂O-Sol, welches sich bald schwarz färbte. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (kein Schütteln!) wurden zur vollständigen Ag⁺-Fällung 20 µl 100 mM NaCl zugesetzt, ca. 30 s gevortext und anschließend 10 min bei 13000 UPM zentrifugiert. Anschließend wurden 450 µl klarer Überstand mit 9 µl 1 M H₃PO₄ versetzt und per HPLC analysiert.

4.4.2 Derivatisierung von N-*tert*-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäure **BC-S**

Da die Enantiomerentrennung des Methylesters **BC-E** mittels Chiral-GC mit erheblich besserer Auflösung gelang, als die Enantiomerentrennung von **BC-S** mittels Chiral-HPLC wurde zur Überprüfung der Enantiomerenreinheit von aufgereinigtem, Methylester-freiem **BC-S** aus präparativen Biotransformationen eine literaturbekannte Derivatisierungsmethode angewandt (Müller et al., 1990):



Dazu wurden zu 1000 µl 5 mM **BC-S** in CHCl₃ 30 µl TMSH (Trimethylsulfoniumhydroxid, 0.25 M in Methanol) gegeben und am GC injiziert (Die eigentliche Reaktion zum Methylester findet hierbei im Injektor bei 250 °C statt). Es wurde dabei die für **BC-E** etablierte GC-Methode verwendet (siehe 4.3.4.2.1).

4.5 Versuche zur Abtrennung von Methanol aus Lösungsmittelgemischen

Um das Gleichgewicht enzymkatalysierter Umesterungen von Methylestern auf die Produktseite zu verschieben, ist es vorteilhaft das Reaktionsprodukt Methanol aus der Reaktionsmischung zu entfernen. Eine einfache Möglichkeit hierzu bietet der Einsatz von Molsieben (Beispiele: Yamada et al., 1989, Bonini et al., 1991; Mori und Tomioka, 1992; Lu und Sih, 1999; Martin-Munoz et al., 1994). Da in deren Käfigstruktur Poren mit definierter Größe enthalten sind, werden von ihnen nur Substanzen mit einem hinreichend kleinen kritischen Moleküldurchmesser absorbiert (Merck, 1998). Die Praktikabilität einer gegenüber Butanol selektiven Absorption von Methanol wurde in eigenen Experimenten getestet.

- *Binäre Mischungen*

Zum Test binärer Mischungen wurden 1-%ige (v/v) Lösungen von Methanol, *n*-Butanol und Isobutanol in trockenem Toluol (1ml) in 1-ml-Schraubdeckelvikals mit Teflondichtung mit jeweils 10 Perlen (ca. 50 mg) Molsieb 4 Å bzw. Molsieb 5 Å (Roth) versetzt und über Nacht auf einem Themomixer bei RT und 700 UPM geschüttelt.

Unlösliches wurde abzentrifugiert und der Alkoholgehalt des klaren Überstandes per GC bestimmt.

- *Ternäre Mischungen*

Ternäre Mischungen wurden folgendermaßen untersucht. 10 µl Methanol, 10 µl *n*-Butanol (bzw. Isobutanol) und 980 µl trockenes Toluol wurden dazu mit jeweils 10 Perlen (ca. 50 mg) Molsieb 4 Å bzw. Molsieb 5 Å versetzt und über Nacht wie oben inkubiert. Auch die Probenahme und -analyse erfolgte wie bei den binären Mischungen.

4.6 Chemische Eigenschaften von Substraten

4.6.1 Stabilität von N-*tert*-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethy **BC-E** in wäßrigem Milieu

Eine Suspension von **BC-E** in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.4 (s. 4.8.1.1), zeigte nach 6-monatiger Lagerung bei 4 °C keine Zersetzung von **BC-E** (DC).

4.6.2 Stabilität von 2-Oxabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester **OBC-E** in wäßrigem Milieu

Da keine Erfahrungen bezüglich der Beständigkeit der Verbindung in wasserhaltiger Umgebung vorhanden waren, mußte diese Frage vorab anhand eigener Tests geklärt werden.

Folgende wäßrige Medien wurden hierzu getestet:

- Chiral-HPLC-Laufmittel (80 % Na-Phosphat pH 3.7 / 20 % Methanol, s. Abschn. 4.1.2.2)
- Deionisiertes Wasser (ungepuffert)
- 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.4

Außerdem wurde zu Vergleichszwecken noch reines Methanol in die Tests einbezogen. In 1-ml-Vials wurde zu jeweils 900 µl der o.g. Medien jeweils 100 µl einer frisch bereiteten Lösung von **OBC-E** in Methanol (10 mM) gegeben. Die klaren Lösungen wurden bei 4 °C gelagert.

Über einen Zeitraum von 17 Tagen wurden jeweils 3 bis 4 Proben entnommen und mittels Chiral-HPLC analysiert. Dazu wurden 100 µl Ansatz 1:10 mit HPLC-Laufmittel verdünnt und injiziert.

4.6.3 Stabilität von 2-Oxabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester **OBC-E** in Zweiphasen-Systemen

Da Lipase-katalysierte Esterhydrolysen von in Wasser schwer löslichen Verbindungen oft vorteilhaft in Zweiphasen-Systemen durchgeführt werden können, wurden auch in diesem Fall Stabilitätstests für das Substrat **OBC-E** durchgeführt.

Dazu wurden in ein 4-ml-Schraubdeckelvial 500 µl 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.2, 250 µl 20mM **OBC-E** in Toluol, 225 µl Toluol und 25 µl Naphthalin (als interner Standard für die GC) gegeben. Einem identischen 2. Ansatz wurden zusätzlich 11 µl Triton[®] X-100 (10 g/l) zugesetzt. Die Ansätze wurden durch intensives Schütteln gemischt und sofort jeweils eine Probe von 100 µl entnommen (Nullprobe). Nach Zentrifugation wurde die verfügbare organische Phase in ein 1-ml-Vial mit Insert überführt und per GC analysiert. In der gleichen Weise wurde mit einer nach ca. 100 h entnommenen Probe verfahren.

4.6.4 Löslichkeit von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO** in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer

Da keinerlei Erfahrungen bezüglich der Löslichkeit des Substrates in wässrigen Medien bestanden, wurden hierzu verschiedene Tests durchgeführt. Außerdem sollte die Erhöhung der Löslichkeit durch die oberflächenaktive Substanz Tween 80 getestet werden, die von Pamperin erfolgreich zur Solubilisierung von in Wasser sehr schwer löslichen 2.2-Paracyclophanen bei Bio reduktionen verwendet wurde (Pamperin, 1998).

Zu diesem Zweck wurde eine Lösung von **TsCHO** in Methanol (100 mM) mit verschiedenen Volumina 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.2 gemischt, mit und ohne Zusatz von Tween 80. Die genaue Zusammensetzung der Test-Lösungen ist in Tabelle 4.6-1 wiedergegeben. Das Überschreiten der Löslichkeitsgrenze konnte durch eine auftretende Trübung der Mischung erkannt werden.

Tabelle 4.6-1: Testmischungen zur Bestimmung der Löslichkeit von **TsCHO** in wässrigen Systemen.

#	1	2	3	4	5	6
0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.2	990 µl	490 µl	240 µl	90 µl	276 µl	261 µl
TsCHO (100 mM in MeOH)	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	15 µl	30 µl
Tween 80	-	-	-	-	9 µl	9 µl
C_{TsCHO}	1 mM	2 mM	4 mM	10 mM	5 mM	10 mM
MeOH (v/v)	1 %	2 %	4 %	10 %	5 %	10 %
Tween 80 (v/v)	-	-	-	-	3 %	3 %

4.6.5 Stabilität von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO** in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer

Da bei verschiedenen Experimenten mit **TsCHO** in wässrigem Puffer nach längerer Zeit eine Braunfärbung auftrat, lag die Vermutung nahe, daß **TsCHO** in wässriger Umgebung nur eine begrenzte Stabilität aufweist. Dies wurde im interessierenden pH-Bereich von 5 bis 8 folgendermaßen untersucht:

In 4-ml-Schraubdeckelvials mit Teflondichtung wurden zu je 3920 µl 0.1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 5.0, 6.0, 7.0 und 8.0) 40 µl **TsCHO** (100 mM in Methanol) und 40 µl N-p-Toluolsulfonylpipecolinalkohol **TsOH** (100 mM in Methanol, als interner Standard für die GC) gegeben. Die klaren Lösungen wurden bei RT inkubiert. Das in diesem Experiment als interner Standard verwendete **TsOH** hatte sich im eingesetzten Puffer als über Wochen stabil erwiesen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Über einen Zeitraum von 170 h wurden jeweils 5 Proben entnommen und per GC analysiert. Dazu wurden 800 µl Reaktionsansatz mit 200 µl Ethylacetat extrahiert und nach Zentrifugation (2 min, 13000 UPM) 100 µl der organischen Phase der GC-Analytik zugeführt.

4.6.6 Racemisierungsgeschwindigkeit von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO**

Da kein enantiomerenreines **TsCHO** zur Verfügung stand mußte für die Ermittlung der Racemisierungsgeschwindigkeit nicht-racemische Substanz mittels einer Biotransformation hergestellt werden.

Dazu wurden in einem 25-ml-Rundkolben 18.7 ml 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.5, 1000 µl NADH (30 mM in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.5) und 200 µl **TsCHO** (100 mM in Methanol) vorgelegt. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 130 µl HLADH (0.1 mg/ml in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.5, entspr. 0.035 Units) und Durchmischen gestartet. Nach 17 h Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Reaktionsansatz 2 mal mit je 10 ml Diethylether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Es blieben 5.9 mg Rohprodukt (**L-TsCHO** + **D-TsOH**), welches in 200 µl Methanol aufgenommen wurde ("Rohproduktlösung").

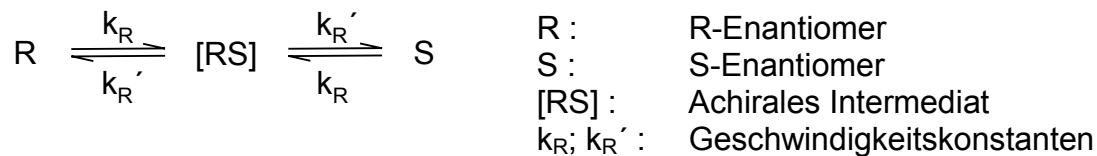
Zur Reaktionskontrolle wurden 30 µl dieser Lösung mit 270 µl Ethylacetat verdünnt und der Chiral-GC- Analytik bzw. der qualitativen DC-Analytik zugeführt.

Zur Bestimmung des Enantiomerenüberschusses von **TsCHO** nach der Biotransformation wurden 20 µl der Rohproduktlösung mit 180 µl Methanol verdünnt, wie in Abschnitt 4.4.1 beschrieben derivatisiert und mittels Chiral-HPLC analysiert.

Je 40 µl der Rohproduktlösung wurden zu jeweils 4000 µl 0.1 M Kaliumphosphatpuffer mit den pH-Werten 5.0, 6.0, 7.0 und 8.0 gegeben. In verschlossenen 4-ml-Schraubdeckel-Vials aus Braunglas mit Teflondichtung wurde bei Raumtemperatur inkubiert.

In einem Zeitraum von 150 h wurden in sinnvollen Zeitabständen jeweils 4 Proben entnommen und der Enantiomerenüberschuss von **TsCHO** bestimmt. Dazu wurden 1000 µl Probe mit 500 µl Diethylether extrahiert, nach Zentrifugation (2 min, 13000 UPM) 350 µl organische Phase in ein KR überführt und durch Überleiten eines Luftstroms eingedampft. Der Rückstand wurde in 120 µl Methanol aufgenommen, wie in Abschnitt 4.4.1 beschrieben derivatisiert und mittels Chiral-HPLC analysiert.

Für die Auswertung der gemessenen Daten wurde folgender Racemisierungsmechanismus zu Grunde gelegt:



Aus diesem ergibt sich für die Racemisierungsgeschwindigkeit (steady state):

$$\frac{d([R]-[S])}{dt} = -k_r([R]-[S])$$

[R] :	Konzentration des R-Enantiomers
[S] :	Konzentration des S-Enantiomers
k _r :	Racemisierungskonstante

bzw. integriert:

$$ee = ee_0 e^{-k_R t}$$

ee : Enantiomerenüberschuß

ee_0 : Enantiomerenüberschuß bei $t = 0$

mit $ee = \frac{[R] - [S]}{[R] + [S]}$

Durch Auftragung von $\ln(ee/ee_0)$ über der Zeit wurde die Racemisierungskonstante k_R und aus ihr die Halbwertszeit der Racemisierung $t_{1/2}^R$ ermittelt.

4.7 Bestimmung der Enantioselektivität enzymkatalysierter Reaktionen

Die oft begrenzte Enantioselektivität von Biokatalysatoren – Enzymen oder Mikroorganismen - bei präparativen Racematspaltungen führt in der Praxis oft zu Problemen. Für die Bewertung der Qualität einer bestimmten Reaktion ist es deshalb notwendig, eine quantitative Aussage über die Enantioselektivität und über den zu erwartenden Verlauf der Reaktion treffen zu können. Eine Arbeit aus dem Jahr 1982 löst diese Problematik, indem ein mathematischer Zusammenhang zwischen dem Umsatz einer Reaktion und der optischen Reinheit des Substrates (ee_S) bzw. des Produktes (ee_P), ausgedrückt durch den jeweiligen Enantiomerenüberschuß, hergestellt wird (Chen et al., 1982):

$$\frac{\ln[(1-c)(1-ee_S)]}{\ln[(1-c)(1+ee_S)]} = \frac{[1-c(1+ee_P)]}{[1-c(1-ee_P)]} = E$$

Mit:

$$ee_S = \frac{[R] - [S]}{[R] + [S]}$$

$$ee_P = \frac{[Q] - [P]}{[Q] + [P]}$$

$$c = 1 - \frac{[R] + [S]}{C_0} = \frac{[P] + [Q]}{C_0}$$

[R] : Konzentration des R-Substrates

[S] : Konzentration des S-Substrates

[P] : Konzentration des R-Produktes

[Q] : Konzentration des S-Produktes

C_0 : Gesamtkonzentration, $C_0 = [S] + [R] + [P] + [Q]$

ee_S : Enantiomerenüberschuß des Substrates

ee_P : Enantiomerenüberschuß des Produktes

c : Reaktionsumsatz

E : Dimensionslose Konstante ("E-Wert")

Voraussetzung dieses Modells ist, daß beide Enantiomere eines Substrates am gleichen aktiven Zentrum des Enzyms nach dem gleichen Mechanismus in einer irreversiblen Reaktion umgesetzt werden. Ferner sollen keine Nebenreaktionen und keine Produktinhibition vorliegen. Der dimensionslose Faktor E ("E-Wert") ist für eine bestimmte Reaktion unter definierten Bedingungen eine Konstante und ein Maß für die Enantioselektivität. Präparativ interessant sind E-Werte ab ~ 10 , bei E-Werten > 100 spricht man von enantiospezifischen Reaktionen.

Lassen sich die Enantiomerenüberschüsse sowohl des Substrates (ee_S) als auch des Produktes (ee_P) bestimmen, so läßt sich der Reaktionsumsatz, unabhängig vom E-Wert der Reaktion, auch mit der Formel von Sih und Wu berechnen (Sih und Wu, 1989):

$$c = \frac{ee_S}{ee_S + ee_P}$$

Damit existiert auch ein direkter Zusammenhang zwischen dem Enantiomerenüberschuß des Substrates (ee_S), dem des Produktes (ee_P) und dem E-Wert (Rakels et al., 1993):

$$\frac{\ln[(1-ee_S)/(1+ee_S/ee_P)]}{\ln[(1+ee_S)/(1+ee_S/ee_P)]} = E$$

Lassen sich im Verlauf einer Reaktion zwei der drei Größen ee_S , ee_P und c messen, so kann theoretisch aus nur zwei Meßwerten der E-Wert bestimmt werden. Zuverlässigere Ergebnisse erhält man jedoch mittels nichtlinearer Regression des jeweiligen Zusammenhangs an eine größere Anzahl Meßdaten.

Jede der drei möglichen Varianten (Messung einer Reihe von ee_S/c -, ee_P/c - oder ee_S/ee_P -Wertepaaren) wurde im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt, abhängig von den gegebenen analytischen Möglichkeiten. Einen besonderen Vorteil bietet dabei die Messung von ee_S/ee_P -Wertepaaren, da diese bei ausreichender Enantiomeren-trennung ($R_S > 1.5$, vgl. Abschnitt 4.3.6) sehr genau bestimmt werden können. Der relative Fehler von derart gemessenen ee -Werten lag bei Kontrollmessungen stets unter 1 %. Außerdem ist hierfür i. d. R. keine Kalibrierung der Analytik notwendig.

Bei allen in diesem Zusammenhang nachfolgend abgebildeten Diagrammen repräsentieren geschlossene Symbole die jeweiligen Meßwerte, während durchgezogene Graphen den berechneten Verlauf einer Reaktion nach dem Modell von Chen et al. darstellen.

Alle untersuchten Reaktionen ließen sich unter geeigneten Bedingungen mit dem oben erläuterten Modell gut bis exzellent beschreiben.

Bei Kenntnis des E-Werts einer Reaktion können maximal erreichbare Enantiomerenreinheiten von Substrat bzw. Produkt, maximale Ausbeuten bei bestimmten geforderten Enantiomerenreinheiten oder maximale Enantiomerenreinheiten bei bestimmten geforderten Ausbeuten vorhergesagt werden. Somit ist der E-Wert die wichtigste Kenngröße einer präparativen, kinetischen Racematspaltung.

Der beschriebene Ansatz von Chen et al. wurde für die Charakterisierung einer großen Anzahl enzymatischer Reaktionen herangezogen und in vielfältiger Weise durch Verwendung komplexerer Modelle weiterentwickelt (Übersicht: Straathof und Jongejan, 1997).

4.8 Biotransformationen mit N-*tert*-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester **BC-E**

4.8.1 Enzymatische Esterhydrolyse

4.8.1.1 Umsetzungen im Titrimaten

Da das Substrat **BC-E** in wässrigem Milieu auf Grund seiner Hydrophobizität praktisch unlöslich ist und die wachsartige Konsistenz eine feine Suspendierung stark erschwert, wurden hinreichend stabile Suspensionen oder Emulsionen nach folgenden Verfahren hergestellt:

- I. In einem 50-ml-Meßkolben wurden 90.0 mg (0.38 mmol) **BC-E** in 250 µl Aceton gelöst. Dazu wurden 1.0 ml einer Lösung von Triton[®] X-100 in Wasser (10 g/l) gegeben und durch Umschwenken emulgiert. Nach Zugabe von 5.0 ml 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.4 wurde fast bis zu Marke aufgefüllt und sofort intensiv geschüttelt. Nach genauem Auffüllen bis zur Marke wurde fest verschlossen, erneut gemischt und schließlich die resultierende Emulsion mit Ultraschall behandelt. Nach ca. 15 min fiel das Substrat sehr feinkristallin wieder aus. So hergestellte Suspensionen waren beim Rühren stabil und enthielten **BC-E** in einer Konzentration von 7.5 mmol/l.
- II. In einem 25-ml-Meßkolben wurden 45.0 mg (0.38 mmol) **BC-E** in 125 µl Toluol gelöst. Dazu wurden 500 µl einer Lösung von Triton[®] X-100 in Wasser (10 g/l) gegeben und durch Umschwenken emulgiert. Nach Zugabe von 2.50 ml 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.4 wurde bis zu Marke aufgefüllt und intensiv geschüttelt. Anschließend wurde die resultierende Emulsion ca. 15 min mit Ultraschall behandelt. So hergestellte Emulsionen waren beim Rühren über einige Stunden stabil und hatten eine Substratkonzentration von 7.5 mmol/l, die Konzentration von **BC-E** in der organischen Phase betrug.

25 ml stabilisierter Substrat-Suspension bzw. -Emulsion (s.o) wurden in einer temperierbaren Meßzelle des Titrimaten (Titrimo 719 S, Fa. Metrohm) mit angeschlossener x,t-Schreiber (Fa. Kipp & Zonen, Modell BD 40) vorgelegt und bei 25 °C auf pH 7.50 vortitriert. Nach Äquilibrierung des Systems (ca. 5 min.) wurde die Reaktion durch Zugabe einer geeigneten Menge Enzym (15 mg in 250 µl Puffer gelöstes Lyophilisat) gestartet. Die Reaktion wurde durch titrimetrische Bestimmung der freiwerdenden Säure **BC-S** mit 0.1 N Natronlauge verfolgt. Zu geeigneten Zeitpunkten wurden Proben von je 300 µl Volumen entnommen, mit 900 µl Cyclohexan extrahiert und die organische Phase nach Abzentrifugation wässriger Bestandteile per GC bezüglich des Enantiomerenüberschusses von **BC-E** untersucht. Der Reaktionsumsatz wurde aus der während der Reaktion verbrauchten Menge Natronlauge berechnet. In allen Fällen trat ein Mehrverbrauch an Natronlauge durch Drift der pH-Elektrode auf. Dieser schon früher beobachtete und untersuchte Effekt wurde dadurch berücksichtigt, daß die gesamte Titrationskurve auf den bei Vollumsatz (Prüfung durch qualitative DC) normiert wurde. Dieses Verfahren wurde validiert und liefert hinreichend korrekte Ergebnisse (Vielhauer, 1997).

4.8.1.2 Umsetzung unter Screeningbedingungen

Beim Screening von Lipasen auf die enantioselektive Esterhydrolyse von **BC-E** wurde das Substrat als Lösung in Toluol (10 mM) in einem Zweiphasen-System eingesetzt (Vielhauer, 1997). Unter diesen Bedingungen lieferten die Umsetzungen mit allen Lipasen bei Auftragung des Substrat-Enantiomerenüberschusses (ee_S) über dem Umsatz (U) die erwarteten Verläufe (Chen et al., 1982). Lediglich das aussichtsreichste Enzym, die Lipase L-2, zeigte einen atypischen Verlauf und verursachte Probleme bei der Probenaufarbeitung (Emulsionsbildung). Dadurch war eine einwandfreie Bestimmung der Enantioselektivität (E-Wert) nicht gelungen. Der vermutete Zusammenhang zwischen den Problemen bei der Probenaufarbeitung und der schlechten Anpaßbarkeit der Meßwerte an das E-Wert-Modell sollte durch Anwendung einer verbesserten Analytik (s. 4.3.3.2) nachgewiesen werden.

Analog der früheren Vorgehensweise wurde die Reaktion in 8 Einzelansätze aufgeteilt. Jeweils 300 μ l Enzymlösung (62.5 mg L-2 in 3000 μ l 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.4) und 200 μ l Substratlösung (10 mM **BC-E** in Toluol) wurden bei RT gerührt. In einem Zeitraum von 56 h wurde in sinnvollen Abständen je ein Ansatz mit 1000 μ l Toluol und 30 μ l 1 M H_3PO_4 versetzt und sofort gevortext. Nach kurzer Zentrifugation wurde 15 min bei 80 °C zur Denaturierung des Enzyms inkubiert, um eine ausreichende Phasentrennung zu erzielen (Vielhauer, 1997). Anschließend wurde für 5 min bei 13000 UPM zentrifugiert und die verfügbare Toluolphase in ein 1-ml-Vial überführt. Die so gewonnene Lösung wurde mittels quantitativer DC (s. 4.3.3.2) und Chiral-GC (s. 4.3.4.1.1) analysiert.

4.8.1.3 Optimierung der Umsetzungsbedingungen

4.8.1.3.1 Untersuchungen zur Auswahl eines optimalen Lösungsmittels

Die untersuchten Lösungsmittel wurden nach ihrer Polarität ausgewählt und sind in Tabelle 4.8-1 aufgeführt. Es wurden vor allem schwach polare und außerdem nur mit Wasser nicht (unbegrenzt) mischbare Solventien in Betracht gezogen, da im Zweiphasen-System gearbeitet werden sollte.

Tabelle 4.8-1: Ausgewählte Lösungsmittel mit Polaritätswerten

Lösungsmittel	Log P	E_T^N (°C)
n-Hexan	4.11 ^a	0.009
Cyclohexan	3.44 ^b	0.006
1-Hexen	3.39 ^a	0.052
Toluol	2.65 ^a	0.099
Diethylether	0.83 ^b	0.117
2-Pentanon	0.99 ^a	0.321
^a nach Tewari et al., 1982 ^b nach Hansch und Leo, 1979 ^c nach Reichardt, 1994		

Log P-Werte (Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten) differieren um bis zu 25 % je nach Literaturquelle, außerdem sind experimentell bestimmte und berechnete Werte "im Umlauf". Hier wurden nur gemessene Werte verwendet.

Zum Vergleich wurde die neuere, mit farbigen Polaritätsindikatoren gemessene E_T^N -Polaritätsskala (Reichardt, 1994) herangezogen.

Die Umsetzungen zur Untersuchung des Lösungsmiteleinflusses wurden in 4-ml-Schraubdeckel-Vials bei RT durchgeführt. 5 mg (0.02 mmol) **BC-E** wurden in 200 µl des jeweiligen Lösungsmittels gelöst. (Bei n-Hexan entsprach dies in etwa der maximalen Löslichkeit). Nach Zugabe von 1800 µl 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.4, 40 µl Triton® X-100 (10 g/l) und 10 µl Lipase aus *Candida antarctica* B (L-2, Roche Diagnostics, 60 mg/ml in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.4) wurde verschlossen, durch heftiges Schütteln homogenisiert und anschließend magnetisch bei 1200 UPM gerührt.

Über einen Zeitraum von ca. 150 h wurden 5 bis 10 Proben entnommen und analysiert. Dazu wurden 100 µl des frisch homogenisierten Reaktionsansatzes in einem KR mit 500 µl Diethylether und 10 µl 1 M H₃PO₄ versetzt (pH ~3.5). Nach intensivem Vortexen wurde zentrifugiert und 100 µl der Etherphase in ein 1-ml-Vial überführt (die restliche Etherphase wurde für die Reaktionskontrolle mittels qualitativer DC herangezogen). Durch Überleiten eines schwachen Luftstromes wurde die Hauptmenge des Diethylethers im Vial verdampft. Anschließend wurde 10 min bei 15 mbar getrocknet. Schließlich wurde mit 1000 µl HPLC-Laufmittel versetzt, 1 h bei 1000 UPM und RT auf dem Thermomixer geschüttelt und per Chiral-HPLC analysiert (s. 4.3.5.1.1). Dabei wurden die Enantiomerenüberschüsse von Substrat (**BC-E**) und Produkt (**BC-S**), sowie der Reaktionsumsatz in einer Analyse gleichzeitig bestimmt.

4.8.1.3.2 Untersuchungen zur Optimierung des pH-Werts

Der pH-Wert wurde im Pufferbereich von 0.1 M Kaliumphosphatpuffer im Bereich von pH 5.0 bis pH 8.0 in Schritten von 0.5 pH-Einheiten variiert. Die Umsetzungen wurden in Anlehnung an die unter 4.8.1.3.1 beschriebene Vorgehensweise durchgeführt. Als Cosolvens wurde Cyclohexan gewählt, auf Triton® X-100 zur Stabilisierung der Emulsionen wurde verzichtet, da dies in folgenden präparativen Umsetzungen ebenfalls nicht vorgesehen war (vgl. Abschnitt 5.1.2.4). In 4-ml-Schraubdeckel-Vials wurden jeweils 1800 µl 0.1 M Kaliumphosphatpuffer des jeweiligen pH-Wertes, 200 µl **BC-E** in Cyclohexan (100 mM) und 10 µl Lipase aus *Candida antarctica* B (L-2, Roche Diagnostics, 6 mg/ml in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer des jeweiligen pH-Wertes) gegeben. Die Ansätze wurden bei Raumtemperatur und 1200 UPM magnetisch gerührt. Über einen Zeitraum von 360 h wurden 5 bis 10 Proben entnommen und analysiert. Probenahme und Auswertung erfolgte wie bereits in Abschnitt 4.8.1.3.1 beschrieben. Lediglich bei den Umsetzungen mit pH-Werten zwischen 5.0 und 6.5 mußte die den Analyse-Proben zugesetzte Menge 1 M H₃PO₄ von 10 auf 6 µl reduziert werden, um einen pH-Wert zwischen 3 und 4 zu erreichen.

4.8.1.3.3 Umsetzungen zur Untersuchung weiterer möglicher Einflußgrößen

Folgende Faktoren (neben der Cosolvens-Polarität und dem pH-Wert) sollten hinsichtlich ihres Einflusses auf die Aktivität und Enantioselektivität der enzymatischen Hydrolyse von **BC-E** nur einer groben Betrachtung unterworfen werden:

- Substratkonzentration in der organischen Phase
- Verhältnis Cosolvens / Puffer
- Verhältnis Substrat- / Enzymmenge
- Zusatz einer oberflächenaktiven Substanz (Triton® X-100)

Diese Faktoren wurden zwar nicht im Detail in jeweils eigenen Versuchsreihen einer Optimierung unterzogen; um jedoch die Größe bzw. Wichtigkeit der jeweiligen Einflüsse abschätzen zu können, wurden neben den bereits beschriebenen Reaktionsansätzen einige zusätzliche Umsetzungen durchgeführt. Prinzipiell wurde wie schon in den Abschnitten 4.8.1.3.1 und 4.8.1.3.2 beschrieben vorgegangen. Abweichungen davon sind in Tabelle 4.8-2 zusammengefaßt.

Tabelle 4.8-2: Zusammensetzung der Reaktionsansätze

#	Cosolvens	Vol. / μl	K-Phosphat, pH 7.4		Triton [®] X-100 ¹⁾	L-2 ²⁾	Probe- Vol.	H ₃ PO ₄ ³⁾ (1 M)
			Vol.	Conc.				
1	Toluol	200 μl	1800 μl	0.1 M	-	100 μl	100 μl	10 μl
2	Cyclohexan	200 μl	1800 μl	0.1 M	40 μl	10 μl	100 μl	10 μl
3	Cyclohexan	200 μl	1800 μl	0.1 M	-	10 μl	100 μl	10 μl
4	Cyclohexan	200 μl	450 μl	0.2 M	-	10 μl	32.5 μl	5 μl
5	Cyclohexan	2000 μl	1800 μl	0.1 M	40 μl	100 μl	200 μl	10 μl

¹⁾ 10 g/l in Wasser

²⁾ Lipase aus *Candida antarctica* B (Roche Diagnostics, 6 mg/ml in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.4)

³⁾ Den Analyse-Proben zur Regulierung des pH-Wertes (~3) zugesetzt

Probenahme und Auswertung erfolgte ebenfalls wie bereits in den Abschnitten 4.8.1.3.1 und 4.8.1.3.2 beschrieben, lediglich das Volumen der entnommenen Analyse-Proben und die zugesetzte Menge Phosphorsäure mußten teilweise angepaßt werden. Auch diese Änderungen sind in Tabelle 4.8-2 aufgeführt.

4.8.2 Enzymatische Umesterungen

4.8.2.1 Umesterung von **BC-E** zum entsprechenden *n*-Butylester **BC-Bu**

Zur Untersuchung der enzymatischen Umesterung von **BC-E** wurden 10 mg Lipase aus *Candida antarctica* B (Roche Diagnostics, L-2) in ein 1-ml-Schraubdeckelvjial eingewogen. Nach Zusatz von 500 μl **BC-E** (10 mM in Toluol), 50 μl Naphthalin (100 mM in Toluol, interner Standard), 10 μl (0.11 mmol) *n*-Butanol und 440 μl Toluol wurde auf einem Thermomixer bei RT und 800 UPM geschüttelt. Zur Überprüfung einer evtl. stattfindenden chemischen Umesterung wurde parallel ein entsprechender Ansatz ohne Enzym inkubiert.

Über einen Zeitraum von ca. 270 h wurden 4 Proben entnommen und analysiert. Dazu wurden 100 μl Reaktionsansatz 5 min bei 13000 UPM zentrifugiert. Anschließend wurden 80 μl klarer Überstand in ein GC-Vial mit 100- μl -Insert überführt und mittels Chiral-GC analysiert.

4.8.2.2 Einfluß von Molsieb auf die enzymatische Umesterung

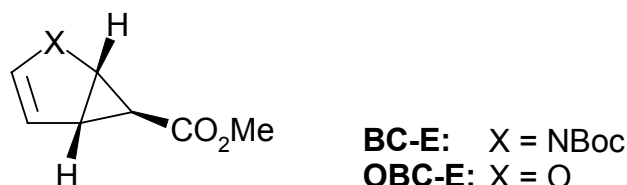
Die Eignung von Molsieb zur Steigerung des Umsatzes bzw. der Aktivität wurde mit folgendem Reaktionsansatz getestet:

10 mg Lipase aus *Candida antarctica* B (Roche Diagnostics, L-2) wurden in ein 1-ml-Schraubdeckelvial eingewogen. Anschließend wurden 500 μ l **BC-E** (10 mM in Toluol), 50 μ l Naphthalin (100 mM in Toluol, interner Standard), 20 μ l (0.22 mmol) *n*-Butanol und 430 μ l Toluol zugesetzt. Zuletzt wurden 10 Perlen (ca. 50 mg) Molsieb (5 Å, Roth) zugegeben. Inkubiert wurde auf einem Thermomixer bei RT und 800 UPM.

Über einen Zeitraum von 270 h wurden 4 Proben entnommen und mittels Chiral-GC analysiert. Probenahme und Auswertung erfolgte wie bereits in Abschnitt 4.8.2.1 beschrieben.

4.9 Biotransformationen mit 2-Oxabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester **OBC-E**

Die Verbindung **OBC-E** ist ein Synthese-Intermediat bei der Darstellung von Cyclopropanolen, die ihrerseits als vielseitige Synthesebausteine verwendet werden können (Böhm et al., 2000; Böhm und Reiser, 2001).



Aufgrund der engen strukturellen Verwandtschaft von **OBC-E** mit der im Rahmen dieser Arbeit eingehend untersuchten Verbindung **BC-E** (siehe Abschnitt 4.8) sollte geklärt werden, ob sich die für **BC-E** entwickelten enzymatischen Racemat-trennungen - evtl. nach Abwandlung - auch für die Darstellung von enantiomeren-reinem **OBC-E** nutzen lassen.

4.9.1 Enzymatische Esterhydrolyse in wässrigem Puffer

Für diese Umsetzungen wurden Enzyme ausgewählt, die sich nicht in Zweiphasen-Systemen oder organischen Lösungsmitteln einsetzen lassen. Außerdem wurde die Lipase aus *Candida antarctica* B (Roche Diagnostics, L-2) getestet, da sie beim Screening auf Umsetzung des strukturverwandten Esters **BC-E** die höchste Aktivität und auch Enantioselektivität aller getesteten Lipasen aufwies (Vielhauer, 1997).

Dazu wurde in 4-ml-Schraubdeckelials 1.2 µl flüssiges **OBC-E** (1.4 mg, 10 µmol) in 1000 µl 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.2 gelöst. Nach Zugabe einer geeigneten Enzymmenge (siehe Tabelle 4.9-1) und Durchmischen der Ansätze wurde bei RT inkubiert. Ein entsprechender Kontrollansatz ohne Enzym wurde parallel inkubiert.

Über einen Zeitraum von 60 min wurden jeweils 4 Proben entnommen. Dazu wurden 20 µl Reaktionsansatz mit 1000 µl HPLC-Laufmittel versetzt, anschließend 5 min bei 13000 UPM zentrifugiert und schließlich 800 µl Überstand in ein HPLC-Vial überführt und mittels Chiral-HPLC analysiert.

Tabelle 4.9-1: Zur Esterhydrolyse von **OBC-E** eingesetzte Enzyme

Enzym ¹⁾	Abkürzung	Konzentration ²⁾	Zugesetztes Vol.	Zugesetzte Menge
Esterase aus Schweineleber	E-1	10 mg/ml	2.0 µl	0.020 mg
Esterase aus Schweineleber	E-2	10 mg/ml	3.8 µl	0.038 mg
Lipase aus <i>Candida antarctica</i> B	L-2	50 mg/ml	10.0 µl	0.500 mg

¹⁾ siehe Abschn. 4.2.1.1
²⁾ in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.2

4.9.2 Enzymatische Umesterungen

4.9.2.1 Screening mit Lipasen

4.9.2.1.1 Ermittlung geeigneter Umsetzungsbedingungen

Vor der Durchführung der eigentlichen Screening-Umsetzungen wurden Tests zur Ermittlung geeigneter Reaktionsbedingungen vorgenommen. Ziel war es dabei, einen geeigneten Nucleophil-Gehalt (= Butanol-Gehalt) zu ermitteln, bei welchem Lipasen grundsätzlich aktiv sein können ($\text{Log } P_{(n\text{-Butanol})} = 0.79$ [Tewari et al., 1982], vgl. Abschnitt 6.1.1.1.1). Außerdem sollte das Gleichgewicht der Reaktion weit genug auf der Produktseite liegen, um evtl. vorliegende Enzymaktivitäten nicht aus thermodynamischen Gründen zu übersehen. Schließlich sollte sichergestellt werden, daß keine chemische Umesterung stattfindet.

Dazu wurde die Lipase aus *Candida antarctica* B (Roche Diagnostics, L-2) als Biokatalysator verwendet, die Aktivität für die Umesterung von **OBC-E** zeigte. Die Umsetzungen wurden in 1-ml-Vials mit Schraubdeckel und Teflondichtung durchgeführt. Es wurden jeweils 10 mg Lipase eingewogen, 500 µl **OBC-E** (20 mM in Toluol) und 50 µl Naphthalin (100 mM in Toluol, interner Standard für die GC-Analytik) zugesetzt. Dann wurden die in Tabelle 4.9-2 angegebenen Mengen n-Butanol zugesetzt und mit Toluol auf 1000 µl Gesamtvolumen ergänzt. Die Ansätze wurden auf einem Themomixer bei RT und 900 UPM geschüttelt.

Nach jeweils 68 und 96 h wurden zur Probenahme 100 µl Reaktionsansatz entnommen und für 5 min bei 13000 UPM zentrifugiert. Anschließend wurden 80 µl klarer Überstand mittels GC-Analytik vermessen.

Als Maß für die Beurteilung der Bedingungen wurde der Reaktionsumsatz nach 68 h herangezogen. Die am besten geeigneten Bedingungen (siehe Ergebnisse, Abschnitt 5.4.1.1) wurden in den anschließenden Screeningexperimenten verwendet.

Tabelle 4.9-2: Zusammensetzung der Testumsetzungen zur Ermittlung geeigneter Screeningbedingungen

Ansatz	Volumen n-Butanol	Lipase L-2 [mg]	C _{OBC-E} [mM]	C _{n-Butanol} [mM]	Mengenverhältnis OBC-E / n-Butanol
1	10 µl	10	10	109	~ 1:10
2	100 µl	10	10	1093	~ 1:100
3	450 µl	10	10	4918	~ 1:500
4 ¹⁾	10 µl	10	10	109	~ 1:10
5 ²⁾	100 µl	-	10	1093	~ 1:100

¹⁾ Es wurde Isobutanol anstatt n-Butanol verwendet. ²⁾ Negativkontrolle.

4.9.2.1.2 Screening

Zur Herstellung der Substratlösung wurde entsprechend Ansatz 1 in Tabelle 4.9-2 in einen 20-ml-Meßkolben 10.0 ml **OBC-E** (20 mM in Toluol), 1000 µl Naphthalin (100 mM in Toluol, interner Standard für die GC-Analytik) und 200 µl n-Butanol gegeben

und anschließend mit Toluol bis zur Marke aufgefüllt. Die Umsetzungen wurden in 1-ml-Vials mit Schraubdeckel und Teflondichtung durchgeführt. Es wurden jeweils 10 mg Lipase (Tabelle 4.9-3) eingewogen und mit 1000 µl der oben beschriebenen Substratlösung versetzt. Die Ansätze wurden auf einem Themomixer bei RT und 900 UPM geschüttelt. Ein entsprechender Kontrollansatz ohne Enzym wurde mitinkubiert. In einem Zeitraum von 125 h wurden 2 – 5 Proben entnommen und mittels GC-Analytik analysiert. Dazu wurden 100 µl Reaktionsansatz für 5 min bei 13000 UPM zentrifugiert und anschließend 80 µl klarer Überstand per GC vermessen.

Tabelle 4.9-3: Auf Fähigkeit zur Umesterung von **OBC-E** getestete Lipasen

#	Hersteller-bezeichnung	Quelle	Anbieter
1	L-1, Lyo.	<i>Burkholderia sp.</i>	Roche Diagnostics
2	L-2, Lyo.	<i>Candida antarctica</i> B	Roche Diagnostics
3	L-3, Lyo.	<i>Candida Rugosa</i>	Roche Diagnostics
4	L-5, Lyo.	<i>Candida antarctica</i> A	Roche Diagnostics
5	L-6, Lyo.	<i>Pseudomonas sp.</i>	Roche Diagnostics
6	L-7, Lyo.	Schweinepankreas	Roche Diagnostics
7	L-8, Lyo.	<i>Humicola sp.</i>	Roche Diagnostics
8	L-9, Lyo.	<i>Mucor miehei</i>	Roche Diagnostics
9	Lipase-MY	<i>Candida Rugosa</i>	MS
10	Lipase-OF	<i>Candida cylindracea</i>	MS
11	Lipase-PL	<i>Alcaligenes</i>	MS
12	Lipase-QL	<i>Alcaligenes</i>	MS
13	Lipase-AL	<i>Achromobacter</i>	MS
14	Lipase-SL	<i>Pseudomonas cepacia</i>	MS
15	Lipase-TL	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	MS
16	Lipase-UL	<i>Rhizopus</i>	MS
17	PPL	Schweinepankreas	Fluka
18	-	<i>Rhizopus arrizus</i>	Osashi Ind.
19	-	<i>Chromobacterium viscosum</i>	Osashi Ind.

4.9.2.2 Einfluß von Molsieb auf die enzymatische Umesterung

Die Eignung von Molsieb zur Steigerung des Umsatzes bzw. der Aktivität wurde mit folgendem Reaktionsansatz getestet:

10 mg Lipase aus *Candida antarctica* B (Roche Diagnostics, L-2) wurden in ein 1-ml-Schraubdeckelvial eingewogen. Anschließend wurden 500 µl **OBC-E** (20 mM in Toluol), 50 µl Naphthalin (100 mM in Toluol, interner Standard für die GC), 20 µl (0.22 mmol) *n*-Butanol und 430 µl Toluol zugesetzt. Zuletzt wurden 10 Perlen (ca. 50 mg) Molsieb (5 Å, Roth) zugegeben. Inkubiert wurde auf einem Thermomixer bei RT und 900 UPM. Ein analoger Ansatz ohne Enzym wurde parallel inkubiert.

Nach 96 h wurde eine Probe entnommen und mittels Chiral-GC analysiert. Probenahme und Auswertung erfolgte wie bereits in Abschnitt 4.9.2.1.2 beschrieben.

4.10 Biotransformationen mit N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO**

Die biokatalytische Reduktion von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO** wurde sowohl mit verschiedenen Mikroorganismen als auch mit kommerziell erhältlichen freien Enzymen durchgeführt. Daneben wurden in einigen im folgenden beschriebenen Experimenten die chemischen Eigenschaften von **TsCHO** in wässrigen Medien untersucht.

4.10.1 Umsetzungen mit Mikroorganismen

4.10.1.1 Optimierung der Screeningbedingungen

Vor der Durchführung der eigentlichen Screening-Umsetzungen mit ausgesuchten Mikroorganismen wurde eine Optimierung der Reaktionsbedingungen vorgenommen. Die hierfür verwendete, kommerziell erhältliche Bäckerhefe (Sigma, Typ I, siehe 4.2.2) zeigte in Vorversuchen Aktivität für die Reduktion von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO**. 0.76 g dieser Trockenhefe wurden bei 30 °C in 25 ml 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.5 im Schüttelbad (100 UPM) suspendiert (ca. 2 h). Zur Bereitung der Substratlösung wurden 2.7 mg (0.01 mmol) **TsCHO** unter Behandlung mit Ultraschall in 10 ml 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.5 gelöst. Die Substratlösung (500 µl) mit den in Tabelle 4.10-1 angegebenen Komponenten wurde in KR's gegeben und bei 30 °C im Thermomixer vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 µl der vortemperierten Hefe-Suspension gestartet. Als Kontrollen wurden zwei Ansätze mit Puffer anstatt Biokatalysator bzw. Puffer anstatt Substrat in der gleichen Weise inkubiert.

Innerhalb von 24 h wurden jeweils 3 Proben entnommen und mittels qualitativer DC untersucht. Dazu wurden 125 µl Reaktionsansatz mit 50 µl Ethylacetat extrahiert und nach Zentrifugation (5 min, 13000 UPM) die organische Phase auf eine DC-Folie aufgetragen und analysiert. Durch zuvor durchgeführte Extraktionsversuche mit verschiedenen Lösungsmitteln konnte gezeigt werden, daß Substrat und Produkt auf diese Weise vollständig aus dem Reaktionsgemisch isoliert werden.

Die Beurteilung der verschiedenen Reaktionsansätze erfolgte durch halbquantitative Auswertung der erhaltenen DC-Chromatogramme. Die am besten geeigneten Bedingungen wurden in den anschließenden Screeningexperimenten verwendet.

Tabelle 4.10-1: Zusammensetzung des Reaktionsmediums bei der Optimierung der Umsetzungsbedingungen für Screening-Experimente.

Ansatz	C _{TsCHO}	Cosolventien (v/v)	Tween 80 (v/v)	Glucose
1	0.5 mM	-	-	-
2	0.5 mM	3 % Methanol	-	-
3	0.5 mM	3 % Ethanol	-	-
4	0.5 mM	3 % DMSO	-	-
5	0.5 mM	-	0.03 %	-
6	0.5 mM	-	0.3 %	-
7	0.5 mM	-	3 %	-
8	0.5 mM	-	-	10 g/l
9	0.5 mM	3 % Methanol	0.3 %	10 g/l
10 ¹⁾	0.5 mM	-	-	-
11 ²⁾	-	-	-	-

1) Kontrollansatz mit Substrat ohne Biokatalysator
2) Kontrollansatz mit Biokatalysator ohne Substrat

4.10.1.2 Screening

Für die Umsetzungen wurde die jeweils einer BTM von 9 mg entsprechende Menge Biofeuchtmasse eingesetzt. Zur Bestimmung der Korrelation zwischen BFM und BTM wurde eine definierte Menge der wie in Abschnitt 4.2.2.5 beschrieben geernteten Mikroorganismen entnommen und deren BTM bestimmt. (vergl. Abschnitt 4.3.1).

Da sich die Biofeuchtmassen nicht exakt einwiegen ließen, wurden etwa 0.5 g BFM (das genaue Gewicht wurde ausgewogen) in einer berechneten Menge 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.5 suspendiert, so daß sich unter Berücksichtigung der jeweiligen BFM/BTM-Korrelation eine Suspension mit 30 mg BTM/ml ergab.

Zur Bereitung der Substratlösung wurden 400 µl **TsCHO** (50 mM in Ethanol) und 500 µl Glucose (400 g/l in Wasser) im 10-ml-Meßkolben mit 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.5 zu 10.0 ml gelöst.

Die Substratlösung (1500 µl) und 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.5 (1200 µl) wurden in 4-ml-Schraubdeckelvials gegeben und bei 30 °C und 600 UPM auf einem Thermomixer vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 300 µl der vortemperierten Zellsuspension gestartet. (Im Fall der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* [Sigma, Typ I, siehe 4.2.2] wurden zur Substratlösung 1500 µl Zellsuspension und kein zusätzlicher Puffer zugesetzt.) Die Reaktionsansätze wurden in den locker verschlossenen Vials bei 30 °C und 600 UPM inkubiert.

Als Kontrolle wurde ein Ansatz mit Puffer anstatt Biokatalysator-Suspension in der gleichen Weise inkubiert.

Innerhalb von 24 h wurden jeweils 4 Proben entnommen und mittels GC-Analytik untersucht. Dazu wurden 500 µl Reaktionsansatz mit 200 µl Ethylacetat extrahiert und nach Zentrifugation (5 min, 13000 UPM) 100 µl der organischen Phase der GC-Analytik zugeführt.

4.10.1.3 Umsetzungen zur Charakterisierung des Produktes der Bioreduktion von **TsCHO** mit Mikroorganismen

Zellsuspensionen und Substratlösung wurden wie in Abschnitt 4.10.1.2 beschrieben hergestellt. Die Substratlösung (750 µl) wurde in 4-ml-Schraubdeckelials gegeben und bei 30 °C und 600 UPM auf einem Thermomixer vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 750 µl der vortemperierten Zellsuspension gestartet. Die Reaktionsansätze wurden in den locker verschlossenen Vials bei 30 °C und 600 UPM inkubiert.

Nach 23 h wurden die Reaktionsmischungen mit jeweils 600 µl Ethylacetat extrahiert und nach Zentrifugation (5 min, 13000 UPM) 100 µl der organischen Phase der GC-Analytik zugeführt und 200 µl in 1-ml-Vials gegeben. Nach Abdampfen des Lösungsmittels (Luftstrom) und Trocknen der Proben bei 15 mbar wurde in jeweils 200 µl Methanol aufgenommen und ca. 15 min verschlossen bei 900 UPM auf einem Thermomixer geschüttelt. Nach Zusatz von je 300 µl Wasser wurde der Enantiomerenüberschuß von **TsOH** per Chiral-HPLC gemessen.

4.10.2 Umsetzungen mit freien Enzymen

4.10.2.1 Screening auf Alkoholdehydrogenasen

Das Screening auf Umsetzung von **TsCHO** mit freien Dehydrogenasen wurde an den photometrischen Standard-Aktivitätstest mit Acetaldehyd als Substrat angelehnt (vergl. Abschnitt 4.3.2.1.3).

Stammlösungen der Enzyme wurden in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.5 in einer Konzentration von 10 mg/ml bereit. Diese wurden zur Verwendung in den Tests zum Erhalt sinnvoller Reaktionsraten entsprechend verdünnt (1:1000 bis unverdünnt). Alle Enzymlösungen wurden bis zum Gebrauch auf Eis gelagert.

In einem KR wurden dazu 870 µl 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.5, 10 µl **TsCHO** (100 mM in Methanol) und 100 µl 1 mM NADH (17.7 mg NADH-Dinatriumsalz in 25 ml 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.5) zusammenpipettiert und einige Minuten auf 25 °C vortemperiert. Im Fall der ADHs aus *Thermoanaerobium brockii* bzw. *Lactobacillus kefir* wurde anstatt der NADH-Lösung eine 1 mM NADPH-Lösung (8.3 mg NADPH-Tetranatriumsalz in 10 ml 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.5) verwendet.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 µl der jeweiligen Enzymlösung und anschließendes kurzes Vortexen gestartet. Die Reaktionslösung wurde sofort in eine Halbmikro-UV-Kunststoffküvette überführt und die Photometer-Messung gestartet.

Der spontane (chemische) Zerfall von NADH bzw. NADPH und die daraus resultierende Abnahme der Extinktion wurden dadurch berücksichtigt, daß in der Referenzküvette im Zweistrahl-Photometer ein dem Test-Ansatz entsprechender Ansatz mit Puffer anstatt Enzym verwendet wurde.

4.10.2.2 Untersuchungen zur Biooxidation von **TsCHO** mit der Aldehyddehydrogenase aus *Saccharomyces cerevisiae* AldDH

Der Test auf enzymatische Oxidation von **TsCHO** zu N-p-Toluolsulfonylpipecolinsäure **TsCOOH** wurde an den photometrischen Standard-Aktivitätstest für die Aldehyddehydrogenase aus *Saccharomyces cerevisiae* (vergl. Abschnitt 4.3.2.1.3) mit Acetaldehyd als Substrat angelehnt

In einem KR wurden 870 μl 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 8.0, 10 μl **TsCHO** (100 mM in Methanol) und 100 μl 10 mM NAD (66.3 mg NAD in 10 ml 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 8.0) zusammenpipettiert und einige Minuten auf 25 °C vortemperiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μl Enzymlösung (10 mg/ml) und anschließendes kurzes Vortexen gestartet. Die Reaktionslösung wurde sofort in eine Halbmikro-UV-Kunststoffküvette überführt und die Photometer-Messung gestartet. Als Referenzküvette diente ein analoger Ansatz mit Puffer anstatt Enzymlösung.

4.10.2.3 Charakterisierung der Umsetzungen von **TsCHO** mit aktiven Dehydrogenasen

Die photometrischen Tests der Screening-Experimente erlauben keinen direkten Nachweis des Reaktionsproduktes von **TsCHO** und es kann nur bei NADH-Konzentrationen bis 0.1 mM gemessen werden, da andernfalls die Extinktion für zuverlässige Messungen zu groß wird. Aufgrund dieser geringen Cofaktorkonzentration blieben die Reaktionsumsätze stets unter 10 %. Daher wurden mit aktiven Dehydrogenasen weitere Umsetzungen bei höheren Cofaktorkonzentrationen durchgeführt, die einen direkten Nachweis des Reaktionsproduktes von **TsCHO** mittels GC und eine Bestimmung der Enantioselektivität der Reaktionen mittels HPLC ermöglichten.

4.10.2.3.1 Umsetzungen mit der ADH aus Pferdeleber

In einem 4-ml-Schraubdeckelvlial wurden 2500 μl 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.5, 450 μl NADH (10 mM in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.5) und 30 μl **TsCHO** (100 mM in Methanol) gemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μl Enzymlösung (0.1 mg/ml) und anschließendes kurzes Vortexen gestartet. Es wurde bei RT inkubiert.

Innerhalb von 90 min wurden 4 Proben entnommen und mittels GC-Analytik untersucht. Dazu wurden 500 μl Reaktionsansatz mit 200 μl Ethylacetat extrahiert und nach Zentrifugation (5 min, 13000 UPM) 100 μl der organischen Phase der GC-Analytik zugeführt. Der verbleibende Reaktionsansatz wurde über Nacht inkubiert und nach 23 h mit 400 μl Ethylacetat extrahiert. Nach Zentrifugation (5 min, 13000 UPM) wurden 100 μl der organischen Phase der GC-Analytik zugeführt und 200 μl in einem offenen 1-ml-Vial durch Überleiten eines Luftstromes eingedampft. Nach Trocknung bei 15 mbar (15 min) wurde in 100 μl Methanol aufgenommen, wie in Abschnitt 4.4.1 beschrieben derivatisiert und per Chiral-HPLC analysiert.

4.10.2.3.2 Umsetzung mit der ADH aus *Lactobacillus kefir*

In einem 4-ml-Schraubdeckelvlial wurden 2270 μl 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.5, 450 μl NADPH (10 mM in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.5) und 30 μl **TsCHO** (100 mM in Methanol) gemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 250 μl Enzymlösung (10 mg/ml) und anschließendes kurzes Vortexen gestartet. Es wurde bei RT inkubiert.

