

Enzymatische Kohlenstoff-Kohlenstoff-Verknüpfungen

F. Effenberger, V. Null, A. Straub

Institut für Organische Chemie, Stuttgart

Zusammenfassung

Für Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) konnte eine einfache chemische Synthese entwickelt werden, die eine technische Anwendung von mit Kaninchenmuskel-Aldolase (RAMA) katalysierte Aldolreaktionen ermöglicht. So konnten u. a. auf diesem Wege die wichtigen Glycosidase-Inhibitoren 1-Desoxymannojirimycin (5) und 1-Desoxynojirimycin (6) in präparativen Mengen auf einfache Weise erhalten werden. Hefe-Transketolase (Hefe TK) wurde ergänzend zu RAMA für stereoselektive C-C-Knüpfungen eingesetzt. Neben der Synthese der wichtigen Glycosidase-Inhibitoren 1,4-Didesoxy-1,4-imino-D-arabinitol (12) und Fagomin (13) konnte darüber hinaus mittels Hefe TK-Katalyse ein neuer Zugang zu L-2-Hydroxyaldehyden erschlossen werden. Für präparative Anwendungen ist die neu aufgefundene *Staphylococcus Carnosus*-Aldolase (SCA) wegen ihrer größeren Stabilität und der einfacheren Zugänglichkeit als Katalysator für stereoselektive Aldolreaktionen besser geeignet als Kaninchenmuskel-Aldolase (RAMA).

Summary

A simple chemical synthesis for dihydroxyacetone phosphate (DHAP) has been developed which allows the technical application of rabbit muscle aldolase (RAMA) catalyzed aldol additions. So, the important glycosidase inhibitors 1-deoxymannojirimycin (5) and 1-deoxynojirimycin (6) became easily available in preparative amounts. Complementary to RAMA also the yeast transketolase (yeast TK) was investigated and applied for the stereoselective C-C coupling. In addition to the synthesis of the glycosidase inhibitors 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol (12) and fagomine (13) a new synthetic route for the preparation of L-2-hydroxyaldehydes L-2 has been developed. Due to the greater stability and the easier access of *Staphylococcus carnosus* aldolase (SCA) in comparison to RAMA, SCA is the more usable catalyst for stereoselective preparative aldol additions.

Résumé

Pour le dihydroxyacétonphosphate (DHAP), il a été possible de développer une synthèse chimique simple qui permet d'obtenir une application technique des réactions aldoliques catalysées à l'aldolase de muscles de lapin (RAMA). C'est ainsi qu'il a été entre autres possible de cette manière d'obtenir de manière aisée les importants inhibiteurs glycosidase 1-déoxymannojirimycine (5) et 1-déoxynojirimycine (6) dans des quantités de préparation. La transcétolase de levure (levure TK) a été utilisée en complément à la RAMA pour des combinaisons C-C stéréosélectives. Outre la synthèse des inhibiteurs glycosidase importants 1,4-didésoxy-1,4-imino-D-arabinitol (12) et fagomine (13), un nouvel accès aux L-2-hydrxal-déhydes a en outre pu être ouvert au moyen de la levure de catalyse TK. Pour des utilisations de préparations, l'aldolase *Staphylococcus carnosus* (SCA) nouvellement découverte se prête mieux, du fait de sa plus grande stabilité et de son accessibilité plus aisée, en tant que catalyseur pour des réactions aldoliques stéréosélectives que l'aldolase des muscles du lapin (RAMA).

Im ersten Antrag auf Gewährung einer Sachbeihilfe im Rahmen des DFG-Schwerpunktprogramms "Wege zu neuen Produkten und Verfahren in der Biotechnologie", vom 7. April 1986, wurde von uns die Untersuchung von vier Enzym-katalysierten Reaktionstypen vorgeschlagen:

- 1) Aldolase-katalysierte Reaktionen
- 2) Enzym-katalysierte Cyanhydrin-Reaktionen
- 3) Enzym-katalysierte Additionen an α, β -ungesättigte Carbonsäurederivate
- 4) Enzym-katalysierte Reaktionen mit N-Acetyl-dehydro- α -amino-säuren

Von den Gutachtern wurde die Empfehlung ausgesprochen, die Enzym-katalysierte Cyanhydrin-Reaktion nicht im Rahmen dieses DFG-Schwerpunktes zu bearbeiten.

Von Enzym-katalysierten Additionen an α, β -ungesättigte Carbonsäurederivate wurden im Rahmen einer Dissertation die durch β -Methylaspartase (EC 4.3.1.2) und Mesaconase (EC 4.2.1.34) katalysierte enantioselektive Addition von Ammoniak bzw. Wasser an α -substituierte Fumarsäuren untersucht/1/. Über die aus der Literatur bekannten Befunde/2/ hinaus konnte das Substratspektrum für die β -Methylaspartase erweitert werden. Es konnte weiter gezeigt werden, daß die Verwendung der isolierten und hochgereinigten β -Methylaspartase gegenüber der Verwendung der immobilisierten Zellen von Clostridium tetanomorphum ATCC 15 920 keine Vorteile ergibt/1/. Unter anaeroben Bedingungen katalysiert C. tetanomorphum nicht mehr die NH_3 -Addition sondern zeigt ausschließlich Mesaconase-Aktivität, was wegen der Instabilität des reinen Enzyms Mesaconase für die praktische Anwendung von Interesse ist/1/. Da diese Reaktionen im eigentlichen Sinne nicht den C-C-Knüpfungsreaktionen zuzuordnen sind, wurden sie im Rahmen dieses Schwerpunktes nicht weiter verfolgt.

Enzym-katalysierte Reaktionen mit N-Acetyl-dehydro- α -amino-säuren, für die wir eine einfache Darstellungsmethode entwickelt hatten/3/, wurden im Rahmen dieses Schwerpunktes von M.R. Kula et al. bearbeitet/4/, wobei wir lediglich die Ausgangsverbindungen zur Verfügung stellten.

Unsere Arbeiten im Förderungszeitraum des DFG-Schwerpunktes "Wege zu neuen Produkten und Verfahren in der Biotechnologie" in der Zeit von 1987 bis 1992 konzentrierten sich deshalb hauptsächlich auf das im Erstantrag unter 1) angeführte Thema "Aldolase-Reaktionen", wobei im Verlaufe der Untersuchungen noch eine Erweiterung auf Transketolase-

Reaktionen vorgenommen wurde. Der vorliegende Ergebnisbericht bezieht sich ausschließlich auf diese Arbeiten, wobei auf die schon publizierten Ergebnisse nur kurz und summarisch eingegangen werden soll.

Bei der Konzeption des Forschungsvorhabens mit den anderen beteiligten Arbeitsgruppen bestand Einverständnis darüber, daß die Anwendung von Enzymen in der Synthese einmal im Hinblick auf die Darstellung präparativer Mengen interessant erscheinender Verbindungen ausgerichtet sein sollte und zum zweiten insbesondere die Kombination enzymatischer und chemischer Teilschritte bei Synthesen angestrebt werden sollte. Dieses Konzept konnte bezüglich beider Zielvorgaben zufriedenstellend realisiert werden.

1 Aldolase-katalysierte Reaktionen

1.1 Darstellung von Dihydroxyacetonphosphat

Wie ausführliche Untersuchungen von G.M. Whitesides, C.H. Wong et al. gezeigt haben/5/, ist die für die Anwendung in der Synthese wichtige Kaninchenmuskel Aldolase (RAMA) (EC 4.1.2.13) sehr spezifisch bezüglich des Substrates Dihydroxyacetonphosphat (DHAP), während der für das DHAP natürliche Reaktionspartner, Glycerinaldehyd-3-phosphat, durch eine Vielzahl anderer Aldehyde ersetzt werden kann, was das vielseitige Synthesepotential RAMA-katalysierter Reaktionen ausmacht.

Bei den meisten in der Literatur beschriebenen Aldolase-Reaktionen wird DHAP aus Fructose-1,6-diphosphat enzymatisch in situ hergestellt und dann weiter umgesetzt. Die Nacharbeitung von Literaturangaben über erfolgreiche, direkte Phosphorylierungen von Dihydroxyaceton konnten wir nicht bestätigen/6a/. Für eine synthetische Anwendung RAMA-katalysierter Reaktionen war deshalb die Entwicklung eines einfachen und billigen Zugangs zum DHAP Voraussetzung.