Innerhalb von 25 h wurden 5 Proben entnommen und mittels GC-Analytik untersucht. Dazu wurden 500 μl Reaktionsansatz mit 200 μl Ethylacetat extrahiert und nach Zentrifugation (5 min, 13000 UPM) 100 μl der organischen Phase der GC-Analytik zugeführt.

Eine analog durchgeführte zweite Umsetzung wurde nach 165 min abgebrochen. Dabei wurden 1000 µl des Ansatzes mit 250 µl Ethylacetat extrahiert und nach Zentrifugation (15 min, 13000 UPM) 100 µl der organischen Phase der GC-Analytik zugeführt. Der verbleibende Reaktionsansatz wurde mit 1000 µl Diethylether extrahiert. Nach Zentrifugation (15 min, 13000 UPM) wurden 600 µl der organischen Phase in einem offenen 2-ml-KR durch Überleiten eines Luftstromes eingedampft. Nach Trocknung bei 15 mbar (15 min) wurde in 120 µl Methanol aufgenommen, wie in Abschnitt 4.4.1 beschrieben derivatisiert und per Chiral-HPLC analysiert.

4.10.2.3.3 Umsetzung mit der Aldehyddehydrogenase aus *Saccharomyces cerevisiae*

In einem KR wurden 344 µl 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 8.0, 90 µl NAD (10 mM in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 8.0) und 6 µl **TsCHO** (100 mM in Methanol) zusammengegeben. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 160 µl Aldehyddehydrogenase aus *Saccharomyces cerevisiae* (10 mg/ml in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 8.0) gestartet, inkubiert wurde bei RT. Nach 70 h wurden 300 µl Reaktionsansatz mit 45 µl 1 M H₃PO₄ versetzt und mit 120 µl Ethylacetat extrahiert. Der Rest des Reaktionsansatzes wurde nach Zusatz von 3 µl **TsCHO** (10 mM in Methanol) in gleicher Weise aufgearbeitet. Nach Zentrifugation (15 min, 13000 UPM) wurden die organischen Extrakte mittels qualitativer DC untersucht.

4.10.2.4 Untersuchungen zur Eignung der Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* zur Regeneration von NADH

4.10.2.4.1 Inhibitionsuntersuchungen mit der HLADH

In Reaktionsansätzen zur Bioreduktion von **TsCHO** mit Cofaktorrecycling war eine mögliche Inhibierung der HLADH durch Methanol (1 Vol.-% als Cosolvens) oder durch Formiat (100 mM als Cosubstrat zur NADH-Regenerierung mit der Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii*) in Betracht zu ziehen. Neben Methanol (vgl. Abschnitt 4.3.2.1.4) wurde also auch Natriumformiat in einer Konzentration von 100 mM auf seine inhibitorische Wirkung getestet. Dazu wurden Aktivitätstests mit **TsCHO** als Substrat (vgl. Abschnitt 4.10.2.1) ohne Formiat bei pH 7.0 bzw. pH 8.0 durchgeführt. In direkt anschließenden analog durchgeführten Tests wurden 100 µl des jeweils verwendeten 0.1 M Kaliumphosphatpuffers durch das gleiche Volumen 1 M Natriumformiat ersetzt.

4.10.2.4.2 Inhibitionsuntersuchungen mit der Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii*

Die erfolgreiche Verwendung des Formiat/Formiatdehydrogenase-Systems zum Cofaktorrecycling setzt voraus, daß die FDH nicht durch das Substrat oder Produkt der eigentlichen Bioreduktion inhibiert wird. So wurden neben Methanol (vgl. Abschnitt 4.3.2.1.4) auch **TsCHO** und **TsOH** auf ihre inhibitorische Wirkung getestet. Dazu wurde der Standardaktivitätstest (vgl. Abschnitt 4.3.2.1.3) abgewandelt, indem 10 µl 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 8.0 durch 10 µl Inhibitorlösung (100 mM **TsCHO** in Methanol bzw. 100 mM **TsOH** in Methanol) ersetzt wurden.

4.10.2.4.3 Bioreduktion von TsCHO mit HLADH und gekoppeltem NADH-Recycling in analytischem Maßstab

In 4-ml-Schraubdeckel-Vials wurden jeweils 2610 μl 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 8.0, 300 μl 1M Natriumformiat, 30 μl NAD (10 mM in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 8.0) und 30 μl **TsCHO** (100 mM in Methanol) gemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Enzyme (Tabelle 4.10-2) und kurzes Vortexen gestartet. Inkubiert wurde im verschlossenen Vial bei RT.

Über einen Zeitraum von 48 h wurden jeweils 6 Proben genommen und mittels Chiral-GC analysiert. Dazu wurden 500 μl Reaktionsansatz mit 125 μl Ethylacetat extrahiert und nach Zentrifugation (2 min, 13000 UPM) die organische Phase der GC-Analytik zugeführt.

Tabelle 4.10-2: Eingesetzte Enzymmengen bei der Bioreduktion von **TsCHO** mit HLADH und gekoppeltem NADH-Recycling in analytischem Maßstab

Ansatz	HLADH ¹⁾	FDH ²⁾	M [mg/l] ³⁾	m _{HLADH} /M [%] ⁴⁾	m _{FDH} /M [%] ⁵⁾
1	1.5 μl	28.5 μl	10	5	95
2	4.5 μl	25.5 μl	10	15	85
3	7.5 μl	22.5 μl	10	25	75

¹⁾ ADH aus Pferdeleber, 1 mg/ml in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 8.0
²⁾ FDH aus *Candida boidinii*, 1 mg/ml in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 8.0
³⁾ Gesamtkonzentration beider Enzyme
⁴⁾ Massenanteil der HLADH
⁵⁾ Massenanteil der FDH

4.10.2.5 Optimierung der Reaktionsbedingungen für die Bioreduktion von **TsCHO** mit HLADH unter Verwendung der Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* zum Recycling von NADH

4.10.2.5.1 Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit der Bioreduktion von TsCHO mit HLADH

Hier wurde entsprechend der Vorgehensweise bei den Screening-Umsetzungen (vgl. Abschnitt 4.10.2.1) verfahren. Jedoch wurden anstatt 0.1 M Kaliumphosphatpuffer vom pH 6.5 entsprechende Puffer mit pH-Werten von 5.0, 6.0, 7.0 und 8.0, auch zur Lösung von NADH und Enzym, verwendet. Die HLADH wurde in einer Konzentration von 10 mg/l eingesetzt.

4.10.2.5.2 Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit der Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii*

Die Tests wurden wie die Standard-Aktivitätstests für die Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* durchgeführt (vgl. Abschnitt 4.3.2.1.3). Jedoch wurden außer 0.1 M Kaliumphosphatpuffer vom pH 8.0 auch entsprechende Puffer mit pH-Werten von 5.0, 6.0 und 7.0, auch zur Lösung von NAD und Enzym, verwendet. Da die Zugabe der Substratlösung (100 μl 1M Natriumformiat, vgl. Abschnitt 4.3.2.1.3) den pH-Wert

der Reaktionsansätze veränderte, wurde der genaue resultierende pH-Wert nach der Durchführung des Photometertests gemessen. Die FDH wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml eingesetzt.

4.10.2.5.3 Untersuchungen zum Einfluß von Substrat- und Cofaktorkonzentration

Ergänzend zu den in Abschnitt 4.10.2.4.3 beschriebenen Umsetzungen wurden noch weitere Umsetzungen unter teilweise geänderten Bedingungen durchgeführt (Tabelle 4.10-3). Ziel war in allen Fällen eine Erhöhung der TTN für NADH unter Berücksichtigung der jeweils erzielbaren Ausbeute von D-TsOH.

Die Reaktion wurde durch Zugabe der Enzyme (Tabelle 4.10-3) und kurzes Vortexen gestartet. Inkubiert wurde in verschlossenen 4-ml-Vials bei RT.

Nach 67 h wurden die Reaktionen abgebrochen, da nach dieser Zeit keine Produktzunahme mehr zu verzeichnen war. Je 500 µl Reaktionsansatz wurden mit 125 µl Ethylacetat extrahiert und nach Zentrifugation (2 min, 13000 UPM) die organische Phase der GC-Analytik zugeführt.

Außerdem wurden nach Abbruch der Reaktion 2000 µl von Ansatz 1 (Tabelle 4.10-3) mit 1000 µl Diethylether extrahiert. Nach Zentrifugation (15 min, 13000 UPM) wurden 600 µl der organischen Phase in einem offenen 2-ml-KR durch Überleiten eines Luftstromes eingedampft. Nach Trocknung bei 15 mbar (15 min) wurde in 120 µl Methanol aufgenommen, wie in Abschnitt 4.4.1 beschrieben derivatisiert und per Chiral-HPLC analysiert.

Tabelle 4.10-3: Zusammensetzung der Reaktionsansätze bei der Bioreduktion von TsCHO mit HLADH und gekoppeltem NADH-Recycling

Ansatz	1	2	3	4
0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 8.0	2556 µl	842 µl	762 µl	861 µl (pH 7.0)
1 M Natriumformiat	300 µl	100 µl	100 µl	100 µl
NAD (10 mM in Reaktionspuffer)	30 µl	10 µl	100 µl (0.1 mM)	10 µl
TsCHO (100 mM in Methanol)	30 µl	20 µl	10 µl	10 µl
HLADH ¹⁾	60 µl	20 µl	20 µl	10 µl*
FDH ²⁾	24 µl	8 µl	8 µl	9 µl*
C_{TsCHO}	1 mM	2 mM	1 mM	1 mM
C_{NAD}	100 µM	100 µM	10 µM	100 µM
m_{HLADH}/M_E ³⁾	20 %	20 %	20 %	10 %
m_{FDH}/M_E ⁴⁾	80 %	80 %	80 %	90 %

¹⁾ ADH aus Pferdeleber, 0.1 mg/ml in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 8.0 (*pH 7.0)

²⁾ FDH aus *Candida boidinii*, 1 mg/ml in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 8.0 (*pH 7.0)

³⁾ Massenanteil der HLADH an der Gesamtmasse $M_E = m_{HLADH} + m_{FDH}$ der Enzyme

⁴⁾ Massenanteil der FDH

4.10.2.5.4 Bestimmung von Werten für K_M und V_{max} der beteiligten Teilreaktionen

Für die sinnvolle Planung einer präparativen Bioreduktion von **TsCHO** mit HLADH und gekoppeltem NADH-Recycling ist die Kenntnis kinetischer Parameter der beteiligten Teilreaktionen unter den vorgesehenen Reaktionsbedingungen eine wichtige Grundlage.

Da es sich bei beiden Teilreaktionen (i. Reduktion von **TsCHO** mit HLADH/NADH; ii. Oxidation von Formiat mit FDH/NAD) um Cofaktor-abhängige Reaktionen handelt, sind eigentlich kinetische Modelle für enzymatische 2-Substrat-Reaktionen heranzuziehen. Diese lassen sich aber bei Konstanzhaltung der Konzentration eines der 2 Substrate in gewöhnliche Michaelis-Menten-Kinetiken überführen (Segel, 1975). Derart bestimmte Werte für K_M und V_{max} sind dann allerdings nur bei der gewählten Konzentration des nicht veränderlichen Substrates gültig.

Desweiteren sind die angeführten Redox-Teilreaktionen reversible Reaktionen. Da aber sehr hohe Formiatkonzentrationen relativ zu den Konzentrationen der anderen Reaktanden gewählt wurden und damit das Gleichgewicht der Gesamtreaktion fast vollständig auf der Produktseite liegt, ist es vertretbar die untersuchten Teilreaktionen als irreversibel zu betrachten. Desweiteren bleibt die Formiatkonzentration während der gesamten Reaktion nahezu konstant. Auch die Konzentration des Substrates **TsCHO** ist zu Beginn der Reaktion mindestens 10 mal so groß, wie die der Cofaktoren. Sie kann daher für eine Ermittlung von Anfangsreaktionsraten ebenfalls als konstant betrachtet werden.

*Bestimmung von $K_M(\text{NADH})$ und V_{max} für die Reduktion von **TsCHO** mit der HLADH in Gegenwart von Formiat*

Bei den hierfür durchgeführten Umsetzungen wurde die Konzentration des Cofaktors NADH klein gegenüber der Konzentration des Substrates **TsCHO** gewählt. Letztere wurde über den betrachteten Reaktionszeitraum als konstant angesehen.

Der Verlauf der Reaktionen wurde wie bei den Screening-Umsetzungen (vergl. Abschnitt 4.10.2.1) im Photometer bei 340 nm verfolgt. Die kinetischen Parameter $K_M(\text{NADH})$ und V_{max} wurden bei pH 7.0 und pH 8.0 bestimmt.

In einem KR wurden dazu 860 μl 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 bzw. pH 8.0, 10 μl **TsCHO** (100 mM in Methanol), 20 μl NADH (10 mM in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 bzw. pH 8.0) und 100 μl 1 M Natriumformiat zusammenpipettiert und einige Minuten auf 25 °C vortemperiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μl HLADH (0.1 mg/ml in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 bzw. pH 8.0) und anschließendes kurzes Vortexen gestartet. Die Reaktionslösung wurde sofort in eine Halbmikro-UV-Kunststoffküvette überführt und die Photometer-Messung gestartet.

In der Referenzküvette im Zweistrahl-Photometer wurde ein dem Test-Ansatz entsprechender Ansatz mit Puffer anstatt NADH-Lösung verwendet.

Für die Anpassung der Parameter $K_M(\text{NADH})$ und V_{max} an die aus den Photometerdaten ermittelten zeitlichen Verläufe der NADH-Konzentration wurde die integrierte Form der Michaelis-Menten-Gleichung verwendet:

$$t = \frac{1}{V_{\max}} \left(K_M \ln \frac{[S]_0}{[S]} + [S]_0 - [S] \right)$$

t : Reaktionszeit
 $[S]$: Konzentration des Substrates (NADH)
 $[S]_0$: Anfangskonzentration des Substrates
 K_M : Michaelis-Menten-Konstante (NADH)
 V_{\max} : Maximale Reaktionsgeschwindigkeit

Bestimmung von $K_M(\text{NAD})$ und V_{\max} für die Oxidation von Formiat mit der FDH aus *Candida boidinii*

Bei den hierfür durchgeführten Umsetzungen wurde die Konzentration des Cofaktors NAD variiert und die Konzentration des Substrates Formiat konstant gehalten (s.o.). Anfangs-Reaktionsraten wurden wie bei den Standard-Aktivitätstests für die Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* im Photometer bei 340 nm gemessen (vgl. Abschnitt 4.3.2.1.3). Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze ist in Tabelle 4.10-4 wiedergegeben. Die kinetischen Parameter $K_M(\text{NAD})$ und V_{\max} wurden bei pH 7.0 und bei pH 8.0 bestimmt (vgl. Parameter der HLADH, obiger Abschnitt).

Tabelle 4.10-4: Zusammensetzung der Reaktionsansätze zur Bestimmung von $K_M(\text{NAD})$ und V_{\max} für die Oxidation von Formiat mit der FDH aus *Candida boidinii* bei pH 7.0 bzw. bei pH 8.0 (Werte in Klammern).

Ansatz	1	2	3	4	Referenz¹⁾
0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 (pH 8.0)	870 μl (875 μl)	850 μl (860 μl)	780 μl (810 μl)	680 μl (730 μl)	880 μl
1M Natriumformiat	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl
NAD (10 mM in Reaktionspuffer)	10 μl (5 μl)	30 μl (20 μl)	100 μl (70 μl)	200 μl (150 μl)	-
FDH ²⁾	20 μl	20 μl	20 μl	20 μl	20 μl
C_{NAD}	0.1 mM (0.05 mM)	0.3 mM (0.2 mM)	1.0 mM (0.7 mM)	2.0 mM (1.5 mM)	-

¹⁾ Lösung für die Referenzstrahl-Küvette im Photometer
²⁾ FDH aus *Candida boidinii*, 1 mg/ml im entsprechenden Reaktionspuffer

Aus den Photometerdaten wurden Anfangs-Reaktionsraten in Abhängigkeit der NAD-Konzentration ermittelt. Anschließend wurden die Michaelis-Menten-Parameter $K_M(\text{NAD})$ und V_{\max} an den experimentell ermittelten Verlauf angepaßt.

4.11 Präparative Umsetzungen

4.11.1 Hydrolyse von N-*tert*-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester **BC-E**

A.

Zur Herstellung des Reaktionspuffers wurden 50 ml 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.4 und 11.1 ml Triton[®] X-100 (10 g/l) mit Wasser zu einem Endvolumen von 500 ml verdünnt. 360 ml dieses Puffers wurden in einem 1-l-Rundkolben vorgelegt und mit einer Lösung von 1.00 g (4.18 mmol) (±)-**BC-E** in 40 ml Toluol versetzt. Der Mischung wurde unter kräftigem Rühren 120 mg Lipase aus *Candida antarctica* B (L-2, Roche Diagnostics, in 2 ml 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.4) zugesetzt. Der Ansatz wurde anschließend unter Schutz vor Luft und Sonnenlicht bei RT gerührt. Nach einer Reaktionszeit von 75 h wurden der Reaktionsmischung Proben von 200 µl entnommen, die mit 200 µl Toluol verdünnt und zentrifugiert wurden. Die organische Phase wurde per Chiral-GC analysiert. Außerdem wurden nach 48.5 h und nach 176.5 h Reaktionszeit Proben (100 µl) entnommen, wie in Abschnitt 4.8.1.3.1 beschrieben aufgearbeitet und mittels Chiral-HPLC analysiert. Nach 196 h Reaktionszeit war chiral-gaschromatographisch kein (+)-(1*R*, 5*R*, 6*R*)-**BC-E** mehr nachzuweisen.

Die Reaktionsmischung wurde mit 1 M Phosphorsäure auf pH 3.0 angesäuert und anschließend 125 g NaCl zugesetzt. Nach 4-maliger Extraktion mit Diethylether (500 ml + 3 x 200 ml) wurden die vereinigten organischen Phasen zuerst mit gesättigter NaCl-Lösung, dann mehrfach mit 1 M KHCO₃ gewaschen, bis per DC kein **BC-S** mehr in der organischen Phase nachzuweisen war. Schließlich wurde mit Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und über Kieselgel (35 x 40 mm) filtriert. Schließlich wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Es blieben 335 mg (34 %) (-)-(1*S*, 5*S*, 6*S*)-**BC-E**.

Die vereinigten wäßrigen KHCO₃-Phasen wurden zur Entfernung von **BC-E**-Resten zweimal mit Cyclohexan gewaschen und mit 2.5 M HCl auf pH ~ 3.5 angesäuert. Anschließend wurde mit 1 M Phosphorsäure auf pH 3.0 eingestellt. Die resultierende Suspension wurde mit Diethylether (3 x 100 ml) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Es wurden 462 mg (49 %) (+)-(1*R*, 5*R*, 6*R*)-**BC-S** erhalten.

B.

384 ml 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 5.0 wurden in einem 1-l-Rundkolben vorgelegt und mit einer Lösung von 1.067 g (4.46 mmol) (±)-**BC-E** in 43 ml Cyclohexan versetzt. Der Mischung wurde unter kräftigem Rühren 64 mg Lipase aus *Candida antarctica* B (L-2, Roche Diagnostics, in 1 ml 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.0) zugesetzt. Der Ansatz wurde anschließend unter Schutz vor Luft und Sonnenlicht bei RT gerührt.

In einem Zeitraum von 20 h wurden der Reaktionsmischung Proben von 100 µl entnommen und diese jeweils mit 15 µl 1 M und 200 µl Toluol versetzt und zentrifugiert. Die organische Phase wurde per Chiral-GC analysiert. Außerdem wurde nach 19.5 h Reaktionszeit eine Probe (100 µl) entnommen, wie in Abschnitt 4.8.1.3.1 beschrieben aufgearbeitet und mittels Chiral-HPLC analysiert. Nach 19.5 h

Reaktionszeit wurde chiral-gaschromatographisch ein Enantiomerenüberschuß von 48.4 % (-)-(1*S*, 5*S*, 6*S*)-**BC-E** gemessen. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Reaktion abgebrochen.

Die Reaktionsmischung wurde mit 10 ml 1 M Phosphorsäure angesäuert (pH 3) und anschließend 125 g NaCl zugesetzt. Nach Extraktion mit Diethylether (300 ml + 3 x 100 ml) wurden die vereinigten organischen Phasen zuerst mit gesättigter NaCl-Lösung, dann mit 1 M KHCO₃ (100 ml + 2 x 50 ml) gewaschen, bis per DC kein **BC-S** mehr in der organischen Phase nachzuweisen war. Schließlich wurde mit Wasser gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und über Kieselgel (35 x 40 mm) filtriert. Schließlich wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Es blieben 711 mg (67 %) (-)-(1*S*, 5*S*, 6*S*)-**BC-E**.

Die vereinigten wäßrigen (KHCO₃ -) Phasen wurden zur Entfernung von **BC-E**-Resten einmal mit Cyclohexan gewaschen und mit 2.5 M HCl auf pH ~ 3.5 angesäuert. Anschließend wurde mit 1 M Phosphorsäure auf pH 3.0 eingestellt. Die resultierende Lösung wurde mit Diethylether (4 x 50 ml) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Es wurden 303 mg (30 %) (+)-(1*R*, 5*R*, 6*R*)-**BC-S** erhalten.

4.11.2 Reduktion von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO**

Um der Oxidationsempfindlichkeit von NADH (Budavari, 1987) und der FDH (Chenault und Whitesides, 1987) entgegenzuwirken, wurde die Reaktion unter Sauerstoffausschluß in Stickstoffatmosphäre durchgeführt. 1068 ml 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 und 120 ml 1 M Natriumformiat (entspr. 120 mmol Formiat) wurden in einem 2-l-Stickstoffkolben unter Rühren mit Helium entgast. Im Stickstoff-Gegenstrom wurden 80 mg (0.12 mmol) NADH-Dinatriumsalz und 321.2 mg **TsCHO** (1.2 mmol) in 12 ml Methanol zugegeben. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 10.2 mg FDH aus *Candida boidinii* (in 1000 µl 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.0) und 1.8 mg HLADH (entspr. 180 µl Originalsuspension) gestartet. Anschließend wurde unter Stickstoffatmosphäre bei RT gerührt. Dabei färbte sich die Reaktionslösung allmählich bräunlich (vgl. Abschnitt 4.6.5).

In einem Zeitraum von 142 h wurden im Stickstoff-Gegenstrom 7 Proben entnommen und per Chiral-GC analysiert. Dazu wurden 800 µl Probe mit 200 µl Ethylacetat extrahiert und nach Zentrifugation die organische Phase der GC-Analytik zugeführt.

Nach 42 h und nach 91 h wurden dem Reaktionsansatz im Stickstoff-Gegenstrom jeweils 20 mg (0.03 mmol) NADH-Dinatriumsalz, 2.5 mg FDH aus *Candida boidinii* (in 250 µl 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.0) und 0.45 mg HLADH (entspr. 45 µl Originalsuspension) zugesetzt, um die Inaktivierung von Enzymen und den Zerfall Cofaktoren auszugleichen.

Nach 142 h wurde per GC eine Ausbeute von 76 % Produkt gemessen und die Reaktion abgebrochen. Dazu wurde die Reaktionslösung mit Diethylether extrahiert (2 x 250 ml + 2 x 100 ml), wobei die bräunliche Farbe in der wäßrigen Phase verblieb. Dabei wurden > 99 % des Reaktionsproduktes D-**TsOH** aus der wäßrigen Phase extrahiert (GC). Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Es wurden 279 mg Rohprodukt (D-**TsOH** + L-**TsCHO**) erhalten. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (45 g Kieselgel 60, Ethylacetat / n-Hexan 60:40) und nach Trocknung im HV blieben 236 g (73 %) D-**TsOH** und 26 mg (8 %) L-**TsCHO**.

5 Ergebnisse

5.1 Hydrolyse von *N-tert*-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester **BC-E**

5.1.1 Umsetzung unter Screening-Bedingungen

Bei früher durchgeführten Messungen der Enantioselektivität bei der Hydrolyse von **BC-E** mit der Lipase aus *Candida antarctica* B unter Screening-Bedingungen konnte der E-Wert der Reaktion nicht zuverlässig bestimmt werden (Vielhauer, 1997; siehe auch Abschnitt 4.8.1.2). Die Lipase L-2 zeigte bei Auftragung des Substrat-Enantiomerenüberschusses (ee_S) über dem Umsatz (c) nicht die zu erwartenden Verläufe (Chen et al., 1982), sondern einen atypischen Verlauf (Abbildung 5.1-1). Außerdem verursachte das Enzym in den hohen eingesetzten Konzentrationen Probleme bei der Probenaufarbeitung durch die Bildung sehr stabiler Emulsionsinterphasen. Eine detaillierte Analyse der Meßdaten legte den Schluß nahe, daß merkliche Mengen Substrat nicht aus dem Reaktionsansatz extrahierbar waren (Vielhauer, 1997). Da der Umsatz c allein aus der Substratabnahme bestimmt wurde, würde dieser Umstand zu falschen Umsatzwerten führen.

Daher wurde die Reaktion analog der früheren Vorgehensweise wiederholt (vergl. Abschnitt 4.8.1.2). Allerdings wurde eine verbesserte quantitative DC-Analytik verwendet, die eine gleichzeitige Bestimmung von Substrat (**BC-E**) und Produkt (**BC-S**) und damit eine Bilanzierung erlaubt (Abschnitt 4.3.3.2).

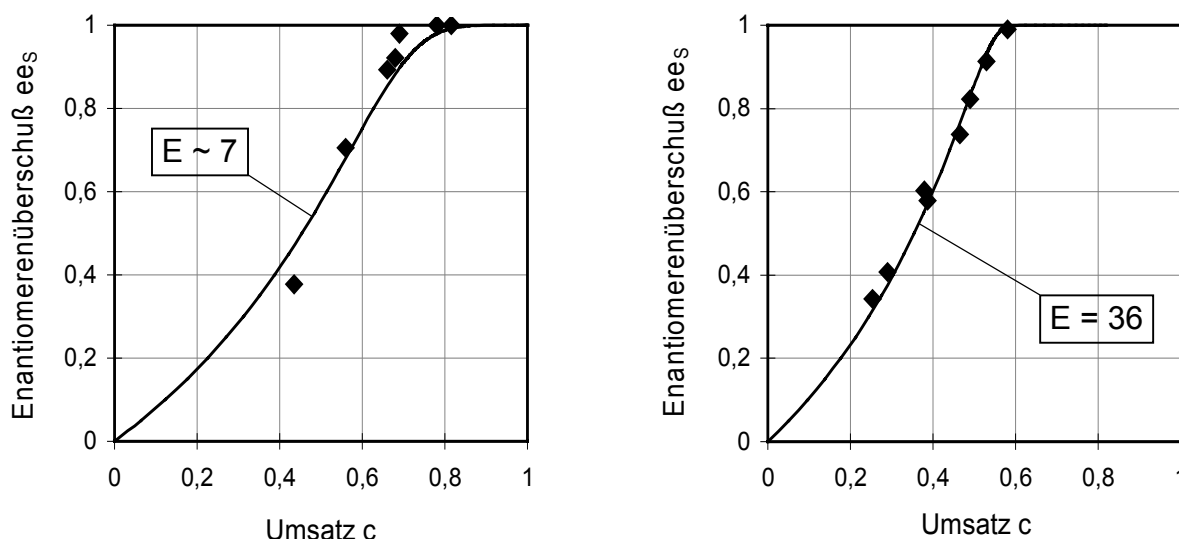


Abbildung 5.1-1: Substrat-Enantiomerenüberschuß (ee_S) über dem Umsatz (c) bei der Hydrolyse von **BC-E** mit der Lipase aus *Candida antarctica* B im Zweiphasensystem: 60 % 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.4, 40 % 10 mM **BC-E** in Toluol. Durchgezogene Graphen entsprechen dem berechneten Verlauf der Reaktionen nach dem Modell von Chen et al. (1982).

Links eine früher durchgeführte, schlecht anpaßbare Messung ohne Bilanzierung (Vielhauer, 1997). Rechts eine im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Messung mit verbesserter Probenaufarbeitung und erweiterter quantitativer DC-Analytik.

Die Wiederfindung von **BC-E** und **BC-S** betrug bei allen Proben in der Summe 100 ± 2 %. Es wurde im Gegensatz zu den früher durchgeführten Messungen also kein an das Enzym adsorbiertes Substrat zurückgehalten. Dies kann auf die Zugabe von Phosphorsäure zu den Reaktionsansätzen vor der Extraktion mit Toluol bei den neueren Versuchen zurückgeführt werden (vgl. Abschnitt 4.8.1.2). Somit kann die Bestimmung der Reaktionsumsätze (c) im Rahmen des Meßfehlers von 2 % als zuverlässig angesehen werden.

Die (ebenfalls zuverlässige) Messung der Enantiomerenüberschüsse mittels Chiral-Gaschromatographie lieferte nun bei Auftragung des Substrat-Enantiomerenüberschusses (ee_S) über dem Umsatz (c) einen gut anpaßbaren Verlauf (siehe Abbildung 5.1-1). Der E-Wert der Reaktion wurde zu $E = 36$ bestimmt, die spezifische Aktivität betrug $EA = 4 \cdot 10^{-4}$ U/mg.

5.1.2 Optimierung der Reaktionsbedingungen

In einer vorangegangenen Arbeit wurde bereits ein Screening auf die Hydrolyse von **BC-E** und eine Charakterisierung der aktivsten Enzyme (Esterase aus Schweineleber und drei Lipasen) durchgeführt (Vielhauer, 1997). Das aussichtsreichste Enzym, die Lipase aus *Candida antarctica* B (L-2, Roche Diagnostics), wies unter Screeningbedingungen im Zweiphasensystem zwar eine gute Selektivität, aber eine unzureichende Aktivität auf. Andererseits war die Aktivität der untersuchten Lipasen in rein wässrigem Medium um zwei Zehnerpotenzen höher, als unter Screeningbedingungen. Die Selektivität war in diesem Fall jedoch gering. Aufgabe war es also, die Reaktionsbedingungen soweit zu optimieren, daß eine präparative Umsetzung mit vertretbaren Enzymmengen bei guter Selektivität ermöglicht wurde.

5.1.2.1 Einfluß des Lösungsmittels

Die Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel kann die Enantioselektivitäten und Aktivitäten von Lipasen verändern (Faber, 1997). Zur Beschreibung dieser experimentellen Beobachtungen entwickelten Laane und Mitarbeiter das Log P-Konzept (Laane et al., 1986). Der Log P-Wert ist der logarithmische Verteilungskoeffizient einer Substanz in einem Zweiphasensystem aus Wasser und Octanol. Er stellt ein Maß für die Hydrophobizität einer Substanz dar. Mit Hilfe dieses Konzeptes konnte für bestimmte Beispiele ein Zusammenhang zwischen der Aktivität von Lipasen und der Hydrophobizität des verwendeten Lösungsmittels hergestellt werden.

Auch die Veränderung von Enantioselektivitäten bestimmter Biokatalysatoren durch die Verwendung verschiedener Lösungsmittel mit unterschiedlichen Log P-Werten konnte in zahlreichen Fällen gezeigt werden. Eine generelle Korrelation konnte in diesem Fall bisher jedoch nicht nachgewiesen werden.

Verknüpft mit der Hydrophobizität eines Lösungsmittels ist seine Polarität. Diese kann relativ einfach mit sogenannten Polaritätsindikatoren gemessen werden (Reichardt, 1994). Zum Vergleich wurde auch diese sog. E_T^N -Polaritätsskala zur Charakterisierung der getesteten Lösungsmittel herangezogen.

Zur Untersuchung dieses Einflusses auf die Enantioselektivität und Aktivität wurden 6 mit Wasser nicht mischbare Lösungsmittel ausgewählt. Die Log P-Werte liegen

zwischen 4.11 und 0.83, die E_T^N -Werte zwischen 0.006 und 0.321. Die Umsetzungen wurden wie in Abschnitt 4.8.1.3.1 beschrieben durchgeführt.

In Tabelle 5.1-1 sind die verwendeten Lösungsmittel, ihre Polaritätsdaten und die Ergebnisse der jeweiligen Umsetzungen aufgeführt. Außer der Verwendung der unterschiedlichen Lösungsmittel wurden alle anderen Reaktionsparameter bei den jeweiligen Reaktionsansätzen konstant gehalten.

Tabelle 5.1-1: Einfluß des Lösungsmittels auf die Aktivität und Enantioselektivität der Hydrolyse von N-tert-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester BC-E (100 mM) mit der Lipase aus Candida antarctica B bei pH 7.4 und Anwesenheit von 200 mg/l Triton[®] X-100 (s. 4.8.1.3.1).

Lösungsmittel	Log P	E_T^N (c)	Aktivität ¹⁾ [U/mg]	Enantioselektivität $E^{2)}$
Cyclohexan	3.44 ^b	0.006	0,19	12.9
n-Hexan	4.11 ^a	0.009	0,23	12.0
1-Hexen	3.39 ^a	0.052	0,11	12.2
Toluol	2.65 ^a	0.099	$9.5 \cdot 10^{-3}$	13.5
Diethylether	0.83 ^b	0.117	$6.5 \cdot 10^{-3}$	13.0
2-Pentanon	0.99 ^a	0.321	$5.4 \cdot 10^{-4}$	$16 \pm 1^{3)}$

^a nach Tewari et al., 1982

^b nach Hansch und Leo, 1979

^c nach Reichardt, 1994

¹⁾ Spezifische Enzymaktivität für den Umsatz beider Enantiomere.

²⁾ E-Wert für die Enantioselektivität (Chen et al., 1982).

³⁾ Wegen sehr geringer Aktivität aus nur einem Meßwert bei relativ geringem Umsatz (14 %) bestimmt

Zunächst fällt der sehr geringe Einfluß der Lösungsmittelpolarität auf die Enantioselektivität der Reaktion auf. Durch Veränderung des Lösungsmittels kann somit keine Steigerung der Enantioselektivität und damit keine Erhöhung der möglichen Ausbeute erwartet werden. Die Unterschiede im E-Wert sind zwar sehr gering, liegen aber eindeutig außerhalb des Bereichs von Meßfehlern. Präparativ haben derartig geringe Unterschiede jedoch keine Bedeutung.

Einen dramatischen Einfluß hat die Lösungsmittelpolarität jedoch auf die Aktivität der Biotransformation. Sie ist bei unpolaren, aliphatischen bzw. alicyclischen Kohlenwasserstoffen ca. 20 mal größer als bei allen anderen Solventien, ohne daß hier die Enantioselektivität entscheidend schlechter wäre. Die Daten sind in Abbildung 5.1-2 zur Veranschaulichung zusammengefaßt.

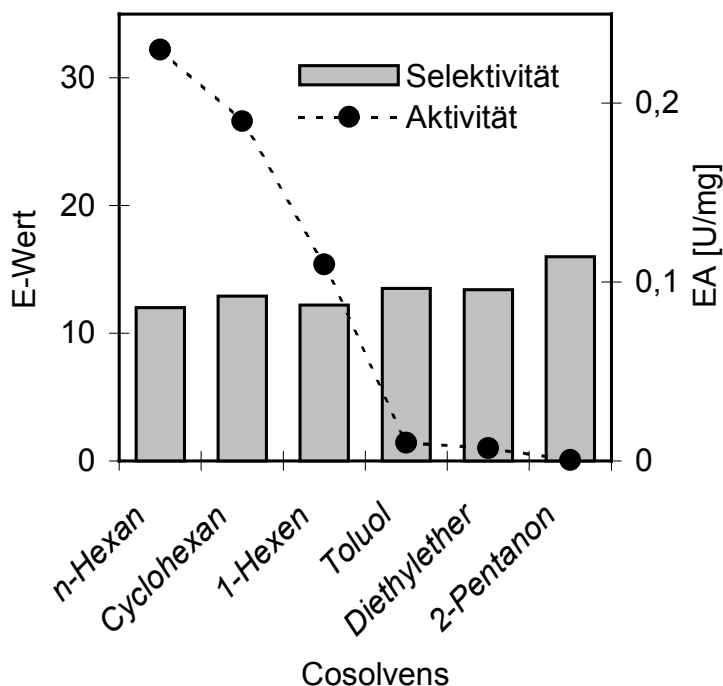


Abbildung 5.1-2: Hydrolyse von *N*-tert-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester **BC-E** mit der Lipase aus *Candida antarctica B* unter Verwendung verschiedener Cosolventien. Die Enantioselektivität ist durch den E-Wert nach Chen et al. (1982) repräsentiert. Die spezifische Enzymaktivität (EA) ist für den Umsatz beider Enantiomere berechnet.

Eine Korrelation zwischen der Lösungsmittelpolarität und der Enzymaktivität der Reaktion ist in Abbildung 5.1-3 dargestellt. Dabei korreliert der E_T^N -Wert ($R^2 = 0.90$) etwas besser mit der Aktivität der Hydrolyse von **BC-E** als der Log P-Wert ($R^2 = 0.81$).

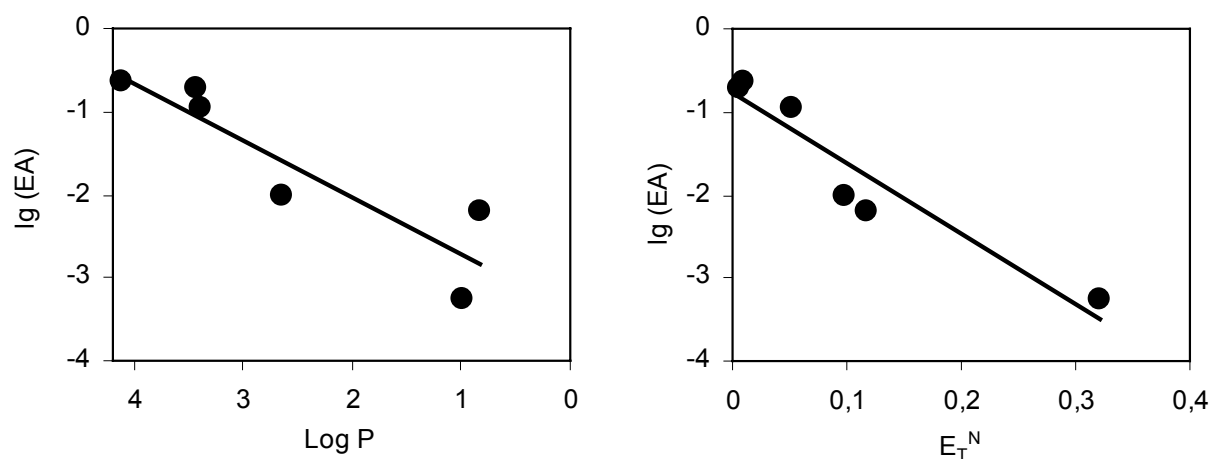


Abbildung 5.1-3: Korrelation zwischen der Enzymaktivität bei der Hydrolyse von **BC-E** mit dem Log P-Wert (Laane et al., 1986) der bzw. dem E_T^N -Wert (Reichardt, 1994) des jeweils verwendeten Lösungsmittel. Aufgetragen ist der dekadische Logarithmus der spezifischen Enzymaktivität (EA) über dem jeweiligen Polaritätsmaß.

5.1.2.2 Einfluß des pH-Wertes

Es ist eine allgemein bekannte Tatsache, daß der pH-Wert einen Einfluß auf die Aktivität der verschiedensten Enzyme besitzt. Der Einfluß auf die Enantioselektivität ist dagegen ein erstaunlich wenig untersuchtes Phänomen (vgl. Boutelje et al., 1988; Barton et al., 1990; Pamperin et al., 1998; Waniek, 2000).

Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sind in Abbildung 5.1-4 zusammengefaßt. Die entsprechenden Umsetzungen wurden unter optimierten Bedingungen mit Cyclohexan als Cosolvens im Zweiphasensystem durchgeführt (vgl. Abschnitt 4.8.1.3.2).

Charakteristische Optima bezüglich des pH-Werts sind weder bei der Aktivität noch bei der Enantioselektivität zu erkennen. Unterhalb von pH 5 ist jedoch das Reaktionsprodukt *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäure **BC-S** nicht ausreichend stabil (Braunfärbung des Reaktionsansatzes durch Zersetzung von **BC-S**), während oberhalb von pH 8 eine chemische Hydrolyse des Substrates **BC-E** zu verzeichnen ist. Aus diesen Gründen wurde der untersuchte pH-Bereich nicht weiter ausgedehnt.

Die Aktivität der Reaktion zeigte keine solch dramatische Abhängigkeit vom pH-Wert, wie von der Polarität des Lösungsmittels (vgl. Abschnitt 5.1.2.1). Dennoch ist die Lipase oberhalb des Neutralpunktes etwas aktiver als im leicht sauren Milieu. Dagegen ließ sich die Enantioselektivität durch Senken des pH Werts deutlich steigern. Während der E-Wert bei pH 7.4 - vor der Optimierung des pH-Werts - bei E = 13 lag, wurde nach der Optimierung bei pH 5.0 ein E-Wert von 32 erreicht. Diese Steigerung hat durchaus Auswirkungen auf die erreichbaren Ausbeuten und auf die möglichen optischen Reinheiten, vor allem des Reaktionsproduktes **BC-S**. Dieser Unterschied ist in Abbildung 5.1-5 verdeutlicht.

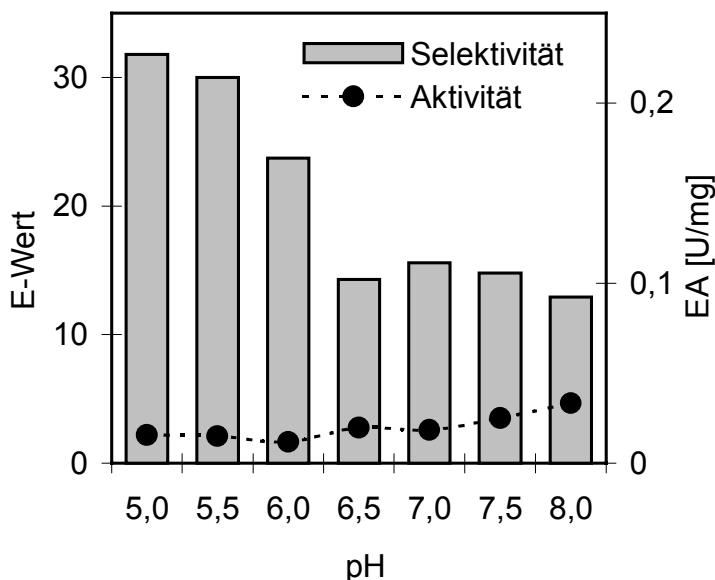


Abbildung 5.1-4: Einfluß des pH-Werts der wäßrigen Phase auf die spezifische Aktivität (EA) und Enantioselektivität (E-Wert) der Hydrolyse von *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester **BC-E** im Zweiphasensystem, katalysiert durch die Lipase aus *Candida antarctica* B.

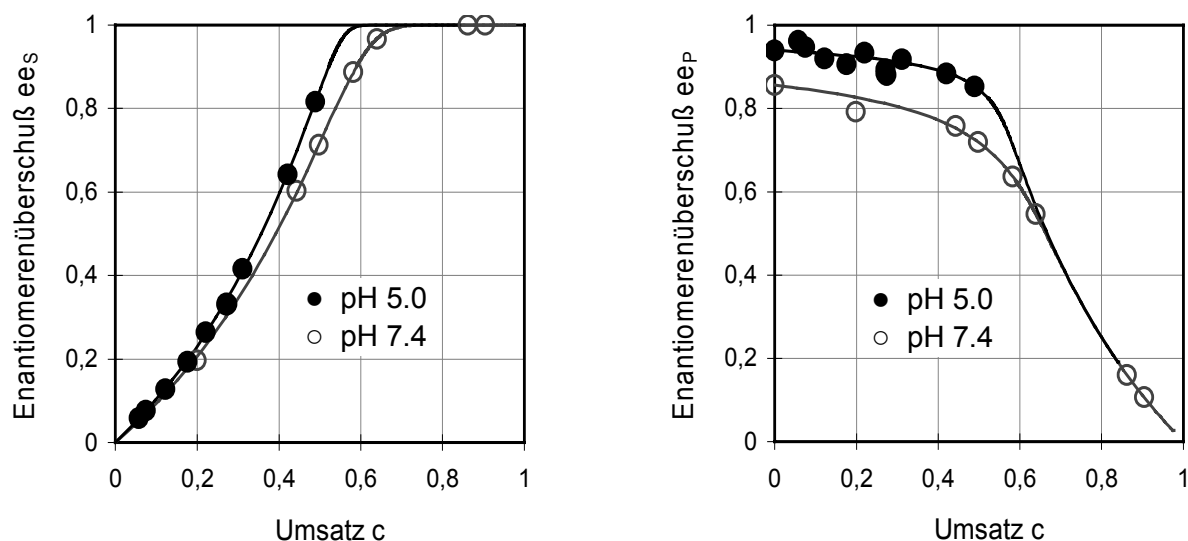


Abbildung 5.1-5: Hydrolyse von **BC-E** mit der Lipase aus *Candida antarctica B* im Zweiphasensystem mit Cyclohexan als Cosolvens: Vor der Optimierung des pH-Wertes bei pH 7.4 (○) und nach der Optimierung bei pH 5.0 (●). Links ist der Enantiomerenüberschuß des Substrates **BC-E** (ee_S) über dem Reaktionsumsatz (c) dargestellt, rechts der des Produktes **BC-S** (ee_P) über dem Reaktionsumsatz (c). Durchgezogene Graphen entsprechen dem berechneten Verlauf der Reaktionen nach dem Modell von Chen et al. (1982).

5.1.2.3 Sonstige Einflüsse

Die hier aufgeführten Einflüsse auf die enzymatische Hydrolyse von **BC-E** mit der Lipase aus *Candida antarctica B* wurden nicht in eigens angelegten Versuchsreihen systematisch untersucht. Dennoch lassen sich aus der Vielzahl der durchgeführten Umsetzungen (vgl. Abschnitte 4.8.1.1, 4.8.1.2 und 4.8.1.3.3) und den dabei gemachten Beobachtungen einige Schlüsse ziehen.

Die Ergebnisse aller Umsetzungen, die nicht zur Optimierung des pH-Werts oder des Lösungsmittels durchgeführt wurden, sind in Tabelle 5.1-2 zusammengestellt.

Eine Reduzierung des Volumens der wäßrigen Phase bei Beibehaltung der Konzentration von **BC-E** in der organischen Phase zur Verkleinerung des Reaktionsvolumens und zur Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute wurde mit Cyclohexan als Cosolvens getestet (Tabelle 5.1-2, Einträge 7 und 8). Diese **Änderung des Phasenverhältnisses** zu Gunsten der organischen Phase steigerte die Aktivität geringfügig um etwa 15 % während die Enantioselektivität um ca. 12 % abnahm.

Die Stabilisierung der Emulsionen bei Reaktionen in Zweiphasensystemen **mittels Zusatz einer oberflächenaktiven Substanz**, in diesem Fall Triton[®] X-100, zeigte einen eindeutigen Einfluß sowohl auf die Geschwindigkeit als auch auf die Selektivität der Hydrolyse von **BC-E**. Bei der Verwendung von Toluol als Lösungsmittel wurde die Aktivität durch den Zusatz von Triton[®] X-100 um ca. 60 % gesteigert, die Enantioselektivität nahm dagegen um ca. 20 % ab (siehe Tabelle 5.1-1, Eintrag "Toluol" und Tabelle 5.1-2, Eintrag 3). Im Fall von Cyclohexan als

Tabelle 5.1-2: Zusammenfassung der Daten aller Hydrolysen von **BC-E** mit der Lipase aus *Candida antarctica* B, die nicht zur Optimierung von pH-Wert oder Cosolvens durchgeführt wurden.

#	Cosolvens	Phasen- verhältnis ¹⁾	$C_{BC-E}^{org. Phase}$ [mM]	K-Phosphat pH 7.4 [mM]	Triton® X-100 [mg/l]	mg Enzym ²⁾ pro g Substrat	EA ³⁾ [U/mg]	E-Wert
1	Aceton ^{5),6)}	0.5/99.5	7.5	0.1	200	333	0.33	4.6
2	Toluol ⁷⁾	40/60	10	0.1	-	13000	$4.2 \cdot 10^{-4}$	35.9
3	Toluol	10/90	100	0.1	-	120	$5.9 \cdot 10^{-3}$	16.5
4	Toluol ⁵⁾	0.5/99.5	1500	0.1	200	333	0.33	7.4
5	Cyclohexan	52/48	10	0.1	200	120	$2.7 \cdot 10^{-2}$	12.2
6	Cyclohexan	10/90	100	0.1	200	12	0.19	12.9
7	Cyclohexan	10/90	100	0.1	-	12	$9.6 \cdot 10^{-2}$	14.7
8	Cyclohexan	30/70	100	0.2	-	12	0.11	13.0

4) Prozentuales Volumenverhältnis zwischen organischer und wässriger Phase

5) Lipase aus *Candida antarctica* B (Roche Diagnostics)

6) Spezifische Enzymaktivität für den Umsatz beider Enantiomere.

4) E-Wert für die Enantioselektivität (Chen et al., 1982).

5) Umsetzung im Titrimaten durchgeführt (vgl. Abschnitt 4.8.1.1).

6) Es resultiert ein einphasiges Reaktionssystem

7) Umsetzung unter früher verwendeten Screening-Bedingungen (vgl. Abschnitt 4.8.1.2).

Cosolvens erhöhte sich die Aktivität sogar um fast 100 % durch den Einsatz von Triton® X-100, die Enantioselektivität sank um 12 % (vgl. Tabelle 5.1-2, Einträge 6 und 7).

Stabilisierte Emulsionen zeigten also erhöhte Enzymaktivität, die Enantioselektivität wurde dafür aber etwas beeinträchtigt.

Die auf die vorgelegte Substratmenge bezogene **eingesetzte Enzymmenge** zeigte keinen Einfluß auf die spezifische Aktivität oder die Enantioselektivität der Hydrolyse von **BC-E**. Bei zwei unabhängig voneinander durchgeführten Reaktionen mit Cyclohexan als Lösungsmittel wurde außer der eingesetzten Enzymmenge (120 bzw. 12 mg Enzym pro Gramm Substrat) nichts an den Reaktionsbedingungen geändert (siehe Tabelle 5.1-1, Eintrag "Cyclohexan" und Tabelle 5.1-2, Eintrag 6). Spezifische Aktivität und Enantioselektivität waren jeweils gleich, was im Einklang mit dem kinetischen Modell von Chen et al. (1982) steht.

Wie aus Tabelle 5.1-2 ersichtlich ist, hatte die **Konzentration von BC-E in der organischen Phase** des Zweiphasensystems die deutlichsten Auswirkungen auf die Geschwindigkeit und Selektivität der Reaktion. So wurden mit Toluol als Cosolvens **BC-E**-Konzentrationen in drei verschiedenen Größenordnungen eingesetzt (Einträge 2, 3 und 4). Die Aktivität der Reaktion nahm offensichtlich stark mit der **BC-E**-Konzentration zu, während die Enantioselektivität durch hohe Konzentrationen erheblich beeinträchtigt wurde. In Abbildung 5.1-6 sind diese Effekte grafisch veranschaulicht. (Wie oben gezeigt wurde, bewirkte die Änderung der anderen Reaktionsparameter wie Enzymmenge, Phasenverhältnis oder Zusatz von Triton® X-100 keine bzw. nicht derart starke Änderungen in der Aktivität oder Enantioselektivität.)

Bei der Verwendung von Cyclohexan als Cosolvens war der Einfluß der Substratkonzentration in der organischen Phase auf die Aktivität der Reaktion weniger stark

ausgeprägt als bei der Verwendung von Toluol (Tabelle 5.1-2, Einträge 5 und 6, vgl. mit den Einträgen 2 und 3). Die Enantioselektivität schien bei Cyclohexan sogar praktisch unabhängig von der Konzentration von **BC-E**. Die beobachteten Effekte sind demnach stark von der Art des Lösungsmittels abhängig.

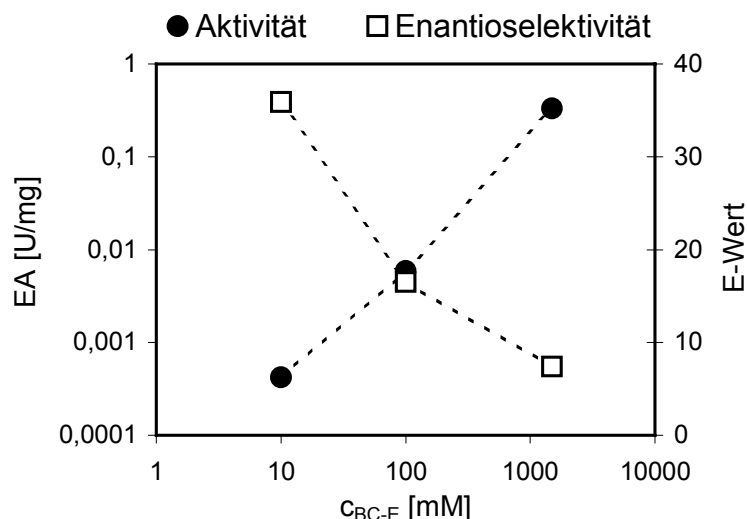


Abbildung 5.1-6: Einfluß der Substratkonzentration c_{BC-E} in Toluol bei der Hydrolyse von **BC-E** mit der Lipase aus *Candida antarctica* B im Zweiphasensystem auf die spezifische Aktivität (EA) und die Enantioselektivität (E-Wert) der Reaktion. EA und c_{BC-E} sind logarithmisch aufgetragen.

5.1.2.4 Zusammenfassung der Experimente zur Optimierung der Reaktionsbedingungen

Die Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchungen wurden zur Ermittlung optimierter Reaktionsparameter verwendet. Diese sind in Tabelle 5.1-3 zusammengefaßt.

Tabelle 5.1-3: Optimierte Reaktionsparameter für die enzymatische Hydrolyse von *N*-tert-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester **BC-E**

Parameter	Optimierte Bedingungen
Enzym	Lipase aus <i>Candida antarctica</i> B (L-2)
Reaktionsmedium	Zweiphasensystem
Lipophile Phase	Cyclohexan
c_{BC-E} in Cyclohexan	100 mM
Wäßrige Phase	0.1 M Kaliumphosphat
pH-Wert	5.0
Verhältnis wäßrige / organische Phase	90 : 10 (v/v)
Stabilisierung der Emulsion	keine

Die eingesetzte Enzymmenge hängt von der in Kauf genommenen Reaktionszeit ab, hat aber ansonsten keinen Einfluß auf die Ausbeuten oder optischen Reinheiten der Produkte. Lediglich bei sehr langen Reaktionszeiten (> 1 Woche) fällt der Verlust des Reaktionsproduktes **BC-S** durch chemische Zersetzung ins Gewicht.