A. Straub konnte, ausgehend von in technischen Mengen verfügbarem Dihydroxyaceton, eine selektive Phosphorylierungsmethode entwickeln, bei der das DHAP als Bariumsalz in hochreiner Form anfällt und das bei Raumtemperatur beliebig lange haltbar ist. Das in wässriger Lösung nur begrenzt stabile DHAP kann aus dem Bariumsalz über einen sauren Ionenaustauscher einfach und in beliebigen Mengen erhalten werden/6/. Damit war eine wichtige Basis für die praktische Anwendung RAMA-katalysierter Reaktionen in der Synthese geschaffen worden, die von Ch.

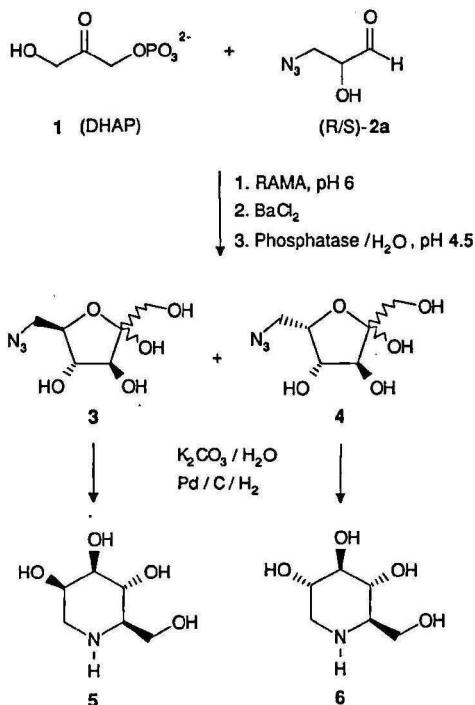
Wandrey et al./7/ verfahrenstechnisch weiter untersucht und für technische Anwendungen ausgebaut wurde.

Umfangreiche Untersuchungen, durch Immobilisierung oder durch chemische Modifizierung die Stabilität der Kaninchenmuskel-Aldolase zu erhöhen, um damit ihre praktische Anwendung zu verbessern, waren nur zum Teil erfolgreich/8/.

1.2 Stereoselektive Darstellung von Aza- und Thiozuckern

Neben Untersuchungen zur Erweiterung des Substratspektrums RAMA-katalysierter Reaktionen/6,8/ haben wir uns vor allem mit der Anwendung dieser Reaktion zur Darstellung der wichtigen Glycosidase-Inhibitoren 1-Desoxymannojirimycin (5) und 1-Desoxynojirimycin (6) beschäftigt.

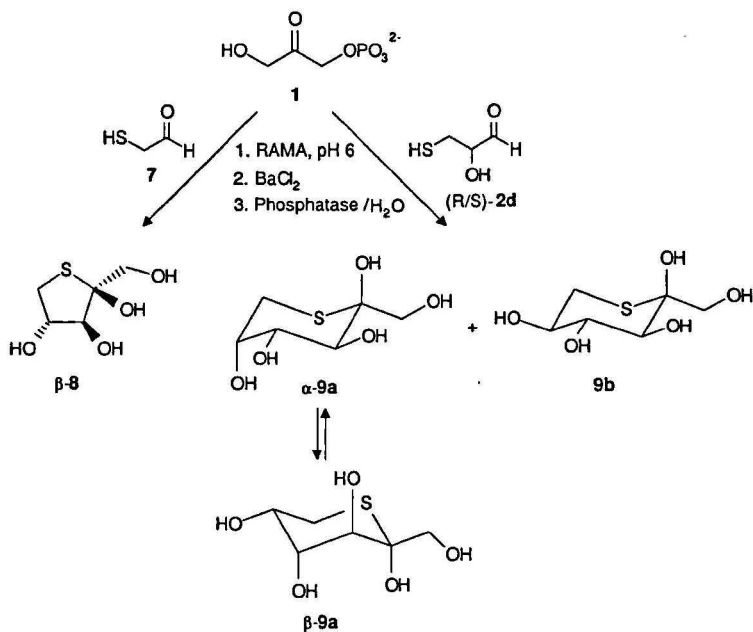
Schema 1



Auf dem in Schema 1 zusammengefaßten Weg konnten die gewünschten Verbindungen 5 und 6 in sehr guten Gesamtausbeuten erhalten werden, wobei auch in Laboransätzen 15 bis 20 g der Endprodukte ohne Schwierigkeiten zu erhalten sind/9/.

Diese Synthese, die ausgehend von einfach zugänglichen achiralen Ausgangsverbindungen über eine Enzym-katalysierte C-C-Knüpfung, anschließende Säulentrennung der entphosphorylierten Zwischenprodukte 3 bzw. 4 und deren Hydrierung zu den biologisch aktiven Verbindungen 5 bzw. 6 mit jeweils vier Chiralitätszentren führt, ist wesentlich einfacher und weniger aufwendig als die sehr breit untersuchten Synthesen dieser Verbindungen, ausgehend von entsprechenden Aldohexosen, obwohl diese schon fast alle erforderlichen Chiralitäten aufweisen. Darüber hinaus sind auf dem von uns beschriebenen Weg in einfacher Weise auch Strukturvarianten von 5 und 6, für die keine natürlichen Aldohexosen zur Verfügung stehen, zugänglich/8/.

Schema 2



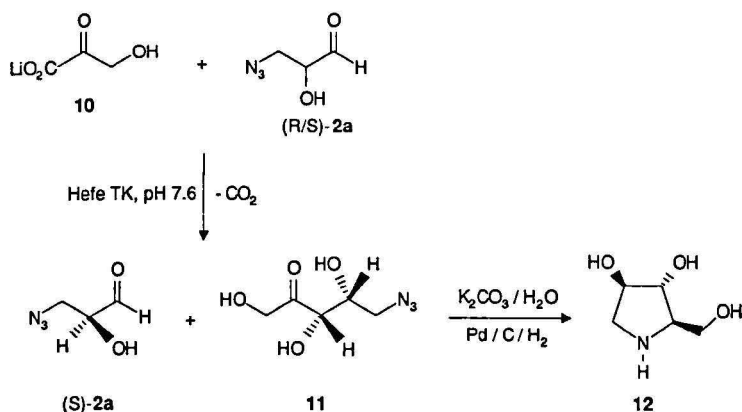
In analoger Weise wie die Aza-Zucker 5 und 6 konnten wir auch Thiozucker, die bisher wenig untersucht wurden, über RAMA-katalysierte Reaktionen darstellen/10/. So erhielten wir ausgehend von Thioacetaldehyd (7) mit DHAP 5-Thio-pentulofuranose (8), die als Anomerengemisch zu 83% in der β -Form vorliegt (Schema 2). Mit racemischem 3-Mercapto-2-hydroxypropanal [(R/S)-2d] und DHAP konnten wir auf vergleichbare Weise 6-Thio-D-arabino-2-hexulopyranose (9a) und 6-Thio-L-xylo-2-hexulopyranose (9b) darstellen/10/. Während 9a als Anomerengemisch zu 85% in der β -Form und zu 15% in der α -Form vorliegt/10,11/, konnten wir für 9b NMR-spektroskopisch nur ein Anomer nachweisen (Schema 2).

2 Anwendung der Hefe-Transketolase in der Synthese

Eine der wirksamsten Glycosidase-Inhibitoren ist 1,4-Didesoxy-1,4-imino-D-arabinitol (12). Unsere Versuche, dieses interessante Pyrrolidin-derivat über eine Aldolase-Reaktion mit DHAP darzustellen, scheiterte an der Instabilität des für die Synthese notwendigen Azido-acetaldehyds. Diese Schwierigkeit konnte durch Anwendung von Hefe-Transketolase (EC 2.2.1.1), die die stereospezifische C-C-Verknüpfung von Lithium-hydroxypyruvat mit α -Hydroxyaldehyden katalysiert/12/, umgangen werden.

Im Schema 3 ist die Darstellung des gewünschten Glycosidase-Inhibitors 12 ausgehend von racemischem 3-Azido-2-hydroxypropanal [(R/S)-2a] zusammengefaßt/9a/.