5.1.3 Hydrolysen von **BC-E** im präparativen Maßstab

Bereits vor der umfassenden Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde eine erste präparative Hydrolyse von **BC-E** bei pH 7.4 durchgeführt. Das Ziel war hierbei die Darstellung von möglichst enantiomerenreinem Substrat **BC-E**, welches dringend für weitere chemische Transformationen und eine Strukturbestimmung der Verbindungsklasse benötigt wurde (Beumer et al., 2000). Beim anfallenden Produkt **BC-S** wurde eine geringere optische Reinheit in Kauf genommen.

Eine zweite präparative Umsetzung wurde nach abgeschlossener Optimierung der Reaktion bei pH 5.0 durchgeführt. Hauptziel war hierbei, das Reaktionsprodukt **BC-S** in möglichst hoher optischer Reinheit bei guter Ausbeute zu gewinnen. Unter den Bedingungen der zuvor durchgeführten (nicht vollständig optimierten) präparativen Reaktion war dies wegen zu niedriger Enantioselektivität nicht möglich gewesen.

5.1.3.1 Umsetzung zur Gewinnung von enantiomerenreinem (1*S*, 5*S*, 6*S*)-**BC-E**

Die Reaktion wurde wie in Abschnitt 4.11.1 (A) detailliert beschrieben durchgeführt und nach 196 h abgebrochen, als das nicht umgesetzte Substrat **BC-E** in der GC-Analytik einen Enantiomerenüberschuß von $ee_S = 99.6\%$ aufwies. Abbildung 5.1-7 zeigt die Entwicklung des Substrat-Enantiomerenüberschusses ee_S über die Reaktionszeit.

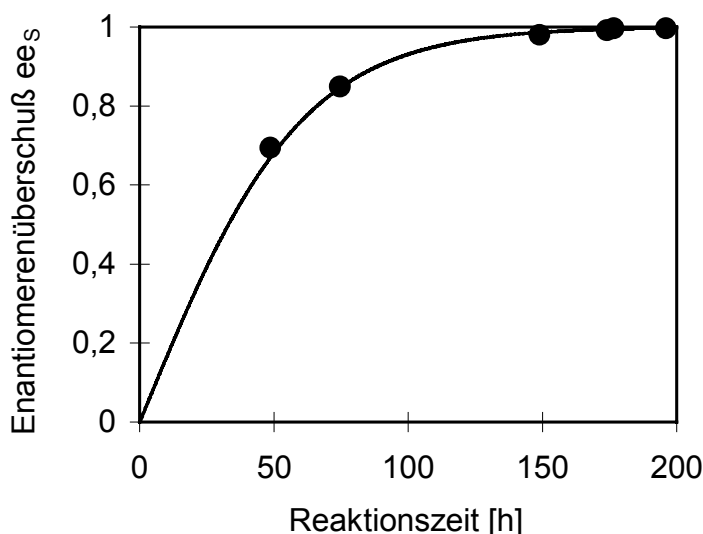


Abbildung 5.1-7: Zeitliche Entwicklung des Substrat-Enantiomerenüberschusses von **BC-E** (ee_S) bei der präparativen Hydrolyse der Verbindung mit der Lipase aus *Candida antarctica B (L-2)* im Zweiphasensystem bei pH 7.4 und mit Toluol als Lösungsmittel. Der durchgezogene Graph stellt den nach Chen et al. (1982) berechneten Verlauf dar.

Die nach der Aufarbeitung des Reaktionsansatzes (vgl. Abschnitt 4.11.1) gewonnenen Verbindungen **BC-E** und **BC-S** sind in Tabelle 5.1-4 charakterisiert. Auf eine eingehendere Charakterisierung wurde verzichtet, da die Substanzen als Edukte für weitere chemische Synthesen vorgesehen waren und deren Produkte detailliert charakterisiert wurden (Beumer et al., 2000).

Tabelle 5.1-4: Charakterisierung der Produkte der präparativen Hydrolyse von racemischem **BC-E** zur Gewinnung von enantiomerenreinem (1*S*, 5*S*, 6*S*)-**BC-E**

Aufgearbeitetes Produkt	(1 <i>S</i> , 5 <i>S</i> , 6 <i>S</i>)- BC-E	(1 <i>R</i> , 5 <i>R</i> , 6 <i>R</i>)- BC-S
Ausbeute	335 mg (33 %)	462 mg (49 %)
Enantiomerenreinheit	$ee_S = 99.6 \%$ (GC, HPLC)	$ee_P = 43.3 \%$ (HPLC)
Spezifische optische Drehung	$[\alpha]_D^{25} = -226.1$ (<i>c</i> 0.118, CHCl ₃)	$[\alpha]_D^{25} = +107.3$ (<i>c</i> 0.122, CHCl ₃)
Habitus	Gelblicher, amorpher Feststoff	Farbloser, kristalliner Feststoff
Ermittelter E-Wert ¹⁾	13.5 (HPLC, GC)	
¹⁾ Nach Chen et al., 1982		

Der ermittelte E-Wert von 13.5 (Tabelle 5.1-4) stimmt exakt mit dem Wert überein, der bei den Experimenten zur Variation des Lösungsmittels unter gleichen Reaktionsbedingungen gemessen wurde (vgl. Tabelle 5.1-1, Eintrag "Toluol"). Dies stellt die erste berichtete Darstellung von enantiomerenreinem (1*S*, 5*S*, 6*S*)-*N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester **BC-E** dar. Die absolute Konfiguration aller in synthetischem Zusammenhang stehenden β -ACC-Derivate wurde aus dieser enantiomerenreinen Verbindung nach einigen chemischen Transformationen mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt (Beumer et al., 2000; vgl. auch Abbildung 5.1-2).

5.1.3.2 Umsetzung zur Gewinnung von enantiomerenreinem (1*R*, 5*R*, 6*R*)-**BC-S**

Die Reaktion wurde wie in Abschnitt 4.11.1 (B) detailliert beschrieben durchgeführt. Als Abbruchkriterium wurde der Enantiomerenüberschuß des Substrates **BC-E** herangezogen, da er sich am schnellsten und einfachsten mittels Chiral-GC bestimmen ließ. Nach 19.5 h wies das nicht umgesetzte Substrat **BC-E** einen Enantiomerenüberschuß von $ee_S = 48.4 \%$ (GC-Analytik) auf, dies entsprach einem berechneten Enantiomerenüberschuß des Produktes **BC-S** von $ee_P = 90.4 \%$ (für $E = 32$, gemessen unter gleichen Reaktionsbedingungen bei den Experimenten zur Optimierung des pH-Werts, vgl. Abschnitt 5.1.2.2). Da für das Produkt eine Enantiomerenreinheit von $ee_P \geq 90 \%$ angestrebt war, wurde die Reaktion zu diesem Zeitpunkt abgebrochen. Abbildung 5.1-8 zeigt die Entwicklung des Substrat-Enantiomerenüberschusses ee_S über die Reaktionszeit.

Die nach der Aufarbeitung des Reaktionsansatzes (vgl. Abschnitt 4.11.1) gewonnenen Verbindungen **BC-E** und **BC-S** sind in Tabelle 5.1-5 charakterisiert. Die optische Reinheit des Reaktionsproduktes **BC-S** blieb dabei wie vorausberechnet bei $ee_P > 90 \%$. Auf eine eingehendere Charakterisierung wurde auch hier verzichtet, da die Substanzen ebenfalls als Edukte für weitere chemische Synthesen vorgesehen waren und deren Produkte detailliert charakterisiert wurden (Beumer et al., 2000).

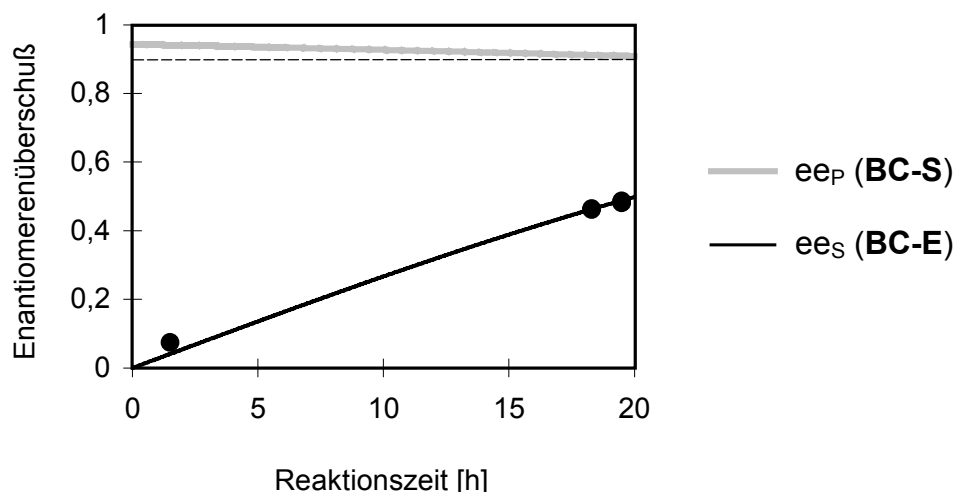


Abbildung 5.1-8: Zeitliche Entwicklung der Enantiomerenüberschüsse des Substrats **BC-E** (ee_S) und des Produktes **BC-S** (ee_P) bei der präparativen Hydrolyse der Verbindung mit der Lipase aus *Candida antarctica* B (L-2) im Zweiphasensystem bei pH 5.0 und mit Cyclohexan als Lösungsmittel. Die durchgezogenen Graphen stellen die nach Chen et al. (1982) berechneten Verläufe ($E = 32$) dar.

Tabelle 5.1-5: Charakterisierung der Produkte der präparativen Hydrolyse von racemischem **BC-E** zur Gewinnung von enantiomerenreinem (1*R*, 5*R*, 6*R*)-**BC-S**

Aufgearbeitetes Produkt	(1 <i>S</i> , 5 <i>S</i> , 6 <i>S</i>)- BC-E	(1 <i>R</i> , 5 <i>R</i> , 6 <i>R</i>)- BC-S
Ausbeute	711 mg (67 %)	303 mg (30 %)
Enantiomerenreinheit	$ee_S = 48.5 \%$ (GC, HPLC)	$ee_P = 91.0 \%$ (HPLC, GC ¹⁾)
Spezifische optische Drehung	$[\alpha]_D^{25} = -114.5$ (c 0.220, CHCl ₃)	$[\alpha]_D^{25} = +255.1$ (c 0.127, CHCl ₃)
Habitus	Gelblicher, amorpher Feststoff	Farbloser, kristalliner Feststoff
Ermittelter E-Wert ²⁾	34.2 (HPLC, GC)	
¹⁾ Als Methylester BC-E nach Derivatisierung mit Trimethylsulfoniumhydroxid, vgl. Abschnitt 4.4.2 ²⁾ Nach Chen et al., 1982		

Der ermittelte E-Wert von 34.2 (Tabelle 5.1-5) stimmte nicht exakt mit dem Wert überein, der bei den Experimenten zur Optimierung des pH-Werts unter gleichen Reaktionsbedingungen gemessen wurde ($E = 32$, vgl. Abschnitt 5.1.2.2).

Die optische Reinheit der wie oben beschrieben dargestellten Säure (1*R*, 5*R*, 6*R*)(+)-**BC-S** konnte durch Umkristallisation aus Hexan / Ethylacetat von $ee_P = 91 \%$ auf $ee_P > 96 \%$ gesteigert werden (Beumer et al., 2000). Das gesamte chemo-enzymatische Verfahren zur Herstellung der β -ACC-Derivate ist in Abbildung 5.1-9 dargestellt.

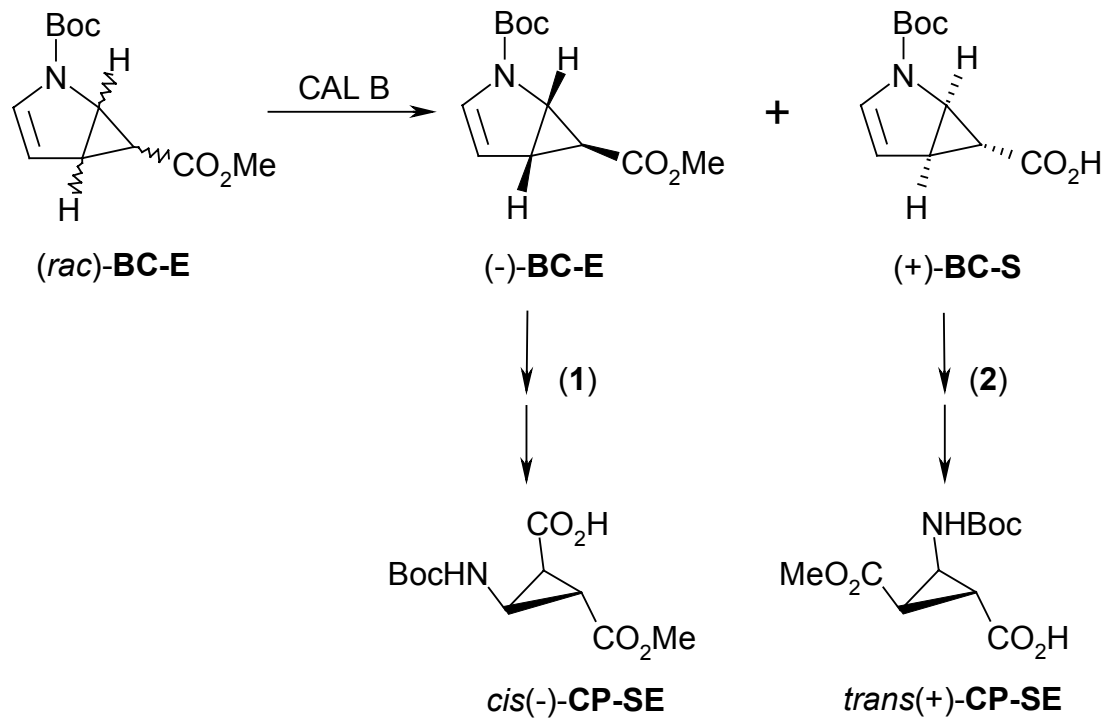


Abbildung 5.1-9: Entwickeltes Verfahren zur chemo-enzymatischen Synthese von enantiomerenreinen β -ACC-Derivaten. (1), (2): Chemische Syntheseschritte (Beumer et al., 2000).

5.2 Umesterung von *N-tert*-Butyloxycarbonyl-2-Aza-bicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester **BC-E**

Enzymatische Transesterifikationen (Umesterungen) sind in der Literatur eingehend beschrieben. Einen ausführlichen Überblick geben mehrere Übersichtsarbeiten (Faber, 1997; Drauz und Waldmann, 1995; Theil, 1997; Schmid und Verger, 1998; Wong und Whitesides, 1994). Die am weitesten verbreitete Anwendung dieses Reaktionstyps ist dabei die enantioselektive Acylierung chiraler Alkohole mit Carbonsäurevinylestern oder –isopropenylestern. Die Alkohololyse von Estern chiraler Carbonsäuren ist dagegen eine eher selten angewandte Variante, da Alkohole relativ schwache Nucleophile und die (i. d. R. nicht aktivierten) Ester einer chiralen Carbonsäure nur schwache Acylierungsmittel sind. Außerdem ist es in diesem Fall schwieriger, das Gleichgewicht der Reaktion auf die Produktseite zu verschieben (Theil, 1997). Daher wurden Versuche zur selektiven Entfernung des Alkohololyseproduktes Methanol aus Reaktionsgemischen durchgeführt.

5.2.1 Untersuchung der selektiven Entfernung von Methanol aus Lösungsmittelgemischen mittels Molsieb

Die selektive Entfernung von Methanol aus Reaktionsgemischen enzymatischer Reaktionen zur Beeinflussung des Gleichgewichts mittels Molsieben ist mehrfach beschrieben worden (Beispiele: Yamada et al., 1989, Bonini et al., 1991; Mori und Tomioka, 1992; Martin-Munoz et al., 1994). Allerdings wurde der Effekt nicht systematisch untersucht, sondern lediglich ohne Optimierung angewandt. Da im Rahmen dieser Arbeit ein derartiges Vorgehen im Zusammenhang mit Umesterungen von Methylestern chiraler Carbonsäuren wie **BC-E** oder auch **OBC-E** (siehe Abschnitt 5.4.2) interessant erschien, wurden eigene Experimente zur quantitativen Untersuchung des Effekts durchgeführt.

Als Lösungsmittel für Umesterungen war Toluol, als Nucleophile waren *n*-Butanol oder Isobutanol vorgesehen. Das Methanol mußte also aus Mischungen mit diesen Stoffen selektiv entfernt werden.

Molsiebe bestehen aus Zeolithen mit definierten Porengrößen und adsorbieren nur Moleküle, deren kritischer Moleküldurchmesser unterhalb dieser Porengröße liegt. Außerdem werden polare Moleküle grundsätzlich stärker adsorbiert, als unpolare. In Tabelle 5.2-1 sind die kritischen Moleküldurchmesser und Polaritätswerte der beteiligten Substanzen aufgeführt. Daraus geht hervor, daß sich *n*-Butanol und Methanol über die Molekülgröße voraussichtlich nur schwer trennen lassen. Dagegen sollten sich Isobutanol und Methanol mittels eines Molsiebs mit einer Porengröße von 5 Å gut trennen lassen. Das Lösungsmittel Toluol sollte angesichts seiner Eigenschaften (kritischer Moleküldurchmesser und Polarität) nicht wesentlich mit den Alkoholen um die Adsorption an Molsiebe konkurrieren können.

Experimente zur selektiven Adsorption von Methanol wurden wie in Abschnitt 4.5 beschrieben in Toluol als Lösungsmittel durchgeführt. Dabei wurden die Konzentrationsverhältnisse so gewählt, daß sie den Bedingungen bei den durchgeführten Umesterungsreaktionen (siehe die Abschnitte 4.8.2 und 4.9.2)

weitgehend entsprachen (Test ternärer Mischungen). Die Ergebnisse der Tests sind in Abbildung 5.2-1 dargestellt.

Tabelle 5.2-1: Kritische Moleküldurchmesser und Polaritäten verschiedener Lösungsmittel, die für Umesterungsreaktionen vorgesehen waren.

Lösungsmittel	Kritischer Moleküldurchmesser ¹⁾ [Å]	Polarität (E_T^N -Wert) ²⁾
Methanol	4.4	0.762
<i>n</i> -Butanol	4.9	0.586
Isobutanol	5.6	0.552
Toluol	6.7	0.099

¹⁾ Nach Merck, 1998

²⁾ Nach Reichardt, 1994

Methanol wird unter den Testbedingungen sowohl von 4 Å -Molsieb als auch von 5 Å -Molsieb sehr stark adsorbiert. Allerdings bleiben bei ersterem doch merkliche Mengen Methanol in der Lösung zurück, während 5 Å -Molsieb Methanol fast vollständig entfernt.

n-Butanol wird von 4 Å -Molsieb nur schwach absorbiert, dagegen senkt 5 Å -Molsieb die Konzentration von *n*-Butanol unter den Testbedingungen auf etwa die Hälfte.

Isobutanol schließlich wird von 4 Å -Molsieb und 5 Å -Molsieb ähnlich schwach adsorbiert.

Die selektivste Trennung wird zwischen Methanol und Isobutanol durch 5 Å -Molsieb erreicht.

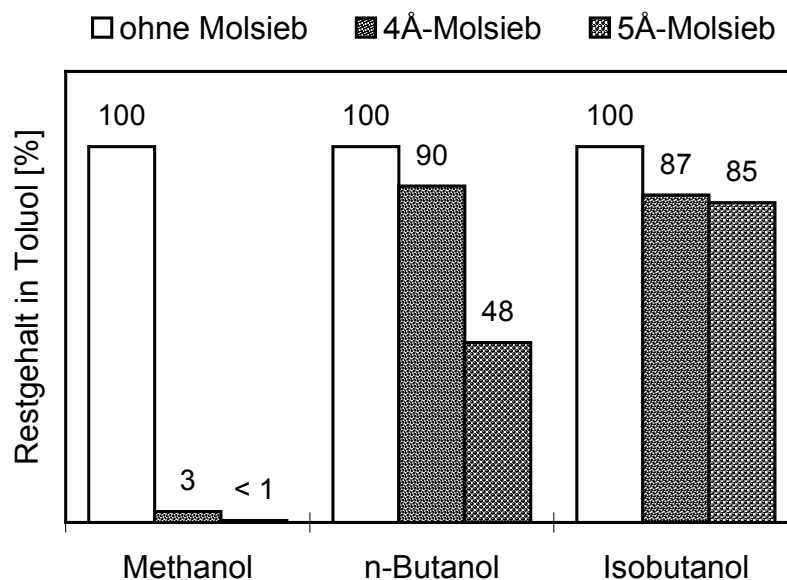


Abbildung 5.2-1: Restgehalte verschiedener Alkohole in Toluol bei Anwesenheit von Molsieb (vgl. Abschnitt 4.5, ternäre Mischungen). *n*-Butanol und Isobutanol wurden jeweils gemeinsam mit Methanol in Toluol vorgelegt, um die konkurrierenden Adsorptionen erfassen zu können.

5.2.2 Untersuchung enzymatischer Umesterungsreaktionen

Um zu untersuchen, ob sich der E-Wert aus der hydrolytischen Reaktion (vgl. Abschnitt 5.1.2) noch weiter steigern lässt, wurde die in Abbildung 5.2-2 schematisch dargestellte Reaktion untersucht. Als Biokatalysator wurde dabei die Lipase aus *Candida antarctica* B verwendet, da sie bei der Hydrolyse von **BC-E** die größte Aktivität und Enantioselektivität gezeigt hatte (Vielhauer, 1997). Die Umsetzung wurde wie in Abschnitt 4.8.2.1 beschrieben durchgeführt. In einer weiteren Reaktion wurde dem Ansatz Molsieb (5 Å) zugesetzt, um das Reaktionsprodukt Methanol aus der Reaktionsmischung zu entfernen und so das Gleichgewicht auf die Seite der Produkte zu verschieben (vgl. voriger Abschnitt, Abschnitt 4.8.2.2 und Abschnitt 5.4).

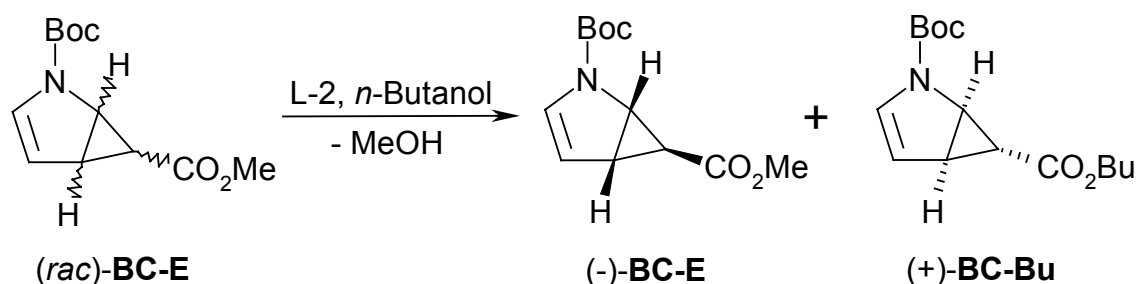


Abbildung 5.2-2: Enzymatische Umesterung von **BC-E** zu **BC-Bu** mit der Lipase aus *Candida antarctica* B (L-2) und *n*-Butanol.

Die Ergebnisse der Umsetzungen sind in Tabelle 5.2-2 zusammengefasst. Zunächst war die untersuchte Umesterung grundsätzlich möglich. Sie war jedoch wesentlich langsamer und unselektiver, als die Hydrolyse von **BC-E** mit dem gleichen Enzym. Auch unter Berücksichtigung der nicht optimierten Reaktionsbedingungen bot die Transesterifikation von **BC-E** mit L-2 gegenüber der Hydrolyse mit demselben Enzym keine erkennbaren oder zu erwartenden Vorteile.

Auffällig war die schlechtere Selektivität der Umesterung bei Anwesenheit von Molsieb. Allerdings wurde mit Molsieb nach 270 h ein wesentlich höherer Gesamtumsatz erzielt als ohne Molsieb, obwohl die Anfangsaktivitäten in beiden Fällen nahezu gleich waren. Eine Verschiebung des Gleichgewichts der Reaktion zu den Produkten hin war demnach möglich.

Tabelle 5.2-2: Aktivität und Enantioselektivität der Umesterung von **BC-E** zu **BC-Bu** mit der Lipase aus *Candida antarctica* B (L-2) und *n*-Butanol in Toluol.

Reaktion	EA ¹⁾ [U/mg]	E-Wert ²⁾	Umsatz nach 270 h
Umesterung ohne Molsieb	$6.1 \cdot 10^{-5}$	6.2	33 %
Umesterung mit Molsieb (5 Å)	$6.6 \cdot 10^{-5}$	2.8	62 %
Hydrolyse ³⁾	$5.9 \cdot 10^{-3}$	16.5	(54 %) ⁴⁾

¹⁾ Spezifische Enzymaktivität für den Umsatz beider Enantiomere.

²⁾ E-Wert für die Enantioselektivität (Chen et al., 1982).

³⁾ Zum Vergleich wurde eine nicht optimierte Hydrolyse im Zweiphasensystem mit Toluol als Lösungsmittel ausgewählt (vgl. Tabelle 5.1-2, Eintrag 3).

⁴⁾ Umsatz nach 167 h.

5.3 Hydrolyse von 2-Oxabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester **OBC-E**

5.3.1 Stabilität von **OBC-E** in wasserhaltigen Systemen

Die Stabilität der Verbindung wurde wie in den Abschnitten 4.6.2 (wäßrige, einphasige Systeme) und 4.6.3 (wasserhaltige Zweiphasensysteme) beschrieben getestet. Die Meßergebnisse sind in Abbildung 5.3-1 zusammengestellt.

Über längere Zeiträume stabil war die Verbindung nur in wasserfreiem Methanol (●). In allen wasserhaltigen Systemen, einschließlich der Zweiphasensysteme, zersetzte sich die Verbindung. So waren nach 4 Tagen in allen Fällen ca. 20 % der Substanz zerfallen.

Dies bedeutet, daß nur relativ schnelle enzymatische Hydrolyse-Reaktionen für eine präparative kinetische Racematspaltung von **OBC-E** in Frage kamen.

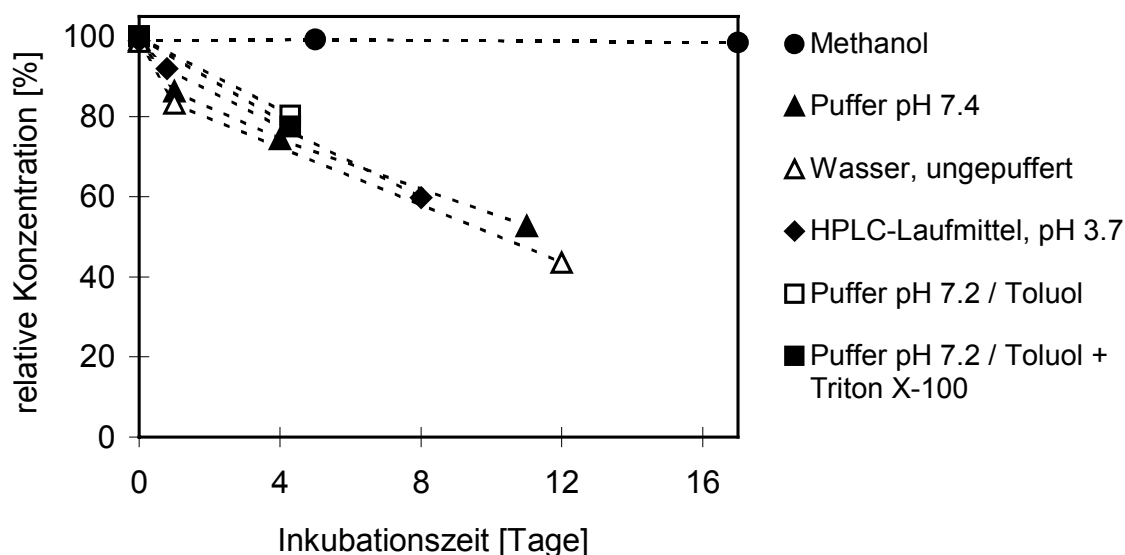


Abbildung 5.3-1: Stabilität von 2-Oxabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester **OBC-E** in wasserhaltigen Systemen bei Raumtemperatur. Die Zweiphasensysteme (□ und ■) wurden während der Inkubation gerührt.

Welcher Art der Zerfall von **OBC-E** in wäßrigen Medien ist, wurde nicht weiter untersucht. In Abbildung 5.3-2 ist ein möglicher Mechanismus dargestellt (Schenk und Steinmetz, 1963). Dabei lagert der bicyclische Enolether **OBC-E** säurekatalysiert unter Ringöffnung zu einem Hexadien-Derivat um.

5.3.2 Enzymatische Hydrolyse von **OBC-E** in wäßrigem Puffer

OBC-E ist in Wasser zwar relativ gut löslich (ca. 10 mM), aber nicht sehr stabil (s.o.). Für die Umsetzungen in wäßrigen Medien wurden daher nur Enzyme ausgewählt, die sich nicht in Zweiphasen-Systemen oder organischen Lösungsmitteln einsetzen lassen. Außerdem wurde die Lipase aus *Candida antarctica* B (L-2) getestet, da sie beim Screening auf Umsetzung des strukturverwandten Esters **BC-E** die höchste

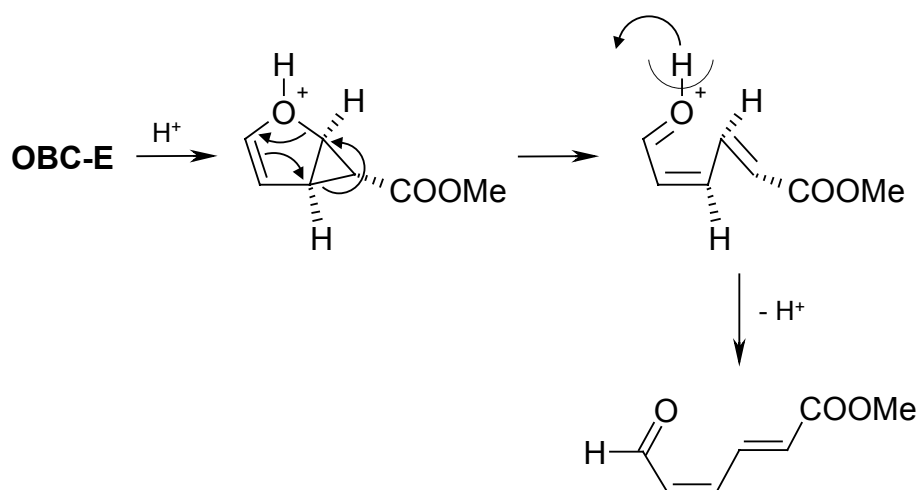


Abbildung 5.3-2: Zersetzung von **OBC-E** durch säurekatalysierte Ringöffnung (nach Schenk und Steinmetz, 1963).

Aktivität und auch Enantioselektivität aller getesteten Lipasen aufwies (Vielhauer, 1997).

Die Reaktionen wurden wie in Abschnitt 4.9.1 beschrieben durchgeführt und untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.3-1 zusammengefasst. Alle Enzyme zeigten hohe Aktivitäten aber nur sehr geringe, für Racematspaltungen uninteressante Enantioselektivitäten. Immerhin stellt die vorgestellte enzymatische Hydrolyse von **OBC-E** eine sehr milde und chemoselektive Methode zur Darstellung der Säure **OBC-S** dar, die in freier Form bislang nicht in der Literatur beschrieben ist.

Tabelle 5.3-1: Kinetische Parameter der Hydrolyse von **OBC-E** in 0.1 M Kaliumphosphat pH 7.2 mit verschiedenen Enzymen

Enzym ¹⁾	EA ²⁾ [U/mg]	E-Wert ³⁾
Lipase aus <i>Candida antarctica</i> B (L-2)	0.2	1.2
Esterase aus Schweineleber (E-1)	7.0	1.2
Esterase aus Schweineleber (E-2)	3.2	1.2

¹⁾ Vgl. Abschnitt 4.9.1, Tabelle 4.9-1.

²⁾ Spezifische Enzymaktivität für den Umsatz beider Enantiomere.

³⁾ E-Wert für die Enantioselektivität (Chen et al., 1982).

5.4 Enzymkatalysierte Umesterungen von 2-Oxabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester **OBC-E**

Auf Grund der geringen Stabilität von **OBC-E** in wasserhaltigen Medien wurden die Anstrengungen auf Reaktionen in organischen Lösungsmitteln konzentriert. Da im Molekül von **OBC-E** die Methylesterfunktion –CO₂Me die einzige funktionelle Gruppe ist, welche für eine praktikable Biotransformation in Frage kam, boten sich

enzymatische Umesterungen (Transesterifikationen, Acyltransferreaktionen) in organischen Lösungsmitteln an. Das Prinzip einer solchen möglichen Reaktion zeigt Abbildung 5.4-1.

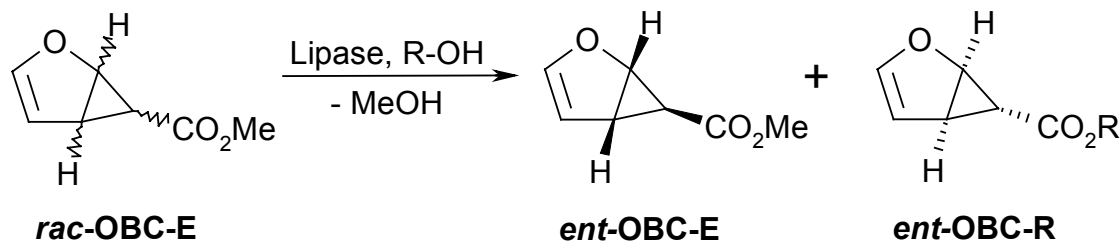


Abbildung 5.4-1: Prinzip einer enantioselektiven, enzymkatalysierten Umesterung von racemischem (rac) **OBC-E** in organischen Lösungsmitteln mit nicht-racemischen (ent) Produkten.

Bei enzymatischen Acyltransferreaktionen werden bevorzugt "aktivierte Ester" eingesetzt. Dies können Phenyl-, Oxim-, Cyanomethyl- oder Enolester sein. Auch Säureanhydride können enzymatisch irreversibel alkoholysiert werden. Diese Methode wird jedoch meist bei der enantioselektiven enzymatischen Acylierung chiraler Alkohole eingesetzt, da hierfür entsprechende aktivierte Ester als Acylierungsmittel kommerziell erhältlich sind. Soll dagegen der (u.U. schon schwer zugängliche) Ester einer chiralen Carbonsäure einer enantioselektiven Alkohololyse unterzogen werden, stehen normalerweise keine "aktivierten" Varianten der Verbindung zur Verfügung. Daher ist die Alkohololyse von chiralen Carbonsäureestern, verglichen mit der Acylierung chiraler Alkohole, eine weniger häufig genutzte Möglichkeit zur enzymatischen Racemattrennung, insbesondere wenn die Carbonsäure die chirale Komponente des Esters darstellt (Faber, 1997; Theil, 1997; Drauz und Waldmann, 1995).

In den dennoch beschriebenen Fällen handelt es sich meist um Lactonisierungen von Hydroxycarbonsäuremethylestern, also intramolekulare Alkoholysen (für eine Übersicht siehe Drauz und Waldmann, 1995). Werden hier energetisch bevorzugte 5- oder 6-Ring-Strukturen gebildet, liegt das Gleichgewicht der Reaktionen meist auf der Produktseite.

Um nun enantioselektive enzymatische Alkoholysen von nicht aktivierten Estern chiraler Carbonsäuren - wie **OBC-E** - möglichst irreversibel zu gestalten, gibt es zwei Möglichkeiten:

- 1) Der als Nucleophil eingesetzte Alkohol wird in großem Überschuß eingesetzt. Die maximal einsetzbare Konzentration kann jedoch durch die Erfordernisse des Enzyms limitiert sein.
- 2) Der als Reaktionsprodukt freigesetzte Alkohol wird selektiv aus dem Reaktionsansatz entfernt.

Diese Maßnahme ist zwar in jedem Fall sinnvoll, kann aber praktisch mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden sein. Im Fall von **OBC-E** wird bei einer Umesterungsreaktion Methanol frei, welches durch Molsieb selektiv adsorbiert werden kann (siehe Abschnitt 5.2.1). Diese Maßnahme ist bei verschiedenen enzymatischen Lactonisierungen in organischen Lösungsmitteln angewandt worden

(Beispiele: Yamada et al., 1989, Bonini et al., 1991; Mori und Tomioka, 1992; Lu und Sih, 1999). Aber auch bei bimolekularen enzymatischen Alkoholysen verschiedener Carbonsäureethylester mit *n*-Octanol wurde Molsieb zur Erhöhung des Reaktionsumsatzes eingesetzt (Martin-Munoz et al., 1994).

5.4.1 Screening auf die enzymatische Alkohololyse von **OBC-E**

5.4.1.1 Ermittlung geeigneter Reaktionsbedingungen

Als nucleophile Alkohole wurden *n*-Butanol und Isobutanol getestet. Sie besitzen keine zu hohen Siedepunkte (117 °C bzw. 108 °C), was im Hinblick auf eine spätere Produktaufarbeitung von Bedeutung war, da **OBC-E** eine recht flüchtige Verbindung ist ($K_{p_{0.05}} = 40$ °C). Außerdem unterscheiden sich *n*-Butanol und Isobutanol ausreichend von Methanol hinsichtlich der Adsorption an Molsiebe (vgl. Abschnitt 5.2.1). Schließlich wurden die Alkohole schon erfolgreich in entsprechenden enzymatischen Umesterungen eingesetzt (Martres et al., 1994; Quiros et al., 1995; Ozegowski et al., 1993).

Bei der Ermittlung geeigneter Screeningbedingungen wurde der Einfluß der Konzentration bzw. des Überschusses der Alkohole auf die Umesterungsreaktion untersucht. Dazu wurde als Biokatalysator die Lipase aus *Candida antarctica* B (L-2) verwendet, da sie das strukturverwandte Substrat **BC-E** in einer entsprechenden Reaktion umsetzte (vgl. Abschnitt 5.2). Die Reaktionen wurden wie in Abschnitt 4.9.2.1.1 beschrieben in Toluol als Lösungsmittel durchgeführt und mittels Chiral-Gaschromatographie verfolgt. Die Ergebnisse der Tests sind in Tabelle 5.4-1 zusammengefaßt.

Tabelle 5.4-1: Einfluß der Butanolkonzentration auf die Alkohololyse von 2-Oxabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester **OBC-E** mit der Lipase aus *Candida antarctica* B (L-2) in Toluol.

	n-Butanol			Isobutanol
c_{Butanol} [mM]	109	1090	4920	109
Molarer Überschuß ¹⁾	10-fach	100-fach	500-fach	10-fach
Spez. Aktivität [U/mg]	$2.4 \cdot 10^{-4}$	$1.7 \cdot 10^{-4}$	$1.3 \cdot 10^{-4}$	$3.0 \cdot 10^{-4}$
E-Wert ²⁾	1.3	1.4	1.4	1.2
Umsatz nach 96 h	87 %	66 %	55 %	83 % (42 h)

¹⁾ Bezogen auf **OBC-E**. ²⁾ Nach Chen et al., 1982.

Es zeigte sich, daß bei niedrigeren Butanol-Konzentrationen (~ 100 mM) größere Aktivitäten und im untersuchten Zeitraum auch höhere Umsätze (> 80 %) zu erzielen waren. Dies ließ auch erkennen, daß das Gleichgewicht der Reaktion bereits bei einem 10-fachen Butanol-Überschuß und ohne Zusatz von Molsieb weit auf der Produktseite liegt. Die Enantioselektivitäten waren in allen Fällen in etwa gleich niedrig und *n*-Butanol und Isobutanol verhielten sich sehr ähnlich. Somit wurde in den folgenden Screeningexperimenten eine *n*-Butanol-Konzentration von ~100 mM verwendet und auf den Einsatz von Molsieb vorerst verzichtet.

5.4.1.2 Screening verschiedener Lipasen

Nach der Ermittlung geeigneter Testbedingungen (s.o.) wurden die Screeningexperimente wie in Abschnitt 4.9.2.1.2 beschrieben durchgeführt. Die Reaktionen wurden mittels chiraler Gaschromatographie verfolgt, wobei der Reaktionsumsatz und die Enantiomerenüberschüsse von Substrat und Produkt (**OBC-Bu**, vgl. Abbildung 5.4-1: R = *n*-Bu) gemessen wurden. Aus diesen Daten wurden dann spezifische Aktivitäten und Enantioselektivitäten nach Chen et al. (1982) bestimmt. Für die Berechnung der E-Werte wurde eine irreversible Reaktion vorausgesetzt, was durch den Einsatz eines 10-fachen Überschusses an *n*-Butanol hinreichend gerechtfertigt ist (vgl. Abschnitt 5.4.1.1). Die Ergebnisse des Screenings sind für alle getesteten Lipasen in Abbildung 5.4-2 zusammengefasst.

Die Hälfte aller getesteten Lipasen zeigte keine Aktivität für die Umesterung von **OBC-E**, der Rest nur sehr geringe Aktivitäten ($\leq 10^{-3}$ U/mg). Das weitaus aktivste Enzym war die schon zur Entwicklung der Screening-Bedingungen (vgl. Abschnitt 5.4.1.1) verwendete Lipase aus *Candida antarctica* B (L-2). Keines der Enzyme wies eine präparativ interessante Enantioselektivität auf, alle E-Werte lagen unterhalb von 4. Da sich also keine befriedigenden Aktivitäten und, was entscheidender ist, nur ungenügende Selektivitäten bei den getesteten Lipasen finden ließen, bot sich kein aussichtsreicher Ansatzpunkt für eine Optimierung der beschriebenen Umesterungsreaktion.

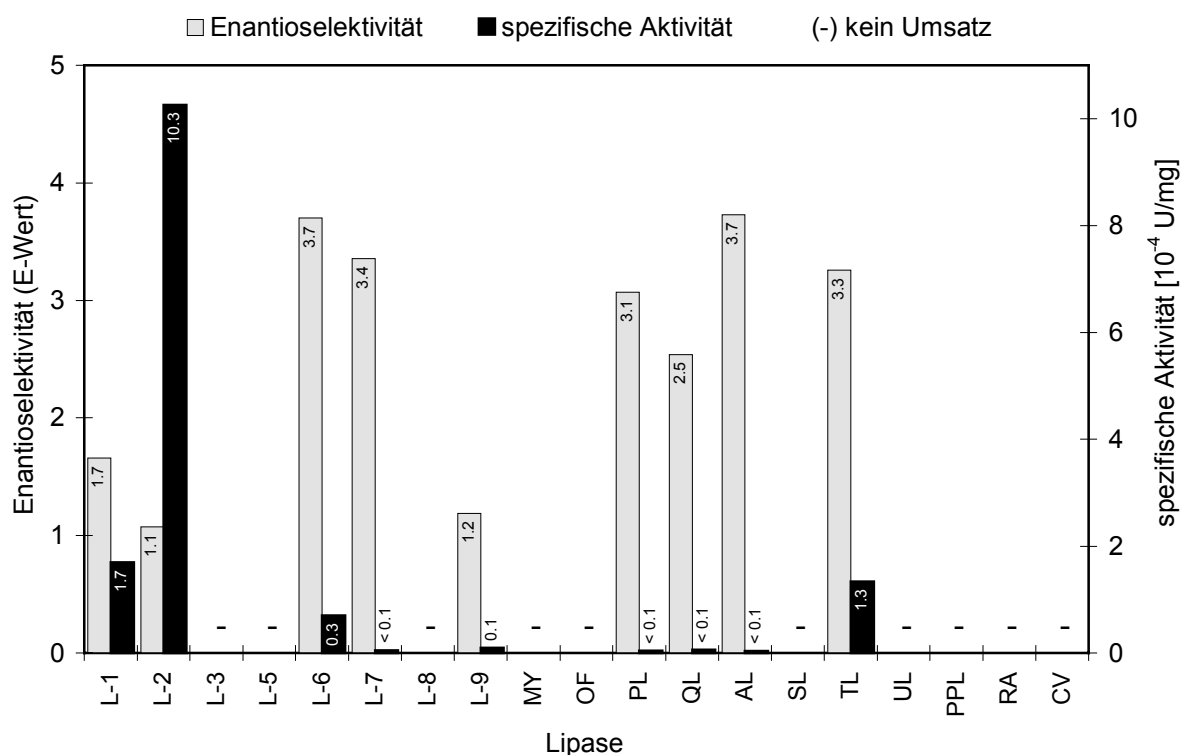


Abbildung 5.4-2: Spezifische Aktivitäten (für den Umsatz beider Enantiomere) und Enantioselektivitäten (E-Wert nach Chen et al., 1982) verschiedener Lipasen beim Screening auf Alkoholylse von 2-Oxabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethyl-ester **OBC-E** mit *n*-Butanol in Toluol. Zu den Abkürzungen für die Lipasen siehe Abschnitt 4.9.2.1.2, Tabelle 4.9-3.

5.4.2 Einfluß von Molekularsieb auf die Alkoholyse von **OBC-E**

Die Reaktionen zur Untersuchung des Einflusses von Molsieb auf die Umesterung von **OBC-E** wurden wie in Abschnitt 4.9.2.2 beschrieben analog den Umsetzungen bei den Screening-Experimenten, aber unter Zusatz von Molekularsieb 5 Å durchgeführt (vgl. auch Abschnitt 5.2.1). Als Biokatalysator wurde die Lipase aus *Candida antarctica* B (L-2) eingesetzt, da sie für die untersuchte Reaktion die größte Aktivität aller getesteten Lipasen aufwies.

Es zeigte sich, daß das Substrat **OBC-E** in Gegenwart von Molekularsieb 5 Å nicht stabil war. Nach 96 h war es – auch bei einem Kontrollansatz ohne Enzym – vollständig zerfallen (GC). Die Gaschromatogramme zeigten Peaks von mindestens vier verschiedenen Zerfallsprodukten, die jedoch nicht identifiziert wurden. Der enzymhaltige Reaktionsansatz zeigte deutliche Mengen des Biotransformationsproduktes **OBC-Bu**. Dies läßt darauf schließen, daß die Umesterung auch in Anwesenheit von Molekularsieb stattfinden kann und **OBC-Bu** gegenüber dem Adsorbens stabiler ist, als **OBC-E**.

Molekularsieb 5 Å ist folglich nicht als Hilfssubstanz für Biotransformationen von **OBC-E** geeignet. Da sich für Umesterungen dieses Substrates ohnehin keine aussichtsreichen Ansatzpunkte finden ließen, wurde die durch Molsieb katalysierte Zersetzung nicht weiter untersucht.

5.5 Chemische Eigenschaften von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO** in wäßrigen Systemen

Da keine Erfahrungen über das Verhalten der Verbindung in wäßrigen Medien vorlagen und die geplanten Bioreduktionen fast nur eben dort möglich waren, wurden verschiedene Eigenschaften von **TsCHO** untersucht. Außerdem wird im Folgenden auf einige spezielle Probleme bei der Enantiomerenanalytik der Verbindung eingegangen.

5.5.1 Analytik

5.5.1.1 Enantiomerentrennung von **TsCHO**

Alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Substanzen erwiesen sich als konfigurationsstabil und es wurde eine zufriedenstellende bis sehr gute Enantiomerentrennung erreicht (s. Abschnitte 4.3.4 und 4.3.5). Eine Ausnahme bildete der N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO**. Er neigt wie alle N-geschützten Aminoaldehyde zur Racemisierung (Jurczak und Golebiowski, 1989; vergl. Abschnitt 5.5.3) und ließ sich gaschromatographisch nicht einwandfrei in die Enantiomere auftrennen. Dabei fällt die schlechte Peaktrennung trotz passablem Trennfaktor (1.03) und ausreichender berechneter Auflösung (1.50, vgl. Abschnitt 4.3.4.2.3) auf. Dies deutet auf eine Racemisierung der Substanz bei der Meßtemperatur von 165 °C auf der Kapillarsäule hin.

Eine Bestätigung dieser Vermutung gelang durch Derivatisierung von L-**TsCHO** aus einer Biotransformation zu L-**TsCOOH** (Abschnitt 4.6.6). Das Produkt der Derivatisierung wies in einer Chiral-HPLC-Messung einen deutlich höheren Enantiomerenüberschuß ($ee_{\text{TsCOOH}} = 86 \%$) auf, als das Edukt der Derivatisierung in einer Chiral-GC-Messung ($ee_{\text{TsCHO}} = 59 \%$).

Somit waren Enantiomerenüberschüsse von **TsCHO** mittels Chiral-GC nicht korrekt bestimmbar.

Mittels Chiral-HPLC unter RP-Bedingungen konnte die Verbindung bei keiner der getesteten Säulen im Eluat per UV-Detektion nachgewiesen werden, obwohl **TsCHO** bei der verwendeten Detektionswellenlänge (234 nm) eindeutig UV-aktiv ist, wie aus dem UV-Spektrum der Verbindung in Wasser/Methanol ersichtlich ist. Offensichtlich ist die Substanz unter RP-Bedingungen (Wasser + Methanol + Kieselgel + Cyclodextrin) nicht stabil. Aus diesem Grund war eine direkte Messung des Enantiomerenüberschusses von **TsCHO** auch mittels Chiral-HPLC nicht möglich.

5.5.1.2 Derivatisierung von **TsCHO** zu N-p-Toluolsulfonylpipecolinsäure **TsCOOH**

Die in Abschnitt 4.4.1 beschriebene Oxidation von **TsCHO** zu **TsCOOH** mittels Silberoxid lieferte keine quantitativen Ausbeuten an **TsCOOH**. Die in den anschließenden HPLC-Messungen wiedergefundenen Mengen **TsCOOH** waren eindeutig kleiner, als die vor der Derivatisierung eingesetzten Mengen **TsCHO** (Ausbeute 0 – 60 %). Wieviel **TsCHO** verlorenging, hing stark von den Derivatisierungsbedingungen ab. Diese Bedingungen wurden dahingehend optimiert,

daß **TsCHO** in jedem Fall vollständig abreagierte, dabei aber möglichst wenig durch Nebenreaktionen verloren ging. Hierbei erwies sich das Verhältnis von Silbernitrat und Natronlauge als besonders kritisch. Bei diesbezüglich äquimolaren Ansätzen reagierte **TsCHO** nicht vollständig ab. Erst ab 50 mol-% Überschuß an Natronlauge wurde der Aldehyd vollständig umgesetzt. Andererseits beeinträchtigten große OH^- -Überschüsse ($> 100 \text{ mol-\%}$) die Ausbeute an **TsCOOH** erheblich. Insgesamt erwies sich ein Ag^+/OH^- -Verhältnis von 3 : 5 als optimal.

Der Verlust von **TsCHO** ist auf dessen Zersetzung im Alkalischen zurückzuführen, die optimierte Oxidation wurde bei $\text{pH} \sim 11.5$ durchgeführt (zur Zersetzung von **TsCHO** siehe Abschnitt 5.5.2).

Je alkalischer eine Lösung von **TsCHO** ist, desto schneller racemisiert die Verbindung (siehe Abschnitt 5.5.2). Daher racemisiert die Verbindung auch unter Derivatisierungsbedingungen in gewissem Maße. Der Einfluß dieses unerwünschten Effekts auf die Bestimmung der Racemisierungsgeschwindigkeit von **TsCHO**, bei der Enantiomerenüberschüsse nach Derivatisierung zu **TsCOOH** gemessen wurden, wird in Abschnitt 6.4.2 diskutiert.

5.5.2 Stabilität von **TsCHO** in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer

Die Zersetzung von **TsCHO** in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer wurde wie in Abschnitt 4.6.5 beschrieben bei verschiedenen pH-Werten gemessen. Die Meßergebnisse sind in Abbildung 5.5-1 dargestellt. Der Zerfall ließ sich bei allen untersuchten pH-Werten gut durch eine Zerfallskinetik 1. Ordnung beschreiben. Die daraus ermittelten Zerfallskonstanten k_Z und die entsprechenden Halbwertszeiten $t_{1/2}^Z$ sind in Tabelle 5.5-1 wiedergegeben.

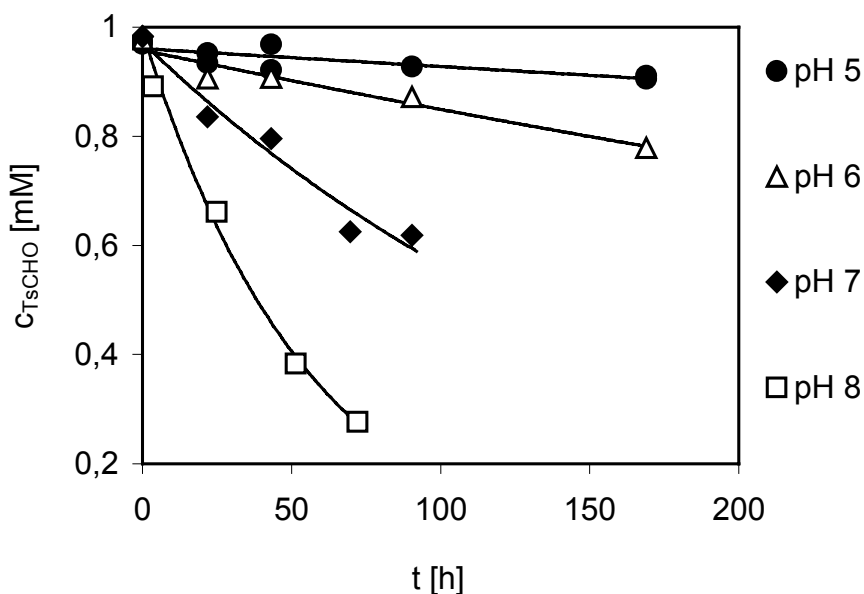


Abbildung 5.5-1: Zerfall von *N-p*-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO** in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer bei RT und verschiedenen pH-Werten. Die durchgezogenen Linien repräsentieren den nach einer Kinetik 1. Ordnung berechneten Verlauf.

Tabelle 5.5-1: Zerfallskonstanten k_z und Halbwertszeiten $t_{1/2}^z$ von **TsCHO** in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer bei verschiedenen pH-Werten und RT.

pH	k_z [1/h]	$t_{1/2}^z$ [h]
5	$4 \cdot 10^{-4}$	1980
6	$1.2 \cdot 10^{-3}$	583
7	$5.1 \cdot 10^{-3}$	135
8	$1.83 \cdot 10^{-2}$	38

Der Zerfall ist bei höheren pH-Werten deutlich schneller, was für einen basenkatalysierten Zerfallsmechanismus spricht. Die Zerfallskonstanten k_z korrelieren sehr gut mit dem pH-Wert, wie in Abbildung 5.5-2 zu erkennen ist. Dabei besteht zwischen k_z und der OH^- -Konzentration kein linearer Zusammenhang sondern ein nicht-linearer der Art:

$$k_z \sim [\text{OH}^-]^{0.58}$$

Dies deutet auf einen komplexeren, basenkatalysierten Zerfallsmechanismus hin.