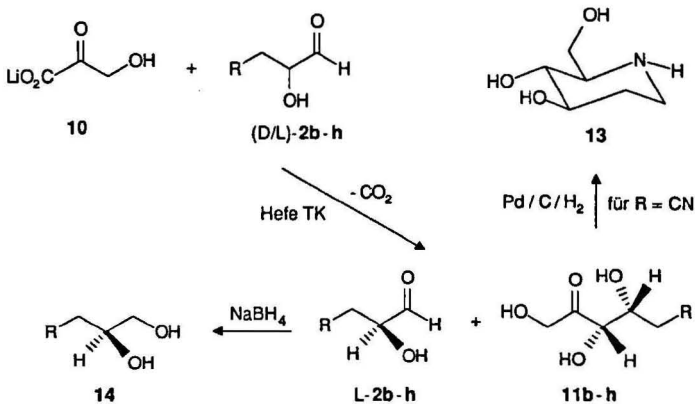
Schema 3



Die Konfigurationen der bei der C-C-Knüpfung mit Hefe Transketolase neu gebildeten Chiralitätszentren entsprechen mit der 3*S* bzw. 4*R*-Konfiguration den Konfigurationen der mit RAMA-katalysierten C-C-Verknüpfungen. Ein Unterschied beider Reaktionen besteht jedoch darin, daß es bei der mit Transketolase-katalysierten Umsetzung racemischer α -Hydroxyaldehyde mit Lithium-hydroxypyruvat zu einer kinetischen Racematspaltung der α -Hydroxyaldehyde kommt.

Neben der Darstellung neuer Ketosen haben wir diese Reaktion deshalb auch zur Gewinnung von für weitere Synthesen interessante L- α -Hydroxyaldehyde mit unterschiedlichen Substituenten in β -Stellung genutzt (Schema 4)/13/. So konnten wir die Hydroxyaldehyde L-2b,c,e-h in Ausbeuten zwischen 50 bis 78% isolieren, wobei die optischen Ausbeuten zwischen 96 und 99%ee lagen. Lediglich der Mercaptoaldehyd L-2d konnte aus der wässrigen Reaktionslösung nicht in Substanz isoliert werden. Durch Umsetzung des Reaktionsgemisches mit DHAP in Gegenwart von RAMA zu 9b konnten wir jedoch indirekt beweisen, daß er in vergleichbarer optischer und chemischer Ausbeute bei der Hefe-Transketolase-katalysierten Umsetzung gebildet worden war/10/.

Schema 4



2,11	b	c	d	e	f	g	h
R	PhCH ₂ O	CH ₃ O	HS	EtS	F	CH ₃	CN

Ausgehend von 2-Desoxy-L-threo-5-hexuloseonitril (11h) haben wir durch katalytische Hydrierung in essigsaurer Lösung den Isomaltase-Inhibitor Fagomin (1,2,5-Tridesoxy-1,5-imino-D-arabino-hexitol) (13) in einer Gesamtausbeute von 57% darstellen können (Schema 4)/14/. Die α -Hydroxyaldehyde L-2 lassen sich mit Natriumborhydrid racemisierungsfrei zu den ebenfalls für weitere synthetische Anwendungen interessanten optisch aktiven 1,2-Diolen 14 umsetzen, wie wir an einigen Beispielen zeigen konnten/15/.

3 Reaktionen mit Staphylococcus Carnosus-Aldolase (SCA)

Wie oben ausgeführt, ist es uns trotz intensiver Bemühungen nicht gelungen, die Stabilität der Kaninchenmuskel-Aldolase entscheidend zu verbessern. Im Arbeitskreis von M.R. Kula konnte jedoch aus dem thermophilen Bakterienstamm Staphylococcus Carnosus eine Aldolase (SCA) isoliert werden, die thermisch stabiler als RAMA ist, und die eine deutlich kleinere Desaktivierung bei der Katalyse von Aldolreaktionen als RAMA aufweist/16/.

Am Beispiel der Reaktion von 3-Azido-2-hydroxypropanal (2a) mit DHAP (1) zu den Azidoketosen 3 bzw. 4 (Schema 1) haben wir das "Synthesepotential" der beiden Aldolasen RAMA und SCA vergleichend untersucht/15/. Die genaue Verfolgung und Optimierung der Reaktionen erfolgte gaschromatographisch nach Derivatisierung der 4 möglichen Stereoisomeren (jeweils zwei Anomere von 3 bzw. 4) zu den Tetrakis(trimethylsilyl)-Derivaten.