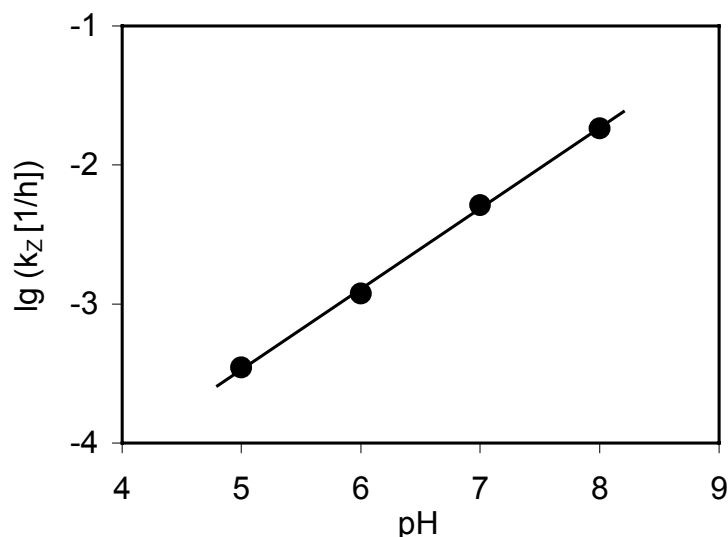


Abbildung 5.5-2: Korrelation zwischen der Zerfallskonstante k_z von **TsCHO** in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer und dem pH-Wert ($R^2 = 0.999$). Aufgetragen ist der dekadische Logarithmus der Zerfallskonstante.

Weder gas- noch dünnschichtchromatographisch ließ sich ein einheitliches Zersetzungsprodukt nachweisen. Da jedoch in erster Linie die Geschwindigkeit des Zerfalls von **TsCHO** für die beabsichtigten Biotransformationen von Bedeutung war, wurde die Chemie der Zersetzungsreaktion nicht näher untersucht.

5.5.3 Racemisierung von **TsCHO** in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer

Die Racemisierung von **TsCHO** in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer wurde wie in Abschnitt 4.6.6 beschrieben bei verschiedenen pH-Werten gemessen. Die Meßergebnisse sind in Abbildung 5.5-3 dargestellt. Die Abnahme des Enantiomerenüberschusses ließ sich bei allen untersuchten pH-Werten gut durch eine Racemisierungskinetik 1. Ordnung beschreiben (vgl. Abschnitt 6.4.1). Die daraus ermittelten Racemisierungskonstanten k_R und die entsprechenden Halbwertszeiten $t_{1/2}^R$ sind in Tabelle 5.5-2 wiedergegeben.

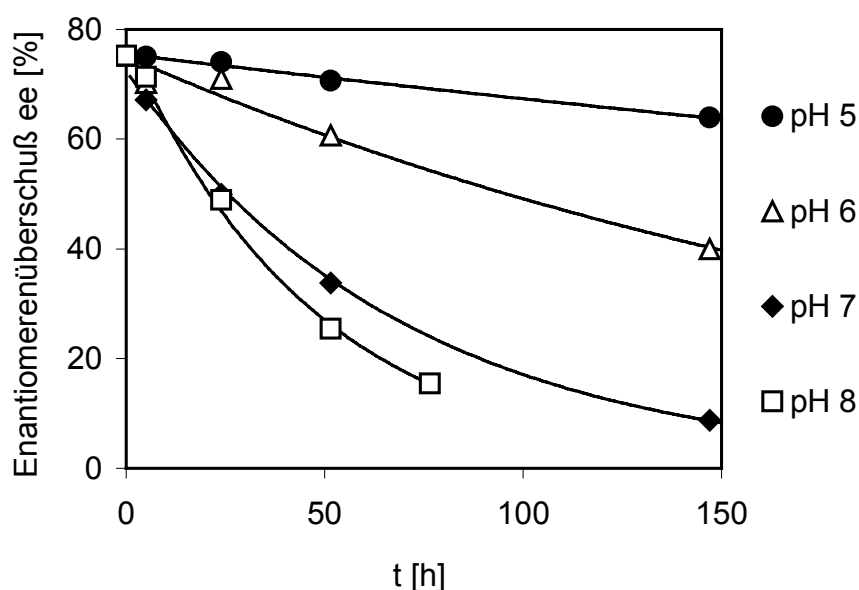


Abbildung 5.5-3: Racemisierung von *N*-*p*-Toluolsulfonyl-*L*-pipecolinaldehyd **L-TsCHO** in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer bei RT und verschiedenen pH-Werten. Die Enantiomerenüberschüsse wurden nach Derivatisierung des **TsCHO** zu *N*-*p*-Toluolsulfonyl-*L*-pipecolinsäure **L-TsCOOH** mittels Chiral-HPLC gemessen. Die unterbrochenen Linien repräsentieren den entsprechend einer Racemisierungskinetik erster Ordnung berechneten Verlauf.

Tabelle 5.5-2: Racemisierungskonstanten k_R und -halbwertszeiten $t_{1/2}^R$ von **TsCHO** in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer bei verschiedenen pH-Werten und RT.

pH	k_R [1/h]	$t_{1/2}^R$ [h]
5	$1.1 \cdot 10^{-3}$	630
6	$4.2 \cdot 10^{-3}$	165
7	$1.45 \cdot 10^{-2}$	48
8	$2.12 \cdot 10^{-2}$	33

Wie der Zerfall ist auch die Racemisierung bei höheren pH-Werten deutlich schneller, was ebenfalls für einen basenkatalysierten Mechanismus spricht. Auch die Racemisierungskonstanten k_R korrelieren bis zum Neutralpunkt sehr gut mit dem pH-Wert, wie in Abbildung 5.5-4 zu erkennen ist. Bei pH 8 allerdings gilt diese

Korrelation offensichtlich nicht mehr, die Racemisierungskonstante weicht um 60 % von der bis pH 7 gültigen Korrelation ab. Durch einen Meßfehler kann dies nicht erklärt werden. Bei einer Meßunsicherheit von $\Delta(\text{ee}) \leq 1\%$ liegt der maximale relative Fehler der ermittelten Racemisierungskonstante unterhalb von 10 %.

Wie schon bei der Zerfallskonstante k_Z besteht auch zwischen der Racemisierungskonstante k_R und der OH^- -Konzentration kein linearer Zusammenhang sondern ein nicht-linearer der Art:

$$k_R \sim [\text{OH}]^{0.56}$$

Dieser zwischen pH 5 und pH 7 gültige Zusammenhang ist dem zwischen der Zerfallskonstante k_Z und der OH^- -Konzentration sehr ähnlich (vgl. voriger Abschnitt). Daraus kann auf einen Zusammenhang zwischen Zerfall und Racemisierung von **TsCHO** geschlossen werden (vgl. Abschnitt 6.4.1).

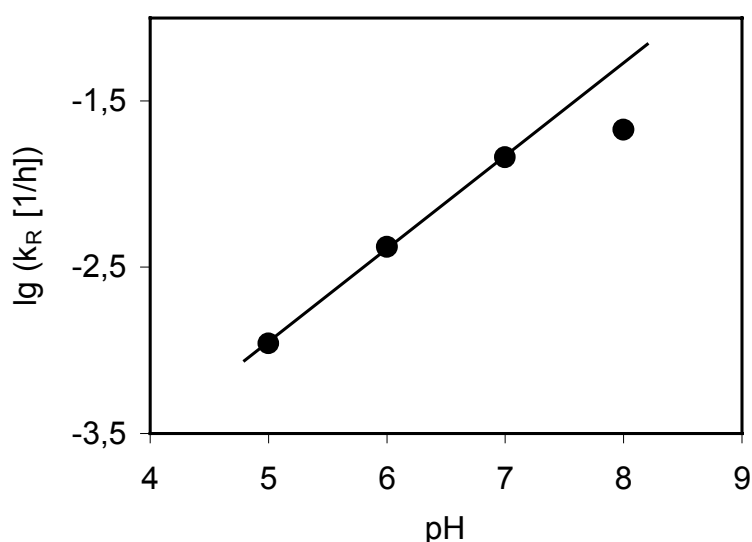


Abbildung 5.5-4: Korrelation zwischen der Racemisierungskonstante k_R von **TsCHO** in in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer und dem pH-Wert ($R^2 = 0.999$). Aufgetragen ist der dekadische Logarithmus der Racemisierungskonstante. Der Meßwert bei pH 8 wurde nicht in die Korrelation einbezogen.

5.5.4 Löslichkeit von **TsCHO** in wässrigen Systemen

Die Löslichkeitsgrenze von **TsCHO** in wässrigen Medien wurde wie in Abschnitt 4.6.4 beschrieben lediglich halbquantitativ untersucht, da in erster Linie deren Größenordnung von Interesse war.

In 0.1 M Kaliumphosphatpuffer war **TsCHO** bis zu einer Konzentration von ~ 2 mM löslich. Darüber traten Trübung und anschließende Tröpfchenbildung auf. Durch den Zusatz von 3 % (v/v) Tween 80 konnte die Löslichkeit auf ~ 10 mM gesteigert werden.

5.6 Screening auf Oxidoreduktase-Aktivität für die Reduktion von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO**

Für die Reduktion von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO** zu N-p-Toluolsulfonylpipecolinalkohol **TsOH** wurden geeignete Mikroorganismen und vier kommerziell erhältliche Alkoholdehydrogenasen getestet. Das Schema der Reaktion ist in Abbildung 5.6-1 dargestellt.

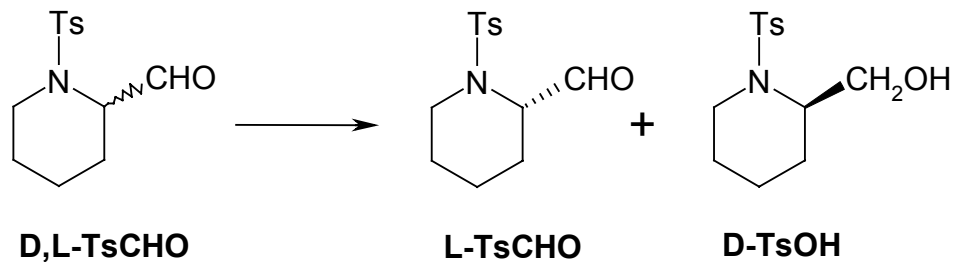


Abbildung 5.6-1: Schematische Darstellung der Reduktion von racemischem **TsCHO** zu optisch aktivem **TsOH** am Beispiel einer D-selektiven Reaktion.

5.6.1 Bioreduktion von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO** mit Mikroorganismen

In der Literatur sind zahlreiche Biotransformationen zur Darstellung enantiomerenreiner Alkohole oder Aldehyde unter Verwendung ganzer Zellen beschrieben (Faber, 1997; Theil, 1997; Drauz und Waldmann, 1995; Servi, 1990). Neben der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* kamen dabei vor allem Hefen zum Einsatz. Geschützte Aminoaldehyde wurden aber bisher noch keinen Bioreduktionen unterworfen.

Intakte, ruhende Zellen haben gegenüber freien Enzymen als Biokatalysator den Vorteil, daß die Zelle mit Hilfe ihres Erhaltungsstoffwechsels die benötigten Coenzyme selbst regenerieren kann. Dazu ist allenfalls das Angebot einer preiswerten C-Quelle wie z.B. Glucose notwendig. Somit ist weder der Zusatz von Redox-Cofaktoren, noch deren Recycling mittels geeigneter Regenerationssysteme nötig. Oft sind Enzyme in der Zelle auch deutlich stabiler, als frei in Lösung.

Ein Nachteil bei der Verwendung ganzer Zellen sind die oft geringen erzielbaren Raum-Zeit-Ausbeuten. Hinzu können Stofftransportprobleme wie das Einschleusen der Substrate in die Zelle oder das Ausschleusen der Produkte kommen. Unter Umständen kann auch die Aufarbeitung der Reaktion und die Produktisolierung bei der Verwendung ganzer Zellen schwierig sein.

5.6.1.1 Auswahl und Anzucht

In einer zuvor am Institut durchgeführten Arbeit wurden verschiedene Mikroorganismen auf die Bioreduktion von Formyl[2.2]paracyclophanen getestet (Pamperin, 1998; Pamperin et al., 1997). Diese wurden u.a. nach ihrer Fähigkeit ausgewählt, optisch aktive Ferrocenderivate reduzieren zu können. Bei beiden Verbindungsklassen handelt es sich jeweils um sterisch anspruchsvolle, chirale Aldehyde. Dies trifft auch auf das hier untersuchte Substrat N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO** zu. Da in der Literatur keine Beispiele für die Bioreduktion speziell von Aminoaldehyden zu finden waren, erschienen die erwähnten, zur Reduktion von Ferrocenderivaten und Formyl[2.2]paracyclophanen genutzten Organismen als ein sinnvoller Ansatzpunkt für ein Screening auf Bioreduktion von **TsCHO**.

Alle Stämme wurden als Submerskulturen auf Komplexmedium (YM, vergl. Abschnitt 4.2.2.1) mit offenem pH-Wert kultiviert. Aufgrund des zu erwartenden unterschiedlichen Wassergehaltes der verschiedenen Mikroorganismen, wurde zur Quantifizierung der folgenden Experimente zunächst eine Korrelation zwischen Biofeuchtmasse (BFM) und Biotrockenmasse (BTM) erstellt. Damit sollte erreicht werden, daß trotz unterschiedlicher Zellgröße und unterschiedlichen Wassergehaltes der verschiedenen Mikroorganismen vergleichbare Mengen an "trockenem" Biokatalysator im Screening eingesetzt werden konnte. Die Korrelationsfaktoren sind in Tabelle 5.6-1 zusammengefaßt.

Tabelle 5.6-1: Ausbeute bei der Kultivierung und Korrelationsfaktoren zwischen Biofeuchtmasse (BFM) und Biotrockenmasse (BTM) für die verwendeten Mikroorganismen

Mikroorganismus	Ausbeute BFM [g/l]	Korrelationsfaktor BFM/BTM
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DSM 11285	14.6	3.7
<i>Rhodotorula rubra</i> IFO 889	44.5	6.4
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> ATCC 20129	35.9	5.5
<i>Pichia jadinii</i> DSM 2361	21.9	5.1
<i>Trigonopsis variabilis</i> DSM 70714	23.0	4.7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , "Type I" ¹⁾	- ¹⁾	1.1 ¹⁾

¹⁾ Trockenhefe, Sigma-Aldrich, Lot-Nr. 24H7105.

5.6.1.2 Geeignete Screeningbedingungen

Der Einsatz eines Cosolvens ist für die schnelle und bequeme Herstellung wäßriger Lösungen von **TsCHO** sehr hilfreich, mit Tween 80 kann die Löslichkeit des Substrates in etwa verfünffacht werden (vgl. Abschnitt 5.5.1). In Vorversuchen wurde daher wie in Abschnitt 4.10.1.1 beschrieben der Einfluß von Cosolventien und des Lösungsvermittlers Tween 80 auf die Aktivität der Trockenhefe *Saccharomyces cerevisiae* "Type I" bei der Bioreduktion von **TsCHO** getestet. Auch die Auswirkung des Angebots von Glucose als Energiequelle für den Mikroorganismus wurde

untersucht. Die Auswertung der Testumsetzungen erfolgte nach 1 h Reaktionszeit halbquantitativ mittels Dünnschichtchromatographie.

In allen getesteten Fällen (vgl. Tabelle 4.10-1) war nach 1 h **TsCHO** deutlich erkennbar zu **TsOH** reduziert worden, nach 22 h lag jeweils Vollumsatz vor. Von den getesteten Cosolventien (jeweils 3 Vol.-% Methanol, Ethanol bzw. DMSO) zeigten Methanol und DMSO schwach hemmende Wirkung, während sich Ethanol leicht positiv auf die Umsetzung auswirkte. Daher wurde für die folgenden Screeningexperimente Ethanol als Cosolvens ausgewählt. Es wurde aus arbeitstechnischen Gründen (vgl. Abschnitt 4.10.1.2) in einer Konzentration von 2 % (v/v) eingesetzt.

Tween 80 zeigte bei einem Zusatz von 0.03 % bzw. 0.3 % (v/v) keine signifikante Wirkung auf die Umsetzung, bei einem Gehalt von 3 % (v/v) war jedoch eine sehr deutliche Hemmung der Umsetzung zu verzeichnen. Da beim nachfolgenden Screening eine Erhöhung der Löslichkeit von **TsCHO** nicht unbedingt notwendig war, wurde dort vorerst auf einen Zusatz von Tween 80 verzichtet.

Der Zusatz von Glucose in einer Konzentration von 10 g/l hatte bei dem angewandten Verhältnis zwischen Biokatalysator und Substrat (113 mg_{BTM} / mg_{TsCHO}) keine signifikante Auswirkung auf die Bioreduktion. Offensichtlich reichte die Reduktionskapazität der Zellen zur vollständigen Umsetzung des angebotenen Substrates aus. Bei ausgeglicheneren Verhältnissen zwischen Biokatalysator und Substrat ist dies aber mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht mehr der Fall. Und da Glucose auch keinerlei nachteilige Wirkungen auf die Umsetzung von **TsCHO** oder auf die Aufarbeitung der Analysenproben hatte, wurde in den folgenden Screening-Umsetzungen Glucose in einer Konzentration von jeweils 10 g/l zugesetzt. Die ermittelten, für geeignet erachteten Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 5.6-2 zusammengefasst.

*Tabelle 5.6-2: Geeignete Reaktionsbedingungen für ein Screening auf die Bioreduktion von **TsCHO** mit Mikroorganismen*

Parameter	Geeignete Bedingungen
Reaktionsmedium	0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.5
Substratkonzentration c_{TsCHO}	1 mM
Cosolvens	2 % (v/v) Ethanol
Lösungsvermittler (Tween 80)	-
Glucose	10 g/l

5.6.1.3 Screening auf die Reduktion von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO**

Die Screeningexperimente wurden unter den in Tabelle 5.6-2 beschriebenen Reaktionsbedingungen durchgeführt (vgl. Abschnitt 4.10.1.2). Bei allen Umsetzungen wurden Substratabnahme und Produktzunahme mittels Gaschromatographie verfolgt und aus den resultierenden Zeit-Umsatz-Kurven die Aktivitäten der jeweils eingesetzten Hefen bestimmt. Bei allen Umsetzungen lag nach 23 h Vollumsatz vor. Das Reaktionsprodukt wurde isoliert und auf sein Enantiomerenverhältnis mittels Chiral-HPLC untersucht. Die Ergebnisse des Screenings sind in Tabelle 5.6-3 zusammengefaßt.

Tabelle 5.6-3: Bioreduktion von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO** zu N-p-Toluolsulfonylpipecolin-alkohol **TsOH** mit verschiedenen Hefen unter Screening-Bedingungen (vgl. Tabelle 5.6-2).

Mikroorganismus	Aktivität [U/g _{BTM}]	Enantiomerenüberschuß ¹⁾ des Produktes TsOH
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DSM 11285	1.3	6 % (D)
<i>Rhodotorula rubra</i> IFO 889	3.4	0 %
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> ATCC 20129	7.7	0 %
<i>Pichia jadinii</i> DSM 2361	1.5	14 % (D)
<i>Trigonopsis variabilis</i> DSM 70714	0.6	0 %
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , "Type I" ²⁾	0.1 ²⁾	42 % (D) ²⁾

¹⁾ Nach Vollumsatz des Substrates **TsCHO**, in Klammern steht das angereicherte Enantiomer des Produktes **TsOH**

²⁾ Trockenhefe, Sigma-Aldrich, Lot-Nr. 24H7105.

Die Hefe *Rhodotorula mucilaginosa* zeigte mit 7.7 U/g_{BTM} die größte Aktivität der getesteten Mikroorganismen, die geringste (0.1 U/g_{BTM}) zeigte die Trockenhefe *Saccharomyces cerevisiae* "Type I". Deren Aktivität kann selbstverständlich nicht ohne weiteres mit den Aktivitäten der anderen getesteten Hefen verglichen werden, welche als Biofeuchtmassen bei -20 °C gelagert wurden.

Bemerkenswert ist die Entstehung teilweise nicht-racemischer, D-angereicherter Produkte trotz vollständiger Umsetzung des racemischen Substrates. Hierfür gibt es zwei mögliche Erklärungen:

1. D-selektive Reduktion von **TsCHO** und Racemisierung der Verbindung während der Reaktion (spontan oder enzymkatalysiert).
2. L-selektiver Abbau des Substrates **TsCHO** (zu einem anderen Produkt als **TsOH**) und / oder L-selektiver Abbau des Produktes **TsOH**.

Die Racemisierungskonstante von **TsCHO** beim Reaktions-pH von 6.5 beträgt $7.7 \cdot 10^{-3}$ 1/h (vgl. Abschnitt 5.5.3). Dementsprechend können sich während einer Reaktionszeit von 23 h spontan maximal 8.5 % des vorliegenden L-**TsCHO** in D-**TsCHO** umwandeln (und umgekehrt). Dies erklärt in keinem Fall den bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, "Type I" gemessenen Enantiomerenüberschuß von 42 %

beim Produkt **TsOH**. Allenfalls eine enzymatische Katalyse der Racemisierung könnte hierzu geführt haben.

Allerdings scheint es in diesem Fall wahrscheinlicher, daß ein enantioselektiver Abbau des L-Substrates **TsCHO** und / oder L-Produktes **TsOH** stattfand. Dies läßt sich an der Bilanzierung der Reaktion erkennen (Abbildung 5.6-2). Die Molsumme von Substrat und Produkt nimmt im Laufe der Zeit eindeutig ab. Bei den übrigen Umsetzungen mit den anderen Mikroorganismen war diese Molsumme im Rahmen der Meßgenauigkeit konstant.

Im Fall der Hefen *Saccharomyces cerevisiae* DSM 11285 und *Pichia jadinii* DSM 2361 kann über die tatsächlichen Gründe für das Vorliegen nicht-racemischer Produkte auf Grund des nur geringen Effekts anhand der vorliegenden Daten keine Aussage getroffen werden.

Parallel durchgeführte Umsetzungen von **TsCHO** mit freien Dehydrogenasen boten vor allem hinsichtlich der Enantioselektivität aussichtsreichere Ansatzpunkte (siehe folgender Abschnitt), daher wurde auf eine eingehendere Untersuchung der Bioreduktion von **TsCHO** mit den getesteten Hefen verzichtet.

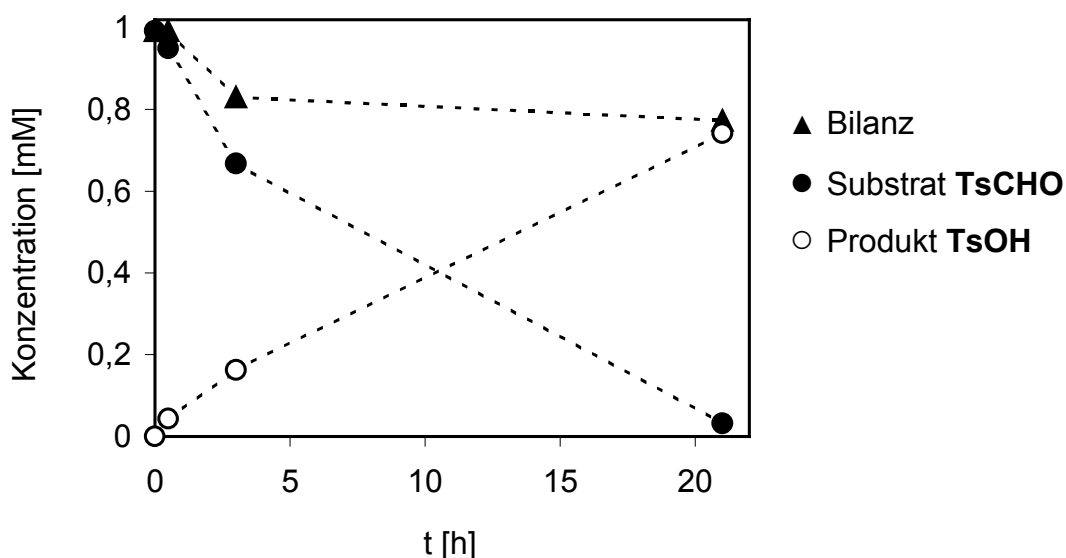


Abbildung 5.6-2: Bioreduktion von *N-p-Toluolsulfonyl-pipecolinaldehyd* **TsCHO** (●) zu *N-p-Toluolsulfonyl-pipecolinalkohol* **TsOH** (○) mit der Trockenhefe *Saccharomyces cerevisiae* "Type I" unter Screeningbedingungen (vgl. Tabelle 5.6-2). Die Molsumme (▲) der Verbindungen nimmt im Verlauf der Reaktion um über 20 % ab.

5.6.2 Bioreduktion von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO** mit freien Alkoholdehydrogenasen

Die zur Reduktion von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO** eingesetzten, kommerziell erhältlichen Alkoholdehydrogenasen und ihre wichtigsten Eigenschaften sind in Tabelle 5.6-4 zusammengestellt. Für diese Enzyme sind in der Literatur zahlreiche enantioselektive Umsetzungen von Ketonen und Aldehyden beschrieben worden (Übersichten: Faber, 1997; Theil, 1997; Drauz und Waldmann, 1995). N-geschützte α -Aminoaldehyde wie **TsCHO** wurden allerdings bisher nicht untersucht.

Tabelle 5.6-4: Eigenschaften der eingesetzten Alkoholdehydrogenasen.

Quelle	Abkürzung	Angriff ¹⁾	Cofaktor	Substratspektrum ²⁾
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YADH	<i>Re</i> (Prelog)	NAD(H)	Eng; kurzkettige, unverzweigte Aldehyde stark bevorzugt
Pferdeleber	HLADH	<i>Re</i> (Prelog)	NAD(H)	Aliphatische und aromatische Aldehyde unterschiedlichster Struktur, cyclische und bicyclische Ketone, kaum acyclische Ketone
<i>Thermoanaerobium brockii</i>	TbADH	<i>Re</i> (Prelog)	NADP(H)	Aldehyde, acyclische Methyl- und Ethylketone, cyclische Ketone; keine sperrigen Reste in direkter Nachbarschaft zur Carbonylgruppe
<i>Lactobacillus kefir</i>	LkADH	<i>Si</i> (Anti-Prelog)	NADP(H)	Cyclische und acyclische Ketone, besonders Methylketone, aromatische Ketone, Enone

¹⁾ Seite, von der die Carbonylgruppe durch den Enzym-Coenzym-Komplex angegriffen wird (nach Prelog, 1964).
²⁾ Nach Drauz und Waldmann, 1995.

5.6.2.1 Aktivitäten der getesteten Alkoholdehydrogenasen bei der Bioreduktion von **TsCHO**

Die oben beschriebenen ADH's wurden zu Vergleichszwecken zunächst einem einheitlichen photometrischen Standardaktivitätstest unterworfen (Abschnitt 4.3.2.1.3). Als Substrat wurde Acetaldehyd gewählt, da ein Test für dieses Substrat bereits etabliert war (Pamperin, 1998) und außerdem auch das interessierende Substrat **TsCHO** einen Aldehyd darstellt.

Desweiteren wurde der Einfluß von Methanol auf die Aktivitäten getestet. Methanol war aus praktischen Gründen bei den Umsetzungen von **TsCHO** anwesend (vgl. Abschnitt 4.3.2.1.4).

Schließlich wurde die Aktivität der ADH's für die Bioreduktion von **TsCHO** photometrisch bestimmt (vgl. Abschnitt 4.10.2.1). Die Ergebnisse aller Tests sind in Tabelle 5.6-5 zusammengefaßt.

Tabelle 5.6-5: Aktivitäten verschiedener Alkoholdehydrogenasen für die Reduktion von Acetaldehyd und N-p-Toluolsulfonylpipercolinaldehyd **TsCHO** bei pH 6.5 und 20 °C.

Umsetzungsbedingungen	Spezifische Aktivität [U/mg] von			
	YADH	HLADH	TbADH	LkADH
Standardaktivität ¹⁾	304	65	1.0	1.3
Standardaktivität bei Anwesenheit von 1 % (v/v) Methanol	290	32	1.0	1.0
Reduktion von TsCHO ²⁾	< 0.01	13	< 0.01	0.01
¹⁾ Aktivität der ADH's unter Standardbedingungen (20 °C, pH 6.5) mit Acetaldehyd als Substrat (vgl. Abschnitt 4.3.2.1.3). ²⁾ Bei Anwesenheit von 1 % (v/v) Methanol (vgl. Abschnitt 4.3.2.1.4).				

Bis auf die HLADH vertrugen alle ADH's 1 % Methanol im Reaktionsmedium recht gut. Bei der ADH aus Pferdeleber wurde die spezifische Aktivität jedoch in etwa halbiert. Da das Enzym Methanol nicht als Substrat akzeptiert (in eigenen Tests wurde keine Bildung von NADH aus NAD bzw. Formaldehyd aus Methanol gefunden), handelt es sich offensichtlich um einen inhibitorischen Effekt.

Wie entsprechend der bekannten Eigenschaften des Enzyms erwartet (vgl. Tabelle 4.2-3 und Tabelle 5.6-4), zeigte die YADH die größte Aktivität bei der Reduktion von Acetaldehyd, aber praktisch keine bei der Reduktion von **TsCHO**.

Die ADH aus Pferdeleber reduzierte **TsCHO** mit erheblicher Aktivität, etwa 40 % der Aktivität, mit der Acetaldehyd unter den gleichen Bedingungen umgesetzt wurde. Dies stellt ein weiteres Beispiel dafür dar, daß die HLADH Aldehyde der unterschiedlichsten Strukturen als Substrate akzeptiert (vgl. Tabelle 5.6-4).

TbADH akzeptierte **TsCHO** nicht als Substrat. Dies überrascht allerdings nicht sonderlich, da es bekanntermaßen keine sperrigen Reste in direkter Nachbarschaft zur Carbonylgruppe zuläßt (vgl. Tabelle 5.6-4). Der 2-(N-p-Toluolsulfonyl)-Piperidyl-Rest, welcher in **TsCHO** direkt an die Carbonylgruppe gebunden ist, stellt jedoch erhebliche sterische Ansprüche.

Die ADH aus *Lactobacillus kefir* war ebenfalls in der Lage, **TsCHO** umzusetzen, allerdings nur mit sehr geringer, für präparative Anwendungen möglicherweise uninteressanter Aktivität. Trotzdem sollte die Enantioselektivität des Enzyms untersucht werden.

Somit kamen die ADH's aus Pferdeleber und *Lactobacillus kefir* für genauere Untersuchungen in Frage.

5.6.2.2 Charakterisierung der Bioreduktionen von **TsCHO** mit aktiven freien Alkoholdehydrogenasen

Zur eingehenderen Untersuchung der Reduktion von **TsCHO** mit der Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber bzw. der Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* wurden wie in den Abschnitten 4.10.2.3.1 und 4.10.2.3.2 beschrieben Umsetzungen mit einem Überschuß an NADH bzw. NADPH durchgeführt und mittels Chiral-GC verfolgt. Der Verlauf der Reaktionen ist in Abbildung graphisch dargestellt.

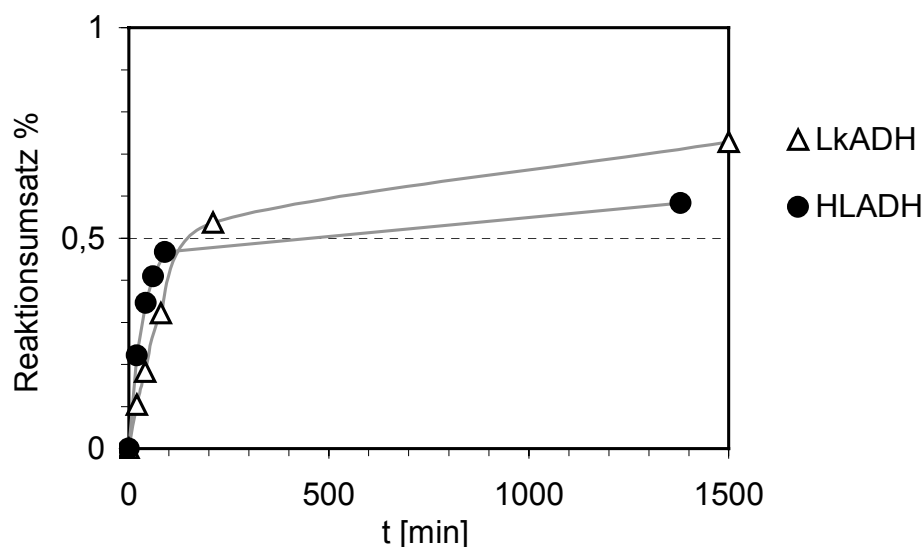


Abbildung 5.6-3: Bioreduktion von *N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd* **TsCHO** mit der Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber (HLADH) bzw. der Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* (LkADH) und einem Überschuß an NADH bzw. NADPH.

Der Enantiomerenüberschuß des Reaktionsproduktes **TsOH** wurde nach Abbruch der Reaktion (HLADH) bzw. in einer separat durchgeführten Umsetzung nach 165 min (LkADH) per Chiral-HPLC bestimmt. Die gemessenen kinetischen Parameter der Reaktionen sind in Tabelle 5.6-6 zusammengestellt. Die spezifischen Aktivitäten der ADH's konnten im Vergleich zu den durch photometrische Messungen ermittelten Daten gut reproduziert werden (vgl. Tabelle 5.6-5). Die etwas höhere spezifische Aktivität der HLADH aus den GC-Messungen läßt sich durch die erheblich höhere Cofaktor-Konzentration bei der entsprechenden Umsetzung erklären (1.5 mM gegenüber 0.1 mM bei den Photometertests).

Bei der durch HLADH katalysierten Bioreduktion konnte nur enantiomerenreines D-**TsOH** im Reaktionsprodukt nachgewiesen werden. Das Enzym arbeitete demnach enantiospezifisch nach D.

Im Reaktionsprodukt der LkADH-Reaktion hingegen wies das **TsOH** nur einen Enantiomerenüberschuß von 72.5 % D-Enantiomer auf. Da die Reaktion nach 165

min abgebrochen wurde, konnten sowohl die chemische Zersetzung (< 1 % bei pH 6.5), als auch die Racemisierung von **TsCHO** (< 2 % bei pH 6.5) vernachlässigt

*Tabelle 5.6-6: Aktivität und Enantioselektivität der Reduktion von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO** mit der Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber bzw. der Alkoholdehydrogenase aus Lactobacillus kefir bei pH 6.5 und 20 °C.*

	Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber	Alkoholdehydrogenase aus <i>Lactobacillus kefir</i>
Spezifische Aktivität [U/mg]	16	0.01
E-Wert ¹⁾	> 100	12
¹⁾ E-Wert für die Enantioselektivität (Chen et al., 1982).		

werden. Außerdem konnte die Reaktion beim gemessenen Umsatz von 46 % als irreversibel betrachtet werden, da ihr Gleichgewicht praktisch ganz auf der Seite der Produkte liegt. Die Angabe eines E-Wertes nach Chen et al. (1982) für irreversible Fälle ist demnach legitim.

Somit zeigte die HLADH sowohl hinsichtlich der Aktivität als auch der Enantioselektivität gegenüber der LkADH weitaus günstigere Eigenschaften. Als besonders erfreulich erwies sich die *Enantiospezifität* der HLADH, da hierdurch angesichts der Racemisierungsfähigkeit von **TsCHO** eine theoretische Ausbeute von 100 % enantiomerenreinem D-**TsOH** möglich wurde. Die folgenden Untersuchungen konzentrierten sich deshalb auf Bioreduktionen von **TsCHO** mit der Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber.

5.7 Optimierung der Reduktion von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO** mit der Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber

Im Hinblick auf eine spätere Kopplung der Reduktion von **TsCHO** mit einem NADH-Recyclingsystem waren noch einige Eigenschaften der Reaktion zu klären.

5.7.1 Einfluß des pH-Wertes auf die Reduktion von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO** mit der Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber

Der Einfluß des pH-Wertes auf die Reduktion von **TsCHO** mit der HLADH wurde im gleichen pH-Bereich (pH 5.0 bis pH 8.0) untersucht, wie dies bei der Untersuchung der Racemisierung bzw. der Zersetzung von **TsCHO** der Fall war. Unterhalb pH 5 ist die Racemisierung des Substrates viel zu langsam, oberhalb von pH 8 ist es zu instabil (vgl. Abschnitte 5.5.2 und 5.5.3).

Ziel der Untersuchungen war nicht die Ermittlung eines pH-Optimums für die Aktivität der Reaktion, sondern eine Quantifizierung der pH-Abhängigkeit der Aktivität für eine sinnvolle Planung der Reaktionsbedingungen bei einer präparativen Reaktion mit NADH-Recycling.

Die entsprechenden Umsetzungen wurden wie in Abschnitt 4.10.2.5.1 beschrieben durchgeführt, die Ergebnisse der Tests sind in Abbildung 5.7-1 dargestellt.

Wie erwartet, war die Aktivität der HLADH im leicht sauren Milieu größer, als im schwach basischen. Dies kann auf den Verbrauch von Protonen bei der Reaktion zurückgeführt werden:



Dementsprechend läuft die Rückreaktion (Oxidation von Alkoholen zu Aldehyden) im basischen Milieu schneller ab.

Die Aktivität der HLADH ist im untersuchten Bereich nahezu linear vom pH-Wert abhängig und nimmt pro pH-Einheit um ca. 3 U/mg ab. Zwischen pH 5 und pH 8 macht die HLADH jedoch bezüglich ihrer Aktivität keine Probleme und ist im gesamten Bereich einsetzbar.

5.7.2 Untersuchungen zur Inhibition der Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber

Bei einer präparativen Reduktion von **TsCHO** würden, bedingt durch das Herstellen der Substratlösung, 1 % Methanol anwesend sein. Dessen inhibitorische Wirkung wurde bereits in Abschnitt 5.6.2.1 erwähnt. Hinweise auf eine Produktinhibition durch **TsOH** ergaben sich in keinem Experiment, weder bei Aktivitätstests mit **TsCHO** als Substrat, noch bei der Bestimmung der MM-Parameter der Reaktion (vgl. Abschnitt 5.7.3). Für das Recycling von verbrauchtem NADH sollte das Formiat/Formiatdehydrogenase-System genutzt werden. Somit war mit relativ hohen Konzentrationen von Formiat (100 mM) im Reaktionsmedium zu rechnen. Daher

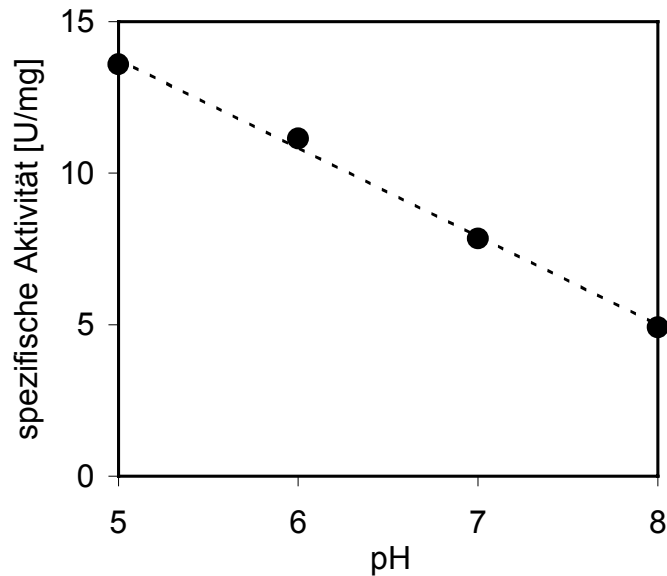


Abbildung 5.7-1: Einfluß des pH-Wertes auf die Aktivität der Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber bei der Reduktion von *N*-*p*-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO** mit NADH.

wurde der Einfluß von Formiat auf die Aktivität der HLADH bei pH 7.0 und pH 8.0 gemessen (vgl. Abschnitt 4.10.2.4.1). Niedrigere pH-Werte wurden auf Grund der zu langsamen Racemisierung von **TsCHO** unterhalb des Neutralpunktes nicht in Betracht gezogen (vgl. Abschnitt 5.5.3).

Die Ergebnisse der Tests sind in Abbildung 5.7-2 dargestellt. Formiat in einer Konzentration von 100 mM hemmte die Aktivität der HLADH erheblich. Bei pH 7.0 nahm die Aktivität um 60 %, bei pH 8 um 45 % ab.

Es handelt sich hierbei vermutlich *nicht* oder *nicht nur* um eine kompetitive Inhibition, da auch V_{\max} durch derart hohe Formiat-Konzentrationen beeinträchtigt wurde (die Messung der MM-Parameter ohne Formiat ergab für V_{\max} signifikant höhere Werte als mit 100 mM Formiat [Daten nicht gezeigt], vgl. Abschnitt 5.7.3); d.h., die hohe Natriumformiat-Konzentration verändert das Reaktionsmedium in seinen Eigenschaften derart, daß das Enzym über einen kompetitiven Effekt hinaus in seiner Aktivität beeinträchtigt wird.

Da es sich offensichtlich *nicht* um eine rein kompetitive Inhibition handelte, wurde auch keine Inhibitionskonstante ermittelt. Die HLADH behielt aber in jedem Fall noch genügend Aktivität bei Gegenwart von 100 mM Formiat, so daß der Aktivitätsverlust gut in Kauf genommen werden konnte. Bei einer Kopplung der Reduktion von **TsCHO** mit dem Formiat/Formiatdehydrogenase-System zum NADH-Recycling war die Aktivität der Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* der limitierende Faktor bzgl. der Aktivität der Gesamtreaktion (vgl. Abschnitt 5.8.1). Und eben die Formiatdehydrogenase verlangte eine hohe Formiat-Konzentration (vgl. Abschnitt 5.7.4.3).

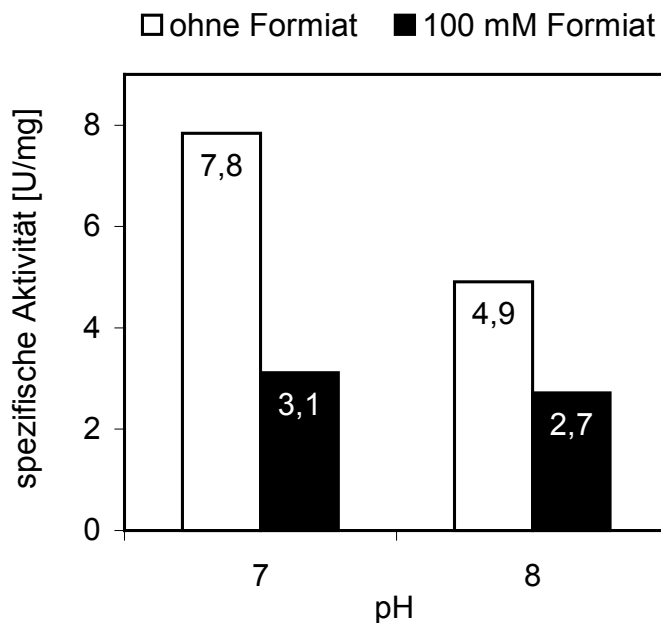


Abbildung 5.7-2: Einfluß von Natriumformiat auf die Aktivität der Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber bei der Reduktion von *N-p*-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO** mit NADH

5.7.3 Bestimmung von $K_M(\text{NADH})$ und V_{\max} für die Reduktion von **TsCHO** in Gegenwart von Formiat

Für eine sinnvolle Planung der Reaktionsbedingungen bei einer präparativen Reduktion von **TsCHO** mit NADH-Recycling war die Kenntnis von MM-Parametern unter Reaktionsbedingungen nötig. Dies betraf das Vorhandensein von Methanol (1 Vol-%), Natriumformiat (100 mM) und den pH-Wert.

$K_M(\text{NADH})$ und V_{\max} für die Reduktion von **TsCHO** wurden wie in Abschnitt 4.10.2.5.4 beschrieben aus photometrischen Online-Messungen des vollständigen Konzentration-Zeit-Verlaufs der Reaktion bei pH 7.0 und pH 8.0 ermittelt. In Abbildung 5.7-3 sind als Beispiel der gemessene Verlauf bei pH 7.0 sowie der berechnete Verlauf nach Optimierung von $K_M(\text{NADH})$ und V_{\max} dargestellt. Die optimierten Parameter sind in Tabelle 5.7-1 zusammengefaßt.

Tabelle 5.7-1: Michaelis-Menten-Parameter der Reduktion von *N-p*-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO** mit der Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber bei einer Substratkonzentration $c_{D,L\text{-TsCHO}} = 1 \text{ mM}$, bei Gegenwart von 100 mM Na-Formiat und bei 20 °C.

MM-Parameter bei	V_{\max} [U/mg]	$K_M(\text{NADH})$ [μM]
pH 7.0	6.4	86
pH 8.0	5.3	81

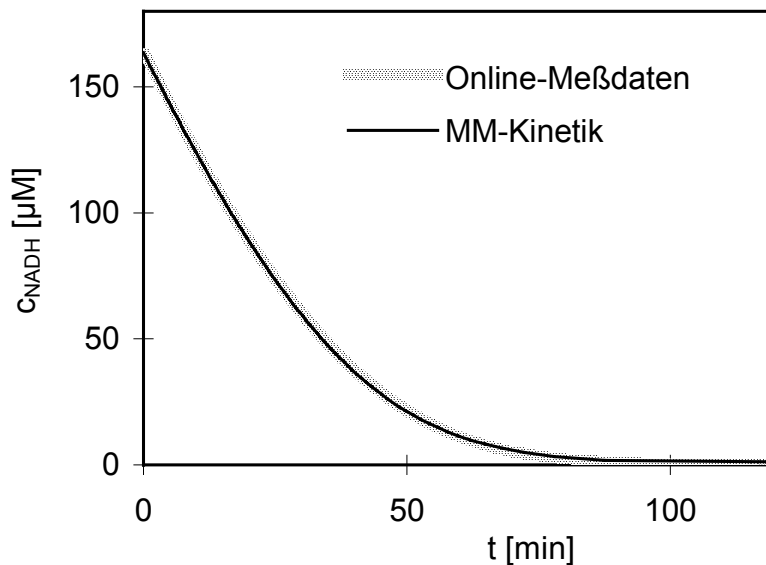


Abbildung 5.7-3: Photometrische Online-Messung ($\lambda = 340 \text{ nm}$) der Reduktion von *N-p-Toluolsulfonyl*pipecolinaldehyd **TsCHO** mit der Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber bei pH 7.0 in Gegenwart von 100 mM Na-Formiat. Der dargestellte Konzentrations-Zeit-Verlauf nach Michaelis Menten (MM-Kinetik) wurde nach Optimierung der Parameter $K_M(\text{NADH})$ und V_{max} berechnet.

5.7.4 Charakterisierung der Oxidation von Formiat mittels der Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* und NAD

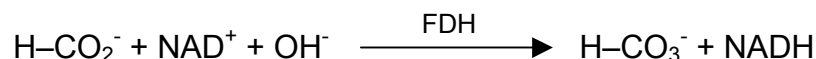
Als NADH-Recycling-System für die Reduktion von **TsCHO** mit der HLADH wurde die Oxidation von Formiat mit der Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* in Betracht gezogen. Zur Prüfung der Eignung dieser Reaktion für den gewünschten Zweck wurden einige Tests durchgeführt.

5.7.4.1 Einfluß des pH-Wertes auf die Aktivität der FDH aus *Candida boidinii*

Wie zuvor gezeigt wurde, hatte der pH-Wert einen erheblichen Einfluß auf die Stabilität und Racemisierungsgeschwindigkeit des Substrates **TsCHO** (vgl. Abschnitte 5.5.2 und 5.5.3) sowie auf die Aktivität der HLADH bei der Reduktion der Verbindung (vgl. Abschnitt 5.7.1). Zur Auswahl eines geeigneten Reaktions-pH war daher das Verhalten des Recycling-Systems bei Variation des pH-Werts von Bedeutung. Laut Literatur hat die Oxidation von Formiat mittels der FDH aus *Candida boidinii* ein breites pH-Optimum zwischen pH 7.5 und 8.5 (Schütte et al., 1976) Trotzdem wurde der Einfluß des pH-Wertes auf das Enzym in eigenen Messungen im gleichen pH-Bereich (pH 5.0 bis pH 8.0) untersucht, wie dies bei der Untersuchung der pH-Abhängigkeit der HLADH-Aktivität bei der Reduktion von **TsCHO** der Fall war.

Die entsprechenden Umsetzungen wurden wie in Abschnitt 4.10.2.5.2 beschrieben durchgeführt, die Ergebnisse der Tests sind in Abbildung 5.7-4 dargestellt.

Entsprechend der stöchiometrischen Reaktionsgleichung lief die Reaktion bei steigendem pH-Wert schneller ab:



Die Aktivität der FDH ist im untersuchten Bereich linear vom pH-Wert abhängig und nimmt pro pH-Einheit um ca. 0.07 U/mg zu. Der Einsatz des Enzyms ist demnach nicht strikt auf den basischen Bereich beschränkt, es wird jedoch vorteilhaft oberhalb des Neutralpunktes eingesetzt. Andernfalls nimmt die (ohnehin schon geringe) spezifische Aktivität weiter ab.

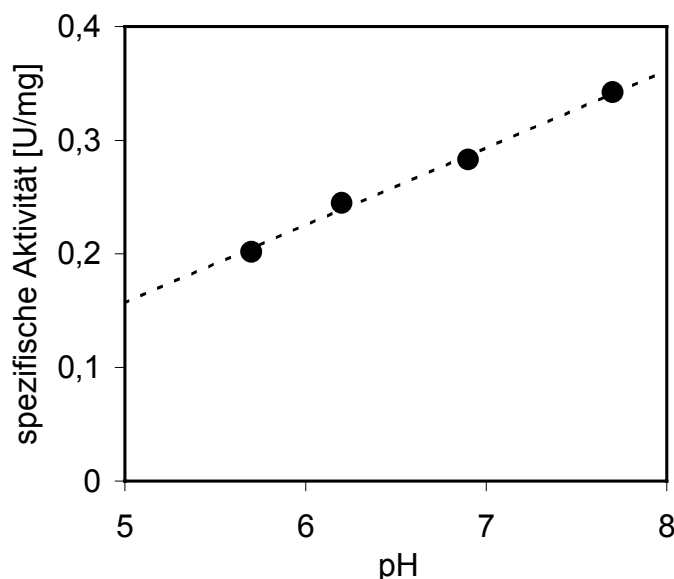


Abbildung 5.7-4: Einfluß des pH-Wertes auf die Aktivität der Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* bei der Oxidation von Natriumformiat mit NAD.

5.7.4.2 Untersuchungen zur Inhibition der Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii*

Bei einer präparativen Reduktion von **TsCHO** würde, wie bereits in Abschnitt 5.7.2 erwähnt, 1 % Methanol im Reaktionsmedium anwesend sein. Außerdem war eine mögliche Inhibition der FDH durch das Substrat **TsCHO** oder das Produkt **TsOH** zu berücksichtigen. Daher wurden alle drei Substanzen wie in Abschnitt 4.10.2.4.2 beschrieben auf ihre inhibitorische Wirkung getestet.

Bei keinem der Stoffe konnte im Rahmen der Meßgenauigkeit ein Inhibitionseffekt nachgewiesen werden. Die FDH zeigte bei allen Tests eine gegenüber dem Standardaktivitätstest unveränderte spezifische Aktivität von 0.36 U/mg.

5.7.4.3 Bestimmung von $K_M(\text{NAD})$ und V_{\max} für die Oxidation von Natriumformiat mit der FDH aus *Candida boidinii*

Für die sinnvolle Planung einer präparativen Reduktion von **TsCHO** mit NADH-Recycling war die Kenntnis kinetischer Parameter *unter Reaktionsbedingungen* nötig. Dies betraf sowohl die eigentliche Reduktion mit der HLADH aus Pferdeleber (vgl. Abschnitt 5.7.3) als auch die NADH-Recyclingreaktion mit der FDH.

$K_M(\text{NAD})$ und V_{\max} für die Oxidation von Formiat wurden wie in Abschnitt 4.10.2.5.4 beschrieben aus photometrischen Messungen bei verschiedenen NAD-Konzentrationen jeweils bei pH 7.0 ermittelt. Die Natriumformiatkonzentration wurde zu 100 mM gewählt, da hier ca. 90 % der maximalen Aktivität vorlagen ($K_M(\text{Formiat}) = 13 \text{ mM}$, Herstellerangabe). Da weder Methanol, noch **TsCHO** oder **TsOH** einen Einfluß auf das Verhalten der FDH gezeigt hatten (vgl. voriger Abschnitt), wurde keiner dieser Stoffe bei den Messungen zugesetzt.

In Abbildung 5.7-5 sind die gemessenen spezifischen Aktivitäten sowie der nach Anpassung von $K_M(\text{NAD})$ und V_{\max} berechnete Verlauf dargestellt. Die optimierten Parameter sind in Tabelle 5.7-2 zusammengefaßt.

Tabelle 5.7-2: Michaelis-Menten-Parameter der Oxidation von Natriumformiat mit der Formiatdehydrogenase aus Candida boidinii bei pH 7.0, 20 °C und bei einer Substratkonzentration $c_{\text{Formiat}} = 100 \text{ mM}$.

MM-Parameter bei	V_{\max} [U/mg]	$K_M(\text{NAD})$ [μM]
pH 7.0	0.33	62
pH 8.0	0.36	221

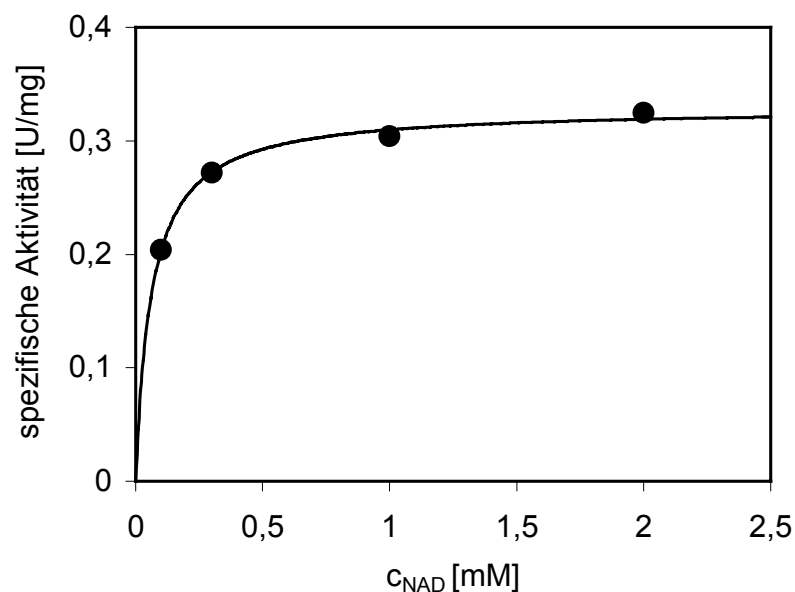


Abbildung 5.7-5: Bestimmung der Michaelis-Menten-Parameter für die Oxidation von Formiat mit der Formiatdehydrogenase aus Candida boidinii bei pH 7.0. Der durchgezogene Graph stellt den nach Optimierung der Parameter $K_M(\text{NADH})$ und V_{\max} berechneten Verlauf dar.