Hinsichtlich des Temperaturoptimums hätte man sich bei der thermostabilen SCA Vorteile gegenüber von RAMA, durch bezüglich des Enzyms mögliche höhere Reaktionstemperaturen, erhoffen können. Die Untersuchungen zeigten jedoch, daß auch für Reaktionen der SCA das Temperaturoptimum bei 25°C liegt/15/. Die Optimierung der Eduktkonzentrationen ergab, daß Konzentrationen größer 100 mM zu den höchsten Ausbeuten führen. Bei der Variation der Enzymmenge konnte bis 15 Units pro mmol Aldehyd eine Steigerung der Ausbeute festgestellt werden, während eine weitere Erhöhung der Enzymmenge keinen Einfluß mehr auf die Ausbeute hatte.

Zum direkten Vergleich der beiden Aldolasen RAMA und SCA, im Hinblick auf ihre Anwendungen in der Synthese, haben wir ihre K_m - und v_{max} -Werte in der bekannten Weise als Ein-Substrat-Reaktion nach Lineweaver und Burk ermittelt/17/ und auf diese Weise folgende Werte erhalten:

RAMA: $K_m = 1.6 \text{ mM}$, $v_{\max} = 32 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$, Turnover = 21 s^{-1}

SCA: $K_m = 5.1 \text{ mM}$, $v_{\max} = 35 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$, Turnover = 19 s^{-1}

Die v_{\max} -Werte und Turnover sind für beide Enzyme vergleichbar, während sich aus den K_m -Werten 2a für RAMA als deutlich besseres Substrat herausstellte als für SCA.

Der direkte Vergleich der Umsetzungen von 2a mit DHAP in präparativen Mengen ergab, daß die Reaktionsgeschwindigkeiten mit beiden Enzymen nahezu identisch sind und die Reaktion unter optimierten Bedingungen nach ca. 7 Stunden beendet ist. Als ein entscheidender Vorteil der SCA gegenüber von RAMA bei diesen Reaktionen kann jedoch ihre deutlich größere Stabilität angesehen werden. Während die Aktivität der SCA nach 2.5 Stunden nur um 10% abgenommen hat und dann weitgehend konstant bleibt, wird für RAMA nach 2.5 Stunden nur noch 60% und nach 24 Stunden nur noch 25% der Ausgangsaktivität gefunden.

Die deutlich größere Stabilität und ihre relativ leichte Zugänglichkeit/16/ ergibt für die bakterielle Aldolase SCA gegenüber der Kaninchenmuskel-Aldolase (RAMA) somit zweifellos Vorteile in der praktischen Anwendung.

Die Zusammenarbeit im DFG-Schwerpunktprogramm "Wege zu neuen Produkten und Verfahren in der Biotechnologie" war besonders eng und intensiv mit den Arbeitsgruppen von M.R. Kula und Ch. Wandrey, worauf in dem Bericht durch Angabe der entsprechenden Literaturzitate hingewiesen wurde. Diese für alle Seiten vorteilhafte Zusammenarbeit wird auch nach Abschluß des Programms seine Fortsetzung finden. Neben der direkten Zusammenarbeit mit den beiden genannten Arbeitskreisen waren jedoch auch die Diskussionen mit anderen Gruppen, zu denen über dieses Programm wissenschaftliche Beziehungen aufgebaut werden konnten, für die Weiterführung unserer Arbeiten außerordentlich nützlich.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft hat uns durch dieses Schwerpunktprogramm eine entscheidende Hilfe in der Weiterführung unserer Untersuchungen zur Anwendung von Enzymen in der organischen Synthese gegeben, wofür ich ihr auch im Namen der Mitarbeiter meinen herzlichen Dank ausspreche.

4 Literatur

/1a/ M. Schwarm: Dissertation, Univ. Stuttgart, 1990

/1b/ F. Effenberger, M. Schwarm: Proceedings in "Biochemical Engineering Stuttgart", Gustav Fischer-Verlag, Stuttgart, 1991, S. 137

RAMA: $K_m = 1.6 \text{ mM}$, $v_{\max} = 32 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$, Turnover = 21 s^{-1}

SCA: $K_m = 5.1 \text{ mM}$, $v_{\max} = 35 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$, Turnover = 19 s^{-1}

Die v_{\max} -Werte und Turnover sind für beide Enzyme vergleichbar, während sich aus den K_m -Werten 2a für RAMA als deutlich besseres Substrat herausstellte als für SCA.