5.8 Kopplung der Bioreduktion von N-p-Toluolsulfonyl-pipecolinaldehyd **TsCHO** mit dem NADH-Recycling-System Formiat/Formiatdehydrogenase

5.8.1 Berechnung der spezifischen Gesamtaktivität des gekoppelten Systems und des optimalen Verhältnisses der Enzyme HLADH und FDH

Bei einem enzymatischen NADH-Recycling mit dem Formiat/Formiatdehydrogenase-System handelt es sich um ein sog. "coupled-system-recycling". Dabei wird in einer separaten Reaktion mit einem zusätzlichen Enzym der verbrauchte Cofaktor regeneriert.

Da bei dieser Variante des Cofaktorrecycling mit zwei Enzymen gearbeitet wird, ist es sinnvoll, das optimale Mengenverhältnis (d.h. das Verhältnis mit der höchsten *spezifischen* Gesamtaktivität) der beiden Enzyme zum Einsatz zu bringen, um sie mit größtmöglicher Effizienz zu nutzen. Außerdem ist die Kenntnis der *spezifischen* Gesamtaktivität der gekoppelten Reaktionen von Bedeutung, um benötigte Enzymmengen und Reaktionszeiten abschätzen zu können.

Diese Fragen sollen im Folgenden einer quantitativen Betrachtung unterzogen werden.

Das gekoppelte Reaktionssystem kann schematisch folgendermaßen dargestellt werden:

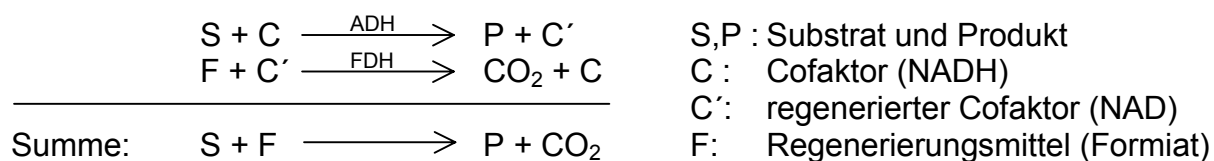


Abbildung 5.8-1: Schematische Darstellung einer Bioreduktion mit gekoppeltem NADH-Recycling mittels des Formiat/Formiatdehydrogenase-Systems

Zur Vereinfachung des Systems wurden einige Bedingungen vorausgesetzt:

- 1) Die Reaktionen seien irreversibel
- 2) Die Cofaktor-Konzentration ist klein gegenüber der Substrat-Konzentration
- 3) Es gelten Michaelis-Menten-Kinetiken bezüglich der Cofaktoren

Diese Voraussetzungen sind jeweils auch zu rechtfertigen:

- Punkt 1) ist in sehr guter Näherung erfüllt, da durch den hohen eingesetzten Formiat-Überschuß und die Irreversibilität der CO₂-Bildung das Gleichgewicht der Gesamtreaktion praktisch vollständig auf der Produktseite liegt.
- Bei der untersuchten Bioreduktion von **TsCHO** war ein Verhältnis zwischen Substat- und Cofaktor-Konzentration von 10 oder größer angestrebt, wodurch Punkt 2) der obigen Voraussetzungen erfüllt war.
- Obiger Punkt 3) gilt eigentlich nicht für cofaktorabhängige, enzymkatalysierte Reaktionen. Wie aber bereits in Abschnitt 4.10.2.5.4 diskutiert wurde, gehen alle gängigen 2-Substrat-Kinetiken bei Konstanthaltung der Konzentration eines Substrates in Michaelis-Menten-Kinetiken über. Und da die Cofaktor-Konzentration klein gegenüber der Substrat-Konzentration gehalten wurde, konnte letztere bis zum Erreichen des stationären Zustandes als konstant angesehen werden.

Unter obigen Voraussetzungen gilt dann:

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{\max}^1 [C]}{K_M^1 + [C]} \quad (\text{Gl. 5-1})$$

$$\frac{d[CO_2]}{dt} = \frac{V_{\max}^2 [C']}{K_M^2 + [C']} \quad (\text{Gl. 5-2})$$

d[P]/dt : Produktbildungsrate

d[CO₂]/dt : Bildungsrate von CO₂

V_{max}¹, K_M¹ : MM-Parameter der ADH

V_{max}², K_M² : MM-Parameter der FDH

[C] : NADH-Konzentration

[C'] : NAD-Konzentration

Die genannten MM-Parameter sind selbstverständlich nur bei den gewählten Reaktionsbedingungen und bei der ADH nur für die gewählte Ausgangskonzentration des Substrates gültig, im Fall der FDH kann die Änderung der Formiatkonzentration hingegen vernachlässigt werden.

Nach Erreichen des stationären Zustandes sind NADH-Verbrauch und –Bildung gleich groß, es stellt sich ein stationäres NADH/NAD-Verhältnis ein und es wird

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{d[CO_2]}{dt} \quad (\text{Gl. 5-3})$$

bzw.

$$\frac{V_{\max}^1 [C]}{K_M^1 + [C]} = \frac{V_{\max}^2 [C']}{K_M^2 + [C']} \quad (\text{Gl. 5-4})$$

Außerdem gelten folgende Zusammenhänge:

$[C] + [C'] = [C]_0$	(Gl. 5-5)	$[C]_0$: Cofaktor-Gesamtkonzentration
$V_{\max}^1 = A_1 \cdot m_E^1$	(Gl. 5-6)	A_1 : maximale spez. Aktivität der ADH [U/mg]
$V_{\max}^2 = A_2 \cdot m_E^2$	(Gl. 5-7)	A_2 : maximale spez. Aktivität der FDH [U/mg]
$m_E^1 + m_E^2 = M_E$	(Gl. 5-8)	m_E^1 : Massenkonzentration der ADH [mg/l]
		m_E^2 : Massenkonzentration der FDH [mg/l]
		M_E : Enzym-Gesamtkonzentration [mg/l]

Aus (Gl. 5-4) bis (Gl. 5-8) ergibt sich für die stationäre NADH-Konzentration:

$$[C]_{\text{stat.}} = \frac{\sqrt{4A_2K_M^1(A_2 - \alpha A_1)[C]_0 + [\alpha A_1(K_M^2 + [C]_0) + A_2(K_M^1 - [C]_0)]^2} - \alpha A_1(K_M^2 + [C]_0) - A_2(K_M^1 - [C]_0)}{2(A_2 - \alpha A_1)}$$

(Gl. 5-9)

mit

$$\alpha = \frac{m_E^1}{m_E^2} \quad (\text{Gl. 5-10})$$

Mit der aus (Gl. 5-8) und (Gl. 5-10) folgenden Beziehung

$$m_E^1 = \frac{\alpha}{\alpha + 1} M_E \quad (\text{Gl. 5-11})$$

folgt für die spezifische Gesamtaktivität $A_{\text{stat.}}$ (bezogen auf die eingesetzte Gesamt-Enzymmenge $m_{\text{ADH}} + m_{\text{FDH}} = M_{\text{gesamt}}$) im stationären Zustand mit (Gl. 5-1) und (Gl. 5-6)

$$A_{\text{stat.}} = \frac{1}{M_E} \cdot \left(\frac{d[P]}{dt} \right)_{\text{stat.}} = \frac{\alpha A_1 [C]_{\text{stat.}}}{(\alpha + 1)(K_M^1 + [C]_{\text{stat.}})} \quad (\text{Gl. 5-12})$$

(Gl. 5-12) erlaubt die Berechnung der spezifischen Gesamtaktivität $A_{\text{stat.}}$ in Abhängigkeit der entsprechenden Enzymparameter A_1 und K_M^1 (für die ADH) bzw. A_2 und K_M^2 (für die FDH), dem eingesetzten Verhältnis der beiden Enzyme sowie der Cofaktor-Gesamtkonzentration. Abbildung 5.8-2 zeigt die graphische Darstellung von (Gl. 5-12) bei verschiedenen Cofaktorkonzentrationen. Bei hohen Cofaktorkonzentrationen erhalten die Verläufe eher theoretischen Charakter, da die getroffenen Annahmen (siehe oben) z. T. keine Gültigkeit mehr besitzen. Wichtig ist jedoch die Erkenntnis, daß die Gesamtaktivität bei einem bestimmten ADH/FDH-Verhältnis maximal wird.

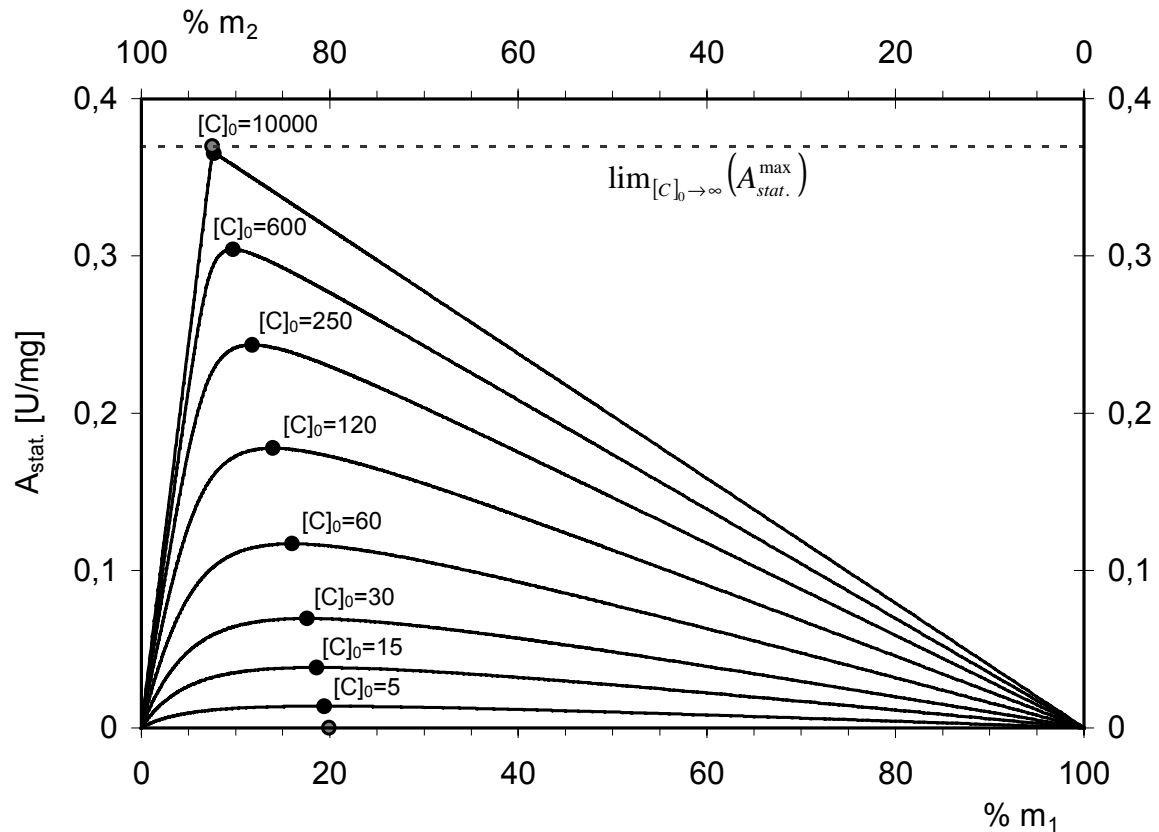


Abbildung 5.8-2: Graphische Darstellung von (Gl. 5-12) bei verschiedenen Cofaktorkonzentrationen $[C]_0$ $[\mu\text{M}]$. Aufgetragen ist die spezifische Gesamtaktivität der Reaktion im stationären Zustand $A_{\text{stat.}}$ über dem prozentualen Massenverhältnis der Enzyme ADH ($\% m_1$) und FDH ($\% m_2$) im Reaktionssystem. Für die Berechnung der Verläufe wurden folgende MM-Parameter angenommen: $A_1 = 4.9 \text{ U/mg}$, $K_M^1 = 68 \mu\text{M}$; $A_2 = 0.4 \text{ U/mg}$, $K_M^2 = 90 \mu\text{M}$.

Eine Extremwertbetrachtung von (Gl. 5-12) bezüglich α liefert:

$$\alpha_{\max} = \frac{A_1 A_2 [C]_0 (K_M^1 + K_M^2 + [C]_0) + [A_1 (K_M^2 + [C]_0) - A_2 (K_M^1 + [C]_0)] \sqrt{A_1 A_2 K_M^1 K_M^2}}{A_1 [A_1 (K_M^2 + [C]_0)^2 - A_2 K_M^1 K_M^2]} \quad (\text{Gl. 5-13})$$

Somit kann mittels (Gl. 5-13) aus den MM-Parametern der Enzyme ADH und FDH sowie der Cofaktorkonzentration das optimale Enzymverhältnis berechnet werden.

Mit dem aus (Gl. 5-13) ermittelten optimalen Enzymverhältnis α_{\max} kann unter Verwendung von (Gl. 5-9) und (Gl. 5-12) für eine gegebene Cofaktorkonzentration $[C]_0$ die maximale spezifische Gesamtaktivität der Reaktion im stationären Zustand $A_{\text{stat.}}^{\max}$ berechnet werden:

$$A_{\text{stat.}}^{\max} = \frac{\alpha_{\max} \cdot A_1 \cdot [C]_{\text{stat.}}^{\max}(\alpha_{\max}, A_1, A_2, K_M^1, K_M^2, [C]_0)}{(\alpha_{\max} + 1) \cdot [K_M^1 + [C]_{\text{stat.}}^{\max}(\alpha_{\max}, A_1, A_2, K_M^1, K_M^2, [C]_0)]} \quad (\text{Gl. 5-14})$$

Wie aus Abbildung 5.8-2 hervorgeht, strebt $A_{stat.}^{max}$ bei steigender Cofaktorkonzentration $[C]_0$ einem Grenzwert zu. Eine Grenzwertbetrachtung von (Gl. 5-14) liefert:

$$\lim_{[C]_0 \rightarrow \infty} (A_{stat.}^{max}) = \frac{A_1 A_2}{A_1 + A_2} \quad (\text{Gl. 5-15})$$

(Gl. 5-15) liefert einen einfachen analytischen Ausdruck für die theoretisch maximal erreichbare Gesamtaktivität einer Bioreduktion mit einer Alkoholdehydrogenase und gekoppeltem NADH-Recycling (coupled-system-recycling) im stationären Zustand. Sie liegt immer niedriger als die jeweiligen maximalen Aktivitäten der ungekoppelten Einzelreaktionen. (Gl. 5-15) liefert somit einen Referenzwert, an dem eine praktisch durchgeführte Reaktion quantitativ bewertet werden kann.

Weiterhin kann eine "Ausnutzung" der Aktivität der beteiligten Enzyme als Quotient der Gesamtaktivität im stationären Zustand und theoretisch maximal erreichbarer Gesamtaktivität definiert werden (Gl. 5-16). Sie gibt Auskunft über den Einfluß der Cofaktorkonzentration auf den Gesamtprozeß.

$$\text{Ausnutzung [\%]} = 100 \cdot \frac{A_{stat.}^{max}([C]_0)}{\lim_{[C]_0 \rightarrow \infty} (A_{stat.}^{max})} \quad (\text{Gl. 5-16})$$

Die oben hergeleiteten Beziehungen wurden zur Planung und Bewertung der Kopplung der Bioreduktion von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO** mit dem NADH-Recycling-System Formiat/Formiatdehydrogenase verwendet.

5.8.2 Bioreduktion von **TsCHO** mit gekoppeltem NADH-Recycling im analytischen Maßstab

Die Versuche im analytischen Maßstab wurden zur Klärung folgender Fragen durchgeführt:

- Eignet sich das Formiat/FDH-System bei der Bioreduktion von **TsCHO** grundsätzlich für die NADH-Regenerierung?
- Liefert das unter 5.8.1 vorgestellte Modell während der stationären Phase der Reaktion korrekte Werte für die Gesamtaktivität?
- Lassen sich nach Abreaktion des D-Substrates durch Racemisierung von **TsCHO** Umsätze über 50 % erzielen?

Das gekoppelte System wurde bei einer Anfangs-NAD-Konzentration von 100 μM und pH 8.0 getestet. Dies bot sich wegen der vergleichsweise schnellen Racemisierung des Substrates **TsCHO** (vgl. Abschnitt 5.5.3) und wegen der relativ hohen Aktivität der FDH (vgl. Abschnitt 5.7.4.1) bei diesem pH-Wert an. Zur Abschätzung eines geeigneten Verhältnisses der einzusetzenden Enzyme HLADH und FDH wurde das in Abschnitt 5.8.1 beschriebene Modell herangezogen. Die verwendeten Enzymparameter und die daraus errechneten Daten sind in Tabelle 5.8-1 zusammengefasst.

Tabelle 5.8-1: Berechnung relevanter Reaktions-Parameter bei der Bioreduktion von *N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd TsCHO* mit der Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber und gekoppeltem NADH-Recycling im analytischen Maßstab bei pH 8.0 (vgl. Abschnitt 5.8.1).

Ausgangsdaten ¹⁾	Berechnete Parameter ²⁾
A ₁ [U/mg] : 5.3	[C] _{stat.} / [C] ₀ : 20.7 %
K _M ¹ [μM] : 81	α _{max} = m _E ¹ / m _E ² : 14.8 % / 85.2 %
A ₂ [U/mg] : 0.4	A _{stat.} ^{max} [U/mg] : 0.16
K _M ² [μM] : 90	lim(A _{stat.} ^{max}) [U/mg] : 0.37
[C] ₀ [μM] : 100	Ausnutzung : 43 %
1) A ₁ : Max. sp. Aktivität der HLADH [U/mg] K _M ¹ : MM-Konstante der HLADH bzgl. NADH (vgl. Tabelle 5.7-1) A ₂ : Max. spez. Aktivität der FDH [U/mg] K _M ² : MM-Konstante der FDH bzgl. NAD (Produktinformation) [C] ₀ : Cofaktor-Gesamtkonzentration	2) [C] _{stat.} / [C] ₀ : NADH-Anteil im stat. Zustand α _{max} : Optimales Enzymverhältnis (HLADH / FDH) A _{stat.} ^{max} : Aktivität im stat. Zustand bei optimalem Enzymverhältnis lim(A _{stat.} ^{max}) : bei unendlich hoher Cofaktorkonzentration theoretisch erreichbare Aktivität Ausnutzung: siehe (Gl. 5-16)

Die Reaktionen wurden wie in Abschnitt 4.10.2.4.3 beschrieben bei 3 verschiedenen Enzymverhältnissen im Bereich des errechneten Optimalverhältnisses angesetzt. Die Ergebnisse der Umsetzungen sind in Tabelle 5.8-2 zusammengefaßt.

Tabelle 5.8-2: Resultate der Bioreduktion von *N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd TsCHO* mit der Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber (HLADH) und gekoppeltem NADH-Recycling mit der Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* (FDH). Die Umsetzungen wurden im analytischen Maßstab bei pH 8.0 und einer Enzym-Gesamtkonzentration von M_E = 10 mg/l sowie einer Cofaktorkonzentration von [C]₀ = 100 μM durchgeführt.

HLADH : FDH α = m _E ¹ / m _E ²	Aktivität im stationären Zustand A _{stat.} [U/mg]	Ausbeute an D-TsOH nach 48 h [%]	TTN
5 : 95	0.159	53	5
15 : 85	0.237	58	6
25 : 75	0.239	56	6

Es zeigte sich, daß ein NADH-Recycling bei der Bioreduktion von **TsCHO** mittels des Formiat/Formiatdehydrogenase-Systems möglich war, die gemessenen Aktivitäten lagen im Bereich der erwarteten Werte. Ein Vergleich der gemessenen Werte mit dem berechneten Verlauf ist in Abbildung 5.8-3 dargestellt. In allen Fällen wurden durch die *in-situ*-Racemisierung von **TsCHO** Umsätze von mehr als 50 % erreicht. Nach einer Reaktionszeit von ca. 24 h konnte jedoch keine weitere Produktbildung

mehr gemessen werden, es wurde lediglich noch der chemische Zerfall des Substrates **TsCHO** verzeichnet (vgl. Abschnitt 5.5.2). Ob die Reaktion durch den Zerfall des Cofaktors NAD (bzw. NADH) zum Stillstand kam, oder auf Grund einer Inaktivierung der HLADH bzw. der FDH, konnte nicht festgestellt werden.

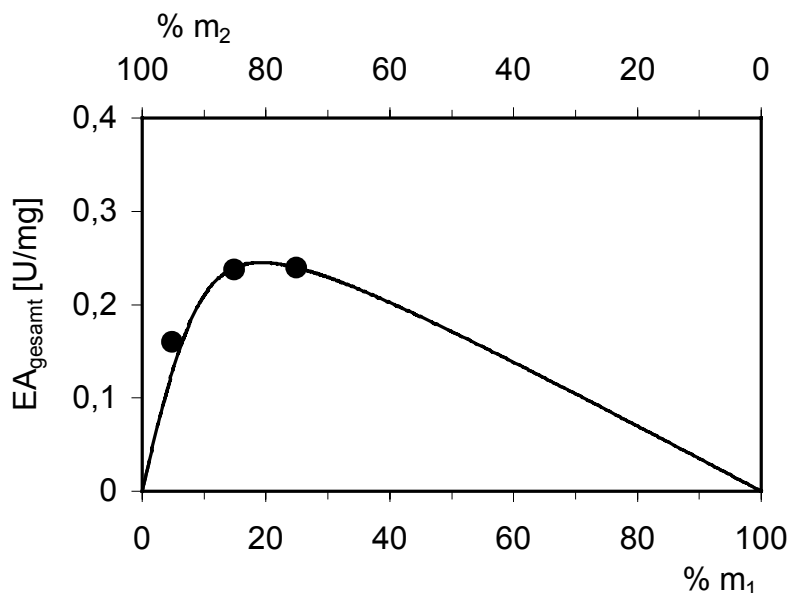


Abbildung 5.8-3: Gemessene spezifische Gesamt-Enzymaktivitäten EA_{gesamt} (●) bei der Bioreduktion von *N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd* **TsCHO** (1 mM) mit gekoppeltem NADH-Recycling in Abhängigkeit des Enzymverhältnisses ($HLADH : FDH = m^1_E : m^2_E$) und berechneter Verlauf (vgl. Abschnitt 5.8.1). Zur Berechnung wurden die in Tabelle 5.8-1 aufgeführten Enzym-Parameter verwendet, lediglich die spezifische Aktivität der FDH wurde zu einer maximalen spezifischen Aktivität von $A_2 = 0.61 \text{ U/mg}$ angepaßt.

5.8.3 Versuche zur Erhöhung der TTN

Angesichts der TTN in Tabelle 5.8-2 war das Konzentrationsverhältnis zwischen dem Substrat **TsCHO** (1 mM) und dem Cofaktor NAD(NADH) (0.1 mM) in den oben beschriebenen Versuchen noch steigerungsfähig. Daher wurden, wie in Abschnitt 4.10.2.5.3 beschrieben, Umsetzungen mit erhöhter Substrat- bzw. erniedrigter Cofaktorkonzentration durchgeführt. Außerdem wurde eine Umsetzung bei pH 7.0 getestet. **TsCHO** erwies sich bei diesem pH-Wert als stabiler, das Verhältnis zwischen Racemisierung und Zersetzung der Verbindung war günstiger (vgl. Abschnitt 6.4.3) und die beteiligten Enzyme zeigten ausreichende Aktivitäten (vgl. Abschnitt 5.7.1 und 5.7.4.1). Allerdings war auf Grund der bei pH 7 langsameren Racemisierung von **TsCHO** (vgl. Abschnitt 5.5.3) mit längeren Reaktionszeiten zu rechnen.

Die Reaktionsverläufe wurde hier nicht im Detail verfolgt, vielmehr war die erreichte Produktkonzentration von Interesse, nachdem die Reaktion zum Stillstand gekommen war (vgl. voriger Abschnitt). Die ermittelten Resultate der Umsetzungen sind in Tabelle 5.8-3 zusammengefaßt.

Tabelle 5.8-3: Versuche zur Erhöhung der TTN bei der Bioreduktion von *N-p-Toluolsulfonyl*pipecolinaldehyd **TsCHO** mit gekoppeltem NADH-Recycling. Die Umsetzungen wurden nach einer Inkubationszeit von 67 h abgebrochen, da keine Produktbildung mehr zu verzeichnen war.

Ansatz	pH-Wert	c_{TsCHO} [mM]	c_{NAD} [μM] ¹⁾	$Y_{\text{D-TsOH}}$ [%] ²⁾	TTN
1	8.0	1	100	52	5
2	8.0	2	100	47	10
3	8.0	1	10	45	45
4	7.0	1	100	53	5

¹⁾ Eingesetzte Konzentration an NAD, entspricht C_0 (vgl. Abschnitt 5.8.1).

²⁾ Produktausbeute.

Grundsätzlich war eine Erhöhung der TTN möglich, die erreichbaren Produktausbeuten sanken aber wegen der längeren Reaktionszeiten und des Zerfalls der Cofaktoren und/oder Enzyme auf unter 50 %. Dagegen wurde bei der Umsetzung bei pH 7 trotz einer längeren Reaktionszeit keine geringere Produktausbeute erzielt, als bei der vergleichbaren Umsetzung bei pH 8.

Das Produkt von Umsetzung 1 wurde isoliert und mittels Chiral-HPLC untersucht. Es erwies sich als enantiomerenreines **D-TsOH**. Somit konnte sichergestellt werden, daß die HLADH auch in Gegenwart des Formiat/FDH-Recyclingsystems enantiospezifisch arbeitete.

5.9 Bioreduktion von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO** mit gekoppeltem NADH-Recycling in präparativem Maßstab

Die Durchführung der präparativen Darstellung von enantiomerenreinem D-**TsCHO** ist in Abschnitt 4.11.2 beschrieben. Zur Berechnung des optimalen Verhältnisses der Enzyme HLADH und FDH und der zu erwartenden Gesamtaktivität des Zwei-Enzym-Systems wurde das in Abschnitt 5.8.1 vorgestellte Verfahren angewandt. Die verwendeten Enzymparameter und die daraus errechneten Daten sind in Tabelle 5.9-1 zusammengefasst.

Tabelle 5.9-1: Berechnung relevanter Reaktions-Parameter bei der Bioreduktion von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO** mit gekoppeltem NADH-Recycling im präparativen Maßstab bei pH 7.0 (vgl. Abschnitt 5.8.1).

Ausgangsdaten ¹⁾	Berechnete Parameter ²⁾
A_1 [U/mg] : 6.4 K_M^1 [μ M] : 86 A_2 [U/mg] : 0.33 K_M^2 [μ M] : 62 $[C]_0$ [μ M] : 100	$[C]_{\text{stat.}} / [C]_0$: 21.1 % $\alpha_{\text{max}} = m_E^1 / m_E^2$: 12.8 % / 87.2 % $A_{\text{stat.}}^{\text{max}}$ [U/mg] : 0.16 $\text{lim}(A_{\text{stat.}}^{\text{max}})$ [U/mg] : 0.31 Ausnutzung : 51 %
¹⁾ A_1 : Max. sp. Aktivität der HLADH [U/mg] K_M^1 : MM-Konstante der HLADH bzgl. NADH (vgl. Tabelle 5.7-1) A_2 : Max. spez. Aktivität der FDH [U/mg] K_M^2 : MM-Konstante der FDH bzgl. NAD (vgl. Tabelle 5.7-2) $[C]_0$: Cofaktor-Gesamtkonzentration	²⁾ $[C]_{\text{stat.}} / [C]_0$: NADH-Anteil im stat. Zustand α_{max} : Optimales Enzymverhältnis (HLADH / FDH) $A_{\text{stat.}}^{\text{max}}$: Aktivität im stat. Zustand bei optimalem Enzymverhältnis $\text{lim}(A_{\text{stat.}}^{\text{max}})$: bei unendlich hoher Cofaktorkonzentration theoretisch erreichbare Aktivität Ausnutzung: siehe (Gl. 5-16)

Der Verlauf der Umsetzung wurde im Reaktionszeitraum von 142 h per Chiral-GC verfolgt, der Verlauf der Reaktion ist in Abbildung 5.9-1 grafisch dargestellt. Durch den zweimaligen Zusatz der Enzyme HLADH und FDH, sowie des Cofaktors NAD konnte deren Inaktivierung während der langen Reaktionsdauer ausgeglichen werden und somit die Ausbeute an D-**TsOH** gegenüber den Umsetzungen im analytischen Maßstab (vgl. Tabelle 5.8-3, Ansatz 4) deutlich von 53 auf 76 % gesteigert werden. Durch die *in-situ*-Racemisierung von **TsCHO** während der enzymatischen Reduktion wurden 52 % des L-**TsCHO** in D-**TsOH** umgewandelt. Beim Abbruch der Reaktion lagen noch ca. 8 % nicht abreagiertes L-**TsCHO** vor.

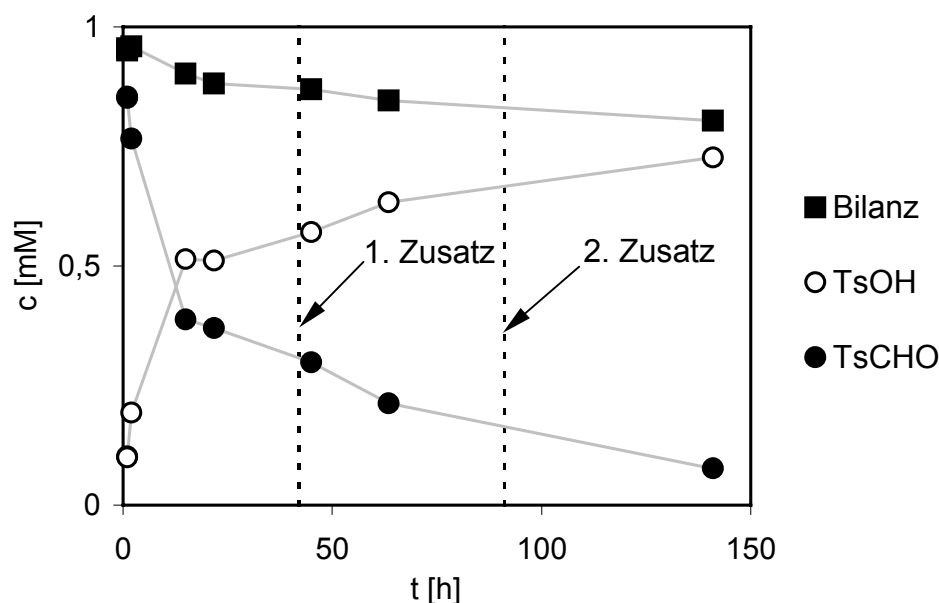


Abbildung 5.9-1: Verlauf der Bioreduktion von *N-p*-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO** mit gekoppeltem NADH-Recycling im präparativen Maßstab. Mit "1. Zusatz" und "2. Zusatz" sind die Zeitpunkte markiert, zu denen die Enzyme HLADH und FDH, sowie der Cofaktor NAD supplementiert wurden.

Weiterhin wurde eine enzymatische Gesamtaktivität von 0.16 U/mg_(HLADH + FDH) gemessen, was exakt dem vorausgerechneten Wert entspricht (vgl. Tabelle 5.9-1). Nach Isolierung und Aufreinigung konnten 236 mg (73 %) enantiomerenreines **D-TsOH** gewonnen werden: Smp. 49-51 °C, $[\alpha]_D^{25} = +35.4$ (*c* 0.144, CHCl₃), *ee* > 99.5 % (Chiral-HPLC). Elementaranalyse: C, 57.97; H, 7.15; N, 5.10 (Berechnet für C₁₃H₁₉NO₃S: C, 57.97; H, 7.11; N, 5.20). ¹H-NMR (250.1 MHz, CDCl₃): δ = 1.19-1.62 (m, 6H, CH₂), 2.12 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, OH), 2.43 (s, 3H, Ts-CH₃), 3.20 (dt, *J* = 12.4, 2.5 Hz, 1H, 6-H_{ax}), 3.56 (ddd, *J* = 11.2, 7.3, 5.6 Hz, 1H, 6-H_{eq}), 3.77-3.90 (m, 2H, CH₂OH), 3.99-4.04 (m, 1H, 2-H), 7.30 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, Ts-H_A), 7.75 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ts-H_B). ¹³C-NMR (62.9 MHz, CDCl₃): δ = 19.2 (CH₂), 21.5 (CH₃); 24.2, 24.8, 41.4 (alle CH₂); 54.7 (CH); 60.7 (CH₂), 127.0, 129.8 (*o,m*-CH), 138.1, 143.3 (*i,p*-C). Die NMR-Daten stimmen mit in der Literatur berichteten überein (Knight et al., 1998).

Eine Übersicht über den durchgeführten Gesamtprozesses zur Herstellung von *N-p*-Toluolsulfonyl-*D*-pipecolinalkohol **D-TsOH** durch Bioreduktion gibt Abbildung 5.9-2.

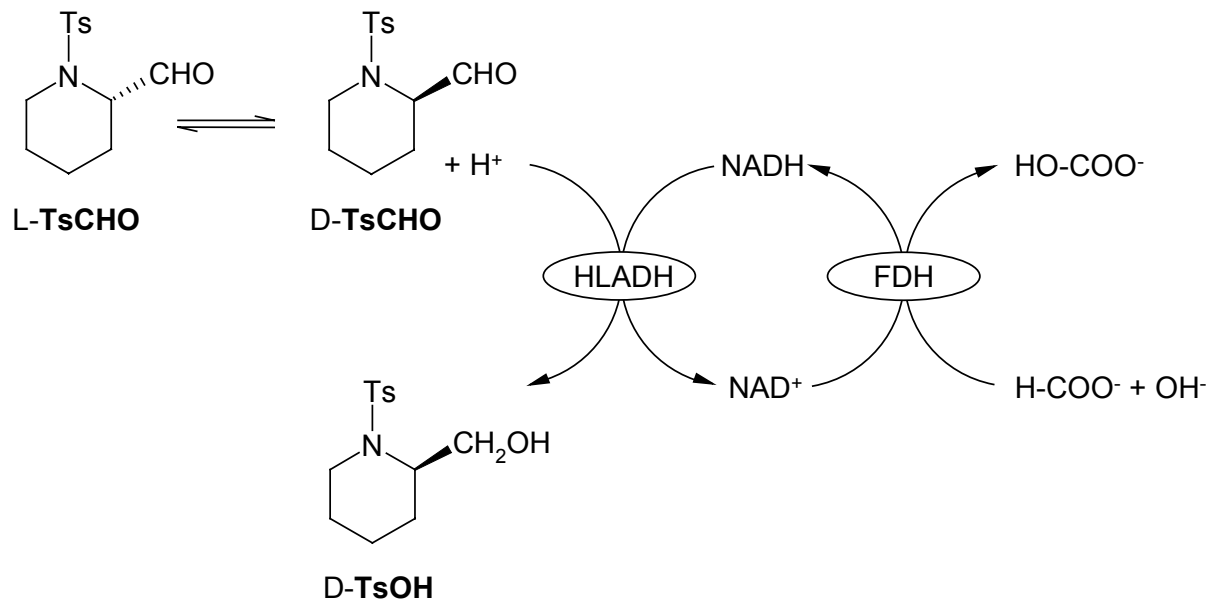


Abbildung 5.9-2: Schematische Darstellung des durchgeführten Gesamtprozesses zur Herstellung von *N*-*p*-Toluolsulfonyl-*D*-pipecolinol *D*-TsOH durch Bioreduktion. HLADH: Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber, FDH: Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii*.

5.10 Untersuchungen zur enzymatischen Oxidation von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO** mit der Aldehyddehydrogenase aus *Saccharomyces cerevisiae*

Neben der Reduktion des Aldehyds **TsCHO** mit Alkoholdehydrogenasen wurde auch die Möglichkeit von dessen Biooxidation zu N-p-Toluolsulfonylpipecolinsäure **TsCOOH** untersucht. Dazu wurden photometrische Aktivitätstests unter verschiedenen Reaktionsbedingungen mit Acetaldehyd als Standard-Substrat (vgl. Abschnitt 4.3.2.1.4) sowie mit **TsCHO** als Substrat (vgl. Abschnitt 4.10.2.2) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Tests sind in Tabelle 5.10-1 zusammengefaßt. Diesen Tests zufolge schien für die Oxidation von **TsCHO** eine - wenn auch geringe - Aktivität der AldDH vorzuliegen.

Tabelle 5.10-1: Aktivität der Aldehyddehydrogenase aus *Saccharomyces cerevisiae* (AldDH) unter verschiedenen Reaktionsbedingungen

Umsetzungsbedingungen	Spezifische Aktivität der AldDH [U/mg]
Standardaktivität ¹⁾	0.41
Standardaktivität bei Anwesenheit von 1 % (v/v) Methanol	0.47
Umsetzung von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd TsCHO ²⁾	0.004 ³⁾
¹⁾ Aktivität mit Acetaldehyd als Substrat bei pH 8.0 und 25 °C. ²⁾ Bei Anwesenheit von 1 % (v/v) Methanol. ³⁾ Scheinbare Aktivität der Oxidation von TsCHO .	

Es sollte nun eine Methode zur Untersuchung des vermuteten Reaktionsproduktes **TsCOOH** auf sein Enantiomerenverhältnis erarbeitet werden. Bei der Entwicklung einer solchen Methode wurde dann aber überraschenderweise festgestellt, daß sich in der Reaktionsmischung einer "Biooxidation" von **TsCHO** mit der AldDH weder per HPLC noch per DC **TsCOOH** nachweisen ließ.

Daraufhin wurden weitere Photometertests durchgeführt und es konnte gezeigt werden, daß nur in Gegenwart von **TsCHO** die schon zuvor beobachtete Extinktionszunahme auftrat. Eine Langzeitreaktion über 70 h mit einer großen Menge Enzym (vgl. Abschnitt 4.10.2.3.3) konnte aber ebenfalls kein **TsCOOH** aus **TsCHO** erzeugen. Im organischen Extrakt der Reaktion war das Produkt per DC nicht nachzuweisen, während sehr geringe Mengen **TsCOOH**, die der Reaktionsmischung zugesetzt wurden, problemlos wiedergefunden werden konnten. Auch kein anderes UV-aktives Reaktionsprodukt war im Dünnschicht-Chromatogramm sichtbar.

Da die photometrisch gemessene Aktivität unbekannter Art sehr gering war, wurde deren Aufklärung nicht weiter nachgegangen. Außerdem boten Reduktionsreaktionen von **TsCHO** mit Alkoholdehydrogenasen erheblich vielversprechendere Ansatzpunkte.

6 Diskussion

6.1 Hydrolyse von *N-tert*-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester **BC-E**

Hydrolasen (Esterasen, Lipasen und Proteasen) sind die am meisten verwendeten Enzyme in der organischen Synthese (Faber, 1997; Theil, 1997; Drauz und Waldmann, 1995). Ein besonderer Vorteil hydrolytischer Reaktionen gegenüber den später in Abschnitt 6.5.1 diskutierten enzymatischen Reduktionen ist dabei, daß keine Coenzyme gebraucht werden und dementsprechend keine Coenzymregenerierung notwendig ist.

Ein weiterer Vorteil dieser Biokatalysatoren, vor allem der Lipasen, liegt in ihrem breiten Substratspektrum und ihrer hohen Stabilität, die auch Reaktionen unter Beteiligung organischer Lösungsmittel ermöglicht.

In einer vorangegangenen Arbeit wurde bereits ein Enzym-Screening auf die Hydrolyse von **BC-E** durchgeführt und die Reaktion mit dem aussichtsreichsten Enzym, einer Lipase aus *Candida antarctica*, teilweise charakterisiert (Vielhauer, 1997).

Diese Reaktion wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit für eine Verwendbarkeit im präparativem Maßstab optimiert und zur Darstellung von enantiomerenreinem **BC-E** und **BC-S** angewandt.

6.1.1 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Durch die Optimierung der Reaktionsbedingungen einer enzymatischen Reaktion lassen sich Aktivität und Enantioselektivität des Biokatalysators in der Regel weiter steigern. Im Rahmen dieser Arbeit wurden vor allem der Einfluß des als Cosolvens verwendeten organischen Lösungsmittels und des pH-Werts systematisch untersucht. Weiterhin wurden Einflüsse wie die Substratkonzentration in der organischen Phase, das Verhältniss der wäßrigen zur organischen Phase und der Zusatz einer oberflächenaktiven Substanz getestet.

Ein weiterer wichtiger Parameter bei enzymatischen Umsetzungen ist die Reaktionstemperatur. Obwohl einige Arbeiten zum Einfluß der Reaktionstemperatur auf die Enantioselektivität enzymatischer Umsetzungen publiziert wurden (Lam et al., 1986; Boutelje et al., 1988; Barton et al., 1990; Holmberg und Hult, 1991; Philips, 1996), sind kaum allgemein zutreffende Regeln erkennbar. Allerdings ist das auf Enzym-Reaktionen anwendbare Temperatur-Spektrum eng begrenzt und innerhalb desselben waren die beobachteten Effekte durchweg so gering, daß sie präparativ nur von geringer Bedeutung sind.

Weiterhin zeigen die Aktivität und die Stabilität von Enzymen im Gegensatz zur Enantioselektivität in der Regel eine sehr erhebliche Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur, und ein Abweichen vom Temperaturoptimum eines Enzyms bringt somit deutliche Nachteile bzgl. der Reaktionsgeschwindigkeit mit sich.

Aus diesen Gründen wurde auf eine Optimierung der Reaktionstemperatur verzichtet.

6.1.1.1 Einfluß des Lösungsmittels

Für Lipasen können drei Arten von Lösungsmittelsystemen eingesetzt werden (Chen und Sih, 1989):

- Ein System aus einer wäßrigen Phase und einem wassermischbaren, organischen Lösungsmittel als Lösungsvermittler
- Ein wasserfreies Lösungsmittel (< 1 % Wasser)
- Ein Zweiphasensystem aus einer wäßrigen Phase und einem nicht mischbaren Lösungsmittel

Die verschiedenen Systeme sind allesamt gut untersucht und die Ergebnisse dieser Arbeiten sind in verschiedenen Übersichtsartikeln zusammengefaßt (z.B. Laane, 1987; Lilly et al., 1987; Adlercreutz und Mattiasson, 1987; Halling 1994; Bell et al., 1995; Ballesteros et al., 1995). Einige Vorteile der Verwendung von organischen Lösungsmitteln bei enzymatischen Reaktionen seien hier kurz angeführt:

- Effiziente Katalyse bei schlecht wasserlöslichen Substraten möglich
- Höhere Selektivität des Biokatalysators erreichbar
- Unerwünschte Nebenreaktionen, Substrat- und Produktinhibition können verringert werden
- Produktabtrennung und Abtrennung des Biokatalysators können vereinfacht sein
- Hydrolytische Enzymreaktionen können in Richtung Synthese gelenkt werden
- Enzyme können in wasserfreien organischen Lösungsmitteln stabiler sein

Die ersten vier Punkte waren auch bei der hier untersuchten enantioselektiven Hydrolyse von **BC-E** im Zweiphasensystem von Vorteil.

6.1.1.1.1 Einfluß auf die Aktivität

Das im Arbeitsgebiet der Biotransformationen populäre, von Laane und Mitarbeitern entwickelte Log P-Konzept (Laane, 1987; Laane et al., 1987a) geht von der Vorstellung aus, daß jeder Biokatalysator eine dünne, für die Funktion essentielle Wasserschicht als unmittelbare Umgebung benötigt ("essential water layer"). Polare organische Lösungsmittel mit niedrigen Log P-Werten (vgl. Abschnitt 5.1.2.1) entziehen dem Enzym auf Grund ihrer Hydrophilie dieses Wasser, während sehr unpolare Lösungsmittel mit hohen Log P-Werten auf Grund ihrer Hydrophobizität die Schicht sogar stabilisieren können. An mehreren Beispielen konnte gezeigt werden, daß bei einem Lösungsmittel mit einem Log P < 2 die Aktivität von Enzymen in der Regel stark erniedrigt ist. Bei einem Log P zwischen 2 und 4 steigt die Aktivität an, bei sehr unpolaren Lösungsmitteln (Log P > 4) bleibt sie auf hohem Niveau konstant. In Abbildung 6.1-1 ist der von Laane allgemein postulierte Verlauf der Aktivität über dem Log P-Wert als Kurve dargestellt (Laane, 1987). Zum Vergleich sind die im Rahmen dieser Arbeit im Zweiphasensystem gefundenen Ergebnisse bei der Hydrolyse von **BC-E** eingetragen.

Die experimentellen Daten bestätigen grundsätzlich das entsprechend dem Log P-Konzept vorhergesagte Verhalten. Die gemessenen Aktivitäten sind allerdings noch besser mit Polaritätsdaten aus der E_T^N -Skala korrelierbar (Reichardt, 1994; vgl. Abbildung 5.1-3).

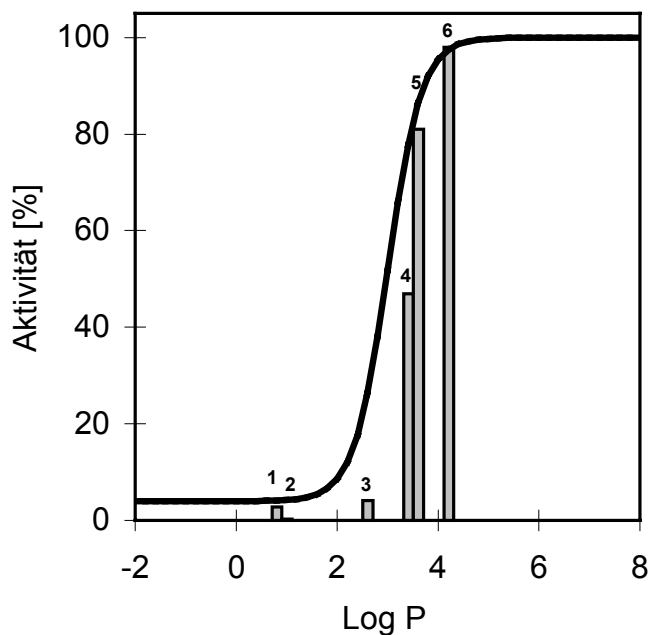


Abbildung 6.1-1: Zusammenhang zwischen der Polarität des Lösungsmittels (Log P) und der Aktivität. Die Balken zeigen die Aktivität der Lipase aus *Candida antarctica B* für die Hydrolyse von *N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester **BC-E** mit Verwendung verschiedener Cosolventien: Diethylether (1), 2-Pentanon (2), Toluol (3), 1-Hexen (4), Cyclohexan (5) und *n*-Hexan (6). Die durchgezogene Linie repräsentiert den allgemein postulierten Verlauf nach Laane (Laane, 1987).

Da im Zweiphasensystem gearbeitet wurde und das Enzym in der wässrigen Phase vorlag, kann im vorliegenden Fall nicht die Beeinträchtigung oder Stabilisierung einer "essential water layer" die Ursache für die Unterschiede in der Aktivität sein. Vielmehr beeinflusst die Lösungsmittelpolarität die Verfügbarkeit des Substrates in der wässrigen Phase - oder an der Phasengrenzfläche. Außerdem nimmt mit steigender Polarität der Gehalt an gelöstem organischem Lösungsmittel in der wässrigen Phase zu, was ebenfalls die Aktivität des Enzyms beeinträchtigen kann.

6.1.1.1.2 Einfluß auf die Enantioselektivität

Die Abhängigkeit der Enantioselektivität einer enzymkatalysierten Reaktion von der Art des verwendeten Lösungsmittels ist Gegenstand zahlreicher Veröffentlichungen (z.B. Ueji, 1992; Bornscheuer et al., 1993). Bislang konnte allerdings keine einheitliche Korrelation zwischen Lösungsmittel-Parametern und Enantioselektivität einer Lipase-katalysierten Reaktion gezeigt werden.

Am Beispiel der von γ -Chymotrypsin katalysierten Umesterung von 3-Hydroxy-2-phenylpropionsäuremethylester konnte gezeigt werden, daß ein wesentlicher Einfluß des Lösungsmittels auf die Enantioselektivität einer Reaktion in den Wechselwirkungen mit dem Substrat liegt (Wescott et al., 1996). Die Autoren konnten nachweisen, daß die Desolvatationsenergie, die für den Übergang des Substrates von der organischen Phase ins aktive Zentrum des Enzyms aufgebracht werden muß, für die beiden Enantiomere unterschiedlich sein kann. Der Unterschied in diesen Aktivierungsenergien trägt zum großen Teil zur Diskriminierung eines

Enantiomers bei. Da der Ansatz von Wescott et al. keine speziellen Anforderungen an Art oder Struktur des Enzyms stellt, ist er prinzipiell auch auf andere Enzymklassen wie Lipasen übertragbar.

In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls der Einfluß des Lösungsmittels auf die Enantioselektivität der Hydrolyse von von N-*tert*-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester **BC-E** untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.1-1 und Abbildung 5.1-2 (siehe Abschnitt 5.1.2.1) zusammengefaßt.

Dabei fällt auf, daß die Art des verwendeten Lösungsmittels kaum einen Einfluß auf die Enantioselektivität der CAL B hatte. Ein derart geringer Einfluß ist durchaus ungewöhnlich. In Anbetracht der Ergebnisse von Wescott und Mitautoren (Wescott et al., 1996) würde dies bedeuten, daß der Unterschied zwischen den Desolvatationsenergien der beiden Enantiomere für alle verwendeten Lösungsmittel gleich ist. Dies erscheint aber eher unwahrscheinlich. Vielmehr scheint die eigentliche Reaktion in der wäßrigen Phase des untersuchten Zweiphasensystems stattzufinden. Die wäßrige Phase wird durch die Art des (nicht mit Wasser mischbaren) Lösungsmittels nur wenig beeinflusst. Insofern wären bei den Reaktionen in den jeweils sehr ähnlichen wäßrigen Phasen verschiedener Zweiphasensysteme auch keine deutlichen Unterschiede in der Enantioselektivität zu erwarten.

Für eine Reaktion in der wäßrigen Phase und nicht direkt an der Phasengrenzfläche spricht auch der Einfluß der Lösungsmittelpolarität auf die Aktivität der Reaktion (vgl. voriger Abschnitt). Schließlich wurden die höchsten Aktivitäten in einphasigen, wäßrigen Systemen erzielt (vgl. Tabelle 5.1-2, Eintrag 1). Die Lipase aus *Candida antarctica* B benötigte demnach offensichtlich keine Grenzflächenaktivierung.

Ein derartiges Verhalten wurde für das Enzym schon mehrfach beschrieben (Pozo und Gotor, 1993; Kierkels und Peters, 1994; Martinelle et al., 1995) und ist angesichts der Struktur des Enzyms auch verständlich (Uppenberg et al., 1994 und 1995). Der für eine Grenzflächenaktivierung verantwortliche und für viele Lipasen charakteristische "Deckel" (Lid) fehlt hier. Stattdessen umgibt eine fast flache, hydrophobe Region die Öffnung zum aktiven Zentrum. Dort sitzt das aktive Serin 105 am Grund einer engen, tiefen Tasche. Eine Visualisierung der Verhältnisse und einen Vergleich zu der "typischen" Lipase aus *Candida rugosa* (Grochulski et al., 1993) zeigt Abbildung 6.1-2.

Die CAL B akzeptiert auf Grund dieser strukturellen Gegebenheiten außergewöhnlich viele, auch "Lipase-untypische" Substrate und zeigt trotzdem in den meisten Fällen gute Enantioselektivitäten (Anderson et al., 1998). Sie wird daher auch als Übergangsform zwischen Lipasen und Esterasen angesehen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der Einfluß des im Zweiphasensystem verwendeten Lösungsmittels im untersuchten Fall wohl hauptsächlich bei der Verfügbarkeit des Substrates in der wäßrigen Phase liegt. Dies hat erhebliche Auswirkungen auf die Aktivität, aber nur geringe auf die Enantioselektivität der Reaktion.

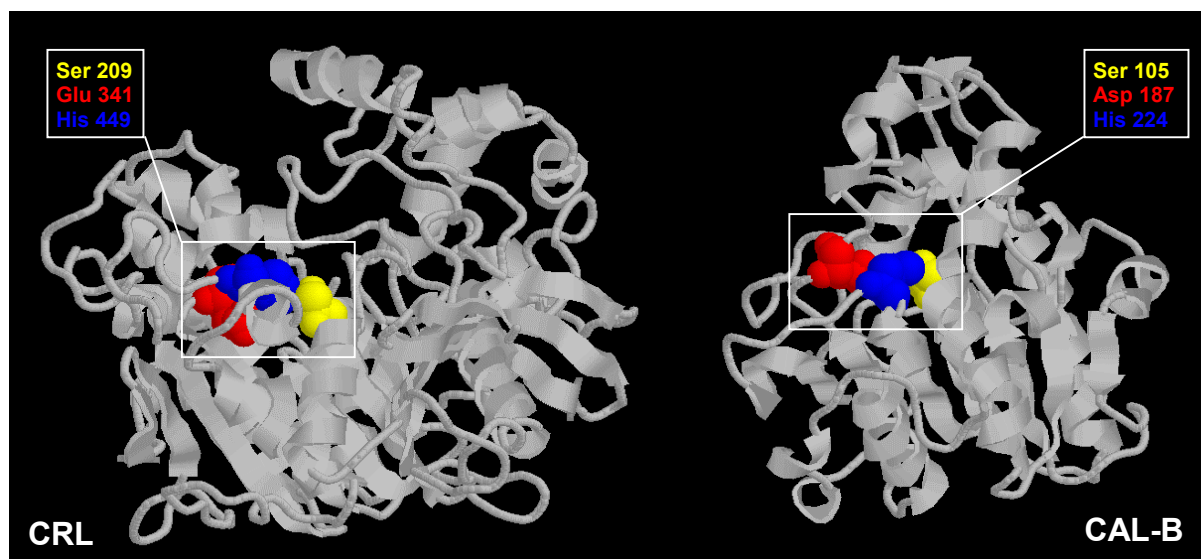


Abbildung 6.1-2: Vergleich der dreidimensionalen Strukturen der Lipasen aus *Candida rugosa* (CRL, nach Grochulski et al., 1993) und aus *Candida antarctica B* (CAL B, nach Uppenberg et al., 1994). Die Aminosäuren der katalytischen Triade im aktiven Zentrum der Enzyme sind farblich markiert. Der "Lid" der CRL ist deutlich erkennbar.

6.1.1.2 Einfluß des pH-Wertes

Eine Änderung des pH-Werts der wässrigen Phase des Reaktionssystems kann zur Protonierung bzw. Deprotonierung von sauren oder basischen Aminosäureresten führen und es kann dadurch auch zu strukturellen Veränderungen des Enzyms und seiner Hydrathülle kommen.

Ein charakteristisches pH-Optimum bezüglich der Aktivität konnte beim untersuchten System zwischen pH 5 und pH 8 nicht festgestellt werden (vgl. Abschnitt 5.1.2.2). Lediglich ein schwacher Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit bei Erhöhung des pH-Wertes war zu verzeichnen. Dies kann auf eine Aktivierung des Nucleophils im aktiven Zentrum der Lipase zurückgeführt werden. Allerdings ist für andere durch die CAL B katalysierte Reaktionen durchaus ein pH-Optimum in der Nähe des Neutralpunktes gemessen worden (Anderson et al., 1998).

Der Einfluß des pH-Werts auf die Aktivität der verschiedensten Enzyme ist eine allgemein bekannte Tatsache. Der Einfluß auf die Enantioselektivität ist dagegen ein erstaunlich wenig untersuchtes Phänomen. Einige Ergebnisse bei Reaktionen mit Hydrolasen sind jedoch publiziert worden. Eine Übersicht ist in Tabelle 6.1-1 zusammengestellt. Dabei fällt auf, daß in allen Beispielen die Enantioselektivität mit steigendem pH-Wert abnahm und kein Optimum oberhalb des Neutralpunktes beobachtet wurde.

In der vorliegenden Arbeit konnte der E-Wert der Hydrolyse von *N-tert*-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester **BC-E** mit der Lipase aus *Candida antarctica B* ebenfalls durch Absenken des pH-Wertes deutlich gesteigert werden (vgl. Abschnitt 5.1.2.2). Dabei war von Vorteil, daß die Aktivität des Enzyms nicht wesentlich davon beeinträchtigt wurde.

Tabelle 6.1-1: Beispiele für den Einfluß des pH-Wertes auf die Enantioselektivität von Hydrolase-katalysierten Reaktionen.

Substrat	Enzym	Untersuchter pH-Bereich	Effekt	Literatur
<i>meso-cis</i> -N-Benzyl-2,5-bismethoxy-carbonylpyrrolidin	Esterase aus Schweineleber	7.5 → 8.0	E ¹⁾ = 1.4, nimmt ab	Boutelje et al., 1988
(R,S)-2-(4-Hydroxyphenoxy)-propion-säuremethylester	Lipase aus <i>Candida rugosa</i>	3.0 → 9.0	E = 33 → E = 3, Optimum bei pH 4.0 (E = 48)	Barton et al., 1990
<i>meso-cis</i> -1,4-Di-acetoxy-2,3-epoxybutan	Lipase aus Schweinepankreas	6.0 → 7.5	E = 5.3 → E = 3.3, Optimum bei pH 6.5 (E = 8.1)	Grandjean et al., 1991
(R,S)-4-Acetoxy-[2.2]paracyclophan	Lipase aus <i>Candida rugosa</i>	5.5 → 8.0	E = 39 → E = 14, Optimum bei pH 7.0 (E > 100)	Pamperin et al., 1998 b
DL-5-Benzylhydantoin	Hydantoinase aus <i>Arthrobacter aurescens</i>	7.5 → 9.5	E = 4, kein meßbarer Einfluß des pH-Wertes	Waniek, 2000
(±)- BC-E	Lipase aus <i>Candida antarctica</i> B	5.0 → 8.0	E = 34 → E = 13, kein Optimum	Diese Arbeit

¹⁾ E-Wert für die Enantioselektivität nach Chen et al., 1982.

Neben dem oben erwähnten Hervorrufen von strukturellen Veränderungen eines Enzyms kann eine Änderung des pH-Wertes auch Einflüsse auf Substrat oder Produkt einer Biotransformation ausüben und damit zu Unterschieden in der Enantioselektivität führen. Im untersuchten Fall wird das Substrat **BC-E** im Bereich zwischen pH 5 und pH 8 nicht vom pH-Wert beeinflusst, wohl aber das Produkt **BC-S**. Der Dissoziationsgrad der Carbonsäure **BC-S** im wäßrigen Bestandteil des untersuchten Zweiphasensystems hängt selbstverständlich vom pH-Wert ab. Durch Titration konnte die Säurekonstante von **BC-S** zu

$$pK_S = 4.27$$

bestimmt werden. Extraktionsversuche mit Cyclohexan bei verschiedenen pH-Werten zeigten, daß die dissoziierte Form **[BC-S]** praktisch vollständig in der wäßrigen Phase verbleibt, während die undissoziierte Form **BC-S** zwischen wäßriger Phase (0.1 M Kaliumphosphatpuffer) und Cyclohexan in einem Verteilungsgleichgewicht vorliegt. Der Verteilungskoeffizient α wurde zu

$$\alpha = \frac{[BC-S]_{0.1 M \text{ Kaliumphosphat}}}{[BC-S]_{\text{Cyclohexan}}} = 0.31$$

bestimmt. Mittels pK_S und α lassen sich die Gleichgewichtskonzentrationen von **BC-S** und **[BC-S]** in den beiden Phasen des Reaktionssystems in Abhängigkeit des

pH-Wertes der wässrigen Phase berechnen. Die erhaltenen Verläufe sind in Abbildung 6.1-3 dargestellt. Es ist zu erkennen, daß die Konzentration an dissoziiertem **[BC-S]** in der wässrigen Phase mit sinkendem pH-Wert deutlich abnimmt. Derartige Veränderungen der Produktkonzentration können einen erheblichen Einfluß auf die beobachtbare Enantioselektivität einer enzymatischen Reaktion haben. So beobachteten Lundhaug et al. (1998) bei der Hydrolyse von racemischem 3-Chlor-1-phenylmethoxy-2-propylbutyrat mit der Lipase B aus *Candida antarctica* eine erhebliche Änderung der Enantioselektivität der Reaktion, wenn durch das Cosolvens Aceton die Löslichkeit des Produktalkohols erhöht wurde. Die Autoren konnten durch die Korrelation von Enantioselektivität und jeweiliger Löslichkeit des Produktes zeigen, daß dieser Effekt auf eine enantioselektive Produktinhibition zurückzuführen war.

Im hier untersuchten Fall korrelieren E-Wert und Produktkonzentration **[BC-S]** allerdings nicht entsprechend. Die gemessenen Enantioselektivitäten der Hydrolyse von **BC-E** (vgl. Abschnitt 5.1.2.2) sind zur Übersicht ebenfalls in Abbildung 6.1-3 eingetragen. Die ausgeprägteste Steigerung der Enantioselektivität ist zwischen pH 5.5 und pH 6.5 zu verzeichnen, während die Produktkonzentration erst zwischen pH 3.5 und pH 5.0 signifikant absinkt.

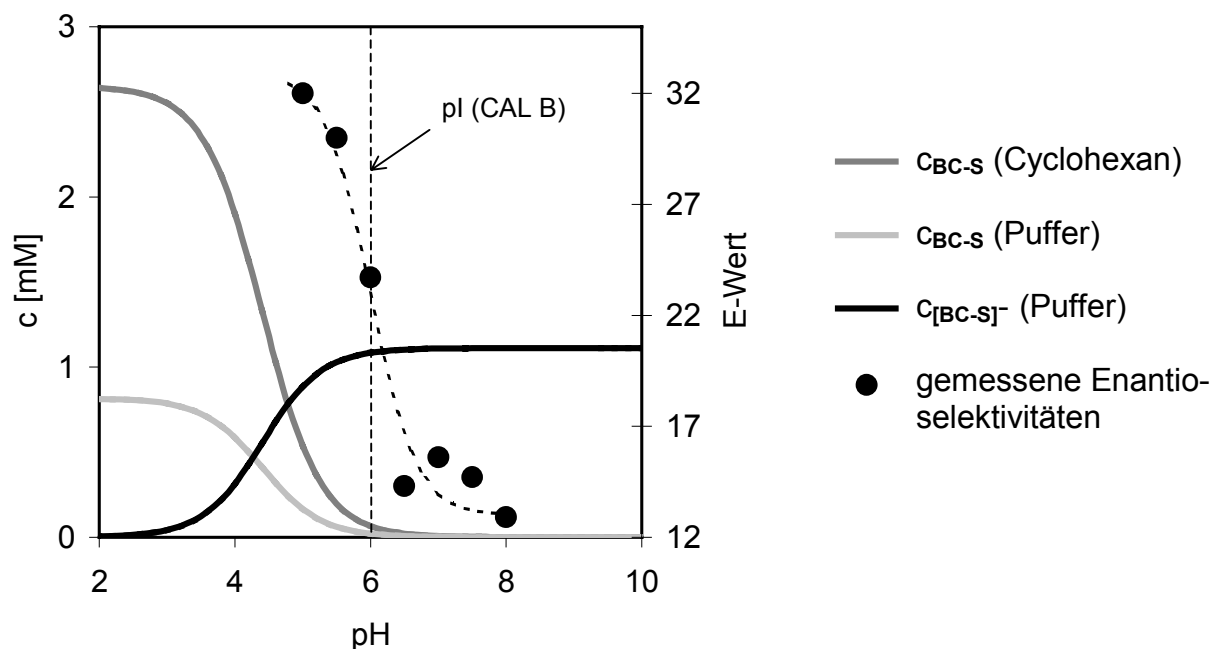


Abbildung 6.1-3: Berechnete Gleichgewichtskonzentrationen von *N*-tert-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäure **BC-S** in einem Zweiphasensystem aus 90 Vol-% 0.1 M Kaliumphosphatpuffer und 10 Vol.-% Cyclohexan in Abhängigkeit des pH-Wertes. Die geschlossenen Symbole (●) zeigen die gemessenen Enantioselektivitäten der Lipase aus *Candida antarctica* B für die Hydrolyse von *N*-tert-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester **BC-E** zu **BC-S** im entsprechenden Zweiphasensystem (vgl. Abschnitt 5.1.2.2).

Eine enantioselektive Produktinhibition ist allem Anschein nach also nicht der wesentliche Grund für die E-Wert-Zunahme zwischen pH 6.5 und pH 5.5. Dagegen

besitzt die CAL B einen isoelektrischen Punkt von $pI = 6.0$ (Anderson et al., 1998). D.h die Nettoladung des Enzyms kehrt sich genau bei dem pH-Wert um, bei dem auch der grösste Anstieg im E-Wert zu verzeichnen ist (vgl. Abbildung 6.1-3). Somit scheint die pH-Abhängigkeit der Enantioselektivität bei der Hydrolyse von **BC-E** im Einfluß der Protonenkonzentration auf die Konformation und Ladung des Enzyms und nicht im Einfluß auf das Substrat bzw. Produkt begründet zu sein.

6.1.1.3 Sonstige Einflüsse

Alle weiteren beobachteten Einflüsse auf Aktivität und Enantioselektivität der Hydrolyse von **BC-E** mit der Lipase aus *Candida antarctica* B folgten einer Tendenz: Veränderungen, die zu einer besseren Verfügbarkeit des Substrates in der wäßrigen Phase des Reaktionssystems führten, erhöhten die spezifische Enzymaktivität und beeinträchtigten die Enantioselektivität (vgl. Abschnitt 5.1.2.3). Dazu gehörten:

- Erhöhung der Substratkonzentration in der organischen Phase
- Reduktion des Volumens der wäßrigen Phase
- Stabilisierung der Emulsion durch eine oberflächenaktive Substanz

Die beobachtete Steigerung der Aktivität ist nicht überraschend. Die gemessene Beeinträchtigung der Enantioselektivität entspricht dagegen nicht dem erwarteten Verhalten, denn nach dem kinetischen Modell, welches für die Ermittlung der Enantioselektivität (E-Wert) zu Grunde gelegt wurde (Chen et al., 1982), spielt die Substratkonzentration hierfür keine Rolle. Es läßt sich einfach zeigen, daß dies auch für Zweiphasensysteme gilt, sofern keine Limitierung durch den Phasenübergang des Substrates vorliegt (Straathof und Jongejan, 1997). Davon kann ausgegangen werden, denn läge eine solche Limitierung vor, würden alle Maßnahmen wie die oben angeführten zu einem verbesserten Phasenübergang und zu einer Steigerung (bzw. Wiederherstellung) der Enantioselektivität führen. Es wurde ja aber das Gegenteil beobachtet.

Somit muß ein Effekt vorliegen, der nicht im verwendeten kinetischen Modell (vgl. Abschnitt 4.7) enthalten ist. Am wahrscheinlichsten scheint das Auftreten einer enantioselektiven Produktinhibition für die beobachtete Beeinträchtigung der Enantioselektivität verantwortlich zu sein (vgl. auch Guo und Sih, 1989 ; Lundhaug et al., 1998; Rakels et al., 1994). Die erhebliche pH-Abhängigkeit des E-Wertes hat zwar offensichtlich andere Ursachen (vgl. voriger Abschnitt), aber dennoch resultierte jede Reaktionsführung, die zu einer Erhöhung der Produktkonzentration in der wäßrigen Phase geführt hatte, in niedrigeren Enantioselektivitäten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden E-Werte überwiegend durch Vermessung der jeweiligen Reaktionen während ihres gesamten Verlaufs bestimmt (vgl. Abschnitt 4.7). Die angegebenen E-Werte sind somit "Mittelwerte" über die gesamte Reaktion. Bei Umsetzungen von **BC-E** unter verschiedensten Bedingungen schien sich bei geringen Umsätzen (d.h. niedrigen Produktkonzentrationen) stets ein merklich höherer E-Wert anzudeuten. Später gemessene Daten bei höheren Umsätzen lieferten dann aber etwas schlechtere Enantioselektivitäten. Auch diese Beobachtung unterstreicht den negativen Einfluß hoher Produktkonzentrationen auf die Enantioselektivität und weist auf das Vorliegen einer Produktinhibition hin.

6.1.2 Hydrolyse im präparativen Maßstab

Unter optimierten Bedingungen wurde, wie in Abschnitt 5.1.3 beschrieben, nur das Reaktionsprodukt (+)-**BC-S** präparativ gewonnen. Das Substrat (-)-**BC-E** wurde bereits zuvor in einer nicht vollständig optimierten präparativen Biotransformation gewonnen.

Bei der Darstellung von (+)-**BC-E** wurde die Reaktion bei einem Umsatz von ~35 % abgebrochen. Das Produkt wies dabei einen Enantiomerenüberschuß von $ee(\mathbf{BC-S}) = 91.0\%$, das Substrat von $ee(\mathbf{BC-E}) = 48.5\%$ auf.

Nun könnte das nicht abreagierte Substrat **BC-E** nach einfacher Abtrennung der organischen Phase des Reaktionsansatzes ohne weitere Aufarbeitung in einer zweiten Stufe weiter enantioselektiv bis zu einem Enantiomerenüberschuß von $ee(\mathbf{BC-E}) > 99\%$ hydrolysiert werden. So wären in einem einfachen, zweistufigen Prozeß Substrat und Produkt der Reaktion in guten Ausbeuten und hohen optischen Reinheiten darstellbar. Die zu erwartenden Kenngrößen eines solchen Prozesses sind in Tabelle 6.1-2 dargestellt.

*Tabelle 6.1-2: Theoretische Ausbeuten und Enantiomerenüberschüsse der Produkte einer zweistufigen Umsetzung von N-tert-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester **BC-E** mit der Lipase aus Candida antarctica B unter optimierten Bedingungen.*

Produkt	(1S, 5S, 6S)- BC-E	(1R, 5R, 6R)- BC-S
Ausbeute	43 %	35 %
Enantiomerenreinheit	$ee_S > 99\%$	$ee_P = 91\%$
Isolierung nach	57 % Umsatz (Stufe 2)	35 % Umsatz (Stufe 1)
Zu Grunde gelegter E-Wert ¹⁾	34.2	
¹⁾ Nach Chen et al., 1982		

6.1.3 Weitere mögliche Verbesserungen

Die Darstellung von enantiomerenreinem **BC-E** mit enzymatischen Methoden wurde nicht als Grundlage für einen hocheffizienten technischen Prozeß entwickelt. Vielmehr wurde die Substanz für Forschungszwecke in optisch reiner Form benötigt (Beumer et al., 2000) und andere Darstellungsmethoden waren bisher erfolglos.

Dennoch wurden die Möglichkeiten zur Optimierung der *Reaktionsbedingungen* im Rahmen dieser Arbeit weitgehend ausgeschöpft. Erst dadurch wurde die Darstellung präparativer Mengen **BC-E** in entsprechender optischer Reinheit überhaupt möglich. Weitere Verbesserungen des entwickelten Verfahrens müßten nun beim Substrat oder beim Biokatalysator ansetzen.

So könnte die Boc-Gruppe am Stickstoff von **BC-E** durch andere Schutzgruppen ersetzt oder die Methylgruppe der Esterfunktion durch andere Alkyl- oder Arylgruppen ausgetauscht werden. Solche Veränderungen in der Substratstruktur können durchaus zu einer Erhöhung der Enantioselektivität einer enzymatischen Hydrolyse führen. Die Verbindung **BC-E** stellt aber nur ein Intermediat in einem

mehrstufigen Syntheseweg zur Darstellung von β -Aminocyclopropan-carbonsäuren dar (vgl. Abschnitt 2.1.1). Und die nachfolgenden Syntheseschritte waren eben genau für die Verbindung **BC-E** mit Boc-Schutzgruppe und Methylesterfunktion entwickelt und optimiert worden. Aus diesen Gründen wurden keine Versuche in dieser Richtung unternommen.

Der verwendete Biokatalysator, die Lipase aus *Candida antarctica* B, könnte noch in zwei Punkten verbessert werden.

Zum einen wäre eine Wiederverwendbarkeit wünschenswert. Dazu sollte das Enzym in immobilisierter Form getestet werden. Ein solches Immobilisat steht zwar mittlerweile kommerziell zur Verfügung, wurde aber aus Zeitgründen nicht getestet.

Desweiteren wäre die Enantioselektivität der Lipase aus *Candida antarctica* B für die Hydrolyse von **BC-E** (E = 34) sicher noch steigerbar. So könnte versucht werden, aus dem kommerziellen Präparat mit den gängigen Methoden der Proteinaufreinigung ein homogeneres Enzym mit verbesserter Enantioselektivität zu gewinnen. Diese Beseitigung von Nebenaktivitäten kontaminierender Hydrolasen mit schlechter oder evtl. gegensätzlicher Selektivität ist auch schon für Lipasen erfolgreich angewandt worden (z.B.: Ng-Youn-Chen et al., 1994).

Darüber hinaus ist es mit den neuen Methoden der Molekularbiologie möglich geworden, das jeweilige Enzym gezielt zu verändern und dadurch z.B. seine Enantioselektivität für ein bestimmtes Substrat zu erhöhen. Mit einem solchen sogenannten "Evolutiven Proteindesign" mit Hilfe der Zufallsmutagenese gelang es z.B., die Hydrolyse von 2-Methyldecansäure-*p*-nitrophenylester mit der Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* von einem E-Wert von 1.1 beim Wildtypenzym auf E = 25.8 beim evolvierten Enzym zu steigern (Liebeton et al., 2000).

6.2 Umesterungen von *N-tert*-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester **BC-E**

Die Alkoholyse von Estern chiraler Carbonsäuren ist eine eher selten angewandte Variante der enzymatischen, enantioselektiven Transesterifikation, da es in diesem Fall schwieriger ist, das Gleichgewicht der Reaktion auf die Produktseite zu verschieben. Außerdem sind Alkohole relativ schwache Nucleophile und die (i. d. R. nicht aktivierten) Ester einer chiralen Carbonsäure nur schwache Acylierungsmittel, was zu sehr langsamen Reaktionen führt.

So verlief auch die in dieser Arbeit untersuchte Alkoholyse von **BC-E** mit *n*-Butanol nur sehr langsam. Wie in Abschnitt 5.2 beschrieben, konnte das Gleichgewicht der Reaktion zwar durch den Einsatz von Molekularsieben auf die Produktseite verschoben werden, aber die gemessenen Enantioselektivitäten waren durchweg niedriger als bei hydrolytischen Reaktionen. Damit konnte das Hauptziel der Versuche nicht erreicht werden: Eine Erhöhung der Enantioselektivität.

Auffällig war die schlechtere Selektivität der Umesterung bei Anwesenheit von Molsieb (E = 2.8 mit Molsieb gegenüber E = 6.2 ohne Molsieb, vgl. Abschnitt 5.2). Ein weiterer Unterschied zwischen Umsetzungen mit und ohne Molsieb war das Zusammenklumpen der in Toluol suspendierten Lipase nach 1 –2 Tagen im Molsieb-

freien Ansatz. In den klaren Überständen der Reaktionslösungen beider Ansätze konnte per DC nur das Substrat **BC-E** und das Alkoholhydrolyseprodukt **BC-Bu** nachgewiesen werden. Allerdings war nach Ansäuern der Reaktionsmischungen mit Essigsäure im Molsieb-freien Ansatz das Hydrolyseprodukt **BC-S** deutlich nachweisbar, im Molsieb-haltigen nicht. Damit konnte gezeigt werden, daß in Abwesenheit eines Trocknungsmittels das im Toluol enthaltene bzw. durch die Enzympräparation eingeschlepptes Wasser ausreicht, um eine Hydrolyse von **BC-E** in Konkurrenz zur Alkoholhydrolyse zu verursachen. Die entstandene Säure **BC-S** protonierte vermutlich das Enzym, band in der hydrophoben Umgebung über ionische Wechselwirkungen daran und verursachte dessen Ausflockung. In diesem Fall wurde also der E-Wert einer Überlagerung von Umesterung und Hydrolyse gemessen. Hieraus resultierte auch der Unterschied zum E-Wert der "reinen" Umesterung in Gegenwart von Molsieb.

Trotzdem bleibt die erheblich geringe Enantioselektivität der Alkoholhydrolyse ($E = 2.8$) im Vergleich mit der Hydrolyse ($E = 16.5$ unter vergleichbaren Bedingungen) erstaunlich, da sich die Reaktionsmechanismen bis zur Bildung des Acyl-Enzym-Komplexes nicht grundsätzlich unterscheiden dürften. In der Bildung dieser diastereomeren Acyl-Enzym-Komplexe liegt auch die enantiodiskriminierende Eigenschaft des Enzyms begründet. Erst danach greifen die unterschiedlichen Nucleophile (Wasser bei der Hydrolyse, *n*-Butanol bei der Alkoholhydrolyse) die beiden diastereomeren Acyl-Enzym-Komplexe an. Entweder nivelliert die stark hydrophobe Umgebung in Toluol die diastereomeren Acyl-Enzym-Komplexe bezüglich ihrer Bildungstendenz oder Stabilität, oder der Angriff des Nucleophils wird bei der Alkoholhydrolyse stärker zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. Letzteres scheint anhand der sehr langsamen Umesterungsreaktion der Fall zu sein und zu einer Verringerung der Enantioselektivität zu führen.

6.3 Biotransformationen mit 2-Oxabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester **OBC-E**

Für eine kinetische Racematspaltung des zu **BC-E** strukturverwandten bicyclischen Esters **OBC-E** konnte kein aussichtsreicher Ansatzpunkt erarbeitet werden. Der Hauptgrund hierfür liegt in der Tatsache, daß keine von über 20 getesteten Hydrolasen eine auch nur annähernd präparativ interessante Enantioselektivität zeigte. Dies galt sowohl für hydrolytische als auch für Umesterungsreaktionen.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Boc-Schutzgruppe im Substrat **BC-E** eine entscheidende Rolle für die Enantiomererkennung durch die Lipase aus *Candida antarctica* B spielt. Diese sterisch anspruchsvolle Gruppe ist der wesentliche strukturelle Unterschied zwischen dem Sauerstoff- und dem Stickstoff-Derivat (siehe Abbildung 6.3-1). Somit müßte es durchaus möglich sein, die Enantioselektivität der Hydrolyse von **BC-E** durch das Einführen einer anderen, möglichst noch sperrigeren N-Schutzgruppe weiter zu erhöhen. Dagegen ist es chemisch grundsätzlich nicht möglich, am Sauerstoffatom von **OBC-E** eine Derivatisierung zu diesem Zweck vorzunehmen.

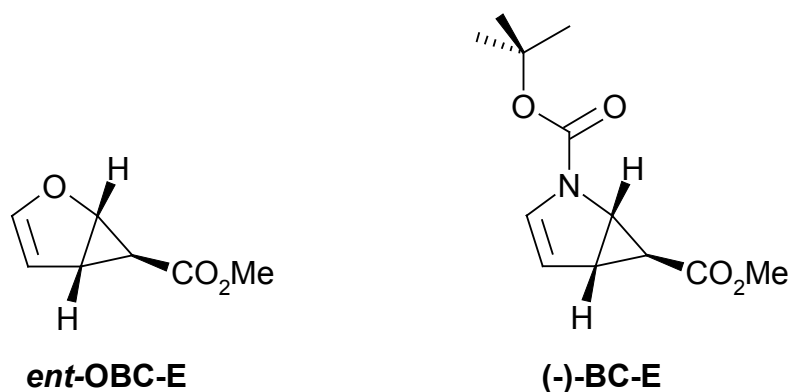


Abbildung 6.3-1: Vergleich der Strukturen von 2-Oxabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester **OBC-E** und N-tert-Butyloxycarbonyl-2-Azabicyclo[3.1.0]hex-3-en-6-carbonsäuremethylester **BC-E**

6.4 Chemische Eigenschaften von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO**

6.4.1 Gleichzeitige Zersetzung und Racemisierung von **TsCHO** in wässrigem Phosphatpuffer

Die chemische Zersetzung (vgl. Abschnitt 5.5.2) und Racemisierung (vgl. Abschnitt 5.5.3) von **TsCHO** in wässrigem Phosphatpuffer bei verschiedenen pH-Werten wurde eingehend untersucht. Da Racemisierung und Zersetzung der Substanz gleichzeitig ablaufen, konnte eine zersetzungsfreie Racemisierung nicht gemessen werden. Somit stellt sich die Frage, ob die während der Racemisierungs-Messungen auftretende Zersetzung von **TsCHO** die ermittelten Racemisierungskonstanten beeinflusst bzw. verfälscht hat.

Da es sich um eine basenkatalysierte Racemisierung handelt (vgl. Abschnitt 5.5.3) und dementsprechend eine anionische, achirale Zwischenstufe auftreten muß, können für die Überlagerung von Racemisierung und Zersetzung von **TsCHO** zwei Reaktionsmechanismen angenommen werden. Diese sind in Abbildung 6.4-1 schematisch dargestellt.

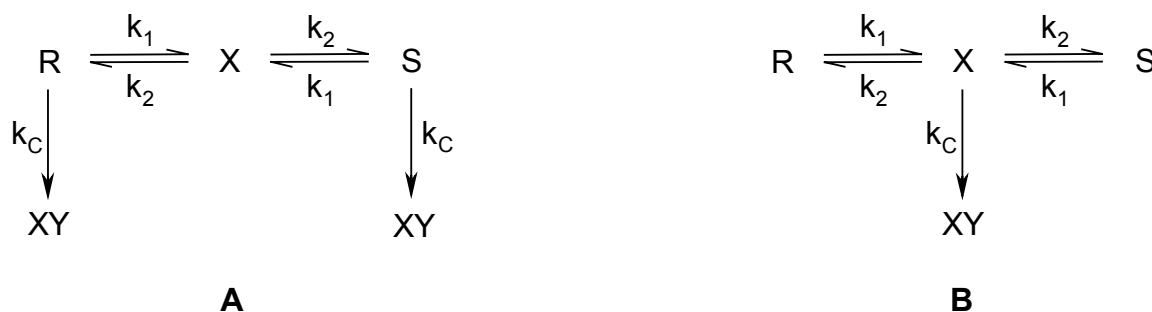


Abbildung 6.4-1: Mögliche Reaktionsmechanismen bei der Racemisierung und chemischen Zersetzung von **TsCHO**. **A**: Die Enantiomere *R* und *S* wandeln sich über eine achirale Zwischenstufe *X* ineinander um und zerfallen jeweils direkt zum unbekanntem Zersetzungsprodukt *XY*. **B**: Die bei der Racemisierung auftretende achirale Zwischenstufe *X* zerfällt zum unbekanntem Zersetzungsprodukt *XY*.

Für beide Mechanismen ergeben sich für den steady state ($d[X]/dt = 0$) folgende Zusammenhänge:

$$([R] + [S]) = ([R] + [S])_0 \cdot e^{-k_Z t} \quad (\text{Gl. 6-1})$$

bzw.

$$([R] - [S]) = ([R] - [S])_0 \cdot e^{-(k_R + k_Z)t} \quad (\text{Gl. 6-2})$$

und damit:

$$ee = ee_0 \cdot e^{-k_R t} \quad (\text{Gl. 6-3})$$

Dabei bedeuten:

[R] : Konzentration von R-TsCHO (bzw. D-TsCHO)

[S] : Konzentration von S-TsCHO (bzw. L-TsCHO)

k_R : Racemisierungskonstante

k_Z : Zersetzungskonstante

Die beiden in Abbildung 6.4-1 dargestellten Mechanismen unterscheiden sich lediglich in der Zusammensetzung von k_R und k_Z aus den Geschwindigkeitskonstanten k_1 , k_2 und k_C und sind folglich äußerlich nicht unterscheidbar:

Tabelle 6.4-1: Zusammensetzung der Racemisierungskonstante k_R und der Zersetzungskonstante k_Z aus den Geschwindigkeitskonstanten k_1 , k_2 und k_C der Reaktionsmechanismen **A** und **B**.

Modell	A	B
Mechanismus	$\begin{array}{ccccc} R & \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} & X & \xrightleftharpoons[k_1]{k_2} & S \\ \downarrow k_C & & & & \downarrow k_C \\ & & & & XY \end{array}$	$\begin{array}{ccccc} R & \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} & X & \xrightleftharpoons[k_1]{k_2} & S \\ \downarrow k_C & & & & \downarrow k_C \\ & & & & XY \end{array}$
Racemisierungskonstante	$k_R = k_1$	$k_R = \frac{2k_1k_2}{2k_2 + k_C}$
Zersetzungskonstante	$k_Z = k_C$	$k_Z = \frac{k_1k_C}{2k_2 + k_C}$

Zunächst ist festzuhalten, daß die Racemisierung von **TsCHO** wie vorausgesetzt (Abschnitt 4.6.6) trotz gleichzeitiger Zersetzung der Substanz nach einer Kinetik erster Ordnung verläuft und die ermittelten Racemisierungskonstanten (vgl. Abschnitt 5.5.3) sinnvoll sind.

Außerdem legen die Modelle **A** und **B** unterschiedliche Zusammenhänge zwischen Racemisierung und Zersetzung von **TsCHO** nahe. Bei Modell **A** können Racemisierung und Zersetzung unabhängig voneinander ablaufen, die Zersetzung kann prinzipiell auch pH-unabhängig sein.

Bei Modell **B** sind Racemisierung und Zersetzung dagegen stark aneinander gekoppelt, da sie über dieselbe (anionische, achirale) Zwischenstufe **X** verlaufen. So ergeben sich bei Modell **B** für k_R und k_Z folgende Zusammenhänge:

$$\frac{k_R}{k_Z} = \frac{2k_2}{k_C} \quad (\text{Gl. 6-4})$$

und

$$k_R + k_Z = k_1 \quad (\text{Gl. 6-5})$$

Die Bildung von **X** hängt von der Geschwindigkeitskonstante k_1 ab, welche mit Sicherheit abhängig von der OH^- -Ionen-Konzentration ist. Setzt man voraus, daß k_2 und k_C nicht pH-abhängig sind, sollten k_R und k_Z nach (Gl. 6-4) die gleiche pH-Abhängigkeit zeigen. Dies stimmt mit dem beobachteten Verhalten genau überein (vgl. Abschnitt 5.5), womit Modell **B** als das wahrscheinlichere angesehen werden kann. Zwischen pH 5 und pH 7 wurde ein in etwa konstantes Verhältnis $k_R/k_Z \approx 3.2$ gemessen, woraus sich nach (Gl. 6-4) ein Verhältnis $k_2/k_C \approx 1.6$ ergibt. Damit wandelt sich das achirale Intermediat **X** zu je $\sim 38\%$ in eins der Enantiomere von **TsCHO** um und zu $\sim 24\%$ zerfällt es irreversibel zu einem unbekanntem Produkt **XY**. Zur Natur von **XY** wurden im Rahmen dieser Arbeit keine Untersuchungen angestellt. Die beobachtete Braunfärbung von **TsCHO**-Lösungen (vgl. Abschnitt 4.6.5) deutete jedoch auf eventuelle Folgereaktionen bzw. Polymerisationsprozesse hin.

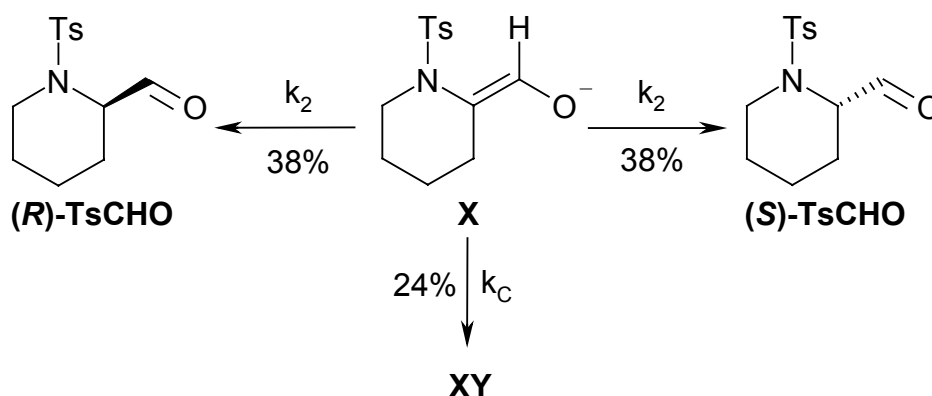


Abbildung 6.4-2: Chemisches Verhalten des achiralen Intermediates **X** bei der Racemisierung von **TsCHO**. Ca. $\frac{1}{4}$ der deprotonierten Verbindung gehen durch irreversiblen Zerfall verloren.

6.4.2 Messung der Racemisierung von **TsCHO**

Die Kenntnis der Racemisierungsgeschwindigkeit von **TsCHO** unter verschiedenen Reaktionsbedingungen war für die Planung und Bewertung von enantioselektiven Bioreduktionen der Verbindung von entscheidender Bedeutung (vgl. Abschnitt 6.4.3). Deren Messung war jedoch mit erheblichen experimentellen Schwierigkeiten verbunden. So stand einerseits kein nicht-racemisches **TsCHO** zur Verfügung, andererseits konnte für die Substanz keine zufriedenstellende Enantiomerenanalytik entwickelt werden. Zur Lösung dieser Probleme wurde optisch aktives **TsCHO** in einer mikropräparativen Biotransformation hergestellt und dessen Enantiomerenüberschuß nach Derivatisierung zu **TsCOOH** bestimmt (vgl. Abschnitte 4.4.1 und 4.6.6). Diese Derivatisierung fand bei einem pH-Wert von ~ 11.5 statt. Dies bedeutet, daß während der Reaktionsdauer der Oxidation zu **TsCOOH** ein gewisser Teil des **TsCHO** chemisch zerfiel und außerdem in gewissem Maß Racemisierung stattfand (**TsCHO** zerfällt und racemisiert umso schneller, je alkalischer die Reaktionslösung ist, vgl. Abschnitte 5.5.2 und 5.5.3). So wurde bei der Optimierung der Derivatisierungsbedingungen beobachtet, daß bei extrem basischen Bedingungen überhaupt kein **TsCOOH** als Oxidationsprodukt nachweisbar war. Es stellt sich nun die Frage, inwiefern der chemische Zerfall und die Racemisierung von **TsCHO** während der Derivatisierung die ermittelten Racemisierungskonstanten verfälschten (der Einfluß der Zersetzung von **TsCHO** während der Inkubation in wäßrigem Phosphatpuffer wurde in Abschnitt 6.4.1 bereits diskutiert).

Daraus ergibt sich für das Derivatisierungsprodukt **TsCOOH**:

$$([P]+[Q]) = \frac{k_D}{k_Z + k_D} ([R]+[S])_0 \cdot (1 - e^{-(k_Z+k_D)t}) \quad (\text{Gl. 6-9})$$

bzw.

$$([P]-[Q]) = \frac{k_D}{k_R + k_Z + k_D} ([R]-[S])_0 \cdot (1 - e^{-(k_R+k_Z+k_D)t}) \quad (\text{Gl. 6-10})$$

und damit für den Enantiomerenüberschuß von **TsCOOH**:

$$ee_P = \frac{k_Z + k_D}{k_R + k_Z + k_D} ee_S^0 \frac{1 - e^{-(k_R+k_Z+k_D)t}}{1 - e^{-(k_Z+k_D)t}} \quad (\text{Gl. 6-11})$$

Dabei bedeuten:

- [P] : Konzentration von R-**TsCOOH** (bzw. D-**TsCOOH**)
- [Q] : Konzentration von S-**TsCOOH** (bzw. L-**TsCOOH**)
- ee_P : Enantiomerenüberschuß von **TsCOOH** während der Derivatisierung

Läßt man die Derivatisierung - wie in der Praxis geschehen - vollständig ablaufen, bis alles Edukt **TsCHO** abreagiert hat, dann erhält man aus (Gl. 6-11) für $t \rightarrow \infty$:

$$ee_P^{end} = \frac{k_Z + k_D}{k_R + k_Z + k_D} ee_S^0 \quad (\text{Gl. 6-12})$$

Dies bedeutet, daß der Enantiomerenüberschuß von **TsCHO** vor der Derivatisierung und von **TsCOOH** nach der Derivatisierung unter definierten Bedingungen proportional zueinander sind. Fände keine Racemisierung statt ($k_R = 0$), wären beide gleich groß.

Das gesamte Experiment zur Messung der Racemisierung von **TsCHO** läßt sich nun schematisch folgendermaßen darstellen:

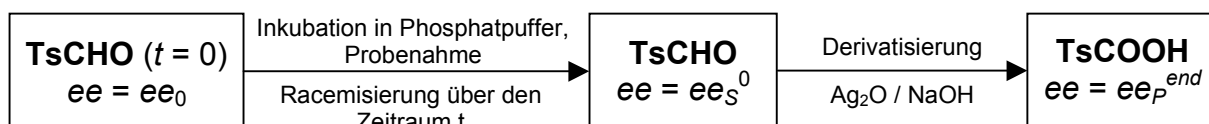


Abbildung 6.4-4: Schematische Darstellung der verschiedenen Arbeitsschritte bei der Messung der Racemisierung von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO**

Aus (Gl. 6-3) (Abschnitt 6.4.1) und (Gl. 6-12) (ee ist hier ee_s^0) folgt:

$$ee_P^{end} = \frac{k_Z + k_D}{k_R + k_Z + k_D} ee_0 \cdot e^{-k_R^{Puffer} \cdot t_{Inkubation}} = ee_P^0 \cdot e^{-k_R^{Puffer} \cdot t_{Inkubation}} \quad (Gl. 6-13)$$

Dabei bedeutet ee_P^{end} den Enantiomerenüberschuß von **TsCOOH** nach erfolgter Inkubation von **TsCHO** in Phosphatpuffer über den Zeitraum $t_{Inkubation}$ und nach Derivatisierung zu **TsCOOH**; ee_P^0 ist der Enantiomerenüberschuß von **TsCOOH** aus der nach $t_{Inkubation} = 0$ derivatisierten **TsCHO**-Probe.

(Gl. 6-13) beschreibt den Zusammenhang zwischen dem Enantiomerenüberschuß von **TsCOOH** nach Derivatisierung (ee_P) und der gesuchten Racemisierungskonstante von **TsCHO** in den jeweiligen Inkubationspuffern (k_R^{Puffer}). Trotz der Zersetzung und Racemisierung von **TsCHO** während der Derivatisierung lieferte die Auftragung von $\ln(ee_P^{end}/ee_P^0)$ über der Inkubationszeit $t_{Inkubation}$ von **TsCHO** in den verschiedenen Puffern als Geradensteigung die jeweilige Racemisierungskonstante k_R^{Puffer} von **TsCHO** (vgl. Abschnitt 4.6.6).

Zusammenfassend geht aus (Gl. 6-13) hervor, daß die in Abschnitt 4.6.6 beschriebene Auswertung der Messung von Enantiomerenüberschüssen ee_P von **TsCOOH** zu korrekten Racemisierungskonstanten k_R^{Puffer} von **TsCHO** geführt hat.

6.4.3 Einfluß der chemischen Eigenschaften von **TsCHO** auf die theoretisch erreichbaren Ausbeuten bei Bioreduktionen

In den durchgeführten Experimenten zur enantioselektiven Bioreduktion von **TsCHO** mit der HLADH zeigte sich, daß die enzymatische Reduktion der Verbindung sehr viel schneller verläuft, als deren chemische Racemisierung (vgl. Abschnitte 5.7.3 und 5.5.3). Dies führt dazu, daß nach Abreaktion des D-Enantiomers die Racemisierung geschwindigkeitsbestimmend wird und die Reaktion nur noch sehr langsam verläuft (vgl. Abbildung 5.6-3, "HLADH"). Andererseits zersetzt sich **TsCHO** langsam in Phosphatpuffer, was bei langen Reaktionszeiten zu Einbußen in der Ausbeute führt.

Die Auswirkungen der Racemierungs- und Zersetzungsgeschwindigkeit auf die erzielbaren Produktausbeuten und die benötigten Reaktionszeiten soll hier auf quantitativer Grundlage betrachtet und diskutiert werden.

Zur Vereinfachung soll das Reaktionssystem in zwei Schritte zerlegt werden:

- 1) Schnelle enzymatische Abreaktion des D-Enantiomers (d.h. des R-Enantiomers). In diesem vergleichsweise kurzen Zeitraum werden Racemisierung und Zersetzung von **TsCHO** vernachlässigt.
- 2) Von der Racemisierungsgeschwindigkeit bestimmte Phase der Reaktion. Hier tritt das D-Enantiomer nur in sehr geringen Konzentrationen als Intermediat auf, ehe es abreagiert. Somit läßt sich die enzymatische Reaktion sehr gut durch eine Kinetik 1. Ordnung beschreiben.

Die oben beschriebene zweite Phase der Reaktion läßt sich durch folgendes Schema darstellen:

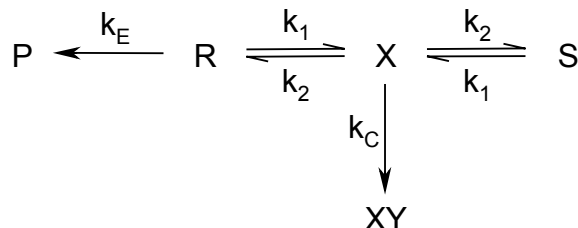


Abbildung 6.4-5: Reaktionsschema der enantiospezifischen Bioreduktion von **TsCHO** mit in situ Racemisierung. Das Enantiomer **R** (*D*-**TsCHO**) wird enzymatisch zum Produkt **P** (*D*-**TsOH**) reduziert. Außerdem wandeln sie sich die Enantiomere **R** und **S** über eine achirale Zwischenstufe **X** ineinander um. **X** zerfällt teilweise auch zum unbekanntem Zersetzungsprodukt **XY**.

Für dieses Reaktionssystem ergeben sich für den steady state ($d[X]/dt = 0$; $d[R]/dt = 0$) folgende Zusammenhänge:

$$\frac{d[S]}{dt} = - \frac{k_1 k_2 k_E + k_1 k_C (k_1 + k_E)}{k_2 (k_1 + 2k_E) + k_C (k_1 + k_E)} [S] \quad (\text{Gl. 6-14})$$

Unter der Voraussetzung, daß die enzymatische Reaktion sehr viel schneller läuft, als die Racemisierung ($k_E \gg k_1$), vereinfacht sich (Gl. 6-14) zu:

$$\frac{d[S]}{dt} = - \frac{k_1 (k_2 + k_C)}{2k_2 + k_C} [S] \quad (\text{Gl. 6-15})$$

Mit den schon zuvor verwendeten Definitionen für die Racemisierungskonstante k_R und die Zersetzungskonstante k_Z (siehe Tabelle 6.4-1) ergibt sich in integrierter Form:

$$[S] = \frac{C_0}{2} \cdot e^{-\left(\frac{k_R}{2} + k_Z\right)t} \quad (\text{Gl. 6-16})$$

Dabei bedeutet C_0 die am Anfang eingesetzte Konzentration an racemischem **TsCHO**. Für die Produkte **P** (*D*-**TsOH**) und **XY** (unbekanntes Zersetzungsprodukt) ergibt sich weiter:

$$[P] = \frac{C_0}{2} + \frac{C_0}{2} \cdot \frac{k_R}{k_R + 2k_Z} \cdot \left\{ 1 - e^{-\left(\frac{k_R}{2} + k_Z\right)t} \right\} \quad (\text{Gl. 6-17})$$

$$[XY] = \frac{C_0}{2} \cdot \frac{2k_Z}{k_R + 2k_Z} \cdot \left\{ 1 - e^{-\left(\frac{k_R}{2} + k_Z\right)t} \right\} \quad (\text{Gl. 6-18})$$

Der entsprechende Konzentrations-Zeit-Verlauf der Reaktanden ist für pH 7 in Abbildung 6.4-6 dargestellt. Daraus geht hervor, daß die Ausbeute am gewünschten, enantiomerenreinen Produkt **D-TsOH** durch die stattfindende Zersetzung von **TsCHO** beschränkt wird. Außerdem wird die Reaktionszeit, bestimmt durch die Racemisierungsgeschwindigkeit, sehr lang.

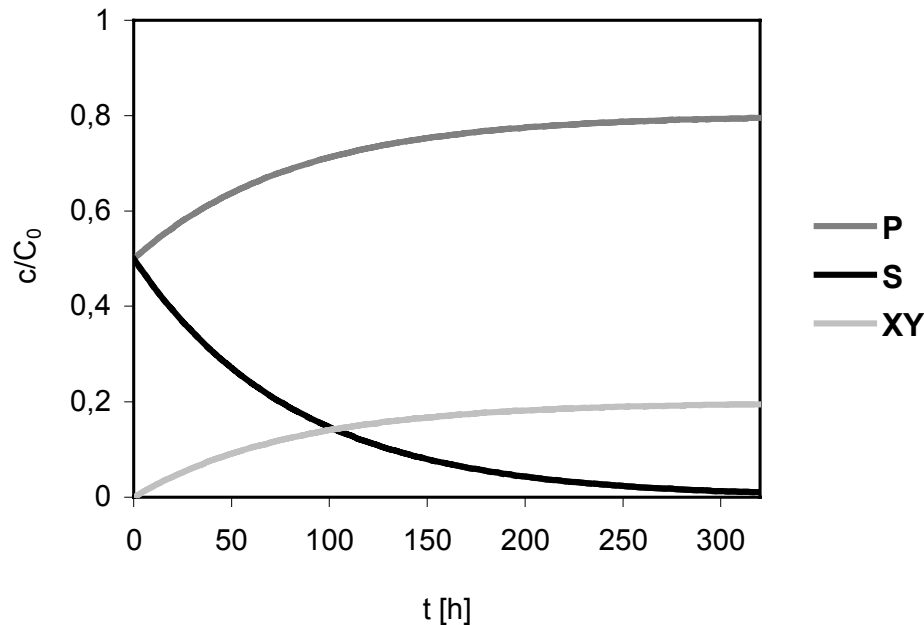


Abbildung 6.4-6: Verlauf der Bioréduktion von anfangs racemischem **TsCHO** mit HLADH nach der Abreaktion des **R-Enantiomers (D-TsCHO)** zu **P (D-TsOH)**. **S (L-TsCHO)** racemisiert und wird danach ebenfalls zu **P** reduziert. Hierzu konkurriert die Zersetzung von **S** zum unbekanntem Produkt **XY**. Für die Berechnung der Verläufe wurden die bei pH 7 gemessenen Konstanten k_R (Racemisierung) und k_Z (Zersetzung) verwendet (vgl. Abschnitt 5.5).

Aus (Gl. 6-16) läßt sich die Reaktionszeit bis zur Abreaktion von beispielsweise 99 % des Eduktes **DL-TsCHO** berechnen:

$$t_{99\%} = \frac{7.824}{k_R + 2k_Z} \quad (\text{Gl. 6-19})$$

Außerdem ergibt sich aus (Gl. 6-17) die maximal erzielbare Ausbeute Y_{\max} an **P (D-TsOH)** als Funktion der Racemisierungskonstante k_R und der Zersetzungskonstante k_Z :

$$Y_{\max} = \frac{[P]_{t \rightarrow \infty}}{C_0} = \frac{k_R + k_Z}{k_R + 2k_Z} = \frac{\frac{k_R}{k_Z} + 1}{\frac{k_R}{k_Z} + 2} \quad (\text{Gl. 6-20})$$

Damit läßt sich für alle pH-Werte, bei denen k_R und k_Z bestimmt wurden, die Reaktionszeit und die maximale Ausbeute berechnen. Die mit den in Tabelle 5.5-1 und Tabelle 5.5-2 aufgeführten Werten für k_R und k_Z berechneten Daten sind in Abbildung 6.4-7 dargestellt.

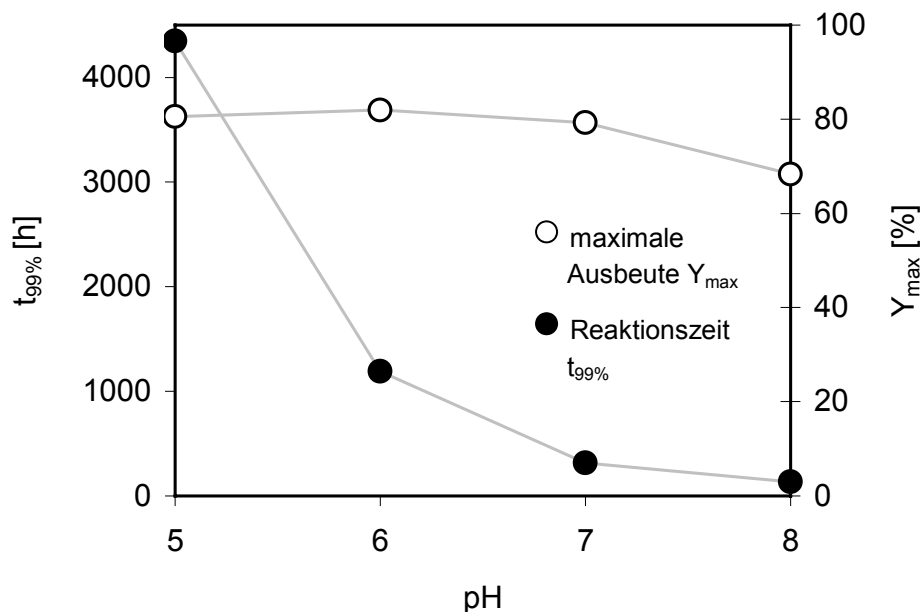


Abbildung 6.4-7: Reaktionszeit $t_{99\%}$ bis zur Abreaktion von 99 % des Eduktes und maximale Ausbeute Y_{max} an *D-TsOH* bei der enantiospezifischen Bioreduktion von *TsCHO* mit HLADH und gleichzeitig stattfindender in situ Racemisierung.

Die Reaktionszeit nimmt bei fallendem pH-Wert drastisch zu (ca. ein halbes Jahr bei pH 5 !), während sich die theoretisch erreichbare Ausbeute durch den pH-Wert praktisch nicht beeinflussen lässt. Nach (Gl. 6-20) ist Y_{max} allein vom Verhältnis zwischen Racemisierung und Zersetzung k_R/k_Z abhängig. Diese Abhängigkeit ist in Abbildung 6.4-8 graphisch dargestellt. Das Verhältnis k_R/k_Z ist zwischen pH 5 und pH 7 nahezu konstant (vgl. Abschnitt 6.4.1), oberhalb dieses pH-Bereiches wird es etwas ungünstiger.

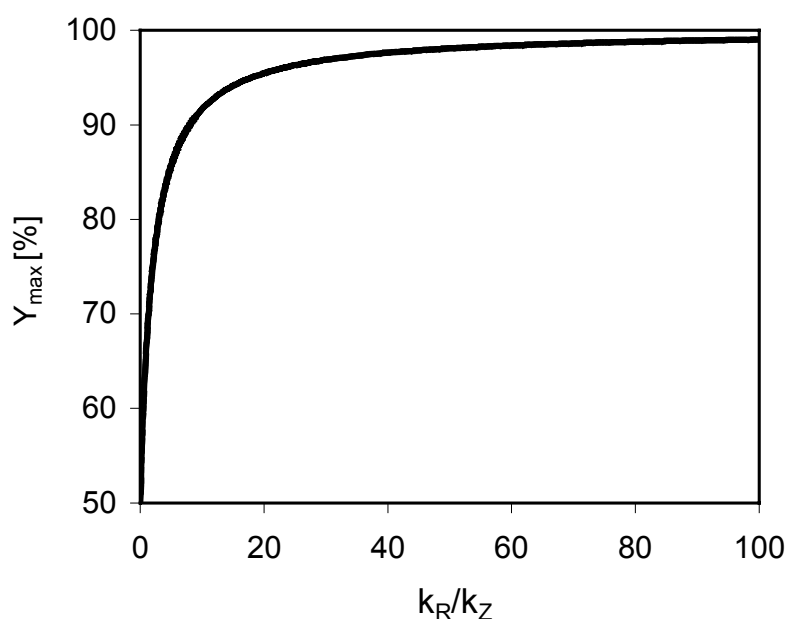


Abbildung 6.4-8: Einfluß des Verhältnisses von Racemisierungsgeschwindigkeit und Zersetzungsgeschwindigkeit des Eduktes (k_R/k_Z) auf die maximal erreichbare Ausbeute Y_{max} bei der enantiospezifischen Bioreduktion von *TsCHO* mit HLADH und gleichzeitig stattfindender in situ Racemisierung.

Somit lässt sich die erzielbare Ausbeute nur durch eine selektive Beschleunigung der Racemisierung erhöhen. Dazu wäre eine geeignete Katalyse, chemisch oder enzymatisch, notwendig. Hierdurch würden auch die langen Reaktionszeiten effektiv verkürzt (vgl. (Gl. 6-19)). So würde eine Verzehnfachung der Racemisierungsgeschwindigkeit bei pH 7 die erreichbare Ausbeute von $Y_{\max} = 79\%$ auf $Y_{\max} = 97\%$ steigern, während die Reaktionszeit von $t_{99\%} = 316\text{ h}$ (ca. 2 Wochen) auf $t_{99\%} = 50\text{ h}$ verkürzt würde.