Der direkte Vergleich der Umsetzungen von 2a mit DHAP in präparativen Mengen ergab, daß die Reaktionsgeschwindigkeiten mit beiden Enzymen nahezu identisch sind und die Reaktion unter optimierten Bedingungen nach ca. 7 Stunden beendet ist. Als ein entscheidender Vorteil der SCA gegenüber von RAMA bei diesen Reaktionen kann jedoch ihre deutlich größere Stabilität angesehen werden. Während die Aktivität der SCA nach 2.5 Stunden nur um 10% abgenommen hat und dann weitgehend konstant bleibt, wird für RAMA nach 2.5 Stunden nur noch 60% und nach 24 Stunden nur noch 25% der Ausgangsaktivität gefunden.

Die deutlich größere Stabilität und ihre relativ leichte Zugänglichkeit/16/ ergibt für die bakterielle Aldolase SCA gegenüber der Kaninchenmuskel-Aldolase (RAMA) somit zweifellos Vorteile in der praktischen Anwendung.

Die Zusammenarbeit im DFG-Schwerpunktprogramm "Wege zu neuen Produkten und Verfahren in der Biotechnologie" war besonders eng und intensiv mit den Arbeitsgruppen von M.R. Kula und Ch. Wandrey, worauf in dem Bericht durch Angabe der entsprechenden Literaturzitate hingewiesen wurde. Diese für alle Seiten vorteilhafte Zusammenarbeit wird auch nach Abschluß des Programms seine Fortsetzung finden. Neben der direkten Zusammenarbeit mit den beiden genannten Arbeitskreisen waren jedoch auch die Diskussionen mit anderen Gruppen, zu denen über dieses Programm wissenschaftliche Beziehungen aufgebaut werden konnten, für die Weiterführung unserer Arbeiten außerordentlich nützlich.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft hat uns durch dieses Schwerpunktprogramm eine entscheidende Hilfe in der Weiterführung unserer Untersuchungen zur Anwendung von Enzymen in der organischen Synthese gegeben, wofür ich ihr auch im Namen der Mitarbeiter meinen herzlichen Dank ausspreche.

4 Literatur

/1a/ M. Schwarm: Dissertation, Univ. Stuttgart, 1990

/1b/ F. Effenberger, M. Schwarm: Proceedings in "Biochemical Engineering Stuttgart", Gustav Fischer-Verlag, Stuttgart, 1991, S. 137

- /2/ M. Akhtar, N.P. Botting, M.A. Cohen, D. Gani: Tetrahedron 43 (1987), 5899
- /3/ F. Effenberger, T. Beisswenger: Chem. Ber. 117 (1984), 1497
- /4/ M. Kittelmann, M.R. Kula: J. Ferment. Bioeng. 73 (1992), 99
- /5/ G.M. Whitesides, C.-H. Wong: Angew. Chem. 97 (1985), 617 (Zusammenfassung mit weiteren Literaturhinweisen)
- /6a/ A. Straub: Diplomarbeit, Univ. Stuttgart, 1986
- /6b/ F. Effenberger, A. Straub: Tetrahedron Lett. 28 (1987), 1641
- /7/ B. Bossow-Berke: Dissertation, Univ. Bonn, 1989
- /8/ A. Straub: Dissertation, Univ. Stuttgart, 1989
- /9a/ T. Ziegler, A. Straub, F. Effenberger: Angew. Chem. 100 (1988), 737
- /9b/ A. Straub, F. Effenberger, P. Fischer: J. Org. Chem. 55 (1990), 3926
- /10/ F. Effenberger, A. Straub, V. Null: Liebigs Ann. Chem., Publ. akzeptiert
- /11/ M. Chmielewski, R.L. Whistler: Carbohydr. Res. 69 (1979), 259
- /12/ P. Srere, J.R. Cooper, M. Tabachnick, E. Racker: Arch. Biochem. Biophys. 74 (1958), 295
- /13/ F. Effenberger, V. Null, T. Ziegler: Tetrahedron Lett. 33 (1992), 5157
- /14/ F. Effenberger, V. Null: Liebigs Ann. Chem., Publ. akzeptiert
- /15/ V. Null: Dissertation, Univ. Stuttgart, 1992
- /16a/ H.P. Brockamp, M.R. Kula: Appl. Microbiol. Biotechnol. 34 (1990), 287
- /16b/ H. Waldmann: Nachr. Chem. Tech. Lab. 39 (1991), 1408
- /17/ H. Bisswanger: Theorie und Methoden der Enzymkinetik, VCH, Weinheim, 1979, S. 55