6.5 Enantioselektive Bioreduktionen von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO**

6.5.1 Screening auf die Bioreduktion von **TsCHO**

Die in der Literatur beschriebenen enantioselektiven Bioreduktionen von organischen Carbonylverbindungen sind äußerst zahlreich (vgl. Abschnitt 5.6). Meist handelte es sich jedoch um die Reduktion chiraler oder prochiraler Ketone, nur eine eher kleine Anzahl von chiralen Aldehyden wurde eingesetzt (Grunwald et al., 1986; Boland und Niedermeyer, 1987; Yamazaki und Hosono, 1988; Pamperin et al., 1997). Chirale, N-geschützte α -Aminoaldehyde wurden bisher jedoch nicht in Biotransformationen eingesetzt. Das in dieser Arbeit untersuchte Reaktionssystem ist schematisch in Abbildung 6.5-1 dargestellt.

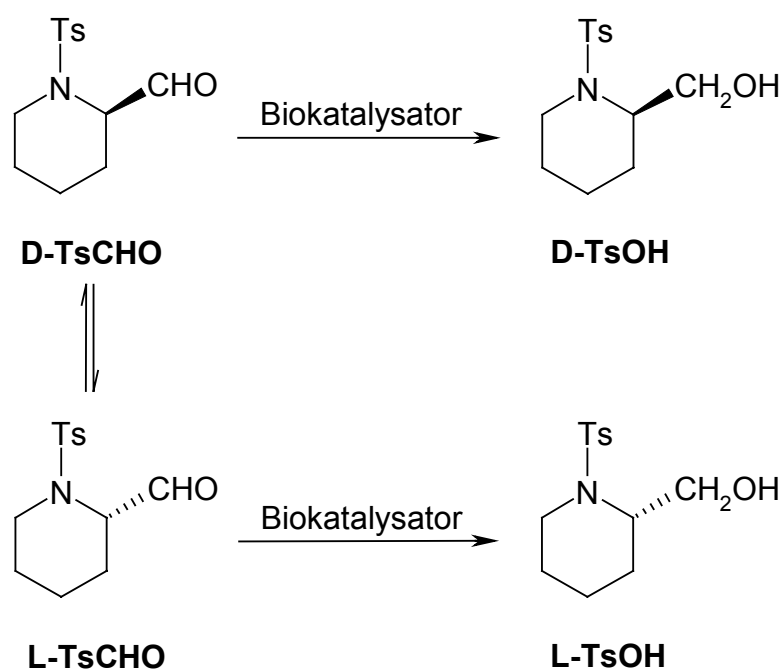


Abbildung 6.5-1: Schematische Darstellung der untersuchten Bioreduktion von **TsCHO** bei gleichzeitiger Racemisierung der Verbindung.

Somit konnte auf keine Erfahrungen mit ausreichend ähnlichen Substraten zurückgegriffen werden. Bei Umsetzungen mit ganzen Zellen wurde daher wie in Abschnitt 5.6.1.1 beschrieben auf am Institut verfügbare Hefe-Stämme

zurückgegriffen, die bereits Aktivität bei der Reduktion von sterisch anspruchsvollen, chiralen Aldehyden gezeigt hatten.

Für Umsetzungen mit freien Enzymen wurden alle derzeit kommerziell erhältlichen Alkoholdehydrogenasen getestet.

6.5.1.1 Reaktionen mit ganzen Zellen

Biotransformationen mit ganzen Zellen haben sich auch in der organischen Chemie als Methode vor allem bei enantioselektiven Synthesen etabliert (Azerad, 1995). Hierbei nehmen Oxidations- und Reduktionsreaktionen mit der auch für den organischen Chemiker leicht zugänglichen Bäckerhefe eine besondere Stellung ein (Servi, 1990; Csuk und Glänzer, 1991). Die Vor- und Nachteile der Verwendung ganzer Zellen gegenüber freien Enzymen bei Oxidations- und Reduktionsreaktionen sind in Tabelle 6.5-1 aufgeführt.

Tabelle 6.5-1: Vor- und Nachteile bei der Verwendung ganzer Zellen gegenüber freien Enzymen bei Oxidations- und Reduktionsreaktionen.

Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none"> • Leichte Zugänglichkeit des Biokatalysators (Bäckerhefe) • Keine Enzymaufreinigung notwendig • Keine Cofaktorregenerierung notwendig • Höhere Stabilität der Enzyme in der Zelle 	<ul style="list-style-type: none"> • Meist geringere Raum-Zeitausbeuten • Teils schwierigere Aufarbeitung der Produkte aus einer großen Menge Biomasse • Auftreten von Nebenreaktionen • Metabolisierung des gewünschten Produktes

Aufgrund fehlender Beispiele für die Bioreduktion von N-geschützten α -Aminoaldehyden in der Literatur wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Hefestämme eingesetzt, die schon in vorausgegangenen Arbeiten für die Reduktion von sterisch anspruchsvollen Aldehyden eingesetzt wurden und am Institut für Bioverfahrenstechnik zur Verfügung standen (Pamperin, 1998). Das Substratspektrum dieser Mikroorganismen ist dort zusammengefasst.

Bei den durchgeführten Screeningexperimenten (vgl. Abschnitt 5.6.1.3) waren alle eingesetzten Hefen in der Lage, das Substrat **TsCHO** zu reduzieren. Die Aktivitäten lagen dabei zwischen 1 und 10 U/g_{BTM}. Es wurden jedoch beim Reaktionsprodukt **TsOH** nur geringe Enantiomerenüberschüsse gefunden, zwischen 0 und 14 %. Dies kann entweder an der schlechten Enantioselektivität *einer* aktiven Dehydrogenase oder - wahrscheinlicher – an der Umsetzung von **TsCHO** durch mehrere Enzyme unterschiedlicher Enantioselektivität liegen.

Eine Ausnahme bildete die Trockenhefe "Bakers Yeast, Type I" (Sigma). Sie zeigte eine spezifische Aktivität von nur 0.1 U/g_{BTM}. Außerdem wurde bei ihr im Reaktionsprodukt ein Enantiomerenüberschuß von 42 % D-**TsOH** gefunden, obwohl das Substrat **TsCHO** vollständig abreagiert war. Hierfür gibt es zwei mögliche Erklärungen:

1. D-selektive Reduktion von **TsCHO** und Racemisierung der Verbindung während der Reaktion (spontan oder enzymkatalysiert).
2. L-selektiver Abbau des Substrates **TsCHO** (zu einem anderen Produkt als **TsOH**) und / oder L-selektiver Abbau des Produktes **TsOH**.

Die Racemisierungskonstante von **TsCHO** beim Reaktions-pH von 6.5 beträgt $7.7 \cdot 10^{-3}$ 1/h (vgl. Abschnitt 5.5.3). Dementsprechend können sich während einer Reaktionszeit von 23 h spontan maximal 8.5 % des vorliegenden L-**TsCHO** in D-**TsCHO** umwandeln (und umgekehrt). Dies erklärt in keinem Fall den bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, "Type I" gemessenen Enantiomerenüberschuß von 42 % beim Produkt **TsOH**. Allenfalls eine enzymatische Katalyse der Racemisierung könnte hierzu geführt haben.

Allerdings scheint in diesem Fall wahrscheinlicher, daß ein enantioselektiver Abbau des L-Substrates **TsCHO** und / oder L-Produktes **TsOH** stattfand. Hierfür spricht die Bilanzierung der Reaktion (siehe Abbildung 6.5-2). Die Molsumme von Substrat und Produkt nimmt im Laufe der Zeit eindeutig ab. Bei den übrigen Umsetzungen mit den anderen Mikroorganismen war diese Molsumme im Rahmen der Meßgenauigkeit konstant.

Im Fall der Hefen *Saccharomyces cerevisiae* DSM 11285 und *Pichia jadinii* DSM 2361 (vgl. Abschnitt 5.6.1.3, Tabelle 5.6-3) kann über die tatsächlichen Gründe für das Vorliegen nicht-racemischer Produkte auf Grund des nur geringen Effekts anhand der vorliegenden Daten keine Aussage getroffen werden.

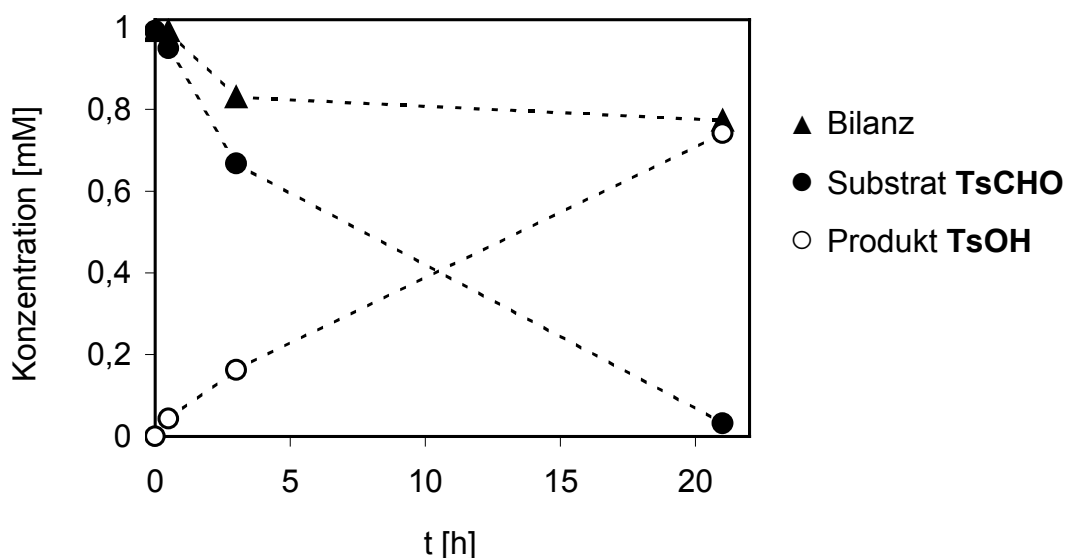


Abbildung 6.5-2: Bioreduktion von *N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd* **TsCHO** (●) zu *N-p-Toluolsulfonylpipecolinalkohol* **TsOH** (○) mit der Trockenhefe *Saccharomyces cerevisiae* "Type I" unter Screeningbedingungen (vgl. Abschnitt 5.6.1.3). Die Molsumme (▲) der Verbindungen nimmt im Verlauf der Reaktion um über 20 % ab.

Da Umsetzungen von **TsCHO** mit freien Dehydrogenasen aussichtsreichere Ansatzpunkte boten, wurde auf eine eingehendere Untersuchung der Bioreduktion von **TsCHO** mit den getesteten Hefen verzichtet.

6.5.1.2 Reaktionen mit freien Enzymen

Enantioselektive Reduktionen von chiralen Aldehyden mit freien Alkoholdehydrogenasen nehmen gemessen an der immensen Anzahl beschriebener Reduktionen chiraler oder prochiraler Ketone nur eine sehr untergeordnete Stellung

ein. Dennoch gibt es einige Arbeiten, bei denen chirale Aldehyde mit der Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber (HLADH) umgesetzt wurden (Grunwald et al., 1986; Boland und Niedermeyer, 1987), darunter auch planar chirale Aldehyde (Yamazaki und Hosono, 1988; Pamperin et al., 1997).

Derzeit sind vier freie Alkoholdehydrogenasen unterschiedlicher Herkunft kommerziell erhältlich. Sie sind mit ihren Substratspektren und ihrer Fähigkeit, das Substrat **TsCHO** umzusetzen in Tabelle 6.5-2 zusammengestellt.

Tabelle 6.5-2: Literaturbekannte und gemessene Eigenschaften der untersuchten freien Alkoholdehydrogenasen

Quelle	Abkürzung	Cofaktor	Spektrum bevorzugter Substrate ¹⁾	EA _{TsCHO} ²⁾ [U/mg]	Enantio-selektivität ³⁾
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YADH	NAD(H)	Eng; kurzkettige, unverzweigte Aldehyde stark bevorzugt	< 0.01	-
Pferdeleber	HLADH	NAD(H)	Aliphatische und aromatische Aldehyde unterschiedlichster Struktur, cyclische und bicyclische Ketone, kaum acyclische Ketone	16	> 100 (D)
<i>Thermoanaerobium brockii</i>	TbADH	NADP(H)	Aldehyde, acyclische Methyl- und Ethylketone, cyclische Ketone; keine sperrigen Reste in direkter Nachbarschaft zur Carbonylgruppe	< 0.01	-
<i>Lactobacillus kefir</i>	LkADH	NADP(H)	Cyclische und acyclische Ketone, besonders Methylketone, aromatische Ketone, Enone	0.01	12 (D)

¹⁾ Nach Drauz und Waldmann (1995).
²⁾ Spezifische Aktivität bei der Umsetzung von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO**.
³⁾ E-Wert für die Enantioselektivität (Chen et al., 1982).

Da **TsCHO** einen cyclischen Aldehyd mit einem sperrigen Substituenten in direkter Nachbarschaft zur Carbonylgruppe darstellt, sollte die Verbindung nach den in Tabelle 6.5-2 aufgeführten Eigenschaften der ADHs nicht oder nur schlecht von der YADH und der TbADH umgesetzt werden. Dies stimmt mit den experimentellen Resultaten überein. Bei der HLADH und der LkADH sprach nichts in den bislang beobachteten Substratspektren gegen eine Umsetzung von **TsCHO**, auch in der Praxis wurde die Substanz von beiden Enzymen reduziert.

Bemerkenswert ist die Enantiospezifität der HLADH für das Substrat **TsCHO**. V. Prelog entwickelte bereits 1964 für einige Oxido-Reduktasen ein Modell zur Erklärung und Vorhersage der Stereospezifität auf der Grundlage von Diamantgitter-Ausschnitten (Prelog, 1964). Dem Modell entstammt auch die bekannte Prelog-Regel zur Vorhersage der absoluten Konfiguration chiraler sekundärer Alkohole, die durch Bioreduktion der entsprechenden unsymmetrischen Ketone gebildet wurden.

Ursprung und Anwendungen des Modells wurden beschrieben (Jones und Beck, 1976), es wurde aktualisiert (Lemière et al., 1982) und erweitert (Horjales und Brändén, 1985).

Ein weiteres populäres Modell der HLADH stammt von Jones und Jakovac (1982) und basiert auf Ausschnitten eines kubischen Raumgitters, eine sog. "Quadranten-Regel" wurde von Nakazaki et al. (1980) entwickelt.

Im Fall des Substrates **TsCHO** bietet sich besonders das Modell von Prelog an, da es unter Verwendung von Substraten mit Cyclohexan- und Decalin-Gerüsten entwickelt wurde. Solche Strukturen lassen sich besonders gut in ein Diamantgitter einpassen. Abbildung 6.5-3 zeigt einen solchen Gitterausschnitt, der das aktive Zentrum der HLADH repräsentiert. Fett hervorgehoben ist die eingepaßte Struktur von **D-TsOH**, dem Reduktionsprodukt von **D-TsCHO**. Da die Geometrie des Übergangszustandes der des Alkohols ähnlicher ist, als der Geometrie der Carbonylverbindung, wird die reagierende C-O-Bindung als Alkohol-Funktion dargestellt (Prelog, 1964). Im Gitter sind durch das Modell neben der Lage der C-O-Bindung noch verschiedene Positionen festgelegt, die durch die Bindung eines potentiellen Substrates nicht in Anspruch genommen werden sollten. Bezüglich dieser Positionen macht das Modell folgende Vorhersagen: Die Besetzung von "verbotenen" Positionen (schwarz) durch irgendwelche Substituenten außer H verhindert jegliche Reaktion. Werden "unerwünschte" Positionen (grau) in Anspruch genommen, wird das entsprechende Substrat nur sehr langsam umgesetzt. Dies gilt auch für Positionen unterhalb des Gitterausschnitts. Wird die weiß markierte Position ("nachteilig") besetzt, dann führt dies zu einer mäßigen bis schlechten Aktivität.

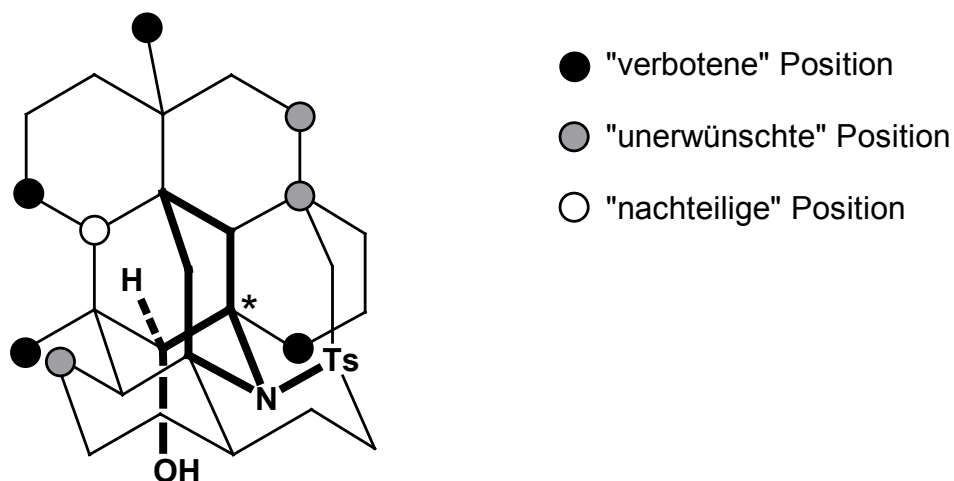


Abbildung 6.5-3: Diamantgitter-Modell für das aktive Zentrum der HLADH nach Jones und Beck, 1976. Die eingepaßte Struktur von *N*-*p*-Toluolsulfonyl-*D*-pipercolinalkohol **D-TsOH** ist fett hervorgehoben. Keine ungünstige Position wird durch das *D*-Enantiomer besetzt.

In Abbildung 6.5-3 ist zu erkennen, daß sich **D-TsOH** in das Gitter einpassen läßt, ohne mit einer ungünstigen Position in Konflikt zu geraten. Mit dem *L*-Enantiomer gelingt dies in keiner denkbaren Position. Somit stimmt die beobachtete *D*-Spezifität der HLADH sehr gut mit den Vorhersagen des Modells von Prelog überein.

6.5.2 Optimierung der Bioreduktion von **TsCHO** mit der Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber

Die HLADH reduzierte die Verbindung **TsCHO** enantiospezifisch, daher war eine Verbesserung der Enantioselektivität der Reaktion weder nötig noch möglich.

Alle Umsetzungen wurden mit einer homogenen wässrigen Lösung des Substrates durchgeführt. Aus diesem Grund waren auch keine Versuche zur Optimierung der Art und Konzentration eines organischen Lösungsmittels ("solvent engineering") notwendig. Untersuchungen zum Einsatz weiterer, mehrphasiger Reaktionssysteme (flüssig-flüssig oder fest-flüssig), eventuell unter Einsatz von Membrantechniken, hätten den Rahmen der vorliegenden Arbeit gesprengt und wurden nicht in Betracht gezogen.

Ein weiterer möglicher Einflußfaktor auf das Verhalten enzymatischer (wie auch nicht-enzymatischer) Reaktionen bezüglich Selektivität und Aktivität ist die Reaktionstemperatur. Da im vorliegenden Fall, wie oben erwähnt, nur die Aktivität der HLADH betrachtet werden mußte, erübrigte sich eine Untersuchung dieses Parameters. Das Temperaturoptimum des Enzyms ist gut untersucht und liegt bei 20 – 25 °C (Ryzewski und Pietruszko, 1977). Somit bot sich ein bequemes Arbeiten bei RT an. Weiterhin nimmt die Stabilität von Enzymen, die der verwendeten Cofaktoren (NADH / NAD⁺) und des Substrates **TsCHO** bei steigender Temperatur ab. Andererseits hätte ein Arbeiten unterhalb von RT zwar die Stabilität aller beteiligten Substanzen erhöht, die Enzymaktivität aber beeinträchtigt.

Aus diesen Gründen wurde auf eine Optimierung der Reaktionstemperatur verzichtet und alle Untersuchungen wurden bei der als am geeignetsten erachteten RT (25 °C) vorgenommen.

6.5.2.1 Einfluß des pH-Wertes

Der Einfluß des pH-Wertes auf die Bioreduktion von **TsCHO** mit der HLADH wurde im Bereich von pH 5.0 bis 8.0 untersucht. Dabei stand nicht das Auffinden eines pH-Optimums der Reaktion im Vordergrund, vielmehr sollte ein geeigneter pH-Wert für ein mit einer NADH-Recyclingreaktion gekoppeltes Reaktionssystem ermittelt werden.

Wie erwartet sank die spezifische Aktivität der HLADH mit steigendem pH-Wert. Dies ist hauptsächlich auf den Verbrauch von Protonen bei der Reaktion zurückzuführen:



Der beobachtete lineare Zusammenhang zwischen pH-Wert und Spezifischer Aktivität (vgl. Abschnitt 5.7.1) geht dabei aus obiger Reaktionsgleichung nicht offensichtlich hervor. Vermutlich überlagern hier weitere Effekte, wie etwa strukturelle Veränderungen des Enzyms durch (De-)Protonierung von Aminosäureresten.

6.5.2.2 Inhibition der HLADH

Wie in Abschnitt 5.7.2 dargestellt, wird die HLADH sowohl durch Methanol (1 %) als auch durch Formiat (100 mM), nicht aber durch das Reaktionsprodukt **TsOH** inhibiert. Beide inhibierenden Verbindungen werden nicht von der HLADH umgesetzt. Die Empfindlichkeit der HLADH gegenüber organischen Lösungsmitteln wie Methanol, auch in Mengen von weniger als 5 Vol-% ist zwar bekannt (Jones und

Beck, 1976), wurde bisher aber noch nicht eingehender untersucht (Theil, 1997). Dagegen ist die Inhibition des Enzyms durch vielerlei Verbindungen, besonders durch kleine anorganische und organische Anionen gut untersucht und beschrieben (Jones und Beck, 1976; Drauz und Waldmann, 1995). Nach Jones und Beck kann Formiat zwar mit einem Alkohol-Substrat bei einer Oxidation um die Bildung des Enzym-Substrat-NAD⁺-Komplexes konkurrieren, nicht aber mit einem Carbonyl-Substrat bei einer Reduktion. Dies würde bedeuten, daß es sich bei dem in dieser Arbeit beobachteten Effekt um eine nicht-kompetitive Inhibition handelt oder um eine unspezifische Beeinträchtigung des Enzyms durch Veränderung des Reaktionsmediums.

Auch andere Oxidoreduktasen werden durch Formiat gehemmt (Neuhauser et al., 1998). Für die enzymatische Xylit-Herstellung aus Xylose wurde sogar ein spezielles, pH-kontrolliertes Fed-Batch-Verfahren entwickelt, um die nicht-kompetitive Inhibition der Xylose-Reduktase aus *Candida tenuis* CBS 4435 durch Formiat zu umgehen. Dabei wird das Formiat für die NADH-Regenerierung kontinuierlich als Ameisensäure zugesetzt, um die Konzentration stets so klein wie möglich und den pH-Wert konstant bei 7.0 zu halten.

Da es sich bei Bioreduktionen mit NADH als Cofaktor um Zwei-Substrat-Kinetiken handelt und ein möglicher Inhibitor mit dem Substrat, dem Produkt, der oxidierten oder reduzierten Form des Cofaktors, oder sogar mit mehreren der Verbindungen gleichzeitig um das aktive Zentrum des Enzyms konkurrieren kann, wäre eine genauere Untersuchung der in dieser Arbeit beobachteten Inhibitionseffekte nur mit außerordentlich aufwendigen kinetischen Messungen möglich gewesen. Im vorliegenden Fall erschien jedoch wichtiger, daß die HLADH auch bei Vorliegen beider inhibierender Substanzen immer noch 20 mal aktiver war, als die zum Recycling von NADH verwendete FDH aus *Candida boidinii*. Letzteres Enzym blieb also trotz der Inhibition der HLADH durch Methanol bzw. Formiat der limitierende Faktor und die Wahl der Reaktionsbedingungen mußte sich nach den Erfordernissen der FDH für eine möglichst hohe Aktivität richten. Dies sind z.B. basische Bedingungen und hohe Formiatkonzentrationen, Methanol beeinträchtigt die FDH dagegen nicht. Daher wurden die Inhibitionen der HLADH durch Methanol und Formiat ohne wesentliche Beeinträchtigung der Gesamtaktivität des gekoppelten Reaktionssystems in Kauf genommen und nicht näher charakterisiert.

6.5.3 Kopplung von Bioreduktion und NADH-Recycling

Die Regeneration von Nicotinamid-Cofaktoren für enzymatische Redox-Synthesen ist ein eingehend untersuchtes und beschriebenes Themengebiet (Reviews: Chenault und Whitesides, 1987; Chenault et al., 1988; Nakamura et al., 1988). Dabei stehen für NAD(H) besser entwickelte und leistungsfähigere Methoden zur Verfügung, als für die (an sich auch wesentlich teureren) phosphorylierten Verbindungen NADP(H). Speziell für die Regenerierung von NADH wird das Formiat/Formiatdehydrogenase-System allgemein als das insgesamt vorteilhafteste angesehen. Seine Vor- und Nachteile sind in Tabelle 6.5-3 zusammengestellt.

Es ist bisher auch das einzige Verfahren für die *in-situ*-Cofaktorregenerierung, welches in einem technischen Prozess eingesetzt wurde (Wandrey et al., 2000; Kragl et al., 1992 und 1996; Wichmann et al., 1981). Daher wurde dieses System auch im Rahmen dieser Arbeit für die Regenerierung von NADH herangezogen.

Tabelle 6.5-3: Vor und Nachteile der Formiat/Formiatdehydrogenase-Methode zur Regenerierung von NADH (nach Chenault und Whitesides, 1987).

Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none"> • Hohes elektrochemisches Reduktionspotential • Billiges Reduktionsmittel • Problemlose Produktisolierung • Mit fast allen biochemischen Systemen kompatibel • Makromolekulare NAD(H)-Derivate verwendbar • Hohe Stabilität 	<ul style="list-style-type: none"> • Teures Enzym • Niedrige spezifische Aktivität der FDH ($\sim 3 \text{ U/mg}_{\text{Protein}}$) • Keine Aktivität für NADP(H)

Bei der Kopplung von Bioreduktions- und Recyclingreaktion waren die Anforderungen beider Teilreaktionen an die Reaktionsbedingungen zu berücksichtigen. Dabei war ein geeigneter Kompromiss für die Wahl der Reaktionsparameter zu finden, da diese Anforderungen teilweise stark unterschiedlich waren. Außerdem wurde das optimale Verhältnis der beteiligten Enzyme für eine maximale Gesamtaktivität ermittelt.

6.5.3.1 pH-Wert und kinetische Parameter der Teilreaktionen

Die kinetischen Parameter K_M und V_{\max} der beteiligten Enzyme HLADH und FDH wurden unter Umsetzungsbedingungen bei pH 7 und pH 8 bestimmt. Die Konzentrationen der Substrate **TsCHO** bzw. Formiat wurden dabei jeweils als konstant angesehen (vgl. Abschnitt 4.10.2.5.4). Neben der in Abschnitt 5.8.1 beschriebenen quantitativen Nutzung der Parameter in einem kinetischen Modell ließen sich aber auch aus den Werten selbst Schlüsse ziehen. Dies betrifft vor allem den Einfluß des pH-Wertes auf das Verhalten der beteiligten Enzyme.

Im Fall der HLADH zeigte der K_M -Wert für NADH keinen signifikanten Unterschied bei den verschiedenen pH-Werten ($K_M = 86 \text{ mM}$ bzw. $K_M = 81 \text{ mM}$), während V_{\max} bei pH 7 ca. 20 % größer war, als bei pH 8 (vgl. auch Abschnitt 5.7.3).

Bei der FDH lagen die Verhältnisse umgekehrt. Hier änderte sich V_{\max} zwischen pH 7 und pH 8 nicht wesentlich ($V_{\max} = 0.33 \text{ U/mg}$ bzw. $V_{\max} = 0.36 \text{ U/mg}$). Dagegen nahm der K_M -Wert für NAD von 62 mM (pH 7) auf 221 mM (pH 8) zu. Die etwas höhere Aktivität der FDH steht somit einer schwächeren Substratbindung bei erhöhten pH-Werten gegenüber.

Bei beiden Enzymen liegt die beobachtete Erhöhung der Aktivität durch Änderung des pH-Wertes offensichtlich nicht an einer Verbesserung der Substratbindung

Die obige Betrachtung der kinetischen Parameter sprach für eine Durchführung einer präparativen Umsetzung bei pH 7. Allerdings spielten für die Wahl der Reaktionsbedingungen neben dem Verhalten der Enzyme auch die chemischen Eigenschaften des Substrates **TsCHO** eine entscheidende Rolle (vgl. Abschnitt 6.4.3). Aus Abbildung 6.4-7 geht dabei hervor, daß unter diesen Gesichtspunkten ebenfalls bei pH 7 der beste Kompromiss zwischen notwendiger Reaktionszeit und erreichbarer Ausbeute erzielt wird.

Schließlich wird auch für die Stabilität von stationären Mischungen der Cofaktoren NAD und NADH bei Bioreduktionen mit *in-situ*-Regenerierung pH 7 als der sinnvollste angesehen (Chenault und Whitesides, 1987).

Insgesamt erwies sich pH 7 beim betrachteten Reaktionssystem sowohl in enzymatischer als auch in chemischer Hinsicht als der geeignetste pH-Wert für eine präparative Reaktion.

6.5.3.2 Kinetische Betrachtung des gekoppelten Systems

In Abschnitt 5.8.1 wurde die quantitative Analyse der Bioreduktion von **TsCHO** mit gekoppeltem NADH-Recycling auf der Grundlage eines kinetischen Modells beschrieben. Dieses Modell erhebt ausdrücklich nicht den Anspruch, die Reaktion während ihres gesamten Verlaufs umfassend beschreiben zu können. Die beschriebenen Annahmen und Vereinfachungen gelten nur für die Anfangsphase der Reaktion und die Berechnung von Anfangsaktivitäten mit verhältnismäßig einfachen Mitteln war auch Sinn und Zweck des vorgestellten Verfahrens.

Aufwendige Verfahren zur möglichst umfassenden mathematischen Beschreibung von enzymatischen Reduktionen mit Cofaktorregenerierung, meist unter Verwendung kontinuierlicher Reaktionsführung, sind in der Literatur eingehend beschrieben. Die reduktive Aminierung von 2-Oxo-4-methylpentansäure zu L-Leucin mit der L-Leucindehydrogenase (LeuDH), Ammonium und kovalent an Polyethylenglykol gebundenem NAD(H) in einem Enzym-Membranreaktor war die erste reaktionskinetisch sehr eingehend charakterisierte und modellierte Reaktion dieser Art (Wichmann et al., 1981). Zur NADH-Regenerierung wurde auch dort das Formiat/FDH-System verwendet. Einen guten Überblick über das grundsätzliche Vorgehen bei derartigen Prozeßoptimierungen geben Kragl et al. (1992). Aus dem LeuDH-Verfahren wurde ein technischer Prozeß zur Herstellung von L-*tert*-Leucin entwickelt und entsprechend umfangreiche kinetische Studien und Optimierungsrechnungen wurden durchgeführt (Kragl et al., 1996a und b). Aber auch andere Bioreduktionsreaktionen mit NADH-Recycling wurden reaktionskinetisch analysiert und modelliert (Katayama et al., 1983; Schmidt, 1992).

All diese Arbeiten versuchen, die jeweiligen gekoppelten Reaktionssysteme so detailliert wie möglich abzubilden und berücksichtigen daher Mehrsubstratkinetiken sowie Substrat- und Produktinhibitionseffekte, Stoffbilanzen je nach Reaktionsführung und manche auch Enzym- und Cofaktorinaktivierungen. Dies ermöglicht die Simulation der entsprechenden Prozesse während ihres gesamten Verlaufs, führt aber auch zu Differentialgleichungssystemen, die nicht mehr geschlossen lösbar sind, sondern nur noch mit entsprechenden rechnergestützten numerischen Verfahren.

Für eine einfache, praktische und schnelle Abschätzung von Anfangsreaktionsraten aus leicht zu ermittelnden kinetischen Parametern sind diese Ansätze zu komplex. Hierfür wurde das in Abschnitt vorgestellte Verfahren entwickelt und am untersuchten Beispiel der Bioreduktion von **TsCHO** angewandt.

Kinetische Parameter von beiden beteiligten Enzymen unter Reaktionsbedingungen wurden ermittelt (vgl. Abschnitt 4.10.2.5.4), weiterhin wurde entsprechend der vorgesehenen Bedingungen für eine präparative Umsetzung von einer

Substratkonzentration von $c_{\text{TsCHO}} = 1\text{mM}$ und einer Formiatkonzentration von $c_{\text{Formiat}} = 100\text{mM}$ ausgegangen (vgl. Abschnitte 5.5.1 und 5.7.4.3).

Die im analytischen (vgl. Abschnitt 5.8.2) und präparativen Maßstab (vgl. Abschnitt 5.9) durchgeführten Reaktionen lieferten im Rahmen der Meßgenauigkeit die vom kinetischen Modell vorhergesagten Gesamtaktivitäten der gekoppelten Systeme im stationären Zustand. Somit erwies sich das in Abschnitt 5.8.1 beschriebene Modell als sinnvolles Werkzeug zur quantitativen Vorhersage verschiedener reaktionskinetischer Charakteristika der stationären Phase der Reaktion wie:

- Optimales Enzymverhältnis
- Einfluß der Cofaktor-Konzentration auf die Effizienz des Systems
- Gesamtaktivität des gekoppelten Systems

6.5.3.3 Umsetzungen im analytischen Maßstab

Diese Versuche wurden durchgeführt, um die grundsätzliche Eignung des Formiat/FDH-Systems zur Cofaktorregenerierung bei der Bioreduktion von **TsCHO** zu prüfen. Gleichzeitig wurde das in Abschnitt 5.8.1 vorgestellte kinetische Modell an der Praxis getestet (vgl. voriger Abschnitt). Außerdem wurden Versuche zur Erhöhung der TTN unternommen.

Während der stationären Phase der Umsetzungen wurden die vorausberechneten Aktivitäten gemessen und es konnten auch Produktausbeuten von über 50 % erzielt werden.

Als Hauptlimitierung aller Reaktionen erwies sich aber der Verlust der Aktivität nach Reaktionszeiten von über 48 h. Nach Abreaktion von D-**TsCHO** wird die NADH-verbrauchende Reaktion wegen der langsamen Racemisierung von **TsCHO** viel langsamer wird, als die NADH-regenerierende. Bei pH 7 ergibt sich aus (Gl. 6-17) und der Racemisierungskonstante k_R von **TsCHO** (vgl. Tabelle 5.5-2) eine maximale NADH-Verbrauchsrate von $3.6\ \mu\text{mol}/(\text{l}\cdot\text{h})$ durch die Bioreduktion von D-**TsCHO** welches aus L-**TsCHO** durch Racemisierung entsteht. Mit den MM-Konstanten für die Regenerierungsreaktion (vgl. Tabelle 5.7-2) berechnet sich daraus eine stationäre NAD^+ -Konzentration von $\sim 1\ \mu\text{M}$, d.h. 99 % des Cofaktors liegen nach Abreaktion des D-**TsCHO** als reduzierte Form NADH vor.

Nun ist die chemische Stabilität dieser Verbindung in wäßriger Lösung sehr gut untersucht (Chenault und Whitesides, 1987 und dort zitierte Literatur). Demnach beträgt die Halbwertszeit von NADH in 0.1 M Phosphatpuffer bei pH 7.0 und $25\ ^\circ\text{C}$ (was in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen entspricht) $t_{1/2} = 29\ \text{h}$. Der Verlust der Aktivität ist also auf den chemischen Zerfall des Cofaktors NADH zurückzuführen. Die Stabilität der verwendeten Enzyme unter den oben genannten Bedingungen ist im Vergleich dazu als erheblich größer bekannt, sowohl die HLADH als auch die FDH können ihre Aktivität bei Reaktionszeiten von einer Woche und mehr aufrecht erhalten (Jones und Beck, 1976 bzw. Wichmann et al., 1981).

Die TTN konnte durch Erniedrigung der Cofaktor-Konzentration von 5 auf 45 gesteigert werden (vgl. Tabelle 5.8-3), die Produktausbeute sank aber wegen der längeren Reaktionszeit in Anbetracht des NADH-Zerfalls auf unter 50 %.

Hieraus ergab sich vor allem die Konsequenz, daß bei einem präparativen Ansatz der Cofaktor nach bestimmten Zeiten nachgeliefert werden mußte, um die Aktivität aufrecht zu erhalten. Solch eine "Cofaktor-Supplementation" ist bei präparativen Bioreduktionen mit isolierten Reduktasen und Cofaktorregenerierung eine durchaus

übliche Maßnahme (Kragl et al., 1996a), überdies werden die Kosten für den Cofaktor NAD(H) wegen niedrigerer Preise und besser entwickelten Reaktionsführungen neuerdings nicht mehr als limitierend für einen derartigen Prozess angesehen (Kragl et al., 1992 und 1996b).

6.5.4 Präparative Umsetzung

Die präparative Umsetzung verlief in allen Punkten wie erwartet, nachdem zweimal NAD, HLADH und FDH ergänzt wurde (vgl. Abschnitt 5.9). Die wichtigsten Daten der Reaktion sind nochmals in Tabelle 6.5-4 zusammengefaßt.

Es bestätigte sich, daß die Reaktionsgeschwindigkeit der Umsetzung nach Abreaktion des D-Enantiomers von **TsCHO** und damit auch die Gesamtdauer der Reaktion von der Racemisierungsgeschwindigkeit der L-Verbindung bestimmt wird.

*Tabelle 6.5-4: Vergleich gemessener und vorausberechneter Reaktions-Parameter bei der Bioreduktion von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO** mit gekoppeltem NADH-Recycling im präparativen Maßstab.*

Parameter		gemessen	vorhergesagt	vgl. Abschn.
$A_{\text{stat.}}^{\text{max}}$ [U/mg] ¹⁾		0.16	0.16	5.8.1
Nach 142 h	Y_{TsCHO} [%] ²⁾	76	74.3	6.4.3
	ee (D-TsOH) [%]	> 99 %	> 99 %	5.6.2.2
	Nicht umgesetztes L-TsCHO [%]	8	8.6	6.4.3
	Chem. zerfallenes TsCHO [%]	16	17.1	6.4.3
¹⁾ Aktivität im stationären Zustand bei angewandtem, optimalem Enzymverhältnis				
²⁾ Produktausbeute				

Die Aktivität konnte durch die Ergänzung von Cofaktor bzw. Enzymen auch über mehrere Tage aufrecht erhalten werden, die Ausbeute konnte dadurch von 53 % **D-TsOH** im analytischen Maßstab (vgl. Tabelle 5.8-3, Eintrag 4) auf 76 % gesteigert werden. Bei vollständiger Abreaktion des Substrates wäre eine maximale Ausbeute von ca. 80 % möglich, allerdings auch eine weitere Reaktionszeit von ca. einer Woche nötig gewesen (vgl. Abschnitt 6.4.3).

6.5.5 Identifizierte Limitierungen

Auf die im Allgemeinen bestehenden Probleme und Nachteile von Bioreduktionen mit isolierten Enzymen unter Beteiligung von Cofaktoren wie NADH wurde bereits an anderer Stelle eingegangen (vgl. Abschnitt 6.5.1.1).

Speziell bei der der Bioreduktion von N-p-Toluolsulfonylpipecolinaldehyd **TsCHO** mit gekoppeltem NADH-Recycling sind entsprechend der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit folgende Punkte verbesserungswürdig:

- 1) Lange Reaktionsdauer
- 2) Limitierte Produktausbeute
- 3) Ungünstiges Verhältnis zwischen Substrat und Cofaktor (d.h. niedrige TTN)

Für Punkt 1) ist allein die langsame spontane Racemisierung des Substrates **TsCHO** unter Reaktionsbedingungen verantwortlich. Punkt 2) ergibt sich direkt aus dem Verhältnis dieser Racemisierungsgeschwindigkeit und der Geschwindigkeit der chemischen Zersetzung des Substrates. Diese beiden Limitierungen ließen sich also, wie bereits in Abschnitt 6.4.3 im Detail diskutiert wurde, durch eine selektive Beschleunigung der Racemisierung von **TsCHO** mittels eines chemischen oder biologischen Katalysators beheben.

6.5.5.1 Möglichkeiten für die Beschleunigung der Racemisierung von **TsCHO**

Methoden zur kontrollierten Racemisierung organischer Verbindungen wurden von Ebbers et al. (1997) in einem Übersichtsartikel zusammengestellt und systematisiert. Für α -Aminocarbonylverbindungen wie **TsCHO** existieren demnach folgende, nach ihrem Mechanismus unterschiedene Methoden:

- Racemisierung durch Bildung von Schiff-Basen-Intermediaten
- Racemisierung durch Redoxprozesse
- Thermische Racemisierung
- Basenkatalysierte Racemisierung
- Säurekatalysierte Racemisierung
- Enzymkatalysierte Racemisierung

Bei **TsCHO** ist die Bildung von **Schiff-Basen-Intermediaten** mit Aldehyden oder Ketonen wegen der Absättigung des N-Atoms durch C-2, C-6 und die Tosyl-Schutzgruppe nicht möglich. Darüber hinaus sind α -Aminoaldehyde in ungeschützter Form nicht stabil (Jurczak und Golebiowski, 1989), weshalb die Methode für diese Verbindungsklasse generell ausscheidet.

Redoxprozesse für die Racemisierung organischer Verbindungen wurden vor allem bei chiralen sekundären Alkoholen und Aminen angewandt (Ebbers et al. 1997; Huerta et al., 2001; Faber, 2001). Dabei entsteht durch reversible oxidative Entfernung eines Wasserstoffs vom asymmetrischen Kohlenstoffatom zunächst ein planares Intermediat. Die nicht-stereoselektiv verlaufende Rückreaktion bildet anschließend ein Racemat. Wassertstoff-Transfer-Katalysatoren für derartige

Oxidations-Reduktions-Sequenzen sind Komplexe der (Übergangs-) Metalle Ru, Rh, Ir, Al oder Pd.

Für eine erfolgreiche Anwendung dieses Prinzips auf die Verbindung **TsCHO** müsste ein Katalysator hochselektiv ein Δ^1 -Piperidin-2-carbaldehyd-Derivat (vgl. Verbindung **13**, Abbildung 2.1-2) ohne Veränderung der Aldehyd-Funktion bilden. Dies ist aber auf Grund des stark elektronenziehenden Effektes der Tosyl-Schutzgruppe und angesichts der Redoxempfindlichkeit von Aldehyden kaum vorstellbar. Somit bieten Redox-Verfahren wohl keine wirklich vielversprechenden Ansatzpunkte für die kontrollierte Racemisierung von **TsCHO**.

Dies ist bedauerlich, da die erfolgreiche Kombination von chemischen Übergangsmetall-Racemisierungskatalysatoren und Enzymen in Eintopf-Reaktionen bereits in der Literatur beschrieben ist und in jüngster Zeit zunehmend Beachtung findet (*Reviews*: Stürmer, 1997; Dinh et al., 1998; El Gihani und Williams, 1999; Huerta et al., 2001). Naturgemäß kamen dabei bisher aber nur Hydrolasen und keine Oxidoreduktasen zum Einsatz.

Die Temperaturabhängigkeit der spontanen Racemisierung von **TsCHO** wurde zwar im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, dennoch läuft - wie nahezu alle chemischen Reaktionen - auch diese bei erhöhter Temperatur sehr wahrscheinlich schneller ab. Dies trifft aber ebenso auf die chemische Zersetzung der Verbindung zu. Durch **thermische Racemisierung** könnte also u. U. die Reaktionszeit verringert, nicht aber die Ausbeute erhöht werden (vgl. Abschnitt 6.4.3). Außerdem müsste die Racemisierung bei erhöhter Temperatur durch entsprechende Reaktionstechnik räumlich von den enzymatischen Bioreduktionsprozessen getrennt werden, da die verwendeten Enzyme und Cofaktoren thermisch instabil sind (vgl. voriger Abschnitt).

Die spontane Racemisierung von **TsCHO** wurde eingehend untersucht und als **basenkatalysiert** identifiziert (vgl. Abschnitt 5.5.3). Nachteilig ist hierbei die gleichzeitig katalysierte Zersetzung der Verbindung, die oberhalb des Neutralpunkts sogar stärker mit dem pH-Wert zunimmt, als die Racemisierung (vgl. Abschnitt 6.4.3). Selbst bei einer räumlichen Trennung der enzymatischen Prozesse und einer Racemisierung unter stark basischen Bedingungen könnte zwar wiederum die Reaktionszeit verringert werden, die erreichbare Ausbeute aber würde vermutlich sogar sinken.

Möglicherweise könnte der Einsatz starker, nicht-nucleophiler Basen wie beispielsweise 1,5-Diazabicyclo[4.3.0]non-5-en (DBN), 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) oder 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO) für die Racemisierung in inerten organischen Lösungsmitteln (Ebbers et al., 1997) die in wässrigen Lösungen beobachtete basenkatalysierte Zersetzung von **TsCHO** vermeiden oder vermindern. Allerdings erforderte die Kopplung dieser Maßnahme mit den enzymatischen Reduktionsschritten in wässriger Lösung entsprechenden reaktionstechnischen Aufwand.

Im untersuchten Bereich von pH 8.0 bis pH 5.0 sank die Racemisierungsgeschwindigkeit von **TsCHO** mit dem pH-Wert (vgl. Abschnitt 5.5.3). Da aber die **säurekatalysierte Racemisierung** von α -Aminocarbonylverbindungen sehr wohl bekannt ist (Ebbers et al., 1997), wäre es durchaus möglich, dass die Racemisierung von **TsCHO** bei weiterer Absenkung des pH-Wertes wieder schneller wird. Weiterhin ist die teilweise Racemisierung von N-geschützten α -Aminoaldehyden bei chromatographischen Aufreinigungen mit Kieselgel aufgefallen (Stanfield et al., 1981;

Rittle et al., 1982) und daraufhin untersucht worden (Lubell und Rapoport, 1987; Jurczak und Golebiowski, 1989). Es wurde gefunden, daß α -Aminoaldehyde je nach α -Substituent in Kontakt mit Kieselgel innerhalb von wenigen Stunden vollständig racemisieren können. Eine Anwendung dieses Effekts für die Beschleunigung der Racemisierung von **TsCHO** mit Kieselgel oder anderen polymeren Säuren wie zum Beispiel sauren Ionenaustauscher-Harzen könnte u. U. aussichtsreiche Ansätze bieten. Dabei wäre einerseits die erhöhte Stabilität von **TsCHO** in (leicht) sauren Medien günstig (vgl. Abschnitt 5.5.2), andererseits die leichte räumliche Trennbarkeit der unlöslichen polymeren Säure von Enzymen und Cofaktoren (evtl. Polymer-vergrößert, vgl. folgender Abschnitt), z.B. durch eine Membran.

Die **enzymkatalysierte Racemisierung** von proteinogenen Aminosäuren wird durch sog. Racemasen bzw. Epimerasen katalysiert. Auch für die cyclischen Aminosäuren Prolin und Hydroxyprolin wurden derartige Enzyme beschrieben (Cardinale und Abeles, 1968; Finlay und Adams, 1970). Es ist bislang nicht bekannt, ob diese Enzyme auch andere cyclische Aminosäuren wie z.B. Pipecolinsäuren oder deren Derivate racemisieren können. Grundsätzlich ist es aber durchaus nicht unwahrscheinlich, einen Biokatalysator für die Racemisierung von **TsCHO** finden zu können. Ein besonderer Vorteil einer enzymatischen Methode wäre die potentielle Kombinierbarkeit mit den anderen enzymatischen Schritten Bioreduktion und NADH-Regenerierung in einem Eintopf-System. Auch das gentechnologische Design eines entsprechenden Ganzzellkatalysators wäre denkbar.

Zusammenfassend bieten die säurekatalysierte und die enzymkatalysierte Racemisierung von **TsCHO** die günstigsten Voraussetzungen für eine erfolgreiche Kombination mit der Bioreduktion der Verbindung.

6.5.5.2 Mögliche Reaktionstechnische Maßnahmen zur Erhöhung der TTN

Zu Punkt 3), Abschnitt 6.5.5 ist zu sagen, daß eine weitere Verringerung der Cofaktor-Konzentration unter 100 μ M zur Erhöhung der TTN wenig Sinn machen würde, da hierdurch die Ausnutzung der beteiligten Enzyme unter 50 % sinken würde (vgl. Abschnitte 5.8.1 und 5.9). Die ungünstige TTN resultiert im vorliegenden Fall vielmehr aus der niedrigen Substratkonzentration, bedingt durch dessen schlechte Löslichkeit.

Im untersuchten Reaktionssystem (homogene Lösung, Batch-Reaktion) ist deshalb eine Erhöhung der TTN kaum zu machen. Es sind aber in der Literatur Systeme beschrieben, die solch ein Problem lösen können.

So bietet sich zunächst ein Übergang vom einfachen Batch-System zu einem kontinuierlichen Verfahren an, bei dem Cofaktoren und Enzyme zurückgehalten werden können. Das bereits in Abschnitt 6.5.3.2 erwähnte Verfahren zur L-Leucin-Herstellung durch reduktive Aminierung von 2-Oxo-4-methylpentansäure mit der L-Leucindehydrogenase (LeuDH) war das erste eingehend beschriebene System dieser Art (Wichmann et al., 1981). Bioreduktion und NADH-Regenerierung mit dem Formiat/FDH-System wurden in einem Enzym-Membranreaktor (EMR) unter Verwendung von Polymer-vergrößertem NADH durchgeführt. Die kontinuierlich zugeführten Substrate (hier: 2-Oxo-Säure + Formiat) verlassen in einem solchen EMR nach der Umsetzung zu den Produkten über eine Ultrafiltrationsmembran den

Reaktor, während die Enzyme und der Cofaktor an Polyethylenglykol gebundene Cofaktor zurückgehalten werden. Diese Art der "Immobilisierung" eignet sich besonders für cofaktorabhängige enzymatische Redoxreaktionen. Wichmann et al. (1981) erzielten für NAD(H) eine TTN von über 5000. Durch weitere Optimierungen konnten später TTNs von bis zu 80.000 erreicht werden (Kula und Wandrey, 1987; Kragl et al., 1996a).

Weitere Verbesserungen lassen sich durch Kaskaden von EMRs erzielen (Kragl et al., 1996b), das Verfahrensprinzip wird heute in einem Prozeß zur Herstellung von L-*tert*-Leucin im Tonnenmaßstab angewandt (Wandrey, 2000).

Allein durch die Verwendung eines kontinuierlichen Verfahrens in einem EMR könnte so auch die TTN bei der Bioreduktion von **TsCHO** trotz dessen schlechter Löslichkeit ohne Erniedrigung der NAD(H)-Konzentration drastisch erhöht werden. Es wurden aber weiterhin kontinuierliche Prozesse speziell für die Bioreduktion von schlecht löslichen Substraten in EMRs entwickelt. Dabei wurden jeweils verschiedene Techniken der kontinuierlichen Substratnachsättigung eingesetzt.

Bei einem sog. "Emulsions-Membranreaktor" wird in einem gerührten Nachlösebehälter die wässrige Phase durch eine hydrophile Ultrafiltrationsmembran von der Substrat-Emulsion abgetrennt (Liese et al., 1998). Die gesättigte Substratlösung wird durch einen EMR geleitet und die dort austretende Produktlösung wieder dem Nachlösebehälter zugeführt. Hier wird das Produkt entsprechend der Verteilungskoeffizienten der beteiligten Substanzen aus der wässrigen Phase extrahiert und letztere mit Substrat nachgesättigt. Bei der Reduktion von 2-Octanon mit der Carbonylreduktase aus *Candida parapsilosis* und Regenerierung des (hier nativen) NADH mittels des Formiat/FDH-Systems konnte die TTN im beschriebenen Emulsions-Membranreaktor gegenüber einem einfachen EMR um den Faktor 9 auf 124 gesteigert werden (Liese et al., 1998). Diese Reaktionsführung eignet sich vor allem für flüssige Substrate, es könnten aber auch Lösungen fester Substrate in geeigneten wasserunlöslichen Lösungsmitteln eingesetzt werden.

Ein anderes Konzept koppelt einen EMR mit einem Membran-basierten Extraktionsmodul (Kruse et al., 1996). In einem Reservoir-Behälter wird unter pH-Kontrolle kontinuierlich Substrat und Formiat nachgelöst. Die Substratlösung passiert einen EMR, wo Bioreduktion und NADH-Regenerierung, wieder mit Hilfe des Formiat/FDH-Systems, gleichzeitig ablaufen. Aus der austretenden, wässrigen Produktlösung wird im Extraktionsmodul das hydrophobe Produkt durch einen kontinuierlichen Hexan-Gegenstrom entfernt. Wässrige und organische Phase sind hier durch eine mikroporöse, hydrophobe Membran voneinander getrennt. Die nun weitgehend produktfreie, wässrige NAD(H)-Lösung wird recyclet und schließlich im Reservoir-Behälter wieder mit Substrat und Formiat beladen. Das in Hexan gelöste Produkt wird ebenfalls kontinuierlich durch Destillation abgetrennt und das zurückgewonnene Hexan wieder dem Kreislauf zugeführt.

Mit diesem Verfahren wurde bei der Reduktion von 1-Phenyl-propan-2-on mit der ADH aus *Rhodococcus erythropolis* eine TTN von 1350 erreicht. Dies entspricht einer Verbesserung der Zyklenzahl um das 20- bis 25-fache gegenüber einer Standard-EMR-Technik (Kruse et al., 1996).

Ein ganz anderer Ansatz zur Erhöhung der TTN bei der Bioreduktion schwerlöslicher Ketone beruht auf einer Erhöhung von deren Löslichkeit durch den Zusatz von

Cyclodextrinen (Zelinski und Kula, 1997). Die Löslichkeit von 2-Acetylnaphthalin in 0.1 M Triethanolamin-Puffer (pH 7.0) konnte durch den Zusatz von *heptakis*-(2,6-di-O-methyl)- β -cyclodextrin (100 mM) um das 147-fache bis auf 50 mM gesteigert werden. Dabei wurde weder die Enantioselektivität noch die spezifische Aktivität der Reduktion von 2-Acetylnaphthalin mit der Carbonylreduktase aus *Candida parapsilosis* durch die Anwesenheit des Cyclodextrinderivates beeinträchtigt. Auch die NADH-Regenerierung durch das Formiat/FDH-System wurde nicht negativ beeinflusst.

Die Erhöhung der TTN bei der Bioreduktion schwerlöslicher Verbindungen wie **TsCHO** stellt hauptsächlich ein reaktionstechnisches Problem dar, für dessen Lösung Ansätze wie die oben beschriebenen zur Verfügung stehen.

Dagegen muß zur Erhöhung der maximal möglichen Ausbeute und zur Verringerung der Reaktionszeit eine geeignete Methode und ein geeigneter Katalysator für die Racemisierung von **TsCHO** gefunden werden. Dabei gibt es nur eine eng begrenzte Anzahl von Möglichkeiten, die mit einer Bioreduktion ohne räumliche Trennung kompatibel sind (vgl. voriger Abschnitt).

7 Literatur

- Adger, B., Dyer, U., Hutton, G. und Woods, M. (1996). "Stereospecific synthesis of the anaesthetic levobupivacaine." *Tetrahedron Lett.*, **37**, 6399-6402.
- Adlercreutz, P. und Mattiasson, B. (1987). "Aspects of biocatalyst stability in organic solvents." *Biocatalysis*, **1**, 99-108.
- Aebischer, B., Frey, P., Haerter, H. P., Herrling, P. L., Mueller, W., Olverman, H. J. und Watkins, J. C. (1989). "Synthesis and NMDA Antagonistic Properties of the Enantiomers of 4-(3-Phosphonopropyl)Piperazine-2-Carboxylic Acid (CPP) and of the Unsaturated Analog (E)-4-(3-Phosphonoprop-2-Enyl)Piperazine-2-Carboxylic Acid (CPP-ENE)." *Helv. Chim. Acta*, **72**, 1043-1051.
- Af Ekenstam, B. T. und Bovin, C. (1987). "L-N-N-Propylpipercolic acid-2,6-xylylidide." *US-Patent*, **US 4,695,576**, 1-8.
- Ager, D. J., Li, T., Pantaleone, D. P., Senkpeil, R. F., Taylor, P. P. und Fotheringham, I. G. (2001). "Novel biosynthetic routes to non-proteinogenic amino acids as chiral pharmaceutical intermediates." *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **11**, 199-205.
- Altenbuchner, J., Siemann-Herzberg, M. und Sylatk, C. (2001). "Hydantoinases and related enzymes as biocatalysts for the synthesis of unnatural chiral amino acids." *Curr. Opin. Biotechnol.*, **12**, 559-563.
- Anderson, E. M., Karin, M. und Kirk, O. (1998). "One biocatalyst - Many applications: The use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis." *Biocatal. Biotransform.*, **16**, 181-204.
- Appella, D. H., Christianson, L. A., Klein, D. A., Powell, D. R., Huang, X. L., Barchi, J. J. und Gellman, S. H. (1997). "Residue-based control of helix shape in β -peptide oligomers." *Nature*, **387**, 381-384.
- Ariente-Fliche, C., Braun, J. und Legoffic, F. (1992). "How to Synthesize Easily Dimethyl (2R) and (2S)-Formylcyclopropane-1,1-Dicarboxylate, a Precursor of a Wide Variety of Substituted Aminocyclopropanecarboxylic Acids." *Synth. Commun.*, **22**, 1149-1153.
- Ariëns, E. J., Soudijn, W. und Timmermans, P. B. M. W. M. (Hrsg.), (1983). *Stereochemistry and Biological Activity of Drugs*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Asensio, G., Andreu, C. und Marco, J. A. (1991). "Enzyme-Mediated Enantioselective Acylation of Secondary-Amines in Organic-Solvents." *Tetrahedron Lett.*, **32**, 4197-4198.
- Azerad, R. (1995). "Application of biocatalysts in organic synthesis." *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **132**, 17-51.
- Bailey, P. D., Millwood, P. A. und Smith, P. D. (1998). "Asymmetric routes to substituted piperidines." *Chem. Commun.*, 633-640.
- Ballesteros, A., Bornscheuer, U., Capewell, A., Combes, D., Condoret, J. S., Koenig, K., Kolisis, F. N., Marty, A., Menge, U., Scheper, T., Stamatidis, H. und Xenakis, A. (1995). "Enzymes in non-conventional phases." *Biocatal. Biotransform.*, **13**, 1-42.

- Barluenga, J., Aznar, F., Valdes, C. und Ribas, C. (1998). "Enantioselective synthesis of substituted pipercolic acid derivatives." *J. Org. Chem.*, **63**, 3918-3924.
- Barton, M. J., Hamman, J. P., Fichter, K. C. und Calton, G. J. (1990). "Enzymatic Resolution of (R,S)-2-(4-Hydroxyphenoxy) Propionic-Acid." *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 577-583.
- Basak, A., Bhattacharya, G. und Palit, S. K. (1997). "Novel regioselective ester hydrolysis by pig-liver esterase." *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **70**, 2509-2513.
- Beck-Sickinger, A. G., Hoffman, E., Paulini, K., Reissig, H. U., Willim, K. D., Wieland, H. A. und Jung, G. (1994). "High-Affinity Analogs of Neuropeptide-Y Containing Conformationally Restricted Non-Proteinogenic Amino-Acids." *Biochem. Soc. Trans.*, **22**, 145-149.
- Bell, E. A. (1976). "Uncommon Amino-Acids in Plants." *FEBS Lett.*, **64**, 29-35.
- Bell, G., Halling, P. J., Moore, B. D., Partridge, J. und Rees, D. G. (1995). "Biocatalyst behaviour in low-water systems." *Trends Biotechnol.*, **13**, 468-473.
- Beumer, R., Bubert, C., Cabrele, C., Vielhauer, O., Pietzsch, M. und Reiser, O. (2000). "The synthesis of diastereo- and enantiomerically pure β -aminocyclopropanecarboxylic acids." *J. Org. Chem.*, **65**, 8960-8969.
- Boehringer-Mannheim (1996). *Chirazyme Lipases & Esterases Screening Set*. (Begleitmaterial).
- Boland, W. und Niedermeyer, U. (1987). "Enantioselective Reduction of Vicinally Substituted Monocyclic Aldehydes With Horse Liver Alcohol-Dehydrogenase - a New Approach to Chiral Alcohols and Aldehydes." *Synthesis*, 28-32.
- Bommarius, A. S., Schwarm, M. und Drauz, K. (1998). "Biocatalysis to amino acid-based chiral pharmaceuticals - examples and perspectives." *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **5**, 1-11.
- Bommarius, A. S., Schwarm, M. und Drauz, K. (2001). "Comparison of different chemoenzymatic process routes to enantiomerically pure amino acids." *Chimia*, **55**, 50-59.
- Bonini, C., Pucci, P. und Viggiani, L. (1991). "A Remarkable Short Synthesis of Optically-Active Mevinic Acid Analogs By Biocatalytic Lactonization of *syn*-3,5-Dihydroxy Esters." *J. Org. Chem.*, **56**, 4050-4052.
- Bornscheuer, U., Herar, A., Kreye, L., Wendel, V., Capewell, A., Meyer, H. H., Scheper, T. und Kolisis, F. N. (1993). "Factors affecting the lipase catalyzed transesterification reactions of 3-hydroxy esters in organic solvents." *Tetrahedron: Asymmetry*, **4**, 1007-1016.
- Bousquet, O. R., Braun, J. und Legoffic, F. (1995). "Countercurrent Chromatography As an Enzymatic Reactor For Organic-Synthesis." *Tetrahedron Lett.*, **36**, 8195-8196.
- Boutelje, J., Hjalmarsson, M., Hult, K., Lindback, M. und Norin, T. (1988). "Control of the Stereoselectivity of Pig-Liver Esterase By Different Reaction Conditions in the Hydrolysis of *cis*-N-Benzyl-2,5-Bismethoxycarbonylpyrrolidine and Structurally Related Diesters." *Bioorganic Chem.*, **16**, 364-375.

- Böhm, C., Schinnerl, M., Bubert, C., Zabel, M., Labahn, T., Parisini, E. und Reiser, O. (2000). "A new strategy for the stereoselective synthesis of 1,2,3-trisubstituted cyclopropanes." *Eur. J. Org. Chem.*, **16**, 2955-2965.
- Böhm, C. und Reiser, O. (2001). "Enantioselective synthesis of (-)-roccellaric acid." *Org. Lett.*, **3**, 1315-1318.
- Braun, M. und Opdenbusch, K. (1997). " α -amino acids and N-protected α -amino aldehydes by stereoselective additions of a chiral vinylolithium reagent to sulfonylimines." *Liebigs Ann.-Recl.*, 141-154.
- Brunner, J. (1993). "Biosynthetic Incorporation of Nonnatural Amino-Acids Into Proteins." *Chem. Soc. Rev.*, **22**, 183-189.
- Bubert, C., Voigt, J., Biasetton, S. und Reiser, O. (1994). "A New Approach to β -Amino and γ -Amino Esters and Amino Aldehydes By Regioselective Ozonolysis of 2,3-Dihydropyrroles and 1,2,3,4-Tetrahydropyridines." *Synlett*, 675-677.
- Bubert, C., Cabrele, C. und Reiser, O. (1997). "Novel strategies for the synthesis of peptides containing *cis*- or *trans*- β -aminocyclopropane-carboxylic acids." *Synlett*, 827-829.
- Budavari, S. (Hrsg.), (1987). *Merck Index*. 11. Auflage, Merck & Co., Inc., Rahway.
- Burgess, K., Ho, K. K. und Moyesherman, D. (1994). "Asymmetric Syntheses of 2,3-Methanoamino Acids." *Synlett*, 575-583.
- Burroughs, L. F. (1957). "1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid: A new amino-acid in perry pears and cider apples." *Nature*, **179**, 360-361.
- Cannon, J. G. und Garst, J. E. (1975). "Ring-Opening Reactions of Certain 2-Carbonyl-Substituted Cyclopropylamines." *J. Org. Chem.*, **40**, 182-184.
- Cardillo, G. und Tomasini, C. (1996). "Asymmetric synthesis of β -amino acids and α -substituted β -amino acids." *Chem. Soc. Rev.*, **25**, 117-128.
- Cardinale, G. J. und Abeles, R. H. (1968). "Purification and mechanism of action of proline racemase." *Biochemistry*, **7**, 3970-3978.
- Chen, C. S., Fujimoto, Y., Girdaukas, G. und Sih, C. J. (1982). "Quantitative-Analyses of Biochemical Kinetic Resolutions of Enantiomers." *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 7294-7299.
- Chen, C. S. und Sih, C. J. (1989). "Enantioselective Biokatalyse in organischen Solventien am Beispiel Lipase-katalysierter Reaktionen." *Angew. Chem.*, **101**, 711-724.
- Chenault, H. K. und Whitesides, G. M. (1987). "Regeneration of Nicotinamide Cofactors For Use in Organic-Synthesis." *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **14**, 147-197.
- Chenault, H. K., Simon, E. S. und Whitesides, G. M. (1988). "Cofactor regeneration for enzyme-catalysed synthesis." *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, **6**, 221-70.
- Copeland, T. D., Wondrak, E. M., Tozser, J., Roberts, M. M. und Oroszlan, S. (1990). "Substitution of Proline With Pipecolic Acid At the Scissile Bond Converts a Peptide Substrate of HIV Proteinase Into a Selective Inhibitor." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **169**, 310-314.

- Cottens, S. und Schlosser, M. (1988). "Attempted and Accomplished Syntheses of a Few Monofluorinated Chrysanthemis Acid-Derivatives." *Tetrahedron*, **44**, 7127-7144.
- Crossley, R. (1992). "The Relevance of Chirality to the Study of Biological-Activity." *Tetrahedron*, **48**, 8155-8178.
- Csuk, R. und Glänzer, B. I. (1991). "Baker's yeast mediated transformations in organic chemistry." *Chem. Rev.*, **91**, 49-97.
- Csuk, R. und von Scholz, Y. (1994). "Synthesis of Cyclopropyl Carbocyclic Nucleosides." *Tetrahedron*, **50**, 10431-10442.
- Davies, S. G. und Ichihara, O. (1999). "Asymmetric synthesis of a highly functionalized β -amino acid: the key amino acid of sperabillins B and D." *Tetrahedron Lett.*, **40**, 9313-9316.
- Dinh, P. M., El Gihani, M. T., Williams, J. M. J. und Harris, W. (1998). "Dynamic kinetic resolution using enzymes and transition metals combination." *Chim. Oggi-Chem. Today*, **16**, 42-44.
- Dougherty, D. A. (2000). "Unnatural amino acids as probes of protein structure and function." *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **4**, 645-652.
- Doyle, M. P. und Protopopova, M. N. (1998). "New aspects of catalytic asymmetric cyclopropanation." *Tetrahedron*, **54**, 7919-7946.
- Drauz, K. und Waldmann, H. (Hrsg.), (1995). *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis - A Comprehensive Handbook*. VCH, Weinheim.
- Drey, C. N. C. (1977). "The chemistry and biochemistry of β -amino acids." in: *Chemistry and biochemistry of amino-acids, peptides, and proteins*. (Hrsg.: Weinstein, B.), Marcel Dekker, New York, Band 4, S. 241-299.
- Drey, C. N. C. (1985). " β and Higher Homologous Amino Acids." in: *Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids*. (Hrsg.: Barrett, G. C.), Chapman and Hall, London, S. 25-54.
- Ebbers, E. J., Ariaans, G. J. A., Houbiers, J. P. M., Bruggink, A. und Zwanenburg, B. (1997). "Controlled racemization of optically active organic compounds: Prospects for asymmetric transformation." *Tetrahedron*, **53**, 9417-9476.
- Eichhorn, E., Roduit, J. P., Shaw, N., Heinzmann, K. und Kiener, A. (1997). "Preparation of (S)-piperazine-2-carboxylic acid, (R)-piperazine-2-carboxylic acid, and (S)-piperidine-2-carboxylic acid by kinetic resolution of the corresponding racemic carboxamides with stereoselective amidases in whole bacterial cells." *Tetrahedron: Asymmetry*, **8**, 2533-2536.
- El Gihani, M. T. und Williams, J. M. J. (1999). "Dynamic kinetic resolution." *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**, 11-15.
- Faber, K. (1997). *Biotransformations in Organic Chemistry*. 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin.
- Faber, K. (2001). "Non-sequential processes for the transformation of a racemate into a single stereoisomeric product: Proposal for stereochemical classification." *Chem.-Eur. J.*, **7**, 5004-5010.
- Finlay, T. H. und Adams, E. (1970). "Kinetic and Structural Studies of Hydroxyproline 2-Epimerase." *J. Biol. Chem.*, **245**, 5248-5260.

- Fleet, G. W. J. und Witty, D. R. (1990). "Synthesis of Homochiral β -Hydroxy- α -Amino-Acids [(2R,3R,4R)-3,4-Dihydroxyproline and (2S,3R,4R)-3,4-Dihydroxypipercolic Acid] and of 1,4-Dideoxy-1,4-Imino-D-Arabinitol [Dab1] and Fagomine [1,5-Imino-1,2,5-Trideoxy-D-Arabino-Hexitol]." *Tetrahedron: Asymmetry*, **1**, 119-136.
- Fliche, C., Braun, J. und Legoffic, F. (1991). "An Enzymatic Enantioselective Route to Methyl Carboxylate 2,3-Methanohomoserine γ -Lactone - a Precursor of Chiral 2,3-Methanohomoserine." *Synth. Commun.*, **21**, 1429-1432.
- Flügge, J. (1970). *Grundlagen der Polarimetrie : Gerätekunde und Messtechnik*. DeGruyter Verlagsgesellschaft, Berlin.
- Fowden, L., Lea, P. J. und Bell, E. A. (1979). "The nonprotein amino acids of plants." *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, **50**, 117-175.
- Fülöp, F. (2001). "The chemistry of 2-aminocycloalkanecarboxylic acids." *Chem. Rev.*, **101**, 2181-2204.
- Gellman, S. H. (1998). "Foldamers: A manifesto." *Accounts Chem. Res.*, **31**, 173-180.
- Gomez-Catalan, J., Aleman, C. und Perez, J. J. (2000). "Conformational profile of 1-aminocyclopropanecarboxylic acid." *Theor. Chem. Acc.*, **103**, 380-389.
- Grandjean, D., Pale, P. und Chucho, J. (1991). "Synthesis of Optically Pure *cis* Epoxyalcohols via an Enzymatic Route; An Alternative to the Sharpless Asymmetric Epoxidation." *Tetrahedron Lett.*, **32**, 3043.
- Griffith, O. W. (1986). " β -Amino Acids - Mammalian Metabolism and Utility As α -Amino-Acid Analogs." *Annu. Rev. Biochem.*, **55**, 855-878.
- Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J. D., Bouthillier, F., Smith, P., Harrison, D., Rubin, B. und Cygler, M. (1993). "Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase." *J. Biol. Chem.*, **268**, 12843-12847.
- Grunwald, J., Wirz, B., Scollar, M. P. und Klivanov, A. M. (1986). "Asymmetric Oxidoreductions Catalyzed By Alcohol-Dehydrogenase in Organic-Solvents." *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 6732-6734.
- Guibe-Jampel, E., Rousseau, G. und Blanco, L. (1989). "Enzymatic Resolution of Racemic Bicyclic Lactones By Horse Liver Esterase." *Tetrahedron Lett.*, **30**, 67-68.
- Guo, Z. W. und Sih, C. J. (1989). "Enantioselective Inhibition - a Strategy For Improving the Enantioselectivity of Biocatalytic Systems." *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 6836-6841.
- Gupta, S., Krasnoff, S. B., Roberts, D. W., Renwick, J. A. A., Brinen, L. S. und Clardy, J. (1991). "Structures of the Efrapeptins - Potent Inhibitors of Mitochondrial ATPase From the Fungus *Tolyposcladium niveum*." *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 707-709.
- Halling, P. J. (1994). "Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis." *Enzyme Microb. Technol.*, **16**, 178-206.
- Hansch, C. und Leo, A. (1979). *Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*. Wiley-Interscience, New York.

- Hibbs, D. E., Hursthouse, M. B., Jones, I. G., Jones, W., Malik, K. M. A. und North, M. (1997). "A facile approach for the synthesis of pseudo-peptides incorporating a (2S,3R)-2-amino-cyclopropane carboxylic acid residue." *Tetrahedron*, **53**, 17417-17424.
- Ho, B. und Zabriskie, T. M. (1998). "Epoxide derivatives of pipercolic acid and proline are inhibitors of pipercolate oxidase." *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8**, 739-744.
- Hockless, D. C. R., Mayadunne, R. C. und Wild, S. B. (1995). "Convenient resolution of (+/-)-piperidine-2-carboxylic acid ((+/-)-pipercolic acid) by separation of palladium(II) diastereomers containing orthometallated (S)-(-)-1-[1-(dimethylamino)ethyl]naphthalene." *Tetrahedron: Asymmetry*, **6**, 3031-3037.
- Holmberg, E. und Hult, K. (1991). "Temperature As an Enantioselective Parameter in Enzymatic Resolutions of Racemic Mixtures." *Biotechnol. Lett.*, **13**, 323-326.
- Horgan, D. J., Stoops, J. K., Webb, E. C. und Zerner, B. (1969). "Carboxylesterases (EC 3.1.1). A large-scale purification of pig liver carboxylesterase." *Biochemistry*, **8**, 2000-2006.
- Horjales, E. und Brändén, C. I. (1985). "Docking of Cyclohexanol-derivatives into the Active Site of Liver Alcohol Dehydrogenase." *J. Biol. Chem.*, **260**, 15445-15450.
- Hubbard, B. K., Thomas, M. G. und Walsh, C. T. (2000). "Biosynthesis of L-p-hydroxyphenylglycine, a non-proteinogenic amino acid constituent of peptide antibiotics." *Chem. Biol.*, **7**, 931-942.
- Huerta, F. F., Minidis, A. B. E. und Backvall, J. E. (2001). "Racemisation in asymmetric synthesis. Dynamic kinetic resolution and related processes in enzyme and metal catalysis." *Chem. Soc. Rev.*, **30**, 321-331.
- Huh, J. W., Yokoigawa, K., Esaki, N. und Soda, K. (1992). "Total Conversion of Racemic Pipercolic Acid Into the L-Enantiomer By a Combination of Enantiospecific Oxidation With D-Amino-Acid Oxidase and Reduction With Sodium-Borohydride." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 2081-2082.
- Ibba, M. und Hennecke, H. (1994). "Towards Engineering Proteins By Site-Directed Incorporation in-Vivo of Nonnatural Amino-Acids." *Bio-Technology*, **12**, 678-682.
- Ishida, H. und Inoue, Y. (1999). "Peptides that contain unnatural amino acids: Toward artificial proteins." *Rev. Heteroatom Chem.*, **19**, 79-142.
- Ito, H., Imai, N., Tanikawa, S. und Kobayashi, S. (1996). "Enantioselective synthesis of curacin A .1. Construction of C1-C7, C8-C17, and C18-C22 segments." *Tetrahedron Lett.*, **37**, 1795-1798.
- Iverson, B. L. (1997). "Chemical synthesis - betas are brought into the fold." *Nature*, **385**, 113-115.
- Jones, J. B. und Beck, J. F. (1976). "Applications of biochemical systems in organic chemistry." in: *Techniques of Chemistry*. (Hrsg.: Jones, J. B., Sih, C. J. und Perlman, D.), Wiley, New York, Band 10, S. 107-401.
- Jones, J. B. und Jakovac, I. J. (1982). "Enzymes in organic synthesis. Part 20. A new cubic-space section model for predicting the specificity of horse liver alcohol dehydrogenase-catalyzed oxidoreductions." *Can. J. Chem.*, **60**, 19-28.

- Juaristi, E. (Hrsg.), (1997). *Enantioselective Synthesis of β -amino acids*. Wiley-VCH, New York.
- Juaristi, E. und Lopez-Ruiz, H. (1999). "Recent advances in the enantioselective synthesis of β -amino acids." *Curr. Med. Chem.*, **6**, 983-1004.
- Jurczak, J. und Golebiowski, A. (1989). "Optically-Active N-Protected α -Amino Aldehydes in Organic-Synthesis." *Chem. Rev.*, **89**, 149-164.
- Katayama, N., Urabe, I. und Okada, H. (1983). "Steady-State Kinetics of Coupled 2-Enzyme Reactor With Recycling of Poly(Ethylene Glycol)-Bound NAD." *Eur. J. Biochem.*, **132**, 403-409.
- Kato, S., Hamada, Y. und Shioiri, T. (1988). "New Methods and Reagents in Organic-Synthesis 79. a Practical Synthesis of the Peptide Part of Jaspamide (Jasplakinolide), a Cyclodepsipeptide From a Marine Sponge." *Tetrahedron Lett.*, **29**, 6465-6466.
- Khaw, L. E., Bohm, G. A., Metcalfe, S., Staunton, J. und Leadlay, P. F. (1998). "Mutational biosynthesis of novel rapamycins by a strain of *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 5491 disrupted in rapL, encoding a putative lysine cyclodeaminase." *J. Bacteriol.*, **180**, 809-814.
- Kierkels, J. G. T. und Peeters, W. P. H. (1994). "Process for the enzymatic preparation of optically active transglycidic acid esters." *Europäisches Patent*, **EP 0 602 740 A1**, 1-7.
- Kisfaludy, L., Koenczki, F. und Katho, A. (1982). "One-Step Synthesis of L-Piperidine-2-Carboxylic Acid." *Synthesis*, 163-163.
- Knight, D. W., Lewis, N., Share, A. C. und Haigh, D. (1998). " β -Hydroxypiperidinecarboxylates: additions to the chiral pool from bakers' yeast reductions of β -ketopiperidinecarboxylates." *J. Chem. Soc.-Perkin Trans. 1*, 3673-3683.
- Koh, K., Ben, R. N. und Durst, T. (1993). "Reaction of (R)-Pantolactone Esters of α -Bromoacids With Amines - a Remarkable Synthesis of Optically-Active α -Amino Esters." *Tetrahedron Lett.*, **34**, 4473-4476.
- Konopelski, J. P., Chu, K. S. und Negrete, G. R. (1991). "Self-Reproduction of Chirality - Asymmetric-Synthesis of β -Aryl- β -Amino Acids From Enantiomerically Pure Dihydropyrimidinones." *J. Org. Chem.*, **56**, 1355-1357.
- Kragl, U., Vasic-Racki, D. und Wandrey, C. (1992). "Kontinuierliche Reaktionsführung mit löslichen Enzymen." *Chem.-Ing.-Tech.*, **64**, 499-509.
- Kragl, U., Kruse, W., Hummel, W. und Wandrey, C. (1996a). "Enzyme engineering aspects of biocatalysis: cofactor regeneration as example." *Biotechnol. Bioeng.*, **52**, 309-319.
- Kragl, U., Vasic-Racki, D. und Wandrey, C. (1996b). "Continuous production of L-tert-leucine in series of two enzyme membrane reactors: Modelling and computer simulation." *Bioprocess Eng.*, **14**, 291-297.
- Kruse, W., Hummel, W. und Kragl, U. (1996). "Alcohol-dehydrogenase-catalyzed production of chiral hydrophobic alcohols. A new approach leading to a nearly waste-free process." *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **115**, 239-243.

- Kula, M. R. und Wandrey, C. (1987). "Continuous Enzymatic Transformation in an Enzyme-Membrane Reactor with Simultaneous NADH Regeneration." in: *Methods in Enzymology*. (Hrsg.: Mosbach, K.), Academic Press, New York, Band 136, S. 9-21.
- Laane, C. (1987). "Medium engineering for bio-organic synthesis." *Biocatalysis*, **1**, 17-22.
- Laane, C., Boeren, S., Vos, K. und Veeger, C. (1987). "Rules For Optimization of Biocatalysis in Organic-Solvents." *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 81-87.
- Lam, L. K. P., Hui, R. A. H. F. und Jones, J. B. (1986). "Enzymes in Organic Synthesis, 35. Stereoselective Pig-Liver Esterase Catalysed Hydrolysis of 3-Substituted Glutamate Diesters - Optimisation of Enantiomeric Excess via Reaction Condition Control." *J. Org. Chem.*, **51**, 2047-2050.
- Lemière, G. L., Van Osselaer, T. A., Lepoivre, J. A. und Alderweireldt, F. C. (1982). "Enzymic in vitro reduction of ketones. Part 8. A new model for the reduction of cyclic ketones by horse liver alcohol dehydrogenase." *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1123-1128.
- Liebeton, K., Zonta, A., Schimossek, K., Nardini, M., Lang, D., Dijkstra, B. W., Reetz, M. T. und Jaeger, K. E. (2000). "Directed evolution of an enantioselective lipase." *Chem. Biol.*, **7**, 709-18.
- Liese, A., Zelinski, T., Kula, M. R., Kierkels, H., Karutz, M., Kragl, U. und Wandrey, C. (1998). "A novel reactor concept for the enzymatic reduction of poorly soluble ketones." *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **4**, 91-99.
- Lilly, M. D., Brazier, M. J., Hocknull, M. D., Williams, A. C. und Woodley, J. M. (1987). "Biological Conversions involving water-insoluble Organic Compounds." in: *Biocatalysis in Organic Media*. (Hrsg.: Laane, C., Tramper, J. und Lilly, M. D.), Elsevier, Amsterdam, S. 3-17.
- Lombardi, A., Saviano, M., Natri, F., Maglio, O., Mazzeo, M., Pedone, C., Isernia, C. und Pavone, V. (1996). "Unusual conformational preferences of β -alanine containing cyclic peptides .7." *Biopolymers*, **38**, 683-691.
- Lombardi, A., Saviano, M., Natri, F., Maglio, O., Mazzeo, M., Isernia, C., Paolillo, L. und Pavone, V. (1996). "Solvent-mediated conformational transition in β -alanine containing cyclic peptides .8." *Biopolymers*, **38**, 693-703.
- Lu, W. und Sih, C. J. (1999). "Chemoenzymatic synthesis of macrocyclic polyamines." *Tetrahedron Lett.*, **40**, 4965-4968.
- Lubell, W. D. und Rapoport, H. (1987). "Configurational Stability of N-Protected α -Amino Aldehydes." *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 236-239.
- Lundhaug, K., Overbeeke, P. L. A., Jongejan, J. A. und Anthonsen, T. (1998). "Organic co-solvents restore the inherently high enantiomeric ratio of lipase B from *Candida antarctica* in hydrolytic resolution by relieving the enantiospecific inhibition of product alcohol." *Tetrahedron: Asymmetry*, **9**, 2851-2856.
- Marcotte, S., Pannecoucke, X., Feasson, C. und Quirion, J. C. (1999). "Enantioselective synthesis of α,α -difluoro- β -amino acid and 3,3-difluoroazetidin-2-one via the Reformatsky-type reaction of ethyl bromodifluoroacetate with chiral 1,3-oxazolidines." *J. Org. Chem.*, **64**, 8461-8464.

- Martin-Munoz, M. G., Fierros, M., Rodriguez-Franco, M. I. und Conde, S. (1994). "Mucor-Miehei Lipase-Catalyzed Transesterifications On Aromatic and Heteroaromatic Substrates - a General Survey." *Tetrahedron*, **50**, 6999-7008.
- Martinelle, M., Holmquist, M. und Hult, K. (1995). "On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase." *Biochim. Biophys. Acta*, **1258**, 272-276.
- Martres, M., Gil, G. und Meou, A. (1994). "Preparation of Optically-Active Aziridine Carboxylates By Lipase-Catalyzed Alcoholysis." *Tetrahedron Lett.*, **35**, 8787-8790.
- Merck, E. (1970). *Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papier-Chromatographie*. E. Merck, Darmstadt.
- Merck, E. (1998). *Laborprodukte für die Praxis: Trocknen im Labor und Technikum*. (Produktinformationsmaterial).
- Meyer, J. J. M. und Grobbelaar, N. (1986). "Biosynthesis of Pipecolic Acid and 4-Hydroxypipicolic Acid." *Phytochemistry*, **25**, 1469-1470.
- Michael, J. P. (2001). "Indolizidine and quinolizidine alkaloids." *Nat. Prod. Rep.*, **18**, 520-542.
- Miyabe, H., Fujii, K. und Naito, T. (1999). "Highly diastereoselective radical addition to oxime ethers: Asymmetric synthesis of β -amino acids." *Org. Lett.*, **1**, 569-572.
- Mochizuki, K., Yamazaki, Y. und Maeda, H. (1988). "Simultaneous Production of D-Pipicolic Acid and L- α -Aminoadipic Acid From DL-Pipicolic Acid Using a Microorganism." **52**, 1113-1116.
- Mohr, P., Waesperarcevic, N., Tamm, C., Gawronska, K. und Gawronski, J. K. (1983). "A Study of Stereoselective Hydrolysis of Symmetrical Diesters With Pig-Liver Esterase." *Helv. Chim. Acta*, **66**, 2501-2511.
- Mori, K. und Tomioka, H. (1992). "Synthesis of 4 Macrolide Pheromones to Define the Scope and Limitation of Enzymatic Macrolactonization." *Liebigs Ann. Chem.*, 1011-1017.
- Moss, W. O., Wakefield, E., Mahon, M. F., Molloy, K. C., Bradbury, R. H., Hales, N. J. und Gallagher, T. (1992). "Ketene-S,S-Acetals As 1,3-Dipolarophiles Towards Azides - a New Synthetic Entry Into Cyclic Amino-Acids." *Tetrahedron*, **48**, 7551-7564.
- Moye-Sherman, D., Jin, S., Li, S. M., Welch, M. B., Reibenspies, J. und Burgess, K. (1999). "Cyclopropane amino acids that mimic two $\chi(1)$ -conformations of phenylalanine." *Chem.-Eur. J.*, **5**, 2730-2739.
- Müller, K. D., Husmann, H., Nalik, H. P. und Schomburg, G. (1990). "Transesterification of Fatty-Acids From Microorganisms and Human Blood-Serum By Trimethylsulfonium Hydroxide (TMSH) For GC Analysis." *Chromatographia*, **30**, 245-248.
- Myers, A. G., Gleason, J. L., Yoon, T. und Kung, D. W. (1997). "Highly practical methodology for the synthesis of D- and L- α -amino acids, N-protected α -amino acids, and N-methyl- α -amino acids." *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 656-673.

- Nakamura, K., Aizawa, M. und Miyawaki, O. (1988). *Electro-enzymology. Coenzyme Regeneration*. (Hrsg.: Aiba, S., Fan, L. T., Fiechter, A., Klein, J. und Schügerl, K.), Springer, Berlin Heidelberg.
- Nakazaki, M., Chikamatsu, H., Naemura, K., Sasaki, Y. und Fujii, T. (1980). "The C₂-Ketone Rule in Horse Liver Alcohol Dehydrogenase (HLADH)-catalysed Oxidation and Reduction." *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 626-627.
- Naumer, H. und Heller, W. (Hrsg.), (1986). *Untersuchungsmethoden in der Chemie: Einführung in die moderne Analytik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Neuhauser, W., Steininger, M., Haltrich, D., Kulbe, K. D. und Nidetzky, B. (1998). "A pH-controlled fed-batch process can overcome inhibition by formate in NADH-dependent enzymatic reductions using formate dehydrogenase-catalyzed coenzyme regeneration." *Biotechnol. Bioeng.*, **60**, 277-282.
- Ng-Youn-Chen, M. C., Serreqi, A. N., Huang, Q. L. und Kazlauskas, R. J. (1994). "Kinetic Resolution of Pipecolic Acid Using Partially-Purified Lipase From *Aspergillus niger*." *J. Org. Chem.*, **59**, 2075-2081.
- Nishizawa, M., Gomi, H. und Kishimoto, F. (1993). "Purification and Some Properties of Carboxylesterase From *Arthrobacter globiformis* - Stereoselective Hydrolysis of Ethyl Chrysanthemate." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**, 594-598.
- Nocioni, A. M., Papa, C. und Tomasini, C. (1999). "A facile and stereocontrolled synthesis of syn- α -alkyl α -hydroxy β -amino acids." *Tetrahedron Lett.*, **40**, 8453-8456.
- Norman, R. und Coxon, J. M. (1993). *Principles of organic synthesis*. 3. Auflage, Blackie Academic & Professional, London.
- North, M. (2000). "Incorporation of conformationally constrained β -amino acids into peptides." *J. Pept. Sci.*, **6**, 301-313.
- Noyori, R., Tokunaga, M. und Kitamura, M. (1995). "Stereoselective Organic-Synthesis Via Dynamic Kinetic Resolution." *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **68**, 36-55.
- Ohfuné, Y. (1992). "Stereoselective Routes Toward the Synthesis of Unusual Amino-Acids." *Accounts Chem. Res.*, **25**, 360-366.
- Ojima, I., Lin, S. N. und Wang, T. (1999). "Recent advances in the medicinal chemistry of taxoids with novel β -amino acid side chains." *Curr. Med. Chem.*, **6**, 927-954.
- Ottenheijm, H. C. J. (1985). "Uncommon Amino-Acids in the Strategy of Natural Product Synthesis." *Chimia*, **39**, 89-98.
- Ozegowski, R., Kunath, A. und Schick, H. (1993 a). "Enzymes in Organic-Synthesis 18. Lipase-Catalyzed Asymmetric Alcoholysis of 3-Substituted Pentanedioic Anhydrides." *Liebigs Ann. Chem.*, 805-808.
- Ozegowski, R., Kunath, A. und Schick, H. (1993 b). "Synthesis of 2,4-Dimethylglutaric Acid Monoesters Via Enzyme-Catalyzed Asymmetric Alcoholysis of meso-2,4-Dimethylglutaric Anhydride." *Tetrahedron: Asymmetry*, **4**, 695-698.
- O'Hagan, D. (1997). "Pyrrole, pyrrolidine, pyridine, piperidine, azepine and tropane alkaloids." *Nat. Prod. Rep.*, **14**, 637-651.

- Palomo, C., Oiarbide, M., Gonzalez-Rego, M. C., Sharma, A. K., Garcia, J. M., Gonzalez, A., Landa, C. und Linden, A. (2000). " α -oxymethyl ketone enolates for the asymmetric mannich reaction. From acetylene and N-alkoxycarbonylimines to β -amino acids." *Angew. Chem.-Int. Edit.*, **39**, 1063-1065.
- Pamperin, D., Hopf, H., Syldatk, C. und Pietzsch, M. (1997). "Synthesis of planar chiral [2.2]paracyclophanes by biotransformations: Kinetic resolution of 4-formyl-[2.2]paracyclophane by asymmetric reduction." *Tetrahedron: Asymmetry*, **8**, 319-325.
- Pamperin, D. (1998). "Enantioselektive Biotransformationen an planar chiralen [2.2]Paracyclophanen." *Dissertation*, Universität Stuttgart, Stuttgart.
- Pamperin, D., Schulz, C., Hopf, H., Syldatk, C. und Pietzsch, M. (1998 b). "Chemoenzymatic synthesis of optically pure planar chiral (S)-(-)-5-formyl-4-hydroxy[2.2]paracyclophane." *Eur. J. Org. Chem.*, 1441-1445.
- Pamperin, D., Ohse, B., Hopf, H. und Pietzsch, M. (1998 c). "Synthesis of planar-chiral [2.2]paracyclophanes by biotransformations: screening for hydrolase activity for the kinetic resolution of 4-acetoxy-[2.2]paracyclophane." *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **5**, 317-319.
- Patrick, K. S. und Singletary, J. L. (1991). "Relative Configuration of Thioridazine Enantiomers." *Chirality*, **3**, 208-211.
- Paulini, K. und Reissig, H. U. (1991). "An Efficient Route to GABA-Analogous Amino-Acids - Cyclopropanation of N-Silylated Allylamines and Enamines." *Liebigs Ann. Chem.*, 455-461.
- Paulini, K. und Reissig, H. U. (1994). "Synthesis of Dipeptides Containing Novel Cyclopropyl-Substituted and Cyclopropenyl-Substituted β -Amino and γ -Amino Acids." *Liebigs Ann. Chem.*, 549-554.
- Pavone, V., Lombardi, A., Dauria, G., Saviano, M., Nastri, F., Paolillo, L., Diblasio, B. und Pedone, C. (1992). " β -Alanine Containing Peptides - a Novel Molecular Tool For the Design of γ -Turns." *Biopolymers*, **32**, 173-183.
- Perlow, D. S., Erb, J. M., Gould, N. P., Tung, R. D., Freidinger, R. M., Williams, P. D. und Veber, D. F. (1992). "Use of N-Fmoc Amino-Acid Chlorides and Activated 2-(Fluorenylmethoxy)-5(4h)-Oxazolones in Solid-Phase Peptide-Synthesis - Efficient Syntheses of Highly N-Alkylated Cyclic Hexapeptide Oxytocin Antagonists Related to L-365,209." *J. Org. Chem.*, **57**, 4394-4400.
- Perumattam, J., Shearer, B. G., Confer, W. L. und Mathew, R. M. (1991). "Synthesis of (D)-Forms and (L)-Forms of Differentially Protected 2-Piperidine-methanamine." *Tetrahedron Lett.*, **32**, 7183-7186.
- Petersen, M., Beck, W. und Heinzmann, K. (2000). "Method for Preparing (2R)-Piperidine Derivatives." *Internationales Patent*, **WO 00/12745**, 1-18.
- Philips, R. S. (1996). "Temperature Modulation of the Stereochemistry of Enzymatic Catalysis: Prospects for Exploitation." *TIBTECH*, **14**, 13-16.
- Plunkett, A. O. (1994). "Pyrrole, Pyrrolidine, Pyridine, Piperidine, and Azepine Alkaloids." *Nat. Prod. Rep.*, **11**, 581-590.
- Porter, E. A., Wang, X. F., Lee, H. S., Weisblum, B. und Gellman, S. H. (2000). "Antibiotics - Non-haemolytic β -amino-acid oligomers." *Nature*, **404**, 565-565.

- Pozo, M. und Gotor, V. (1993). "Chiral carbamates through an enzymic alkoxy-carbonylation reaction." *Tetrahedron*, **49**, 4321-4326.
- Prelog, V. (1964). "Specification of the stereospecificity of some oxido-reductases by diamond lattice sections." *Pure Appl. Chem.*, **9**, 119-130.
- Quiros, M., Astorga, C., Rebolledo, F. und Gotor, V. (1995). "Enzymatic Selective Transformations of Diethyl Fumarate." *Tetrahedron*, **51**, 7715-7720.
- Qureshi, A., Colin, P. L. und Faulkner, D. J. (2000). "Microsclerodermins F-I, antitumor and antifungal cyclic peptides from the lithistid sponge *Microscleroderma* sp." *Tetrahedron*, **56**, 3679-3685.
- Rakels, J. L. L., Straathof, A. J. J. und Heijnen, J. J. (1993). "A Simple Method to Determine the Enantiomeric Ratio in Enantioselective Biocatalysis." *Enzyme Microb. Technol.*, **15**, 1051-1056.
- Rakels, J. L. L., Caillat, P., Straathof, A. J. J. und Heijnen, J. J. (1994). "Modification of the Enzyme Enantioselectivity By Product Inhibition." *Biotechnol. Prog.*, **10**, 403-409.
- Rao, A. B., Rehman, H., Krishnakumari, B. und Yadav, J. S. (1994). "Lipase-Catalyzed Kinetic Resolution of Racemic (+/-)2,2-Dimethyl-3-(2-Methyl-1-Propenyl)-Cyclopropane Carboxyl Esters." *Tetrahedron Lett.*, **35**, 2611-2614.
- Reichardt, C. (1994). "Solvatochromic Dyes As Solvent Polarity Indicators." *Chem. Rev.*, **94**, 2319-2358.
- Reissig, H. U. (1988). "Donor-Acceptor-Substituted Cyclopropanes - Versatile Building-Blocks in Organic-Synthesis." *Top. Curr. Chem.*, **144**, 73-135.
- Rittle, K. E., Homnick, C. F., Ponticello, G. S. und Evans, B. E. (1982). "A Synthesis of Statine Utilizing an Oxidative Route to Chiral α -Amino Aldehydes." *J. Org. Chem.*, **47**, 3016-3018.
- Rodwell, V. W. (1971). "Pipelicolic acid." *Methods Enzymol.*, **17B**, 174-188.
- Rupprecht, K. M., Baker, R. K., Boger, J., Davis, A. A., Hodges, P. J. und Kinneary, J. F. (1998). "Synthetic studies on the immunosuppressive agent FK-506: Construction of the polycarbonyl region." *Tetrahedron Lett.*, **39**, 233-236.
- Rusconi di Lugano, F. R., Monteiro, J., Fliche, C., Braun, J. und le Goffic, F. (1992). "An Enantioselective Chemoenzymatic Synthesis of the 4 1-Amino 2-Methylcyclopropane Carboxylic-Acids." *Synth. Commun.*, **22**, 1155-1158.
- Ryzewski, C. N. und Pietruszko, R. (1977). "Horse liver alcohol dehydrogenase SS: purification and characterization of the homogenous isoenzyme." *Arch. Biochem. Biophys.*, **183**, 73-82.
- Sabbioni, G. und Jones, J. B. (1987). "Enzymes in Organic-Synthesis 39. Preparations of Chiral Cyclic Acid-Esters and Bicyclic Lactones Via Stereoselective Pig-Liver Esterase Catalyzed Hydrolyses of Cyclic Meso Diesters." *J. Org. Chem.*, **52**, 4565-4570.
- Salaün, J. und Baird, M. S. (1995). "Biologically-Active Cyclopropanes and Cyclopropenes." *Curr. Med. Chem.*, **2**, 511-542.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Hrsg.: Nolan, C.), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- Sanchez-Sancho, F. S. und Herradon, B. (1998). "Short syntheses of (S)-pipecolic acid, (R)-coniine, and (S)- δ -coniceine using biocatalytically-generated chiral building blocks." *Tetrahedron: Asymmetry*, **9**, 1951-1965.
- Scarborough, R. M. (1999). "Structure-activity relationships of β -amino acid-containing integrin antagonists." *Curr. Med. Chem.*, **6**, 971-981.
- Schenk, G. O. und Steinmetz, R. (1963). "Photochemische Bildungsweisen und Umlagerungen von Thiopheno- und Furano-Cyclopropan-carbonsäureestern." *Liebigs Ann. Chem.*, **668**, 19-30.
- Schmid, R. D. und Verger, R. (1998). "Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications." *Angew. Chem.-Int. Edit.*, **37**, 1609-1633.
- Schmidt, E., Ghisalba, O., Gygax, D. und Sedelmeier, G. (1992). "Optimization of a Process For the Production of (R)-2-Hydroxy-4-Phenylbutyric Acid - an Intermediate For Inhibitors of Angiotensin Converting Enzyme." *J. Biotechnol.*, **24**, 315-327.
- Schneider, M., Engel, N. und Boensmann, H. (1984 a). "Enzymatic Syntheses of Chiral Building-Blocks From Racemates - Preparation of (1R,3R)-Chrysanthemic, (1R,3R)-Permethrinic and (1R,3R)-Caronic Acids From Racemic, Diastereomeric Mixtures." *Angew. Chem.-Int. Edit. Engl.*, **23**, 64-66.
- Schneider, M., Engel, N., Honicke, P., Heinemann, G. und Gorisch, H. (1984 b). "Hydrolytic Enzymes in Organic-Synthesis 3. Enzymatic Syntheses of Chiral Building-Blocks From Prochiral Meso-Substrates - Preparation of Methyl(Hydrogen)-1,2-Cycloalkanedicarboxylates." *Angew. Chem.-Int. Edit. Engl.*, **23**, 67-68.
- Schneider, M. J. (1996) in: *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*. (Hrsg.: Pelletier, S. W.), Wiley, New York, Band 10, S. 155-299.
- Schotten, T., Boland, W. und Jaenicke, L. (1985). "Synthesis of Enantiomerically Pure Pheromones of South-Pacific Brown-Algae - Hormosirene and Dictyoptere A." *Helv. Chim. Acta*, **68**, 1186-1192.
- Schütte, H., Flossdorf, J., Sahn, H. und Kula, M. R. (1976). "Purification and Properties of Formaldehyde Dehydrogenase and Formate Dehydrogenase From *Candida boidinii*." *Eur. J. Biochem.*, **62**, 151-160.
- Seebach, D. und Matthews, J. L. (1997). " β -peptides: A surprise at every turn." *Chem. Commun.*, 2015-2022.
- Seebach, D., Abele, S., Schreiber, J. V., Martinoni, B., Nussbaum, A. K., Schild, H., Schulz, H., Hennecke, H., Woessner, R. und Bitsch, F. (1998). "Biological and pharmacokinetic studies with β -peptides." *Chimia*, **52**, 734-739.
- Seebach, D., Abele, S., Gademann, K. und Jaun, B. (1999). "Pleated sheets and turns of β -peptides with proteinogenic side chains." *Angew. Chem.-Int. Edit.*, **38**, 1595-1597.
- Segel, I. H. (1975). *Enzyme Kinetics : Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. 1. Auflage, Wiley, New York.
- Servi, S. (1990). "Baker Yeast As a Reagent in Organic-Synthesis." *Synthesis*, **1**, 1-25.

- Shiraiwa, T., Shinjo, K. und Kurokawa, H. (1991). "Asymmetric Transformations of Proline and 2-Piperidinecarboxylic Acid Via Formation of Salts With Optically-Active Tartaric Acid." *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **64**, 3251-3255.
- Sih, C. J. und Wu, S. H. (1989). "Resolution of Enantiomers Via Biocatalysis." *Top. Stereochem.*, **19**, 63-125.
- Stanfield, C. F., Parker, J. E. und Kanellis, P. (1981). "Preparation of Protected Amino Aldehydes." *J. Org. Chem.*, **46**, 4797-4798.
- Stecher, H. und Faber, K. (1997). "Biocatalytic deracemization techniques: Dynamic resolutions and stereoinversions." *Synthesis*, 1-16.
- Straathof, A. J. J. und Jongejan, J. A. (1997). "The enantiomeric ratio: origin, determination and prediction." *Enzyme Microb. Technol.*, **21**, 559-571.
- Stürmer, R. (1997). "Enzyme und Übergangsmetallkomplexe Hand in Hand - ein neuer Ansatz zur dynamischen kinetischen Racematspaltung." *Angew. Chem.*, **109**, 1221-1222.
- Takahata, H. und Momose, T. (1993) in: *The Alkaloids. Chemistry and Pharmacology*. (Hrsg.: Cordell, G. A.), Academic Press, Inc., San Diego, Band 44, S. 189-256.
- Takeuchi, Y. und Marshall, G. R. (1998). "Conformational analysis of reverse-turn constraints by N-methylation and N-hydroxylation of amide bonds in peptides and non-peptide mimetics." *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 5363-5372.
- Tang, T. P. und Ellman, J. A. (1999). "The *tert*-butanesulfinyl group: An ideal chiral directing group and boc-surrogate for the asymmetric synthesis and applications of β -amino acids." *J. Org. Chem.*, **64**, 12-13.
- Tewari, Y. B., Miller, M. M., Wasik, S. P. und Martire, D. E. (1982). "Aqueous Solubility and Octanol Water Partition Coefficient of Organic Compounds at 25.0 °C." *J. Chem. Eng. Data*, **27**, 451-454.
- Thai, D. L., Sapko, M. T., Reiter, C. T., Bierer, D. E. und Perel, J. M. (1998). "Asymmetric synthesis and pharmacology of methylphenidate and its para-substituted derivatives." *J. Med. Chem.*, **41**, 591-601.
- Theil, F. (1997). *Enzyme in der Organischen Synthese*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Tombo, G. M. R. und Bellus, D. (1991). "Chirality and Crop Protection." *Angew. Chem.-Int. Edit. Engl.*, **30**, 1193-1215.
- Toone, E. J. und Jones, J. B. (1987). "Enzymes in Organic-Synthesis 40. Evaluation of the Enantioselectivity of the Pig-Liver Esterase Catalyzed Hydrolyses of Racemic Piperidine Carboxylic-Acid Esters." *Can. J. Chem.-Rev. Can. Chim.*, **65**, 2722-2726.
- Toy, P. H., Dhanabalasingam, B., Newcomb, M., Hanna, I. H. und Hollenberg, P. F. (1997). "A substituted hypersensitive radical probe for enzyme-catalyzed hydroxylations: Synthesis of racemic and enantiomerically enriched forms and application in a cytochrome P450-catalyzed oxidation." *J. Org. Chem.*, **62**, 9114-9122.

- Tsuji, T., Onishi, T. und Sakata, K. (1999). "Lipase-catalyzed synthesis of a tri-substituted cyclopropyl chiral synthon: a practical method for preparation of chiral 1-alkoxycarbonyl-2-oxo-3-oxabicyclo[3.1.0]hexane." *Tetrahedron: Asymmetry*, **10**, 3819-3825.
- Ueji, S., Fujino, R., Okubo, N., Miyazawa, T., Kurita, S., Kitadani, M. und Muromatsu, A. (1992). "Solvent-Induced Inversion of Enantioselectivity in Lipase-Catalyzed Esterification of 2 Phenoxypropionic Acids." *Biotechnol. Lett.*, **14**, 163-168.
- Uppenberg, J., Hansen, M. T., Patkar, S. und Jones, T. A. (1994). "The Sequence, Crystal-Structure Determination and Refinement of 2 Crystal Forms of Lipase-B From *Candida antarctica* (Vol 2, Pg 293, 1994)." *Structure*, **2**, 453-454.
- Uppenberg, J., Hansen, M. T., Patkar, S. und Jones, T. A. (1994). "Sequence, Crystal-Structure Determination and Refinement of 2 Crystal Forms of Lipase-B From *Candida antarctica*." *Structure*, **2**, 293-308.
- Uppenberg, J., Oehrner, N., Norin, M., Hult, K., Kleywegt, G. J., Patkar, S., Waagen, V., Anthonsen, T. und Jones, T. A. (1995). "Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols." *Biochemistry*, **34**, 16838-16851.
- Vecchiotti, V., Giordani, A., Giardina, G., Colle, R. und Clarke, G. D. (1991). "(2S)-1-(Arylacetyl)-2-(Aminomethyl)Piperidine Derivatives - Novel, Highly Selective κ -Opioid Analgesics." *J. Med. Chem.*, **34**, 397-403.
- Vielhauer, O. (1997). "Kinetische, enzymatische Racematspaltungen zur Darstellung von enantiomerenreinen Allenen und β -Aminosäuren." *Diplomarbeit*, Universität Stuttgart, Stuttgart.
- Voigt, J., Noltemeyr, M. und Reiser, O. (1997). "An efficient synthesis of conformationally restricted peptides containing β -aminocyclopropane-carboxylic acids." *Synlett*, 202-204.
- Walser, P., Renold, P., Ngoka, V., Hosseinzadeh, F. und Tamm, C. (1991). "Stereoselective Hydrolysis of Substituted Cyclopropanedicarboxylates With Pig-Liver Esterase." *Helv. Chim. Acta*, **74**, 1941-1952.
- Wandrey, C., Liese, A. und Kihumbu, D. (2000). "Industrial biocatalysis: Past, present, and future." *Org. Process Res. Dev.*, **4**, 286-290.
- Waniek, T. (2000). "Untersuchungen zur Substratspezifität und Enantioselectivität mikrobieller Hydantoinasen." *Dissertation*, Universität Stuttgart, Stuttgart.
- Wescott, C. R., Noritomi, H. und Klivanov, A. M. (1996). "Rational control of enzymatic enantioselectivity through solvation thermodynamics." *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 10365-10370.
- Wichmann, R., Wandrey, C., Buckmann, A. F. und Kula, M. R. (1981). "Continuous enzymatic transformation in an enzyme membrane reactor with simultaneous NAD(H) regeneration." *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 2789-2802.
- Wickwire, B. M., Harris, C. M., Harris, T. M. und Broquist, H. P. (1990). "Pipelicolic Acid Biosynthesis in *Rhizoctonia-Leguminicola* 1. the Lysine, Saccharopine, Δ^1 -Piperideine-6-Carboxylic Acid Pathway." *J. Biol. Chem.*, **265**, 14742-14747.

- Wickwire, B. M., Wagner, C. und Broquist, H. P. (1990). "Pipicolic Acid Biosynthesis in *Rhizoctonia-Leguminicola* 2. Saccharopine Oxidase - a Unique Flavin Enzyme Involved in Pipicolic Acid Biosynthesis." *J. Biol. Chem.*, **265**, 14748-14753.
- Wong, C. H. und Whitesides, G. M. (1994). *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*. Pergamon Press, Oxford.
- Yadav, J. S., Rao, A. B., Reddy, Y. R. und Reddy, K. V. R. (1997). "Enzymatic resolution of (+/-)-*cis*-3-(2,2-dichloro-3,3,3-trifluoropropyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylate." *Tetrahedron: Asymmetry*, **8**, 2291-2294.
- Yamada, H., Ohsawa, S., Sugai, T. und Ohta, H. (1989). "Lipase-Catalyzed Highly Enantioselective Macrolactonization of Hydroxyacid Esters in an Organic-Solvent." *Chem. Lett.*, 1775-1776.
- Yamazaki, Y. und Hosono, K. (1988). "Stereoselectivity of horse liver alcohol dehydrogenase catalyzed oxidoreduction of an organometallic meso diol and the corresponding dialdehyde." *Tetrahedron Lett.*, **29**, 5769-5770.
- Zabriskie, T. M., Kelly, W. L. und Liang, X. (1997). "Stereochemical course of the oxidation of L-pipicolic acid by the flavoenzyme L-pipicolate oxidase." *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 6446-6447.
- Zelinski, T. und Kula, M. R. (1997). "Asymmetric enzymatic reduction of lipophilic ketones in aqueous solution containing cyclodextrins." *Biocatal. Biotransform.*, **15**, 57-74.

Hiermit erkläre ich, daß die vorliegende Arbeit von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel durchgeführt und verfaßt wurde.

(Oliver Vielhauer)